

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA A *Peronospora destructor* (Berk.) Casp. EN EL  
GERMOPLASMA LOCAL DE CEBOLLA

por

Paula Lisette COLNAGO VIEYTO

TESIS presentada como uno de los requisitos para  
obtener el título de Magister en Ciencias Agrarias  
opción Ciencias Vegetales

MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2010

Tesis aprobada por:

-----  
Nombre completo y firma

-----  
Nombre completo y firma

-----  
Nombre completo y firma

-----  
Nombre completo y firma

Fecha: -----

Autor: -----  
Nombre completo y firma

Director: -----  
Nombre completo y firma

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecer al Ing. Agr. PhD. Guillermo Galván, quien dirigió esta tesis. Por su dedicación, compromiso, pero fundamentalmente por su calidez y vocación docente en la tarea.

Al Ing. Agr. MSc. Pablo González del departamento de Protección Vegetal de la facultad, por su participación activa en la dirección de los aspectos de fitopatología vinculados a la tesis y por su permanente apoyo durante todo el trabajo.

Al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, por facilitarme parte de su infraestructura para poder llevar adelante algunas etapas de la tesis.

A todos los funcionarios de la Unidad de Horticultura del Centro Regional Sur, Víctor, Natalia, Quito, Adriana y Jara que apoyaron las tareas de campo.

Quiero agradecer también a todos mis compañeros de horticultura, Margarita, Fernanda, Santiago, Luis, Ana Cecilia, Tato, Cecilia, Héctor, Sebastián, Julio, Mariana, Bruno, Franca y Carlos, por el apoyo y aliento brindado durante este tiempo.

A Manuel y Joan, con quienes compartí el trabajo de campo y varias charlas.

Finalmente a mi esposo José Pedro y a mis hijos, Guillermo y Catalina, por su tiempo, su amor y su apoyo.

## TABLA DE CONTENIDO

	Páginas
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	IV
RESUMEN.....	V
SUMMARY.....	VI
<u>1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....</u>	<u>1</u>
1.1. EL CULTIVO DE CEBOLLA EN URUGUAY.....	1
1.2. MILDIÚ: EL AGENTE CAUSAL Y LA ENFERMEDAD.....	2
1.3. MODELOS DE PROGRESO DE LA ENFERMEDAD.....	3
1.4. EL PATOSISTEMA <i>Allium cepa</i> – <i>Peronospora destructor</i> .....	5
1.5. ESTRATEGIAS DE CONTROL.....	6
1.6. RESPUESTAS DIFERENCIALES EN EL GERMOPLASMA LOCAL DE CEBOLLA.....	7
1.7. OBJETIVOS.....	10
<u>2. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA A <i>Peronospora destructor</i> BERK. (CASP.) EN EL GERMOPLASMA LOCAL DE CEBOLLA.....</u>	<u>11</u>
RESUMEN.....	11
SUMMARY.....	12
2.1. INTRODUCCIÓN.....	13
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
2.3. RESULTADOS.....	20
2.4. DISCUSIÓN.....	35
<u>3. AJUSTES METODOLÓGICOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A <i>Peronospora destructor</i> EN CONDICIONES CONTROLADAS.....</u>	<u>43</u>
3.1. INTRODUCCIÓN.....	43
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
3.3. RESULTADOS.....	51

3.4. DISCUSIÓN.....	56
<u>4. CONCLUSIONES.....</u>	<u>59</u>
<u>5. BIBLIOGRAFÍA.....</u>	<u>60</u>
<u>6. ANEXOS.....</u>	<u>65</u>

## ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	<b>Cuadros</b>	<b>Pág.</b>
<b>1</b>	Materiales genéticos evaluados en ensayos a campo. Año 2007 y 2008.	17
<b>2</b>	Incidencia, área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC), y severidad de <i>P. destructor</i> , para 27 poblaciones locales y los cultivares INIA Colorada y Pantanoso del Sauce CRS. Año 2007.	22
<b>3</b>	Estimaciones de los parámetros de las curvas según grupos por ciclo fenológico.	26
<b>4</b>	Significancia estadística de la comparación entre curvas de progreso de la incidencia de <i>Peronospora destructor</i> para los materiales genéticos evaluados, agrupados por ciclo.	26
<b>5</b>	Contrastes significativos entre pares de curvas de progreso de la incidencia de <i>Peronospora destructor</i> , dentro de cada grupo fenológico, para el ensayo 2007.	27
<b>6</b>	Diferencias en la incidencia a <i>P. destructor</i> , método Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ) y severidad para 12 poblaciones locales y los cultivares INIA-Fagro Dulce, INIA Casera, Pantanoso del Sauce CRS y Canarita CRS. Año 2008.	30
<b>7</b>	Contrastes LRT ( $p < 0.05$ ) y rango según fecha de evaluación de la severidad de <i>P. destructor</i> . Ensayos 1 y 2, 2008.	31
<b>8</b>	Descripción de los ensayos de 2008 (1, 2 y 3) y 2009 (4).	50
<b>9</b>	Presencia de manchas y o esporulación de <i>P. destructor</i> en función de los días post inoculación según tratamiento	53
<b>10</b>	Evaluación de la incidencia, severidad y esporulación observada en el material vegetal inoculado con <i>P. destructor</i> .	56

<b>Figuras</b>	<b>Pág.</b>
<b>1</b> Curvas de progreso de la enfermedad (evolución de la incidencia de <i>P. destructor</i> ) y AUDPC para cinco accesiones evaluadas en 2007 que tuvieron comportamientos diferentes: UR9104, UR8209, UR9704, UR9718 y UR8709.	21
<b>2</b> Correspondencia en la evaluación a campo entre la incidencia de <i>P. destructor</i> evaluada el 9 de Noviembre, y la severidad evaluada el 22-24 Noviembre 2007, para 27 poblaciones locales, INIA Colorada y Pantanoso del Sauce CRS. Las accesiones de mayor resistencia se destacaron con un círculo punteado.	23
<b>3</b> Curvas de progreso de la enfermedad (a partir de datos de incidencia) según diferencias en el ciclo fenológico (DC, DI y DL) y significancia estadística entre las curvas.	24
<b>4</b> Evolución de la incidencia (izquierda) y de la severidad (derecha) a <i>P. destructor</i> en cuatro poblaciones locales del ensayo 1 (arriba) y del ensayo 2 (abajo), 2008.	29
<b>5</b> Duración en horas de las condiciones de humedad y temperatura favorables a <i>P. destructor</i> de setiembre a diciembre. Años 2007 (superior) y 2008 (inferior).	32
<b>6</b> Incidencia de <i>P. destructor</i> y duración del período en horas en que las condiciones de humedad y temperatura estuvieron en el rango óptimo para la infección con <i>P. destructor</i> en 2007 (superior) y 2008 (inferior).	34
<b>7</b> Macetas en cámara de crecimiento. Vaporizadores domésticos (izquierda), nebulizadores (centro), vista con vaporizadores en funcionamiento (derecha).	46
<b>8</b> Plantas en macetas inoculadas en el ensayo 2 (izquierda), y hojas sueltas inoculadas en el ensayo 3 (centro y derecha).	48
<b>9</b> Vista general del ensayo 4 de inoculación con <i>P. destructor</i> en condiciones controladas.	51
<b>10</b> Síntomas observados en el ensayo 4.	54
<b>11</b> Síntomas observados en el ensayo 4 a los 21 d.d.i.	55

## RESUMEN

El mildiú causado por *Peronospora destructor* constituye una de las enfermedades de mayor importancia económica en la producción de cebolla en el mundo. El desarrollo de cultivares con resistencia genética es una alternativa tendiente a disminuir el uso de agrotóxicos, que disminuye la contaminación del medio ambiente y protege la salud humana. En Uruguay, se han observado diferencias del germoplasma local y cultivares en la respuesta ante la enfermedad. Las diferencias en el desarrollo de la enfermedad podrían ser consecuencia de diferencias en la tasa de infección y/o en el período de latencia. El objetivo general de este trabajo fue identificar fuentes de resistencia en el germoplasma local de cebolla. Se realizaron ensayos a campo en 2007 y 2008, evaluando en total 34 poblaciones locales, cinco cultivares y una población avanzada de mejoramiento. Se evaluó semanalmente la incidencia de *P. destructor*, se ajustó una ecuación logística para los datos y se calculó el Área debajo de la Curva de Progreso de la Enfermedad (AUDPC). La severidad fue evaluada una vez en 2007 y en tres momentos en 2008. En 2007, el germoplasma local mostró diversidad en la incidencia de la enfermedad (3 a 99%), en la severidad (7 a 40% del área foliar afectada) y en el AUDPC. Los materiales evaluados en 2008 mostraron diferencias de menor magnitud. Se encontró relación entre el ciclo fenológico y la resistencia. El grupo de materiales de día largo presentó mayor resistencia que los grupos de día intermedio y de día corto. Este comportamiento podría ser el resultado de factores de resistencia específicos, o de diferencias fisiológicas relacionadas al estado de desarrollo en el momento en que se da el ataque de *P. destructor*. La evolución de la enfermedad en 2008 fue muy variable. La incidencia y la severidad presentaron una caída brusca en una fecha de evaluación, y un pico posterior en la que se alcanzaron valores cercanos a 100%. Se realizaron ensayos de ajuste metodológico para mantener *P. destructor* en condiciones controladas. Se evaluaron distintas formas de recolección de la muestra, preparación del inóculo, técnicas de inoculación, material a inocular y distintas condiciones ambientales luego de la infección. Se logró infección utilizando planta entera e inoculación en seco sobre la superficie de la hoja previamente mojada. La diversidad observada en la respuesta a *P. destructor*, confirma el potencial del germoplasma local para ser usado como fuente de resistencia en el mejoramiento de cebolla.

**Palabras claves:** *Allium cepa*, Germoplasma local, *P. destructor*, Resistencia parcial.



## SUMMARY

Downy mildew caused by *Peronospora destructor* is an important disease worldwide. The development of resistant cultivars is a strategy to control this disease which would reduce the use of chemicals, while save the environment and people's health. In Uruguay, landraces and cultivars presented differences in the response to downy mildew in field conditions. This could be the result of difference in infection rate or latent period. This research aimed to identify sources of resistance to downy mildew in the local onion germoplasm. Field trails were conducted in 2007 and 2008, in which 34 landraces, five cultivars and one advanced population were assessed. The proportion of plants with sporulation or typical downy mildew spots was evaluated once a week and data was integrated in a logistic model to calculate the Area Under Disease Progress Curve (AUDPC). Disease severity was assessed once in 2007 and three times in 2008. In 2007, local germoplasm differed in the disease incidence (3 to 99%), severity (7 to 40% of infected leaf area), and AUDPC. Accessions assessed in 2008 showed differences as well, but smaller than in 2007. Resistance and growing cycle were related. Long-day accessions were more resistant than intermediate and short-day accessions. This behavior could involve either specific resistance factors or could be the result of physiological differences related to developmental stage for each accession when infections with *P. destructor* take place. Evolution of disease was very variable in 2008. The disease incidence decreased in one evaluation date, and increased markedly the week after up to achieve 100% of infected plants for most accessions. Inoculations under controlled environmental conditions were carried out to maintain *P. destructor* and evaluate components of resistance in different accessions. Different ways of collecting inoculum, preparing the inoculum, inoculation techniques, whole plant versus detached leaves, and different environmental conditions were evaluated. Downy mildew infection was observed using whole plants and dry sporulation distributed as inoculum on the leaf surface previously wet. Large diversity in the response to *P. destructor* confirms the value of onion local germoplasm to be used as resistance source in onion breeding.

**Key words:** *Allium cepa*, Local germplasm, Partial resistance, *P. destructor*.

## INTRODUCCIÓN

### 1.1. El cultivo de cebolla en Uruguay

La cebolla (*Allium cepa* L.) es un cultivo de importancia dentro de la horticultura nacional. Se encuentra en tercer lugar por su Valor Bruto de Producción luego de la papa y el tomate. Ocupa una superficie de 2100 has de unas 10000 has destinadas a la horticultura, no considerando la papa (MGAP-DIEA, 2009). El 80% se cultiva en el sur del país, fundamentalmente en el departamento de Canelones, y el 20% restante en la región norte, en Salto principalmente. Unos 2000 productores cultivan este rubro, en su mayoría productores familiares con una superficie promedio de 1 hectárea por productor.

Ligado a la lógica de producción familiar, la producción artesanal de semillas constituye una actividad importante en los predios, y la utilización de poblaciones locales (variedades criollas) es alta. Las poblaciones locales de cebolla involucraron un 74% de los productores en 2004, con una superficie cultivada de más del 50% (MGAP-DIEA, 2007). Por otro lado, existen programas nacionales de mejoramiento genético de cebolla y de producción de semilla certificada. Unas 700 has (33%) son sembradas con semilla procedente de estos programas.

La cebolla es una especie bienal que completa su ciclo de desarrollo en dos años. Su reproducción es alógama, con flores hermafroditas que presentan protandria. La polinización es entomófila y es habitual el uso de abejas en condiciones comerciales de producción de semillas. Para la formación del bulbo, la especie tiene respuesta cualitativa al fotoperíodo. Esta fuerte respuesta al fotoperíodo lleva a que la producción y la cosecha de cebolla sea estacional, y que se realice el abastecimiento todo el año en base a la combinación de zonas de producción y la conservación poscosecha. Cada cultivar requiere superar un umbral de fotoperíodo mínimo para inducirse a bulbificar. Esto lleva a la clasificación de los distintos materiales genéticos disponibles según la cantidad de horas que requieren para dar lugar a esta etapa del desarrollo. Los cultivares utilizados en el país se clasifican arbitrariamente como de Día Corto (DC), Intermedio

(DI) o Largo (DL) en función de su respuesta al fotoperíodo. Si bien no existe investigación nacional sobre este punto, se estima que estos grupos requieren entre 10-12 horas, 12-13 horas, y más de 13 horas respectivamente (Galván, G. 2009. com. pers.).

## **1.2. Mildiu: el agente causal y la enfermedad**

El cultivo de cebolla es afectado por varias enfermedades foliares. En las condiciones agroclimáticas de Uruguay, *Botrytis squamosa*, *Alternaria porri*, *Stemphylium vesicarium* y *Peronospora destructor* son las que aparecen con mayor frecuencia y para las que se justifican las medidas de control utilizadas por los productores (González Idiarte H. *et al*, 2008).

El mildiu de la cebolla causado por *Peronospora destructor* (Berk.) Casp. constituye una de las enfermedades de mayor importancia económica en la producción de cebolla en el mundo. La infección puede causar reducciones del rendimiento del 30% al 70% (Yarwood, C.E. 1943, Van Doorn, A.M. 1959). En Uruguay actualmente constituye la enfermedad foliar de mayor importancia, tanto en la producción comercial de bulbos como en la producción de semilla. Investigaciones nacionales en semilleros de cebolla detectaron una reducción en el rendimiento de semilla por planta en el orden de 30% cuando el tejido afectado fue superior al 25-50% del área del escapo (González Idiarte, H. *et al*, 2008).

*Peronospora destructor* es un parásito obligado y pertenece al Reino *Chromista*, phylum *Oomycota*, clase *Oomycete*. Es causante de una enfermedad cuya sintomatología característica es la aparición en las hojas de áreas ovales o cilíndricas de color verde-amarillo pálido a café. Estas manchas típicas también aparecen en escapos florales durante la etapa reproductiva. Inicialmente los síntomas pueden aparecer en las hojas adultas, y se observa una mancha alargada y pálida sin brillo (Schwartz, H.F. y Mohan, S.K. 2008). Cuando las condiciones ambientales son favorables al desarrollo de la enfermedad, se observa esporulación sobre las hojas infectadas, de color gris a violeta

y éstas se tuercen y mueren. Se cita también que *P. destructor* puede sobrevivir en restos de cultivo, en bulbos o semillas infectadas (Schwartz, H.F. y Mohan, S.K. 2008; Agrios, G.N. 2005; Maude, R.B. 1990). Si bien la transmisión de *P. destructor* por semilla no se ha confirmado en condiciones nacionales, la frecuente observación de plantas con poco vigor, tamaño reducido, con hojas deformadas que rápidamente se cubren de esporas y que sirven como fuente de inóculo para el resto del cultivo podrían ser consecuencia de la infección de las semillas (Maeso, D. 2005).

### 1.3. Modelos de progreso de la enfermedad

El desarrollo de una epidemia es el resultado de la acción conjunta de las características del hospedero (nivel de resistencia al patógeno, susceptibilidad según momento del ciclo de crecimiento y desarrollo, uniformidad genética de la población), las características del patógeno (virulencia, cantidad de inóculo, tipo de reproducción) y del ambiente (temperatura y humedad relativa fundamentalmente). Es importante la consideración del tiempo durante el que transcurren los diferentes eventos, ya que las condiciones climáticas, el estado de crecimiento cuando el hospedero y patógeno coexisten, así como la duración del ciclo de la infección de cada enfermedad en particular, determinarán la cantidad de enfermedad resultante.

El patrón de una epidemia en términos de número de lesiones, cantidad de tejido afectado o número de plantas enfermas puede ser representado a través de una curva que muestra el progreso de la epidemia en el tiempo, llamada *curva de progreso de la enfermedad*. El punto de origen y la forma de la curva dan información acerca del momento de aparición y la cantidad de inóculo, así como de cambios en la susceptibilidad del hospedero durante la estación de crecimiento. Si bien las curvas de progreso de enfermedad varían (por ejemplo con el clima, las variedades utilizadas y la localidad), son características para algunos grupos de enfermedades. Por ejemplo, la curva de saturación es característica de enfermedades monocíclicas, la curva sigmoide

típica de enfermedades policíclicas, y la bimodal para enfermedades que afectan distintos órganos de la planta (Agrios, G.N. 2005).

A partir de las curvas de progreso de la enfermedad puede obtenerse la tasa de crecimiento de la enfermedad ( $r$ ). Ésta representa el incremento o descenso de la enfermedad por unidad de tiempo (días, semanas). Los patrones de las tasas de epidemias son dados por curvas de tasas, y son distintas para distintos grupos de enfermedades. Para poder comparar las epidemias es frecuente la transformación matemática de las curvas en líneas rectas. La pendiente de estas rectas se usa para calcular la tasa de incremento de la enfermedad (Agrios, G.N. 2005). En enfermedades monocíclicas, el inóculo inicial cobra fundamental importancia, y el incremento de la tasa de la enfermedad es afectado por los factores ambientales y prácticas culturales que influyen en la resistencia del hospedero y la virulencia del patógeno. Para enfermedades policíclicas, si bien el inóculo inicial tiene gran importancia, el número final de ciclos de infección al que se llega es más relevante. Los mismos factores que afectan las enfermedades monocíclicas (manejo y ambiente sobre el hospedero y el patógeno) y que determinan diferencias en la dispersión, penetración, multiplicación y tamaño de la lesión, entre otros, determinan en los patógenos policíclicos el número de ciclos de infección que tendrá lugar durante la estación de crecimiento.

*P. destructor* es un patógeno policíclico. Para describir el comportamiento de epidemias causadas por este tipo de patógeno, el modelo logístico es el que mejor se ajusta al desarrollo observado de la enfermedad. A diferencia de un modelo exponencial, éste asume que cuando el número de lesiones fúngicas crece, los sitios disponibles para nuevas lesiones disminuyen, por lo que la ecuación incluye un factor de reducción densidad-dependiente. Se asume que la tasa de crecimiento relativo (TCR) decrece linealmente con el tamaño de población:

$$\frac{dY}{dt} = r \times Y \times \frac{1 - Y}{Y_m}$$

donde la tasa de crecimiento instantánea ( $dY/dt$ ) es igual a la tasa de crecimiento bajo condiciones no limitantes ( $r * Y$ ) multiplicado por un factor de reducción,  $(1-Y)/Y_m$ . El parámetro  $Y_m$  es el máximo tamaño posible de población (evaluado en este trabajo como incidencia y severidad de la enfermedad). En el modelo logístico de crecimiento de la población,

$$Y_t = \frac{Y_m}{1 + K \times e^{-rt}}$$

se asume que el efecto de la densidad de la población del patógeno sobre el crecimiento de esa misma población es instantáneo. Esto es una deficiencia del modelo, ya que en las poblaciones de patógenos existen distintos tiempos biológicos, como por ejemplo el período de latencia (Rabbinge, R. *et al.*, 1989).

