



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Rol de enzimas relacionadas a la patogénesis en cebolla y especies emparentadas, en respuestas de defensa a patógenos fúngicos

Pablo Galeano

Tesis de Maestría

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Magíster

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Setiembre 2025

**Rol de enzimas relacionadas a la patogénesis en
cebolla y especies emparentadas, en respuestas de
defensa a patógenos fúngicos**

Tribunal:

Ing. Agr. PhD. Carolina Leoni, Presidente

Dra. Cecilia Giacomini

Dra. María Inés Siri

Dra. Laura Franco Fraguas, Directora

Dr. Guillermo Galván, Director

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis Laura Franco Fraguas y Guillermo Galván. Gracias por su infinita paciencia, enseñanzas, compañerismo y generosidad. Dicen que a la suerte hay que ayudarla, pero en este caso me siento un afortunado sin esfuerzo. Además de dos profesores excelentes son grandes personas. Esta tesis es también un compromiso y un hacer con ellos.

Sin duda, el haber culminado esta etapa es responsabilidad y mérito también de otras y otros que acompañaron, empujaron, caminaron y trabajaron conmigo. No sé si me acordaré de todos. Primero, al grupo humano del Área Bioquímica de Facultad de Química agradecer la generosidad en el compartir, el respeto en el hacer, y la persistencia en su amable presión para que terminara esta etapa. Me siento muy a gusto, sostenido y reconocido por ese lindo grupo de personas que además saben mucho de bioquímica y áreas afines. También agradecer al equipo del CRS de Facultad de Agronomía, en particular a Natalia Curbelo por su generoso e imprescindible trabajo en la producción de plantas y colaboración con los ensayos. Al Departamento de Fitopatología de Facultad de Agronomía en la persona del Profesor Pedro Mondino, por el acceso a cepas, laboratorio y saberes. Al profesor Marciel Stadnik del Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Federal de Santa Catarina (UFSC) donde realicé una pasantía que contribuyó a mi formación y la obtención de resultados. También colaboraron, en su etapa de formación, Lucía Sosa, Paula Sanguineto y Valentina Croce, haciendo extractos y análisis enzimáticos. En el empuje para la culminación de la tesis fue fundamental la colaboración con la Dra. Silvana Alborés y la M.Sc. Noheilly Vásquez.

Agradecer al PEDECIBA Química por su apoyo en la realización de mi Maestría y por la beca otorgada para realizar la pasantía en la UFSC. A la Comisión Académica de Posgrados de la UdelaR que a través de su programa de Becas de Apoyo a Docentes para realizar estudios de Posgrado me apoyó económicamente para realizar esta Maestría. Al área Bioquímica del Depbio de Facultad de Química y al Departamento de Producción Vegetal de Facultad de Agronomía que me apoyaron en todo el proceso con infraestructura y materiales.

Por último, decir que el largo y sinuoso camino de esta tesis recorrió repechos empinados, valles agradables, bajadas vertiginosas y se encontró con bifurcaciones en las que hubo que elegir para dónde seguir (y por tanto desistir de otros posibles rumbos). En todo ese camino estuve siempre acompañado por mi eterna compañera, Silvana. ¡Gracias por el sostén y por bancar! También gracias para mi hijo Mateo, siempre motivo y razón para ser mejor.

Rol de enzimas relacionadas a la patogénesis en cebolla y especies emparentadas, en respuestas de defensa a patógenos fúngicos

Lic. Pablo Galeano

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

2025

Directores de Tesis:

Dra. Laura Franco Fraguas

Área Bioquímica, DEPBIO, Facultad de Química, Udelar

Dr. Guillermo Galván

Departamento de Producción Vegetal, Centro Regional Sur (CRS)

Facultad de Agronomía, Udelar

RESUMEN

El cultivo de cebolla (*Allium cepa*) está entre los tres principales cultivos hortícolas en Uruguay. Por las características climáticas del país, las enfermedades provocadas por hongos tienen alta incidencia. Entre las principales enfermedades están las causadas por *Botrytis squamosa* (manchas foliares) y *Fusarium oxysporum* (podredumbre basal). Si bien son escasas las fuentes de resistencia en la base genética del cultivo, existen especies emparentadas a la cebolla que son promisorias fuentes de resistencia para estas dos enfermedades. Tal es el caso de *Allium fistulosum*.

Se denomina proteínas relacionadas a la patogénesis (PRs) a un grupo de proteínas que en plantas son inducidas por la presencia de patógenos. Varias peroxidasas (POX), β -1,3-glucanasas (GLU) y quitinasas (QUIT) han sido clasificadas como PRs. El rol de estas proteínas en los mecanismos de defensa parece ser limitado. Sin embargo, participan del arreglo de mecanismos que hacen a la defensa basal, así como en potenciar mecanismos de defensa en plantas en las que se ha inducido resistencia.

En esta tesis indagamos acerca del rol de estas enzimas en *A. cepa* y *A. fistulosum* en respuestas de defensa frente a *F. oxysporum* y *B. squamosa* y en respuestas provocadas por el uso de quitosano comercial como inductor de resistencia. La hipótesis general en la que basamos nuestras preguntas de investigación es que las enzimas peroxidasas, β -1,3-glucanasas y quitinasas participan en las respuestas de defensa en estos patosistemas y las variaciones en sus niveles de actividad inciden en la eficiencia de estas respuestas.

En ensayos de desafío en los que se enfrentaron plantas de *A. cepa* y *A. fistulosum* a cepas de *F. oxysporum* de virulencia contrastante, se observó que las actividades POX, GLU y QUIT aumentaron en ambas especies en respuesta al daño causado por el patógeno siendo la cepa más virulenta la que provocó los mayores aumentos. La actividad POX mostró cambios más tempranos que las de GLU y QUIT en ambas especies mostrando respuestas más acentuadas en *A. fistulosum*. En *A. cepa*, las actividades POX y GLU estarían involucradas además en respuestas eficientes en la contención del patógeno ante cepas de poca virulencia. En un trabajo previo, determinamos que ambas especies adquieren resistencia a *F. oxysporum* en las primeras etapas de desarrollo de las plántulas. En esta tesis observamos que esto podría vincularse a aumentos en las actividades POX y GLU en los primeros 7 días de desarrollo junto a la expresión de isoformas básicas de POX en las radículas. Una mayor velocidad de germinación y tasa de crecimiento y un aumento más rápido de las actividades POX y GLU, así como la presencia de isoperoxidasas específicas, podrían estar asociadas a una adquisición de resistencia más temprana por parte de *A. fistulosum*.

Frente a *B. squamosa*, en *A. cepa* las tres actividades enzimáticas analizadas participaron en una respuesta de defensa ineficiente en la contención del patógeno. En *A. fistulosum*, que no desarrolló síntomas, las POX participaron en una respuesta de defensa temprana y eficiente, pudiendo estar involucradas isoformas básicas específicas. Por su parte, la aplicación de quitosano comercial redujo la susceptibilidad de *A. cepa* a *B. squamosa*. Los resultados muestran que las quitinasas podrían estar implicadas en los mecanismos efectores de este tipo de resistencia inducida.

Role of enzymes related to pathogenesis in onion and related species in defense responses to fungal pathogens

Pablo Galeano

Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química

Universidad de la República

2025

Directors:

Dra. Laura Franco Fraguas

Área Bioquímica, DEPBIO, Facultad de Química, UdelaR

Dr. Guillermo Galván

Departamento de Producción Vegetal, Centro Regional Sur (CRS)

Facultad de Agronomía, UdelaR

Abstract

Onion cultivation (*Allium cepa*) is among the three main horticultural crops in Uruguay. Due to the country's climatic characteristics, fungal diseases have a high incidence. Among the main diseases are those caused by *Botrytis squamosa* (leaf spots) and *Fusarium oxysporum* (basal rot). Although sources of resistance in the genetic base of the crop are scarce, there are species related to onions that are promising sources of resistance to these two diseases. Such is the case of *Allium fistulosum*.

Pathogenesis-related proteins (PRs) are a group of proteins that are induced in plants by the presence of pathogens. Several peroxidases (POX), β -1,3-glucanases (GLU), and chitinases (QUIT) have been classified as PRs. The role of these proteins in defense mechanisms appears to be limited. However, they participate in the arrangement of mechanisms that make up basal defense, as well as in enhancing defense mechanisms in plants in which resistance has been induced.

In this thesis, we investigate the role of these enzymes in *A. cepa* and *A. fistulosum* in defense responses against *F. oxysporum* and *B. squamosa* and in responses triggered by the use of commercial chitosan as a resistance inducer. The general hypothesis on which we base our research questions is that peroxidase, β -1,3-glucanase, and chitinase enzymes participate in defense responses in these pathosystems and that variations in their activity levels affect the efficiency of these responses.

In challenge tests in which *A. cepa* and *A. fistulosum* plants were exposed to strains of *F. oxysporum* of varying virulence, POX, GLU, and QUIT activities were observed to increase in both species in response to damage caused by the pathogen, with the most virulent strain causing the greatest increases. POX activity showed earlier changes than GLU and QUIT in both species, with more pronounced responses in *A. fistulosum*. In *A. cepa*, POX and GLU activities were also involved in efficient responses in containing the pathogen against strains of low virulence. In a previous study, we determined that both species acquire resistance to *F. oxysporum* in the early stages of seedling development. In this thesis, we observed that this could be linked to increases in POX and GLU activities in the first 7 days of development, together with the expression of basic POX isoforms in the radicles. A higher germination rate and growth rate and a more rapid increase in POX and GLU activities, as well as the presence of specific isoperoxidases, could be associated with earlier resistance acquisition by *A. fistulosum*.

Against *B. squamosa*, in *A. cepa* the three enzymatic activities analyzed participated in an inefficient defense response in containing the pathogen. In *A. fistulosum*, which did not develop symptoms, POX participated in an early and efficient defense response, with specific basic isoforms possibly involved. Meanwhile, the application of commercial chitosan reduced the susceptibility of *A. cepa* to *B. squamosa*. The results show that chitinases could be involved in the effector mechanisms of this type of induced resistance.

Índice

Capítulo 1 - Introducción	1
1.1 Introducción.....	1
1.1.1 El cultivo de cebolla	1
1.1.2 Enfermedades fúngicas del cultivo de cebolla	2
Podredumbre basal causada por <i>Fusarium</i>	3
Tizón de la hoja causado por <i>Botrytis squamosa</i>	4
1.1.3 Resistencia genética en cebolla	7
Resistencia a la Podredumbre basal causada por <i>Fusarium</i>	8
Resistencia a Tizón de la hoja causado por <i>B. squamosa</i>	9
1.1.4 Resistencia asociada a la edad de la planta	9
1.1.5 Resistencia inducida en plantas	10
1.1.6 Proteínas Relacionadas a la Patogénesis (PRs)	13
Peroxidasas.....	14
β -1,3-glucanasas y quitinasas.....	17
1.2 Objetivos.....	25
Capítulo 2 - Materiales y Métodos	27
2.1 Germinadores de <i>A. cepa</i> y <i>A. fistulosum</i>	27
2.1.1 Material vegetal	27
2.1.2 Germinadores	27
2.1.3 Porcentaje de germinación	27
2.1.4 Tasa de crecimiento	28
2.2 Muestreo de plantas durante el ciclo de cultivo de <i>A. cepa</i>	30
2.3 Ensayos de desafío de <i>A. cepa</i> y <i>A. fistulosum</i> frente a <i>F. oxysporum</i>	31
2.3.1 Material vegetal	31
2.3.2 Cepas de <i>F. oxysporum</i> y producción de inóculo	31
2.3.3 Ensayos de desafío frente a <i>F. oxysporum</i>	32
2.3.4 Evaluación de síntomas	33
2.4 Ensayos de desafío de <i>A. cepa</i> y <i>A. fistulosum</i> frente a <i>B. squamosa</i> y evaluación de Biorend® como inductor de resistencia.	34
2.4.1 Material vegetal	34
2.4.2 Cepas de <i>B. squamosa</i> y producción de inóculo	34
2.4.3 Ensayos de desafío frente a <i>B. squamosa</i>	35

2.4.4 Evaluación de síntomas	37
2.4.5 Microscopía.....	38
2.5 Análisis de actividades enzimáticas.....	38
2.5.1 Obtención de extractos	38
2.5.2 Actividad peroxidasa (POX).....	39
2.5.3 Actividad β -1,3-glucanasa (GLU).....	40
2.5.4 Actividad quitinasa (QUIT) y actividad N-acetil- β -glucosaminidasa (NAG)	40
2.5.5 Actividad de enzimas vinculadas al estrés oxidativo	41
2.5.6 Análisis estadístico	42
Capítulo 3 – Evolución de las actividades enzimáticas basales.....	43
3.1 Porcentaje de germinación y tasa de crecimiento	44
3.1.1 Porcentaje de germinación.....	44
3.1.2 Tasa de crecimiento	45
3.2 Evolución de las actividades enzimáticas basales durante la germinación de <i>A. cepa</i> y <i>A. fistulosum</i>	47
3.2.1 Evolución de la actividad POX.....	47
3.2.2 Evolución de la actividad GLU.....	51
3.2.3 Evolución de la actividad QUIT	51
3.2.4 Diferencias entre <i>A. cepa</i> y <i>A. fistulosum</i>	52
3.3 Evolución de las actividades enzimáticas basales durante el ciclo de cultivo en <i>A. cepa</i>	53
3.3.1 Evolución de las actividades según órgano de la planta	54
3.3.2 Diferencias en la evolución de las actividades en las variedades de cebolla	56
3.3.3 Perfiles de isoperoxidasas durante el ciclo de cultivo	58
Capítulo 4 – Respuesta de <i>A. cepa</i> y <i>A. fistulosum</i> a <i>F. oxysporum</i>	63
4.1 Evaluación de síntomas	63
4.2 Evaluación de la respuesta enzimática.....	68
4.2.1 Cambios en la actividad POX.....	69
4.2.2 Cambios en las actividades GLU y QUIT.....	73
4.2.3 Diferencias en la respuesta en Pantanoso y <i>A. fistulosum</i>	75
Capítulo 5 – Respuesta de <i>A. cepa</i> y <i>A. fistulosum</i> frente a <i>B. squamosa</i> y efecto del Biorend® como inductor de resistencia	77
5.1 Evaluación de síntomas	78
5.2 Análisis por microscopía	83

5.3 Evaluación de la respuesta enzimática.....	86
5.3.1 Enzimas vinculadas al estrés oxidativo	86
5.3.2 Enzimas vinculadas a la patogénesis	89
Capítulo 6 – Conclusiones y perspectivas.....	95
6.1 Conclusiones	95
6.2 Perspectivas.....	99
Anexos	101
Anexo 3.I.....	103
Anexo 3.II.....	104
Anexo 3.III	106
Anexo 3.IV.....	112
Anexo 4.I	115
Anexo 4.II.....	118
Anexo 4.III	120
Anexo 5.I.....	127
Anexo 5.II.....	131
Anexo 5.III	138
Anexo 5.IV.....	146
Bibliografía.....	147

Lista de abreviaturas

APX - Ascorbato peroxidasa

BLB – Tizón de la hoja causado por *B. squamosa*

CAT - Catalasa

CRS – Centro Regional Sur, Facultad de Agronomía

dai - Días antes la inoculación

ddi – Días desde la inoculación

dds – Días desde la siembra

FBR – Podredumbre basal causada por *Fusarium spp.*

FOC - *Fusarium oxysporum f. sp. Cepae*

GLU – Glucanasas

GPX – Guayacol peroxidasa

ha - Hectáreas

IE – Índice de enfermedad

IEF – Isoelectroenfoque

ISR – Resistencia sistémica inducida

LFC - $\log_2$ del cociente de las actividades comparadas ($\log_2$ fold change)

MLG – Glucanos de enlaces mixtos

NAG - N-acetil- β -glucosaminidasa

PDA – Agar papa dextrosa

pI -Punto isoeléctrico

POX – Peroxidasas clase III

PRs – Proteínas relacionadas a la patogénesis

QUIT – Quitinasas

RGR – Tasa de crecimiento relativo

ROS – Especies reactivas del oxígeno

SA – Ácido salicílico

SAR – Resistencia sistémica adquirida

SOD – Superóxido dismutasa

UE – Unidad enzimática

CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

El control de las enfermedades fúngicas en cultivos hortícolas representa un desafío tanto para darles viabilidad económica en la producción realizada por los agricultores, como para obtener alimentos sanos, de alta calidad, libres de enfermedades y con baja carga de residuos de pesticidas. El control químico ha sido una herramienta valiosa, pero conlleva preocupaciones con relación a sus efectos en el ambiente y la salud de trabajadores y consumidores. Después de varias décadas, a pesar del advenimiento de nuevos principios activos, la generación de resistencia por parte de los patógenos ha resultado en la pérdida de efectividad de los fungicidas químicos que se usan en la actualidad en varios cultivos, como la cebolla [1], [2], [3]. El mejoramiento genético por resistencia es una estrategia ampliamente utilizada y se han obtenido resultados exitosos en nuestro país con el desarrollo de cultivares de cebolla con resistencia parcial a varias enfermedades fúngicas [4], [5]. Entender los mecanismos subyacentes a las respuestas de defensa de las plantas frente a sus patógenos resulta un aporte fundamental, tanto para el mejoramiento genético, como para el desarrollo de herramientas de control vinculadas al manejo del cultivo.

1.1.1 El cultivo de cebolla

La cebolla (*Allium cepa* L.) es una planta herbácea del género *Allium* perteneciente a la familia de las *Liliaceae*. Si bien es una planta bienal comúnmente se cultiva como anual con el propósito de cosechar sus bulbos. Originaria de Asia Central, su cultivo es uno de los más antiguos y actualmente está ampliamente distribuido en el mundo en zonas con climas subtropicales a templados. Su adaptabilidad a una amplia diversidad de ambientes, la posibilidad de almacenamiento de los bulbos secos y sus características culinarias y medicinales motivó que se volviera un ingrediente central en la cocina de una multiplicidad de culturas alrededor del mundo [6], [7].

En 2023 se produjeron 111 millones de toneladas de cebolla (bulbos secos) en 6 millones de hectáreas (ha) a nivel mundial. Esto la sitúa como la cuarta hortaliza en volumen y área de producción, detrás de la mandioca, la papa y el boniato [8]. También en Uruguay

la cebolla es uno de los rubros hortícolas más importantes. En la zafra 2014/15 (última encuesta de producción disponible) cultivaron cebolla más de 900 productores hortícolas (38% del total) abarcando más de 1500 ha y produciendo en conjunto unas 30 mil toneladas. La cebolla se posiciona entre los tres principales rubros hortícolas del país tanto en área como en volumen de producción [9]. Para el año 2021 la producción se estimó en 36 mil toneladas [10].

El ciclo reproductivo de la cebolla es de dos años, por lo que se la clasifica como una especie vegetal bienal. Durante el primer año, luego de la siembra al fin del verano y el desarrollo vegetativo durante el otoño y el invierno, las plantas forman bulbos a partir de las porciones basales de las hojas en respuesta al aumento de las horas de luz durante la primavera. Siguiendo esta estacionalidad, el momento de siembra óptima y bulbificación difiere según la variedad de cebolla sea de ciclo corto (precoz), intermedio o largo. Una vez formado por completo, el bulbo entra en un período de dormancia lo que permite su cosecha y almacenamiento. Durante el otoño-invierno del segundo año se da el proceso de vernalización en respuesta a la acumulación de horas de frío. Durante este período el meristemo apical vegetativo que se encuentra dentro del bulbo se transforma en meristemo reproductivo. Los bulbos, una vez brotados, producen hojas y a su tiempo (con fotoperíodo largo en la primavera) escapos florales que generan una inflorescencia (umbela) con cientos de flores y luego semillas [6].

En Uruguay existe una diversidad de poblaciones locales o variedades criollas de cebolla que han sido base para programas de mejoramiento nacionales que han dado como resultado cultivares de uso extendido entre los productores. Tal es el caso de las variedades INIA Casera desarrollada por INIA en el norte del país y Pantanoso del Sauce desarrollada en el Centro Regional Sur (CRS) de Facultad de Agronomía [5].

1.1.2 Enfermedades fúngicas del cultivo de cebolla

Por las características climáticas de nuestro país, con lluvias durante todo el ciclo del cultivo y períodos de alta humedad, las enfermedades provocadas por hongos tienen alta incidencia en la producción de cebolla. Entre las principales enfermedades fúngicas que afectan el cultivo están las causadas por *Fusarium oxysporum f. sp. cepae* (podredumbre basal y de raíces) y *Botrytis squamosa* (mancha blanca o tizón de la hoja) [11], [12].

Podredumbre basal causada por *Fusarium*

La podredumbre basal causada por *Fusarium spp.* (FBR por sus siglas en inglés) es una enfermedad muy extendida a nivel mundial que afecta a la cebolla y a otras especies del género *Allium* [13]. Son varias las especies de *Fusarium* que la provocan y si bien una única especie puede actuar como agente etiológico, en general es una asociación de especies las responsables del desarrollo de la enfermedad [14]. En la cebolla el principal agente causal de la enfermedad es *F. oxysporum f. sp. cepae* (FOC) aunque se han reportado otras especies, entre ellas *F. proliferatum* [11], [15]. FBR es endémica en las zonas de producción de Uruguay, y llega a ser grave en algunos predios con monocultivo ajo-cebolla en la Región Sur [16]. Las pérdidas ocasionadas por FBR en el cultivo de cebolla son muy variables; en Estados Unidos se han registrado pérdidas de rendimiento de entre el 3 y 35% y en bulbos cosechados pérdidas de hasta el 75% [13], [17].

Fusarium oxysporum es una especie compleja y diversa con formas patogénicas y no patogénicas. Los aislamientos no patogénicos habitan en el suelo comúnmente como saprófitos o como endófitos. Las formas patogénicas afectan a una amplia variedad de especies de plantas y se clasifican según su especificidad de hospederos en *formae speciales*, siendo FOC una de las más de 120 identificadas [18], [19], [20]. Perteneciente al grupo de los Ascomycetes, su forma de reproducción predominante, sino exclusiva, es asexual produciendo microconidios, macroconidios y clamidosporas. Las clamidosporas presentan paredes gruesas y pueden permanecer viables en el suelo por varios años actuando como inóculo primario [13].

Como muchos hongos fitopatógenos, para invadir los tejidos de la planta, *F. oxysporum* secreta una serie de enzimas que degradan la pared de las células de su hospedero, como poligalacturonasas, pectato liasas, xilanasas y proteasas, aunque el rol de cada una de ellas en el proceso de infección no está del todo claro. En general el mecanismo de infección puede dividirse en varios pasos: reconocimiento de la raíz, fijación y colonización de la superficie, penetración y colonización de la corteza de la raíz y proliferación de hifas dentro de los vasos del xilema. Se ha postulado que la proliferación del patógeno dentro del xilema se da mediante la producción de microconidios, aunque trabajos más recientes apuntan a que la producción de clamidosporas es la forma de proliferación [18].

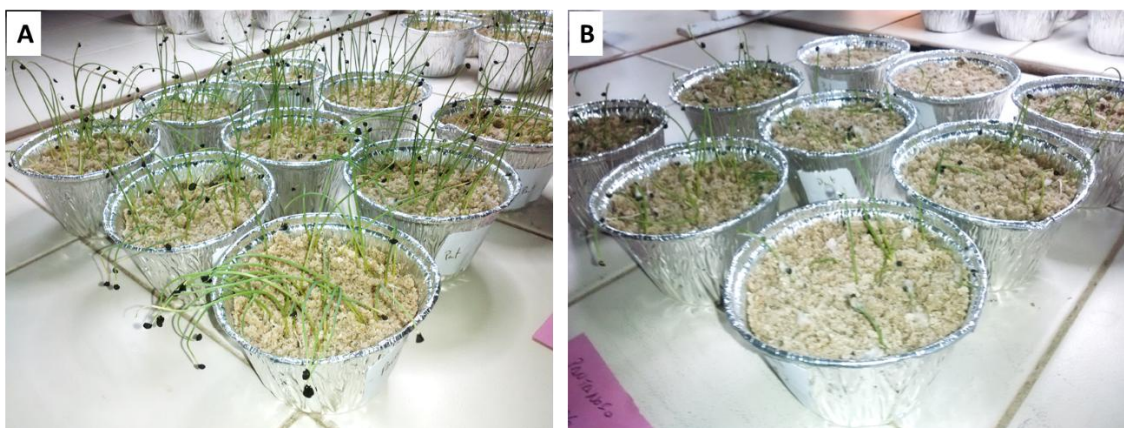


Figura 1.1. Síntomas de dumping-off en plantines de cebolla var. Pantanoso del Sauce. **A-** Tratamiento control sin patógeno. **B-** Expuestos desde la siembra a FOC (cepa NL 93186). Imagen generada durante el desarrollo de esta tesis.

FOC infecta las raíces y el disco basal (la base del tallo) de la cebolla provocando síntomas que pueden presentarse en todas las etapas de desarrollo de la planta, produciendo pérdidas tanto en pre como en poscosecha. Los estadios de plántulas y bulbo maduro son los más susceptibles, en tanto que la planta en crecimiento durante el ciclo del cultivo se ve menos afectada. En condiciones ambientales propicias, suelos húmedos y con temperaturas entre 28 y 32°C [14], el patógeno puede provocar la muerte de plántulas, su marchitamiento (damping-off) o retrasar su emergencia y crecimiento, como se muestra en la Figura 1.1. En plantas maduras los primeros síntomas visibles se manifiestan como clorosis que puede evolucionar hacia la necrosis desde los ápices de las hojas, y eventualmente de todas las hojas desencadenando la muerte de la planta. La infección en el disco basal provoca la muerte y desprendimiento de raíces, así como una decoloración marrón de los tejidos. Los mayores daños se observan durante el almacenamiento de bulbos cosechados, dado que la infección continúa progresando, causando pudriciones que inviabilizan su comercialización [13], [21].

