

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGRÓNOMICA**



**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

“Caracterización morfológica, patogénica y molecular del agente causal  
de la roya blanca en girasol (*Helianthus annuus* L.)”

DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN  
COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
INGENIERA AGRÓNOMA

**AUTORA**

ANA GABRIELA TAMAYO MORALES

**TUTOR**

Ing. Rita Santana Mayorga M. Mg.

**CEVALLOS- ECUADOR**

**2023**

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“La suscrita, TAMAYO MORALES ANA GABRIELA, portadora de la cédula de identidad número: 1804451332 libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de Investigación titulado: **“Caracterización morfológica, patogénica y molecular del agente causal de la roya blanca en girasol (*Helianthus annuus* L.)”** es original, autentico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas”.



.....

**TAMAYO MORALES ANA GABRIELA**

## DERECHOS DE AUTOR

“Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado **“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, PATOGENICA Y MOLECULAR DEL AGENTE CAUSAL DE LA ROYA BLANCA EN GIRASOL (*Helianthus annuus L.*)”**, como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Ingeniero Agrónomo, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice copia de este informe final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él”.



.....  
**TAMAYO MORALES ANA GABRIELA**

**“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, PATOGENICA Y MOLECULAR DEL AGENTE CAUSAL DE LA ROYA BLANCA EN GIRASOL (*Helianthus annuus* L.)”.**

**REVISADO POR:**

-----  
**Ing. Rita Santana Mayorga M. Mg.**  
**TUTOR**

**APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN:**

	<b>FECHA</b>
----- <b>PhD. PATRICIO NÚÑEZ</b> <b>PRESIDENTE DEL TRIBUNAL</b>	<b>16/03/2023</b> -----
----- <b>Ing. Mg. JORGE DOBRONSKI</b> <b>MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN</b>	<b>16/03/2023</b> -----
----- <b>Ing. Mg. SEGUNDO CURAY</b> <b>MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN</b>	<b>16/03/2023</b> -----

## **DEDICATORIA**

La presente investigación está dedicado a Dios quien me ha bendecido todos los días otorgándome fortaleza y sabiduría para poder cumplir cada uno de mis objetivos.

A mi madre Rebeca que me enseñó a luchar y trabajar fuerte para lograr cumplir cada uno de mis sueños, por la paciencia, educación y sobre todo por todo el amor que me brindo para hacer de mí una persona responsable, capaz y honesta, a pesar que ya no esté a mi lado este logro va para ella en el cielo.

A mi padre Wilson y a mi hermana Mayra que han estado a mi lado con sus consejos y apoyándome en este largo camino, enseñándome que con perseverancia todos los sueños se cumplen.

A Bryan que siempre está brindándome su apoyo incondicional, por alentarme e impulsarme día tras día a culminar este objetivo y a mi hija Sophia por ser el pilar fundamental de mi vida.

A todos mis profesores por haberme compartido sus conocimientos y a mis amigas por brindarme su amistad en todos mis años de formación.

## **AGRADECIMIENTO**

Mi agradecimiento eterno a mí querida Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato por haberme dado las herramientas necesarias para formarme como una gran profesional.

A mi tutor Ing. Rita Santana por brindarme su apoyo incondicional en la ejecución de esta investigación.

A cada uno de los maestros de la Facultad de Ciencias Agropecuarias que con sus enseñanzas y sabios consejos me ayudaron alcanzar este título.

**Ana Gabriela Tamayo Morales**

## ÍNDICE

Introducción.....	1
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>3</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>3</b>
1.1 Antecedentes Investigativos.....	3
1.2 Categorías Fundamentales o Marco Conceptual.....	5
1.2.1 Cultivo de girasol ( <i>H. annuus</i> ).....	5
1.2.1.1 Historia.....	5
1.2.1.2 Generalidades .....	5
1.2.1.3 Clasificación taxonómica.....	5
1.2.1.4 Descripción botánica.....	6
1.2.1.5 Requerimientos edafoclimáticos .....	7
1.2.1.6 Etapas fenológicas.....	7
1.2.1.7 Plagas y Enfermedades .....	8
1.2.1.8 Variedades utilizadas .....	10
1.2.2 La roya blanca ( <i>P. helianthicola</i> ) en girasol .....	11
1.2.2.1 Taxonomía.....	11
1.2.2.2 Signos y síntomas.....	12
1.2.2.3 Epidemiología .....	12
1.2.3 Técnicas moleculares .....	13
1.2.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	13
1.2.3.2 Cebadores específicos de <i>P. helianthicola</i> .....	13
1.3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	14
1.3.1 Hipótesis.....	14

1.3.2 Objetivos .....	14
<b>CAPÍTULO II</b> .....	16
<b>METODOLOGÍA</b> .....	16
2.1 Ubicación del experimento .....	16
2.2 Características del lugar .....	16
2.3 Equipos y materiales .....	16
2.3.1 Equipos.....	16
2.3.2 Materiales.....	17
2.3.3 Reactivos .....	18
2.4 Análisis estadístico.....	18
2.5 Diseño experimental .....	18
2.6 Manejo del experimento .....	18
2.6.1 Objetivo 1. Caracterizar los síntomas y signos de la roya blanca en <i>H. annuus</i> ..	19
2.6.2 Objetivo 2. Caracterizar la morfología de pústulas, hifas, esporangios, oosporas y zoosporas de la roya blanca.....	20
2.6.3 Objetivo 3. Inocular hojas sanas de diferentes variedades de <i>H. annuus</i> con suspensiones de esporas obtenidas a partir de pústulas de roya blanca .....	21
2.6.4 Objetivos 4. Detectar fragmentos amplificados mediante PCR del gen COX2 (citocromo C oxidasa) HelF3/R2 específico para roya blanca en <i>H. annuus</i> .....	22
2.7 Variables respuesta .....	26
<b>CAPÍTULO III</b> .....	27
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	27
3.1 Caracterización de los síntomas y signos de la roya blanca en <i>H. annuus</i> .....	27
3.2 Caracterización morfológica de pústulas, hifas, esporangios, oosporas y zoosporas de la roya blanca .....	29

3.3 Inoculación de hojas sanas de diferentes variedades de <i>H. annuus</i> con suspensiones de esporas obtenidas a partir de pústulas de roya blanca .....	32
3.4 Detección de fragmentos amplificados mediante PCR del gen COX2 (citocromo C oxidasa) HelF3/R2 específico para roya blanca en <i>H. annuus</i> .....	36
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	38
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	38
4.1 CONCLUSIONES .....	38
4.2 RECOMENDACIONES .....	39
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	40
<b>ANEXOS</b> .....	46

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla N°1.</b> Clasificación taxonómica del girasol .....	6
<b>Tabla N°2.</b> Etapas fenológicas del girasol.....	7
<b>Tabla N°3.</b> Taxonomía de <i>P. Helianthicola</i> .....	12
<b>Tabla N°4</b> Cebadores específicos con su secuencia correspondiente utilizados en este estudio.....	23
<b>Tabla N°5.</b> Condiciones de amplificación.....	23
<b>Tabla N°6.</b> Caracterización morfológica de la roya blanca bajo microscopio .....	28
<b>Tabla N°7.</b> Forma de las pústulas.....	30
<b>Tabla N°8.</b> Forma de los esporangios.....	30
<b>Tabla N°9.</b> Forma de las zoosporas .....	31
<b>Tabla N°10.</b> Forma de las oosporas.....	32
<b>Tabla N°11.</b> Periodo de incubación de la roya blanca.....	32
<b>Tabla N°12.</b> Índice de infección de la roya blanca.....	33

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama de actividades realizadas para la caracterización de los síntomas y signos de la roya blanca en <i>H. annuus</i> .....	19
<b>Figura 2.</b> Diagrama de actividades realizadas para la caracterización morfológica de pústulas, hifas, esporangios, oosporas y zoosporas de la roya blanca.....	20
<b>Figura 3.</b> Diagrama de actividades realizadas para inocular hojas sanas de diferentes variedades de <i>H. annuus</i> con suspensiones de esporas obtenidas a partir de pústulas de roya blanca.....	21
<b>Figura 4.</b> Esquema de actividades realizadas para aislar el ADN fúngico de la roya blanca .....	22
<b>Figura 5.</b> Esquema de actividades realizadas para la amplificación para PCR.....	24
<b>Figura 6.</b> Esquema de actividades realizadas para electroforesis en gel de agarosa .....	25
<b>Figura 7.</b> Síntomas de la roya blanca en la superficie adaxial de las hojas de <i>H. annuus</i> ...	27
<b>Figura 8.</b> Signos de la roya blanca en la superficie abaxial de las hojas de <i>H. annuus</i> .....	28
<b>Figura 9.</b> Índice de infección de las diferentes variedades a los 14 días posteriores a la inoculación .....	34
<b>Figura 10.</b> Índice de infección de las diferentes variedades a los 21 días posteriores a la inoculación .....	34
<b>Figura 11.</b> Índice de infección de las diferentes variedades a los 27 días posteriores a la inoculación .....	35
<b>Figura 12.</b> Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen COX2 en gel agarosa al 1% en muestras de girasol con roya blanca.....	37

## RESUMEN

La roya blanca (*Pústula helianthicola*) del girasol descubierto en Argentina en 1940 se caracteriza por producir pústulas en las hojas, observándose en la superficie adaxial pústulas de color amarillo y en la superficie abaxial pústulas de color blanco, llegando a producir necrosis a la planta lo cual afecta el rendimiento y calidad del capítulo. El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar morfológica, patogénica y molecularmente el agente causal de la roya blanca en el girasol. Para la caracterización morfológica se estableció el cultivo de girasol en un lote con antecedentes de roya blanca y a partir del crecimiento vegetativo del cultivo se realizó los registros de los distintos síntomas y signos, y posteriormente se observó bajo el microscopio el diámetro de pústulas, esporangios, oosporas y zoosporas. Para la caracterización patogénica se inoculó hojas sanas de diferentes variedades de girasol (Vincent's Choice, Híbrido Sunbright y Sunrich Orange) con una suspensión de  $10^4$  de esporas obtenidas a partir de las pústulas de la roya blanca. Para la caracterización molecular se detectaron fragmentos amplificados mediante PCR del gen COX2 (citocromo C oxidasa) HelF3/R2 específico para la roya blanca. Por vez primera para Ecuador se describieron hojas de girasol presentando como síntoma la aparición de pústulas amarillentas en forma de ampollas en la superficie adaxial de la hoja y posteriormente como signo la aparición de pústulas blancas en la superficie abaxial de las mismas, las cuales contenían las esporas que diseminarán la enfermedad. El valor promedio del diámetro de las pústulas de las muestras de girasol con roya blanca fue de 29,24  $\mu\text{m}$ . Los esporangios alcanzaron un valor promedio de 14,81  $\mu\text{m}$ . Las zoosporas mostraron un valor promedio de 9,9  $\mu\text{m}$ . Las oosporas alcanzaron un promedio de 17,6  $\mu\text{m}$ . Las hifas no fueron encontradas y por ende no tienen mediciones. La inoculación de las hojas sanas de diferentes variedades demostró que existen diferencias significativas entre variedades, detallando que la variedad Vincent's Choice es la más susceptible a la roya blanca y la variedad Sunrich Orange es la más resistente. De las muestras de girasol con roya blanca analizadas, el gen COX2 (citocromo C oxidasa) HelF3/R2 fue detectado en la parroquia Montalvo de la Provincia de Tungurahua.

**Palabras clave:** *Pústula helianthicola*, esporas, pústulas, girasol, amplificación, gen, COX2.

## SUMMARY

White rust (*Pústula helianthicola*) of sunflower, discovered in Argentina in 1940, is characterized by the production of pustules on the leaves, with yellow pustules on the adaxial surface and white pustules on the abaxial surface, leading to necrosis of the plant, which affects the yield and quality of the flower head. The objective of the present work was to characterize morphologically, pathogenically and molecularly the causal agent of white rust in sunflower. For the morphological characterization, the sunflower crop was established in a field with a history of white rust, and from the vegetative growth of the crop, the different symptoms and signs were recorded, and later the diameter of pustules, sporangia, oospores and zoospores were observed under the microscope. For pathogenic characterization, healthy leaves of different sunflower varieties (Vincent's Choice, Sunbright Hybrid and Sunrich Orange) were inoculated with a suspension of 10<sup>4</sup> spores obtained from white rust pustules. For molecular characterization, PCR-amplified fragments of the COX2 (cytochrome C oxidase) gene HelF3/R2 specific for white rust were detected. For the first time in Ecuador, sunflower leaves were described presenting as a symptom the appearance of yellowish pustules in the form of blisters on the adaxial surface of the leaf and later as a sign the appearance of white pustules on the abaxial surface of the leaves, which contained the spores that will spread the disease. The average value of the diameter of the pustules of the sunflower samples with white rust was 29.24  $\mu\text{m}$ . Sporangia reached an average value of 14.81  $\mu\text{m}$ . Zoospores showed an average value of 9.9  $\mu\text{m}$ . Oospores reached an average of 17.6  $\mu\text{m}$ . Hyphae were not found and therefore have no measurements. Inoculation of healthy leaves of different varieties showed that there are significant differences between varieties, detailing that the Vincent's Choice variety is the most susceptible to white rust and the Sunrich Orange variety is the most resistant. Of the sunflower samples with white rust analyzed, the COX2 (cytochrome C oxidase) HelF3/R2 gene was detected in the Montalvo parish of the Tungurahua Province.