No siempre los modelos son apropiados para describir el progreso de la enfermedad. La combinación de factores en el cultivo, incluyendo el crecimiento del hospedero, puede resultar en una curva de progreso de la enfermedad que declina antes que la cosecha, o en un momento dado durante la epidemia por cambios repentinos en el hospedero. Métodos alternativos como el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC) o el análisis de varianza con el tiempo como factor de análisis, pueden ser útiles. El AUDPC representa la cantidad de enfermedad integrada entre dos momentos de tiempo definidos. Es un descriptor válido de la epidemia donde se asume que el daño generado al hospedero es relativo a la cantidad y duración de la epidemia (Campbell, C.L. 1998).

#### **1.4. El patosistema *Allium cepa* – *Peronospora destructor***

*Peronospora destructor* produce zoosporas en zoosporangios (esporas asexuales) y oosporas (sexuales). Estas últimas pueden sobrevivir en el suelo y constituyen el inóculo inicial de próximas epidemias. *P. destructor* sobrevive en variedades de cebolla que son cultivadas todo el año y en los residuos de cosecha. Se cita también que *P.*

*destructor* puede sobrevivir en restos de cultivo, en bulbos o semillas infectadas (Schwartz, H.F. y Mohan, S.K. 2008; Agrios, G.N. 2005; Maude, R.B. 1990).

La esporulación requiere temperaturas en el rango entre 4.7 y 20.6 °C, humedad relativa igual o superior a 95% y oscuridad (Hildebrand, P.D. y Sutton, J.C. 1982). Ocurre durante la noche cuando las condiciones predisponentes a la misma se prolongan por más de seis horas. Las zoosporas son liberadas durante el día, pero la relación entre las variables ambientales y la liberación de esporas aun no están determinadas. Durante el ciclo de cultivo, las zoosporas son llevadas por el viento, medio por el cual alcanzan a infectar nuevas plantas. Las zoosporas pueden sobrevivir un día post liberación, o tres a cinco días mientras están en el zoosporangióforo (Hildebrand, P.D. y Sutton, J.C. 1982, Leach, C.M. *et al.* 1982). La infección ocurre con agua libre sobre la hoja, y temperatura en el rango entre 1 y 25°C (óptima en el entorno de 13°C). La infección requiere de 2 a 6 horas si las temperaturas se encuentran en el rango de 3–14°C, período que aumenta si las temperaturas son más altas. Luego de la infección, el período de latencia para que ocurra esporulación abundante es de 10 a 16 días. La infección podría ocurrir en el mismo período de humedad en el que se produjo la esporulación, o durante la siguiente noche (Hildebrand, P.D. y Sutton, J.C. 1982).

### **1.5. Estrategias de Control**

A las pérdidas de rendimiento causadas por *P. destructor*, se suman los gastos que se realizan en la aplicación de tratamientos químicos. Debido al uso incorrecto de los productos químicos comerciales disponibles para su control, no se logra un control exitoso, por lo que existe un alto uso de agrotóxicos con riesgos para el ambiente y para el agricultor sin alcanzar la eficacia deseada.

En el afán de disminuir y racionalizar la aplicación de fitosanitarios para esta enfermedad, se ha evaluado en Uruguay el sistema de pronóstico *Downcast*, originario de Canadá. *Downcast* determina períodos de riesgo de esporulación en base a valores

diarios de temperatura promedio diurna y nocturna, lluvia y períodos con humedad relativa mayores a 95% (Hildebrand, P.D. y Sutton, J.C. 1984; Maeso, D. 2000).

Algunos de los factores considerados en la adaptación de los sistemas de alarma a las condiciones nacionales fueron el estado fenológico (edad a partir de la cual el huésped es más susceptible) y la susceptibilidad varietal. Mediante este sistema de pronóstico se logra un control preventivo de la enfermedad a la vez que disminuye el número de aplicaciones realizadas. Sin embargo, las condiciones ambientales predisponentes para la enfermedad ocurren muy frecuentemente en Uruguay. Esto llevó a que solo se eliminaran dos o tres aplicaciones en comparación con el sistema calendario, por lo que el número de aplicaciones en la estación sigue siendo alto.

La resistencia genética es una forma de control económica y ambientalmente amigable. Dentro de la base genética del cultivo no se dispone de fuentes de resistencia completa a *P. destructor*. Por el contrario, *Allium roylei* Stearn, una especie emparentada, presenta resistencia completa a *P. destructor* (Van der Meer, Q.P. y Vries, J.N. 1990). La resistencia de *A. roylei* es independiente de la densidad del inóculo, del período de latencia y de la edad de la planta (Kofoet, A. y Zinkernagel, V. 1989). El cruzamiento con *A. cepa* es viable, y el híbrido interespecífico resultante es resistente (Kofoet, A. *et al.*, 1990). Si bien se han logrado avances, existen barreras interespecíficas que dificultaron la introgresión (Alan, A.R. *et al.*, 2003; Scholten, O.E. *et al.*, 2007). A la fecha, no se ofrecen aun cultivares resistentes comercialmente.

### **1.6. Respuestas diferenciales en el germoplasma local**

Aunque se carece de evaluaciones cuantitativas sistemáticas, en Uruguay, en condiciones de producción se han observado diferencias dentro del germoplasma local y entre cultivares en la respuesta ante la enfermedad. Cuando se observan respuestas cuantitativamente distintas entre variedades de hospederos, puede tratarse de resistencia parcial. La identificación de fuentes de resistencia parcial permitiría su explotación



posterior en el mejoramiento genético. Diferencias bioquímicas, fisiológicas, morfológicas o anatómicas pueden contribuir a la variación total observada. El efecto general de la resistencia parcial es reducir la tasa de infección con cualquier combinación de factores ambientales (Vanderplank, J.E. 1984). Si bien puede asumirse que no hay resistencia post-infección en *Allium cepa*, algunos mecanismos pre-infección morfológicos como la disposición de hojas erectas, podrían reducir la deposición de agua en hojas y consecuentemente la tasa de infección en el campo (Kofeet, A. y Zinkernagel, V. 1989). Esto resultaría en una reducción del desarrollo de la epidemia a pesar de un tipo de infección susceptible, a la vez que en esquemas de integración de las medidas de control, posibilitaría al menos reducir el número de aplicaciones actualmente realizado para el control de la enfermedad, dado que los procesos de penetración, crecimiento y reproducción del patógeno son menos exitosos en una planta menos susceptible.

Los patógenos liberan una variedad de sustancias al medio que actúan como efectores no específicos de reconocimiento del hospedero. En varias combinaciones hospedero-patógeno, los patógenos emiten efectores para un hospedero específico, llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Los PAMPs delatan la presencia del patógeno al sistema inmune de la planta. Una vez que se da la reacción de reconocimiento (efectores del patógeno con receptores del hospedero), tienen lugar una serie de reacciones bioquímicas y de cambios estructurales para detener al patógeno (Jones, J.D.C. y Dangl, J.L. 2006; Dangl J.L. y Jones, J.D.C. 2001). La rapidez y la efectividad con que las plantas reconozcan la presencia del patógeno, determinará cuánto el patógeno se desarrollará y qué tan severos serán los síntomas antes de que las defensas de las plantas frenen su avance. Sustancias inhibitorias del patógeno producidas por la planta son movilizadas hacia el punto de ataque del patógeno. Algunas son solo intra-celulares, pero en varios casos la señal también es transmitida a células adyacentes y aparentemente señales de alarma son transmitidas a toda o casi toda la planta. La naturaleza química de esto no es certeramente conocida en cada combinación patógeno-

hospedero, pero parece involucrar proteínas quinasas, iones calcio, ATPasas y otras. Estas resistencias sistémicas involucran al ácido salicílico, ácido jasmónico, etileno y otros (Jones, J.D.C. y Dangl, J.L. 2006; Agrios, G.N. 2005).

En la resistencia parcial o cuantitativa, las plantas dependen de la acción de numerosos genes que se expresan constitutivamente y/o tras el ataque de un patógeno, y que frenan o enlentecen el avance del patógeno en los tejidos, reduciendo el daño generado. Los genes involucrados en resistencia cuantitativa parecen estar vinculados a la producción o expresión de defensas estructurales o bioquímicas (Agrios, G.N. 2005). Algunos componentes de la resistencia parcial son el período de latencia, la frecuencia de infecciones y la producción de esporas. Aunque estos componentes se pueden medir en una prueba monocíclica en condiciones controladas, el nivel de resistencia parcial sólo puede determinarse directamente en experimentos policíclicos a campo. Los resultados deben correlacionarse bien con los componentes de la resistencia medida en condiciones controladas. El nivel de resistencia parcial es, en general, específico para algunas especies de patógenos, pero tiene más o menos igual efectividad contra todos los genotipos del patógeno, por lo que es resistencia no específica a la raza. En algunos casos se ha visto interacción diferencial (hospedero-raza), donde la relación es de gen menor a gen menor. En general es un carácter cuantitativo debido a genes (QTL) con pequeños efectos. La definición de resistencia parcial no implica que la herencia siempre sea poligénica. Algunas resistencias que se heredan monogénicamente producen una reducción cuantitativa en el desarrollo de la epidemia a pesar de que ocurra una reacción compatible (Niks, R.E. y Lindhout, W.H. 2004; Agrios, G.N. 2005).

La edad es otro factor de la planta que afecta todos los componentes de la resistencia, excepto posiblemente la resistencia a la infección (la proporción de esporas que establezcan lesiones). En cada sistema patógeno-hospedero el efecto de la edad de la planta puede manifestarse de distinta forma. Por ejemplo, la resistencia horizontal para el “tizón tardío” causado por *Phytophthora infestans* en papa es mayor a “mediana edad”, y las plantas se convierten en más susceptibles a medida que envejecen. En el

caso de la enfermedad de la cebada causada por *Erysiphe graminis*, la susceptibilidad de planta joven es seguida de resistencia de planta adulta (Vanderplank, J.E. 1984; Pierre, M. *et al.*, 2007).

### **1.7. Objetivos**

Esta tesis tuvo por objetivo general identificar fuentes de resistencia a *Peronospora destructor* en el germoplasma local de cebolla.

Los objetivos específicos dentro de este trabajo comprendieron:

- 1) Determinar si existen diferencias dentro del germoplasma local en la respuesta a *Peronospora destructor*.
- 2) Identificar factores que determinan las diferencias en el germoplasma local.
- 3) Ajustar una metodología para las evaluaciones de resistencia en condiciones controladas.

## 2

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA A *Peronospora destructor* Berk. (Casp.)  
EN EL GERMOPLASMA LOCAL DE CEBOLLA<sup>1</sup>****Resumen**

El mildiú causado por *Peronospora destructor* constituye una de las enfermedades de mayor importancia económica en la producción de cebolla en el mundo. El objetivo de este trabajo fue identificar fuentes de resistencia en el germoplasma local de cebolla. Se realizaron ensayos a campo en 2007 y 2008 en los que se evaluaron en total 34 poblaciones locales, cinco cultivares y una población avanzada de mejoramiento. La proporción de plantas con esporulación o manchas típicas causadas por *P. destructor* se evaluó semanalmente, se ajustó una ecuación logística a los datos y se calculó el Área debajo de la Curva de Progreso de la Enfermedad (AUDPC). La severidad se evaluó una vez en 2007, y tres veces en 2008. El germoplasma local mostró diversidad en la proporción de plantas con síntomas típicos (3 a 99%), en la severidad (7 a 40% del área foliar afectada) y en el AUDPC. Los materiales evaluados en 2008 también mostraron diferencias, aunque de menor magnitud. Se encontró relación entre el ciclo fenológico y la resistencia. El grupo de accesiones de día largo presentó mayor resistencia que los grupos de día intermedio y de día corto. Esto podría ser el resultado de factores de resistencia específicos presentes en el germoplasma de día largo, o de diferencias fisiológicas relacionadas al estado de desarrollo que condicionan la susceptibilidad al patógeno. En 2008, la evolución de la enfermedad fue muy variable. La proporción de plantas con esporulación y manchas típicas de *P. destructor* cayó bruscamente en una evaluación, y subió a la semana siguiente hasta 100% de las plantas para la mayoría de las accesiones. Dentro del germoplasma de día intermedio, también se observaron variaciones significativas en la respuesta a *P. destructor*. La diversidad observada en la respuesta a *P. destructor* confirma el potencial del germoplasma local para ser usado como fuente de resistencia en el mejoramiento de cebolla.

**Palabras claves:** *Allium cepa*, Ciclo fenológico, Germoplasma local, *Peronospora destructor*, Resistencia parcial, Epidemiología.

---

<sup>1</sup> Este capítulo será enviado a *Agrociencia* para ser publicado como: Colnago, P., González, P. H., Noguez, M., Bentancur, O. y Galván, G. A. Evaluación de la respuesta a *Peronospora destructor* Berk (Casp.) en el germoplasma local de cebolla.

### Summary

Downy Mildew caused by *Peronospora destructor* is an important disease in Uruguay and worldwide. This research aimed to identify resistance sources to downy mildew in the local onion germplasm. Field trials were conducted in 2007 and 2008, in which 34 landraces, five cultivars and one advanced breeding population were assessed. The proportion of plants with sporulation or typical symptoms for downy mildew was evaluated once a week, data was integrated in a logistic model, and the Area Under Disease Progress Curve (AUDPC) was calculated. Disease severity was assessed once in 2007 and three times in 2008. Local germplasm showed differences in the proportion of diseased plants (3 to 99%), severity (7 to 40% of infected leaf area) and AUDPC. Accessions assessed in 2008 showed differences as well, but smaller than in 2007. Resistance and growing cycle were related. Long-day accessions showed more resistance than intermediate- and short-day accessions. This behavior could involve either specific resistance factors or could be the result of physiological differences related to developmental stage for each accession when infections with *P. destructor* take place. In 2008 evolution of disease was very variable. The presence of sporulation and typical downy mildew spots decreased in one evaluation date, and increased markedly the week after up to achieve 100% of infected plants for most accessions. Significant differences in the response to *P. destructor* were also observed among intermediate-day accessions. Diversity observed in the response to *P. destructor*, confirm the potential value of local germplasm to be used as resistance source in onion breeding.

**Key words:** *Allium cepa*, Phenological cycle, Local germplasm, *Peronospora destructor*, Partial resistance, Epidemiology,

## 2.1. Introducción

La cebolla (*Allium cepa* L.) es un cultivo de importancia dentro de la horticultura nacional, ocupando el tercer lugar por su Valor Bruto de Producción luego de la papa y el tomate. La utilización de poblaciones locales que se mantienen mediante la multiplicación artesanal de semillas en los predios es alta. En 2004 el 74% de los productores utilizaron poblaciones locales de cebolla, ocupando el 50% del área para ese año (MGAP-DIEA, 2007). Por otra parte, existen programas nacionales de mejoramiento genético de cebolla y de producción de semilla certificada. Unas 700 ha (33% del área) son sembradas con semilla procedente de estos programas.

El mildiú de la cebolla causado por *Peronospora destructor* (Berk.) Casp. constituye una de las enfermedades de mayor importancia económica en la producción de cebolla en el mundo. La infección puede causar reducciones del rendimiento del 30% al 70% (Van der Doorn, A.M. 1959; Yarwood, C.E. 1943). En Uruguay actualmente constituye la enfermedad foliar de mayor importancia, tanto en la producción comercial de bulbos como en la producción de semilla (González Idiarte G., *et al.* 2008). Debido al uso incorrecto de los productos químicos comerciales disponibles para su control, no se logra un control exitoso, por lo que existe un alto uso de agrotóxicos con riesgos para el ambiente y para el agricultor sin alcanzar la eficacia deseada. En Uruguay se registran períodos de varias semanas al año con condiciones favorables para la epidemia, lo que hace difícil la implementación de estrategias de control exitosas. La validación de sistemas de pronóstico se vislumbra como una herramienta más en el control integrado de la enfermedad (Maeso, D. *et al.*, 2000).

*Peronospora destructor* es un parásito obligado que pertenece al reino *Chromista*, phylum *Oomycota*, clase *Oomycete*. Inicialmente los síntomas pueden aparecer en las hojas adultas, observándose una mancha alargada y pálida sin brillo. Los síntomas característicos producidos por el patógeno son áreas ovales o cilíndricas de color verde-amarillo pálido a café, tanto en hojas como en escapos florales durante la etapa

reproductiva (Schwartz, H.F. y Mohan, S.K. 2008). Sobrevive en restos de cultivos, en bulbos y semillas infectadas. (Schwartz, H.F. y Mohan, S.K. 2008; Agrios, G.N. 2005; Maude, R.B. 1990).

Produce zoosporas en zoosporangios (esporas asexuales) y oosporas (sexuales). La esporulación requiere temperaturas en el rango de 4.7 – 20.6°C, humedad relativa igual o superior a 95% y oscuridad (Hildebrand, P.D. y Sutton, J.C. 1982). Las zoosporas son liberadas durante el día al descender la humedad relativa, y pueden sobrevivir un día post liberación o tres a cinco días mientras están en el zoosporangióforo (Hildebrand, P.D. y Sutton, J.C. 1982; Leach, C.M. *et al.*, 1982). La infección ocurre entre 1-25°C (óptimo en el entorno de 13° C) y con presencia de agua libre. Luego de la infección, el período de latencia para que ocurra una nueva esporulación abundante es de 10 a 16 días (Hildebrand, P.D. y Sutton, J.C. 1982).

Dentro de la base genética del cultivo no se dispone de fuentes de alta resistencia a *P. destructor*. Por el contrario, *Allium roylei* Stearn, una especie que pertenece a la sección *Cepa* del género *Allium*, presenta resistencia completa a *P. destructor* (Van der Meer, Q.P. and Vries, J.N.). La resistencia de *A. roylei* es independiente de la densidad del inóculo y de la edad de la planta (Kofeet, A. y Zinkernagel, V. 1989). El cruzamiento con *Allium cepa* es viable, y el híbrido interespecífico resultante es resistente (Kofeet, A. *et al.*, 1990). Si bien se han logrado avances, existen barreras interespecíficas que dificultan la introgresión (Alan, A.R. *et al.*, 2003; Scholten, O.E. *et al.*, 2007), y solo en el largo plazo puede preverse la utilización de esta fuente de resistencia en cebollas adaptadas a diferentes regiones de producción.

Aun cuando no se cuenta con evaluaciones cuantitativas sistemáticas, en condiciones de producción en Uruguay se han observado diferencias dentro del germoplasma local y entre cultivares en la respuesta ante la enfermedad. La identificación de fuentes de resistencia parcial permitiría su explotación posterior en el mejoramiento genético. Estas diferencias en el desarrollo de la enfermedad podrían ser consecuencia de diferencias en

componentes de la resistencia como la tasa de infección, el período de incubación y/ o el período de latencia. La resistencia parcial puede traducirse en mejoras en el resultado económico del cultivo, a la vez que posibilitaría al menos reducir el número de aplicaciones actualmente realizado para el control de la enfermedad.

El desarrollo de cultivares con resistencia genética se presenta como una alternativa tendiente a disminuir el uso de agrotóxicos, disminuyendo la posible contaminación del medio ambiente y protegiendo la salud humana. A la vez, brinda herramientas a los sistemas de producción orgánica y la producción integrada.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar el germoplasma local en su respuesta a *Peronospora destructor* e identificar fuentes de resistencia. Se discuten los factores que podrían determinar las diferencias en el germoplasma local.

## **2.2. Materiales y métodos**

Se realizaron tres ensayos a campo, uno en 2007 y dos en 2008, que se ubicaron en el Centro Regional Sur (CRS), Facultad de Agronomía, Progreso, Canelones.

### ***Ensayo 2007***

Se sembraron 27 poblaciones locales de *Allium cepa* procedentes del banco de germoplasma de Facultad de Agronomía, y dos cultivares nacionales que se incluyeron como testigos: Pantanoso del Sauce CRS e INIA Colorada (Tabla 1). Estas poblaciones abarcaron distintas regiones del país y tipos varietales: precoces (día corto, DC), semi-precoces (día intermedio, DI) y tardías (día largo, DL).