Tizón de la hoja causado por *Botrytis squamosa*

El tizón de la hoja causado por *B. squamosa* (BLB por sus siglas en inglés) es una enfermedad foliar de la cebolla caracterizada por la aparición de manchas necróticas, muy extendida en todas las zonas productoras de cebolla a nivel mundial. Si bien *B. cinerea* puede provocar síntomas similares, son superficiales dado que el patógeno no

logra penetrar en los espacios intercelulares de las hojas por lo que no desarrolla la enfermedad. La información acerca de las pérdidas ocasionadas por la enfermedad es limitada, sin embargo, se han reportado pérdidas de rendimiento del cultivo de hasta el 30% [22]. En Uruguay el tizón de la hoja afecta el cultivo durante la fase de almácigos en la región Sur llegando a provocar la pérdida total de los mismos. En el litoral Norte, debido a la época de cultivo, la enfermedad afecta el cultivo durante todo el ciclo [12].

El género *Botrytis* consta de 38 o más especies de hongos fitopatógenos, necrótrofos pertenecientes al grupo de los Ascomycetes [23]. Dentro del género existen especies que presentan reproducción sexuada con producción de ascosporas y otras que solo se reproducen de forma asexuada mediante la producción de microconidios, macroconidios y clamidosporas [24]. Especies de este género están entre los patógenos más extendidos del planeta afectando plantas en todas las zonas climáticas con algunas especies generalistas y otras (la mayoría) muy específicas en su rango de hospederos. La más conocida y estudiada es *B. cinerea* dado que afecta a más de 1400 especies de plantas incluida la cebolla en la cual produce manchas superficiales en sus hojas, pardeamiento de bulbos y tizón en las inflorescencias [23]. Otras cuatro especies de *Botrytis* que afectan al cultivo tienen a la cebolla como único hospedero. De éstas, *B. squamosa* además de ser la causante del tizón de la hoja, también puede provocar la formación de esclerocios en el cuello de los bulbos lo que llega a causar pudriciones y pérdidas de su valor comercial. Las restantes tres especies, *B. allii*, *B. aclada* y *B. byssoidea*, son agentes causales de la enfermedad conocida como pudrición del cuello que afecta a los bulbos [22].

El ciclo del Tizón de la hoja comienza cuando un conidio de *B. squamosa* se deposita en la superficie de una hoja de cebolla, germina y forma un tubo germinativo. Para que el conidio germine, deben darse ciertas condiciones ambientales; temperaturas de entre 18 y 20 °C y períodos de humedad en la hoja de 48 hs son las condiciones óptimas. En el extremo del tubo germinativo se forma un apresorio capaz de penetrar la cutícula de la hoja. Comúnmente, el apresorio se forma en la parte superior de las paredes anticlinales de las células epidérmicas con lo que el hongo penetra en el tejido de la hoja creciendo a través de la lámina media que separa las paredes anticlinales (Figura 1.2).

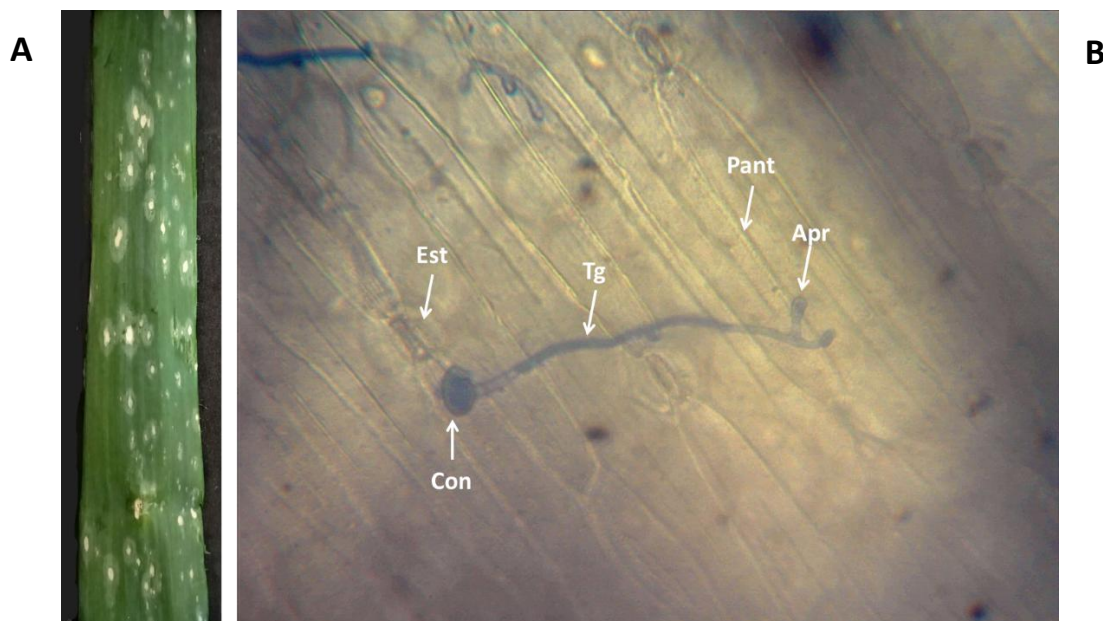


Figura 1.2. **A-** Sección de una hoja de cebolla con síntomas de Tizón luego de 8 días de inoculada con *Botrytis squamosa*, caracterizados por manchas blancas algo hundidas, elongadas, con bordes a veces definidos, a veces difusos con un halo clorótico. **B-** Epidermis de la hoja de cebolla en la que se observa un conidio de *B. squamosa* germinado, 48 horas después de la inoculación. Se observa la formación de apresorios sobre pared anticlinal de una célula de la epidermis. (Con: conidio; Tg: tubo germinativo; Apr: apresorio; Pant: pared anticlinal; Est: estoma). Microscopía óptica, 400X. Tinción con azul de anilina 0.1% en lactofenol. Imágenes generadas durante el desarrollo de esta tesis.

Alternativamente, los tubos germinativos entran directamente al tejido de la hoja a través de los estomas. Al entrar en la hoja, las hifas crecen principalmente de forma intercelular. El colapso de las células epidérmicas y mesófilas da lugar a los primeros síntomas característicos, que pueden observarse como pequeñas manchas necróticas. La posterior propagación de las hifas da lugar a la expansión de la lesión que suele estar rodeada de un halo clorótico (Figura 1.2). Con el avance de la infección las hojas empiezan a marchitarse, lo que provoca su senescencia temprana y en consecuencia un enlentecimiento en el crecimiento de la planta. En el tejido vegetal necrótico, el hongo produce conidióforos y nuevos conidios que son dispersados por el viento a otras hojas e inician un nuevo ciclo de infección, proporcionando una fuente de inóculo secundario. En la primavera, cuando las condiciones ambientales no son las favorables para la formación de conidios (temperaturas entre 14 y 20 °C y alta HR durante varias horas al día), *B. squamosa* produce esclerocios en los tejidos infestados de las plantas, los cuales

pueden permanecer en el material vegetal en descomposición durante varios meses y funcionar como estructuras de hibernación. Cuando comienza la nueva temporada de crecimiento, los esclerocios pueden formar apotecios que luego producirán ascosporas o producir nuevos conidios que actuarán como fuente primaria de inóculo. Otras fuentes de inóculo primario incluyen conidios que crecen en hojas colonizadas de bulbos germinados que quedaron como rastrojo, plantas de cebolla en campos de producción de semillas y plantas de cebolla voluntarias que crecieron a partir de bulbos desechados [22], [25].

1.1.3 Resistencia genética en cebolla

Las plantas se defienden de la invasión de patógenos mediante componentes estructurales y bioquímicos preexistentes o inducidos por la presencia del patógeno. La combinación de tales componentes difiere según la interacción patógeno-hospedero particular, la edad de la planta, el tejido atacado, el estado nutricional de la planta y las condiciones ambientales en que se da la interacción [26], [27]. El mejoramiento genético por resistencia es la estrategia más rentable y sostenible para el control de las enfermedades de los cultivos [15]. El mejoramiento genético busca generar variedades de plantas que porten aquellos componentes basales o inducidos que les permitan responder de forma eficiente ante la presencia de patógenos.

En cebolla, las técnicas de mejoramiento están menos desarrolladas que en otros cultivos. Las principales restricciones biológicas que presenta la especie para el mejoramiento genético son su ciclo reproductivo bienal, sus requerimientos fototérmicos que limitan los cruzamientos entre variedades, y su carácter alógamo que mantiene una alta diversidad genética [4]. A pesar de su capacidad para auto fecundarse, la cebolla se considera un cultivo alógamo con alto nivel de depresión endogámica. Esto deriva en que mayoritariamente los cultivares de cebolla sean heterocigotos con cada planta conteniendo una combinación única de información genética [21]. A todo esto, se suma que, a pesar de ser una especie diploide con 8 pares de cromosomas ($2n = 2x = 8$), posee uno de los genomas eucariotas más grandes (16 Gb) lo que ha retrasado la secuenciación completa del genoma y el mapeo de genes de interés agronómico.

A pesar de estas restricciones, mediante distintas estrategias de genotipado molecular, se han mapeado algunos genes, entre ellos unos pocos genes de resistencia [4], [21]. En 2021, Finkers et al. [28] publicaron el primer borrador del genoma disponible para la cebolla con 14,9 Gb ensamblados. Esto genera expectativas en cuanto a la posibilidad de aplicar más y mejores herramientas de genética molecular y de selección asistida por marcadores en el mejoramiento genético de la cebolla. La reciente creación de un banco de datos de genómica funcional específica del género *Allium* va en esa dirección [29].

En cuanto al mejoramiento por resistencia a enfermedades en cebolla, si bien son escasas las fuentes de resistencia a patógenos fúngicos en la base genética del cultivo, la existencia de germoplasma local muy diverso y con adaptación productiva es una de las razones que han justificado el mejoramiento genético en Uruguay [5], [30]. Además, existen especies emparentadas, en particular *A. roylei* y *A. fistulosum*, que son promisorias fuentes de resistencia y que es posible utilizarlas en programas de mejoramiento [4], [11], [31]. De hecho, existen ejemplos exitosos al respecto [32] pero los obstáculos a superar son varios. El cruzamiento entre especies de *Allium* con diferencias en el tamaño del genoma (como es el caso de *A. cepa* con relación a *A. roylei* y *A. fistulosum*), puede dar lugar a una baja fertilidad en las plantas de la progenie y se requieren programas de mejoramiento de varios años para la obtención de resultados [22].

Resistencia a la Podredumbre basal causada por *Fusarium*

Para la podredumbre basal causada por FOC, no se dispone de fuentes de alta resistencia dentro de la base genética del cultivo de cebolla, pero existe variabilidad que se ha utilizado en la selección recurrente por numerosos programas de mejoramiento [13]. Además, se ha reportado resistencia en *A. roylei*, *A. fistulosum* y *A. schoenoprasum* [4], [11], [33], [34]. Si bien los mecanismos de herencia de la resistencia parcial a FBR en cebolla aún no se conocen por completo, se reconoce como un modo de herencia cuantitativo controlado por múltiples genes con efectos aditivos [15], [17]. En ese contexto, algunos locus de carácter cuantitativo (QTLs), genes y marcadores moleculares para genotipado vinculados a la resistencia a FBR han sido mapeados tanto en *A. cepa* como en *A. fistulosum* y *A. roylei* [15], [17], [21], [35].

En lo que refiere a la respuesta de defensa a FOC en cebolla, se han identificado varios genes cuyos patrones de expresión cambian como parte de esta respuesta. En ensayos en que se enfrentaron plantines y bulbos de una variedad de cebolla a cepas de FOC y *F. proliferatum* que difieren en su virulencia, Le y colaboradores [36] encontraron que la expresión de las enzimas fenilalanina amonio-liasa (*PAL1*, *PAL2*), lipoxigenasa (*LOX2*), chalcona sintasa (*CHS*), antocianidina sintasa (*ANS*) y pectina metilesterasas (*PME*) correlacionaba positivamente con la agresividad del patógeno, pero que este aumento en la expresión no contuvo el avance de la infección [36].

Resistencia a Tizón de la hoja causado por *B. squamosa*

Contra esta enfermedad tampoco se dispone de fuentes de alta resistencia en cebolla. Varios trabajos identificaron escasa variabilidad dentro de *A. cepa*, pero sí encontraron fuentes de resistencia a este patógeno en las especies emparentadas *A. fistulosum* y *A. roylei* [37], [38]. En Uruguay se ha observado variabilidad en la respuesta a *B. squamosa*, existiendo variedades locales de cebolla que mostraron menor desarrollo de la enfermedad que cultivares introducidos, entre las que destacaron INIA Casera y Pantanoso del Sauce [12]. También en el sur de Brasil se observó variabilidad en la respuesta en 40 cultivares comerciales y en desarrollo [3].

Aunque no se conoce la base genética de la resistencia parcial a *B. squamosa* en cebolla, se conocen algunos aspectos en especies emparentadas. La resistencia en *A. roylei* está controlada por un único gen parcialmente dominante (*Bs1*) que confiere resistencia a las progenies de *A. cepa* × *A. roylei* [38], [39]. Además, utilizando una población tri-híbrida [*A. cepa* × F1(*A. roylei* × *A. fistulosum*)], se identificó un QTL que por su gran tamaño da indicios de que genes menores de *A. roylei* o *A. fistulosum* contribuirían a los niveles de resistencia a *B. squamosa* mostrados por esta población [22], [40].

1.1.4 Resistencia asociada a la edad de la planta

Para varias interacciones planta-patógeno, se conoce que la resistencia de la planta cambia según su estado de desarrollo, lo que se denomina *resistencia asociada a la edad* y se manifiesta en distintos momentos según el patosistema en estudio. Comúnmente se asocia este tipo de resistencia a la adquirida a medida que aumenta la edad de la planta (resistencia de planta adulta) pero también existen ejemplos en que los tejidos

de más edad se vuelven susceptibles a los patógenos como es el caso ya mencionado de los bulbos de cebolla frente a FOC. Los mecanismos que subyacen a estos cambios son de distinta naturaleza dependiendo del patógeno, la planta y su estado de desarrollo [41], [42]. Varios trabajos han vinculado estos cambios de resistencia con la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), entre ellas algunas peroxidasas, β -1,3-glucanasas y quitinasas [43], [44], [45].

Como se describe en la sección 1.1.2, especies del género *Fusarium* afectan el cultivo de cebolla causando FBR en las primeras etapas de desarrollo de los plantines. Durante el crecimiento vegetativo posterior la cebolla se ve menos afectada por el patógeno, aumentando su susceptibilidad recién al comienzo de la bulbificación por lo que la enfermedad reaparece al final del cultivo y persiste en la poscosecha causando pudriciones en los bulbos [13], [46], [47]. A pesar de que son bien conocidos los cambios de resistencia a *Fusarium* vinculados a las etapas de desarrollo en la cebolla, es poca la información experimental que hay al respecto y se desconoce cuáles son los mecanismos que los explican.

1.1.5 Resistencia inducida en plantas

La expresión *resistencia inducida* refiere genéricamente a un aumento en la resistencia de la planta provocado por inductores biológicos o químicos, que la protege de futuros ataques de patógenos. Ésta se puede generar por la infección de la planta con un patógeno, en respuesta al daño causado por insectos, tras la colonización de las raíces por ciertos microorganismos benéficos o tras el tratamiento con productos químicos específicos. Se caracteriza por la activación de mecanismos de defensa latentes que se expresan en menor tiempo y con mayor intensidad ante un ataque posterior de un patógeno o insecto herbívoro (fenómeno denominado 'priming'). La resistencia inducida se expresa tanto localmente en el lugar de la inducción, como sistémicamente en partes de la planta no expuestas al inductor y generalmente confiere protección contra un amplio rango de patógenos [48].

Para comprender los mecanismos subyacentes a este tipo de resistencia, en el contexto del alcance de esta tesis, se mencionarán brevemente algunos conceptos básicos que describen el sistema inmune de las plantas. Las plantas poseen en sus células receptores transmembrana de reconocimiento de patrones (PRR) capaces de reconocer

compuestos comunes a la mayoría de los microorganismos, denominados patrones moleculares asociados a microorganismos o a patógenos (MAMPs o PAMPs), como la flagelina y el factor de elongación Tu bacterianos, o la quitina y esfingolípidos fúngicos. También reconocen señales endógenas derivadas del daño provocado por los patógenos a través de patrones moleculares asociados a daños (DAMPs), como el ATP extracelular o componentes de la pared de las células vegetales. El reconocimiento de estos patrones por parte de los PRRs activa mecanismos de defensa, como la producción explosiva de especies reactivas del oxígeno (ROS) entre otros, en una respuesta denominada inmunidad activada por PAMPs (PTI) que logra ser efectiva ante la mayoría de los potenciales patógenos. Para colonizar a sus hospederos los patógenos deben evadir esta primera línea de defensa segregando moléculas efectoras que suprimen la respuesta PTI o evaden su detección por parte de los PRRs. A su vez las plantas, en su coevolución con los patógenos, presentan receptores citoplasmáticos, denominados proteínas R (de resistencia) capaces de reconocer estas moléculas efectoras y desatar un segundo nivel de respuestas de defensa denominado inmunidad activada por efector (ETI). La respuesta ETI, que comúnmente deriva en la una reacción de hipersensibilidad (muerte de células en torno al lugar de infección), es efectiva contra biótrosos en plantas resistentes a ciertas razas de patógenos en lo que se denomina resistencia gen a gen. Tanto PTI como ETI pueden desatar respuestas sistémicas en la planta más allá del sitio de reconocimiento del patógeno que aumentan su resistencia en partes aún no dañadas a un amplio espectro de patógenos [48], [49], [50].

A estas respuestas sistémicas se las ha caracterizado según sean inducidas por organismos patogénicos o no patogénicos, como resistencia sistémica adquirida (SAR) [51] en el primer caso o como resistencia sistémica inducida (ISR) [52], [53], [54] en el segundo. Se las ha diferenciado por estar mediadas por distintas vías de señalización, y porque SAR es predominantemente eficiente contra patógenos biótrosos mientras que ISR lo es contra necrótrofos [48], [55]. Sin embargo, la dicotomía SAR/ISR es cuestionable dado que componentes de sus vías de señalización son compartidos y en algunos casos confieren a las plantas inmunidad a patógenos biótrosos y necrótrofos [48], [56]. Se ha reportado además que microorganismos benéficos también inducen la

expresión de PRs como parte de ISR siendo que originalmente se postuló que este efecto era solo mediado por SAR [55].

La resistencia inducida se caracteriza, como se comentó más arriba, por el fenómeno denominado 'priming' donde el contacto inicial con el agente inductor no provoca un aumento sustancial de los mecanismos de defensa, pero la planta queda en condiciones de dar una respuesta amplificada y más rápida ante ataques subsecuentes de un amplio rango de patógenos e incluso puede transferir este estado a su descendencia [57].

Distintos compuestos pueden actuar como inductores de resistencia y su uso constituye un avance en las estrategias ambientalmente sostenibles para el control de las enfermedades que afectan a los cultivos ya que no implica el uso de sustancias biocidas. La eficacia mostrada por estos compuestos en condiciones controladas rara vez se ha confirmado en condiciones de campo, lo que ha retrasado su comercialización y uso por los agricultores [58]. Sin embargo, existe cada vez mayor interés y presión pública por encontrar alternativas al uso de plaguicidas. Un ejemplo de esto es la posición que ha tomado el Parlamento Europeo identificando a la Inducción de Resistencia como una estrategia a desarrollar para la protección de cultivos, lo que ha renovado el interés en el desarrollo de inductores [59].

Se han formulado inductores de resistencia tanto sintéticos como de origen biológico. Entre los sintéticos los más utilizados han sido análogos del ácido salicílico (SA) como el acibenzolar-S-metil (ASM, comercializado como Bion o Actigard). Sin embargo, estos compuestos presentan restricciones en cuanto a su ecotoxicidad, como es el caso del ASM en los ecosistemas acuáticos, por lo que el uso de inductores de origen biológico es más ventajoso desde el punto de vista ambiental. Varios compuestos microbianos que actúan como MAMPs o PAMPs se han formulado para utilizarse comercialmente como inductores al igual que componentes de las plantas que actúan como DAMPs [60]. En particular el quitosano, un derivado desacetilado de la quitina, es uno de los más utilizados. Este polímero tiene el beneficio dual de presentar actividad antimicrobiana y actuar como inductor de resistencia. La quitina se puede obtener de varias fuentes naturales (algas, moluscos, crustáceos, insectos, hongos) y existen distintos métodos para N-desacetilarla. Por esto el quitosano puede variar en su grado de desacetilación, peso molecular y pKa lo que influye en sus propiedades como inductor de resistencia.

Se han reportado varios trabajos que vinculan la inducción de resistencia provocada por quitosano con un aumento en las actividades de POX, QUIT y GLU [61].

1.1.6 Proteínas Relacionadas a la Patogénesis (PRs)

Se denominan así a un grupo de proteínas inducidas por la presencia de patógenos. El término PR se define para aquellas proteínas que en plantas sanas no se detectan o están a concentraciones basales y que específicamente se inducen bajo condiciones patológicas o situaciones relacionadas, acumulándose en forma local y en algunos casos en forma sistémica. Son proteínas de bajo peso molecular y en algunos casos péptidos, que oscilan entre 6 y 43 kDa. Son termoestables, solubles a bajo pH (menor a 3) y resistentes a las proteasas. Las isoformas ácidas de las PR son las que comúnmente se inducen como parte de una respuesta del sistema inmune de la planta, siendo secretadas al apoplasto donde se las encuentra mayoritariamente. Las variantes básicas de las PRs son típicamente intracelulares acumulándose principalmente en las vacuolas, se vinculan a menudo a procesos de desarrollo de la planta y tienen una inducción limitada ante la invasión de los tejidos por patógenos. Las PRs se clasifican en 19 familias según similitudes en sus propiedades bioquímicas y biológicas, aunque las familias 18 y 19 no están bien caracterizadas y no se conoce su modo de acción (Tabla 1.1). Varias quitinasas (QUIT), glucanasas (GLU) y peroxidasas (POX) han sido clasificadas como PRs ya que se inducen en las primeras etapas de la interacción planta-patógeno [62], [63], [64], [65].

Algunas PRs pueden inhibir el crecimiento de patógenos y/o la germinación de esporas, o actuar como agentes antimicrobianos, pero su rol en los mecanismos de defensa parece ser limitado y en muchos casos no está claro [64], [66]. Su relevancia en la defensa de las plantas a los patógenos ha quedado reafirmada con hallazgos recientes que muestran que los propios patógenos sintetizan proteínas análogas a las PRs (denominadas PR-like), que juegan un rol importante en potenciar la virulencia de los patógenos y suprimir las defensas de sus hospederos. La función precisa, el modo de acción y la contribución de las proteínas PR-like a la virulencia del patógeno no están del todo claras. Sin embargo, se ha postulado que estas proteínas pueden formar complejos con las proteínas PR del huésped, interfiriendo así en sus funciones relacionadas con la defensa [65].

Tabla 1.1. Familias de PRs y sus principales características

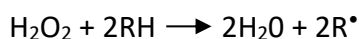
Familia*	Actividad	Funciones/Propiedades
PR-1	Señalización respuesta inmune Unión a lípidos	- Actividad antimicrobiana - Proteínas abundantes en apoplasto frente a ataque de patógenos
PR-2	β -1,3-glucanasas	- Actividad antimicrobiana - Degradación de la pared celular
PR-3; PR-4; PR-8; PR-11	Quitinasas	- Actividad antimicrobiana - Degradación de la pared celular - Sinergia con PR-2
PR-5	Similares a taumatina/osmotina /zeamatina	- Actividad antifúngica - Unión a glucanos - Ruptura osmótica membrana plasmática
PR-6 (péptido antimicrobiano)	Inhibidores de proteasas	- Nematicidas - Insecticidas - Actividad antimicrobiana - Sinergia con PR-13
PR-7	Endoproteasas similares a subtilisina (serin peptidasas)	- Actividad antifúngica - Modulación respuesta inmune (vía fitocitoquinas)
PR-9	Peroxidasas Clase III	- Síntesis de lignina - Reforzamiento pared celular planta - Degradación de compuestos fenólicos
PR-10	Similares a ribonucleasas Unión a lípidos	- Actividad antimicrobiana y antivírica - Nematicidas - Citoplasmáticas
PR-12 (péptido antimicrobiano)	Defensinas	- Actividad antimicrobiana - Eflujo de iones membrana microbiana
PR-13 (péptido antimicrobiano)	Tionina	- Actividad antimicrobiana - Permeabilidad membrana microbiana - Sinergia con PR-14
PR-14 (péptido antimicrobiano)	Proteínas de transferencia de lípidos no específicos Inhibidoras de proteasas	- Actividad antimicrobiana
PR-15; PR-16	Oxalato oxidasas; similares a oxalato oxidasas	- Actividad antimicrobiana - Generación de ROS
PR-17	Aminopeptidasas putativas	- Actividad antimicrobiana y antivírica

* Las familias PR-18 y PR-19 no se incluyen dado que la información existente sobre sus propiedades es escasa y preliminar. Elaborada a partir de Han & Schneider 2024 y dos Santos & Franco 2023 [64], [65]

Peroxidasas

Las peroxidasas (EC 1.11.1.x) son enzimas oxidorreductasas que utilizan el peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones [67]. Debido a la diversidad de donadores de electrones que utilizan, estas enzimas tienen asignados actualmente 27 números por la Enzyme Commission (EC), siendo las clasificadas con el número 1.11.1.7 las que catalizan

la oxidación de un rango mayor de sustratos, fundamentalmente compuestos fenólicos [68]. En su ciclo peroxidativo, las reacciones catalizadas por estas enzimas pueden representarse según la siguiente ecuación donde RH representa el sustrato dador de electrones y R• el radical producido por la reacción:



Los radicales producidos en esta reacción participan, según su naturaleza, en distintos procesos fisiológicos como el metabolismo de ROS, la síntesis de polímeros como la lignina y la suberina, el entrecruzamiento de componentes de la pared celular y el catabolismo de las auxinas.