**Keywords:** *Pústula helianthicola*, spores, pustules, sunflower, amplification, gene, COX2.

## INTRODUCCIÓN

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es un cultivo originario de América del Norte. Llega a adaptarse excelente a diferentes climas y temperaturas que van entre los 13 y 25 °C y en cuanto se refiere a suelos, este se desarrolla mucho mejor en suelos profundos, levemente alcalinos y con un buen drenaje; además, se conoce que el girasol tiende a tener resistencia a la sequía y tiene una baja exigencia nutricional (**Gómez-Arnau, 2004**). Se conoce el uso de girasol como planta forrajera, debido a su enorme producción de masa verde por hectárea y también a su alto porcentaje de proteína que contienen sus tallos, inflorescencias y sobre todo sus hojas (**Alemán, 1992**).

A nivel mundial, el girasol es una de las oleaginosas más valiosas, debido a su importancia económica en la industria oleoquímica y a su gran producción anual. El girasol sobresale por su producción de semillas ricas en aceite y proteína de alta calidad comestible, dándole un alto valor nutritivo, ya que contiene vitamina E y ácido linoleico (**De Caram et al., 2007**). El cultivo de girasol contiene aproximadamente un 55% de aceite, un 90% de ácidos grasos insaturados (ácido oleico entre un 15 a 30% y ácido linoleico entre un 55 a 75%) y un 10% de ácidos grasos saturados (**Rodríguez et al., 2020**).

Según **Expoflores (2020)**, en el Ecuador hay aproximadamente 4.800 hectáreas (ha) cultivadas con diferentes variedades de flores, dando a conocer que el cultivo de girasol ocupa alrededor de 110 ha, las cuales están distribuidas en las provincias de Pichincha, Imbabura, Azuay y Cotopaxi. El promedio de producción está entre 300.000 y 450.000 tallos de girasol por hectárea, dependiendo siempre de la densidad de siembra y del tamaño que llegue a tener la inflorescencia (**Carrillo y Yumbla-Orbes, 2022**).

Dentro de su clasificación taxonómica, el cultivo de girasol pertenece a la familia Asterácea, cuyo género es *Helianthus*. Dentro de esta especie están diversas subespecies cultivadas, ya sea como plantas ornamentales, oleaginosas o forrajeras (**Viorel, 1997**). Su ciclo vegetativo está comprendido entre 100 a 150 días teniendo siempre en cuenta que se puede lograr

observar alguna variabilidad según el tipo de genotipo, la época de siembra y la administración necesaria de nutrientes y agua (**Tenesaca, 2015**).

El girasol presenta un tallo único, que llega a alcanzar una altura de 2.20 metros. Sus hojas son trinervales, con forma peciolada, dentadas y el tamaño varía entre 10 a 30 centímetros (**Rodríguez et al., 2017**). La inflorescencia de tonalidad amarilla a naranja es denominada capítulo, la cual tiene un diámetro de 10 a 30 centímetros y está formada por un pedúnculo floral, un receptáculo, un involucro, flores liguladas colocadas normalmente en 1 a 2 filas que tienen como función llamar la atención de los insectos polinizadores y flores tubulares ubicadas al interior del capítulo, las cuales contienen los órganos reproductores y de estas se llega a obtener las semillas (**Melgares, 2001**).

Entre las enfermedades fúngicas que más afecta el girasol, está la roya blanca, cuyo agente causal es el hongo *Pústula helianthicola* C. Rost & Thines, el cual es un oomiceto biotrófico obligado. Es una especie recién descrita, que se separó del antiguo complejo de especies de *P. tragopogonis* (sin. *Albugo tragopogonis*) debido a razones filogenéticas moleculares y morfología distintiva en la formación de oosporas (**Fálico et al., 2005**). La *P. helianthicola* rápidamente consiguió importancia debido a las graves pérdidas que provoca en la producción (**Castaño et al., 2005**).

Los síntomas de esta enfermedad comienzan en el haz de las hojas inferiores e incluyen manchas oleosas, denominadas pústulas. Dichas pústulas son de color amarillo, elevadas, de 5 a 10 mm de diámetro y posteriormente, se observan pústulas blancas en el envés de las hojas. Estas pústulas pueden llegar a coalescer y producir necrosis (**Fálico et al., 2005**).

Se conoce que para llegar a controlar esta enfermedad, es recomendable sembrar híbridos de girasol, los cuales son genéticamente resistentes, también se recomienda realizar tratamientos químicos de las semillas con fungicidas específicos, evitar fechas de siembra temprana, sobre todo en suelos ricos en arcilla y finalmente evitar realizar riegos por la noche (**Lava et al., 2015**).

# CAPÍTULO I

## MARCO TEÓRICO

### 1.1. Antecedentes investigativos

**Spring y Lava (2010)**, emplearon una técnica de microcapilaridad para llegar a seleccionar zoosporas que infecten plantas de girasol, con el fin de conocer la biología y epidemiología de la roya blanca. Las oosporas encontradas fueron aisladas y utilizadas para otros estudios de germinación e infección. En la investigación utilizaron pruebas basadas en PCR para reconocer el patógeno en diferentes muestras de suelo y tejido del huésped asintomático.

**Rost y Thines (2012)**, recolectaron oosporas y esporangios de especímenes de herbario (*P. obtusata* y *P. helianthicola*), empleando una aguja curvada para así extraer pequeños fragmentos de tejido. En total midieron 2.014 esporangios, dando a conocer que el tamaño oscilo entre los 13 a 17µm. Además, mencionaron que la pared exterior de las oosporas tiene un grosor promedio de 3.8 µm y la pared interior tiene un grosor promedio de 1,3 µm.

**Lava y Spring (2012)**, realizaron estudios, mostrando que la infección con una sola espora en el girasol es la forma idónea de producir cepas genéticamente homogéneas de *P. helianthicola* y que tal infección unitaria puede llegar a mostrar homotalismo, esto mediante la formación de oosporas. Como resultado, confirmaron la gran importancia que tienen las oosporas para la primera infección y para la dispersión del patógeno a larga distancia con semillas contaminadas.

**Lava et al., (2013)**, señalaron que las oosporas de la *P. helianthicola*, frecuentemente se producen en los aquenios de los girasoles infectados. En la investigación mostraron que estas oosporas son extremadamente infecciosas, incluso cuando hay falta de latencia o tratamientos térmicos, también indicaron que las oosporas son la fuente principal de infección en las plantas de girasol y a su vez son la fuente más importante en cuanto se trata a que el patógeno se extienda a nuevas áreas.

**Spring *et al.*, (2011)**, realizaron secuenciaciones parciales del gen COX2 (citocromo C oxidasa) con muestras de roya blanca, descubriendo mediante la comparación de estas secuencias, numerosos polimorfismos de un solo nucleótido. Además, indicaron que estos cebadores específicos (Peter\_RubisCO\_down, Peter\_RubisCO\_up, COX2\_Hud F, COX2\_Hud R, COX2\_HelF3 y COX2\_Hel R2), ayudan a rastrear el patógeno en los tejidos asintomáticos de los girasoles infectados, demostrando así su naturaleza sistémica.

**Kajornchaiyakul y Brown (1976)**, inocularon diferentes hojas de girasol con roya blanca y estudiaron el desarrollo de infección que tienen estas hojas. Determinaron que los esporangios germinaron y liberaron de 7 a 11 zoosporas, las cuales se aglomeraron en la parte adaxial de la hoja y llegaron a penetrar los estomas. Mencionaron también, que estas mismas zoosporas germinaron a las 8 horas después de la inoculación y desarrollaron hifas intercelulares. En su estudio observaron que si las plantas de girasol se encuentran bajo condiciones propicias, entonces los síntomas de roya blanca se hacen visibles al quinto día después de haber realizado la inoculación artificial.

**Fálico *et al.*, (2005)**, describieron los diferentes síntomas que causa naturalmente la roya blanca en las plantas de girasol, realizaron siembras del cultivo en Argentina y fueron comparados con cultivos de Sudáfrica. En su estudio registraron síntomas en la etapa de floración y en la etapa de madurez fisiológica y clasificaron los diferentes síntomas en cinco grandes grupos: lesiones foliares, lesiones en peciolas, lesiones en tallos, lesiones en capítulos y lesiones en nervaduras.

Finalmente, **Crepel *et al.*, (2006)**, mencionaron que el girasol es una flor de corte muy utilizada en Bélgica como decoración, y a su vez mencionaron que en año 2004 observaron por primera vez brotar la roya blanca en plantas de girasol, causando pérdidas significativas de hasta el 80%. Realizaron la caracterización morfológica de la enfermedad, describiendo que las pústulas parecían ampollas de color amarillento en el haz de las hojas y de color blanco en el envés de las hojas, las cuales contenían innumerables esporangios. Finalmente confirmaron que estas pústulas llegan a fusionarse causando que la hoja se seque en su totalidad.

Las investigaciones mencionadas anteriormente, forman parte de la recopilación necesaria para realizar la presente investigación, las cuales contribuyen con información importante referente a la caracterización del agente causal de la roya blanca en girasol (*H. annuus*), mediante la inoculación de diferentes variedades y la utilización de cebadores específicos para *P. helianthicola*.

## **1.2. Categorías fundamentales o marco conceptual**

### **1.2.1. Cultivo de Girasol (*H. annuus*)**

#### **1.2.1.1. Historia**

El girasol es conocido desde hace 3.000 años y se sabe que es originario de América del Norte, aun así, es la Unión Soviética quien lo propago y cultivo a gran escala hasta la actualidad (**García, 1971**). Actualmente, el girasol tiene un gran valor económico, pues es la semilla oleaginosa número uno en Europa y la número cuatro en el mundo, después de la palma, soya y canola. Además, el girasol es el encargado de producir mundialmente el 13% del aceite vegetal (**Palacio y Agudelo, 2020**).

#### **1.2.1.2. Generalidades**

El girasol es muy importante ya que se le puede sacar provecho a toda la planta, el capítulo en forma ornamental, las hojas como forraje ya que contiene fibra para el ganado, el tallo en la fabricación de papel, la semilla en la producción de aceite. Además, cuando se elabora el aceite se llegan a producir productos secundarios como es un aceite de menor calidad, con el cual se puede fabricar jabones y desecantes de mezcla para pinturas (**Chicaiza, 2017**).

#### **1.2.1.3. Clasificación taxonómica**

De acuerdo con (**García et al., 2010**), la clasificación taxonómica es la siguiente:

**Tabla N°1.** Clasificación taxonómica del girasol

TAXONOMÍA	
<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Asterales
<b>Familia</b>	Asteraceae
<b>Género</b>	<i>Helianthus</i>
<b>Especie</b>	<i>Annuus</i> L.

**Fuente:** García *et al.*, 2010

#### 1.2.1.4. Descripción botánica

**Raíz:** pivotante, la cual crece más rápido que su parte aérea, esta raíz consta de un eje principal y numerosas raíces secundarias y terciarias las cuales crecen ya sea en sentido vertical u horizontal, conjuntamente el sistema radical puede llegar a medir 4 metros de profundidad (**Pizarro, 2009**).

**Tallo:** es recto, cilíndrico, de consistencia áspera y vellosa, su altura esta entre 60 y 200 centímetros y su diámetro entre 2 a 6 centímetros, esto dependiendo siempre de los cultivares. Cuando el cultivo de girasol llega a la etapa de madurez, su tallo tiende arquearse debido al peso que ejerce el capítulo (**Duarte, 2004**).

**Hojas:** son grandes y pecioladas, los tres primeros pares de hojas de su base son opuestas y a partir del cuarto par, las hojas suelen ser alternas, el número de hojas esta entre 12 y 40 dependiendo de la variedad (**Buxade, 2003**).

**Inflorescencia:** está conformada por un capítulo de entre 10 a 40 centímetros de diámetro y está constituido por dos tipos de flores que están insertadas en un receptáculo envuelto por brácteas protectoras (**Buxade, 2003**).

El girasol es una planta alógama y la maduración de los pistilos y los estambres ocurre en diferentes tiempos, por lo cual el polen casi siempre no llega a polinizar el mismo capítulo de donde es originario (**Marcilla, 1987**). Después de la fecundación, su ovario se modifica a fruto (aquenio), que a su vez está conformado por el pericarpio (envoltura) y su óvulo se modifica en semilla, es decir, la parte interna del fruto (**Pizarro, 2009**).