El almácigo se sembró el 17 y 18 de abril 2007 en canteros solarizados. El diseño experimental fue un alfa-látice con cuatro repeticiones por accesión en bloques completos. El trasplante se realizó el 10 de agosto de 2007. Cada parcela contó con 60



plantas (tres filas por cantero con una distancia entre plantas de 10 cm). Para aumentar y homogeneizar la presión de inóculo, cada dos canteros con las parcelas de evaluación, se intercaló una variedad susceptible (Pantanoso del Sauce CRS) a alta densidad (cuatro filas y 8 cm entre plantas). En el área donde se instaló el ensayo, se cultivó cebolla durante los dos años anteriores, y hubo presencia de *P. destructor*. El control de malezas consistió en una aplicación de Oxifluorfen (1 litro/ha) pre-trasplante y posteriormente carpidas manuales. A fines de octubre comenzó un período seco, por lo que el ensayo se regó para incrementar las condiciones predisponentes a la enfermedad. Las cosechas se realizaron con 60-80% de vuelco a partir del 4 de diciembre hasta el 11 de enero. No se realizaron aplicaciones de fungicidas ni insecticidas.

**Tabla 1.** Materiales genéticos evaluados en ensayos a campo. Año 2007 y 2008.

2007		2008	
Identificación	Origen	Identificación	Origen
UR19101	Canelones	<i>Ensayo 1</i>	
UR8709	Tapia, Canelones	UR9719	s/d Canelones
UR9729	Constitución, Salto	UR9717	Pantanosos-Can
UR9720	Pantanosos Sauce	UR9728	Ruta 90 km9-Pdu
UR7022	Pantanosos Sauce, Can.	UR9722	Belén-Artigas
UR9101	Canelones	UR9703	S. Francisco-Pdu
UR7021	Canelón Grande, Can	INIA-FAGRO-Dulce	
UR9702	Esperanza, Paysandú	INIA-Casera	
UR9103	Canelones		
UR8903	San Bautista, Can.	<i>Ensayo 2</i>	
UR8823	Pando, Can.	Canarita CRS	
UR8819	La Paloma, Can	Caballero (pob. local)	Canelón G-Can
UR8703	San Bautista, Can.	Cabrera (pob. local)	Canelón G-Can
UR8905	Piedra Sola, Can.	Endocría Pantanosos	
UR9102	Canelones		
UR8907	Canelones		
UR8710	Canelones		
UR8901	San Bautista, Can.		
UR8701	San Bautista, Can.		
UR8815	Los Arenales, Can.		
UR9104	Canelones		
UR8906	Piedra Sola, Can.		
UR8902	Cañada Grande, Can		
INIA Colorada			
Pantanosos Sauce CRS			
<b>2007-2008*</b>			
UR9706	Mercedes-Soriano		
UR9718	Pantanosos Sauce-Can		
UR9720	Pantanosos Sauce-Can		
UR9704	Mercedes-Soriano		
UR9727	Porvenir-Pdu		

\*en 2008 estas accesiones se incluyen en el Ensayo 1.

### ***Ensayos 2008***

En un primer ensayo se sembraron diez poblaciones locales y los cultivares INIA Casera e INIA Fagro Dulce (Tabla 1). El diseño experimental fue de bloques completos aleatorizados con cuatro repeticiones por accesión. Cada parcela contó con 51 plantas con igual arreglo espacial que el ensayo 2007. Se intercaló el mismo cultivar susceptible –Pantano del Sauce CRS– a la misma densidad. Los almácigos se sembraron el 23 de abril 2008 y el trasplante se realizó el 11 de agosto 2008. Treinta días post-trasplante se aplicó urea (46-0-0), 130 kg por ha. En el control de malezas se utilizó Linuron (1.5 kg/ha), y re-aplicaciones de Oxifluorfen + Oxadiazon a los caminos (0.5 lt/ha + 1.5lt/ha). El control químico de malezas se complementó con carpidas manuales. No se realizaron aplicaciones de fungicidas ni insecticidas. Las cosechas se realizaron con 60-80% de vuelco a partir del 27 de noviembre y se extendieron hasta el 12 de diciembre.

En el ensayo 2, se incluyeron dos poblaciones locales, el cultivar Canarita CRS y una población avanzada de mejoramiento denominada Endocría. La fecha de transplante, la densidad y el diseño experimental fueron los mismos que en el ensayo 1. Las cosechas comenzaron el 5 de diciembre y se extendieron hasta el 10 de enero de 2009.

Los materiales que se evaluaron en 2008 fueron en su mayoría de DI (Tabla 7). Cinco poblaciones locales (las accesiones UR9704, UR9706, UR9718, UR9720, UR9727) ya se habían evaluado en 2007. Para otras poblaciones locales ya evaluadas en 2007, no se contó con semilla suficiente para la instalación del ensayo 2008.

### ***Evaluaciones realizadas***

Las observaciones se realizaron sobre las plantas de la fila central de cada parcela. La incidencia (presencia/ausencia de manchas o signo) se midió semanalmente a partir de que se detectaron condiciones ambientales favorables para la infección del patógeno. En 2007 el período de evaluación se extendió del 27 de setiembre hasta el 23 de noviembre, y en 2008 desde el 4 de setiembre hasta el 31 de octubre. La severidad se registró el 22

de noviembre en 2007 y el 3, 10 y 17 de octubre en los ensayos de 2008. Con los valores de incidencia de la enfermedad se calculó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC). Para la evaluación de severidad se estimó el porcentaje del área foliar afectada por la enfermedad, utilizando una escala de 0 a 100% con intervalos de 5% (Agrios, G.N. 2005). La evaluación se realizó sobre hojas verdes activas, y se tuvo en cuenta la presencia de esporulación o síntomas típicos de *P. destructor*. No se consideraron hojas completamente secas o senescentes ni las puntas secas de hojas que no permitían reconocer si la causante de la senescencia del tejido fue *P. destructor*, otra enfermedad u otra causa.

### ***Análisis estadístico***

En 2007, el efecto de las accesiones sobre la incidencia fue estudiado mediante el ajuste de regresiones logísticas en función del tiempo. Se asumió una distribución binomial de plantas afectadas en el total de plantas por población. Las curvas de incidencia se compararon mediante contrastes de razón de verosimilitud (LRT, *likelihood ratio test*). También se efectuaron contrastes entre grupos de accesiones fenológicas, determinados de acuerdo al ciclo (momento de cosecha). Se utilizó el procedimiento GENMOD del paquete estadístico SAS versión 9.1.3 (SAS Institute, Cary, NC, 2005). Para los datos del ensayo 2008 no se ajustaron curvas, sino que directamente se estimó la probabilidad de incidencia en cada fecha de muestreo. Las probabilidades de incidencia de las diferentes poblaciones y momentos se compararon usando el test de Tukey adaptado por Kramer (1956).

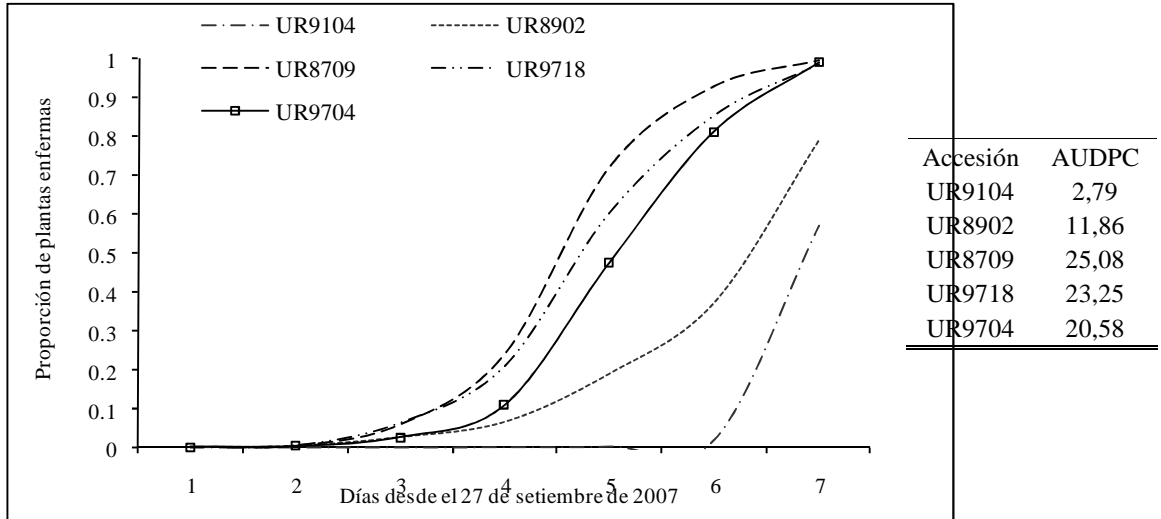
El efecto de las poblaciones sobre la severidad en cada año fue estudiado ajustando modelos lineales generalizados asumiendo una distribución multinomial ordinal de la escala de severidad. En 2008, dado que se tuvo más de una medición, se consideró el efecto del momento de evaluación en los modelos. Se usó también el procedimiento GENMOD del mismo paquete estadístico.

Para analizar la información climática se construyeron gráficas en las que se relacionó la evolución de la enfermedad con la ocurrencia de condiciones predisponentes. Para ello, se consideró días y horas en oscuridad (período comprendido entre las 21 horas y las 6:30 horas) con humedad relativa igual o mayor a 95% y dos rangos de temperatura: entre 4 a 23°C para el rango amplio (contabilizado como “horas”) y entre 12 y 14°C como rango óptimo. Solo se consideraron aquellos días en que estas condiciones se dieron por al menos dos horas de forma continua. La información climática se presenta en anexos.

### **2.3. Resultados**

#### ***Ensayo 2007***

El germoplasma local de cebolla mostró diversidad en las variables de respuesta a la enfermedad estudiadas: incidencia y severidad (Tabla 2, Figura 1). Si bien todas las poblaciones se comportaron como susceptibles, el progreso de la incidencia no fue similar para las diferentes accesiones ( $p < 0.05$ ). La evaluación del 9 de noviembre fue la fecha en que más difirieron las poblaciones, en un rango de 3 a 99% de plantas enfermas. A partir de entonces se observó un rápido progreso de la enfermedad para todos los materiales genéticos. Como consecuencia, en la evaluación del 23 de noviembre este rango fue de 65 a 100% de plantas enfermas. Considerando las evaluaciones en estas fechas donde se manifestaron diferencias significativas entre poblaciones, las accesiones UR9104 y UR8902 fueron las que tuvieron menor porcentaje de plantas enfermas (Tabla 2). En el otro extremo, las accesiones que tuvieron mayor incidencia fueron UR9718, UR8709 y UR9704 con 92, 95 y 99% de incidencia respectivamente el 9 de noviembre. Como consecuencia, las accesiones también difirieron fuertemente en el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (Figura 1).

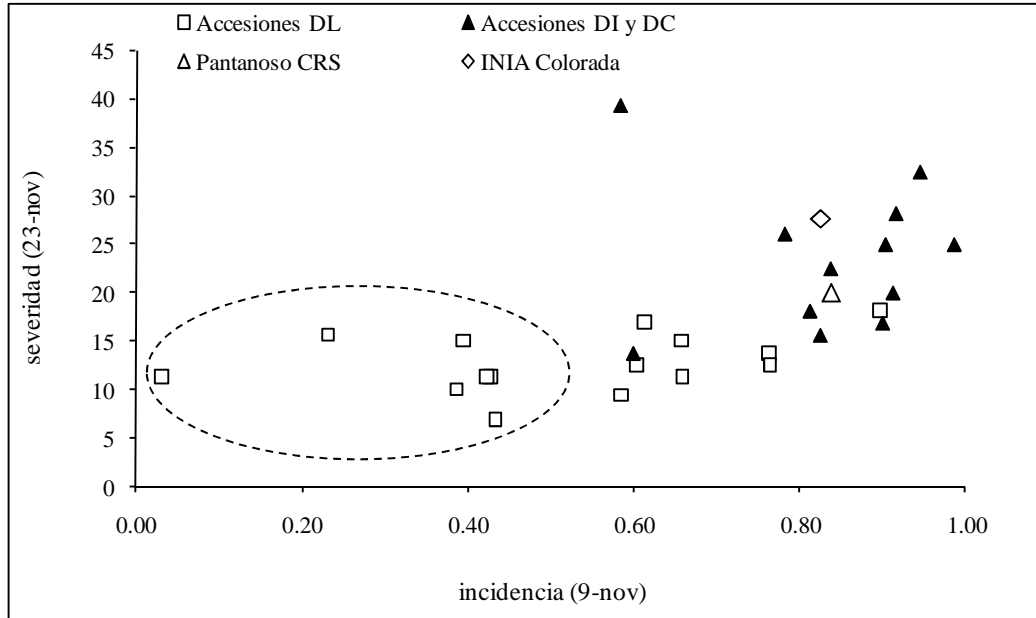


**Figura 1.** Curvas de progreso de la enfermedad (evolución de la incidencia de *P. destructor*) y AUDPC para cinco accesiones evaluadas en 2007 que tuvieron comportamientos diferentes: UR9104, UR8209, UR9704, UR9718 y UR8709.

**Tabla 2.** Incidencia, área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC), y severidad de *P. destructor*, para 27 poblaciones locales y los cultivares INIA Colorada y Pantanoso del Sauce CRS. Año 2007.

Identificación Nº	Origen	Momento de cosecha	Incidencia							Severidad	Contrastes LRT	AUDPC
			27/9/07	4/10/07	17/10/07	24/10/07	2/11/07	9/11/07	23/11/07	23/11/07		
UR19101	Canelones	Nov. (DC)*	0	0.00	0.04	0.04	0.23	0.58	0.90	39.38	a	15.54
UR8709	Tapia, Canelones	Dic. (DIB)	0	0.00	0.09	0.06	0.37	0.95	1.00	32.50	a	25.08
UR9718	Pantanoso Sauce	Nov. (DC)	0	0.01	0.14	0.14	0.48	0.92	0.99	28.20	b	23.25
INIA Colorada		Nov. (DC)	0	0.01	0.10	0.01	0.33	0.83	0.91	27.60	b	17.22
UR9727	Porvenir, Paysandú	Dic. (DIA)	0	0.00	0.10	0.01	0.23	0.78	1.00	26.10	b	19.27
UR9729	Constitución, Salto	Dic. (DIA)	0	0.01	0.14	0.03	0.35	0.90	1.00	25.00	b	21.02
UR9704	Mercedes, Soriano	Dic. (DIA)	0	0.01	0.11	0.05	0.33	0.99	1.00	25.00	b	20.58
UR9720	Pantanoso Sauce	Dic. (DIA)	0	0.01	0.11	0.06	0.36	0.84	1.00	22.50	b	19.97
Pantanoso del Sauce CRS		Dic. (DIB)	0	0.05	0.09	0.01	0.45	0.84	0.99	20.00	b	22.09
UR7022	Pantanoso Sauce, Can.	Dic. (DIB)	0	0.00	0.05	0.01	0.32	0.91	0.95	20.00	b	18.79
UR9101	Canelones	Dic. (DIB)	0	0.00	0.19	0.01	0.37	0.81	1.00	18.13	bc	20.94
UR7021	Canelón Grande, Can	Enero (DL)	0	0.00	0.13	0.01	0.28	0.90	0.96	18.13	bc	20.42
UR9702	Esperanza, Paysandú	Dic. (DIA)	0	0.00	0.04	0.01	0.36	0.90	0.96	16.88	cd	19.99
UR9103	Canelones	Enero (DL)	0	0.00	0.05	0.00	0.19	0.61	0.98	16.88	bc	14.33
UR8903	San Bautista, Can.	Dic. (DIB)	0	0.00	0.00	0.00	0.35	0.83	0.95	15.63	cd	18.25
UR8823	Pando, Can.	Enero (DL)	0	0.00	0.00	0.03	0.13	<b>0.23</b>	<b>0.89</b>	<b>15.63</b>	cd	<b>10.19</b>
UR8819	La Paloma, Can	Enero (DL)	0	0.01	0.14	0.06	0.26	0.66	0.97	15.00	cd	18.08
UR8703	San Bautista, Can.	Enero (DL)	0	0.00	0.04	0.00	0.17	<b>0.39</b>	<b>0.97</b>	<b>15.00</b>	cd	<b>14.41</b>
UR8905	Piedra Sola, Can.	Enero (DL)	0	0.01	0.19	0.04	0.50	0.76	0.95	13.75	cd	21.59
UR9102	Canelones	Dic. (DIB)	0	0.00	0.04	0.00	0.31	0.60	1.00	13.75	cd	17.57
UR8907	Canelones	Enero (DL)	0	0.00	0.10	0.00	0.28	0.76	1.00	12.50	cd	19.27
UR8710	Canelones	Enero (DL)	0	0.00	0.11	0.00	0.20	0.60	0.83	12.50	cd	15.38
UR8901	San Bautista, Can.	Enero (DL)	0	0.00	0.05	0.04	0.25	0.66	0.88	11.25	de	16.12
UR8701	San Bautista, Can.	Enero (DL)	0	0.00	0.05	0.04	0.23	<b>0.43</b>	<b>0.82</b>	<b>11.25</b>	de	<b>13.79</b>
UR8815	Los Arenales, Can.	Enero (DL)	0	0.00	0.10	0.01	0.09	<b>0.42</b>	<b>0.80</b>	<b>11.25</b>	de	<b>11.57</b>
UR9104	Canelones	Enero (DL)	0	0.00	0.00	0.00	0.00	<b>0.03</b>	<b>0.77</b>	<b>11.25</b>	de	<b>2.79</b>
UR8906	Piedra Sola, Can.	Enero (DL)	0	0.00	0.04	0.00	0.21	<b>0.39</b>	<b>0.75</b>	<b>10.00</b>	de	<b>13.43</b>
UR9706	Mercedes, Soriano	Dic. (DIB)	0	0.01	0.05	0.01	0.22	0.58	0.88	9.38	de	16.58
UR8902	Cañada Grande, Can	Enero (DL)	0	0.00	0.04	0.00	0.17	<b>0.43</b>	<b>0.65</b>	<b>6.88</b>	e	<b>11.86</b>

- DC, DI y DL corresponden a ciclos fenológicos de Día Corto, Intermedio y Largo respectivamente. Las accesiones agrupadas como de DIA maduraron en la primera quincena de diciembre mientras que las de DIB lo hicieron en la segunda quincena del mes.
- Los valores resaltados corresponden a las accesiones que reunieron los valores más bajos de incidencia, severidad y AUDPC (destacadas en un círculo en la Figura 2)



**Figura 2.** Correspondencia en la evaluación a campo entre la incidencia de *P. destructor* evaluada el 9 de Noviembre, y la severidad evaluada el 22-24 Noviembre 2007, para 27 poblaciones locales, INIA Colorada y Pantanoso del Sauce CRS. Las accesiones de menor susceptibilidad se destacaron con un círculo punteado.