En base a sus relaciones filogenéticas, según la base de datos RedOxiBase [69], las peroxidasas se clasifican en 13 grupos principales. El grupo más numeroso (con 9.051 anotaciones a la fecha, un 55% del total) corresponde a la superfamilia de las Peroxidasas Clase III (en adelante POX), un grupo de hemo peroxidasas presentes sólo en plantas [70]. Todas las peroxidasas de este grupo clasifican como EC 1.11.1.7 y comparten el mismo mecanismo catalítico para descomponer el peróxido de hidrógeno [71], [72]. En las plantas están presentes al menos otros tres tipos de peroxidasas; glutatión peroxidasa (EC 1.11.1.9), catalasa (EC 1.11.1.6) y ascorbato peroxidasa (EC 1.11.1.11); pero sólo han sido clasificadas como PRs algunas Peroxidasas Clase III (PR-9) [66], [72].

Las POX están codificadas por grandes familias multigénicas. Por citar algunos ejemplos, se han identificado 138 genes en arroz [73], 118 en maíz [74] y 73 en *Arabidopsis thaliana* [75]. En el género *Allium*, actualmente hay anotadas en RedOxiBase 28 secuencias para *A. cepa* de las cuales sólo 3 son secuencias completas [70]. Las POX son típicamente proteínas monoméricas de 30 a 45 kDa altamente glicosiladas. Si bien entre distintas especies la homología de secuencias es baja, su plegamiento está muy conservado. Además de un grupo prostético hemo, estas enzimas tienen unidos dos iones Ca^{+2} altamente conservados que juegan un rol importante en el mantenimiento de la configuración del sitio activo [72], [76] (Figura 1.3). Aunque pueden oxidar un amplio rango de sustratos, tienen una moderada especificidad por los fenoles. A nivel celular, se encuentran en vacuolas (isoformas básicas) o en el apoplasto (isoformas ácidas) asociadas a la pared celular [76].

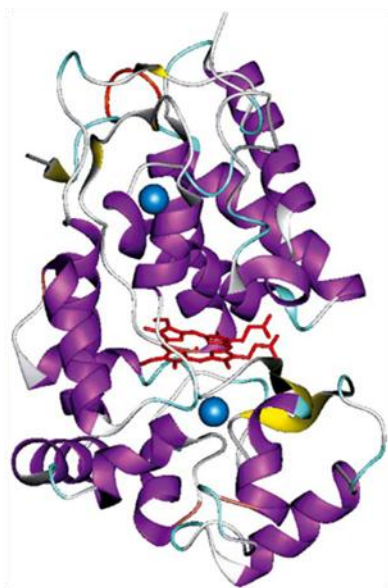


Figura 1.3. Representación tridimensional de la estructura de la isoforma C de la peroxidasa de rábano picante (*Armoracia rusticana*, HRP del inglés horseradish peroxidase), una peroxidasa de clase III, determinada por cristalografía de rayos X. El grupo hemo (en rojo) se localiza entre los dominios proximal y distal, cada uno de los cuales contiene un átomo de calcio (esferas azules). Los motivos estructurales, α -hélice y hoja β , se muestran en violeta y amarillo respectivamente. (Tomado de Veitch 2004 [77])

Las POXs están involucradas en un amplio rango de procesos fisiológicos a lo largo del ciclo de vida de la planta lo que se manifiesta en la gran diversidad de isoformas y en su versatilidad catalítica. Estos procesos incluyen el metabolismo de ROS, el desarrollo y mantenimiento de las paredes celulares, el metabolismo de las auxinas, el crecimiento de los frutos, elongación de raíces y la germinación de semillas y la protección frente a estreses bióticos y abióticos [72], [76]. En lo que respecta a los mecanismos de defensa frente a patógenos, están involucradas en la producción de lignina y suberina, en el reforzamiento y engrosamiento de la pared celular, en la síntesis de fitoalexinas, en la producción y detoxificación de ROS, en la reparación de membranas, y algunas presentan actividad antifúngica [78], [79], [80]. Su polifuncionalidad y diversidad hace difícil asignarles un rol particular en la defensa. La función de cada POX puede diferir de las demás tanto por el estímulo al que responde, el órgano en que se expresa, como por la afinidad a distintos sustratos [81]. Según el patosistema analizado se vinculan a la resistencia de distinta forma, pueden estar implicadas en respuestas fisiológicas a nivel celular, inducirse durante la patogénesis (por lo cual algunas se clasifican como PR-9), inducirse por microorganismos no patogénicos o por daño, o expresarse distintas POXs en variedades resistentes y susceptibles de determinada especie de planta [82], [83], [84]. La inducción de ciertas peroxidasas ha sido vinculada a la resistencia en algunos patosistemas, mientras que en otros se la ha vinculado con la respuesta al daño provocado por el patógeno durante el desarrollo de la infección [85]. La sobreexpresión

de peroxidasas vinculadas a la resistencia en plantas transgénicas ha dado resultados dispares, aumentando la resistencia en algunos patosistemas pero no en otros [86], [87].

Como se comenta en la sección 1.1.5, dentro de la batería de respuestas de la primera línea de defensa de las plantas contra los patógenos se encuentra la rápida producción de ROS como el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno, el oxígeno singlete y el radical hidroxilo. Las ROS pueden causar daños en el ADN, ARN, proteínas y lípidos no sólo del patógeno sino también de la propia planta si se acumulan en exceso por lo que su concentración debe ser regulada. Para esto la planta cuenta con un sofisticado sistema antioxidante con componentes no enzimáticos (ascorbato, glutatión, carotenoides, entre otros) y enzimas capaces de neutralizar las ROS. Además de las POX que descomponen el H_2O_2 , otras peroxidasas como las catalasas (CAT) y las ascorbato peroxidasas (APX), y otras oxidorreductasas como la superóxido dismutasa (SOD) intervienen en la modulación de las concentraciones de ROS en los distintos compartimentos celulares en los que se generan. Durante el estrés provocado por la presencia del patógeno la actividad de estas enzimas se modifica para lograr un equilibrio entre promover el rol en la defensa de las ROS y evitar que causen daños no deseados en el tejido vegetal [88].

β -1,3-glucanasas y quitinasas

La pared de las células de plantas y hongos está compuesta por una red tridimensional de polisacáridos que protegen a la célula y le dan sus características morfológicas. En las plantas, los β -glucanos, como la celulosa, la calosa, el xiloglucano y el glucano de enlaces mixtos (MLG), son los componentes estructurales predominantes. Estos polisacáridos comparten una columna vertebral compuesta por bloques de D-glucosa unidos por enlaces β -1,4 y/o β -1,3, que pueden contener sustituciones adicionales en la cadena lateral. En general, la estructura de la pared celular vegetal comprende un entramado de microfibrillas de celulosa recubiertas de diversos polisacáridos no celulósicos. Se ha propuesto que el xiloglucano entrecruza las microfibrillas celulósicas, mientras que las pectinas como el homogalacturonano y el ramnogalacturonano forman un pegamento estructuralmente diverso que proporciona flexibilidad o rigidez dependiendo de las modificaciones químicas. Otras clases de polímeros basados en compuestos fenólicos como la lignina también se asocian a esta estructura. La abundancia, longitud y

asociaciones de estos polímeros se modifican durante el desarrollo de la planta y en respuesta a señales ambientales. En los hongos, la capa más interna de la pared celular contiene cadenas de β -1,3 glucano con ramificaciones β -1,6 y quitina (polímero de N-acetil glucosamina unidas por enlaces β -1,4) que forman puentes de hidrógeno intracadena y pueden ensamblarse en microfibrillas que forman un andamiaje alrededor de la célula. Este exoesqueleto está unido a proteínas y/u otros polisacáridos, que lo recubren, cuya composición puede variar según la especie fúngica. Las paredes celulares de plantas y hongos son estructuras dinámicas que se remodelan durante el desarrollo del organismo y en respuesta a estímulos ambientales, así como en la interacción huésped-patógeno. Esta remodelación implica la fragmentación y re-vinculación de los componentes de la pared por la acción de un conjunto de enzimas entre las que destacan las glicosilasas (GH), entre ellas las β -1,3 glucanasas y las quitinasas [89], [90], [91], [92].

Las plantas cuentan con β -glucanasas que hidrolizan distintos enlaces en los β -glucanos. Las endo- β -glucanasas escinden aleatoriamente los enlaces β -D-glucosídicos internos en el esqueleto del glucano, mientras que las exo- β -glucanasas actúan sobre los extremos de la cadena. Por último, las β -glucosidasas hidrolizan los residuos β -D-glucosilo terminales liberando β -D-glucosa. En función del enlace β -D-glucosídico que hidrolizan, hay tres tipos principales de β -glucanasas (Figura 1.4): i) β -1,4-glucanasas que hidrolizan enlaces β -1,4 glicosídicos (implicadas en la remodelación, hidrólisis y síntesis de la celulosa y el xiloglucano y que, por sus similitudes en la secuencia aminoacídica, clasifican en la familia GH9 de las glucosil hidrolasas), ii) β -1,3-glucanasas que hidrolizan enlaces β -1,3 glicosídicos y iii) β -1,3-1,4-glucanasas que tienen como sustrato a los MLGs e hidrolizan exclusivamente enlaces β -1,4 glicosídicos que tienen adyacentes un enlace β -1,3 hacia el extremo no reductor del polisacárido. Junto a las β -1,3 glucanasas, pertenecen a la familia GH17 de las glicosil hidrolasas [91].

Las β -1,3-glucanasas (glucano endo- β -1,3-glucosidasas, EC 3.2.1.39) catalizan la hidrólisis de glucanos que contienen residuos de glucosa contiguos ligados por enlaces β -1,3 como es el caso de la calosa. Este polímero se encuentra en sitios específicos de la pared celular de las plantas y es un componente estructural de los plasmodesmos, canales que comunican a las células vegetales entre sí. Estas enzimas también pueden

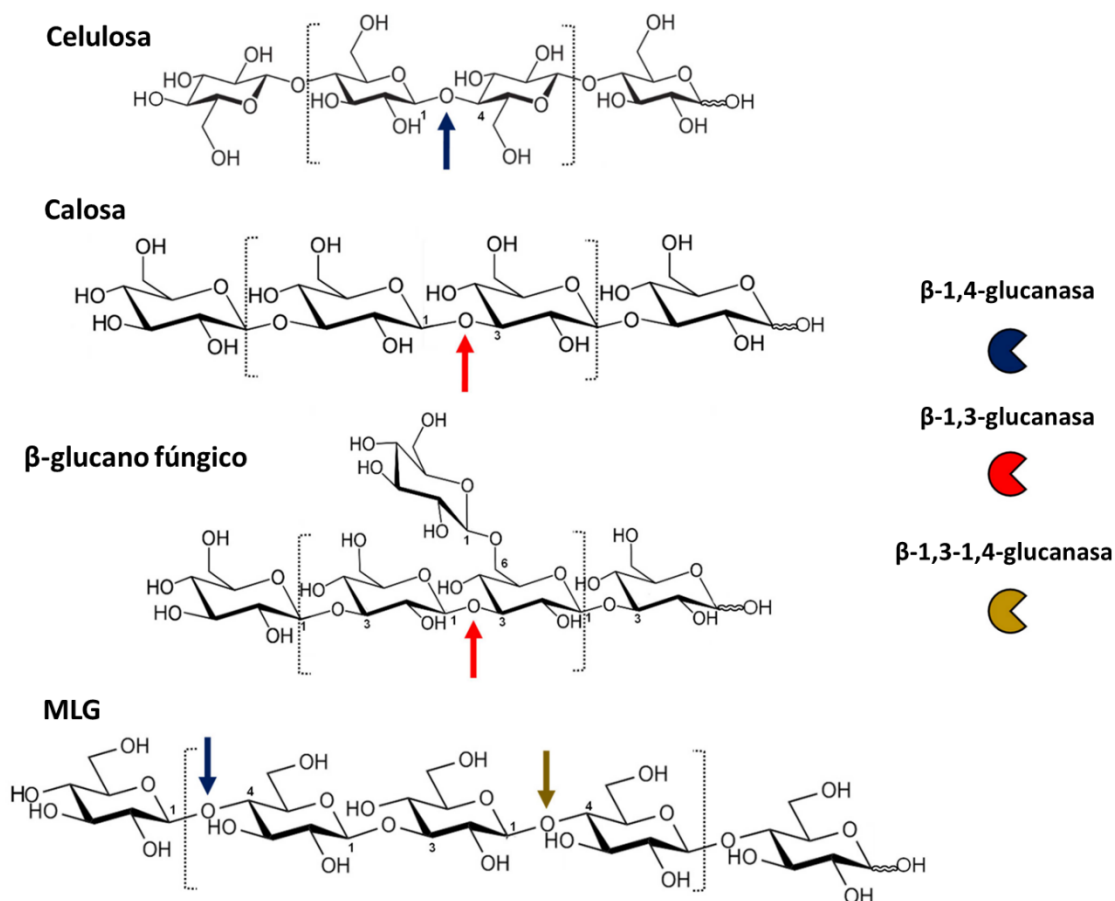


Figura 1.4. Actividad y sustratos principales de los tres tipos de β -glucanasas presentes en plantas. Las flechas indican el tipo de enlace que hidrolizan en cada caso. Adaptado de Perrot et al. 2022 [91].

hidrolizar los β -1,3- y β -1,3-1,6-glucanos de las paredes de hongos que han invadido los tejidos de la planta, por lo que juegan un rol importante en la defensa frente a estos patógenos [91]. Las β -1,3-glucanasas son codificadas por familias multigénicas y su gran diversidad ha sido un desafío a la hora de clasificarlas. En distintas especies de plantas se las ha clasificado según su secuencia de aminoácidos, peso molecular y su punto isoeléctrico. Sin embargo, miembros de un mismo grupo con similitudes estructurales, presentan patrones de expresión distintos, según el tejido y estado de desarrollo de la planta y ante estreses bióticos o abióticos [93].

En cuanto a sus funciones biológicas vinculadas a la degradación de la calosa, las β -1,3-glucanasas participan en varios procesos de desarrollo de la planta y en la respuesta a estímulos ambientales. En *Arabidopsis* se ha observado, que los genes que las codifican están sobreexpresados en el centro quiescente del meristemo, evidenciando su rol en

el desarrollo de los tejidos de la planta [92]. Además, al intervenir en la formación de plasmodesmos, participan en la modulación del tráfico de señales entre las células, por lo que están implicadas en procesos como la maduración del polen, la formación de raíces laterales y yemas axilares, la diferenciación de los estomas, el desarrollo de frutos y en las respuestas a estímulos ambientales como las bajas temperaturas, los cambios en las horas de luz y el ataque de patógenos [91].

En cuanto a su rol en las respuestas de defensa, varias endo β -1,3-glucanasas conforman la familia PR-2 de proteínas relacionadas a la patogénesis dado que se inducen ante la presencia de patógenos. Algunas de ellas participan directamente en la hidrólisis de los β -1,3- y β -1,3-1,6-glucanos presentes en las paredes celulares de los patógenos, en particular los hongos. Esta actividad antifúngica por lo general no es especie específica, sino que afecta a un amplio rango de patógenos y tiene efectos deletéreos en la germinación de esporas y el crecimiento de las hifas. Además del efecto antimicrobiano, la acción de estas enzimas sobre componentes de la pared celular de los hongos, libera oligosacáridos que actúan como MAMPs, elicitando respuestas de defensa tanto locales como sistémicas (ver sección 1.1.5) [91]. Las β -1,3-glucanasas también están implicadas en la acumulación de calosa que engrosa la pared celular de la planta entorno al sitio de contacto con el patógeno, o que rodea a los haustorios formados por algunos hongos patógenos. De todas formas, es poca la información que se tiene acerca de la caracterización bioquímica de las β -1,3-glucanasas implicadas en estos mecanismos [91]

Las quitinasas (poli (1,4-(N-acetil-glucosamin-) glicanohidrolasas, EC 3.2.1.14), catalizan la hidrólisis de enlaces β -1,4 entre las unidades de N-acetil-glucosamina (GlcNAc) de la quitina. La hidrólisis de la quitina es producto de la acción de tres actividades enzimáticas distintas llevadas adelante por endo-quitinasas y dos actividades exo-quitinasas (quitobiosidasas y β -N-acetil-glucosaminidasas). Las endo-quitinasas (EC 3.2.1.14) cortan enlaces β -1,4 entre unidades de GlcNAc localizados internamente a lo largo del polímero. Las quitobiosidasas (EC 3.2.1.29), catalizan la liberación sucesiva de dímeros de GlcNAc desde el extremo no reductor. El producto final de la hidrólisis producida por las actividades endo- y exo-quitinasas, son pequeños oligosacáridos que sirven de sustrato a las β -N-acetil-glucosaminidasas (EC 3.2.1.30). Éstas producen monómeros de GlcNAc completando la degradación total del polímero [94] (Figura 1.5).

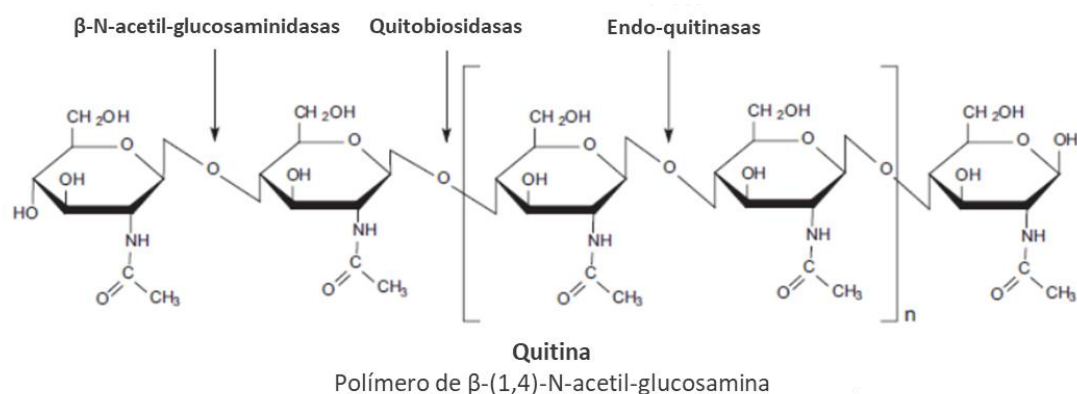


Figura 1.5. Acción hidrolítica de endo-quitinasas, quitobiosidasas y β-N-acetilglucosaminidasas sobre la quitina. (Adaptado de Complex Carbohydrate Analysis: Enzymes, Kits and Reagents, Sigma 2007).

En base a similitudes en su secuencia, las quitinasas presentes en plantas pertenecen a las familias GH18 y GH19 de las glicosil hidrolasas. Están codificadas por familias multigénicas y presentan diversidad funcional según su localización celular, estructura y dominio catalítico. En base a estas características se las ha clasificado en siete clases, del I al VII estando presente en las plantas las de Clase I a V y VII [95], [96], [97].

Además de tener un rol en la defensa contra patógenos, como se describe a continuación, las quitinasas de las plantas juegan otros roles importantes en el ciclo de vida de las plantas, produciendo moléculas señalizadoras o factores morfogénicos [97]

Con relación a su participación en los mecanismos de defensa a patógenos, las quitinasas conforman varias familias de PRs. PR-3 incluye quitinasas de clase I, II, IV y V; PR-4 de clases I y II; PR-8 de clase III y PR-11 de clase I [66]. En conjunto, estas familias incluyen isoformas ácidas y básicas que se inducen ante el ataque de patógenos. Además de los hongos, la infección por bacterias y virus también induce la expresión de estas enzimas. En forma análoga a la acción de las β-1,3-glucanasas sobre los glucanos, la acción de las quitinasas sobre la quitina de la pared de los hongos fitopatógenos provoca la liberación de oligosacáridos de quitina que actúan como elicitores de las respuestas de defensa de la planta. Algunos hongos fitopatógenos han desarrollado mecanismos para evitar el reconocimiento de la quitina por parte de las quitinasas del hospedero, mediante desacetilación o cubriéndola con sus propias proteínas de unión a quitina [98].

β -1,3-glucanasas y quitinasas actúan sinérgicamente en los mecanismos de defensa a patógenos fúngicos, inhibiendo el crecimiento de los mismos al degradar su pared celular y liberar elicitores (MAMPs) que permiten al sistema inmune de la planta reconocerlos y activar los mecanismos de defensa [66], [99], [100]. La efectividad de estas enzimas varía según el patosistema, el estado de desarrollo de la planta, el tejido atacado y el estrés al que esté sometida la planta. Las isoformas ácidas de ambas son generalmente secretadas al apoplasto mientras que las básicas son vacuolares. Trabajos con plantas transgénicas reportan que las isoformas básicas son más efectivas contra necrotrofos, mientras que las ácidas tendrían su principal rol en la liberación de elicitores de la pared del hongo en el apoplasto e inhibir el crecimiento de hongos biotrofos [101]. Se han reportado casos en que los niveles constitutivos de estas enzimas contribuyen a la resistencia, pero luego su expresión en plantas transgénicas ha arrojado resultados ambiguos, mostrando una efectividad limitada [102]. Varios trabajos han vinculado una mayor expresión o actividad de estas enzimas con la resistencia a enfermedades cuando se comparan cultivares susceptibles o resistentes a determinado patógeno en algunos cultivos como el tomate, el trigo, el ajo y la rúcula [103], [104], [105], [106].

Al igual que para el caso de las peroxidasas, la inducción de quitinasas y β -1,3-glucanasas aporta a la resistencia en algunos patosistemas, pero está vinculada a una respuesta no eficiente en contener el avance del patógeno en otros [82], [85]. También se ha demostrado su participación en el establecimiento de resistencia sistémica adquirida (SAR) y resistencia sistémica inducida (ISR) en algunos patosistemas [66], [107]. Estas enzimas son herramientas importantes para la defensa de la planta contra patógenos fúngicos, participan en el arreglo de mecanismos que sustentan la resistencia basal o inducida, pero en pocos casos son determinantes de la misma.

En lo que refiere a especies del género *Allium*, Anisimova y colaboradores reportan en estudios en los que enfrentaron cultivares susceptibles y resistentes de ajo (*Allium sativum*) a *Fusarium proliferatum*, que la expresión de β -1,3-glucanasas y quitinasas podría vincularse a la resistencia del hospedero en este patosistema [106]. En un trabajo anterior Zapacosta et al. [108] estudiaron los cambios en los niveles de actividad de peroxidasas, glucanasas y quitinasas de cebolla frente a *Phoma terrestres*, en

comparación con la respuesta en *A. fistulosum*. El contacto con el patógeno incrementó la actividad de peroxidasas y glucanasas en la cebolla, mientras que *A. fistulosum* presentó altos niveles de glucanasas y quitinasas constitutivas. McLusky et al [109] también reportaron incremento en la actividad peroxidasa de cebollas en la zona de inoculación con *Botrytis allii*, asociado a la formación de papillae. No se conoce el rol de estas enzimas en las respuestas de defensa en cebolla y *A. fistulosum* frente a *F. oxysporum* o *B. squamosa*.

Como antecedente a este trabajo de tesis nuestro grupo publicó resultados acerca de la respuesta de plántulas de *A. cepa* y *A. fistulosum* frente a *F. oxysporum* encontrando que *A. fistulosum* se comportaba como más resistente que *A. cepa* frente a las cepas más virulentas del patógeno y que las actividades de POX y GLU aumentaban en ambas especies en respuesta al daño causado por el patógeno. Reportamos además que ambas especies adquieren resistencia a *F. oxysporum* tempranamente (a los 7 días de sembradas) [34].

1.2 Objetivos

Tomando en consideración los antecedentes mencionados, en esta tesis indagamos acerca del rol de enzimas vinculadas a la patogénesis en *A. cepa* y *A. fistulosum* en respuestas de defensa frente a *F. oxysporum* y *B. squamosa* y en respuestas provocadas por el uso de quitosano comercial como inductor de resistencia.

La hipótesis general en la que basamos nuestra investigación es que las enzimas peroxidadas (POX), β -1,3-glucanasas (GLU) y quitinasas (QUIT) participan en las respuestas de defensa en estos patosistemas y las variaciones en sus niveles de actividad inciden en la eficiencia de estas respuestas.