#### **1.2.1.5. Requerimientos edafoclimáticos**

El girasol no es exigente en cuanto trata a suelos, aunque prioriza los suelos franco-arcillosos y ricos en materia orgánica, con un pH de 5.8 hasta 8.0, además, es importante priorizar su drenaje, ya que no se desarrolla favorablemente en suelos encharcados. Para su germinación necesita temperaturas no menos de 5°C, llegando adaptarse a temperaturas que van entre 15 a 30 °C en todo su desarrollo. Otro factor relevante a mencionar es la luz ya que el girasol exige mucha luz solar al comienzo de su desarrollo, si llegase a faltar llega a debilitar a la planta y por ende forma capítulos pequeños (**Carmigniani, 2017**). En cuanto a la altitud se conoce que el girasol se adapta muy bien desde el nivel del mar hasta alturas de 2700 msnm (**Chicaiza, 2017**).

#### **1.2.1.6. Etapas fenológicas**

De acuerdo con (**Schneider y Miller, 1981**), dice que la fenología de los cultivos está comprendido por las etapas que conforman su ciclo de vida. El girasol está conformado por las siguientes etapas:

**Tabla N°2.** Etapas fenológicas del Girasol

<b>Etapa de Siembra-Emergencia</b>	<b>Etapa de Emergencia-Iniciación Floral</b>	<b>Etapa de Iniciación floral- Floración</b>	<b>Etapa de Floración-Madurez fisiológica</b>
0 a 10 días	11 a 40 días	40 a 60 días	60 a 120 días
- Aquí se conoce el número de plantas logradas por unidad de superficie.	- Comienza con la emergencia de las plántulas y finaliza cuando el ápice comienza a distinguir inflorescencias.	- Aquí se llegan a diferenciar las flores y se define el número potencial de granos que tendrá el capítulo. - Esta etapa finaliza cuando comienza la antesis.	- Aquí se llega a producir la acumulación de carbohidratos, proteínas y ácidos grasos de los granos.

**Fuente:** Schneiter y Miller, 1981

### 1.2.1.7. Plagas y enfermedades

#### Plagas

De acuerdo con (Casuso *et al.*, 2017), investigaciones realizadas describen que las principales plagas que atacan al girasol son:

**Gusano alambre**, causado por *Agriotes sp.*: en la preemergencia estos insectos causan una germinación retrasada. Después de la etapa de germinación llega a causar enanismo de las plántulas y posteriormente a estas mismas plantas les causa marchitez y muerte completa.

**Gusano blanco**, es originado por *Melolontha melolonta linnaeus*: el daño es observado después de los 15-20 días siguientes de la germinación, causando marchitamiento y secado completo de las plantas. Si el daño es a nivel radicular entonces las plantas de girasol tienen roeduras y cortes en sus ramificaciones.

**Gorgojos**, es causado por *Listroderes argentinensis* y *L. costirostris obliquus*: estos insectos llegan a coincidir su nacimiento con las etapas de siembra y de la emergencia de las plántulas, causando daños en toda la planta ya que principalmente se alimentan sobre el follaje y otras veces sobre raíces y tallo.

## **Enfermedades**

De acuerdo con (**Ivancovich y Lavilla, 2016**), investigaciones realizadas describen que las principales enfermedades que atacan al girasol son:

**Podredumbre húmeda**, causada por *Sclerotinia sclerotiorum*: sus esclerocios llegan a germinar produciendo apotecios, los cuales liberan esporas sexuales que se transportan por el viento. Esta enfermedad perjudica inicialmente la parte baja del tallo, causando la destrucción de sus vasos conductores, no permitiendo la circulación de los nutrientes y produciendo la muerte de la planta.

**Verticilosis**, ocasionado por *Verticillium dahliae* *Kleb.*: en el tallo llega a manifestarse en el exterior con estrías de color negro y en el interior con podredumbre de su medula, causando el taponamiento de sus tejidos conductores. En el caso de las hojas, inicia desde la parte inferior a la parte superior, donde se observa clorosis interneval. Si llega a enfermarse la flor, entonces las semillas no son aptas para ser comercializadas y utilizadas.

**Mildiu**, causado por *Plasmopara halstedii*: las plantas presentan enanismo, no llegando a exceder los 50 centímetros de altura. En la superficie adaxial de las hojas se desarrolla decoloraciones del borde de las nervaduras, coincidiendo con masas algodonosas de color blanco, conformada por la fructificación de este hongo.

**Roya blanca**, causada por *Pústula helianthicola*: esta enfermedad se reconoce por la aparición de pústulas de color amarillo en el haz de las hojas y posteriormente se llega a observar pústulas de color blanco en el envés de las hojas, ocasionando necrosis.

**Tizón del tallo**, producido por *Sclerotium rolfsii* Sacc.: el tallo llega a presentar un estrangulamiento que llega ocasionar la muerte de la planta, independientemente del estado fenológico que se encuentre. Sus signos llegan a manifestarse mediante la presencia de micelios en forma de telarañas, situado en la base recubierto con abundantes esclerocios en forma de granos de pimienta.

**Mancha en escudete del tallo**, ocasionada por *Phoma oleracea* var. *helianthi tuberosi* Sacc.: se observa manchas de color negro y superficiales, justamente en donde se realiza la inserción del peciolo, de 8 a 10 centímetros de longitud. Rara vez se puede llegar a observar deformaciones en la base de los tallos.

**Podredumbre seca del capítulo**, producida por *Rhizopus arrhizus*: es potencialmente destructivo ya que llega afectar la calidad y cantidad de aceite que produce el cultivo y a su vez llega a destruir directamente el capítulo. Inicia con áreas necrosadas exactamente en la inserción del capítulo en el tallo y después se forma una podredumbre que abarca todo el capítulo.

**Podredumbre bacteriana**, ocasionada por *Erwinia carotovora*: al inicio llega a ocasionar una podredumbre acuosa al interior de su tallo destruyéndolo en su totalidad, pero en la parte externa del tallo se ve normal. Finalmente sus tallos llegan a quebrarse, perdiendo totalmente todas las plantas enfermas.

#### **1.2.1.7. Variedades utilizadas**

##### **Vincent´s Choice (K6-55)**

Girasol F1 Híbrido, posee un alto vigor y tiene como característica principal su gran resistencia al Mildiu, pero no a la roya blanca desde su etapa de emergencia. Sus pétalos son redondeados y superpuestos formando así flores más atractivas; además, esta variedad llega a tener una mayor altura en los días cortos (**Sakata, 2022**).

## **Hibrido Sunbright**

Girasol F1 Híbrido, esta variedad es libre de polen y produce una floración más precoz, tallos mucho más cortos y duros, los pétalos de su capítulo son más redondos. Esta variedad es menos susceptible a la botritis pero no se tiene información sobre su susceptibilidad a la roya blanca (Sakata, 2022).

## **Sunrich Orange**

Girasol F1 Híbrido, llega a ser precoz a comparación de las otras variedades, sus flores son verticales y no llegan a producir polen, su tallo es mucho más duro y no llega a ramificarse. Además, se conoce que es una variedad con rendimiento alto ya que resiste diferentes enfermedades (Sakata, 2022).

### **1.2.2. La roya blanca (*P. helianthicola*) en girasol**

Los registros de la *P. helianthicola* posiblemente datan del año 1883. Los países con registros confiables en las siguientes décadas incluyen Argentina, donde se observó en la década de 1940, Uruguay en la década de 1950 y la Unión Soviética en la década de 1960. En Sudáfrica, se convirtió en una enfermedad emergente recientemente a pesar de algunos registros de hace más de 80 años. De 1992 a 1997, se informó por primera vez en EE.UU. sobre girasoles cultivados e infectados. En 1994, hubo un brote grave en el sur de Francia y 10 años más tarde ya había llegado a Bélgica. También se ha establecido firmemente en los campos de girasoles del sur de Alemania desde 2003 (Rost y Thines, 2012).

#### **1.2.2.1. Taxonomía**

De acuerdo con (Agrios, 1995), la *P. helianthicola*, según su morfología y su filogenia pertenece al reino Fungi, clase Oomycetes, orden Albuginales y a la familia Albuginaceae.

**Tabla N°3.** Taxonomía de *P. helianthicola*

<b>TAXONOMÍA</b>	
<b>Reino</b>	Fungí
<b>Phylum</b>	Heterokontophyta
<b>Subfilum</b>	Pseudofungi
<b>Clase</b>	Oomycetes
<b>Orden</b>	Albuginales
<b>Familia</b>	Albuginaceae

**Fuente:** Agrios, 1995

### 1.2.2.2. Signos y síntomas

Todo comienza en la superficie adaxial de la hoja, desde la parte inferior a la superior de la planta y comprenden unas manchas oleosas amarillentas, elevadas, conocidas como pústulas o ampollas, con un diámetro de 5 a 10 mm, más adelante, en relación con estas manchas se llegan a observar pústulas blanquecinas sobre la superficie abaxial de las hojas. Se sabe que estas pústulas pueden llegar a coalescer, hasta el punto de agujerar algunas hojas. También puede llegar a producir algunas manchas aceitosas en la inserción del peciolo con el tallo, por presencia de las oosporas (esporas sexuales) en los tejidos afectados y ocasiona que las hojas se sequen prematuramente (**Herbario Virtual Fitopatología, 2017**).

### 1.2.2.3. Epidemiología

La fuente de inóculo primario son sus oosporas, las cuales están presentes en los restos del cultivo de girasol y los suelos infectados anteriormente. Se dice que las semillas contaminadas, tienen un rol importante en la dispersión del patógeno a larga distancia. Estas esporas pueden llegar a producir zoosporas que penetran cuidadosamente por los estomas e infectan las pequeñas plántulas. Las pústulas que se encuentran en la superficie abaxial de las hojas contienen grandes masas de esporangios asexuales y blanquecinos. Cuando estas pústulas llegan a romperse liberan esporangios que vuelan con ayuda del viento, diseminando la enfermedad en todo un lote. Si la infección llega a la parte floral puede ser muy

significativa, localizándose las oosporas en aquenios y brácteas, lo que demuestra la creciente importancia epidemiológica de la fase sexual del patógeno. Las temperaturas óptimas de infección esta entre 10 a 15°C y para el desarrollo del patógeno esta entre 20 a 25 °C (Herbario Virtual Fitopatología, 2017).

### **1.2.3. Técnicas moleculares**

#### **1.2.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

En el año de 1975 por parte de Sanger, se diseñó un método que trata de generar secuencias de ADN in vitro, mediante la utilización de secuencias cortas de oligonucleótidos que desempeñan el papel de iniciadores (primers) con secuencias conocidas. Se sabe que siempre se podrá encontrar una zona homóloga en el extremo 5´ y 3´ de la cadena de ADN, comprobando así la exuberancia de nucleótidos y oligonucleótidos. Por la presencia de la enzima ADN polimerasa y la replicación de escenarios para la iniciación de hebras, fue posible sintetizar fragmentos de forma más rápida, provocando así una gran impresión con esta tecnología denominada como PCR conjuntamente con el reconocimiento de taq polimerasa (Mas *et al.*, 2016).

Esta síntesis de ADN tiene tres etapas, la primera es la desnaturalización que se basa en el rompimiento de los hidrógenos a una temperatura de entre 92 a 95°C, la segunda etapa es el apareamiento en donde llegan a unirse los primers con hebras del ADN, con un claro descenso de temperatura, pero esto dependerá de la secuencia y el tamaño de los primers, por último se da la síntesis de las hebras nuevas a una temperatura de 72°C con el fin de que la taq polimerasa realice su función y como resultado habrá una copia de ADN (Díaz *et al.*, 2014).

#### **1.2.3.2. Cebadores específicos de *P. helianthicola***

Se llegaron a diseñar cebadores específicos para la detección basada en PCR de cepas de *P. helianthicola*. La especificidad de estos cebadores se llegó a confirmar mediante numerosas

pruebas cruzadas con ADN de varios oomicetos. Esto permitió la detección con ADN de esporangios y oosporas individuales. Además, las herramientas moleculares se aplicaron con éxito para rastrear el patógeno en tejido asintomático de plantas de girasol infectadas, lo que demuestra la naturaleza sistémica del hongo (Spring *et al.*, 2011).

### **1.3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **1.3.1. HIPÓTESIS**

**H<sub>0</sub>:** Mediante la caracterización de síntomas, signos, así como la descripción morfológica y patogénica y la amplificación del gen COX2 (citocromo C oxidasa) HelF3/R2, no se podría identificar el agente causal de la roya blanca de *H. annuus* en la Parroquia Montalvo de la Provincia de Tungurahua.