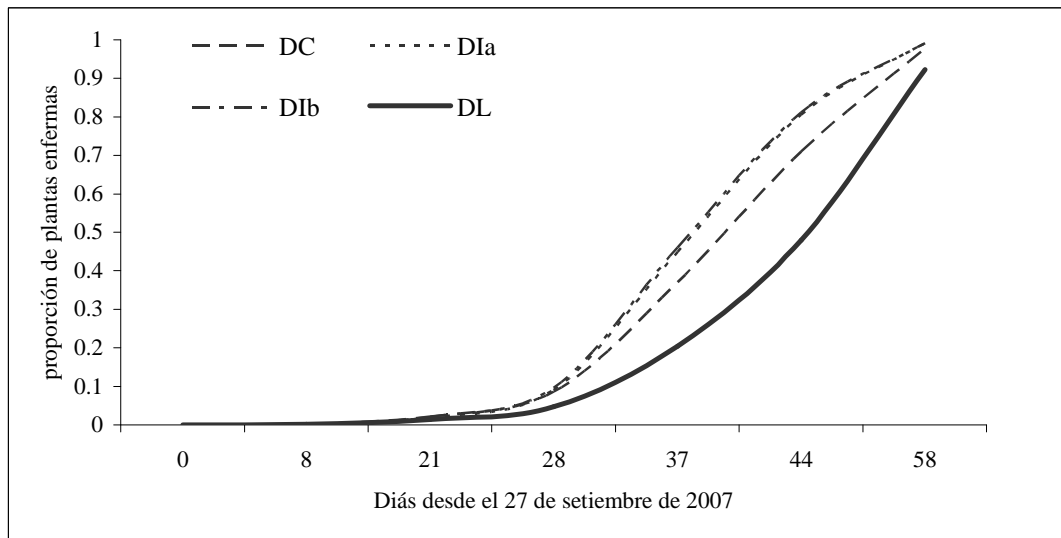
La severidad a *P. destructor* fue evaluada solo el 22-24 noviembre de 2007. Se observó diversidad entre accesiones en la severidad, en un rango desde 7 a 40% del área foliar afectada (Tabla 2). Inicialmente se planificó evaluar la severidad en al menos tres momentos para observar la evolución de esta variable y construir la curva de progreso de la enfermedad. Sin embargo, en 2007 las condiciones ambientales favorables al desarrollo del patógeno no se extendieron por un período prolongado. Al contar con una sola fecha de monitoreo para severidad en 2007, no fue posible construir curvas de evolución del tejido afectado.

Muchas de las accesiones que mostraron menor incidencia el 9 de noviembre (cuando se observó la mayor diferencia entre accesiones), fueron las mismas que presentaron



menor porcentaje de tejido afectado el 23 de noviembre: UR8902 con severidad estimada en 6.9% y UR9104 con 11.3%. En el otro extremo, también coincidieron las accesiones que tenían mayor porcentaje de plantas enfermas con aquellas que tuvieron afectado mayor porcentaje de tejido, con valores de severidad de 25 a 32% (Tabla 2).

Por lo tanto, al combinar el comportamiento en cuanto a incidencia y severidad de *P. destructor*, pudo diferenciarse un grupo de accesiones que presentó los menores valores para ambas variables (Figura 2): valores inferiores a 45% en la incidencia, y menor o igual a 20% en la severidad. Este grupo quedó integrado por las accesiones UR9104, UR8902, UR8815, UR8701, UR8703, UR8906 y UR8823 (Anexo 1).



**Figura 3.** Curvas de progreso de la enfermedad (a partir de datos de incidencia) según diferencias en el ciclo fenológico (DC, DI y DL) y significancia estadística entre las curvas. DC, DI y DL corresponden a ciclos fenológicos de Día Corto, Intermedio y Largo respectivamente. Las accesiones agrupadas como de DIa maduraron en la primera quincena de diciembre mientras que las de DIb lo hicieron en la segunda quincena del mes. Por este motivo se

separaron en dos grupos para su análisis, pero no se encontró diferencias significativas entre los mismos.

Los cultivares INIA Colorada y Pantanoso del Sauce CRS incluidos en el ensayo como testigos, se ubicaron dentro del grupo de materiales genéticos más susceptibles (Tabla 2, figura 2).

Al analizar la relación de la respuesta a *P. destructor* con variables morfológicas y agronómicas, se encontró que estuvo relacionada con la variación en el ciclo fenológico (Figura 3). Es así que los materiales genéticos tempranos (DC y DI) fueron significativamente más susceptibles que materiales tardíos (DL) (Tablas 3 y 4).

Si bien las diferencias observadas entre grupos fenológicos son de mayor magnitud, también se observó diversidad en la susceptibilidad a *P. destructor* dentro de los grupos fenológicos de DI y DL (Tabla 5).

### ***Ensayos 2008***

En 2008 se realizaron dos ensayos a campo donde se evaluaron 12 poblaciones locales, 3 cultivares y una población avanzada de mejoramiento en total (Tabla 1). El primer ensayo incluyó cinco accesiones también evaluadas en 2007. Se observaron síntomas a campo a partir del 4 de setiembre a diferencia de lo observado para 2007, donde se registraron los primeros síntomas un mes más tarde, a partir del 4 de octubre. En ambos años se llegó a valores de incidencia de la enfermedad del 100% para los cultivares y poblaciones más susceptibles. En 2007 estos valores se registraron el 23 de noviembre, con un rango que osciló entre 65% y 100% de incidencia de la enfermedad. En 2008 la incidencia máxima se alcanzó el 17 de octubre y el rango fue de 80% a 100%.

En esta temporada no se pudo ajustar un modelo matemático para el progreso de la enfermedad, por lo que se analizaron las medias de cada población en cada fecha. En la evaluación de la enfermedad no se consideraron las hojas secas, lo que pudo haber

distorsionado el registro de la enfermedad. Se observó una caída brusca en el registro de incidencia y severidad (10 de octubre) y posteriormente valores altos alcanzando el 100% de incidencia (17 de octubre) en la mayoría de las accesiones al darse condiciones para nuevos ciclos de infección.

**Tabla 3.** Estimaciones de los parámetros de las curvas según grupos por ciclo fenológico. Año 2007.

Grupo ciclo	$\beta_0$	E. standard	$\beta_1$	E. standard
DC	-8.0663	0.7586	0.2037	0.01776
DIa	-8.8155	0.6790	0.2327	0.01696
DIb	-8.6997	0.6405	0.2308	0.01580
DL	-8.1280	0.4562	0.1829	0.00887

DC, DI y DL corresponden a ciclos fenológicos de Día Corto, Intermedio y Largo respectivamente. Las accesiones agrupadas como de DIa maduraron en la primera quincena de diciembre mientras que las de DIb lo hicieron en la segunda quincena del mes.

**Tabla 4.** Significancia estadística de la comparación entre curvas de progreso de la incidencia de *Peronospora destructor* para los materiales genéticos evaluados, agrupados por ciclo. Año 2007.

Grupo ciclo	Nr. Accesiones	Grupo ciclo		
		DIa	DIb	DL
DC	3	0.3169	0.2881	0.0208 *
DIa	5	–	0.9856	< 0.001 *
DIb	7		–	< 0.001 *
DL	14			–

DC, DI y DL corresponden a ciclos fenológicos de Día Corto, Intermedio y Largo respectivamente. Las accesiones agrupadas como de DIa maduraron en la primera quincena de diciembre mientras que las de DIb lo hicieron en la segunda quincena.

**Tabla 5.** Contrastes significativos entre pares de curvas de progreso de la incidencia de *Peronospora destructor*, dentro de cada grupo fenológico, para el ensayo 2007.

Ciclo fenológico	Contrastes accesiones	Significancia
DC		ns
DI	UR8903-UR8709	0.0437
	UR9702-UR9706	0.0468
	UR9706-UR8709	0.0164
DL	UR9103-UR9104	0.0033
	UR9104-UR8710	0.0052
	UR9104-UR8901	0.0016
	UR9104-UR8701	0.0101
	UR9104-UR8902	0.0275
	UR9104-UR8815	0.0261
	UR9104-UR8823	0.0355
	UR9104-UR8703	0.0021
	UR9104-UR8819	0.0003
	UR9104-UR8907	<0.0001
	UR9104-UR8906	0.008
	UR9104-UR8905	<0.0001
	UR9104-UR7021	<0.0001
	UR8902-UR8907	0.0115
	UR8902-UR8905	0.0426
	UR8902-UR7021	0.0129
	UR8815-UR8907	0.0232
	UR8815-UR8905	0.0464
	UR8815-UR7021	0.0239
	UR8823-UR8907	0.0165
	UR8823-UR8905	0.0052
	UR8823-UR7021	0.0089

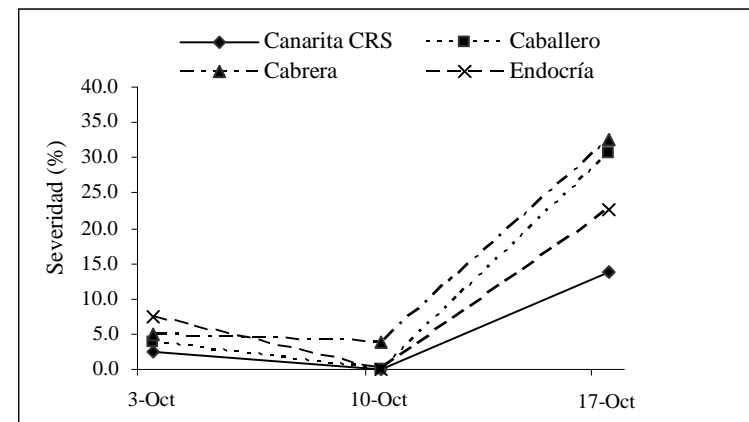
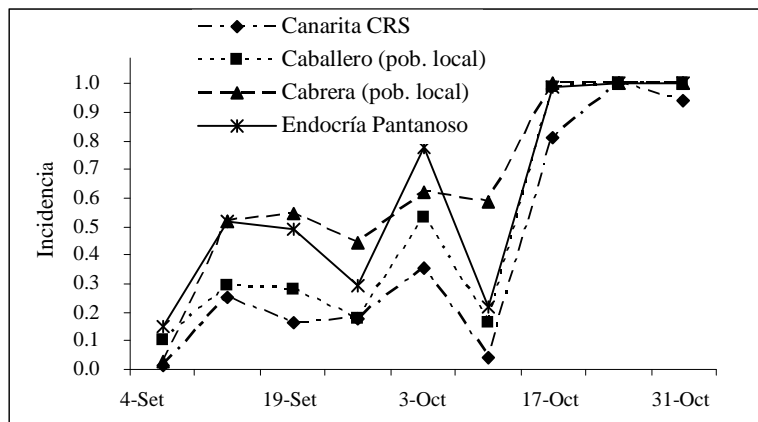
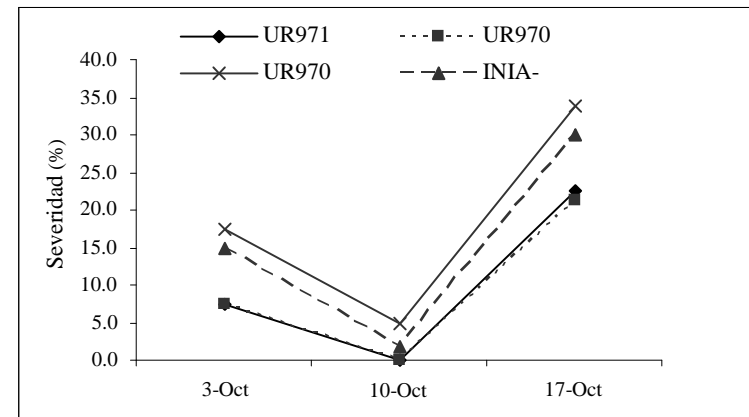
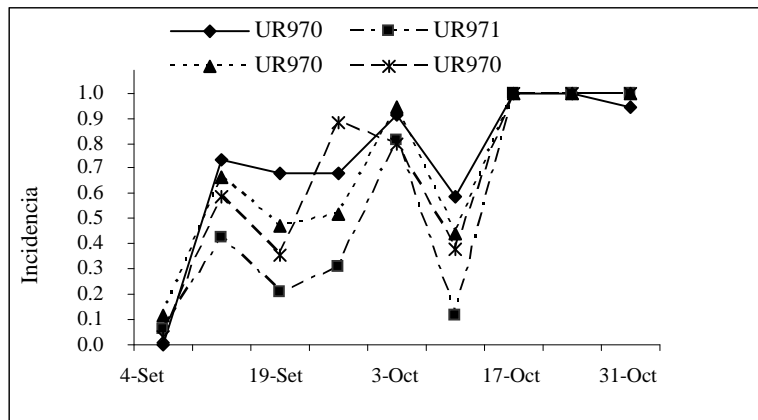
La Figura 4 presenta la evolución de la incidencia de *P. destructor* y de severidad para cuatro poblaciones locales contrastantes del ensayo 1 y para los cuatro materiales genéticos del ensayo 2. No hubo diferencias significativas por fecha de monitoreo, pero sí se observaron diferencias en el comportamiento general de las poblaciones (Tabla 6).

Se destacó UR9719 por tener menor incidencia a lo largo del período estudiado. En el ensayo 2, el cultivar Canarita CRS fue el que presentó los menores valores promedios de incidencia para el período (Tabla 6).

Dado que las accesiones corresponden en su mayoría al tipo DI, las diferencias en la respuesta a la enfermedad observadas entre accesiones, no son dependientes del ciclo (fenómeno observado el año anterior, con accesiones de día largo). Como consecuencia, posibilitaría usarlas en los programas de mejoramiento como fuente de resistencia parcial de ciclo DI mediante selección recurrente.

Se registró la evolución de la severidad como porcentaje de tejido afectado en tres momentos del ciclo, entre el 3 y 17 de octubre. En el ensayo 1, UR9719 y UR9706 fueron las accesiones con mejor comportamiento, ya que no superaron el 26.5% de tejido afectado. Por el contrario, UR9704 y el cultivar INIA Casera fueron los que presentaron los mayores porcentajes de severidad, así como la mayor variabilidad en los datos en las tres fechas consideradas. La magnitud de las diferencias en severidad, sin embargo, fue menor que las diferencias observadas para incidencia de la enfermedad a lo largo de las distintas fechas de monitoreo (Figura 5, Tabla 7). En el Ensayo 2, si bien existieron diferencias en el nivel de severidad de *P. destructor* según fecha de monitoreo, en todos los casos Canarita CRS fue la que presentó los menores valores de tejido afectado y menor variabilidad en la distribución de los datos (Figura 4, Tabla 7- rangos).

Al observar conjuntamente las curvas de incidencia y severidad, se identificaron accesiones que mostraron los menores valores del ensayo para las dos variables. Entre las accesiones que presentaron menor incidencia de *P. destructor* (UR9719 y UR9706 en el ensayo 1, y Canarita CRS en el ensayo 2), también la severidad fue menor, resultando en menor porcentaje de tejido afectado.



**Figura 4.** Evolución de la incidencia (izquierda) y de la severidad (derecha) a *P. destructor* en cuatro poblaciones locales del ensayo 1 (arriba) y del ensayo 2 (abajo), 2008.

**Tabla 6:** Diferencias en la incidencia a *P. destructor*, método Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ) y severidad para 12 poblaciones locales y los cultivares INIA-Fagro Dulce, INIA Casera, Pantanoso del Sauce CRS y Canarita CRS. Año 2008.

Identificación N°	Cosecha	Incidencia									Contrastes ( $p < 0.05$ )	Severidad		
		4/9	11/9	19/9	26/9	3/10	10/10	17/10	24/10	31/10		3/10	10/10	17/10
<b><i>Ensayo 1</i></b>														
UR9717	Nov**	0.06	0.54	0.28	0.47	0.87	0.16	1.00	1.00	0.76	ab	11.25	0.00	21.25
UR9722	Nov	0.04	0.51	0.34	0.29	0.79	0.10	1.00	1.00	1.00	ab	11.25	0.00	22.50
<b>UR9718</b>	Nov	0.09	0.44	0.40	0.59	0.96	0.40	1.00	1.00	0.99	ab	16.25	1.25	23.75
UR9719	Dic	0.06	0.43	0.21	0.31	0.81	0.12	1.00	1.00	1.00	b	7.50	0.00	26.25
UR9728	Nov	0.04	0.72	0.29	0.46	0.85	0.15	1.00	1.00	0.87	ab	11.25	0.00	27.50
<b>UR9727</b>	Nov	0.12	0.63	0.53	0.57	0.90	0.41	1.00	1.00	1.00	ab	10.00	1.67	28.33
INIA-FAGRO-Dulce	Nov	0.06	0.50	0.26	0.31	0.82	0.28	1.00	1.00	0.91	ab	8.75	0.00	28.75
UR9703	Nov	0	0.74	0.68	0.68	0.91	0.59	1.00	1.00	0.94	a	12.50	5.00	30.00
<b>UR9706</b>	Nov	0.03	0.59	0.35	0.88	0.79	0.38	1.00	1.00	1.00	a	7.50	0.00	30.00
<b>UR9720</b>	Nov	0.10	0.62	0.43	0.62	0.84	0.21	1.00	1.00	1.00	ab	13.75	0.00	30.00
INIA-Casera	Nov	0.18	0.72	0.52	0.65	0.88	0.19	1.00	1.00	1.00	ab	15.00	0.00	32.50
<b>UR9704</b>	Nov	0.12	0.66	0.47	0.51	0.94	0.44	1.00	1.00	1.00	a	17.50	2.50	33.75
<b><i>Ensayo 2</i></b>														
Canarita CRS	Dic	0.01	0.25	0.16	0.18	0.35	0.04	0.81	1.00	0.94	b	2.50	0.00	13.75
Endocría Pantanoso	Dic	0.15	0.51	0.49	0.29	0.78	0.22	0.99	1.00	1.00	a	7.50	0.00	22.50
Caballero (pob. local)	Ene	0.10	0.29	0.28	0.18	0.53	0.16	0.99	1.00	1.00	ab	3.75	0.00	30.63
Cabrera (pob. local)	Ene	0.03	0.51	0.54	0.44	0.62	0.59	1.00	1.00	1.00	a	5.00	3.75	32.50

Las accesiones resaltadas fueron también evaluadas en 2007.

\*\*Todas las cosechas de este mes son del 27 de noviembre, lo que permite clasificar a este grupo dentro del ciclo DI.

**Tabla 7:** Contrastes LRT ( $p < 0.05$ ) y rango según fecha de evaluación de la severidad de *P. destructor*. Ensayos 1 y 2, 2008.