Vinculadas a esta hipótesis general nos planteamos una serie de hipótesis específicas:

- Durante la germinación, las actividades POX, GLU y QUIT evolucionan de forma diferencial en *A. cepa* y *A. fistulosum*.
- Los niveles de actividad de estas enzimas varían a lo largo del ciclo de cultivo de *A. cepa*, con cambios asociados a su estado fenológico.
- La exposición de *A. cepa* y *A. fistulosum* frente a *F. oxysporum* o *B. squamosa* provoca aumentos en las actividades POX, GLU y QUIT con respuestas más intensas y/o tempranas en la especie más resistente.
- La aplicación de Biorend® previo a la inoculación con el patógeno reduce la severidad de los síntomas causados por *B. squamosa* en *A. cepa* y *A. fistulosum*, aumentando las actividades POX, GLU y QUIT y/o induciendo aumentos más intensos y/o tempranos luego de la inoculación.

Para responder a estas hipótesis nos planteamos los objetivos que se describen a continuación.

El **objetivo general** de esta Tesis de Maestría es contribuir al conocimiento sobre el rol de enzimas vinculadas a la patogénesis (POX, GLU y QUIT) en las respuestas de defensa de la cebolla (*Allium cepa*) y su especie emparentada *Allium fistulosum*, frente a patógenos fúngicos de interés en nuestro país (*Fusarium oxysporum* y *Botrytis squamosa*).

Para ello nos propusimos los siguientes **objetivos específicos**:

1 – Determinar las variaciones en las actividades enzimáticas POX, GLU y QUIT durante la germinación de cebolla y de A. fistulosum.

2- Determinar las variaciones en las actividades enzimáticas POX, GLU y QUIT a largo del ciclo de cultivo de cebolla.

3- Estudiar la respuesta de A. cepa y A. fistulosum frente a F. oxysporum siguiendo la evolución de síntomas y los cambios de las actividades enzimáticas POX, GLU y QUIT.

4- Estudiar la respuesta de A. cepa y A. fistulosum frente a B. squamosa siguiendo la evolución de síntomas y los cambios de las actividades enzimáticas POX, GLU y QUIT.

5- Evaluar el efecto del Biorend® (quitosano comercial) como inductor de resistencia en A. cepa y A. fistulosum frente a B. squamosa.

El abordaje de los objetivos específicos 1 y 2 se desarrolla en el Capítulo 3; el del objetivo específico 3 se desarrolla en el Capítulo 4 y el de los objetivos específicos 4 y 5 se desarrolla en el Capítulo 5.

CAPÍTULO 2 - MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Germinadores de *A. cepa* y *A. fistulosum*.

Con el propósito de evaluar los cambios en las actividades enzimáticas en estudio durante las primeras etapas de desarrollo de las plántulas, se germinaron semillas de *A. cepa* var. Pantanoso del Sauce (en adelante Pantanoso) y *A. fistulosum*. Se realizó conteo de semillas germinadas y colecta de muestras a los 1, 2, 4 y 7 días de puestas a germinar.

2.1.1 Material vegetal

Se utilizaron semillas producidas en el CRS. En *A. cepa* se utilizó la variedad Pantanoso. Esta variedad fue desarrollada por el CRS a partir de poblaciones locales de la zona Pantanoso del Sauce del departamento de Canelones y actualmente es la más utilizada en el sur de Uruguay. En *A. fistulosum* se utilizó la población UR13005 producida a partir de semilla originaria de Japón.

2.1.2 Germinadores

En placas de Petri se colocaron dos láminas superpuestas de papel Whatman N°1 y se humedecieron con 4 ml de agua destilada. En cada placa se sembraron 25 semillas de *A. cepa* o 30 semillas de *A. fistulosum*. Las placas se colocaron en Cámara de Crecimiento con un régimen de luz de 12 horas a 20°C y 90% de humedad relativa (Figura 2.1). A los 1, 2, 4 y 7 días de puestas a germinar se hizo conteo de semillas germinadas, se colectó y pesó el material vegetal y se guardó liofilizado para posteriores análisis. Para cada especie y momento de muestreo (días 1, 2, 4 y 7) se sembraron 12 placas (96 placas en total). En la colecta, la unidad de muestreo consistió en todo el material vegetal de cuatro placas, por lo que para cada especie y fecha de muestreo se obtuvieron tres repeticiones.

2.1.3 Porcentaje de germinación

El porcentaje de germinación se calculó en base al cociente entre el número de semillas germinadas sobre el total de semillas puestas a germinar. Se consideraron germinadas las semillas en las que se visualizó la emergencia de la radícula, como se muestra en la Figura 2.2. Para el conteo se tomaron como unidad muestral las semillas germinadas de cuatro placas (la misma que para la colecta del material vegetal) por lo que se obtuvieron

tres repeticiones para cada especie y fecha de muestreo. Las diferencias en los porcentajes de germinación entre ambas especies a distintos tiempos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism 7.00. Se utilizó Prueba t despareada (método Holm-Sidak) para determinar diferencias significativas para $\alpha = 0,05$.

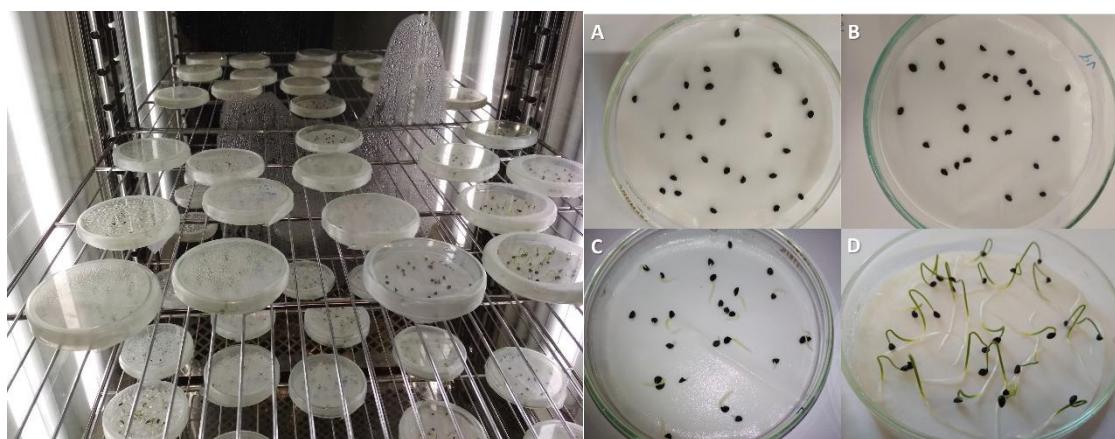


Figura 2.1. Germinadores. Izq.: Germinadores en cámara de crecimiento. Der.: Germinadores de *A. cepa* var. *Pantanoso* a distintos tiempos de puestos a germinar; A: 1 día, B: 2 días, C: 4 días, D: 7 días.



Figura 2.2. Semillas germinadas de *A. cepa* y *A. fistulosum* a los 2 días de puestas a germinar. Izquierda: las flechas indican las radículas emergiendo de dos semillas germinadas de *A. cepa*. Derecha: microfotografía de semilla de *A. fistulosum* con la radícula emergiendo.

2.1.4 Tasa de crecimiento

El crecimiento de la planta es definido como un incremento irreversible en sus dimensiones debido a la multiplicación y/o aumento en el volumen de sus células. Dado que es dificultoso medir el volumen de la planta, se toman otras variables asociadas. El peso fresco es un buen estimador del volumen cuando las plantas están en plena

turgencia. En las etapas juveniles del desarrollo de la planta, el incremento de la biomasa en el tiempo tiene un comportamiento exponencial:

$$W_t = W_0 e^{kt}$$

donde W_t es el peso final, W_0 es el peso inicial, t es el tiempo y k es la Tasa de Crecimiento Relativo (RGR según sus siglas en inglés) [110].

Para analizar el crecimiento de los plantines el parámetro determinado fue RGR. Para esto se tomó el peso fresco del material vegetal durante el período de crecimiento exponencial de las plántulas (días 1 a 7) (Figura 2.3). Para cada tiempo y especie, el peso fresco se obtuvo de promediar el peso de las semillas o plántulas de cuatro placas con lo que se obtuvieron tres repeticiones para cada medida. Las variaciones entre el día 0 y 1 no se consideraron dado que el aumento de peso en ese lapso es debido en gran parte a la imbibición de las semillas.

La variación del peso fresco en el tiempo se analizó utilizando el software GraphPad Prism 7.00. RGR se determinó utilizando una regresión no lineal ajustando los datos a una curva de crecimiento exponencial ($Y=Y_0 * e^{(k*X)}$, donde Y es el peso fresco y X el tiempo en días) por el método de mínimos cuadrados. El valor de RGR corresponde al valor del parámetro k expresado en días⁻¹. El tiempo de duplicación del peso fresco, siguiendo el modelo de crecimiento exponencial, se calculó como $\ln 2/k$. Las RGR de ambas especies se compararon utilizando la prueba F de la extra suma de los cuadrados y el Criterio de Información de Akaike. La prueba F evalúa la probabilidad (p value) de que las diferencias observadas se deban a la dispersión aleatoria de los datos, mientras que el Criterio de Información de Akaike evalúa la probabilidad de que determinados datos se ajusten a dos modelos alternativos, en nuestro caso a que las k sean iguales o

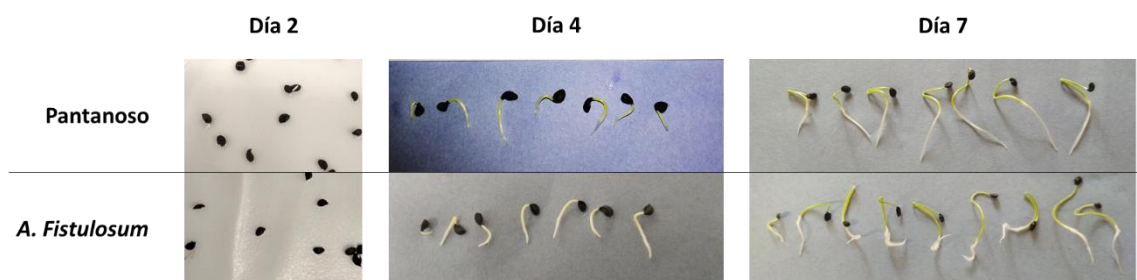


Figura 2.3. Crecimiento de plántulas de *A. cepa* var. Pantanoso del Sauce (arriba) y *A. fistulosum* (abajo), luego de 2, 4 y 7 días de puestas a germinar.

diferentes. Para el caso en que los modelos a comparar tienen los mismos grados de libertad, como es nuestro caso, el programa GraphPad recomienda utilizar el Criterio de Información de Akaikeⁱ.

2.2 Muestreo de plantas durante el ciclo de cultivo de *A. cepa*

Con el propósito de determinar cambios en las actividades enzimáticas durante el desarrollo de plantas adultas de *A. cepa*, se tomaron muestras de un ensayo de variedades de cebolla realizado a campo en el CRS (Figura 2.4).

Se colectaron muestras de cuatro variedades de cebolla (Pantanoso del Sauce, Brava, INIA Casera e INIA Naqué) en siete fechas durante una zafra del cultivo: 30/05, 30/06, 4/08, 9/09, 8/10, 17/11 y 12/12. En todas las fechas se muestrearon 8 plantas de cada variedad a excepción del 30/05, fecha en la que los plantines de la variedad Brava aún estaban emergiendo y el 12/12 en que se sólo se muestreó Pantanoso y Brava, dado que las otras dos variedades habían sido cosechadas previo a dicha fecha. Al ser variedades de distinto ciclo las fechas de siembra no fueron las mismas para todas ellas con lo que al momento de muestreo tenían distintas edades como se describe en la Tabla 2.1. La edad de las plantas se presenta en días desde la siembra (dds).

A partir de las 8 plantas muestreadas por cada fecha y variedad, se hizo un pool de forma que se analizaron como muestras compuestas. De cada una de estas muestras compuestas se prepararon tres extractos a partir de los distintos órganos: raíz + plato basal; falso tallo (bulbo); y hojas. De esta forma se analizó la evolución de las actividades enzimáticas en los distintos órganos para cada variedad.

Tabla 2.1. Edad de las plantas (dds) al momento del muestreo.

Variedad	Siembra ^a	Fecha de muestreo						
		30/05	30/06	9/08	9/09	8/10	17/11	12/12
INIA Casera	28/03	63 ^b	94 ^b	129	165	194	234	-
INIA Naqué	28/03	63 ^b	94 ^b	129	165	194	234	-
Pantanoso	16/04	44 ^b	75 ^b	110	146	175	215	240
Brava	5/05	-	56 ^b	91 ^b	127	156	196	221

^a Fecha de siembra. ^b Plantas colectadas de almácigo.

ⁱ https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/curve-fitting/REG_Comparing_Models_Tab.htm



Figura 2.4 Vista general de ensayo de variedades de cebolla en el CRS de Facultad de Agronomía.

2.3 Ensayos de desafío de *A. cepa* y *A. fistulosum* frente a *F. oxysporum*

Se realizaron ensayos de desafío en los que se enfrentaron desde la siembra plántulas de *A. cepa* y *A. fistulosum* a cepas de virulencia contrastante de *F. oxysporum*. Se tomaron muestras a distintos tiempos de forma de evaluar la evolución de las respuestas enzimáticas de las plantas conforme se desarrolló la interacción hospedero-patógeno.

2.3.1 Material vegetal

Se utilizaron semillas producidas en el CRS. En *A. cepa* se utilizó la variedad Pantanoso del Sauce (en adelante Pantanoso). En *A. fistulosum* se utilizó la población UR13005 producida a partir de semilla originaria de Japón.

2.3.2 Cepas de *F. oxysporum* y producción de inóculo

Las cepas de *F. oxysporum* f. sp. *cepae* (FOC) se obtuvieron de la colección del Laboratorio de Fitopatología de Facultad de Agronomía. Para los ensayos de desafío se seleccionaron cepas de virulencia contrastante: FOC NL93186 y UR06 [11]. La primera es un aislamiento de origen holandés y la segunda de un aislamiento nacional. En trabajos anteriores al desarrollo de esta tesis se observó que NL93186 es más virulenta que UR06 cuando se exponen semillas de *A. cepa* desde la siembra. Dado que durante

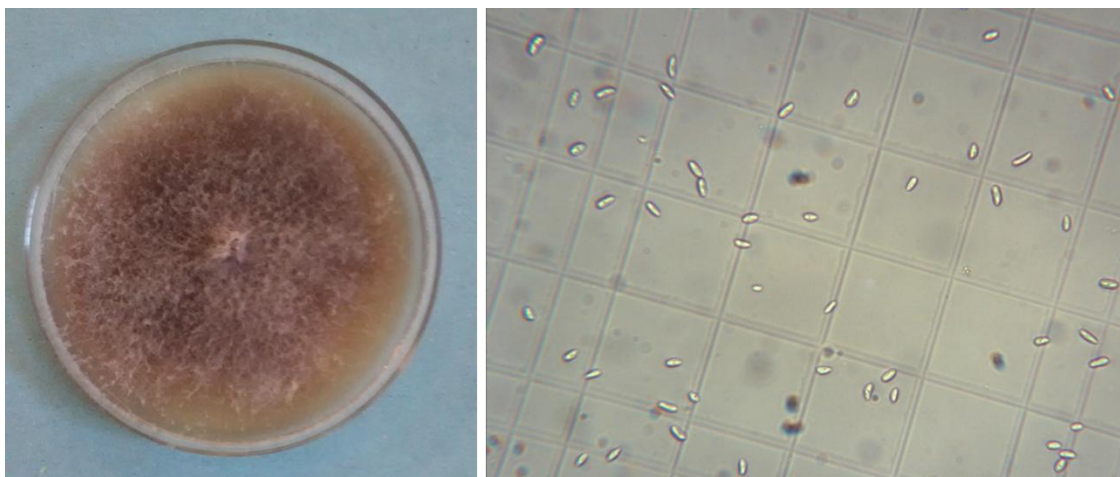


Figura 2.5. Producción de inoculo de *F. oxysporum*. Izq.: Micelio esporulado de *F. oxysporum* en placa de Petri con PDA. Der.: Microfotografía de microconidios de *F. oxysporum* en Cámara de Neubauer.

el mantenimiento de la colección estas cepas fueron replicadas en medios nutrientes, a los efectos de recuperar la virulencia se inocularon plántulas de Pantanoso y a partir de éstas se realizaron los re-aislamientos.

A partir de micelio conservado en papel estéril de cada una de las cepas, se sembraron placas con agar papa dextrosa (PDA). Las placas fueron incubadas en estufa a 24°C durante dos semanas. Los conidios producidos fueron suspendidos en agua estéril con Tween 0,01% y filtrados con gasa estéril. Se hizo conteo de la concentración de conidios utilizando Cámara de Neubauer y se ajustó su concentración a 3×10^5 esporas/ml con agua estéril. (Figura 2.5).

2.3.3 Ensayos de desafío frente a *F. oxysporum*

Para evaluar las respuestas de Pantanoso y *A. fistulosum* a las cepas de FOC, se realizaron ensayos de desafío mediante test de plántulas, el cual ha mostrado ser un método rápido para evaluar resistencia a FBR en cebolla y correlaciona bien con los resultados de evaluaciones de la infección en plato basal y bulbo de plantas adultas [21], [111]. Se sembraron 30 semillas de Pantanoso o *A. fistulosum* en pots de papel de aluminio de 180 ml con arena estéril inoculada con 20 ml de una suspensión de aproximadamente 3×10^5 esporas/ml de una de las cepas de FOC, o agua destilada estéril como control. Por lo tanto, para cada especie de planta se realizaron tres tratamientos:

Control, +NL93186 y +UR06. Por cada tratamiento se sembraron 24 potes por lo que el total de potes sembrados fueron 144.

Los potes sembrados se incubaron en cámara de crecimiento a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y un régimen de 12h al día de luz fluorescente $75 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y se mantuvieron dentro de bolsas de polipropileno para asegurar condiciones de humedad óptimas para el desarrollo del patógeno y evitar contaminaciones cruzadas (Figura 2.6).

A los 3, 7 y 11 días desde de la siembra (dds) se realizó colecta de plántulas para análisis bioquímicos. Al día 3 se colectaron 6 potes por tratamiento mientras que los días 7 y 11 se colectaron 9 potes por tratamiento. La unidad de muestreo correspondió a las plántulas de tres potes (dos repeticiones por tratamiento al día 3 y tres repeticiones por tratamiento a los días 7 y 11). Para algunos tratamientos, debido al poco material vegetal colectado, la unidad de muestreo correspondió a más de tres potes por lo que en lugar de tres, se obtuvieron dos repeticiones. Las plántulas colectadas fueron lavadas con agua estéril para eliminar restos de arena y liofilizadas para posteriores análisis bioquímicos.

2.3.4 Evaluación de síntomas

La evaluación de síntomas se hizo por conteo de plántulas totales y normales a los 7 y 11 dds. A los 3 dds no fue posible hacer conteo de plántulas dado que las semillas estaban germinando, por lo que se registró el porcentaje de semillas germinadas. Se consideraron plantas normales las que no presentaban síntomas de damping-off. Se contaron las plantas de cada pote de forma que para cada tratamiento el número de



Figura 2.6. Ensayos de desafío frente a *F. oxysporum* Izq.: Potes sembrados mantenidos en bolsas de polipropileno durante un ensayo de desafío. Centro: Pote con plántulas de Pantanoso expuestas a FOC UR06 7 días después de sembradas. Der.: Plántulas de Pantanoso expuestas a FOC UR06 colectadas 11 días después de sembradas.

repeticiones correspondió al número de pots (9 en todos los casos). Se definió el índice de enfermedad (IE) como la relación $IE = 1 - (I/C)$, donde I es el valor de la variable (número de plántulas totales o normales) en el tratamiento inoculado con el patógeno y C es el valor de la variable para el tratamiento control. Valores de IE cercanos a cero indican alta resistencia de la planta o baja virulencia del patógeno mientras que valores cercanos a uno indican alta susceptibilidad de la planta hospedera o alta virulencia del patógeno. Para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos, se realizaron test de ANOVA y prueba t desapareada (método Holm-Sidak) para $\alpha = 0,05$ utilizando el software GraphPad Prism 8.0.2.

2.4 Ensayos de desafío de *A. cepa* y *A. fistulosum* frente a *B. squamosa* y evaluación de Biorend® como inductor de resistencia.

Se realizaron ensayos de desafío en los que se enfrentaron plantas adultas de *A. cepa* y *A. fistulosum* a una cepa virulenta de *B. squamosa*. Los ensayos se diseñaron con el propósito de evaluar la respuesta enzimática de las plantas conforme avanza la relación hospedero-patógeno y estudiar el efecto de un compuesto comercial basado en quitosano (Biorend®) como inductor de resistencia.

2.4.1 Material vegetal

Las plantas fueron producidas en el CRS. En *A. cepa* se utilizaron las variedades Pantanoso y Naqué; en *A. fistulosum* se utilizó la población UR13005 producida a partir de semilla originaria de Japón. Los almácigos fueron sembrados en los meses de febrero y marzo. A los 3 meses aproximadamente, se transplantaron los plantines a macetas en invernáculo hasta su uso. La edad de las plantas fue de entre 118 a 206 días contando desde la siembra (dds), según el ensayo.

2.4.2 Cepas de *B. squamosa* y producción de inóculo

De la colección de cepas de *B. squamosa* del laboratorio de Fitopatología (Facultad de Agronomía) se seleccionó la cepa Bs-UR05 por su virulencia y capacidad para producir inóculo. Dado que el micelio de *B. squamosa* no produce conidios cuando es crecido en medios de cultivo, para obtenerlos es necesario inducir la producción de esclerocios para a partir de éstos, obtener conidios. Para ello, se replicó micelio en placas con PDA y se creció durante 15 días a 20 °C, hasta la formación de esclerocios. Los esclerocios se



Figura 2.7. Producción de inoculo de *B. squamosa*. Izq. arriba: Placas de PDA con micelio de *B.squamosa* formando esclerocios. Izq. Abajo: Esclerocios germinados en arena estéril. Der.: Vista aumentada en lupa estereoscópica de esclerocio germinado observándose conidios.

transfirieron a placas con arena estéril húmeda y se incubaron a 4 °C sin luz durante 7 semanas hasta que germinaron y produjeron conidios (Figura 2.7). Los esclerocios con conidios se sumergieron en agua destilada estéril con Tween 20 al 0,1% y se agitó para desprender las esporas. La suspensión se filtró con gasa estéril y se realizó conteo de esporas en Cámara de Neubauer para ajustar la concentración a 1×10^4 esporas ml^{-1} .

2.4.3 Ensayos de desafío frente a *B. squamosa*

Se realizaron tres sets de ensayos de desafío en los que se enfrentaron plantas adultas de *A. cepa* y *A.fistulosum* a una cepa de *B. squamosa* (Bs-UR05). En los tres casos se aplicó el mismo diseño experimental que se describe a continuación:

- Tres días antes de ser inoculadas (dai) con el patógeno, las plantas fueron pretratadas con quitosano comercial (Biorend®, Biotex S.A.). Para esto se asperjaron las hojas de las plantas con una solución acuosa 2% de Biorend®(aprox. 0,5 mg/mL de quitosano, ajustado a pH 5,0 con HCL 1M). Las plantas usadas como control fueron asperjadas con agua estéril. En todos los casos se utilizó Tween 20 al 0.1% como adherente.
- La inoculación con el patógeno se hizo con aproximadamente 5 mL de suspensión de esporas (concentración de 1×10^4 esporas/mL) por planta,

- cubriendo la totalidad del follaje. Las plantas no inoculadas fueron asperjadas con agua estéril. En todos los casos se utilizó Tween 20 al 0.1% como adherente.
- La combinación del pretratamiento con Biorend® (inductor) y la inoculación con el patógeno dio lugar a cuatro tratamientos en un arreglo factorial 2 x 2: plantas sin inductor y sin inocular (control); con inductor y sin inocular (Biorend); sin inductor e inoculadas (+*B.sq.*); con inductor e inoculadas (Biorend +*B.sq.*) (Tabla 2.2).
 - Cada planta se cubrió con bolsas de polipropileno y se mantuvieron en condiciones controladas en cámara de crecimiento (17 °C, 100% humedad relativa, 10h diarias de luz) hasta la evaluación de síntomas y toma de muestras para análisis bioquímicos (tercera hoja más joven de cada planta).

Tabla 2.2. Tratamientos resultantes del pretratamiento (3 dai) con Biorend® y la inoculación con *B. squamosa*

		Inoculación	
		H ₂ O	<i>B. squamosa</i>
3 dai	H ₂ O	Control	+ <i>B.sq.</i>
	Biorend (ind.)	Ind.	Ind. + <i>B.sq.</i>

En el primer set de ensayos (en adelante **Ensayo 1**), se utilizaron dos variedades de *A. cepa* (Pantanoso y Naqué) y una población de *A. fistulosum* (UR13005). En total se utilizaron 168 plantas de 118 dds al momento de la inoculación con el patógeno. Los muestreos se realizaron al momento de la inoculación (día 0) y a los 2, 4 y 8 días después de la inoculación (ddi). Para cada tratamiento y momento de muestreo se colectaron hojas de 4 plantas (4 repeticiones). La evaluación de síntomas se realizó a los 4 y 8 ddi. A partir de las muestras colectadas en este ensayo se analizaron las actividades enzimáticas vinculadas al estrés oxidativo.