**H<sub>1</sub>:** Mediante la caracterización de síntomas, signos, así como la descripción morfológica y patogénica y la amplificación del gen COX2 (citocromo C oxidasa) HelF3/R2, se podría identificar el agente causal de la roya blanca de *H. annuus* en la Parroquia Montalvo de la Provincia de Tungurahua.

#### **1.3.2. OBJETIVOS**

##### **Objetivo general**

- Caracterizar morfológica, patogénica y molecularmente el agente causal de la roya blanca en *H. annuus*.

##### **Objetivos específicos**

- Caracterizar los síntomas y signos de la roya blanca en *H. annuus*.
- Caracterizar la morfología de pústulas, hifas, esporangios, oosporas y zoosporas de la roya blanca.

- Inocular hojas sanas de diferentes variedades de *H. annuus* con suspensiones de esporas obtenidas a partir de pústulas de roya blanca.
- Detectar fragmentos amplificados mediante PCR del gen COX2 (citocromo C oxidasa) HelF3/R2 específico para roya blanca en *H. annuus*.

## **CAPÍTULO II**

### **METODOLOGÍA**

#### **2.1. Ubicación del experimento**

La presente investigación se realizó en la provincia de Tungurahua en el cantón Cevallos en la Facultad de Ciencias Agropecuarias en sus diferentes laboratorios de investigación y los ensayos de patogenicidad se realizaron en la parroquia Juan Montalvo, perteneciente al cantón de Ambato.

#### **2.2. Características del lugar**

##### **Laboratorio:**

La Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato en el sector Querochaca, perteneciente al cantón de Cevallos. Ubicado al Sureste de Ambato a 19.31 km y localizado a una altitud de 2.850 msnm, sus coordenadas geográficas son: 01°24'27" de latitud Sur y 78°35'00" de longitud Oeste.

##### **Patogenicidad:**

El Barrio San Miguel de la Parroquia Juan Montalvo, perteneciente al cantón de Ambato. Ubicado al Sureste de Ambato a 17.50 km y localizado a una altitud de 2.834 msnm, sus coordenadas geográficas son: 01°21'09" de latitud Sur y 78°36'54" de longitud Oeste.

#### **2.3. Equipos y Materiales**

##### **2.3.1. Equipos**

- Refrigeradora (INDURAMA).
- Termociclador (APPLIED BIOSYSTEMS™ 4484078).
- Autoclave (MIDMARK).
- Agitador vórtex (THERMO SCIENTIFIC).
- Cámara fotográfica (CANON 2000d).
- Balanza de precisión (OHAUS - EX124).
- Estereoscopio binocular (EUROTECH).
- Bloque térmico (THERMO SCIENTIFIC).
- Microscopio (MOTIC).
- Destilador de agua (THERMO SCIENTIFIC).
- Liofilizadora (LABCONCO - FreeZone 4.5).
- Microondas (SAMSUNG).
- PCR convencional (THERMO SCIENTIFIC).
- Sistema de imagen táctil ENDURO GDS.

### **2.3.2. Materiales**

- Hojas de girasol con signos de roya blanca.
- Bolsas de plástico (18 x 24 cm).
- Aspersor pequeño.
- Vasos plásticos (34 oz).
- Micrómetro ocular.
- Racks para PCR (SIGMA - ALDRICH).
- Papel de aluminio.
- Primers (INVITROGEN).
- Micropipetas (THERMO SCIENTIFIC de 0,2 a 1000µl).
- Puntas de micropipetas (VQIR de 0,2µl, 20µl y 1000µl).
- Racks para tubos eppendorf (SIGMA - ALDRICH).

### **2.3.3. Reactivos**

- Agarosa (INVITROGEN).
- Bromuro de etidio (SIGMA - ALDRICH).
- Agua destilada.
- Buffer TAE (INVITROGEN).
- EDTA (SIGMA-ALDRICH).
- Agua ultrapura (INVITROGEN).
- NaOH (SIGMA-ALDRICH).
- Tampón de extracción A (Naoh + Tween 20).
- Tampón de extracción B (Tris-Hcl + Edta).
- Taq DNA polimerasa (THERMO SCIENTIFIC).
- Tris HCl pH 8 (INVITROGEN).
- Trackit 100 bp dna ladder (THERMO SCIENTIFIC).
- Tween 20 (INVITROGEN).
- Marcador de peso molecular de 100-12000 bp (THERMO SCIENTIFIC).

### **2.4. Análisis estadístico**

Para poder obtener la información se utilizó el Análisis de Varianza (ADEVA) y posteriormente fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS (versión 26.0.).

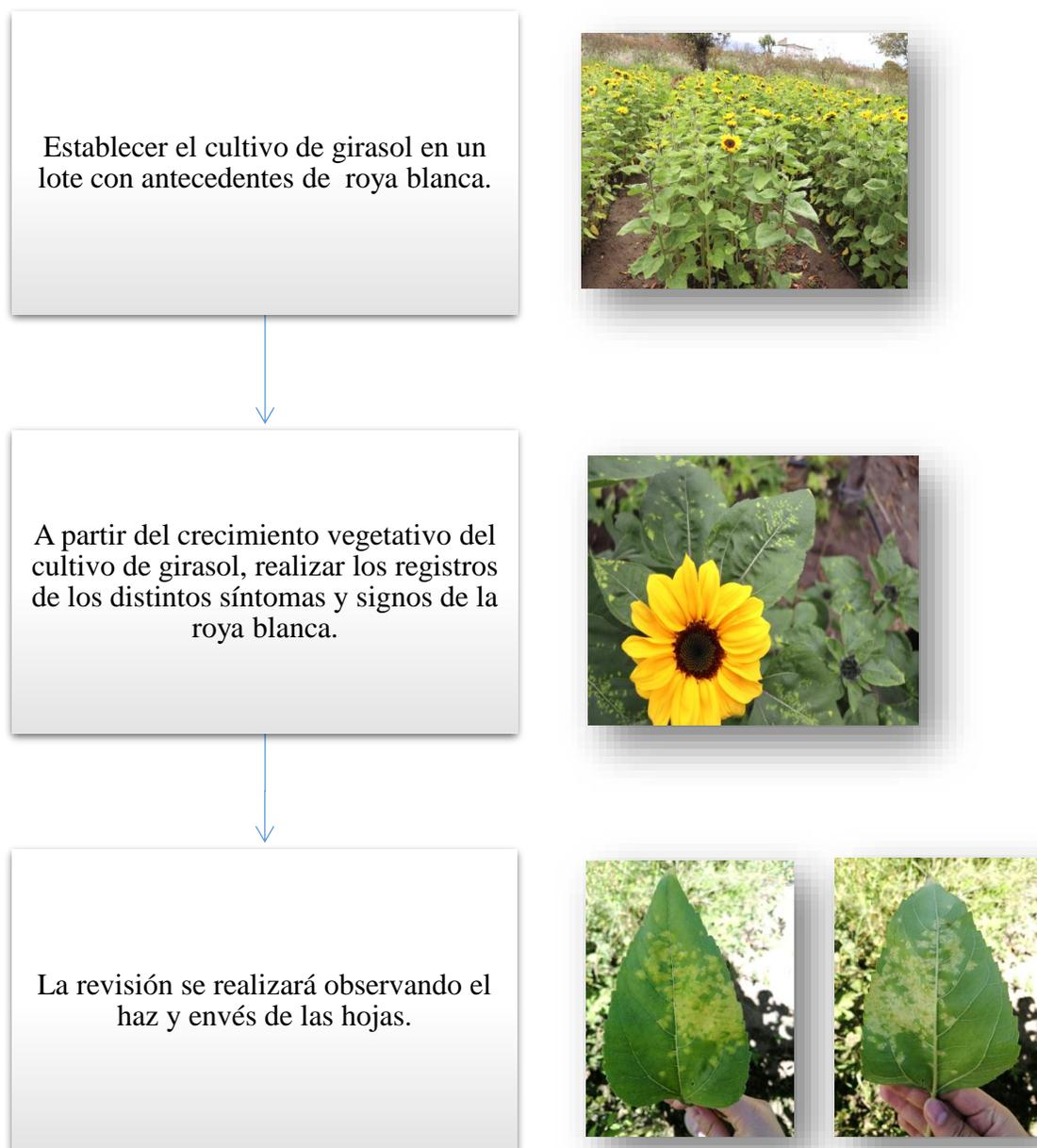
### **2.5. Diseño experimental**

Diseño completamente aleatorizado, en donde se realizarán 3 repeticiones de PCR para cada cebador específico.

### **2.6. Manejo del experimento**

### 2.6.1. Objetivo 1. Caracterizar los síntomas y signos de la roya blanca en *H. annuus*.

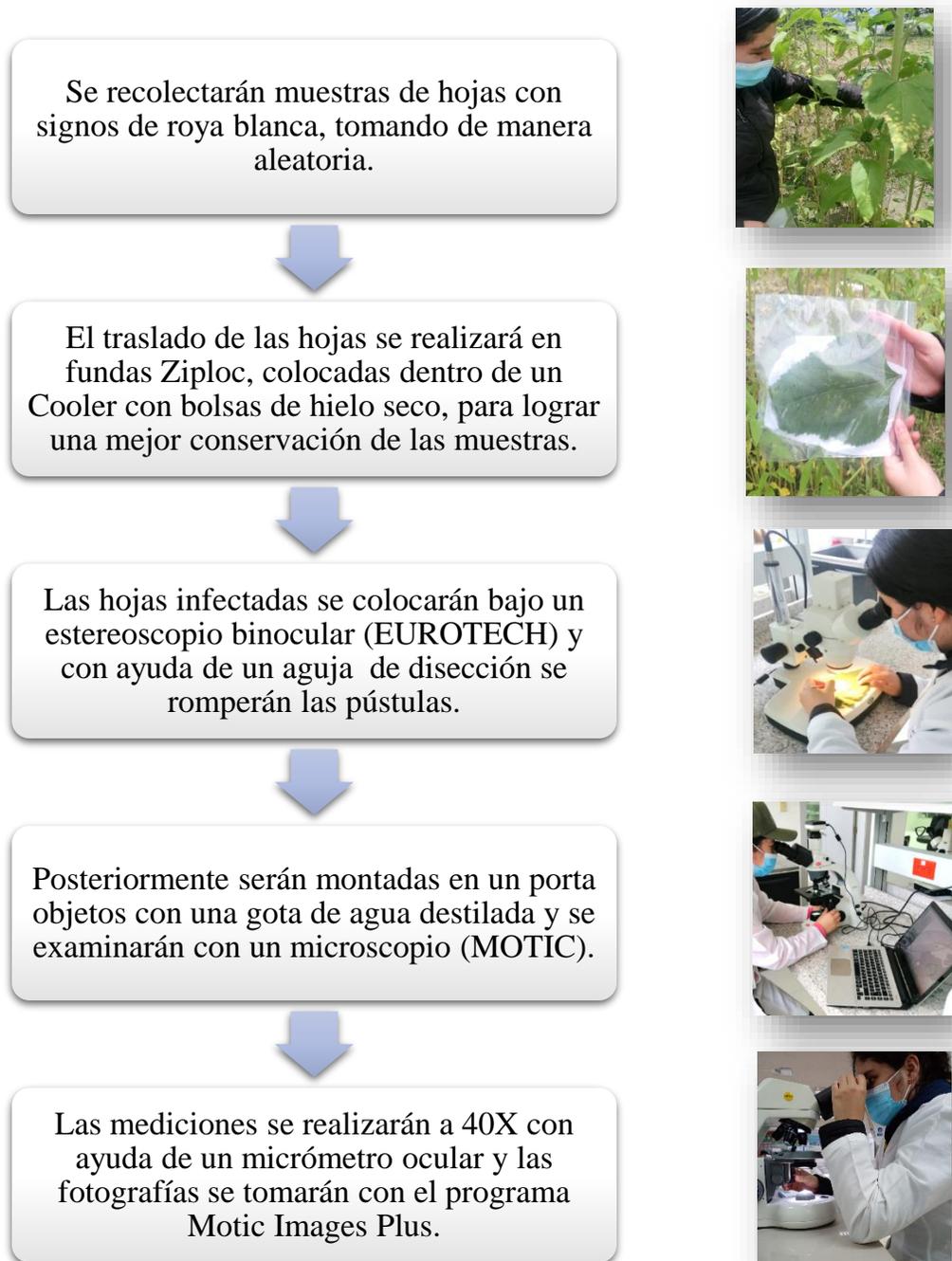
**Figura 1.** Diagrama de actividades realizadas para la caracterización de los síntomas y signos de la roya blanca en *H. annuus*.