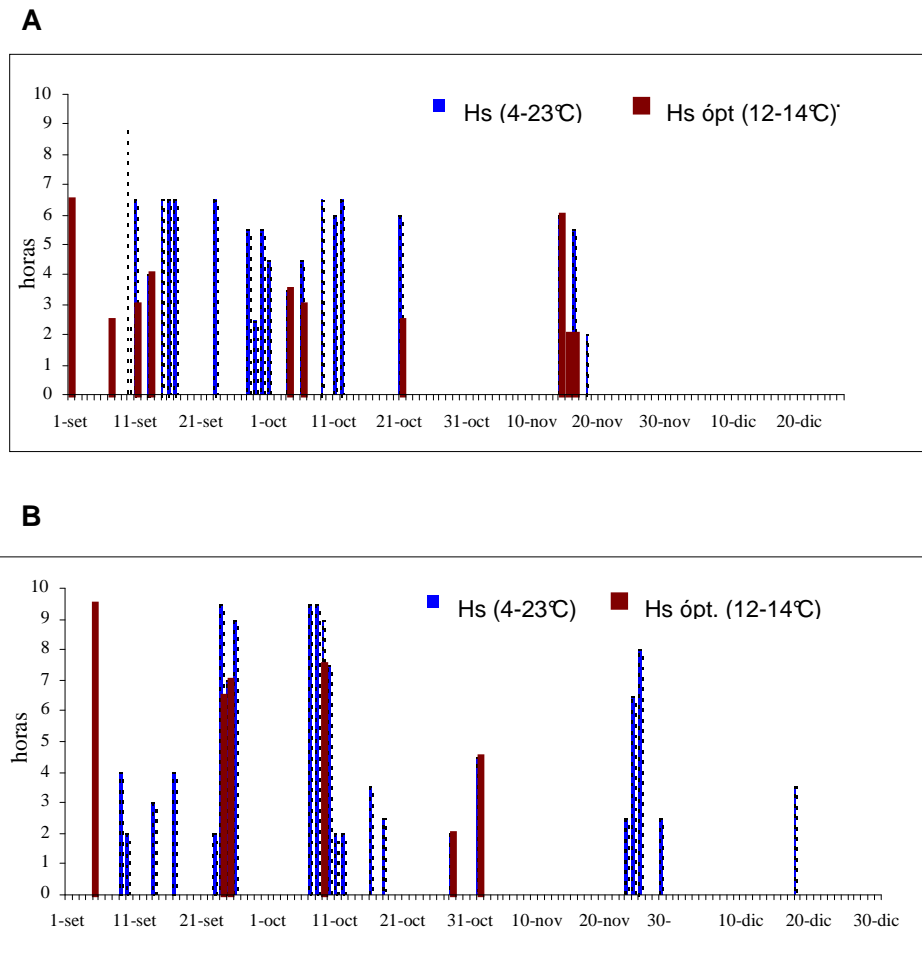
Identificación	3-Oct	LRT	rango	Identificación	10-Oct	LRT	rango	Identificación	17-Oct	LRT	rango
<i>Ensayo 1</i>											
<b>UR9704</b>	17.50	a	53.75	UR9703	5.00	a	20.00	<b>UR9704</b>	33.75	a	83.75
<b>UR9718</b>	16.25	a	30.00	<b>UR9704</b>	2.50	b	18.75	INIA-Casera	32.50	a	91.25
INIA-Casera	15.00	a	86.25	<b>UR9727</b>	1.67	c	8.33	<b>UR9720</b>	30.00	a	38.75
<b>UR9720</b>	13.75	a	40.00	<b>UR9718</b>	1.25	d	7.50	UR9703	30.00	b	32.50
UR9703	12.50	b	27.50	INIA-Casera	0.00	d	12.50	<b>UR9706</b>	30.00	bc	47.50
UR9717	11.25	bc	40.00	<b>UR9720</b>	0.00	de	8.75	INIA-FAGRO-D	28.75	bc	32.50
UR9728	11.25	c	36.25	UR9717	0.00	de	5.00	<b>UR9727</b>	28.33	bc	36.67
UR9722	11.25	cd	35.00	UR9728	0.00	de	8.75	UR9728	27.50	c	63.75
<b>UR9727</b>	10.00	d	31.67	UR9722	0.00	e	6.25	UR9719	26.25	c	41.25
INIA-FA-Dulce	8.75	de	30.00	INIA-FA-Dulce	0.00	ef	12.50	<b>UR9718</b>	23.75	c	31.25
UR9719	7.50	de	37.50	UR9719	0.00	ef	3.75	UR9722	22.50	c	42.50
<b>UR9706</b>	7.50	e	22.50	<b>UR9706</b>	0.00	f	20.00	UR9717	21.25	c	43.75
<i>Ensayo 2</i>											
Endocría	7.50	a	22.50	Cabrera	3.75	a	26.25	Cabrera	32.50	a	42.50
Cabrera	5.00	ab	23.75	Canarita CRS	0.00	b	2.50	Caballero	30.63	a	60.00
Caballero	3.75	ab	48.75	Caballero	0.00	c	12.50	Endocría	22.50	a	40.00
Canarita CRS	2.50	b	17.50	Endocría	0.00	c	12.50	Canarita CRS	13.75	b	25.00

Las accesiones resaltadas fueron también evaluadas en 2007.



**Análisis de variables climáticas**

El análisis de la información climática para el período de evaluación de las accesiones mostró variaciones importantes en cuanto a las condiciones ambientales predisponentes a la enfermedad. En la Figura 5 se presenta los días y la duración del período (cantidad de horas en esos días) en los que se dieron las condiciones para esporulación de *P. destructor* (oscuridad, humedad relativa igual o mayor a 95% y temperatura en el rango de 4 a 23°C). Los datos se presentan en el Anexo 2.

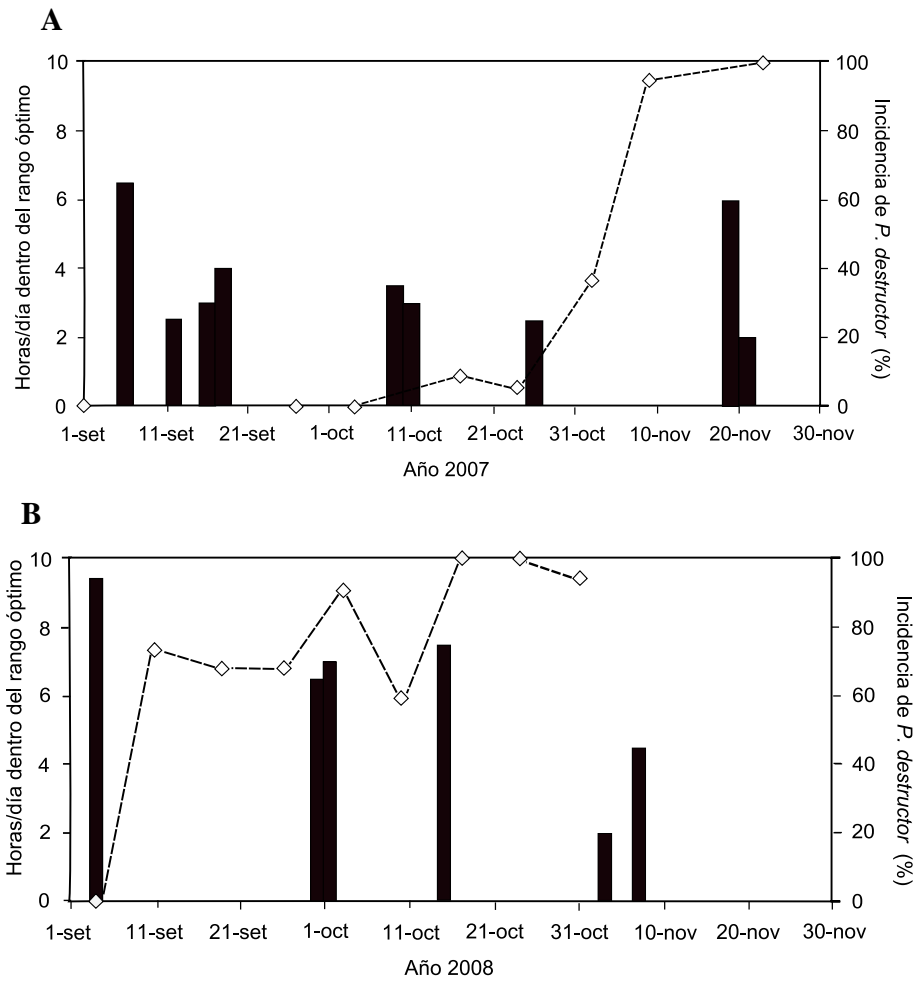


**Figura 5:** Duración en horas de las condiciones de humedad y temperatura favorables a *P. destructor* de setiembre a diciembre. Años 2007 (A) y 2008 (B).

En 2008 se observó que las oscilaciones de temperatura y humedad fueron mayores que en 2007 para el período estudiado. Es decir que se dieron lapsos mayores sin condiciones para la esporulación de *P. destructor* o bien períodos discontinuos con condiciones óptimas. Esto coincide con las fuertes oscilaciones en el progreso de la enfermedad observadas en 2008, tanto en la proporción de plantas con síntomas activos de la enfermedad así como en los registros obtenidos en las evaluaciones de severidad. Al mismo tiempo, en este segundo año, en los períodos en que se dan condiciones para infección y o esporulación, esas condiciones persisten por mayor tiempo que el año anterior (en 2007 no superan en ningún caso las 6,5 horas).

Se analizó la correspondencia entre la evaluación de la proporción de plantas con esporulación o síntomas típicos de *P. destructor* realizada semanalmente, con la ocurrencia de condiciones climáticas favorables para la enfermedad (Figura 6). Tanto en 2007 como en 2008, se observó que el progreso de la enfermedad estuvo más asociada a lo que se definió como el rango de temperaturas óptimo, y no al rango amplio de ocurrencia de la enfermedad. Por ejemplo, en 2007 los primeros registros de incidencia de la enfermedad en torno al 15 de octubre, pudieron ser consecuencia de las condiciones óptimas que se dieron para el patógeno los días 9 y 11 de octubre. Estas condiciones se volvieron a producir 29 de octubre causando un aumento del número de plantas que presentaron síntomas activos el 4 de noviembre. En 2008, los primeros síntomas se reportan el 14 de setiembre, luego de registrarse días con condiciones óptimas los primeros días del mes (Figuras 5 y 6).

Las accesiones UR9704, UR9706, UR9718, UR9720 y UR9727 se evaluaron en las zafas 2007 y 2008. Los resultados obtenidos en el comportamiento sanitario de estos materiales son consistentes entre zafas. La accesión UR9706 fue una de las destacadas dentro del grupo fenológico de DI en 2007 por presentar baja incidencia y severidad a *P. destructor*, lo que coincide con los resultados obtenidos en las evaluaciones de 2008. La accesión UR9704 fue la que presentó mayor número de plantas enfermas y de tejido afectado en ambos años (Tablas 2 y 6).



**Figura 6.** Incidencia de *P. destructor* y duración del período en horas en que las condiciones de humedad y temperatura estuvieron en el rango óptimo (12-14°C) para la infección con *P. destructor* en 2007 (A) y 2008 (B).

## 2.4. Discusión

### Respuesta del germoplasma local

Se encontraron diferencias entre los materiales genéticos incluidos en los ensayos por su resistencia a *P. destructor*. Si bien se conoce que dentro *A. cepa* no existe resistencia completa a esta enfermedad (Van der Meer, Q.P. y Vries, J.N. 1990), diferentes mecanismos involucrados en la resistencia parcial pueden ocasionar un atraso en la instalación del patógeno así como una tasa de progreso de la enfermedad menor (Agrios, G.N. 2005, Vanderplank, J.E. 1984), como se observó con las accesiones UR9104 y UR8902 en el ensayo de 2007, así como con UR9119 y el cultivar Canarita CRS en los ensayos de 2008.

Una posible explicación de las diferencias observadas entre las poblaciones locales puede involucrar las defensas estructurales de la planta. A este nivel podrían estar actuando elementos constitutivos como son estructuras pre-formadas que eviten la instalación del patógeno. La cebolla tiene una capa de cera que recubre toda su superficie foliar, característica que presenta variación genética entre cultivares y accesiones. Esta superficie hidrofóbica tiende a disminuir la probabilidad de que se forme una película de agua continua en la superficie foliar, elemento que es esencial para la infección de *P. destructor* (Schwartz, H.F. y Mohan, S.K. 2008; Hildebrand, P.D. *et al.*, 1982). Sin embargo las accesiones que presentaron los menores valores para incidencia y severidad (Figura 2) presentaron serosidad variable (Anexo 3). Por tanto, en este estudio no resulta una característica que explique las diferencias observadas, como sí sería en el caso del patosistema *A. cepa* – *Botrytis squamosa* (Galvan, G. *et al.* 2004). El ángulo de inserción de las hojas en el falso tallo que lleve a diferencias en la persistencia de las gotas de lluvia o rocío sobre la superficie foliar, es otro parámetro que puede estar influyendo en las diferencias observadas entre accesiones y cultivares (Kofot, A. *et al.* 1989).

Otras hipótesis que explicaría las diferencias en la incidencia de *P. destructor* entre accesiones son las diferencias en las respuestas desencadenadas ante la presencia del patógeno por el sistema de defensa de la planta, generando diferencias en la tasa de desarrollo de la enfermedad. La defensa basal activada a través del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) podría diferir entre accesiones, generando diferencias en la tasa de infecciones instaladas exitosamente. Diferencias en las reacciones bioquímicas y en los cambios estructurales una vez producida la reacción de reconocimiento *P. destructor* – *A. cepa*, pueden determinar qué tan rápido el patógeno se desarrollará, y qué tan severos serán los síntomas antes de que las defensas de las plantas frenen su avance. Esto puede evidenciarse a través de diferencias en el período de latencia así como en el número de infecciones exitosas. Al trabajar en condiciones de campo, las diferencias que se observaron en cantidad total de enfermedad a través de AUDPC en 2007 o en el momento en que se llega al mayor porcentaje de plantas afectadas en 2008, son producto de varios ciclos de infección, esporulación y dispersión del patógeno. En ese caso, las diferencias en resistencia entre las accesiones que lleven a diferencias por ejemplo en el período de latencia, pueden estar manifestando menor número de ciclos de reproducción del patógeno en aquellas más resistentes.

### **Relación con el ciclo fenológico**

La respuesta al fotoperíodo que tiene *Allium cepa*, determina diferentes momentos para el comienzo de la bulbificación y por tanto diferencias en el momento de maduración y cosecha de los bulbos. En las condiciones agroecológicas de producción de Uruguay, las condiciones ambientales favorables al desarrollo de *P. destructor* se cumplen a partir de setiembre y se extienden durante todo octubre. La práctica más extendida de cultivo de cebolla en Uruguay es mediante la siembra de almácigos y posterior trasplante. En condiciones comerciales de producción, los cultivares de DL se

transplantan durante el mes de setiembre. En el ensayo de 2007, aun cuando accesiones de DC, DI y de DL fueron trasplantados en la misma fecha, las accesiones de DL fueron las menos afectadas, por lo que la diferencia en la respuesta a *P. destructor* no se debe a un escape por época. Una posible hipótesis que explique esta relación con el ciclo fenológico es que el comportamiento frente a *P. destructor* podría atribuirse a factores de resistencia específicos en el grupo de materiales tardíos (valencianas), de expresión cuantitativa (Kamoun, S. 1998; Vanderplank, J.E. 1984). De ser así, podría transferirse la resistencia mediante cruzamiento a los otros grupos fenológicos del germoplasma de cebolla y selección recurrente por resistencia y ciclo precoz a semi-precoz.

Alternativamente otra hipótesis podría ser que las diferencias en la respuesta a *P. destructor* son resultado de diferencias entre los grupos de madurez según estado fisiológico-fenológico. En accesiones de DC o DI para las que se ha iniciado la bulbificación o están próximos a la bulbificación en el momento en que aparece *P. destructor*, podrían producirse cambios hormonales y nutricionales que afecten negativamente mecanismos de resistencia basales. En ese caso, la resistencia parcial en las accesiones de día largo no sería fácilmente aplicable al desarrollo de cultivares precoces y semiprecoces resistentes.

Esta segunda hipótesis vincula la expresión de resistencia con el desarrollo del cultivo. La influencia del desarrollo de la planta es tan importante como el resto de los factores involucrados en la expresión de la resistencia, pero no ha sido tenido en cuenta con la misma frecuencia en los análisis (Pierre, M. *et al.* 2007). La adquisición de resistencia o el incremento de la misma en etapas tardías del desarrollo (resistencia de la planta adulta), es un fenómeno comúnmente observado para diversos cultivos y pato-sistemas. La interacción *P. destructor* –*A. cepa* parece manifestar lo opuesto: mayor susceptibilidad conforme avanza su desarrollo. Los mecanismos involucrados en la “resistencia relacionada a la edad” (RRA) –una de las primeras denominaciones para este fenómeno, propuesta por Lazarovits *et al.* (1980) difieren de otros relativos al sistema de defensa innato, la resistencia sistémica inducida o la resistencia sistémica

adquirida. La resistencia a enfermedades en los casos de RRA está asociada a cambios de fase o transiciones importantes ocurridas a lo largo del ciclo de vida de la planta (Poething, R.S.; 2003; Bäurle, I. y Dean, C. *et al*, 2006). En el ensayo de 2007 se observó que las accesiones correspondientes a DL tuvieron mayor resistencia que las de DI y las de DC (que fueron las más afectadas por el patógeno). Dada la respuesta cualitativa al fotoperíodo que tiene esta especie para bulbificar, aun cuando todas las accesiones fueron plantadas al mismo tiempo, el estado de desarrollo en el que se encontraban al momento que comenzó la infección, difería fuertemente entre grupos. Los requerimientos de fotoperíodo se cumplieron en torno al 1-7 de octubre, al 1-7 de noviembre, y al 5-10 de diciembre, para los ciclos de DC, DI y DL respectivamente. En la evaluación del 4 de octubre, sólo 3 de las 15 accesiones de DL presentaban síntomas, 4 de las 11 accesiones de DI y 2 de las 3 accesiones de DC. En la evaluación del 2 de noviembre, estos valores ascienden a 14 accesiones de DL, y la totalidad de las accesiones de DI y de DC, pero los valores de incidencia difirieron entre grupos fenológicos. Se encontraron los menores valores para DL con un promedio de 21% de plantas enfermas, mientras que el promedio para DI y DC fue de 34% y 35% respectivamente. En síntesis, estas observaciones indican que conforme avanza el desarrollo fenológico, la planta se hace más susceptible, pero no puede asociarse claramente un cambio de fase como determinante para esta susceptibilidad, sino que parecería que a partir del inicio de la bulbificación la planta está más susceptible en términos cuantitativos. Por otra parte, al observar la evolución del comportamiento de las accesiones frente a *P. destructor* a lo largo de la estación, se observó mayor enfermedad conforme avanza el ciclo. Esto puede ser atribuido en parte a que, conforme se acerca la madurez, los tejidos presenten mayor susceptibilidad. Sumado a esto, al tratarse de un patógeno policíclico, lo observado podría ser el resultado de varios ciclos que determinan un rápido crecimiento de la enfermedad, en la medida de que las condiciones ambientales se mantengan dentro de los rangos óptimos.

Los mecanismos que controlan la transición del desarrollo en la planta huésped pueden ser los mismos que gobiernan la expresión de la resistencia (Pierre, M. *et al.*, 2007). El gran número de genes que interviene en la resistencia parcial, podría estar vinculado a las distintas etapas de los procesos fisiológicos de la planta, que generan las sustancias y estructuras que constituyen sus mecanismos de defensa (Agrios, G.N. 2005).

Sobre la colección de germoplasma de cebolla utilizada en este trabajo (Tabla 1), se realizó un estudio de diversidad genética en base a marcadores ISSR. No se pudieron diferenciar grupos genéticos aislados dentro de la colección (Monteverde, E. *et al.*, 2009). No obstante, existieron diferencias entre las accesiones más distanciadas, así como asociaciones fuertes entre otras accesiones. Las accesiones de día corto aparecieron asociadas independientemente de su origen geográfico, mientras que las de día intermedio y día largo (fundamentalmente de Canelones) no se diferenciaron genéticamente entre ellas. Esta base genética común sería consecuencia del intercambio de germoplasma que existe entre productores, interpolinización natural y mezclas intencionales (Monteverde, E. *et al.*, 2009). Como consecuencia, la diversidad genética no se correspondió con la diversidad fenotípica observable en esta colección, ni las diferencias en grados de resistencia a *P. destructor* que se asociaron a grupos por ciclo fenológico (Anexo 3). Por tanto, la información disponible no permitió discriminar si las diferencias en resistencia observadas se deben efectivamente al ciclo o a factores genéticos específicos.

### **Epidemiología de *P. destructor***

El comportamiento observado en 2008, con bruscas variaciones en la incidencia y la severidad de la enfermedad, indica la alta virulencia del patógeno, así como su condición de policíclico resultando en epidemias que pueden ser devastadoras.

Si se observan conjuntamente las curvas de evolución de enfermedad construidas para ambos años y los datos climáticos para el mismo período, se evidencia la



dependencia de las condiciones climáticas que tiene esta enfermedad. Temperatura y humedad son los principales factores climáticos que afectan el desarrollo de la epidemia. Las condiciones ambientales pueden afectar el crecimiento de la planta hospedera, la succulencia, y la susceptibilidad a patógenos. También afecta la sobrevivencia, vigor, tasa de multiplicación, esporulación, y distancia de dispersión del patógeno, así como su tasa de éxito en la germinación y penetración de esporas (Agrios, G.N. 2005). La temperatura y humedad relativa por fuera del intervalo óptimo para el desarrollo del patógeno resultaron en un descenso importante de la enfermedad registrada en la semana del 3 al 10 de octubre en 2008. Estas condiciones podrían estar afectando negativamente su sobrevivencia (cantidad de inóculo que permanece viable), dispersión y/o su tasa de reproducción. El desfasaje entre (1) el momento del ciclo en el que se dieron las condiciones óptimas para la expresión de la enfermedad con (2) el momento en que se registraron aumentos en la incidencia y/o severidad, puede estar explicado por el período de latencia, si bien éste no puede ser determinado con precisión en condiciones de campo.