El segundo set de ensayos (en adelante **Ensayo 2**) se realizó para confirmar los resultados vinculados al desarrollo de síntomas observados en el Ensayo 1. Se utilizaron las mismas variedades de cebolla (Pantanoso y Naqué) y la población de *A. fistulosum* (UR13005) utilizadas en el Ensayo 1. A diferencia de aquel ensayo, en este caso la edad

de las plantas al momento de la inoculación fue de 162 dds en lugar de 118 dds. En este ensayo sólo se evaluó el desarrollo de síntomas a los 8 ddi (momento en que se vieron los resultados más contrastantes entre los distintos tratamientos y genotipo en el Ensayo 1) y no se tomaron muestras para análisis bioquímicos.

En el tercer set de ensayos (en adelante **Ensayo 3**), se optó por tener un mayor número de repeticiones por tratamiento por lo que se utilizó una sola variedad de *A. cepa* (Pantanoso) y una población de *A. fistulosum* (UR13005). Se utilizaron seis plantas (6 repeticiones) por tratamiento y fecha de muestreo (un total de 168 plantas). La edad de las plantas fue de 206 dds al momento de la inoculación. Los muestreos se realizaron al momento de la inoculación (día 0) y a los 2, 4 y 8 ddi. La evaluación de síntomas se realizó a los días 2, 4 y 8 ddi. A partir de las muestras colectadas en este ensayo se analizaron las actividades enzimáticas de peroxidasas, glucanasas y quitinasas.

2.4.4 Evaluación de síntomas

Se estimó el porcentaje de tejido afectado de la tercera (hoja 3) y cuarta hoja (hoja 4) más joven de cada planta, a los 2, 4 y 8 días desde la inoculación (ddi) con *B. squamosa*, dependiendo del ensayo. La elección de las hojas 3 y 4 responde a que son las hojas con la lámina completamente desarrollada más jóvenes por lo que no presentan signos de senescencia (o son muy escasos) y la probabilidad de la colonización por otros microorganismos disminuye. Además, las diferencias en su vigor vegetativo (la hoja 3 presenta más vigor) se refleja en diferencias en los síntomas, que se desarrollan más en la hoja 4 lo que permite discriminar mejor entre respuestas a diferentes condiciones. Para estimar el porcentaje de tejido foliar afectado, se tomaron imágenes de sección de cada hoja y se las procesó con el programa Quant v. 1.0.2 (Figura 2.8). Para establecer diferencias con significación estadística entre grupos de datos se realizaron test de ANOVA y comparaciones múltiples por el método de Holm-Sidak o test LSD de Fisher, para $\alpha = 0,05$ o $0,1$ según se indica en resultados, utilizando el software GraphPad Prism 8.0.2.



Figura 2.8. A y B: Vista general de ensayo de desafío de *A. cepa* y *A. fistulosum* frente a *B. squamosa* en cámara de crecimiento. C: Imagen de sección de hoja con manchas necróticas típicas ocasionadas por *B. squamosa*. D: La misma imagen procesada con el programa Quant, para estimar porcentaje de área foliar afectada.

2.4.5 Microscopía

Se realizaron observaciones al microscopio con el fin de confirmar que los síntomas observados se debían a la colonización de los tejidos de la planta por *B. squamosa*. El tejido vegetal fue tratado durante 48hs con una solución de etanol/ácido acético (3:1, v/v) para decolorado y fijación de las estructuras celulares. Luego se mantuvieron en una solución de lactoglicerol (ácido láctico/glicerol/agua, 1:1:1, v/v/v) hasta su tinción. Luego de enjuagadas las muestras fueron teñidas con azul de anilina 0.1% en lactofenol para observación de las estructuras fúngicas. Las observaciones se realizaron en microscopio óptico modelo XYL-146Y de Labotech con aumento 400x.

2.5 Análisis de actividades enzimáticas

2.5.1 Obtención de extractos

Todas las muestras fueron liofilizadas (24h usando equipo Labotech) y preservadas de la humedad a -20°C hasta su utilización. Para la obtención de los extractos acuosos, el tejido liofilizado fue tratado por abrasión en mortero a temperatura y pH controlado

(buffer Acetato 50mM, pH 5,6). La relación entre el peso del tejido liofilizado y el volumen de buffer utilizado fue registrada para cada extracto y varió según el órgano y la edad de la planta. Las suspensiones obtenidas fueron centrifugadas y los sobrenadantes límpidos se gel filtraron en columnas comerciales PD-10 (Sephadex G25). Las actividades enzimáticas fueron expresadas como unidades de enzima por gramo de tejido liofilizado (UE g⁻¹).

Para las muestras provenientes de ensayos de desafío frente a *F. oxysporum*, los extractos se obtuvieron a partir de radículas germinadas, en el caso de las muestras colectadas el día 2 y a partir de las raíces de las plántulas, para las colectadas los días 7 y 11. Para los ensayos de desafío frente a *B. squamosa*, los extractos se prepararon a partir de la tercera hoja más joven de cada planta.

Los sustratos utilizados en los ensayos que se describen a continuación fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. El peróxido de hidrógeno utilizado fue adquirido de Macron.

2.5.2 Actividad peroxidasa (POX)

La actividad peroxidasa (POX) (EC 1.11.1.7) se determinó usando *o*-dianisidina como sustrato (0,5 % en MetOH) en presencia de H₂O₂ según Franco Fraguas *et al.* [112]. La oxidación del sustrato se siguió espectrofotométricamente por aumento de la absorbancia a 460 nm. El coeficiente de extinción molar a 460 nm de la *o*-dianisidina oxidada utilizado para el cálculo de las UE fue de 11,3 mM⁻¹cm⁻¹. La UE se definió como la cantidad de enzima que oxida 1 μmol de *o*-dianisidina por minuto en las condiciones de reacción (pH 4,8; 20 °C; [H₂O₂] 10 mM).

El análisis del perfil de isoformas de POX se realizó por zymograma electroforético mediante isoelectroenfoque (IEF) utilizando equipo PhastSystem™ (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Las muestras fueron corridas en geles comerciales PhastGel IEF pH 3-9 (pI). El revelado enzimático específico para POX se realizó utilizando *o*-dianisidina como sustrato en presencia de H₂O₂. Para la estimación de los pI se procedió como sigue:

- se realizó IEF con un marcador de pI Broad range (pH 3-10), Amersham GE, en las mismas condiciones, utilizando el mismo equipo y tipo de gel que para las muestras analizadas;
- para visualizar las bandas se utilizó tinción por plata;
- para asignar pI a las

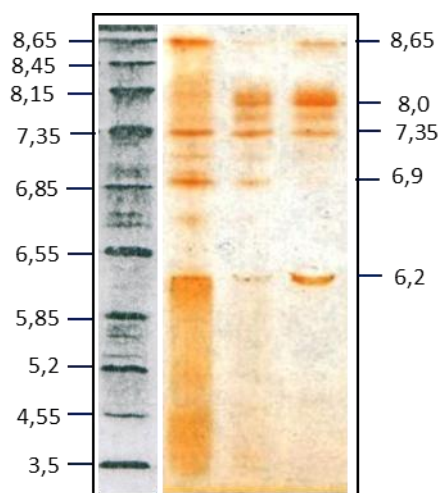


Figura 2.9. Asignación de pI a bandas obtenidas por IEF. A la izquierda marcador de pI revelado mediante tinción con plata; a la derecha zymograma revelado para actividad POX en tres muestras.

bandas obtenidas en los zymogramas se procesaron las imágenes utilizando como referencia la obtenida para el marcador de pI. En la figura 2.9 se presenta el IEF revelado con plata obtenido para el marcador de pI y se muestra un ejemplo de asignación de bandas a un zymograma. El mismo procedimiento se usó para todas las asignaciones de pI durante el desarrollo de la tesis.

2.5.3 Actividad β -1,3-glucanasa (GLU)

La actividad β -1,3-glucanasa (GLU) (EC 3.2.1.39) se determinó según Abeles y Furrence [113] usando laminarina como sustrato (1 % en buffer acetato 50 mM pH 4,8). Los azúcares reductores liberados por la acción de la enzima sobre el sustrato fueron determinados como glucosa por la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico según el método de Bernfeld [114]. Para esto se construyó una curva de calibración con soluciones estándares de glucosa de concentración conocida, determinándose la cantidad de ácido 3,5-dinitrosalicílico reducido, por medida de la absorbancia a 540 nm. La UE se definió como la cantidad de enzima que libera 1 mg de azúcares reductores en forma de glucosa en las condiciones de reacción (1h; pH 4,8; 37°C).

2.5.4 Actividad quitinasa (QUIT) y actividad N-acetil- β -glucosaminidasa (NAG)

La actividad quitinasa (QUIT) (EC 3.2.1.14) se determinó utilizando quitina azure como sustrato y la actividad N-acetil- β -glucosaminidasa (NAG) (EC 3.2.1.30) se determinó utilizando p-nitrofenil-N-Acetil- β -D-Glucosamina (pNP-GlcNAc).

Con quitina azure, la actividad se determinó por liberación del colorante a la solución según método descrito por Kim *et al.* [115] con modificaciones (el sustrato se suspendió en buffer acetato 50mM pH 5,6; el tiempo de incubación fue de 3h a 40°C; la

absorbancia del sobrenadante se midió a 560 nm). La UE se definió como la cantidad de enzima que produce un aumento de 0.01 en la Abs. 560 nm en las condiciones de reacción (3h; pH 5.6; 40°C).

Con pNP-GlcNAc, la actividad NAG se determinó siguiendo la liberación de p-N-fenol a 405 nm según método descrito por Frändberg and Schnürer [116] con modificaciones (el sustrato fue disuelto en buffer acetato 50mM pH 5,6; el tiempo de incubación fue de 30 minutos a 40°C). La UE se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 nmol de p-N-fenol por minuto en las condiciones de reacción (pH 5,6; 40°C).

2.5.5 Actividad de enzimas vinculadas al estrés oxidativo

Las actividades de enzimas vinculadas al estrés oxidativo se determinaron según Elavarthi and Martin [117] a excepción de la actividad POX. Para estos ensayos la actividad POX se determinó utilizando guayacol como sustrato.

La actividad superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1) se determinó por su capacidad de inhibir la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) a formazán en presencia de riboflavina, oxígeno y luz, al provocar la dismutación de radicales superóxido que reducen al NBT. La reacción se realizó a temperatura ambiente durante 15 minutos bajo luz fluorescente de 15 W en buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7,8 suplementado con EDTA 2 mM, Tritón X-100 0,025% y L-Metionina 10 mM. La formación de formazán se siguió por la medida de Abs 560 nm. La UE se definió como la cantidad de enzima necesaria para inhibir en un 50% la formación de formazán en las condiciones de reacción (pH 7,8; temperatura ambiente).

La actividad catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6) se determinó siguiendo la velocidad de descomposición del peróxido de hidrógeno por medida de la variación de la Abs a 240 nm. El coeficiente de extinción molar a 240 nm del H₂O₂ utilizado para el cálculo de las UE fue de 43,6 mM⁻¹cm⁻¹. La reacción se realizó a 30°C durante 4 minutos en buffer 50 mM fosfato de potasio pH 7,0 con [H₂O₂] 10 mM. La UE se definió como la cantidad de enzima necesaria para descomponer 1 µmol de peróxido por minuto en las condiciones de reacción (pH 7,0; 30°C).

La actividad ascorbato peroxidasa (APX) (EC 1.11.1.11) se determinó por medio de la velocidad de oxidación del ácido ascórbico en presencia de H₂O₂ a 30°C en buffer 50 mM

fosfato de potasio pH 7,0. La oxidación del ascorbato se siguió por medida de la Abs 290 nm utilizando un coeficiente de extinción molar de $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para el cálculo de las UE. La UE se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de ácido ascórbico por minuto en las condiciones de reacción (pH 7,0; 30°C; $[\text{H}_2\text{O}_2]$ 0,5 mM).

La actividad peroxidasa (POX) (EC 1.11.1.7) se determinó por medio de la velocidad de oxidación del guayacol, en presencia de H_2O_2 a 30°C en buffer 50 mM acetato de sodio pH 5,6. La formación de tetra guayacol se siguió por medida de la Abs 470 nm y el coeficiente de extinción molar a 470 nm del mismo utilizado para el cálculo de las UE fue de $26,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La UE se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de guayacol por minuto en las condiciones de reacción (pH 5,6; 30°C; H_2O_2 100 mM).

2.5.6 Análisis estadístico

En relación a las actividades enzimáticas, para establecer diferencias con significación estadística entre grupos de datos o entre pares de datos, se realizaron test de ANOVA y prueba t desapareada (método Holm-Sidak) o test LSD de Fisher, para $\alpha = 0,05$ (se indican los casos que se usó $\alpha = 0,1$) utilizando el software GraphPad Prism 8.0.2. Los cambios en las actividades enzimáticas de las plantas entre tratamientos o días de muestreo se presentan como el $\log_2$ del cociente de las actividades comparadas ($\log_2$ fold change, LFC). Esto permite dar proporcionalidad a los cambios en las actividades lo que da más claridad al análisis de los resultados (actividad sin cambios, LFC=0; duplicada, LFC=1; reducida a la mitad, LFC=-1). En todos los casos se indica si las actividades comparadas presentan diferencias estadísticamente significativas.

CAPÍTULO 3 – EVOLUCIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS BASALES

Como se comentó en la sección 1.1.4, la resistencia de la planta a ciertos patógenos puede variar según su estado de desarrollo. Esta resistencia vinculada a la edad puede estar determinada, entre otros factores, por los niveles en la expresión de genes que codifican PRs, entre ellas algunas peroxidasas, β -1,3-glucanasas y quitinasas. Como antecedente al trabajo de esta tesis, se generaron resultados acerca de la adquisición de resistencia en *A. cepa* y *A. fistulosum* a la podredumbre basal causada por *Fusarium* (FBR) en las primeras etapas de desarrollo de las plántulas. Se observó que plantines de 7, 14 y 42 días de edad no eran susceptibles, mientras que plantines expuestos al patógeno desde la siembra sí lo eran (Figura 3.1), mostrando *A. fistulosum* mayores niveles de resistencia que las variedades de *A. cepa* Pantanoso y Brava [34].

Con el fin de analizar el rol de las enzimas en estudio con esta temprana adquisición de resistencia, en esta tesis evaluamos la evolución de sus actividades durante la germinación en *A. cepa* variedad Pantanoso y *A. fistulosum*. En forma complementaria a estos estudios, se evaluó la evolución de estas actividades durante el ciclo de cultivo de distintas variedades de *A. cepa*, dado que *F. oxysporum* y *B. squamosa* afectan el cultivo de cebolla en distintos momentos de su desarrollo [11], [12]. En este capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos.

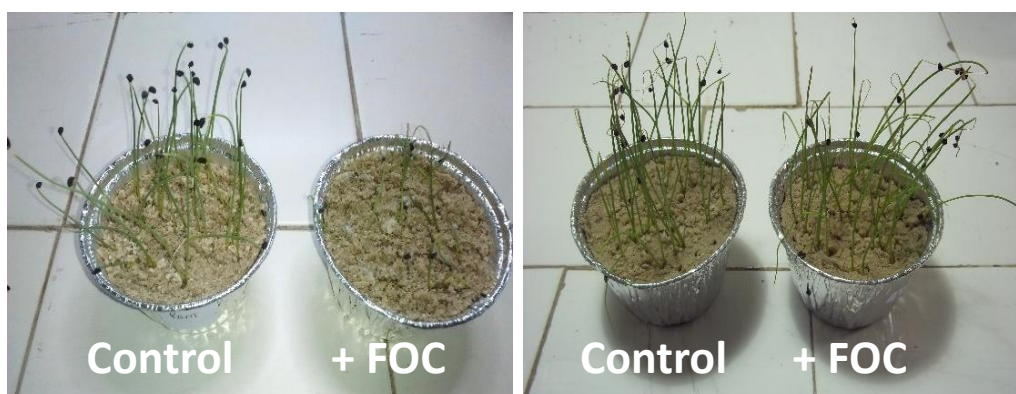


Figura 3.1 Efecto de la exposición a *F. oxysporum* sp. *cepae* (FOC) en plantines de *A. cepa* var. Pantanoso al enfrentarlos a la siembra (izquierda) o 7 días después de sembrados (derecha).

3.1 Porcentaje de germinación y tasa de crecimiento

Como se indica en la sección 2.1.1, para los estudios de germinación se utilizaron semillas de *A. cepa* variedad Pantanoso del Sauce (en adelante Pantanoso), y la accesión UR 13005 de *A. fistulosum* (en adelante *A. fistulosum*)

3.1.1 Porcentaje de germinación

A. fistulosum mostró una germinación más temprana que *A. cepa* variedad Pantanoso (Figura 3.2). A los 2 días de puestas a germinar, 48% de las semillas de *A. fistulosum* habían germinado, mientras que el porcentaje fue menor a 4% para Pantanoso. A los 4 días habían germinado en torno al 90% de las semillas de *A. fistulosum* y el 97% de Pantanoso (Tabla 3.1, Figura 3.3). El mayor porcentaje de germinación de Pantanoso a partir del día 4 mostró una mejor calidad en el lote de semillas utilizadas respecto de las de *A. fistulosum* a pesar de lo cual estas últimas presentaron un mejor vigor como se describe en la siguiente sección.

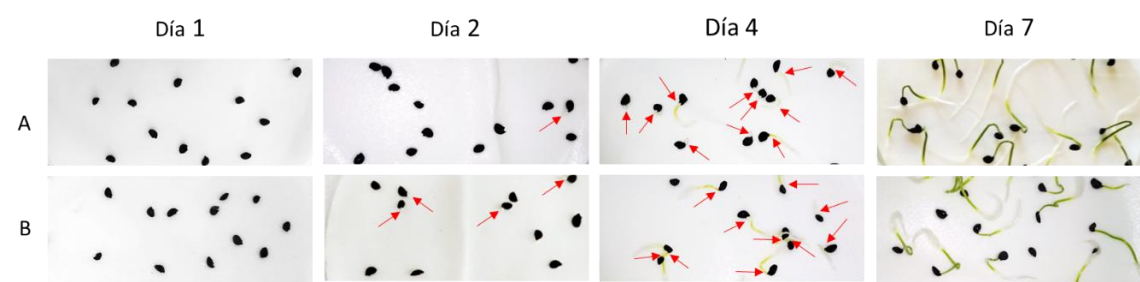


Figura 3.2. Germinación de semillas de *A. cepa* var. Pantanoso (A) y *A. fistulosum* (B) entre los días 1 y 7. Se muestran secciones de placas a modo ilustrativo. Para los días 2 y 4 se indica con flechas la emergencia de la radícula.

Tabla 3.1. Evolución del porcentaje de germinación de *A. cepa* variedad Pantanoso y *A. fistulosum* entre los días 1 y 7.

Especies	Día 1		Día 2		Día 4		Día 7	
	% ^a	σ	% ^a	σ	% ^a	σ	% ^a	σ
<i>A. cepa</i> var. Pantanoso	1,0	1,7	3,7	2,5	97,0	0,0	99,7	0,6
<i>A. fistulosum</i>	0,0	0,0	48,0	9,2	87,5	3,7	92,7	1,2

^a Promedio de porcentajes obtenidos de tres repeticiones. En negrita se destacan porcentajes con diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0,05$) entre ambas especies. σ es el desvío estándar de los promedios. En Anexo 3.I se presentan los resultados de todas las repeticiones y el análisis estadístico.

3.1.2 Tasa de crecimiento

La Tasa de Crecimiento Relativo (RGR) fue calculada en base al peso fresco de los plantines evaluado entre los días 1 y 7 (Tabla 3.2). Las variaciones entre el día 0 y 1 no se consideraron dado que el aumento de peso en ese lapso se debe mayoritariamente a la imbibición de las semillas. Se asumió un modelo de crecimiento exponencial donde el valor de RGR corresponde al del parámetro k expresado en días^{-1} . Ese valor fue de 0,18 para *A. cepa* variedad Pantanoso y 0,21 para *A. fistulosum* lo que indica un crecimiento más rápido en esta última especie. El tiempo de duplicación del peso de los plantines fue de 3,8 y de 3,2 días respectivamente. Los R cuadrado, que indican cuánto se ajustan los datos al modelo de crecimiento exponencial, fueron de 0.9693 y 0.9764 respectivamente (Figura 3.3).

Comparando las RGR de ambas especies por Prueba F, el valor p fue de 0,0722. Si se comparan los valores de RGR utilizando el Criterio de Información de Akaikeⁱⁱ, es más probable que las RGR sean diferentes (59%) a que sean iguales (41 %). Por tanto, se puede afirmar que *A. fistulosum* crece a una tasa mayor que *A. cepa* variedad Pantanoso.

Varios autores han reportado una relación negativa entre el tamaño de las semillas y las RGR en varios grupos de plantas [110]. Esto se confirma en nuestro caso de estudio. Las semillas de *A. fistulosum* pesaron menos que las de *A. cepa* var Pantanoso (2,1 y 4,1 mg respectivamente, ver Anexo 3.II), mientras que la RGR de la primera especie fue mayor que la de la segunda.

Tabla 3.2. Peso de plantines de *A. cepa* variedad Pantanoso y *A. fistulosum* entre los días 1 y 7.

Especies	Día 1		Día 2		Día 4		Día 7	
	mg/pl ^a	σ	mg/pl ^a	σ	mg/pl ^a	σ	mg/pl ^a	σ
<i>A. cepa</i> var. Pantanoso	7,0	0,4	7,3	0,3	9,2	0,2	18,2	0,2
<i>A. fistulosum</i>	3,8	0,2	4,3	0,2	5,6	0,3	12,1	0,5

^a Promedio de peso fresco obtenido de tres repeticiones. σ es el desvío estándar de los promedios. En Anexo 3.II se presentan los resultados de todas las repeticiones y del análisis estadístico.

ⁱⁱ https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/curve-fitting/REG_Comparing_Models_Tab.htm

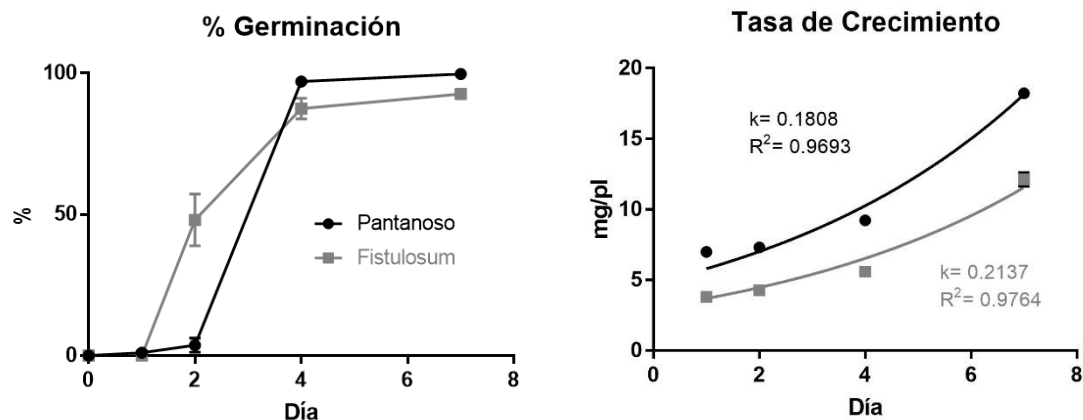


Figura 3.3. Evolución del porcentaje de germinación y Tasa de Crecimiento Relativo de *A. cepa* variedad Pantanoso del Sauce (Pantanoso) y *A. fistulosum* (Fistulosum). En el gráfico de la derecha el valor de k corresponde a la Tasa de Crecimiento Relativo (RGR); R^2 indica qué tanto se ajustan los datos al modelo de crecimiento exponencial.

La velocidad de germinación y de crecimiento de los plantines en sus primeras etapas de desarrollo se vinculan al **vigor de las semillas** (mencionado también como vigor de los plantines por algunos autores). Una definición ampliamente aceptada del vigor es la suma total de las propiedades de la semilla que determinan su nivel de actividad y rendimiento durante la germinación y la emergencia de la plántula. El vigor está relacionado al éxito que tendrá un lote de semillas en el establecimiento de plántulas en la amplia gama de condiciones ambientales que se dan a nivel de cultivo, y viene determinado por la interacción de componentes genéticos y ambientales. La madurez de la semilla al momento de la cosecha y su posterior manipulación, en particular su clasificación y almacenamiento, también influyen en el vigor de la semilla, aspectos ampliamente estudiados por la industria semillera.

Menos atención se ha prestado a los componentes genéticos del vigor que, sin embargo, también son determinantes [118]. En general, para testear el vigor de un lote de semillas se toman en consideración tres características principales: la velocidad de germinación, el crecimiento descendente de la radícula y el ascendente de los brotes (estos últimos determinantes de la RGR). Taylor *et. al* [21] reportaron, en un estudio con varias accesiones de cebolla y especies emparentadas (entre ellas *A. fistulosum*), una correlación parcial entre el vigor de los plantines (en particular la tasa de crecimiento de las radículas) y la resistencia a FBR. Observaron que aquellas accesiones que

presentaban mayor velocidad de crecimiento de sus raíces eran, en general, más resistentes a FBR; lo mismo observaron con el % de germinación pero con una correlación más débil y evaluado a las 3 semanas de puestas a germinar [21]. En nuestro trabajo, comprobamos que *A. fistulosum* presenta una mayor velocidad de germinación y una mayor tasa de crecimiento relativa que *A. cepa* variedad Pantanoso, lo que podría vincularse también a la adquisición más temprana de resistencia a FBR, como se observó en los estudios que anteceden a este trabajo [34].