**Elaborado por:** Ana Tamayo

**2.6.2. Objetivo 2. Caracterizar la morfología de pústulas, hifas, esporangios, oosporas y zoosporas de la roya blanca.**

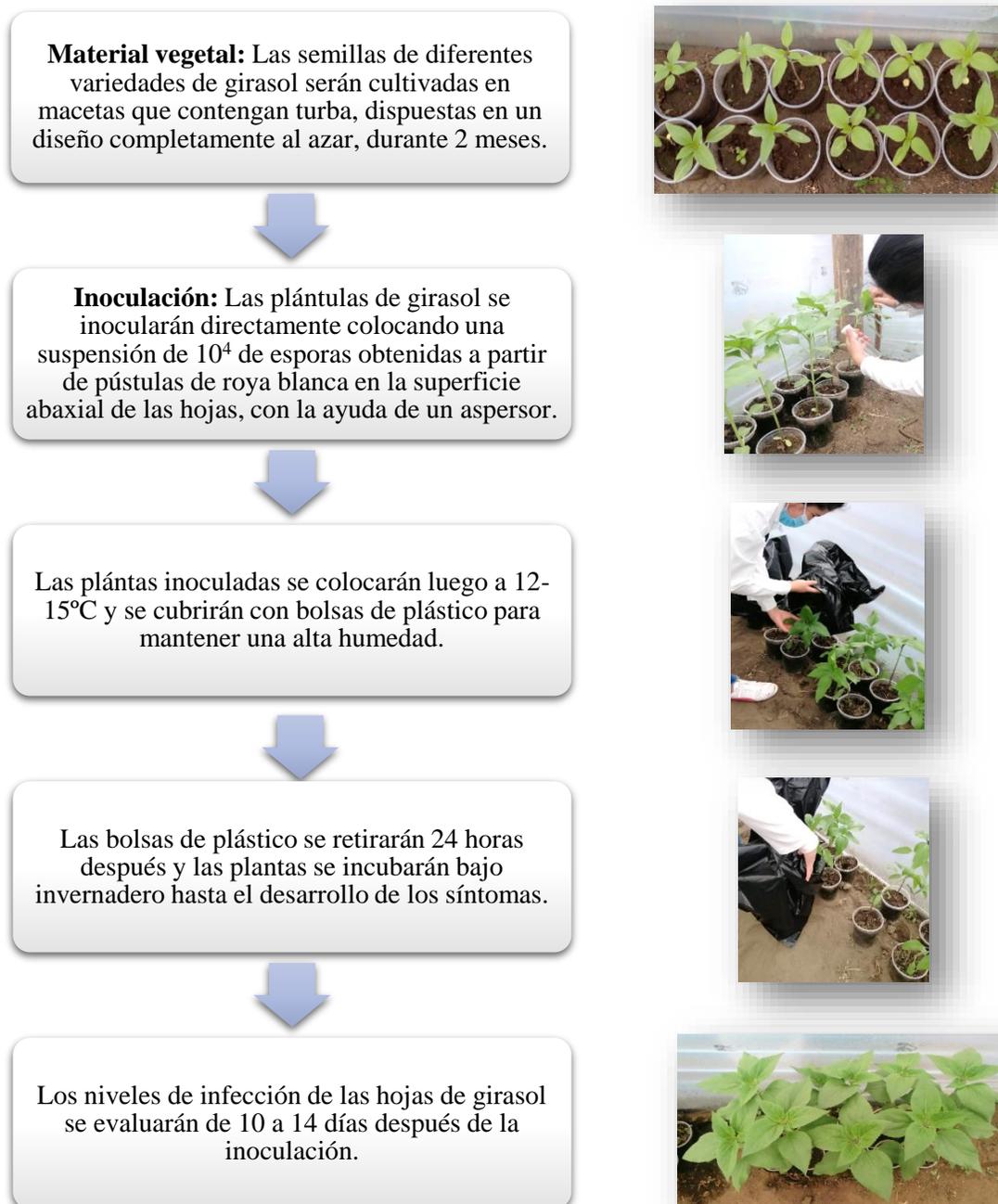
**Figura 2.** Diagrama de actividades realizadas para la caracterización morfológica de pústulas, hifas, esporangios, oosporas y zoosporas de la roya blanca.



**Elaborado por:** Ana Tamayo

### 2.6.3. Objetivo 3. Inocular hojas sanas de diferentes variedades de *H. annuus* con suspensiones de esporas obtenidas a partir de pústulas de roya blanca.

**Figura 3.** Diagrama de actividades realizadas para inocular hojas sanas de diferentes variedades de *H. annuus* con suspensiones de esporas obtenidas a partir de pústulas de roya blanca.



**Elaborado por:** Ana Tamayo

**2.6.4. Objetivo 4. Detectar fragmentos amplificados mediante PCR del gen COX2 (citocromo C oxidasa) HelF3/R2 específico para roya blanca en *H. annuus*.**

Para aislar el ADN fúngico de la roya blanca se siguió el siguiente esquema:

**Figura 4.** Esquema de actividades realizadas para aislar el ADN fúngico de la roya blanca.



1. Triturar las muestras previamente liofilizadas con hidrógeno líquido.



2. Posteriormente añadir 50  $\mu$ l del tampón A (NaOH 100 mM, Tween 20 al 20%) y se incuba a 95°C por 10 minutos.



3. De inmediato se coloca 50  $\mu$ l del tampón B (Tris - HCL 100 mM, EDTA 2mM) y se agita suavemente durante unos 35 segundos.



4. Finalmente se toman 2  $\mu$ l de muestra para realizar las pruebas de amplificación.

**Elaborado por:** Ana Tamayo

La amplificación y secuenciación del ADN se encuentra sucinto en las siguientes tablas:

**Tabla N°4.** Cebadores específicos con su secuencia correspondiente utilizados en este estudio.

	<b>CEBADORES ESPECÍFICOS</b>	<b>SECUENCIA 5' → 3'</b>
<b>F</b>	Peter_RubisCO_down	CCAAACGTGAATACCCCCGAAGC
<b>R</b>	Peter_RubisCO_up	GCTCTACGTCTGGAAGATTTGCGA
<b>F</b>	COX2_Hud F	GGCAAATGGGTTTTCAAGATCC
<b>R</b>	COX2_Hud R	CCATGATTAATACCACAAATTTCACTAC
<b>F</b>	COX2_Hel F3	TTAGAAACTTTTGTACAC
<b>R</b>	COX2_Hel R2	AAATATCAGAATATTCATAT

**Tabla N°5.** Condiciones de amplificación

<b>CEBADORES ESPECÍFICOS</b>	<b>SEGMENTO</b>	<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>TIEMPO</b>	<b>CICLOS</b>
1	Desnaturalización inicial	94°	4 minutos	1
2	Desnaturalización	94°	40 segundos	36
3	Hibridación	52°	40 segundos	
4	Elongación	72°	40 segundos	
5	Extensión final	72°	4 minutos	1

Esquema de amplificación para PCR:

**Figura 5.** Esquema de actividades realizadas para la amplificación para PCR.



1. Distribuir los tubos de PCR en sus respectivas racks.



2. Añadir 2.5  $\mu$ l de 10X DreamTaq Green Buffer.



3. Posteriormente colocar 1  $\mu$ l dNTP 2mM respectivamente.



4. Al instante colocar 1  $\mu$ l del Primer Forward y 1  $\mu$ l del Primer Reverse.



5. Colocar 2  $\mu$ l del ADN que fue extraído, seguidamente colocar 0.63  $\mu$ l de DreamTaq DNA Polymerase.



6. Añadir agua ultrapura hasta llegar a completar 25  $\mu$ l de la reacción.



7. Colocamos los tubos PCR con su respectiva reacción en vórtex durante 40 segundos y al final los colocamos en el termociclador PCR para realizar sus respectivos ciclos.

**Elaborado por:** Ana Tamayo

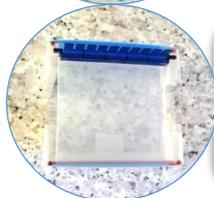
Los productos de amplificación PCR se analizaron en un gel de agarosa (1%) con TAE 1X y se tiñeron con bromuro de etidio (10 mg/ml). El largo del fragmento de ADN amplificado será estimado mediante comparaciones con el marcador molecular (100bp) y posteriormente se visualizó en el sistema de imagen táctil ENDURO GDS.

Esquema para electroforesis en gel de agarosa:

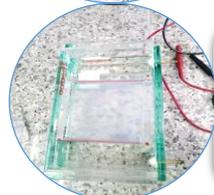
**Figura 6.** Esquema de actividades realizadas para electroforesis en gel de agarosa.



1. Preparar 1gr de Agarosa y colocar en el microondas durante 2 minutos.



2. Colocar la solución obtenida en el soporte respectivo con su peineta.



3. Ya solidificada la Agarosa, retirar la peineta y colocar en la cuba de electroforesis.



4. Enseguida añadir el Buffer TBE en la cuba cubriendo el gel en su totalidad.



5. Colocar 3  $\mu$ l de marcador molecular y 6  $\mu$ l de cada muestra en un pocillo consecutivo y cerrar con la tapa de la cuba.



6. Finalmente conectar a una fuente de corriente y esperar que se realice la electroforesis durante 40 minutos a 100 voltios.

**Elaborado por:** Ana Tamayo

## **2.7. VARIABLE RESPUESTA**

- Color y forma de las pústulas: anverso y reverso de las hojas.
- Medir las dimensiones de al menos 50 pústulas, hifas, esporangios, zoosporas y oosporas.
- Inocular al menos tres diferentes variedades de girasol.
- Detectar fragmentos amplificados del gen COX2 específico para roya blanca.

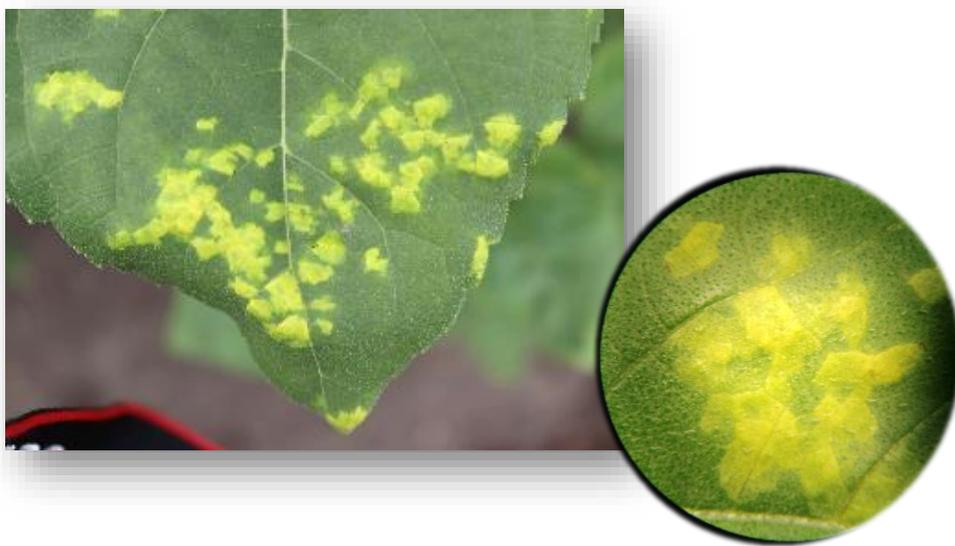
## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Caracterización de los síntomas y signos de la roya blanca en *H. annuus*.

Se observó como primer síntoma, la aparición de pústulas de color amarillo con forma de ampollas elevadas en la superficie adaxial de las hojas inferiores de las plantas girasol, llegando hasta las hojas superiores (**Figura 7**).

**Figura 7.** Síntomas de la roya blanca en la superficie adaxial de las hojas de *H. annuus*.



**Elaborado por:** Ana Tamayo

Posteriormente, un signo claro de la enfermedad, fue la aparición de pústulas blancas de aspecto ceroso en la parte abaxial de las mismas hojas, las cuales fusionaron y produjeron la muerte total de las hojas, las cuales se desprendieron de la planta. Estas pústulas blancas se tornaron de color café una vez liberaron las esporas (**Figura 8**).

**Figura 8.** Signos de la roya blanca en la superficie abaxial de las hojas de *H. annuus*.



**Elaborado por:** Ana Tamayo

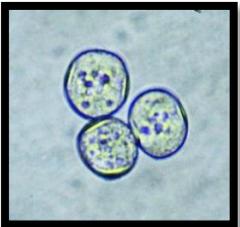
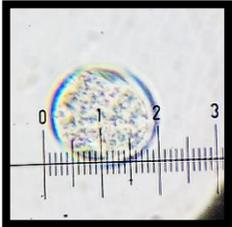
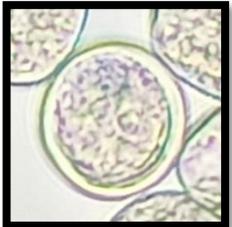
**Fálico *et al.*, (2005)**, describieron que los síntomas de la roya blanca inician en el haz de las hojas inferiores, las cuales incluyen diversas manchas oleosas, amarillentas y elevadas, de 5 a 10 mm de diámetro, llamadas pústulas, posteriormente, observaron signos en el envés de las hojas, pústulas blancas, las cuales llegaron a coalescer causando necrosis.