El modelo logístico que se ajustó para 2007 tiene una serie de supuestos. Entre ellos, que el ambiente en el cual la enfermedad se desarrolla es uniforme y que hay cambios constantes en la enfermedad que son inmediatamente visibles (Campbell, 1998). Dadas las mayores oscilaciones climáticas durante la evaluación de 2008, el incumplimiento de estos dos supuestos posiblemente sea lo que haya imposibilitado el ajuste de una curva logística. Se sucedieron cambios bruscos en las condiciones climáticas que generaron, por un lado, el enlentecimiento del desarrollo del patógeno en algunos períodos, así como posiblemente hayan acelerado el ciclo de la enfermedad en otros períodos (disminuyendo el tiempo de latencia y/o aumentando la cantidad de esporulación del patógeno). No obstante, no es posible determinar una fuerte asociación entre la evaluación preliminar de las condiciones requeridas para la enfermedad y las curvas construidas tras las evaluaciones de 2007 y 2008. Este análisis debería realizarse

considerando el período de latencia del patógeno y con mayor conocimiento acerca de cómo las fluctuaciones climáticas actúan sobre su ciclo.

La caída brusca en la incidencia (plantas registradas como enfermas en mediciones anteriores pasaron a contabilizarse como sanas) podría explicarse por la senescencia total del tejido que estuvo enfermo, y también por el fenómeno de recuperación de áreas foliares que, permaneciendo verdes, estuvieron recubiertas de esporulación. El crecimiento del hospedero es un factor importante en muchas epidemias y puede afectar la tasa aparente de crecimiento de la enfermedad y la pendiente de la curva de progreso de la enfermedad. El crecimiento de las plantas puede “diluir” el efecto de la enfermedad. Si la planta crece a mayor velocidad que lo que lo hace el patógeno es posible incluso observar que “decrece” la enfermedad aun cuando no lo esté haciendo. Un factor adicional es la pérdida de hojas viejas de la planta y/o de hojas enfermas, lo que puede causar que la cantidad de enfermedad observada disminuya en el tiempo. Ambos factores, crecimiento y defoliación pueden ser importantes en el intento de calcular la tasa de crecimiento de la enfermedad, pudiendo ser subestimada o incluso negativa (Campbell, C.L. 1998).

Se han propuesto distintas correcciones para poder utilizar estos modelos en simulación de epidemias (Campbell, C.L. 1998; Rabbinge, R. *et al.*, 1989; Kushalappa, D.C. *et al.*, 1982). Estas correcciones proponen alguna forma de considerar la enfermedad referida al crecimiento del hospedero. Vanderplank (1984) propuso corregir la tasa de incremento de la enfermedad sobre los cambios en la cantidad de tejido susceptible del hospedero en un intervalo de tiempo determinado (biomasa 1 y biomasa 2 en los tiempos 1 y 2), basándose en el trabajo de Zadoks y Schein (1979) con *Puccinia striiformis* en trigo. La tasa de infección relativa corregida por el crecimiento del hospedero propuesta por Vanderplank, si bien se adapta a muchos patosistemas, en otros continuaría dando valores negativos. Por ejemplo, en el caso de la enfermedad del café causada por *Hemileia vastatrix*, el rápido crecimiento del hospedero reduce la proporción de enfermedad acumulada en el mismo período, resultando en valores

negativos. Por lo que sobre la base de las correcciones a los modelos propuestos por Vanderplank, fueron surgiendo otros métodos que mejoraron estos resultados (Kushalappa, D.C. *et al.* 1982).

## 3

**AJUSTE METODOLÓGICO PARA LA EVALUACIÓN DE RESISTENCIA A  
*Peronospora destructor* EN CONDICIONES CONTROLADAS****3.1. Introducción**

Para evaluar la resistencia a *P. destructor* en condiciones controladas se requiere previamente de un ajuste metodológico que permita trabajar con éxito en estas condiciones. Si bien el nivel de resistencia parcial debe evaluarse a campo, componentes de la resistencia parcial como el período de latencia, la frecuencia de infecciones y la producción de esporas se determinan en pruebas monocíclicas en condiciones controladas. Esa cuantificación de los componentes de la resistencia en condiciones controladas es un trabajo complementario a la evaluación a campo que aportaría información de gran utilidad, ya que se están evaluando posibles fuentes de resistencia parcial de expresión cuantitativa. En base a la bibliografía disponible, durante 2008 y 2009 se realizaron una serie de ensayos con el objetivo de ajustar una metodología de mantenimiento e inoculación de *P. destructor* en condiciones controladas. En este capítulo se presenta una breve revisión acerca de las condiciones requeridas para el mantenimiento e inoculación con *P. destructor*, los resultados obtenidos y se discuten las principales dificultades detectadas.

**Condiciones para esporulación**

La esporulación requiere temperaturas en el rango de 4.7 – 20.6°C, humedad relativa de 95% o superior y oscuridad (Hildebrand, P.D. y Sutton, J.C. 1982; Maeso, D. 2005). Ocurre durante la noche cuando las condiciones predisponentes se prolongan por al menos seis horas. El patógeno no logra esporular cuando las condiciones de HR son menores a 95% entre las 02:00 y las 06:00AM, así como cuando el período de oscuridad

predisponente es seguido de días con altas temperaturas (Hildebrand P.D. y Sutton J.C., 1982). Si bien la esporulación requiere de humedad relativa superior a 95%, la presencia de una película continua de agua sobre la hoja, la inhibe (Hildebrand P.D. y Sutton J.C., 1982).

### **Condiciones para la dispersión**

Las zoosporas son liberadas durante el día, pero la relación entre las variables ambientales y la liberación de zoosporas aun no están determinadas con precisión. Las zoosporas pueden sobrevivir un día post liberación o tres a cinco días mientras están en el zoosporangióforo. La cantidad de zoosporas liberadas se incrementa a partir de las 07:00hs, llega a un máximo de liberación entre las 08:00 – 09:00, y declina posteriormente. Prácticamente no se registra liberación entre las 18:00hs y las 06:00hs. Este patrón diurno de liberación de zoosporas ocurre en días sin lluvias, generalmente soleados y con marcada alza de temperatura y disminución de la HR. Pueden registrarse picos de liberación menores si la HR se incrementa tarde en el día. En días nublados, la liberación de esporas coincide con intervalos soleados durante el día (Hildebrand, P.D. y Sutton, J.C. 1982). Hildebrand y Sutton (1982) encontraron que la liberación inicial podía estar asociada con la radiación infrarroja (RI). La radiación produce una oleada electrostática en la atmósfera después del amanecer que puede impulsar un mecanismo de descarga de zoosporas tal como lo propone Leach *et al.* (1982). El efecto de la exposición a RI conforme baja la HR, no pudo ser separado en estos experimentos de los efectos atribuibles a los cambios de HR. En otros trabajos, existen evidencias del aumento de liberación de esporas debido a exposiciones prolongadas a RI, tanto en saturación como con HR reducida (Hildebrand, P.D. y Sutton, J.C., 1982).

### **Condiciones para la infección**

La infección ocurre con una película de agua libre sobre el tejido y con temperaturas entre 1-25°C (óptimo en el entorno de 13° C). Requiere dos a seis horas si las temperaturas se encuentran en el rango de 3-14°C, y aumenta si las temperaturas son más altas. Luego de la infección, el período de latencia para que ocurra una nueva esporulación abundante es de 10 a 16 días. La infección puede ocurrir en el mismo período de humedad para la esporulación, o durante la siguiente noche (Hildebrand, P.D. y Sutton, J.C., 1982).

### **Objetivo**

El objetivo de los trabajos que se describen en este capítulo fue ajustar una metodología de mantenimiento e inoculación de *P. destructor* en condiciones controladas.

## **3.2. Materiales y métodos**

### ***Ensayo 1***

El primer ensayo se realizó en 2008, en el Centro Regional Sur (CRS) de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República.

Para las inoculaciones se utilizaron plantas en macetas del cultivar susceptible Pantanoso del Sauce CRS, con más de cinco o seis hojas extendidas, de 20 cm de largo o más, y al menos 100 días desde la siembra. Las plantas se produjeron y mantuvieron en invernáculo, y estaban libres de síntomas de *P. destructor* al momento de la inoculación (Tabla 8).

La recolección de zoosporangios se hizo a partir de plantas del cultivo a campo con presencia de esporulación, a primera hora de la mañana. Para la inoculación se utilizó una suspensión con una concentración de  $1 \times 10^4$  zoosporangios/ml (Kofot, A. y Zinkernagel, V. 1989). Se utilizaron como testigos plantas pulverizadas con agua. Luego

de inoculadas, las plantas fueron dispuestas sobre mesas en una cámara de crecimiento de 12 m<sup>3</sup> con temperatura controlada, y luz fluorescente de 75  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Las condiciones de cámara fueron las utilizadas por Adb-Elrazik A.A. y Lorbeer J.W. (1980): durante las primeras 24 horas se mantuvieron las plantas a 14°C y oscuridad, esta temperatura se mantuvo durante 4 días más, y luego se elevó a 18°C durante 8 días con un fotoperíodo de 12 horas. La humedad relativa se mantuvo entre 95 y 100% durante todo el período.

Al retirar las macetas de la cámara, éstas se observaron durante 72 horas más, por lo que la duración total del ensayo fue de 16 días cubriendo el período de latencia citado. Se realizaron tres repeticiones consecutivas de este ensayo entre los meses de agosto y setiembre. Cada repetición contó con ocho plantas en macetas individuales: seis con plantas inoculadas y dos testigos.

Para mantener la humedad relativa en el rango requerido (95 a 100%), se evaluaron dos sistemas de generación de humedad: vaporizadores domésticos y nebulizadores. Se utilizaron cuatro vaporizadores domésticos simultáneos, regulados por temporizador. Los nebulizadores se colocaron a una distancia de 1,10 m entre ellos. Luego de transcurridas 48 horas de la inoculación, las plantas se observaron diariamente durante todo el ensayo buscando presencia de síntomas o signo.



**Figura 7:** Macetas en cámara de crecimiento. Vaporizadores domésticos (izquierda), nebulizadores (centro), vista con vaporizadores en funcionamiento (derecha).

## *Ensayo 2*

Este ensayo y el siguiente se realizaron durante 2008 y tuvieron como objetivo lograr mayor control de las condiciones requeridas sobre cada una de las fases que forman parte del proceso de inoculación-infección. Se realizaron en el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental Wilson Ferreira Aldunate, Las Brujas, Canelones. La recolección de zoosporangios se realizó de la misma manera que en el ensayo 1. Se inocularon plantas enteras en macetas, cultivar Pantanoso del Sauce CRS, con 5 o 6 hojas extendidas, de 20 cm o más de largo, y al menos 100 días desde la siembra. Luego de la inoculación, las plantas se colocaron en una cámara donde se mantuvieron en oscuridad por 24 h a temperaturas en el rango de los 9 y 20°C y atmósfera saturada (HR 100%). Transcurrido este período, las plantas fueron llevadas a biotrones (LPH-300-RDS, Nippon Medical and Chemical Instruments Co., Tokyo, Japón) donde permanecieron a 14°C durante 4 días, seguidos de 18°C durante 8 días y humedad relativa entre 95 y 100% durante todo el período (Adb-Elrazik, A.A. y Lorbeer, J.W. 1980).

Se definieron ocho tratamientos (Tabla 8) que combinaron:

- (1) Inoculación en húmedo (suspensión) versus “en seco”. En este último caso se depositan los zoosporangióforos sobre la hoja previamente mojada con agua destilada o con agua corriente. Los zoosporangióforos fueron retirados de la superficie de las plantas colectadas con un pequeño cepillo y colocados con éste inmediatamente sobre la superficie de las hojas a inocular.
- (2) Preparación de la suspensión: calidad del agua. Se diferenciaron tratamientos con agua destilada y otros con agua corriente. Se asperjó con un dispensador de mano.
- (3) Remoción o no de la capa de cera de la hoja.

Se realizaron dos repeticiones por tratamiento. Sobre la misma planta se inocularon cuatro hojas, aplicando más de un tratamiento (ejemplo: dos hojas con remoción de serosidad y dos hojas sin remoción). Las observaciones se realizaron cada dos días a partir del tercer día en que las plantas estaban en el biotró (cuarto día post inoculación).



### ***Ensayo 3***

Se realizó en cámara de crecimiento en la Facultad de Agronomía, Universidad de la República. La recolección del inóculo se hizo en las mismas condiciones que para los ensayos 1 y 2. Se inocularon hojas sueltas, provenientes de plantas con las mismas características que el ensayo 2. Se definieron ocho tratamientos que combinaron los mismos factores que en el ensayo 2 y se aplicó cada tratamiento sobre tres hojas colocadas en cajas de plástico. Se realizaron dos repeticiones por tratamiento (Tabla 8, Figura 8). El ensayo completo fue repetido una vez. Se realizaron observaciones diariamente y se registró presencia de síntomas o signo.

### ***Ensayo 4***

En 2009 durante los meses de setiembre y octubre se realizó un experimento en la cámara del CRS que permitió continuar con el ajuste de la metodología para la inoculación en condiciones controladas. Se utilizaron plantas con las mismas características que los ensayos anteriores. Las plantas utilizadas correspondieron a los cultivares INIA Colorada, INIA Fagro Dulce, Pantanoso del Sauce CRS, una población local –Valenciana Caballero– y una accesión de *Allium fistulosum*. La recolección de zoosporangios fue igual que en los experimentos de 2008.



**Figura 8:** Plantas en macetas inoculadas en el ensayo 2 (izquierda), y hojas sueltas inoculadas en el ensayo 3 (centro y derecha).

Teniendo en cuenta los resultados de los ensayos anteriores, previamente a la inoculación las plantas se asperjaron con agua corriente. Se raspó la esporulación de las hojas colectadas a campo con un cubreobjetos, y se distribuyeron los zoosporangios en forma homogénea sobre las hojas a inocular de cada planta. Inmediatamente, se colocó una bolsa de nailon individual sobre cada planta (Figura 9). Las plantas fueron llevadas a la cámara de crecimiento donde se mantuvieron con temperaturas entre 10 y 17°C los primeros cuatro días y entre 10 y 20°C a partir del quinto día.

A los siete días (7 d.d.i.) se retiraron las bolsas de nailon individuales. Al día siguiente (8 d.d.i.) se evaluaron los síntomas observados, y se realizó una segunda evaluación a los 21 días post inoculación (21 d.d.i.).

La incidencia, severidad, y proporción de plantas con esporulación se analizaron ajustando modelos lineales generalizados asumiendo una distribución multinomial ordinal de la escala de severidad, y distribución binomial para la incidencia y la proporción de plantas con esporulación.

**Tabla 8:** Descripción de los ensayos de 2008 (1, 2 y 3) y 2009 (4).

Ensayos	Tratamientos	Material Vegetal	Recolección de zoosporas	Condiciones de cámara
1	1: control de humedad con vaporizadores 2: control de humedad con nebulizadores	P. del Sauce CRS. Plantas enteras	a partir de plantas del cultivo a campo esporuladas, a primera hora de la mañana	24 h oscuridad y 14°C, 4 días a 14°C y 8 días a 18°C. HR 95-100%.
2	1: remoción de cera-suspensión-agua corriente 2: remoción de cera-suspensión-agua destilada 3: remoción de cera-en seco-agua corriente 4: remoción de cera-en seco-agua destilada 5: sin remoción-suspensión-agua corriente 6: sin remoción-suspensión- agua destilada 7: sin remoción-en seco-agua corriente 8: sin remoción-en seco-agua destilada	P. del Sauce CRS. Plantas enteras	a partir de plantas del cultivo a campo esporuladas, a primera hora de la mañana	24 h oscuridad y 9-20°C, 4 días a 14°C y 8 días a 18°C. HR 95-100%.
3	Los mismos 8 tratamientos definidos En el ensayo 2	P. del Sauce CRS. Hojas sueltas	a partir de plantas del cultivo a campo esporuladas, a primera hora de la mañana	24 h oscuridad y 14°C, 4 días a 14°C y 8 días a 18°C. HR 95-100%.
4	todas las plantas fueron inoculadas en seco Sin remoción de cera y previamente humedecidas con agua corriente	P. del Sauce CRS INIA Colorada INIA Fagro Dulce Val. Caballero (PL) <i>A. fistulosum</i>	a partir de plantas del cultivo a campo esporuladas, a primera hora de la mañana	inoculación + bolsa 4 días 10-17°C 10-20°C a partir del 5°



**Figura 9.** Vista general del ensayo 4 de inoculación con *P. destructor* en condiciones controladas. Las plantas permanecieron cubiertas con bolsas de nailon individuales hasta 7 d.d.i.

### 3.3. Resultados

#### *Ensayo 1*

En este primer ensayo, no se observaron síntomas, por lo que no pudo confirmarse infección ni esporulación de *P. destructor*. La dificultad en mantener durante todo el período las condiciones ambientales arriba expuestas (fundamentalmente HR mayor a 95%), se identificó como la principal limitante.

La utilización de nebulizadores se ajustó mejor a las condiciones del ensayo que los vaporizadores domésticos, ya que no afectaron la temperatura. Presentaron como problema la formación de una película de agua continua y permanente sobre las hojas.

### ***Ensayo 2***

No se observaron síntomas ni esporulación de *P. destructor* en las plantas inoculadas mediante suspensión de zoosporas. En cambio, sí se observaron manchas en los tratamientos inoculados “en seco” (Tabla 9). Las manchas observadas eran blancas y deprimidas, de 0,5 a 1 cm promedio de largo. Se observó esporulación en una sola planta con inoculación en seco y con remoción de cera, 48 horas luego de terminado el período en el biotrópico y puesta en condiciones de humedad relativa ambiente, 70– 90%.

No se encontraron diferencias entre la utilización de agua destilada y agua corriente para humedecer la hoja previo a la inoculación “en seco”. La aparición de síntomas se observó en plantas inoculadas en seco, independientemente de que tuvieran o no remoción de la capa de cera (Tabla 9).

### ***Ensayo 3***

En los ensayos con inoculación en hojas sueltas, hubo una importante contaminación con otros patógenos, no pudiéndose discriminar la ocurrencia o no de *P. destructor*. En estos tratamientos no se logró cumplir el total del período establecido para la observación (16 días), ya que las hojas presentaron descomposición del tejido y pudrición generalizada antes de este momento.

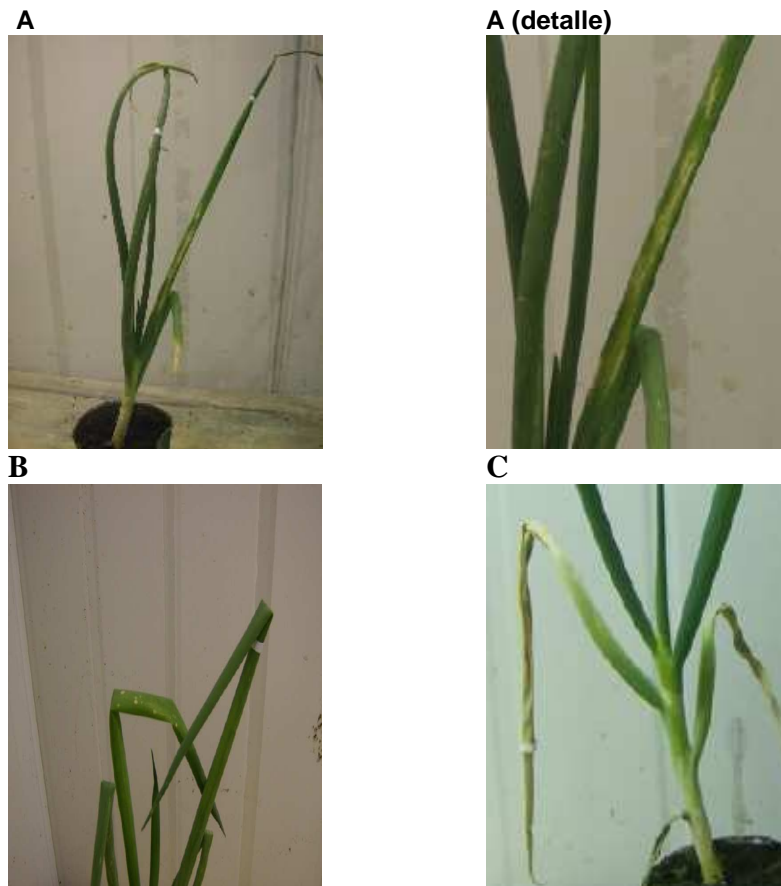
**Tabla 9:** Presencia de manchas y o esporulación de *P. destructor* en función de los días post inoculación según tratamiento. Ensayo 2, 2008.