3.2 Evolución de las actividades enzimáticas basales durante la germinación de *A. cepa* y *A. fistulosum*

A continuación, se presentan los resultados de la evaluación de las actividades enzimáticas durante la germinación de *A. fistulosum* y *A. cepa* variedad Pantanoso. Las muestras analizadas fueron colectadas los días 0 (semillas), 1, 2, 4 y 7 luego de puestas a germinar. Para la actividad POX se presenta la evolución del perfil de isoformas por análisis de IEF.

3.2.1 Evolución de la actividad POX

La actividad peroxidasa (POX) mostró aumentos más rápidos y marcados en *A. fistulosum* que en *A. cepa* (Tabla 3.3, Figura 3.4). En el total del período evaluado (de 0 a 7 días), la actividad POX se duplicó 4,6 veces en Pantanoso y 6,5 veces en *A. fistulosum*. En el gráfico de la izquierda de la Figura 3.4 se presenta la evolución de los niveles de actividad POX en ambas especies y en el de la derecha los cambios de esa actividad en cada período, expresados como LFC (ver sección 2.5.6). El expresar los cambios de esta forma permite darles proporcionalidad y visualizarlos con mayor claridad. En los períodos del día 1 al 2 y del día 2 al 4, *A. fistulosum* mostró valores de LFC superiores a los de *A. cepa* con la diferencia más marcada entre los días 2 y 4. Entre los días 4 y 7 los aumentos fueron mayores en *A. cepa*. En cuanto al nivel de actividad, este fue mayor en *A. cepa* en la semilla y en los días 1 y 2; al día 4 la actividad en *A. fistulosum* fue mayor, aunque sin significancia estadística y al día 7 la actividad en ambas especies fue similar.

Tabla 3.3. Evolución de las actividades enzimáticas en plantines de *A. cepa* variedad Pantanoso y *A. fistulosum* entre los días 0 y 7.

AE ^a	Especies	Día 0			Día 1		Día 2		Día 4		Día 7	
		UE/g ^b	UE/g	LFC ^c	UE/g	LFC	UE/g	LFC	UE/g	LFC	UE/g	LFC
POX	Pantanoso ^d	1,2*	2,0*	0,7	2,7*	0,4*	9,5	1,8*	28,9	1,6*		
	<i>A. fistulosum</i>	0,3*	0,4*	0,3	1,0*	1,5*	15,9	4,0*	27,8	0,8*		
GLU	Pantanoso	0,1	0,7	2,6	0,6	-0,4	7,8*	3,8*	19,1	1,3*		
	<i>A. fistulosum</i>	0,1	0,7	1,6	0,5	-0,9	14,2*	4,9*	18,6	0,4*		
QUIT	Pantanoso	48	63	0,4	63	0	45*	-0,5*	37*	-0,3		
	<i>A. fistulosum</i>	50	54	0,1	53	0	75*	0,5*	66*	-0,2		

^a Actividad enzimática. POX, Peroxidasas; GLU, Glucanasas; QUIT, Quitinasas. ^b Unidades de Enzima por gramo de tejido liofilizado (UE/g). ^c LFC, es el log₂ del cociente de la actividad enzimática sobre la del día anterior de muestreo. ^d Refiere a *A. cepa* variedad Pantanoso del Sauce. Para cada día se indican con asterisco valores de UE/g y LFC con diferencias estadísticamente significativas ($\alpha=0.05$) entre ambas especies. En negrita se indican para cada especie valores de UE/g que presentan diferencias estadísticamente significativas respecto del día anterior de muestreo y sus respectivos LFC. En Anexo 3.III se presentan los resultados de todas las repeticiones y del análisis estadístico.

En lo que refiere al **perfil de isoformas de POX**, entre los días 0 al 2 no se observaron variaciones en ambas especies, predominando las isoformas ácidas. Cuando se las compara, se observa que *A. fistulosum* presenta mayor variedad de isoformas. Ambas especies presentan isoformas de pl 4,8; 4,9 y 5,85, Pantanoso presenta además una isoforma de pl 5,2, mientras que *A. fistulosum* presenta isoformas de pl 5,7; 6,1; 6,2 y una isoforma neutra de pl 7,0 (Figura 3.5, carriles 0).

Peroxidasas

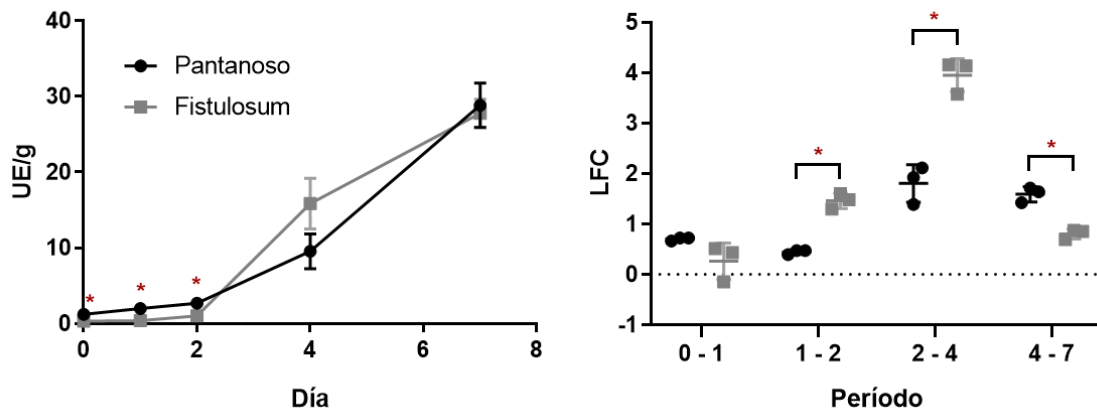


Figura 3.4. Evolución de la actividad POX en plantines de *A. cepa* variedad Pantanoso (Pantanoso) y *A. fistulosum* (Fistulosum) entre los días 0 y 7. Izquierda: Nivel de actividad POX para los distintos días de muestreo. Derecha: Cambios en la actividad POX respecto del día anterior de muestreo expresados como el $\log_2$ del cociente de las actividades comparadas (LFC). Se indica con asterico diferencias estadísticamente significativas ($\alpha=0.05$) entre ambas especies.

Al día 4, cuando comienza a emerger el cotiledón, ambas especies mantienen la actividad de las isoformas ácidas, pero comienzan a expresarse isoformas básicas. En Pantanoso se observa una banda de pl 8,2 y otra muy tenue de pl 7,55 que también aparece en *A. fistulosum*. En esta última especie, en lugar de una isoforma de pl 8,2 aparece una de pl 8,0 y ya no se observa la isoforma de pl 7,0 (Figura 3.5, carriles 4).

Para el día 7 se analizaron por separado cotiledones y radículas (Figura 3.5, carriles indicados como 7H y 7R, respectivamente). Se observa que en los cotiledones sólo se expresan isoformas básicas. En Pantanoso, a la isoforma de pl 8,2 observada al día 4 se suma una de pl 8,45. En *A. fistulosum*, a las isoformas de pl 7,55 y 8,0 se suman las de pl 7,35 y 8,5. En las radículas es donde se observa actividad de isoformas ácidas, pero con menos diversidad que al día 4; en ambas especies se observaron las mismas POX de pl 4,8; 5,1 y 6,75, esta última se visualiza no como una banda definida, sino que corre en forma difusa o borrosa (fenómeno que en inglés se define como smear band) lo que causa dificultades a la hora de asignación del valor de pl de la banda central (más adelante se discute sobre este efecto). En cuanto a las isoformas básicas, las radículas de ambas especies mantienen la actividad de las isoformas observadas al día 4 pero en el caso de *A. fistulosum* se suma una de pl 7,25.

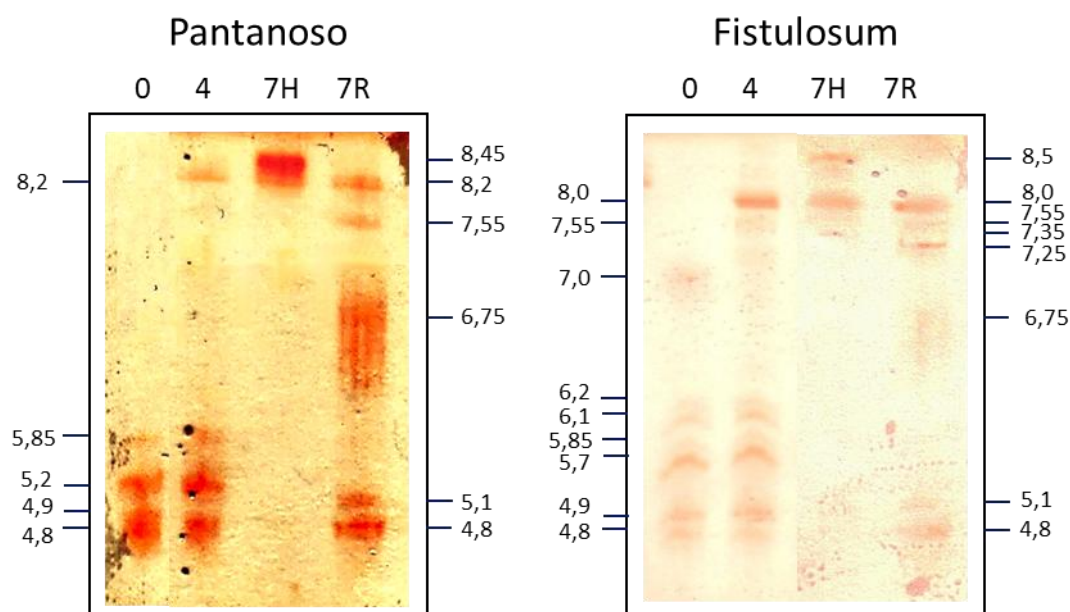


Figura 3.5. Perfiles de isoformas de POX obtenidos mediante zimogramas basados en isoelectroenfoque. Se presentan los resultados para extractos obtenidos de semillas (0), plantines de 4 días (4) y de cotiledones y radículas de plantines de 7 días (7H y 7R, respectivamente). Para cada especie se presentan los pI de POX presentes en: a la izquierda semillas y plantines de 4 días; a la derecha cotiledones y radículas de plantines de 7 días.

Observados en su conjunto, estos resultados muestran importantes cambios en el perfil de POX expresadas por ambas especies en sus primeras etapas de desarrollo. Destaca el hecho de que las isoformas básicas comienzan a expresarse una vez emerge el cotiledón teniendo presencia luego en radículas y cotiledones con algunas isoformas presentes en ambos órganos y otras, siendo particulares de cada uno. En cuanto a las isoformas ácidas la diversidad observada en semillas y en la etapa previa a la emergencia del cotiledón, disminuye luego y su presencia se restringe a la radícula. Estos cambios son esperables y probablemente asociados a la diversidad de roles que juegan las POX (ó más bien sus isoformas) durante el desarrollo de la planta [72]. En particular, las isoformas ácidas excretadas al espacio extracelular juegan roles importantes en las primeras etapas de la germinación, tanto en la defensa ante el ataque de patógenos, como en la escisión de los compuestos de la pared celular alrededor de la zona de protrusión de la radícula [71], [119].

Se ha reportado que variedades susceptibles y resistentes de algunas especies de plantas difieren en las isoformas de POX que expresan [83], [84]. Tomando esto en

cuenta, la diferencia de perfiles observados en semillas de *A. cepa* variedad Pantanoso y *A. fistulosum* podría ser una de las razones por las cuales ambas especies presentan distinta susceptibilidad a cepas virulentas de FOC cuando son inoculadas a la siembra. En particular las semillas de *A. fistulosum* presentan una POX de pl 7,0 que está ausente en *A. cepa*. En el mismo sentido, el cambio en el perfil de isoformas a partir del día 4 en ambas especies podría estar vinculado a la temprana adquisición de resistencia a FOC. Es de destacar que a partir del día 4 ambas especies comienzan a expresar isoformas básicas de POX que presentan actividad en las radículas al día 7, por lo que éstas podrían estar implicadas en la adquisición de resistencia vinculada al desarrollo de la planta.

3.2.2 Evolución de la actividad GLU

La actividad β -1,3-glucanasa (GLU) mostró actividades similares en ambas especies durante el período evaluado a excepción del día 4 cuando la actividad en *A. fistulosum* fue significativamente mayor que en *A. cepa* (Tabla 3.3, Figura 3.6). Hasta el día 2 no hubo cambios significativos de esta actividad en ambas especies, a diferencia de la actividad POX que mostró aumentos significativos entre los días 1 y 2. Sin embargo, en los períodos entre los días 2 a 4 y 4 a 7, el comportamiento de la actividad GLU fue similar a la de la POX en ambas especies. Entre los días 2 y 4 se observó un aumento de la actividad que fue de mayor en *A. fistulosum*, con un LFC de 5,0 mientras que en *A. cepa* ese valor fue de 3,8. Entre los días 4 y 7 el aumento en la actividad GLU fue mayor en *A. cepa* de forma que al día 7 la actividad en ambas especies fue similar.

3.2.3 Evolución de la actividad QUIT

La actividad quitinasa (QUIT) presentó valores similares en ambas especies hasta el día 2 (Tabla 3.3, Figura 3.6). La única variación estadísticamente significativa en ese período se observó en *A. cepa* que aumentó su actividad entre los días 0 y 1, sin embargo, el LFC de esta variación no fue estadísticamente distinto al observado en *A. fistulosum*. Entre los días 2 y 4 esta actividad disminuyó en *A. cepa* y aumentó en *A. fistulosum* en la misma proporción. Entre los días 4 y 7 no se observan cambios estadísticamente significativos en ambas especies por lo que la actividad QUIT en *A. fistulosum* fue mayor a la de *A. cepa* desde el día 4 hasta el final del período evaluado.

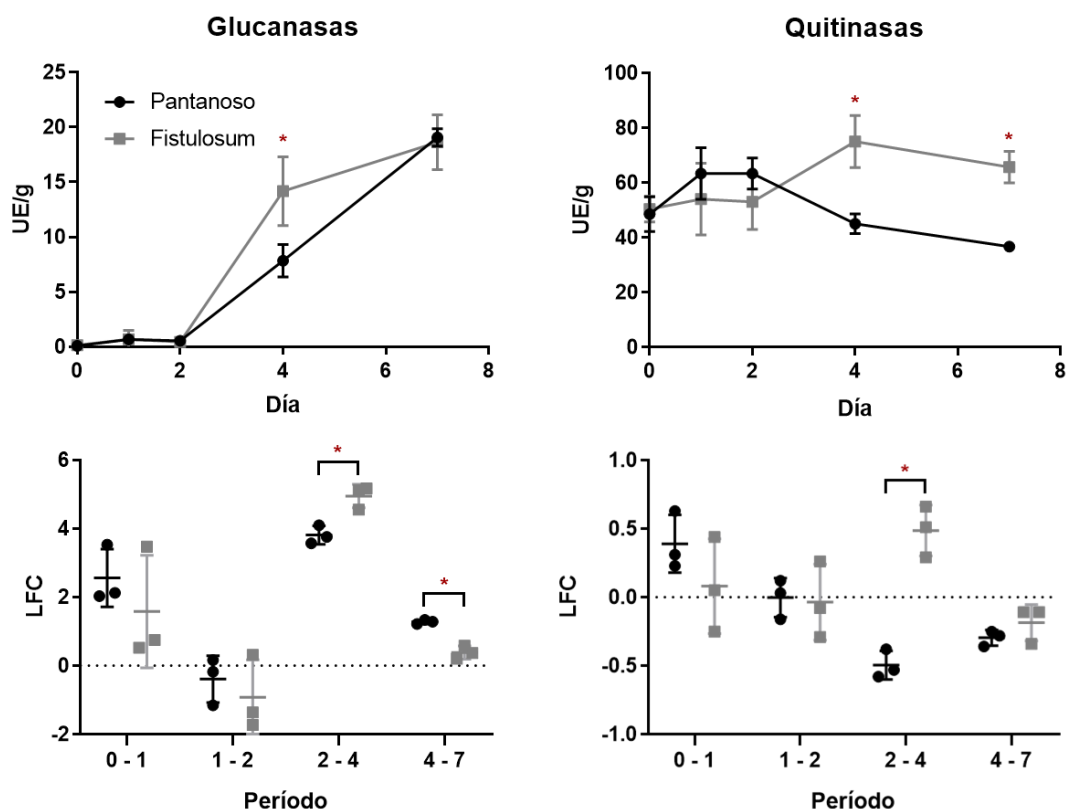


Figura 3.6. Evolución de las actividades GLU y QUIT en plantines de *A. cepa* variedad Pantanoso (Pantanoso) y *A. fistulosum* (Fistulosum) entre los días 0 y 7. Izquierda: Actividad glucanasa. Derecha: Actividad Quitinasa. Arriba: Actividades expresadas como UE/g correspondientes a cada momento de muestreo. Se presenta el promedio de tres repeticiones con su desvío estándar. Abajo: Cambios en las actividades en el período indicado expresados como el $\log_2$ del cociente de las actividades comparadas (LFC). Se indica con asterico diferencias estadísticamente significativas ($\alpha=0.05$) entre ambas especies.

3.2.4 Diferencias entre *A. cepa* y *A. fistulosum*

Mirados en su conjunto, estos resultados muestran que *A. fistulosum* presenta aumentos más marcados que *A. cepa* en las actividades enzimáticas evaluadas, en los primeros 4 días de desarrollo de la plántula. En particular durante el período entre los días 2 y 4 luego de puestas a germinar, las plántulas de *A. fistulosum* mostraron mayores incrementos y niveles de actividad para las tres actividades en comparación con las de *A. cepa* variedad Pantanoso (Tabla 3.3). El aumento más temprano en las actividades POX, GLU y QUIT en plántulas de *A. fistulosum* en comparación con *A. cepa*, junto a diferencias en los perfiles de isoformas de POX, podrían vincularse a sus mayores niveles de resistencia frente a FOC a la siembra, ya reportados.

Más allá de su posible rol en procesos fisiológicos vinculados a la adquisición de resistencia, estas actividades enzimáticas están implicadas en los mecanismos de desarrollo y crecimiento de la planta [72], [91], [97] por lo que las diferencias en su evolución podrían vincularse también a la mayor velocidad de germinación y tasa de crecimiento observadas en *A. fistulosum* en comparación con *A. cepa* variedad Pantanoso.

3.3 Evolución de las actividades enzimáticas basales durante el ciclo de cultivo en *A. cepa*.

Como se describe en la Sección 2.2, con el propósito de determinar cambios en actividades de enzimas vinculadas a la patogénesis durante el desarrollo de plantas adultas de *A. cepa*, se colectaron muestras de cuatro variedades de cebolla. Además de Pantanoso del Sauce, se tomaron muestras de las variedades Brava, INIA Casera e INIA Naqué. Las colectas se realizaron en siete fechas durante una zafra del cultivo. Las fechas de muestreo y edad de las plantas se describen en la Tabla 2.1. En la Figura 3.7 se presenta un esquema del ciclo de cultivo donde se indican los momentos de muestreo de cada variedad. El estado de desarrollo de las plantas en cada fecha de muestreo se ve influenciado además de por la edad, por el tipo de ciclo de cada variedad para alcanzar la bulbificación, siendo INIA Casera e INIA Naqué semi-tempranas, Pantanoso semi-tardía y Brava tardía.

Las actividades enzimáticas fueron analizadas por separado en los distintos órganos de la planta (raíz + plato basal; falso tallo; y hojas) (Figura 3.8). Además de las actividades POX, GLU y QUIT, se analizó la actividad N-acetil- β -glucosaminidasa (NAG). En el Anexo 3.IV se presentan tablas con los resultados de las actividades analizadas. Para facilitar su análisis en esta sección se los presenta en forma de gráficos (Figura 3.9). Si bien se presenta en todos los casos la línea de mejor ajuste por regresión lineal, en muchos casos no se encontró una correlación estadísticamente significativa entre las variaciones en la actividad enzimática y la edad de la planta (la probabilidad de que un valor distinto de 0 del coeficiente de correlación de Pearson se deba al azar fue mayor a 0.05). En los casos en que esta correlación fue significativa ($\alpha=0.05$) se indica el valor del coeficiente de correlación de Pearson (r) como indicador de que tan dependiente es la actividad enzimática, de la edad de la planta.

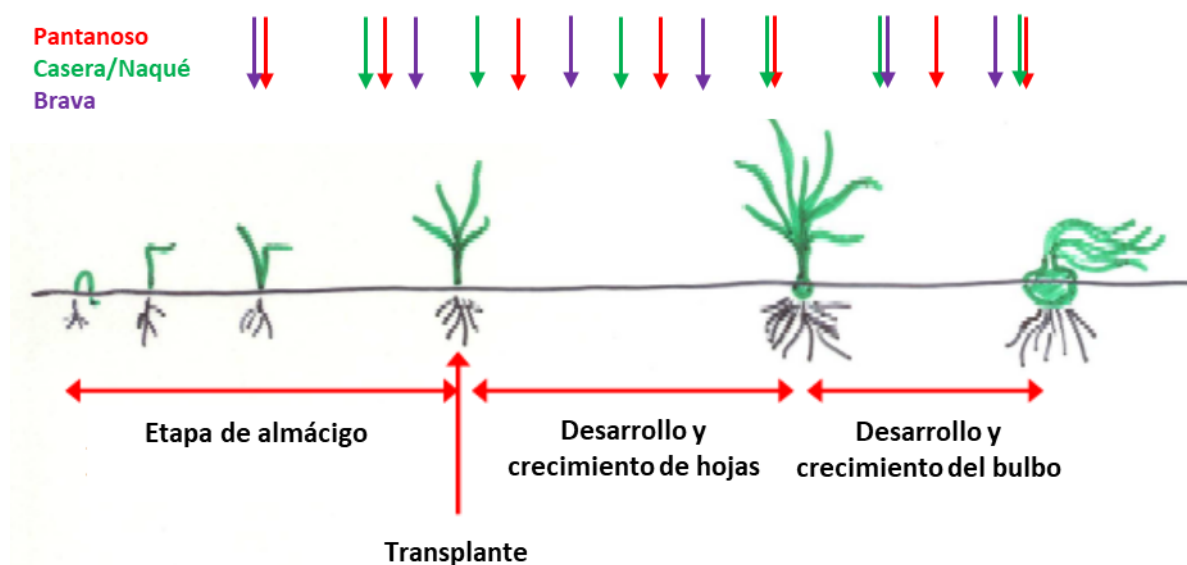


Figura 3.7. Esquema de la fase vegetativa del desarrollo de la cebolla correspondiente a un ciclo de cultivo. Las flechas indican el estado aproximado de desarrollo en que se encontraban las plantas al momento del muestreo. Cada color indica una variedad diferente salvo el verde que corresponde a INIA Casera e INIA Naqué dado que fueron sembradas y transplantadas en las mismas fecha, además de presentar ciclos similares (semi-tempranas). (Adaptado de [120])

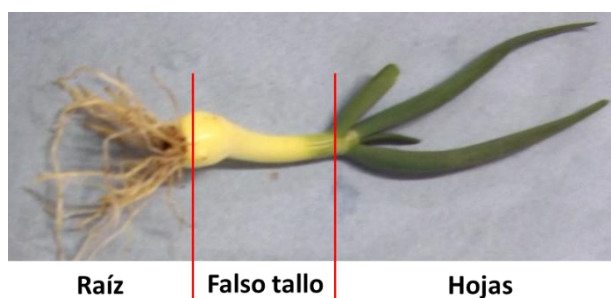


Figura 3.8. Planta de *A. cepa* variedad Pantanoso de 146 dds. Se indican las secciones de la planta que fueron analizadas por separado. Raíz incluye al plato basal (tallo verdadero).

3.3.1 Evolución de las actividades según órgano de la planta

Cuando se observa su evolución en los distintos órganos, en las raíces fue donde se encontró menor correlación entre las variaciones de las actividades enzimáticas y la edad de la planta. Los casos en que se encontró correlación significativa fueron para las actividades QUIT y GLU en algunas de variedades. La actividad QUIT aumentó significativamente en raíces de Pantanoso e INIA Casera. La actividad GLU mostró una disminución significativa en las raíces de INIA Naqué y Brava, aunque con valores de r moderados. Para las actividades POX y NAG no se encontró correlación para ninguna de las variedades.