**Fernández y Figueruelo (2002)**, mencionan de igual forma que los primeros síntomas a observar son manchas amarillentas que forman ampollas en la cara superior de las hojas y pústulas eflorescentes blanquecinas en la cara inferior de las hojas, las cuales constituyen el signo del patógeno, posteriormente, la parte de la hoja afectada puede llegar a caer, dejando una especie de agujero en las mismas.

Con los resultados obtenidos en este estudio se comprobó que los síntomas y signos de la roya blanca que presentó el cultivo de girasol (*H. annuus*), no mostraron variaciones con respecto a las observaciones realizadas por otros investigadores.

### 3.2. Caracterización morfológica de pústulas, hifas, esporangios, oosporas y zoosporas de la roya blanca.

**Tabla N°6.** Caracterización morfológica de la roya blanca bajo microscopio.

	Pústulas	Esporangios	Zoosporas	Oosporas
Gráfico				
	4X	40X	40X	40X
Tamaño Promedio	29,2 (µm)	14,8 (µm)	9,9 (µm)	17,6 (µm)
Forma	Forma variada	Redonda	Redonda	Redonda
Color	Blanquecinas	Verde agua	Verde agua	Café claro

**Elaborado por:** Ana Tamayo

Como se puede apreciar en la **Tabla N° 6** de la caracterización morfológica de la roya blanca, se observó que para las pústulas existe una variación que oscila entre 12,8 µm a 69,9 µm, con un promedio de 29,24 µm. En el estudio realizado por **Fálico et al. (2005)** obtuvieron pústulas de tamaños variados con las siguientes medidas: desde 1-2 mm (10-20 µm) a 5-10 mm (50-100 µm) de forma similar a ampollas, demostrando no mostrar variación con las pústulas medidas en el presente estudio.

**Herbario Virtual Fitopatología, (2017)** menciona que la forma de las pústulas no está definida, demostrando no tener variación con la forma de las pústulas de este estudio (**Tabla N°7**).

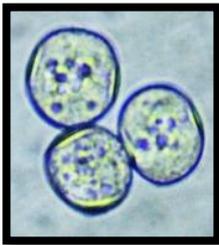
**Tabla N°7.** Forma de las pústulas.

<b>Diferencia en la forma de las pústulas</b>	
	
<b>Fuente:</b> Tamayo, 2023.	<b>Fuente:</b> Herbario Virtual Fitopatología, 2017.

Los esporangios oscilaron en un rango de 13,8  $\mu\text{m}$  a 17,7  $\mu\text{m}$ , alcanzando un promedio de 14,81  $\mu\text{m}$ . **Rost y Thines (2012)**, mencionan que el tamaño de los esporangios osciló entre 13,3  $\mu\text{m}$  a 18,5  $\mu\text{m}$  con un promedio de 15,9  $\mu\text{m}$ , no llegando a mostrar variación con respecto al tamaño de los esporangios de este estudio.

**Lava y Spring (2012)** obtuvieron esporangios de forma elipsoidal, demostrando tener variación con la forma de los esporangios de este estudio (**Tabla N°8**).

**Tabla N°8.** Forma de los esporangios.

<b>Diferencia en la forma de los esporangios</b>	
	
<b>Fuente:</b> Tamayo, 2023.	<b>Fuente:</b> Lava y Spring, 2012.

Las zoosporas de este estudio variaron en tamaños que van desde las 7,9  $\mu\text{m}$  hasta las 11,8  $\mu\text{m}$ , con un promedio de 9,9  $\mu\text{m}$ . En el trabajo realizado por **Kajornchaiyakul y Brown (1976)** mencionan que las zoosporas se diferenciaban dentro del esporangio y se liberaban individualmente a través de la papila rota (estructura similar a una tapa en la punta de los esporangios que se formó después de colocarlos en agua por 30 minutos). Además, en su estudio mencionan que el tamaño de las zoosporas vario mucho de 6  $\mu\text{m}$  a 12  $\mu\text{m}$ , no llegando a tener gran variación con los tamaños de las zoosporas medidas en este estudio.

**Lava y Spring (2012)** obtuvieron zoosporas de forma redonda, demostrando no tener variación con la forma de las zoosporas de este estudio (**Tabla N°9**).

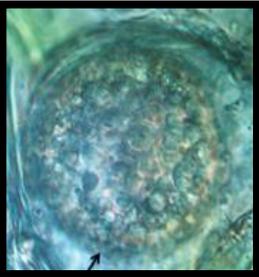
**Tabla N°9.** Forma de las zoosporas.

<b>Diferencia en la forma de las zoosporas</b>	
	
<b>Fuente:</b> Tamayo, 2023.	<b>Fuente:</b> Lava y Spring, 2012.

Las oosporas en este estudio variaron en tamaños que van desde 13,8  $\mu\text{m}$  a 21,7  $\mu\text{m}$ , con un promedio de 17,6  $\mu\text{m}$ . **Rost y Thines (2012)** obtuvieron mediciones de oosporas que van desde 44,8  $\mu\text{m}$  a 53,7  $\mu\text{m}$  con un promedio de 49,3  $\mu\text{m}$ , dándonos una variación significativa de tamaño con las oosporas de este estudio.

**Lava y Spring (2012)** obtuvieron oosporas de forma redonda, demostrando no tener variación con la forma de las oosporas de este estudio (**Tabla N°10**).

**Tabla N°10.** Forma de las oosporas.

<b>Diferencia en la forma de las oosporas</b>	
	
<b>Fuente:</b> Tamayo, 2023.	<b>Fuente:</b> Lava y Spring, 2012.

Por último, las hifas en este estudio no fueron encontradas y no se obtuvieron mediciones. **Kajornchaiyakul y Brown (1976)** mencionaron en su estudio que las zoosporas son las que producen hifas de infección intercelular pero no pueden ser vistas microscópicamente ni tampoco se pueden desarrollar en medio de cultivo ya que la *P. helianthicola* es un oomiceto biotrófico obligado.

Con los resultados obtenidos en esta investigación se comprobó que todas estas mediciones coinciden con lo informado morfológicamente para la roya blanca en girasol, a excepción de las oosporas que fueron las únicas en tener una variación significativa de tamaño. Con respecto a la forma se comprobó que las pústulas, zoosporas y oosporas de esta investigación no tuvieron variación en forma a excepción de los esporangios los cuales variaron de forma elipsoidal a redondo.

### **3.3. Inoculación de hojas sanas de diferentes variedades de *H. annuus* con suspensiones de esporas obtenidas a partir de pústulas de roya blanca.**

**Tabla N°11.** Periodo de incubación de la roya blanca.

Variedades	Periodo de incubación (días)	
	Media	Rango
Vincent´s Choice	14,20	c
Hibrido Sunbright	17,30	b
Sunrich Orange	19,80	a

**Elaborado por:** Ana Tamayo

En la toma de datos realizados a los 14 días posteriores a la inoculación sobre el periodo de incubación de la roya blanca, se observó que dentro de las variedades existen diferencias estadísticas significativas respecto a los días en incubar la enfermedad (**Tabla N°11**).

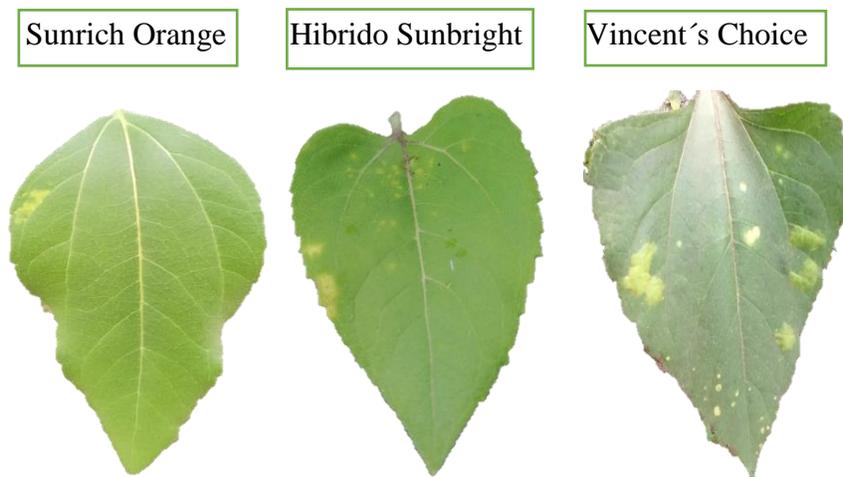
Se detalla que la variedad Sunrich Orange tardó un promedio de 19,80 días en incubar la roya blanca, mostrando su gran resistencia ante la enfermedad y por ende anteponiéndose como mejor variedad con respecto a la variedad Hibrido Sunbright que tardó un promedio de 14,20 días y la variedad Vincent´s Choice que tardó un promedio de 11,30 días en incubar la enfermedad (**Tabla N°11**).

**Spring et al. (2011)** mencionan que, el periodo de incubación puede llegar a durar de 12 a 15 días, aunque puede llegar alargarse hasta 7 semanas si las temperaturas sobrepasar los 30°C. Durante la incubación las hojas afectadas son asintomáticas y los primeros síntomas de la roya blanca se pueden evidenciar al culminar el periodo de incubación.

**Tabla N°12.** Índice de infección de la roya blanca.

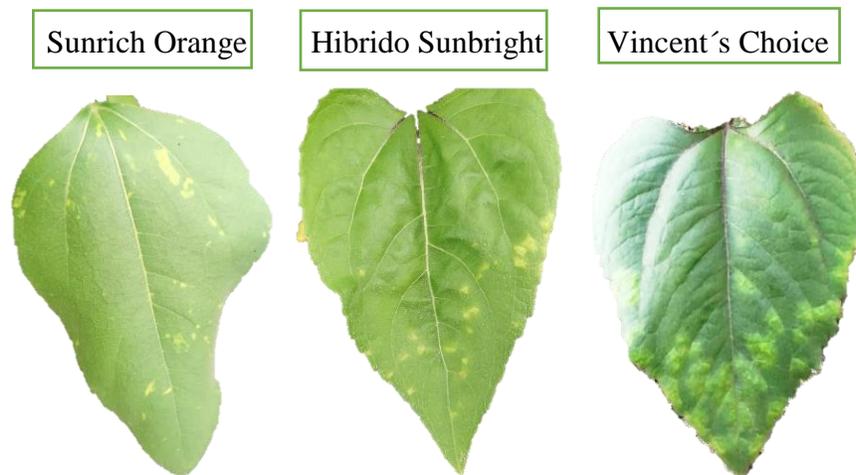
Variedades	Índice de infección de la roya blanca					
	14 días		21 días		28 días	
	Media	Rango	Media	Rango	Media	Rango
Vincent´s Choice	28,59	c	58,72	b	78,97	c
Hibrido Sunbright	13,85	b	28,85	a	61,92	b
Sunrich Orange	7,44	a	29,51	a	47,56	a

**Figura 9.** Índice de infección de las diferentes variedades a los 14 días posteriores a la inoculación.



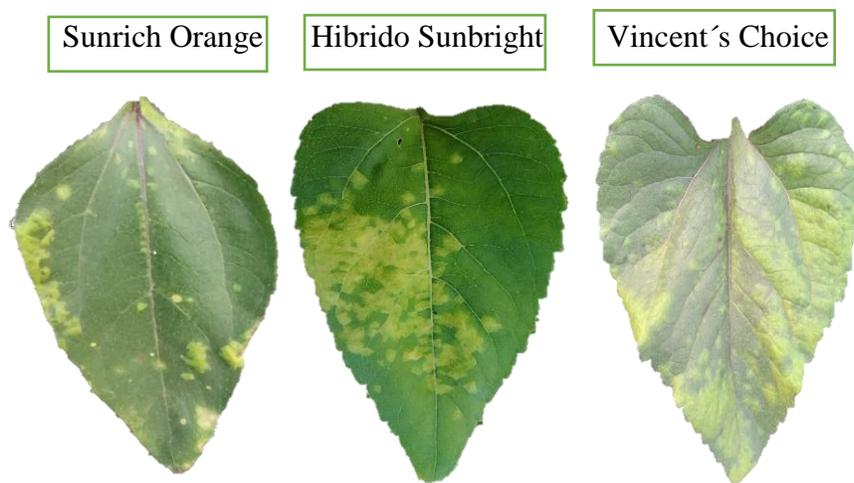
**Elaborado por:** Ana Tamayo

**Figura 10.** Índice de infección de las diferentes variedades a los 21 días posteriores a la inoculación.



**Elaborado por:** Ana Tamayo

**Figura 11.** Índice de infección de las diferentes variedades a los 27 días posteriores a la inoculación.



**Elaborado por:** Ana Tamayo

La inoculación con una suspensión de  $10^4$  de esporas obtenidas a partir de pústulas de roya blanca se realizó a los dos meses de edad de cada una de las variedades, la primera toma de datos se realizó a los 14 días posteriores a la inoculación.