Remoción cera	Tratamientos		Días desde inoculación			
	Tipo de inoculación	Fuente de agua	4	6	8	10
Si	suspensión	corriente	no	no	no	no
Si	suspensión	destilada	no	no	no	no
Si	en seco	corriente	si*	si	si	si
Si	en seco	destilada	no	si	si	si
no	suspensión	corriente	no	no	no	no
no	suspensión	destilada	no	no	no	no
no	en seco	corriente	si	si	si	si
no	en seco	destilada	no	si	si	si

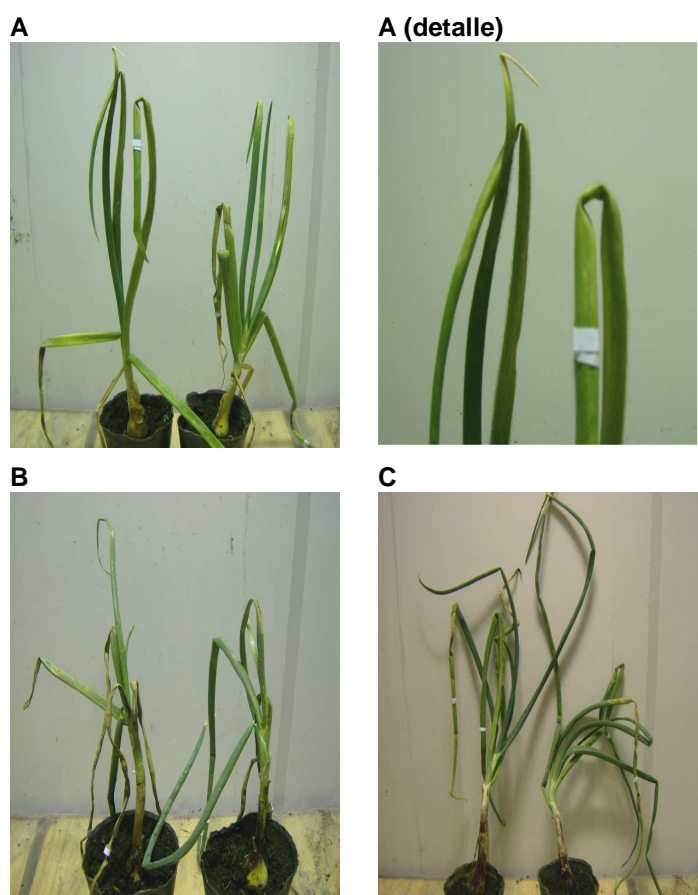
\* en todos los casos las manchas observadas fueron blancas a necróticas, deprimidas, de 0.5 a 1 centímetro promedio de largo.

#### **Ensayo 4**

En este ensayo realizado en 2009, se obtuvieron síntomas necróticos similares a los síntomas obtenidos en el ensayo 3 realizado en 2008 (Figura 10). Los síntomas se observaron desde los 7 días después de la inoculación, cuando se removieron las bolsas de nailon, y siguieron incrementándose hasta la segunda evaluación a los 21 días. La incidencia llegó al 100% de las plantas inoculadas, con un nivel de severidad que provocó el colapso de las hojas inoculadas en los cultivares más susceptibles (Tabla 10). La esporulación se observó en la segunda evaluación, a los 21 días (Figura 11).



**Figura 10.** Síntomas de *P. destructor* observados en el ensayo 4. Las hojas inoculadas se marcaron con un anillo de papel blanco. **A:** Pantanoso del Sauce CRS. Manchas necróticas deprimidas en la zona inoculada, ovoides a irregulares (8 d.d.i.) **B:** *Allium fistulosum*. Manchas pequeñas (hasta 3 mm de diámetro) necróticas deprimidas en la zona (8 d.d.i.). **C:** *Allium fistulosum*. Planta con las dos hojas inoculadas totalmente necróticas (21 d.d.i.).



**Figura 11.** Síntomas de *P. destructor* observados en el ensayo 4 a los 21 d.d.i. **A:** Población local valenciana Caballero, con esporulación sobre tejido verde. **B:** INIA Fagro Dulce. **C:** INIA Colorada.



**Tabla 10.** Evaluación de la incidencia, severidad y esporulación observada en el material vegetal inoculado con *P. destructor*. Ensayo 4, 2009.

Material Vegetal	Nro pl.	Incidencia				Severidad <sup>1</sup>		Esporulación 21 d.d.i.
		8		21		8	21	
		d.d.i.	%	d.d.i.	%	d.d.i.	d.d.i.	
INIA Fagro Dulce	3	3	100	3	100	3.0	3.3	1.00
Pantanos del Sauce	11	7	64	11	100	1.5 a	3.3 a	0.83 ns
INIA Colorada	10	8	80	10	100	1.2 ab	1.7 b	0.89
Valenciana Caballero	12	3	25	11	92	0.3 b	2.7 ab	0.75
<i>Allium fistulosum</i>	11	6	55	10	91	1.0 ab	2.7 ab	0.67

<sup>1</sup> Se utilizó una escala de 0 a 4 para evaluar severidad: 0: sin síntomas; 1: menor a 5% del área foliar afectada; 2: entre 5 y 25%; 3: de 25 a 50%; 4: mayor a 50%

### 3.4. Discusión

Los resultados obtenidos permitieron el ajuste metodológico necesario para el mantenimiento e inoculación en condiciones controladas con *P. destructor*. La humedad relativa cercana a la saturación y temperaturas en el rango de 10 a 15°C, se confirmaron como requisitos imprescindibles para lograr infección y posterior esporulación. El éxito obtenido en el ensayo 4 puede ser atribuible al logro de estas condiciones. Asimismo, la ausencia de una película continua de agua sobre la hoja parece clave para el éxito de la esporulación. Esto se corresponde con el comportamiento a campo de la enfermedad, donde la esporulación fallaba cuando se registraban días de lluvias que mantenían la hoja mojada (Hildebrand, P.D. y Sutton, J.C. 1982).

La inoculación “en seco” parece más efectiva que la aplicación de una suspensión de zoosporangios como método de inoculación. Este método se asemeja más a lo que ocurriría en condiciones de campo, donde las zoosporas se liberan debido a descensos importantes en la humedad relativa y se dispersan con el viento (Leach, *et al.* 1982). Las mismas no llegan con un medio líquido (como podría ser el salpicado) como sí ocurre con otros patógenos. Si se utilizara esta forma de inoculación para trabajos futuros,

habría que prever cómo cuantificar la concentración de zoosporas inoculadas. A la vez, se debería continuar con el ajuste del método de inoculación con una suspensión de zoosporangios, utilizado en trabajos previos (Adb-Elrazik, A.A. y Lorbeer, J.W., 1980; Kofoet, A. y Zinkernagel, V., 1989).

Los síntomas se observaron en los tratamientos en seco, independientemente de la fuente de agua utilizada para humedecer la hoja (Tabla 10). La ausencia de sales en el agua destilada no tuvo efecto marcado sobre las zoosporas cuando es utilizada con este fin.

La infección ocurrió en plantas con y sin remoción de cera, aunque el escaso número de plantas utilizadas o la falta de repetición del ensayo completo imposibilitan confirmar las diferencias encontradas por Adb-Elrazik y Lorbeer (1980) en el porcentaje de infección.

En el ensayo 4 realizado en 2009 se observaron diferencias entre las accesiones, aun cuando el objetivo no era realizar una evaluación de materiales genéticos. *Allium fistulosum* tuvo principalmente manchas necróticas de 2 a 6 mm de diámetro (Figura 11), más chicas que los cultivares de cebolla susceptibles INIA Fagro Dulce y Pantanoso del Sauce (manchas ovoides de 10 a 30 mm de diámetro, que coalescen). Este resultado coincidiría con trabajos previos donde se reporta el comportamiento susceptible de *A. fistulosum* a *P. destructor* (Kofoet, A. y Zinkernagel, V., 1989). En este trabajo se encontró que si bien es susceptible, en general presenta menor grado de susceptibilidad que la mayoría de los cultivares de *A. cepa*.

Los cultivares INIA Fagro Dulce y Pantanoso del Sauce CRS fueron los más susceptibles, con 100% de incidencia y alta severidad. INIA Colorada tuvo alta incidencia y menor severidad. Las poblaciones locales valenciana Caballero seguida de *A. fistulosum* tuvieron una expresión inicial de la enfermedad menor que la de otros cultivares de cebolla, lo que se expresa en baja incidencia y severidad. En la segunda evaluación el nivel de incidencia y severidad fue alto, no observándose diferencias entre

los cultivares evaluados. Si bien el cultivar Colorada INIA tuvo alta incidencia, presentó menor progreso en la severidad, diferenciándose del cultivar susceptible Pantanoso del Sauce CRS en la segunda evaluación (21 d.d.i.). Estos resultados coinciden con las diferencias observadas a campo.

De confirmarse esta correspondencia entre la inoculación en condiciones controladas y los resultados obtenidos a campo, la primera resultará una herramienta complementaria de gran utilidad en el mejoramiento genético que puede facilitar y dinamizar la selección y evaluación de materiales, con mayor independencia de las condiciones ambientales a campo. También posibilitaría la realización de nuevos trabajos que profundizaran el conocimiento acerca de la biología de *P. destructor*, sus mecanismos de infección, y sobre epidemiología del patógeno.

## CONCLUSIONES

Las diferencias observadas en incidencia y severidad representan un elemento valioso para el control de la enfermedad, en particular en un esquema de control integrado. La resistencia parcial con que cuentan algunos de los materiales evaluados, por ejemplo UR9104 y UR8902, no evita que la planta se enferme sino que retarda el desarrollo de la infección y por tanto la propagación de la enfermedad y el desarrollo de la epidemia.

Si bien se requiere de más años de evaluación para confirmar la estabilidad en el comportamiento de estas accesiones, los resultados son promisorios en cuanto a la utilización de las accesiones UR9104, UR8902 y el cultivar Canarita CRS como fuentes de resistencia parcial en programas de mejoramiento.

La complementariedad con evaluaciones en condiciones controladas permitiría confirmar estos resultados. El éxito en la infección y la esporulación de *P. destructor* obtenido mediante el ajuste metodológico realizado, permite la planificación de trabajos futuros que determinen y cuantifiquen diferencias entre las accesiones y cultivares en el período de latencia, la tasa de infecciones y la producción de esporas.

Los avances obtenidos en cuanto a la metodología para el mantenimiento e inoculación con *P. destructor*, indican que hay correspondencia entre los resultados obtenidos a campo y lo observado con las inoculaciones en condiciones controladas.

**BILIOGRAFÍA**

- Abd-elrazik, A.A.; Lorbeer, J.W. 1980. A procedure for isolation and maintenance of *Peronospora destructor* on onion. *Phytopathology*. 70: 780 – 782.
- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology*. Elsevier Academic Press. Florida. 921p.
- Alan, A.R.; Mutschler, M.A.; Brants, A.; Cobb, E.; Earle, E.D. 2003. Production of gynogenic plants from hybrids of *Allium cepa* L. and *A. roylei* Stearn. 165 (6): 1201 – 1211.
- Bashi, E.; Aylor, D.E. 1983. Survival of detached sporangia of *Peronospora destructor* and *Peronospora tabacina*. *Phytopathology*. 72: 1135 – 1139.
- Bäurle, I.; Dean, C. 2006. The timing of developmental transitions in plants. *Cell*, 125: 655-664.
- Buloviené, V.; Surviliené, E. 2006. Effect of environmental conditions and inoculum concentration on sporulation of *Peronospora destructor*. *Agronomy Research*. 4: 147-150.
- Campbell, C.L. 1998. Disease progress in time: modelling and data analysis. En: *The epidemiology of plant diseases*. Ed. Gareth Jones. Springer, Netherlands. pp 42 – 72.
- Coelho, P.S.; Valério, L.; Monteiro, A.A. 2009. Leaf position , leaf age and plant age affect the expresión of downy mildew resistanse in *Brassica oleracea*. *European Journal of Plant Pathology*. 125: 179-188.

- Dangl, J.L.; Jones, J.D.C. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*. 411: 826-833.
- Galván, G.; González, P.; Reggio, A. 2004. Onion leaf blight caused by *Botrytis squamosa* in Uruguay and the differential response of local cultivars. *Allium improvement Newsletter*. 13:51-54.
- González, H.; Colnago, P.; González, P.; Peluffo, S.; Zipitría, J. 2008. Efecto de las prácticas de manejo del cultivo semillero de cebolla en presencia de enfermedades y en el rendimiento y calidad de las semillas. Informe final de Proyecto CSIC 2005-2007. Facultad de Agronomía – Universidad de la República. Uruguay.
- Griffiths, H.M.; Jones, D.G. 1987. Components of partial resistance as criteria for identifying resistance. *Annals of Applied Biology*. 110: 603 – 610.
- Hildebrand, P.D.; Sutton, J.C. 1982. Weather variables in relation to an epidemic of onion Downy Mildew. *Phytopathology*, 72 (2): 219 – 224.
- Jones, J.D.G.; Dangl J.L. 2006. The plant immune system. *Nature*. 444: 323-329.
- Kamoun, S.; Van West, P.; Govers, F. 1998. Quantification of late blight resistance of potato using transgenic *Phytophthora infestans* expressing B-glucuronidase. *European Journal of Plant Pathology*. 104: 521-525.
- Kofoet, A.; Zinkernagel, V. 1989. Resistance to downy mildew (*Peronospora destructor* (Berk.) Casp.) in *Allium* species. *Journal of Plant Diseases and Protections*. 97 (1): 13 – 23.

- Kofoet, A.; Kik, C.; Wietsma, W.A.; De Vries, J.N. 1990. Inheritance of resistance to downy mildew (*Peronospora destructor* (Berk.) Casp.) from *Allium roylei* Stearn in the backcross *Allium cepa* L. x (*A. Roylei* x *A. cepa*). *Plant Breeding*. 105: 144 – 149.
- Kofoet, A.; Fischer, K. 2007. Evaluation of plant resistance improvers to control *Peronospora destructor*, *P. parasitica*, *Bremia lactucae* and *Pseudoperonospora cubensis*. *Journal of Plant Diseases and Protections*. 114 (2): 54 – 61.
- Kramer, C.Y. 1956. Extension of multiple range tests to group means with unequal numbers of replications. *Biometrics*. 12: 309–310.
- Kushalappa, A.C.; Ludwig, A. 1982. Calculation of apparent infection rate in plant diseases: Development of a method to correct for host growth. *Phytopathology* 72: 373 - 377.
- Lazarovits, G.; Stössel, R.; Ward E.W.B. 1981. Age-related changes in specificity and glyceollin production in the hypocotyl reaction of soybeans to *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Phytopathology*. 71: 94-97.
- Leach, C.M.; Hildebrand, P.D.; Sutton, J.C. 1982. Sporangium discharge by *Peronospora destructor*: influence of humidity, red-infrared radiation and vibration. *Phytopathology*, 72: 1056 –1056.
- Maeso, D.; Arboleya, J.; Fernández, S.; Suárez, C.; Medina, V. 2000. Evaluación de un sistema de pronóstico para el control de enfermedades foliares en diferentes cultivares de cebolla. En: INIA Las Brujas, Serie Actividades de difusión 223. pp. 17-29.

- Maeso, D. 2005. Enfermedades del cultivo de cebolla. En: Tecnología para la producción de cebolla. Ed. Arboleya, J. Boletín de divulgación 88: pp. 167-172.
- Maude, R.B., 1990. Leaf diseases of onions. En: Onions and Allied crops. Volume 2. pp. 173-190. Ed. Rabinowitch, H. D. and Brewster, J. L. CRC Press, Florida. 320p.
- MGAP-DIEA, 2007. Encuestas hortícolas 2008. Zonas Sur y Litoral Norte. Serie Encuestas n° 263. 44p.
- MGAP-DIEA, 2009. Encuestas hortícolas 2008. Zonas Sur y Litoral Norte. Serie Encuestas n° 277. 27p.
- Pedrosa, R.A.; Maffia, L.A.; Mizubuti, E.S.; Brommonschenkel, S.H. 2004. Componentes de resistencia em cebola a *Collectotrichum gloesporioides*. Fitopatologia Brasileira. 29: 606 – 613.
- Pierre, M.; Riviere, D.; Galiana, E. 2007. Resistance to pathogens and host developmental stage: a multifaceted relationship within the plant kingdom. New Phytologist. 175: 405-416.
- Poethig, R.S. 2003. Phase change and the regulation of developmental timing in plants. Science. 301: 334-336.
- Qi, X.; Jiang, G.; Chen, W.; Niks, R.E.; Stam, P.; Lindhout, P.; 2004. Isolate-specific QTLs for partial resistance to *Puccinia hordei* in barley. Theoretical and Applied Genetics. 99: 877-884.



- Rabbinge, R.; Zadoks, J.C.; Bastiaans, L. 1989. Population models. En Simulation and systems management in crop protection. Ed Rabbinge, R., Ward, S.A. and van Laar, H.H. Wageningen. pp. 81-118.
- Scholten, O.E.; Van Heusden, A.W.; Khrustaleva, L.I.; Burger-Meijer, K.; Mank, R.A.; Antonise, R.G.C.; Harrewijn, J.L.; Van Haecke, W.; Oost, E.H.; Peters, R.J.; Kik, C. 2007. The long and winding road leading to the successful introgression of downy mildew resistance into onion. *Euphytica*. 156: 345-353.
- Schwartz, H.F.; Mohan, S.K. 2008. Compendium of onion and garlic diseases. APS Press. St Paul, Minnesota, USA. 54p.
- Smith, R.W. 1985. Reappearance and control of onion downy mildew epidemics in New York. *Plant Disease*. 69: 703-706.
- Van der Doorn, A.M. 1959. Investigations on the occurrence and the control of downy mildew (*Peronospora destructor*) in onions. *European Journal of plant diseases*. (6) 65, 193-255.
- Van der Meer, Q.P.; Vries, J.N. 1990. An interspecific cross between *Allium roylei* Stearn and *Allium cepa* L., and its backcross to *A. cepa*. *Euphytica*. 47: 29-31.
- Vanderplank, J.E. 1984. Disease resistance in plants. Academic Press, INC. 194p.
- Yarwood, C.E., 1943. Onion downy mildew. *Hilgardia* 14, 595-691.
- Zadoks, J.C.; Schein, R.D. 1979. Epidemiology and plant disease management. Oxford Univ. press, New York. 427p.

## 6

### ANEXOS

**Anexo 1.** Accesiones que presentaron la combinación más baja de proporción de plantas con síntomas típicos de *P. destructor* y de severidad.

Accesión	Incidencia* (% plantas enfermas)	Severidad (% tejido afectado)
UR9104	3	11.25
UR8902	43	6.80
UR8815	42	11.25
UR8701	43	11.25
UR8703	39	15.00
UR8906	39	10.00
UR8823	23	15.63

\* Valores para el 9 de noviembre de 2007.

**Anexo 2.** Duración en horas de las condiciones de humedad y temperatura favorables a *P. destructor* de según fecha. Años 2007 y 2008.