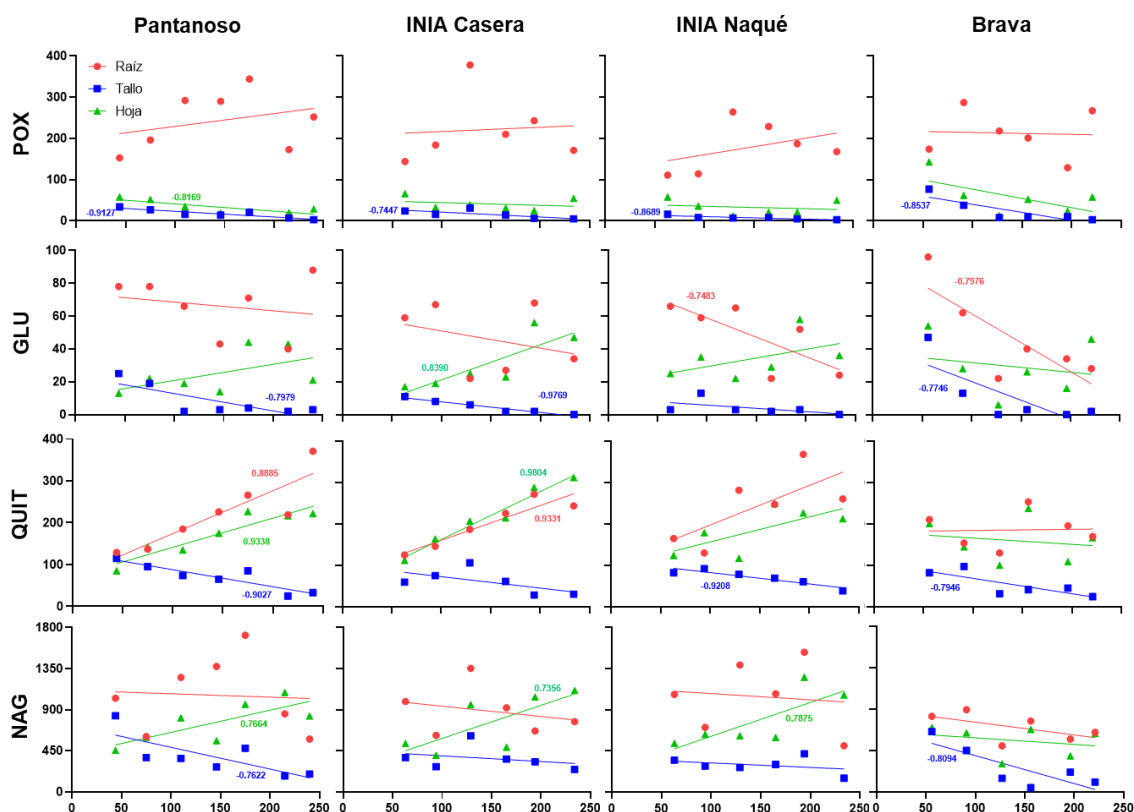


Figura 3.9. Evolución de las actividades POX, GLU, QUIT y NAG durante el ciclo de cultivo de cuatro variedades de *A. cepa* (Pantanosos, INIA Casera, INIA Naqué y Brava). Para cada actividad y variedad se presentan los resultados de los tres órganos analizados (Raíz, Tallo y Hoja). Para cada gráfico el eje de las ordenadas corresponde a la actividad enzimática expresada en UE/g y el eje de las abscisas a la edad de las plantas en dds. Para cada serie de datos se presenta la línea de mejor ajuste obtenida por regresión lineal y se indica el coeficiente de correlación de Pearson (r) cuando es estadísticamente significativo ($\alpha=0.05$).

Al momento del muestreo fue inevitable que se produjeran roturas de raíces lo que agrega un factor más de variabilidad en las actividades enzimáticas analizadas. En particular, se ha reportado que POX y GLU están asociadas a la reparación de daños en los tejidos de varias especies de plantas [91], [119] por lo que sus actividades pudieron verse afectadas.

En el falso tallo los niveles de actividades enzimáticas disminuyen a medida que la planta se desarrolla. Esta relación negativa fue generalizada para todas las actividades y variedades, aunque en algunos casos no fue estadísticamente significativa (QUIT y NAG en INIA Casera; GLU y NAG en INIA Naqué). Este resultado puede explicarse fundamentalmente porque las células de la vaina de las hojas que forman el falso tallo

se van elongando y acumulando carbohidratos de reserva a medida que avanza el ciclo del cultivo para dar lugar a la formación del bulbo. El bulbo es un órgano de reserva con baja actividad metabólica, con lo que la relación entre la actividad enzimática y el peso seco disminuye. De todas formas, mientras las actividades POX y GLU son prácticamente nulas al final del ciclo en los bulbos de las cuatro variedades, las actividades QUIT y NAG tienen reducciones menos drásticas y mantienen actividad (Anexo 3.IV), por lo que la actividad quitinasa podría jugar un rol en el mantenimiento del bulbo como estructura de conservación y resistencia.

En las hojas, la actividad POX mostró una tendencia decreciente, pero con correlación significativa sólo para la variedad Pantanoso. Para todas las variedades, en la última fecha de muestreo, la actividad POX aumentó en hojas respecto de la fecha anterior de muestreo. Esto probablemente se deba a que las hojas, en esta etapa de maduración del bulbo, han dejado de crecer e iniciado su proceso de senescencia, proceso en el cual se ha reportado la implicancia de la actividad POX en otras especies de plantas [72], [119]. Al igual que en las raíces, la actividad QUIT en hojas aumentó consistentemente en Pantanoso e INIA Casera con valores de r cercanos a 1, mostrando INIA Naqué un comportamiento similar, pero sin significancia estadística. La actividad NAG también se correlacionó positivamente con la edad de la planta en hojas de estas tres variedades.

La actividad GLU también mostró una tendencia a aumentar, pero la correlación fue significativa sólo para INIA Casera.

3.3.2 Diferencias en la evolución de las actividades en las variedades de cebolla

La evolución de la actividad POX durante el ciclo de cultivo fue similar en las cuatro variedades evaluadas en todos los órganos como se comenta en la sección anterior. Para las actividades GLU, QUIT y NAG, su evolución presentó patrones similares en Pantanoso, INIA Casera e INIA Naqué en los distintos órganos observándose diferencias con la variedad Brava. Mientras que en las hojas de Brava no se encontró correlación entre la edad de la planta y las actividades GLU, QUIT y NAG, en las otras tres variedades estas correlaciones fueron positivas, aunque en algunos casos no tuvieron significancia estadística, particularmente en lo que respecta a la actividad GLU. En las raíces, las diferencias respecto a la actividad QUIT fueron las mismas que las observadas en hojas;

Brava no muestra correlación mientras que en las otras tres variedades esta actividad aumenta con la edad de la planta.

De las cuatro variedades evaluadas, Brava es la única de ciclo largo (tardía) y, según un estudio de caracterización fenotípica realizado por Boschi [121], es la que presenta mayores diferencias respecto de las otras tres. Otra diferencia relevante es que mientras Pantanoso, INIA Casera e INIA Naqué presentan tolerancia a *B. squamosa* [12], Brava es más susceptible a este patógeno. Las diferencias en los patrones de evolución de QUIT y NAG en las hojas de esta variedad con relación a las demás, podrían contribuir a explicar su mayor susceptibilidad a este patógeno. Para visualizar mejor estas diferencias, en la Figura 3.10 se presentan la evolución de las actividades QUIT y NAG en hojas de las cuatro variedades evaluadas. En las primeras dos fechas de muestreo, cuando las plántulas tenían menos de 100 dds y estaban en fase de crecimiento aún en almácigo, las actividades QUIT y NAG son similares en las cuatro variedades. En las últimas dos fechas de muestreo, cuando las plantas tenían más de 190 días y estaban en la etapa de desarrollo y crecimiento de los bulbos, Brava presentó niveles basales más bajos en esas actividades que las otras variedades.

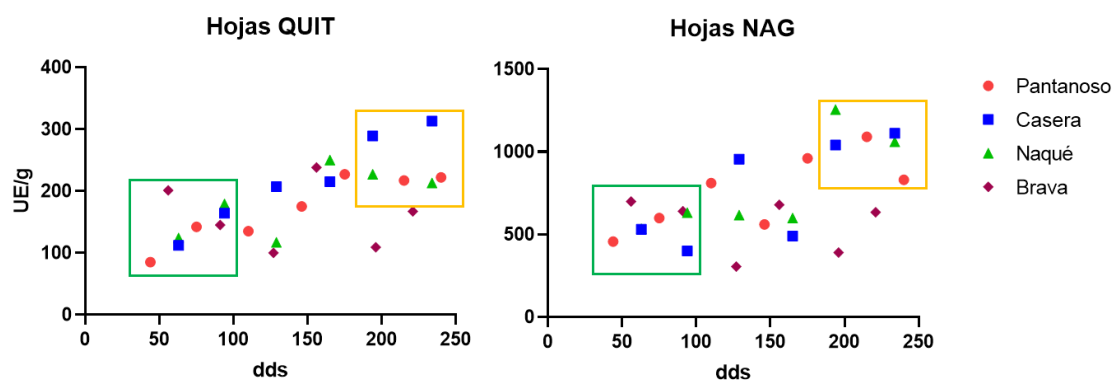


Figura 3.10. Evolución de las actividades QUIT y NAG durante el ciclo de cultivo en hojas de cuatro variedades de *A. cepa* (Pantanoso, INIA Casera, INIA Naqué y Brava). Para cada gráfico el eje de las ordenadas corresponde a la actividad enzimática expresada en UE/g y el eje de las abscisas a la edad de las plantas en dds. Los recuadros verdes contienen las actividades de cada variedad en la etapa de almácigo. Los recuadros amarillos tienen, en cada gráfico, las mismas dimensiones que los verdes y contienen actividades enzimáticas de la etapa de crecimiento del bulbo.

3.3.3 Perfiles de isoperoxidasas durante el ciclo de cultivo

Además de la evolución de los niveles de actividad de las enzimas en estudio durante el ciclo de cultivo, para las POX se determinaron los cambios en el perfil de isoformas siguiendo su actividad mediante zimogramas basados en isoelectroenfoque.

En general se observó que los perfiles y su evolución fue similar en las cuatro variedades evaluadas (Figura 3.11). Durante la germinación se había observado para Pantanoso que, una vez emergido el cotiledón comienzan a observarse actividad de isoformas básicas en el cotiledón y en la radícula, mientras que las isoformas ácidas quedan restringidas a esta última disminuyendo la diversidad observada en la etapa previa (Figura 3.5). Durante el desarrollo de la planta adulta se reafirma la predominancia de las isoformas básicas en todos los órganos quedando restringidas las isoformas ácidas a la raíz o a su expresión transitoria, presumiblemente en respuesta a algún tipo de estrés como se discute más adelante. A medida que avanzó el ciclo las isoformas con pI más cercanos a la neutralidad dejan de expresarse con lo que al final del ciclo predominan las isoformas de pI netamente básicos.

Analizando los cambios en el perfil de isoformas en las distintas etapas de desarrollo de la planta, se observa que la diversidad de isoformas disminuye al final del ciclo cuando se da la formación y crecimiento del bulbo. Esto podría atribuirse en el caso de hojas y falso tallo a los bajos niveles de actividad al final del ciclo, pero lo mismo se observa en raíces donde los niveles de actividad fueron similares o superiores a los de la etapa de almácigo. Durante la etapa de formación y desarrollo del bulbo dejan de crecer nuevas hojas y también se detiene el crecimiento y aparición de nuevas raíces centrándose la acumulación de fotoasimilados en el crecimiento del bulbo [120]. Es de esperar que estos cambios fisiológicos tengan su correlato en el perfil de actividad de las isoformas dado que, como se comentó antes, las POX participan en los procesos de desarrollo de la planta [72], [119]. Una transición importante en este perfil se observa cuando las plantas alcanzan un grado de desarrollo tal que son transplantadas desde los almácigos al cultivo. En las raíces de todas las variedades, en la etapa de almácigo, se observa la presencia de isoformas de pI 6,9 y 7,0 que no se observan luego del transplante y aparecen isoformas de pI 8,2 y 8,4 que estaban ausentes o aparecían muy tenues. En tallo y hojas se da algo similar con isoformas de pI 7,35; 7,55 y 8,2 que dejan de estar

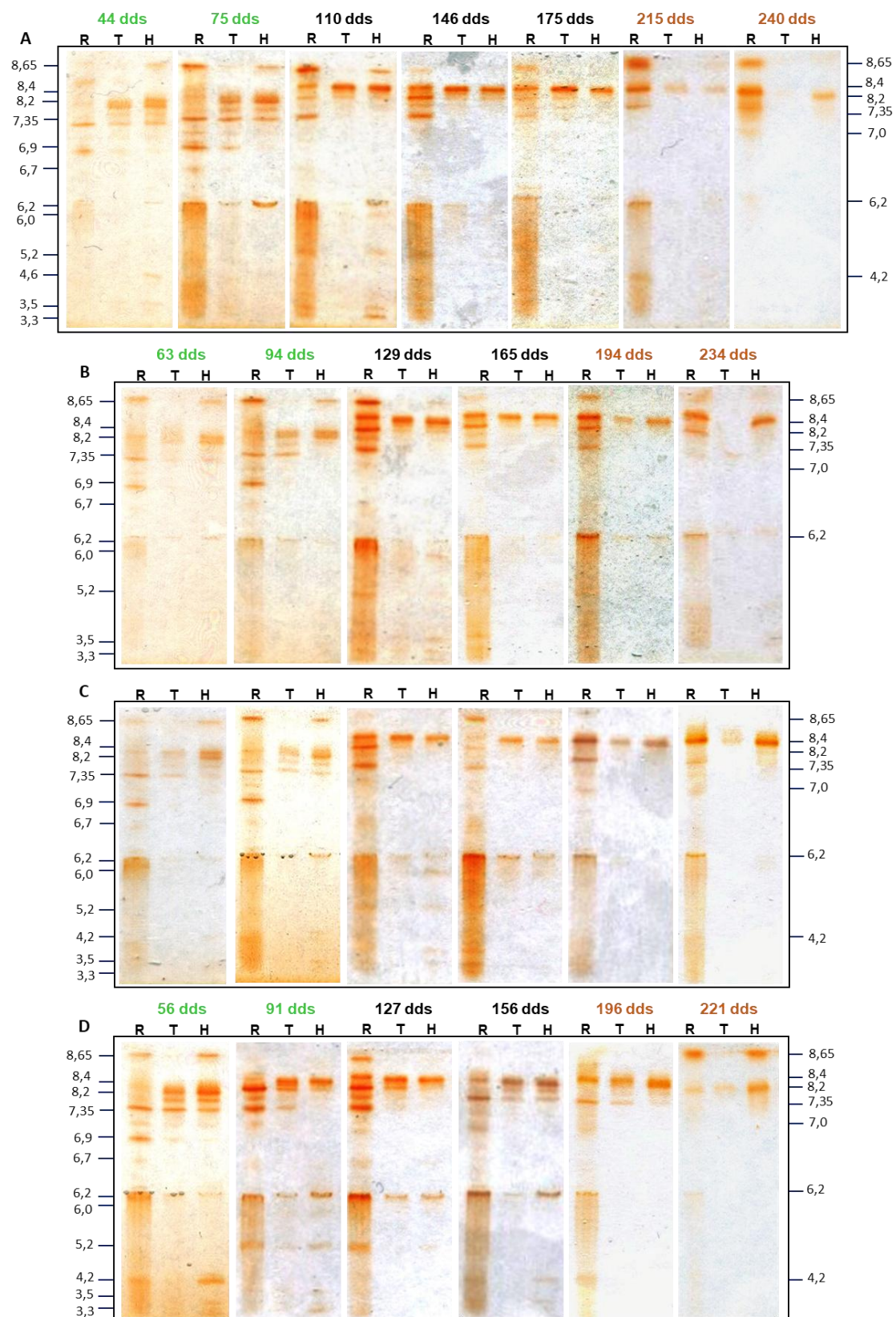


Figura 3.11. Perfiles de isoformas de POX obtenidos mediante zimogramas basados en isoelectroenfoque. A- Pantanos; B- INIA Casera; C- INIA Naqué; D- Brava. Se presentan los resultados de la evolución de los perfiles para cada fecha de muestreo y órgano (R- Raíz; T; Falso

tallos; H- Hoja). La edad de la planta se indica en dds (en verde etapa de almácigo; en negro etapa de crecimiento de las hojas; en marrón etapa de bulbificación). Para B y C la edad de las plantas es la misma en cada fecha de muestreo. A los lados de las figuras se indican valores de pI de la mayoría de las bandas.

presentes luego de la etapa de almácigo, apareciendo una isoforma de pI 8,4 que es la única que perdura en todos los órganos hasta el final del ciclo. Durante la bulbificación no se observan nuevas isoformas, pero deja de estar presente en la raíz la isoforma de pI 8,2, con lo que al final del ciclo no hay más de tres o cuatro isoformas con actividad detectable en toda la planta de un total de 14 isoformas identificadas.

Mención aparte merecen las isoformas ácidas. Se visualizan bandas de pI 3,3; 3,5; 4,2; 5,2 y 6,0 que parecen no responder al estado de desarrollo de la planta sino a estímulos ambientales, dado que no aparecen asociadas a determinada etapa del crecimiento sino en fechas de muestreo puntuales. Por ejemplo, para el muestreo de fecha 9 de agosto, se observan en hojas de plantines de Brava de 91 dds, bandas de pI 3,3; 3,5 y 5,2, esta última también presente en tallos y raíces. En esa misma fecha, en plantas de Pantanoso de 110 dds aparecen esas mismas tres isoformas además de una de pI 6,0 en hojas y raíces; observándose también algunas de estas bandas en raíces y/o en hojas de plantas de las variedades INIA Casera e INIA Naqué de 129 dds. Reafirma la hipótesis de que estas isoformas se pueden haber inducido por estrés biótico el hecho de que en general, las PRs inducidas como respuesta de la planta a este tipo de estrés son ácidas [65]. En particular se ha reportado la inducción de una peroxidasa de pI 3,6 en repollo por la infección con *Xanthomonas campestris*, [84] y una de pI 3,5 en papa por *Phytophthora infestans* [122]. En un trabajo anterior nuestro grupo reportó la inducción de una isoforma de pI 3,65 en hojas de plántulas de Pantanoso expuestas a FOC [34].

Es de mencionar que la banda de pI 6,2 que se observa en casi todos los carriles, coincide con el sitio donde se siembran las muestras en el gel, por lo que en algunos carriles la presencia de una banda en ese pH podría asociarse con que una parte minoritaria de la muestra sembrada quedó en el origen de siembra. Este es un artificio que se observa algunas veces en el sistema electroforético usado en este trabajo (equipo PhastSystem) y por la forma horizontal en que se siembran las muestras. De todas formas, hay carriles

en los que no se observa la presencia de dicha banda (a modo de ejemplo, Figura 3.11, A, carriles T y H, 175dds) por lo que esa banda correspondería a una isoforma de POX.

Por otro lado, en las muestras provenientes de raíces se evidencia que existen isoformas ácidas que no corren como bandas bien definidas, sino que corren en forma difusa ó borrosa (fenómeno que en inglés se define como smear bands). Este comportamiento electroforético a menudo se asocia con la heterogeneidad de la glicosilación de una proteína. En el caso de POX (una glicoproteína) se observa que esta heterogeneidad se asocia más a las isoformas ácidas, en donde la Figura 3.11 muestra claramente la presencia de estas bandas corriendo en forma difusa ó como un fenómeno de arrastre. Esto no se observa para las isoformas básicas de una misma muestra, en donde las bandas son bien definidas. Este fenómeno de difusión de bandas sólo se observa en las muestras provenientes de raíces de las 4 variedades de *A. cepa*, lo que estaría marcando una diferencia a nivel de la glicosilación, con las isoformas presentes en hojas y falso tallo. Adicionalmente comparando con el perfil de Pantanoso en los germinadores, (Figura 3.5) se observa que las isoformas ácidas no presentan un smear tan marcado como el observado en raíces durante el ciclo de cultivo. En dicha figura se ven claramente bandas mucho más definidas para los mismos valores de pI. Esto podría indicar que para estas isoformas ácidas varía el tipo de glicosilación a medida que se desarrolla la planta. Esa variación podría relacionarse con mayor presencia de azúcares cargados negativamente en la glicosilación de las POX en plantas adultas.

En lo que refiere a diferencias en el perfil de isoformas entre las distintas variedades, no se encontraron polimorfismos. Las diferencias se encuentran sobre todo en la edad de la planta a la que se producen los cambios en los perfiles de isoformas. Por ejemplo, en INIA Casera y Brava las isoformas de pI 7,35 y 7,55 dejan de observarse en hojas más tempranamente que en Pantanoso e INIA Naqué. En hojas y falso tallo de Brava se observa actividad de las isoformas de pI 7,55 y 8,2 hasta comenzada la etapa de bulbificación mientras que en el resto de las variedades estas isoformas dejan de detectarse una vez culminada la etapa de almácigo. También en Brava, pero en las raíces, la isoforma de pI 8,4 se observa más tempranamente que en las otras variedades.

Como se comenta en la sección 1.1.2, los estadíos más susceptibles de la cebolla a FOC son las plántulas cuando empiezan a germinar, el bulbo en desarrollo y el bulbo maduro,

en tanto que la planta en crecimiento se ve menos afectada. Del seguimiento de las isoformas de POX durante la germinación se postula que las isoformas básicas presentes en radículas de 7 días (pI 7,55 y 8,2) y ausentes en las semillas podrían estar implicadas en la temprana adquisición de resistencia a este patógeno. Al estado de bulbo, la isoforma que se encuentra ausente en raíces y plato basal (que es por donde el patógeno invade la planta) es la de pI 8,2 por lo que esta isoforma podría contribuir a la resistencia de la cebolla a FOC en la etapa de crecimiento de la planta.

CAPÍTULO 4 – RESPUESTA DE *A. CEPA* Y *A. FISTULOSUM* A *F. OXYSPORUM*

En la sección 1.1.2 se describió cómo la podredumbre basal causada por *Fusarium spp.* (FBR) afecta al cultivo de cebolla y en la sección siguiente se comentaron aspectos vinculados a las fuentes de resistencia en especies emparentadas como *A. fistulosum*. Se comentó además que nuestro grupo publicó resultados acerca de la respuesta de *A. cepa* y *A. fistulosum* frente a *Fusarium oxysporum f. sp. cepae* (FOC) reportando que *A. fistulosum* se comportaba más resistente que *A. cepa* frente a las cepas más virulentas del patógeno [34]. En aquel trabajo se evaluaron plantas luego de 14 días de ser expuestas al patógeno determinándose las variaciones en las actividades POX, GLU y QUIT. Las actividades enzimáticas no pudieron evaluarse para las plantas de *A. cepa* expuestas desde la siembra a las cepas más virulentas dado que fueron devastadas por el patógeno.

Con el objetivo de estudiar la evolución de la respuesta de *A. cepa* y *A. fistulosum* frente a FOC, en el marco de esta tesis se realizaron ensayos de desafío en los que se enfrentaron, desde la siembra, plántulas de ambas especies hospederas a cepas de virulencia contrastante del patógeno. Se evaluaron los síntomas y las actividades enzimáticas a distintos tiempos desde la siembra como se describe en la sección 2.3. El propósito fue vincular el avance de la enfermedad en un período de 11 días con los cambios en las actividades de las enzimas en estudio. En este capítulo se presentan y discuten los resultados de esos ensayos.

4.1 Evaluación de síntomas

A partir del test de plántulas en que se enfrentaron *A. cepa* variedad Pantanoso y *A. fistulosum* a las cepas FOC UR06 y NL93186, se realizó la evaluación de síntomas por conteo de plantines emergidos totales y normales a los 7 y 11 dds. A modo ilustrativo en la Figura 4.1 se presentan potes de Pantanoso de 7 y 11 dds, sin exponer y expuestos a la cepa NL93186. En la Figura 4.2 se presentan los resultados de forma gráfica y en el Anexo 4.I las tablas con los datos completos y el análisis estadístico.

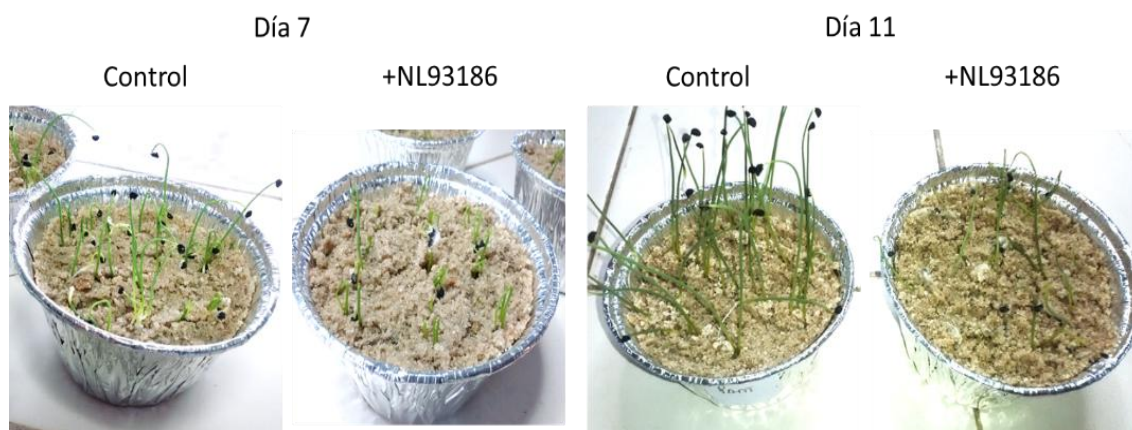


Figura 4.1 Potes con plántulas de Pantanoso de 7 y 11 dds sin exponer (control) y expuestos a FOC NL93186.