A los 14 días existieron diferencias estadísticas significativas entre todas las variedades, se detalló que la variedad Sunrich Orange se colocó como la variedad más resistente, obteniendo un promedio de 7,44% de infección, seguido por la variedad Híbrido Sunbright con un promedio de 13,85% de infección, mientras que la variedad Vincent's Choice alcanzó un promedio de 28,59% de infección, demostrando esta última ser la variedad con el índice más alto de infección (**Tabla N°12 y Figura 9**).

A los 21 días no existieron diferencias estadísticas significativas entre la variedad Sunrich Orange con un promedio de 29,51% de infección y la variedad Híbrido Sunbright con un promedio de 28,85% de infección, sin embargo, las variedades antes mencionadas sí mostraron diferencia estadística significativa con la variedad Vincent's Choice que tuvo un promedio de 58,72% de infección, demostrando así su alto índice de infección (**Tabla N°12 y Figura 10**).

A los 28 días existieron diferencias estadísticas significativas entre todas las variedades, se detalló que la variedad Sunrich Orange se colocó como la variedad más resistente, obteniendo un promedio de 47,56% de infección, seguido por la variedad Híbrido Sunbright con un promedio de 61,92% de infección, mientras que la variedad Vincent's Choice alcanzó un promedio de 78,97% de infección, demostrando esta última ser la variedad con el índice más alto de infección (**Tabla N°12 y Figura 11**).

**Carmona y Sautua (2018)**, mencionan que la resistencia a la roya blanca probablemente es controlada por diversos genes, sin embargo, las diversas empresas semilleras no incorporan aun a este patógeno como prioridad, ya que le consideran una enfermedad secundaria. Además aclaran que la susceptibilidad a la roya blanca es independiente de la resistencia que posean las variedades al Mildiu (enfermedad más importante del girasol) para la que si hay variedades genéticamente resistentes.

Con respecto al análisis de varianza y el paquete estadístico SPSS, la variedad Sunrich Orange demostró diferencias significativas con relación a las otras variedades y se mantuvo a lo largo de la toma de datos presentando valores menores de índice de infección a comparación con las demás variedades, de esta manera se puede mencionar que esta variedad logra una gran resistencia a la roya blanca.

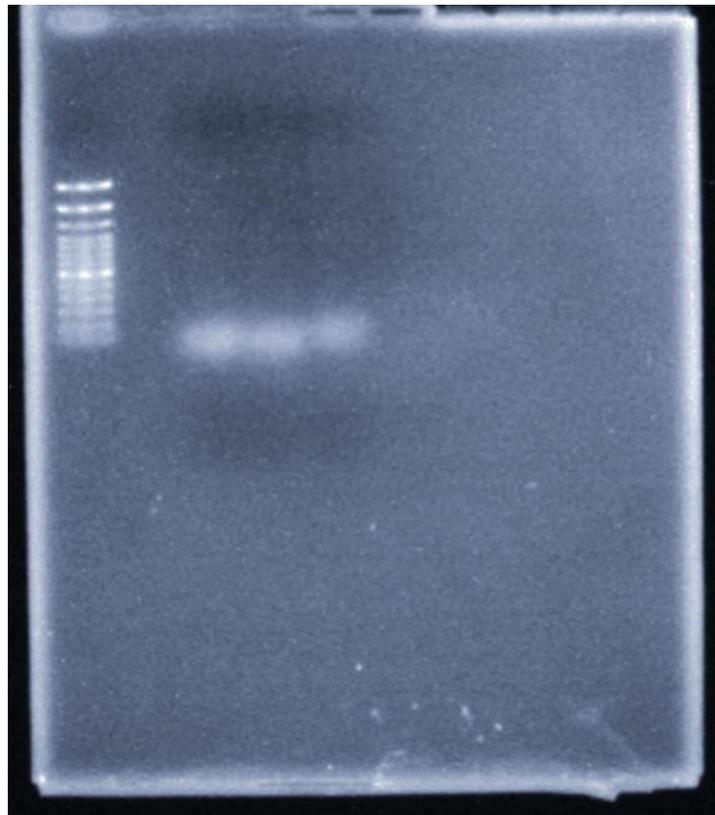
#### **3.4. Detección de fragmentos amplificados mediante PCR del gen COX2 (citocromo C oxidasa) HelF3/R2 específico para roya blanca en *H. annuus*.**

Al realizar la amplificación del gen COX2 en las muestras de girasol con roya blanca, se constató la presencia del mismo en la parroquia Juan Montalvo, perteneciente al cantón de Ambato. Según **Spring et al. (2011)**, señalaron en su investigación que el COX2 se presentó en siete de ocho muestras realizadas, sin tener problemas en la secuencia del gen, demostrando similitud con los análisis realizados en el presente estudio.

Además, **Spring et al., (2011)** realizaron una amplificación similar a la nuestra que consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos, seguido de una desnaturalización

a 94°C durante 40 segundos, después una hibridación a 52°C durante 40 segundos, seguido de una elongación a 72°C durante 40 segundos, estos tres últimos pasos con 36 ciclos respectivamente y finalmente una extensión final a 72°C durante 4 minutos.

**Figura 12.** Visualización de los productos amplificados mediante PCR del gen COX2 en gel agarosa al 1% en muestras de girasol con signos de roya blanca.



**Elaborado por:** Ana Tamayo

## CAPÍTULO IV

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1. CONCLUSIONES

- Las hojas de *H. annuus* presentaron como síntoma la aparición de pústulas amarillentas en forma de ampollas en la superficie adaxial de la hoja y posteriormente como signo la aparición de pústulas blancas cerosas en la superficie abaxial de las mismas, las cuales se tornaron de color café una vez liberaron las esporas.
- El valor promedio del diámetro de las pústulas de las muestras de girasol con roya blanca fue de 29,24  $\mu\text{m}$ . Los esporangios alcanzaron un valor promedio de 14,81  $\mu\text{m}$ . Las zoosporas mostraron un valor promedio de 9,9  $\mu\text{m}$ . Las oosporas alcanzaron un promedio de 17,6  $\mu\text{m}$ . Las hifas no fueron encontradas y por ende no tienen mediciones. Todas estas características coinciden con lo informado morfológicamente para la roya blanca en girasol, a excepción de las oosporas que fueron las únicas en tener una variación significativa de tamaño (49,3  $\mu\text{m}$ ). Con respecto a la forma se comprobó que las pústulas, zoosporas y oosporas de esta investigación no tuvieron variación en forma a excepción de los esporangios los cuales variaron de forma elipsoidal a redondo.
- La inoculación de las hojas sanas de diferentes variedades demostró que existen diferencias significativas entre variedades, detallando que la variedad Vincent's Choice es la más susceptible a la roya blanca y la variedad Sunrich Orange es la más resistente. Con los datos recolectados se concluye que la variedad Sunrich Orange obtuvo los valores más bajos al término de la toma de datos a los 28 días, en porcentaje de índice de infección alcanzó 47,56 % y además tardó más días en incubar la enfermedad con 19,80 días.

- De las muestras de girasol con roya blanca analizadas, el gen COX2 (citocromo C oxidasa) HelF3/R2 fue detectado en la parroquia Montalvo de la Provincia de Tungurahua.

#### **4.2. RECOMENDACIONES**

- Realizar el método de inoculación en otras variedades de girasol para ampliar la información sobre la *P. helianthicola*.
- Utilizar un kit de limpieza de gel PerfectPrep para las amplificaciones de COX2.
- Determinar la ausencia o presencia mediante PCR del gen COX2 de muestras de girasol con signos de roya blanca de diferentes provincias.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. (1995). Fitopatología (2ª edición). Limusa.
- Alemán, R. (1992). Instrucciones técnicas para el establecimiento del girasol. CIAP. MINAG.
- Asociación de Productores y Exportadores de Flores [Expoflores]. (2020). Reporte estadístico anual 2020. Expoflores. <https://expoflores.com/wp-content/uploads/2021/03/Anual-Expoflores.pdf>
- Buxade, C. (2003). Enciclopedia práctica de la agricultura y la ganadería. Océano/Centrum. Barcelona-España. 1032 p.
- Carmigniani, C. (2017). Evaluación agronómica de cinco distanciamientos de siembra en el cultivo de girasol (*Helianthus annuus* L.)” en la zona de Pangua (Bachelor's thesis, Quevedo: UTEQ).
- Carmona, M., y Sautua, F. (2018). La roya blanca, una amenaza que obliga a estar muy cerca del girasol. <https://news.agrofy.com.ar/noticia/173076/roya-blanca-amenaza-que-obliga-estar-muy-cerca-girasol>
- Carrillo Criollo, J. F., y Yumbra-Orbes, M. (2022). Caracterización morfológica y análisis de crecimiento de tres cultivares de *Helianthus annuus* L. para flor de corte. Siembra, 9(1), e3323. <https://doi.org/10.29166/siembra.v9i1.3323>
- Castañó, F., Gulya, T., Ré, J., Echeverría, M., y Rodríguez, R. (2005). Reaction of some sunflower accessions to *Albugo tragopogonis* and *Sclerotinia sclerotiorum* infections/respuestas a las infecciones de *Albugo tragopogonis* y de *Sclerotinia sclerotiorum* en diferentes introducciones de girasol/réponses aux infections d'albugo

- tragopogonis et du Sclerotinia sclerotiorum chez de germplasm du tournesol. *Helia*, 28(43), 25-32.
- Casuso, M., Simon, C., Cavalieri, J., y Pérez, G. (2017). Guía práctica para la identificación de plagas del cultivo de girasol. *Ediciones INTA, Chaco*.
- Chicaiza, R. (2017). Duración de las etapas fenológicas y caracterización morfológica de tres accesiones de girasol (*Helianthus annuus* L.) en el sector Querochaca, cantón Cevallos, provincia de Tungurahua (Bachelor's thesis).
- Crepel, C., Inghelbrecht, S., y Bobev, S. G. (2006). First report of white rust caused by *Albugo tragopogonis* on Sunflower in Belgium. *Plant disease*, 90(3), 379-379.
- De Caram, G., Angeloni<sup>1</sup>, P., y Prause<sup>1</sup>, J. (2007). Determinación de la curva de dilución de nitrógeno en diferentes fases fenológicas del girasol. [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S036528072007000200009&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S036528072007000200009&script=sci_arttext)
- Díaz, AS; Rentería, LF; Cortez, JA; Palacios, ES. 2014. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, 53. [https://www.researchgate.net/profile/Jorge-Ramirez-Salcedo/publication/296695965\\_Microarreglos\\_de\\_DNA\\_Fabricacion\\_Proceso\\_y\\_Analisis/links/56d88bc408aee73df6ccfd74/Microarreglos-de-DNA-Fabricacion-Proceso-y-Analisis.pdf#page=69](https://www.researchgate.net/profile/Jorge-Ramirez-Salcedo/publication/296695965_Microarreglos_de_DNA_Fabricacion_Proceso_y_Analisis/links/56d88bc408aee73df6ccfd74/Microarreglos-de-DNA-Fabricacion-Proceso-y-Analisis.pdf#page=69)
- Duarte, G. (2004). El cultivo de girasol en siembra directa. Primera Edición. Monsanto. Buenos Aires-Argentina. 208 p.
- Fálico, Ladys., Visintín, Griselda, y Alcaraz, María Evangelina (2005). Síntomas producidos por *Albugo Tragopogonis* en girasoles de Entre Ríos (Argentina). *Ciencia, Docencia y Tecnología*, XVI (30), 217-227.

- Fernández, J. P., y Figueruelo, A. (2002). Enfermedades: Identificación y Manejo. El cultivo de girasol en la región semiárida pampeana, 65.
- García, H., Moreno, L., Londoño, C., y Sofrony, C. (2010). Estrategia Nacional para la Conservación de Plantas: actualización de los antecedentes políticos y normativos, y revisión de avances. Instituto Humboldt y Red Nacional de Jardines Botánicos. Bogotá Colombia. 160 p.
- García, J. (1971). *El girasol oleaginoso* (No. CIDAB-: S253-H6-10/71). España. Ministerio de Agricultura.
- Gómez-Arnau, J. (2004). El cultivo del girasol. Hojas Divulgadoras núm. 20/88 HD. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. [https://www.miteco.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd\\_1988\\_20.pdf](https://www.miteco.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1988_20.pdf)
- Herbario Virtual Fitopatología. (2017). Herbario Virtual Fitopatología. [https://herbariofitopatologia.agro.uba.ar/?page\\_id=506](https://herbariofitopatologia.agro.uba.ar/?page_id=506)
- Hernández, R., y Mendoza, C. (2018). Metodología de la investigación. Las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta. México. McGrawHill. [https://www.academia.edu/44382737/metodolog%C3%8da\\_de\\_la\\_investigaci%C3%9n\\_las\\_rutas\\_cuantitativa\\_cualitativa\\_y\\_mixta?auto=citations&from=cover\\_page](https://www.academia.edu/44382737/metodolog%C3%8da_de_la_investigaci%C3%9n_las_rutas_cuantitativa_cualitativa_y_mixta?auto=citations&from=cover_page)
- Ivancovich, A. J., y Lavilla, M. (2016). Diagnóstico y manejo de enfermedades en girasol. Ediciones INTA.
- Kajornchaiyakul, P., y Brown, J. F. (1976). The infection process and factors affecting infection of sunflower by *Albugo tragopogi*. *Transactions of the British Mycological Society*, 66(1), 91-95.