2007			2008		
Hs	Hs ópt	Día	Hs	Hs ópt.	Día
7	6.5	6-set	7.5	0	7-set
6.5	0	7-set	6.5	0	8-set
6.5	2.5	12-set	4	0	9-set
6.5	0	14-set	4.5	0	10-set
9	0	15-set	9.5	9.5	11-set
6.5	3	16-set	4	0	15-set
4	4	18-set	2	0	16-set
6.5	0	20-set	3	0	20-set
6.5	0	21-set	4	0	23-set
6.5	0	22-set	2	0	29-set
6.5	0	28-set	9.5	6.5	30-set
5.5	0	3-Oct	7	7	1-Oct
2.5	0	4-Oct	9	0	2-Oct
5.5	0	5-Oct	9.5	0	13-Oct
4.5	0	6-Oct	9.5	0	14-Oct
3.5	3.5	9-Oct	9	7.5	15-Oct
4.5	3	11-Oct	7.5	0	16-Oct
6.5	0	14-Oct	2	0	17-Oct
6	0	16-Oct	2	0	18-Oct
6.5	0	17-Oct	3.5	0	22-Oct
6	2.5	26-Oct	2.5	0	24-Oct
6	6	19-Nov	2	2	3-Nov
5.5	2	21-Nov	4.5	4.5	7-Nov
2	0	23-Nov	2.5	0	29-Nov
			6.5	0	30-Nov
			8	0	1-dic
			2.5	0	4-dic
			3.5	0	24-dic

**Anexo 3.** Origen y características morfológicas de la colección de materiales genéticos evaluados en 2007.

<b>Identificación</b>	<b>Origen</b>	<b>Momento cosecha</b>	<b>Porte follaje</b>	<b>Serosidad de la hoja</b>	<b>Color bulbo</b>	<b>Forma bulbo</b>
UR19101	Canelones	noviembre	erecto	Media	Br y BrO	E y O
UR8709	Tapia, Canelones	diciembre	erecto	Media-alta	BrO	E y O
UR9718	Pantanosos Sauce	noviembre	Semi erecto	Alta	Ch	C
UR9727	Porvenir, Paysandú	diciembre	Semi erecto	Media alta	BrC y Mr	Ech
UR9729	Constitución, Salto	diciembre	erecto	Alta	BrO	B
UR9704	Mercedes, Soriano	diciembre	erecto	Media-alta	Br y BrC	Ch y O
UR9720	Pantanosos Sauce	diciembre	Semi erecto	media	C	Ch
UR7022	Pantanosos Sauce, Can.	diciembre	erecto	baja	Br y Mr	B y O
UR9101	Canelones	diciembre	Semi-erecto	alta	Br y BrO	E y O
UR7021	Canelón Grande, Can	enero	erecto	Alta	BrO	O
UR9702	Esperanza, Paysandú	diciembre	erecto	Media-alta	Br y BrC	E y O
UR9103	Canelones	enero	erecto	Baja	BrO	B
UR8903	San Bautista, Can.	diciembre	erecto	Media	BrO	B y O
UR8823	Pando, Can.	enero	erecto	Baja	BrO	B y O
UR8819	La Paloma, Can	enero	Semi-erecto	Media	BrO	O
UR8703	San Bautista, Can.	enero	erecto	Media	Br	B y O
UR8905	Piedra Sola, Can.	enero	erecto	Media	BrO	O
UR9102	Canelones	diciembre	erecto	Media	BrO y M	B y O
UR8907	Canelones	enero	erecto	Alta	BrO	O
UR8710	Canelones	enero	erecto	Baja	BrO	B
UR8901	San Bautista, Can.	enero	erecto	Media	BrO	B y O
UR8701	San Bautista, Can.	enero	erecto	Baja	BrO	O
UR8815	Los Arenales, Can.	enero	erecto	Baja	BrO	O
UR9104	Canelones	enero	erecto	Baja	Br	O
UR8906	Piedra Sola, Can.	enero	erecto	Alta	BrO	B
UR9706	Mercedes, Soriano	enero	erecto	Alta	BrC	E y O
UR8902	Cañada Grande, Can	enero	erecto	Baja	BrC	B
INIA		noviembre	erecto	Alta	C	Ech y
Colorada						O
Pantanosos		diciembre	erecto	alta	BrO	E
CRS						

<b>Br</b>	Bronceado	<b>O</b>	Oval
<b>BrO</b>	Bronceado Oscuro	<b>B</b>	Botella
<b>BrC</b>	Bronceado Claro	<b>E</b>	Esférica
<b>M</b>	Marrón	<b>Ech</b>	Esférica Chata
<b>Mr</b>	Marrón rojizo	<b>Ch</b>	Chata
<b>C</b>	Colorado		

**Anexo 4.** Primavera 2007 (setiembre-diciembre). Días y horas dentro del rango de temperaturas óptimas (12-14°C y HR igual o mayor a 95%)

<b>FECHA</b>	<b>HORA</b>	<b>Tx</b>	<b>Tmin</b>	<b>Tmax</b>	<b>HUM</b>
6-Sep	0:00	12.2	12.3	12.2	98
6-Sep	0:15	12.1	12.2	12.1	98
6-Sep	0:30	12	12.2	12	99
6-Sep	1:00	12.5	12.5	12.1	100
6-Sep	1:15	12.7	12.7	12.5	100
6-Sep	1:30	12.7	12.7	12.6	100
6-Sep	1:45	12.7	12.7	12.7	100
6-Sep	2:00	12.7	12.7	12.7	100
6-Sep	2:15	12.7	12.8	12.7	100
6-Sep	2:30	13.1	13.1	12.7	100
6-Sep	2:45	13	13.2	13	100
6-Sep	3:00	13.2	13.2	13	100
6-Sep	3:15	13.2	13.2	13.2	100
6-Sep	3:30	13.2	13.2	13.1	100
6-Sep	3:45	12.8	13.2	12.8	100
6-Sep	4:00	12.9	12.9	12.8	100
6-Sep	4:15	12.8	13	12.8	100
6-Sep	4:30	12.7	12.9	12.7	100
6-Sep	4:45	12.9	12.9	12.7	100
6-Sep	5:00	12.8	12.9	12.8	100
6-Sep	5:15	13	13	12.8	100
6-Sep	5:30	12.8	13	12.7	100
6-Sep	5:45	12.5	12.8	12.5	100
6-Sep	6:00	12.7	12.7	12.5	100
6-Sep	6:15	12.9	12.9	12.7	100
6-Sep	6:30	13	13.1	12.9	100
12-Sep	4:30	13.8	13.9	13.8	97
12-Sep	4:45	13.7	13.8	13.7	98
12-Sep	5:00	13.6	13.7	13.6	99
12-Sep	5:15	13.6	13.6	13.6	99
12-Sep	5:30	13.6	13.6	13.5	100
12-Sep	5:45	13.7	13.7	13.6	100
12-Sep	6:00	13.7	13.7	13.7	100
12-Sep	6:15	13.7	13.7	13.7	100
12-Sep	6:30	13.6	13.7	13.6	100
16-Sep	0:00	12.7	12.7	12.7	100
16-Sep	0:15	12.7	12.7	12.7	100
16-Sep	0:30	12.6	12.7	12.6	100
16-Sep	0:45	12.5	12.6	12.5	100
16-Sep	1:00	12.4	12.5	12.4	100

16-Sep	1:15	12.4	12.4	12.4	100
16-Sep	1:30	12.3	12.4	12.3	100
16-Sep	1:45	12.2	12.3	12.2	100
16-Sep	2:00	12.2	12.2	12.2	100
16-Sep	2:15	12.2	12.2	12.2	100
16-Sep	2:30	12.1	12.2	12.1	100
16-Sep	2:45	12.1	12.1	12.1	100
16-Sep	3:00	12	12.1	12	100
18-Sep	2:30	12	12	12	95
18-Sep	2:45	12.1	12.1	12	96
18-Sep	3:00	12.1	12.1	12.1	96
18-Sep	3:15	12.2	12.2	12.1	95
9-Oct	3:00	12.5	12.6	12.5	95
9-Oct	3:15	12.5	12.5	12.5	95
9-Oct	3:30	12.4	12.5	12.4	95
9-Oct	3:45	12.4	12.4	12.4	95
9-Oct	4:00	12.5	12.5	12.4	95
9-Oct	4:15	12.5	12.5	12.5	95
9-Oct	4:30	12.5	12.5	12.5	95
9-Oct	4:45	12.6	12.6	12.5	96
9-Oct	5:00	12.5	12.6	12.5	96
9-Oct	5:15	12.6	12.6	12.5	97
9-Oct	5:30	12.6	12.6	12.5	99
9-Oct	5:45	12.6	12.6	12.6	100
9-Oct	6:00	12.6	12.6	12.6	100
9-Oct	6:15	12.7	12.7	12.6	100
9-Oct	6:30	12.7	12.7	12.7	100
12-Oct	0:00	12.7	12.7	12.7	97
12-Oct	0:15	12.7	12.7	12.7	98
12-Oct	0:30	12.7	12.7	12.7	98
12-Oct	0:45	12.7	12.7	12.7	97
12-Oct	1:00	12.7	12.7	12.7	96
12-Oct	1:15	12.7	12.7	12.7	95
17-Oct	0:00	12.2	12.2	12.2	100
17-Oct	0:15	12.2	12.2	12.2	100
17-Oct	1:00	12.2	12.2	12.2	100
26-Oct	0:30	13.5	13.5	13.3	95
26-Oct	0:45	13.3	13.5	13.3	95
26-Oct	1:00	13	13.3	13	95
26-Oct	1:15	12.9	13.1	12.8	96
26-Oct	1:30	12.7	12.9	12.7	96
26-Oct	1:45	12.7	12.8	12.7	100
26-Oct	2:00	12.4	12.7	12.3	100
26-Oct	2:15	12.3	12.4	12.1	100
26-Oct	2:30	12.3	12.3	12.3	100
26-Oct	2:45	12.4	12.4	12.3	100

29-Oct	5:15	12.1	12.1	12	96
29-Oct	5:30	13	13	12.1	100
29-Oct	6:30	13.6	13.6	13.4	96
30-Oct	5:30	13.4	13.4	13.2	96
30-Oct	5:45	13.5	13.5	13.4	99
30-Oct	6:00	13.9	13.9	13.4	100
19-Nov	0:15	12.7	13	12.7	95
19-Nov	0:30	13.1	13.1	12.7	100
19-Nov	0:45	13.4	13.5	13.2	100
19-Nov	1:00	13.7	13.7	13.4	100
19-Nov	1:15	13.3	13.7	13.3	100
19-Nov	1:30	13.1	13.3	13.1	100
19-Nov	1:45	12.7	13.1	12.6	100
19-Nov	2:00	12.4	12.7	12.4	100
19-Nov	2:15	12.2	12.3	12.2	100
19-Nov	2:30	12.9	12.9	12.2	100
19-Nov	2:45	13.5	13.5	12.9	100
19-Nov	3:00	13.2	13.7	13.2	100
19-Nov	3:15	12.7	13.3	12.7	100
19-Nov	6:00	13.2	13.2	12.7	100
19-Nov	6:15	13.3	13.3	13.2	100
19-Nov	6:30	13.4	13.4	13.3	100
21-Nov	1:00	12.7	12.7	12.3	96
21-Nov	1:15	12.7	12.7	12.6	96
21-Nov	1:30	12.8	12.8	12.7	100
21-Nov	1:45	12.8	12.9	12.8	100
21-Nov	2:00	12.7	12.8	12.7	100
21-Nov	2:15	12.6	12.7	12.6	100
21-Nov	2:30	12.3	12.6	12.3	100
21-Nov	2:45	12.1	12.3	12.1	100

**Anexo 3:** Primavera 2008 (setiembre-diciembre). Días y horas dentro del rango de temperaturas óptimas (12-14°C y HR igual o mayor a 95%)

<b>FECHA</b>	<b>HORA</b>	<b>Tx</b>	<b>Tmin</b>	<b>Tmax</b>	<b>HUM</b>
10-Sep	21:00	13.8	13.8	13.7	99
10-Sep	21:15	13.8	13.8	13.8	99
10-Sep	21:30	13.9	13.9	13.9	99
10-Sep	21:45	13.9	13.9	13.9	100
10-Sep	22:00	13.9	13.9	13.9	100
10-Sep	22:15	13.8	13.9	13.8	100
10-Sep	22:30	13.8	13.8	13.8	100
10-Sep	22:45	13.8	13.8	13.8	100
10-Sep	23:00	13.7	13.8	13.7	100
10-Sep	23:15	13.7	13.7	13.7	100
10-Sep	23:30	13.7	13.8	13.7	100
10-Sep	23:45	13.7	13.7	13.7	100
11-Sep	0:00	13.7	13.7	13.7	100
11-Sep	0:15	13.7	13.7	13.7	100
11-Sep	0:30	13.7	13.7	13.7	100
11-Sep	0:45	13.7	13.7	13.7	100
11-Sep	1:00	13.7	13.7	13.7	100
11-Sep	1:15	13.7	13.7	13.7	100
11-Sep	1:30	13.7	13.7	13.7	100
11-Sep	1:45	13.7	13.7	13.7	100
11-Sep	2:00	13.8	13.8	13.7	100
11-Sep	2:15	13.9	13.9	13.8	100
11-Sep	2:30	13.9	13.9	13.9	100
11-Sep	2:45	13.9	13.9	13.9	100
11-Sep	3:00	13.9	13.9	13.9	100
11-Sep	3:15	13.9	13.9	13.9	100
11-Sep	3:30	13.8	13.9	13.8	100
11-Sep	3:45	13.8	13.8	13.8	100
11-Sep	4:00	13.8	13.8	13.8	100
11-Sep	4:15	13.7	13.8	13.7	100
11-Sep	4:30	13.7	13.7	13.7	100
11-Sep	4:45	13.6	13.7	13.6	100
11-Sep	5:00	13.6	13.6	13.6	100
11-Sep	5:15	13.5	13.6	13.5	100
11-Sep	5:30	13.6	13.6	13.5	100
11-Sep	5:45	13.6	13.6	13.6	100
11-Sep	6:00	13.7	13.7	13.6	100
11-Sep	6:15	13.7	13.7	13.7	100
11-Sep	6:30	13.8	13.8	13.7	100
27-Sep	2:30	13.1	13.1	12	96



30-Sep	0:45	13.8	13.9	13.8	97
30-Sep	1:00	13.8	13.8	13.8	98
30-Sep	1:15	13.7	13.8	13.7	98
30-Sep	1:30	13.7	13.8	13.7	100
30-Sep	1:45	13.7	13.7	13.7	100
30-Sep	2:00	13.7	13.7	13.7	100
30-Sep	2:15	13.7	13.7	13.7	100
30-Sep	2:30	13.6	13.7	13.6	100
30-Sep	2:45	13.6	13.6	13.6	100
30-Sep	3:00	13.5	13.6	13.5	100
30-Sep	3:15	13.4	13.5	13.4	100
30-Sep	3:30	13.4	13.4	13.4	100
30-Sep	3:45	13.4	13.4	13.4	100
30-Sep	4:00	13.3	13.4	13.3	100
30-Sep	4:15	13.2	13.3	13.2	100
30-Sep	4:30	13.2	13.3	13.2	100
30-Sep	4:45	13.2	13.2	13.2	100
30-Sep	5:00	13.2	13.2	13.2	100
30-Sep	5:15	13.2	13.2	13.2	100
30-Sep	5:30	13.1	13.2	13.1	100
30-Sep	5:45	13	13.1	13	100
30-Sep	6:00	13	13.1	13	100
30-Sep	6:15	12.9	13	12.9	100
30-Sep	6:30	12.9	12.9	12.9	100
30-Sep	23:15	12.6	12.6	12.6	95
30-Sep	23:30	12.6	12.6	12.6	96
30-Sep	23:45	12.6	12.6	12.6	96
1-Oct	0:00	12.2	12.6	12.2	96
1-Oct	0:45	12.3	12.3	12.2	100
1-Oct	1:00	12.4	12.4	12.3	100
1-Oct	1:15	12.5	12.5	12.4	100
1-Oct	1:30	12.6	12.6	12.5	100
1-Oct	1:45	12.6	12.6	12.6	100
1-Oct	2:00	12.7	12.7	12.6	100
1-Oct	2:15	12.7	12.7	12.7	100
1-Oct	2:30	12.7	12.7	12.7	100
1-Oct	2:45	12.7	12.7	12.7	100
1-Oct	3:00	12.8	12.8	12.7	100
1-Oct	3:15	12.8	12.8	12.8	100
1-Oct	3:30	12.8	12.8	12.8	100
1-Oct	3:45	12.9	12.9	12.8	100
1-Oct	4:00	12.9	12.9	12.9	100
1-Oct	4:15	12.9	12.9	12.9	100
1-Oct	4:30	12.9	12.9	12.9	100
1-Oct	4:45	12.9	12.9	12.9	100
1-Oct	5:00	12.8	12.9	12.8	100

1-Oct	5:15	12.8	12.8	12.8	100
1-Oct	5:30	12.8	12.8	12.7	100
1-Oct	5:45	12.8	12.8	12.8	100
1-Oct	6:00	12.8	12.8	12.8	100
1-Oct	6:15	12.9	12.9	12.8	100
1-Oct	6:30	12.9	12.9	12.9	100
11-Oct	5:15	13.2	13.4	13.1	95
11-Oct	5:30	13.2	13.2	13.2	96
11-Oct	5:45	13	13.2	13	97
11-Oct	6:00	13.3	13.3	13	99
11-Oct	6:15	13.4	13.4	13.3	98
11-Oct	6:30	13.7	13.7	13.4	98
14-Oct	22:45	13.7	13.8	13.7	99
14-Oct	23:00	13.6	13.7	13.6	100
14-Oct	23:15	13.6	13.6	13.6	100
14-Oct	23:30	13.6	13.6	13.6	100
14-Oct	23:45	13.7	13.7	13.6	100
15-Oct	0:00	13.7	13.7	13.7	99
15-Oct	0:15	13.7	13.7	13.7	98
15-Oct	0:30	13.6	13.7	13.6	96
15-Oct	0:45	13.4	13.6	13.4	95
15-Oct	1:00	13.4	13.4	13.3	95
15-Oct	1:15	13.4	13.4	13.4	95
15-Oct	1:30	13.4	13.4	13.3	96
15-Oct	1:45	13.4	13.5	13.4	96
15-Oct	2:00	13.4	13.4	13.4	97
15-Oct	2:15	13.3	13.4	13.3	98
15-Oct	2:30	13.4	13.4	13.3	99
15-Oct	2:45	13.6	13.6	13.4	100
15-Oct	3:00	13.6	13.6	13.6	99
15-Oct	3:15	13.6	13.6	13.6	99
15-Oct	3:30	13.6	13.6	13.6	99
15-Oct	3:45	13.6	13.6	13.6	100
15-Oct	4:00	13.5	13.6	13.5	100
15-Oct	4:15	13.6	13.6	13.5	100
15-Oct	4:30	13.6	13.6	13.5	100
15-Oct	4:45	13.6	13.6	13.6	100
15-Oct	5:00	13.7	13.7	13.6	100
15-Oct	5:15	13.7	13.7	13.7	100
15-Oct	5:30	13.7	13.7	13.7	100
15-Oct	5:45	13.7	13.7	13.7	99
15-Oct	6:00	13.7	13.7	13.7	100
15-Oct	6:15	13.7	13.7	13.7	100
15-Oct	6:30	13.8	13.8	13.7	100
3-Nov	4:30	12.8	12.8	12.7	96
3-Nov	4:45	12.7	12.9	12.7	96

3-Nov	5:00	12.8	12.8	12.7	97
3-Nov	5:15	12.9	13	12.8	97
3-Nov	5:30	12.5	12.8	12.3	99
3-Nov	5:45	12.3	12.5	12.2	100
3-Nov	6:00	13	13	12.4	100
3-Nov	6:15	13.5	13.5	13	100
3-Nov	6:30	13.8	13.8	13.5	100
7-Nov	2:00	13.7	13.7	13.4	95
7-Nov	3:15	13.5	13.5	13.3	96
7-Nov	3:30	13.6	13.6	13.3	100
7-Nov	3:45	13.5	13.6	13.5	97
7-Nov	4:00	13.3	13.5	13.3	97
7-Nov	4:15	13.2	13.3	13.1	98
7-Nov	4:30	12.9	13.2	12.9	97
7-Nov	4:45	12.9	12.9	12.8	100
7-Nov	5:00	12.6	12.9	12.6	98
7-Nov	5:15	12.7	12.7	12.5	100
7-Nov	5:30	12.6	12.7	12.6	100
7-Nov	5:45	12.3	12.6	12.3	100
7-Nov	6:00	12.3	12.4	12.3	100
7-Nov	6:15	13	13	12.3	100
7-Nov	6:30	13.9	13.9	13.1	100