- Lava, S. S., Heller, A., y Spring, O. (2013). Oospores of *Pustula helianthicola* in sunflower seeds and their role in the epidemiology of white blister rust. *IMA Fungus*, 4(2), 251-258.
- Lava, S. S., y Spring, O. (2012). Homothallic sexual reproduction of *Pustula helianthicola* and germination of oospores. *Fungal biology*, 116(9), 976-984.
- Lava, S.S., Zipper, R. y Spring, O. (2015). Roya ampolla blanca del girasol: especificidad del huésped y efectos fungicidas sobre la infectividad y las etapas tempranas de la infección. *Protección de cultivos (Guildford, Surrey)*, 67, 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.10.019>
- Mancilla, L. (1987). Estudio agronómico del cultivo de girasol. Editorial América. Caracas-Venezuela. 172 p.
- Mas, E; Poza, J; Ciriza, J; Zaragoza, P; Osta, R; Rodellar, C. (2016). Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *Revista Aquatic*, (15). <http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/139>
- Melgares, J. (2001). El cultivo de girasol (*Helianthus annuus*) para flor cortada. *Flormarket*, 2(2), 55-61. <http://www.bionica.info/biblioteca/Melgares%202001%20girasol.pdf>
- Murillo, J. (2011). Métodos de investigación de enfoque experimental. <https://www.academia.edu/download/55568285/Experimental.pdf>
- Palacio-Román, S. A., y Agudelo-Escobar, B. (2020). Desarrollo del girasol (*Helianthus annuus* L.) con aplicación de codornaza bajo distintas láminas de riego. *Ciencia y Agricultura*, 17(1), 3-17.
- Pizarro, M. (2009). Girasol. Tercera Edición. Editorial Hortitécnia. Santa Fé de Bogotá Colombia. 41 p.

- Ploch S, Telle S, Choi Y-J, Cunnington J, Priest M, Rost C, Shin H-D, Thines M (2011). The molecular phylogeny of the white blister rust genus *Pustula* reveals a case of underestimated biodiversity with several undescribed species on ornamentals and crop plants. *Fungal Biol*, in press
- Rodríguez Guzmán, E., Ramírez Serrano, C., Güitrón López, M. M., Palmeros Suárez, P. A., y Ángeles Espino, A. (2020). Cultivo de anteras e inducción de callo haploide en germoplasma bc3 de girasol (*Helianthus annuus* L.). *Acta universitaria*, 30.
- Rodríguez, A., Gómez, R., Barrón, R., Benito, Martínez, y Escamilla, G. (2017). Evaluación de híbridos de girasol (*Helianthus annuus* L.) en régimen de temporal en el Valle del Mezquital, Hidalgo. México, Mexico: Universidad Politecnica de Francisco I. Madero.
- Rost, C., y Thines, M. (2012). A new species of *Pustula* (Oomycetes, Albuginales) is the causal agent of sunflower white rust. *Mycological Progress*, 11(2), 351-359.
- Schneider, A. A., y Miller, J. F. (1981). Description of sunflower growth stages 1. *Crop Science*, 21(6), 901-903.
- Sakata. (2022). Vincents (*Helianthus annuus* L.). <https://www.sakataornamentals.eu/cut-flower/sunflower/vincent@s>
- Spring, O., y Lava, S. S. (2010). The biology and epidemiology of sunflower white blister rust, *Pustula helianthicola*.
- Spring, O., Marco, T., Wolf, S., y Zipper, R. (2011). PCR-based detection of sunflower white blister rust (*Pustula helianthicola* C. Rost & Thines) in soil samples and asymptomatic host tissue. *European journal of plant pathology*, 131(3), 519-527.

Tancara, QC. (2003). La investigación documental. *Temas Sociales*, (17), 91-106.  
[http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0040-29151993000100008&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0040-29151993000100008&lng=es&tlng=es)

Tenesaca, C. (2015). Fenología y profundidad radical del cultivo de girasol (*Helianthus annuus*) var. Sunbright, en el sector Querochaca, Cantón Cevallos, Provincia de Tungurahua. Ambato, Ecuador: Universidad Técnica de Ambato. Proyecto de Investigación de Pregrado.

Viorel, A. (1977). *El girasol*. 2 ed. España, España. Editorial Mundi Prensa.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Liofilización de las hojas de girasol con pústulas de roya blanca.



La muestra se liofilizó durante 3 días.

## Anexo 2. Extracción del ADN fúngico.



Trituración de la muestra con nitrógeno líquido.



Muestras con 50  $\mu$ l del tampón A (95°C por 10 min).



Reposo con 50  $\mu$ l de tampón B y posteriormente conservación del ADN (-20°C).

**Anexo 3.** Amplificación de las muestras en el PCR convencional.

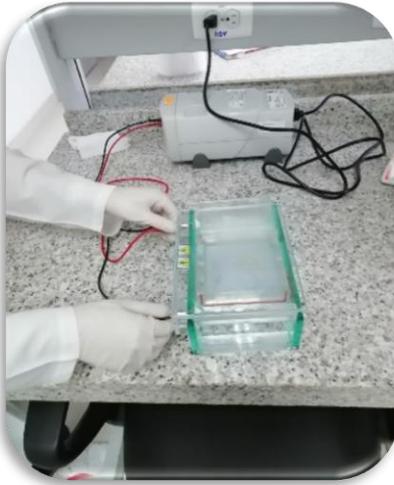


COX2 - HelF3/R2 con sus respectivos ciclos de amplificación.

**Anexo 4.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%.

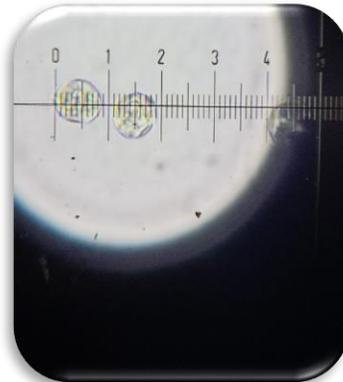
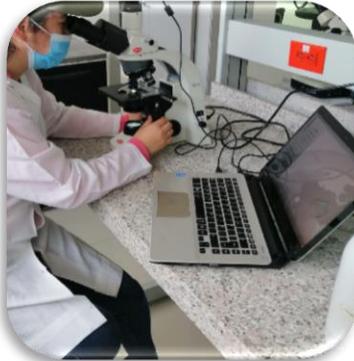


Carga de cada pocillo con marcador molecular y con las muestras.



Gel colocado en la fuente de poder a 100v durante 40 minutos.

**Anexo 5.** Caracterización morfológica de la roya blanca bajo microscopio.



Mediciones realizadas a 40X con ayuda de un micrómetro ocular.

**Anexo 6.** Medición de 50 pústulas, esporangios, zoosporas y oosporas.

<b>Número</b>	<b>Pústulas (µm)</b>	<b>Esporangios (µm)</b>	<b>Zoosporas (µm)</b>	<b>Oosporas (µm)</b>
<b>1</b>	31,1	15,8	9,9	15,8
<b>2</b>	29,8	15,8	9,9	15,8
<b>3</b>	22,7	13,8	11,8	17,7
<b>4</b>	28,0	13,8	9,9	17,7
<b>5</b>	27,1	15,8	7,9	19,7
<b>6</b>	23,3	13,8	7,9	13,8
<b>7</b>	21,7	13,8	7,9	13,8
<b>8</b>	69,9	13,8	11,8	15,8
<b>9</b>	26,8	13,8	11,8	17,7
<b>10</b>	31,1	15,8	9,9	13,8
<b>11</b>	35,2	13,8	7,9	19,7
<b>12</b>	23,3	15,8	11,8	17,7
<b>13</b>	35,3	15,8	9,9	21,7
<b>14</b>	34,6	15,8	7,9	15,8
<b>15</b>	36,7	15,8	7,9	17,7
<b>16</b>	37,3	13,8	11,8	17,7
<b>17</b>	14,8	15,8	9,9	19,7
<b>18</b>	13,7	13,8	9,9	19,7
<b>19</b>	15,3	13,8	11,8	15,8
<b>20</b>	22,5	13,8	7,9	21,7
<b>21</b>	67,0	15,8	11,8	15,8
<b>22</b>	20,2	17,7	11,8	15,8
<b>23</b>	22,7	15,8	7,9	13,8
<b>24</b>	25,6	15,8	9,9	17,7
<b>25</b>	28,8	13,8	11,8	17,7

<b>26</b>	29,1	15,8	7,9	19,7
<b>27</b>	33,3	13,8	9,9	19,7
<b>28</b>	36,3	13,8	11,8	17,7
<b>29</b>	17,1	13,8	7,9	17,7
<b>30</b>	37,4	13,8	7,9	15,8
<b>31</b>	28,1	15,8	9,9	17,7
<b>32</b>	45,0	15,8	11,8	13,8
<b>33</b>	24,4	13,8	11,8	21,7
<b>34</b>	23,3	15,8	11,8	17,7
<b>35</b>	26,4	13,8	9,9	15,8
<b>36</b>	17,7	13,8	9,9	17,7
<b>37</b>	35,7	15,8	11,8	17,7
<b>38</b>	24,9	15,8	7,9	17,7
<b>39</b>	24,6	13,8	7,9	19,7
<b>40</b>	21,0	15,8	7,9	17,7
<b>41</b>	38,8	13,8	9,9	15,8
<b>42</b>	46,6	13,8	11,8	17,7
<b>43</b>	25,2	15,8	11,8	19,7
<b>44</b>	23,3	15,8	9,9	17,7
<b>45</b>	31,5	15,8	7,9	19,7
<b>46</b>	14,6	15,8	9,9	21,7
<b>47</b>	37,7	13,8	7,9	17,7
<b>48</b>	12,8	13,8	11,8	17,7
<b>49</b>	37,0	13,8	9,9	15,8
<b>50</b>	26,1	15,8	9,9	19,7
<b>Promedio</b>	29,2	14,8	9,9	17,6

**Anexo 7.** Inoculación en hojas sanas de diferentes variedades de girasol.



Germinación de las diferentes variedades de girasol.



Plántulas trasplantadas en macetas para su posterior inoculación.



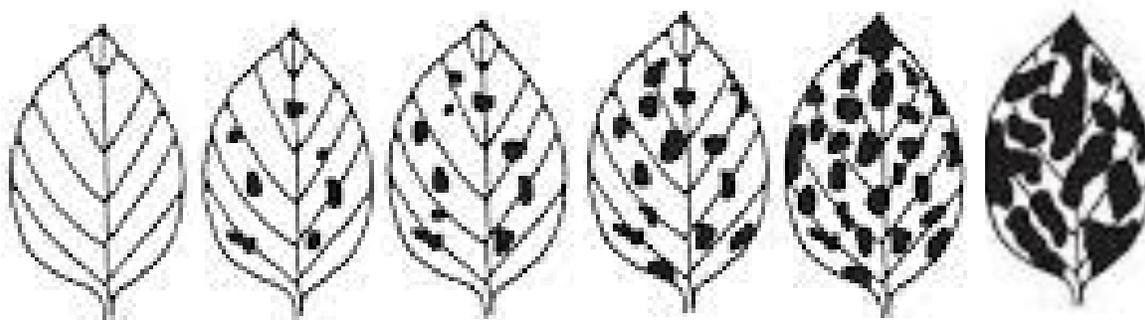
Inoculación de las plantas con una suspensión de  $10^4$  de esporas obtenidas a partir de pústulas de roya blanca.



Observación de los primeros síntomas de la enfermedad.

**Anexo 8.** Escala y diagrama utilizada para medir el índice de infección de la roya blanca en el girasol.

ESCALA	HOJA (% daño)
0	Sano, sin síntomas visibles
1	0.5 – 1 % de área afectada
2	1 – 5 % de área afectada
3	6 – 20 % de área afectada
4	21 – 50 % de área afectada
5	> 50 % de área afectada



**Anexo 9.** Fórmula utilizada para medir el índice de infección de la roya blanca en el girasol.

$$I.I. (\%) = \frac{\sum a * b}{N * T} * 100$$

a = grados de la escala

b = número de hojas

N = número de grados

T = total de hojas por planta