El conteo de plántulas normales permitió discriminar mejor los efectos del patógeno, y por esta razón se presentan los índices de enfermedad (IE) calculados a partir del número de plántulas normales (Tabla 4.1, Anexo 4.II) (ver sección 2.3.4). A los 3 dds no fue posible hacer conteo de plántulas dado que estaban emergiendo. De todas formas, al tomar las muestras para análisis bioquímicos, se observó para ambas especies que el porcentaje de semillas germinadas (65% en *A. cepa* Pantanoso y 66% en *A. fistulosum*) no se vio afectado por la exposición a ninguna de las cepas del patógeno.

Tabla 4.1. Conteo de plántulas normales e IE en *A. cepa* Pantanoso y *A. fistulosum* a los 7 y 11 días de enfrentadas a las cepas de FOC UR06 y NL93186.

Evaluación	Tratamientos	Pantanoso		<i>A. fistulosum</i>	
		$\bar{X}^a$	IE ^b	$\bar{X}^a$	IE ^b
Día 7	Control	28 a		19 a	
	+UR06	27 a	0,03a	16 bc	0,15a
	+NL93186	20 b	0,29b	13 cd	0,29a
Día 11	Control	26 a		17 ab	
	+UR06	25 a	0,01a	12 d	0,30a
	+NL93186	4 c	0,84c	5 e	0,73b

^a Promedio de plantines normales en 9 pots por tratamiento.

^b Índice de enfermedad, IE = 1 – (Inoculado/Control). Para cada especie se indica con letras diferencias estadísticamente significativas entre grupos de datos (p<0,05). En negrita se destacan resultados que indican afectación de las plántulas por el patógeno.

Como se observa en la Tabla 4.1 y en la Figura 4.2, frente a la cepa de FOC menos virulenta (UR06), Pantanoso se comportó como resistente mientras que *A. fistulosum* mostró una moderada susceptibilidad, evidenciada en el conteo de plántulas normales, desde los 7 dds (Figura 4.2 C). A los 11 dds, si bien el IE aumentó en *A. fistulosum*, la diferencia respecto del día 7 no fue significativa (Tabla 4.1, Figura 4.3 A). Frente a la cepa más virulenta (NL93186), ambas accesiones fueron susceptibles mostrando similar grado de afectación a los 7 dds (IE de 0,29 en ambos casos) con aumentos significativos al día 11. Este aumento fue algo mayor para *A. cepa* Pantanoso (IE= 0,84) pero sin diferencias estadísticamente significativas respecto de *A. fistulosum* (IE= 0,73) (Tabla 4.1, Figura 4.3 B).

En un trabajo anterior reportamos que *A. cepa* Pantanoso y la accesión de *A. fistulosum* (UR13005) se comportaron como resistentes a la cepa UR06 y que frente a la cepa NL93186 ambas fueron susceptibles, pero con una mayor resistencia mostrada por *A. fistulosum*. En aquel trabajo la evaluación se hizo a los 14 dds y mientras que las plántulas de Pantanoso fueron totalmente devastadas por la cepa NL93186 (IE= 1), en *A. fistulosum* el IE fue de 0.67 [34]. En el presente trabajo a los 11 dds, frente a esta cepa, *A. fistulosum* presentó un IE de 0.73 que no se diferenció del nivel de afectación mostrado por Pantanoso (IE= 0.84). Además, *A. fistulosum* se vio afectado por la cepa UR06 mientras que Pantanoso se volvió a comportar como resistente.

Esto nos muestra que, mientras Pantanoso mantuvo su comportamiento frente a estas cepas, la accesión UR13005 de *A. fistulosum* se mostró más susceptible que en el antecedente mencionado. Esta diferencia pudo deberse a la falta de vigor en las semillas de esta accesión dado que tenían más tiempo de cosechadas que las de Pantanoso y bajo porcentaje de germinación. A los 7 dds el porcentaje de emergencia de plantines totales en los pots sin inocular con el patógeno (control) fue de 64% para *A. fistulosum* y de 96% para Pantanoso. En contraste, en los ensayos de germinación reportados en el Capítulo 3, estos porcentajes fueron de 93% y 100% respectivamente y si bien las condiciones de aquel ensayo fueron distintas (placas con papel de filtro en lugar de pots con arena estéril), la calidad de las semillas de *A. fistulosum* utilizadas en los ensayos frente a *Fusarium* fue menor.

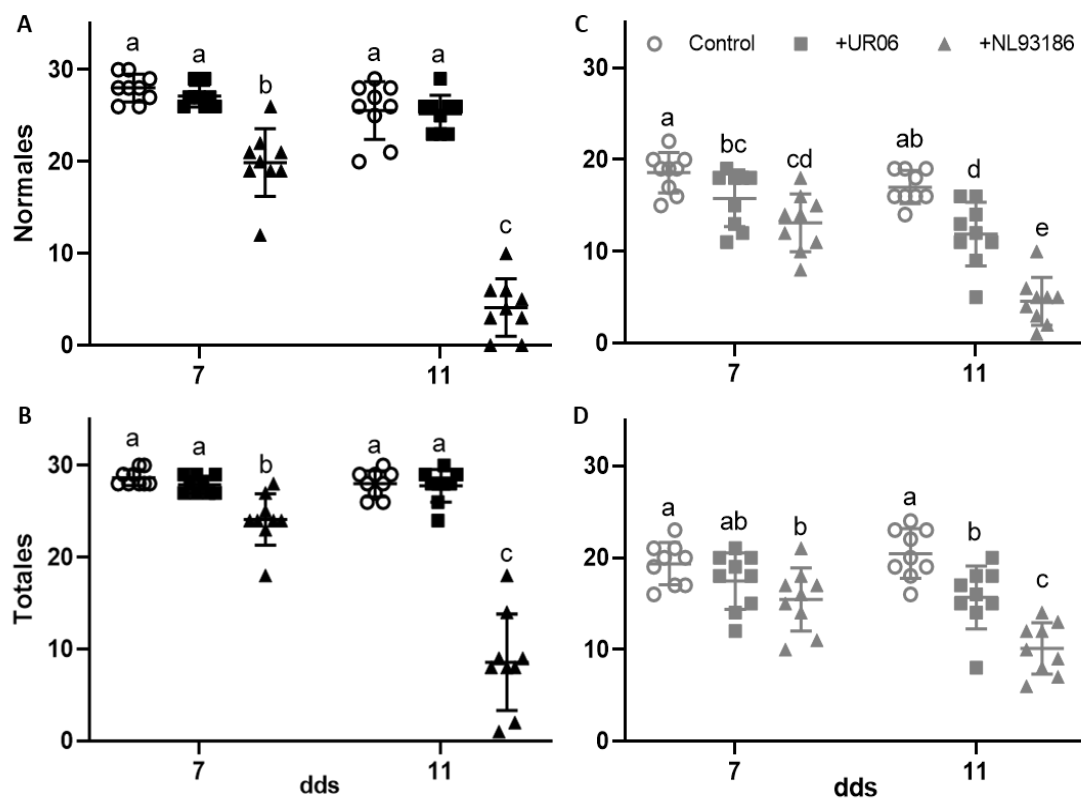


Figura 4.2. Conteo de plántulas normales y totales de *Pantanoso* (A y B) y *A. fistulosum* (C y D) a los 7 y 11 dds. La leyenda en el gráfico C indica el tipo de tratamiento (control sin patógeno; +UR06; +NL93186) para todos los casos. Los símbolos se presentan en negro para *Pantanoso* y en gris para *A. fistulosum*. Para cada gráfico se indica con letras diferencias estadísticamente significativas entre grupos de datos ($p < 0,05$).

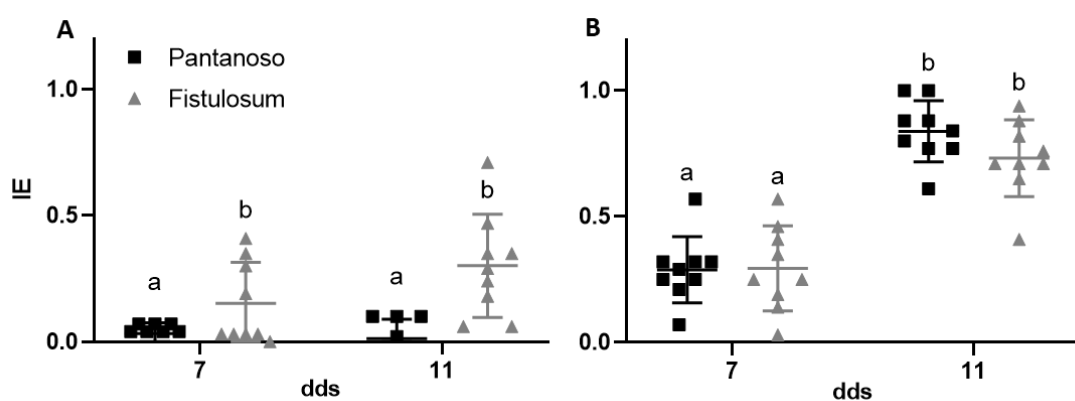


Figura 4.3. Índice de enfermedad (IE) en *Pantanoso* y *A. fistulosum* a los 7 y 11 dds. A- Plántulas expuestas a la cepa FOC UR06; B- Plántulas expuestas a la cepa FOC NL93186. Para cada gráfico se indica con letras diferencias estadísticamente significativas entre grupos de datos ($p < 0,05$).

Como se comenta en la sección 3.1.2, se ha reportado en cebolla y especies emparentadas un vínculo entre el vigor de los plantines y la resistencia a FBR [21] lo que explica que un bajo vigor en los plantines de *A. fistulosum* fue el motivo de su mayor susceptibilidad a las cepas de FOC en relación con ensayos anteriores. Se intentó repetir los ensayos con otro lote de semillas de *A. fistulosum* pero también presentó bajo porcentaje de emergencia de plantines.

La resistencia observada en Pantanoso frente a la cepa UR06 puede ser resultado de adaptación por coevolución y de la selección indirecta por resistencia a FOC realizada por los productores. La variedad Pantanoso del Sauce fue desarrollada en Uruguay a partir de poblaciones criollas de cebolla con un histórico prolongado de siembra en el país [30] y la cepa UR06 fue aislada en Uruguay en zona de producción de cebolla. En cambio, la cepa NL93186, frente a la cual Pantanoso fue susceptible, fue aislada en Holanda en 1925 (cepa de referencia para la especie). Sobre *A. fistulosum* se observó que la cepa UR06, aunque menos agresiva que la cepa NL93186, también es patogénica. A diferencia de Pantanoso, la accesión UR13005 de *A. fistulosum* tiene un histórico de pocos años en el país (Galván, *Com. Pers.*). En Argentina, Caligiore y colaboradores [123], con una metodología similar, también encontraron indicios de coevolución. Utilizando una variedad de cebolla de Wisconsin, seleccionada por resistencia a FBR, los aislamientos locales fueron más agresivos que un aislamiento del mismo origen que la variedad de cebolla [123].

Con respecto al uso de cepas de *Fusarium* de distinta virulencia para la evaluación de resistencia a FBR en *A. cepa* y especies emparentadas, Taylor y colaboradores sugieren que la mejor estrategia es utilizar cepas altamente agresivas [21]. Esto evitaría considerar como resistente a FBR una accesión que en realidad no lo es. En nuestro caso se confirma la conveniencia de utilizar cepas agresivas. Frente a la cepa menos agresiva (UR06), Pantanoso se comportó como resistente, en cambio fue susceptible frente a la cepa más agresiva NL93186. Frente a esta cepa, *A. fistulosum* también fue susceptible, afectándose menos que Pantanoso cuando se hizo la evaluación a los 11 dds, pero sin diferencias significativas.

En cuanto a si la agresividad de distintas cepas de *Fusarium spp.* es independiente de las accesiones en las que se evalúe la FBR, los antecedentes no son concluyentes. En un

estudio que incluyó cinco variedades de cebolla y nueve accesiones de especies emparentadas, entre ellas cuatro de *A. fistulosum*, Galván y colaboradores [11] realizaron ensayos de desafíos con plantas adultas utilizando tres cepas de *Fusarium*. Si bien encontraron diferencias en la agresividad de las cepas, los resultados mostraron interacción cepa x accesión [11]. En cambio, en un estudio realizado por Taylor y colaboradores esta interacción no fue tan clara y el nivel de agresividad de las cepas no estuvo determinada por las variedades de cebolla evaluadas. Ese estudio comprendió 10 variedades comerciales de cebolla y 6 aislamientos de FOC y se hizo mediante test de plántulas haciendo conteos entre los 10 y 28 dds [124]. En nuestro caso la cepa NL93186 fue la más agresiva para las dos accesiones utilizadas.

Si bien se ha observado que *A. fistulosum* presenta altos niveles de resistencia a FBR, su comportamiento defiere según la agresividad de la cepa a la que se expone [11], [33], [34]. En el estudio de Galván y colaboradores [11], se encontraron diferencias en los niveles de resistencia de las accesiones siendo las de *A. fistulosum* más resistentes que las de *A. cepa* frente a todas las cepas. Sin embargo, en otro trabajo publicado por el grupo de Taylor algunas accesiones de *A. cepa* mostraron mayores niveles de resistencia a FBR que *A. fistulosum*, frente a una cepa agresiva de FOC. Ese estudio incluyó 83 accesiones de cebolla y una de *A. fistulosum* que estuvo entre las más resistentes [21]. Por tanto, según estos antecedentes y lo observado en esta tesis, la mayor resistencia de *A. fistulosum* a FBR con relación a *A. cepa*, si bien se da en general, no se cumple en todos los casos y esto depende de la variedad de cebolla evaluada, la cepa de *Fusarium* y el vigor de la semilla utilizada.

4.2 Evaluación de la respuesta enzimática

Para todas las muestras se determinaron las actividades enzimáticas POX, GLU y QUIT. De las muestras colectadas a los 3 dds los extractos se obtuvieron a partir de semillas germinadas y de las colectadas a los 7 y 11 dds se prepararon a partir de las radículas de los plantines. Para los tratamientos con la cepa NL93186 al día 11 no fue posible colectar material vegetal dado que el avance de la enfermedad destruyó los tejidos. Los resultados de las actividades enzimáticas se presentan en la Tabla 4.2 y en la Figura 4.4. Para analizar los cambios en las actividades enzimáticas provocados por los distintos

Tabla 4.2. Actividades enzimáticas en Pantanoso y *A. fistulosum* a los 3, 7 y 11 días de sembradas (dds) y enfrentadas a las cepas de FOC UR06 y NL93186.

Tiempo	Tratamiento	Pantanoso			<i>A. fistulosum</i>		
		POX	GLU	QUIT	POX	GLU	QUIT
3 dds	Control	1,4a	2,1a	73a	1,1a	1,4a	59a
	+UR06	2,5a	1,9a	62a	1,8a	1,5a	62a
	+NL93186	2,5a	1,8a	57a	1,9a	1,8a	69a
7 dds	Control	25b	90b	218b	11b	119b	281b
	+UR06	37c	107c	243b	17c	135b	399c
	+NL93186	62d	146d	400c	36d	161b	523d
11 dds	Control	24b	88b	277bc	9,3b	127b	272b
	+UR06	32bc	89bc	281bc	11b	118b	343bc

Las actividades enzimáticas (POX, Peroxidasas; GLU, Glucanasas; QUIT, Quitinasas) están expresadas en Unidades de Enzima por gramo de tejido liofilizado (UE/g). Para cada especie y actividad, se indica con letras diferencias estadísticamente significativas entre grupos de datos ($p < 0,05$). Se resalta en negrita valores con diferencias significativas respecto al control.

tratamientos, se calculó el LFC con relación al control correspondiente. En el Anexo 4.III se presentan los resultados de las actividades enzimáticas de todas las repeticiones y los análisis estadísticos más relevantes junto con los LFC y el análisis estadístico de las diferencias entre éstos en los casos pertinentes.

4.2.1 Cambios en la actividad POX

A los 3 días de ser sembradas y expuestas al patógeno, las semillas germinadas de ambas especies presentaron un aumento en la actividad peroxidasa (POX) similar frente a las dos cepas de FOC utilizadas en el ensayo. Si bien esos aumentos respecto al control no tuvieron significancia estadística, debido a los bajos niveles de actividad y el bajo número de repeticiones, sus LFC fueron de 0,8 para Pantanoso y en torno a 0,7 para *A. fistulosum*, diferenciándose claramente de las respuestas de las actividades GLU y QUIT (Tabla 4.2 y Figura 4.6). Esta respuesta en la actividad POX se da por la presencia del patógeno a pesar de que ninguna de las dos cepas afecta el porcentaje de germinación en ninguna de las especies. Esto indicaría que, tempranamente, la plántula en germinación detecta la presencia del patógeno lo que provoca una respuesta que

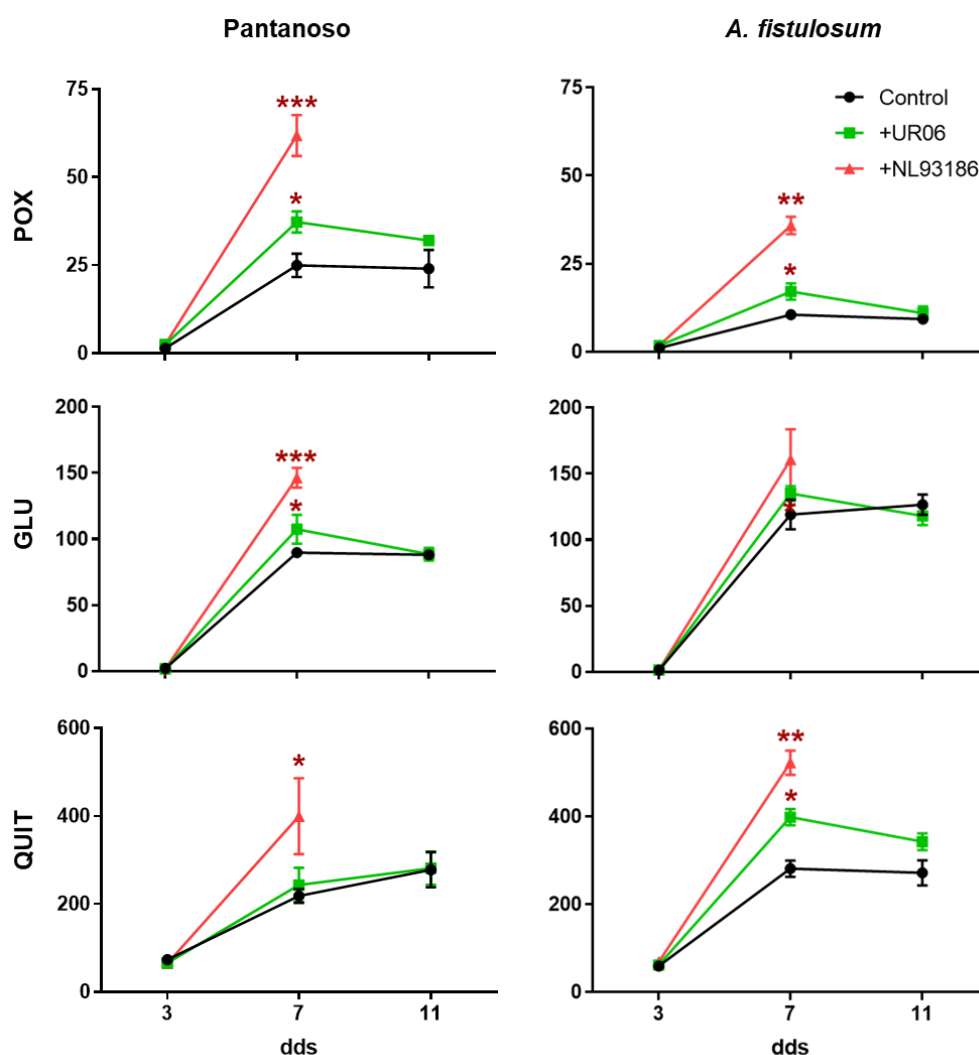


Figura 4.4. Evolución de las actividades POX, GLU y QUIT en plántulas de *A. cepa* var. Pantanoso y *A. fistulosum* durante los ensayos de desafío frente a cepas de FOC. A los 3 dds los resultados corresponden a semillas germinadas, a los 7 y 11 dds corresponden a las radículas de las plántulas. Para cada gráfico el eje de las ordenadas corresponde a la actividad enzimática expresada en UE/g y el eje de las abscisas a la edad de las plántulas en dds. La leyenda en el gráfico superior derecho indica el tipo de tratamiento (control sin patógeno; +UR06; +NL93186). Para cada gráfico se indica con asteriscos diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento con patógeno y su correspondiente control (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

incluye el aumento de la actividad POX. Del análisis del perfil de isoformas no surge que se induzca alguna isoforma específica en ninguna de las dos especies (Figura 4.5 A). Se observa que los perfiles son similares a los obtenidos para los germinadores al día 4 (Figura 3.5) pero mientras en *A. fistulosum* comenzaron a visualizarse isoformas básicas,

no sucedió lo mismo con Pantanoso, confirmando un desarrollo más temprano de la plántula en la primera especie.

A los 7 dds ambas cepas provocaron aumentos de la actividad POX con significancia estadística, en las radículas tanto de Pantanoso como de *A. fistulosum* (Figura 4.4). Frente a la cepa UR06 el nivel de aumento respecto al control fue similar en ambas especies, aun cuando las plántulas de Pantanoso no se vieron afectadas mientras que las de *A. fistulosum* sí lo fueron, aunque con un índice de enfermedad moderado. La cepa NL93186 que afectó a ambas especies de manera similar, provocó aumentos de la actividad POX significativamente mayores que UR06, observándose para *A. fistulosum* un LFC mayor al de Pantanoso (Figura 4.6). El hecho de que la cepa FOC UR06 provoque aumentos de la actividad POX en Pantanoso, aun cuando no logra desarrollar la enfermedad, indica que existe un nivel de respuesta asociado a la presencia del patógeno en que la actividad POX aumenta independientemente del daño. Frente a la cepa más agresiva (NL93186), el mayor aumento de la actividad POX puede asociarse al mayor nivel de daño observándose para *A. fistulosum* una respuesta más acentuada.

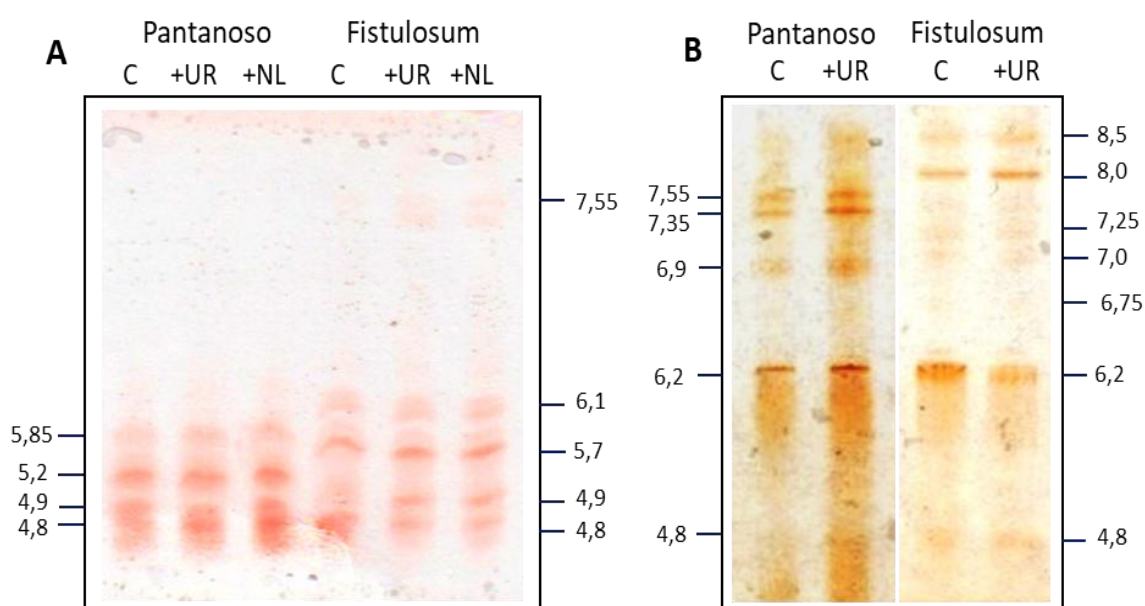


Figura 4.5. Perfiles de isoformas de POX obtenidos mediante zimogramas basados en isoelectroenfoque. **(A)** Semillas germinadas 3 dds; **(B)** Radículas de plántulas 11 dds. Se presentan los perfiles para los distintos tratamientos: Control (C); +UR06 (+UR); +NL93186 (+NL). A los lados de las figuras se indican valores de pI de las bandas.

Los perfiles de isoformas de POX obtenidos para los 7 dds, fueron de baja calidad y no mostraron bandas que se indujeran o reprimieran por la presencia del patógeno. En radículas de Pantanoso se observó la aparición de isoformas básicas de pI 7,55 y 8,2 y en *A. fistulosum* una de pI 8,0 confirmando lo observado en los germinadores.

A los 11 dds no se pudo analizar el efecto provocado por la cepa NL93186 dado que, como se comentó, el avance de la enfermedad provocó la pérdida de la mayor parte del tejido radicular. Frente a la cepa UR06, las radículas de Pantanoso mostraron un aumento de la actividad POX respecto al control similar al de los 7 dds aunque algo menor y sin significancia estadística. En *A. fistulosum* el aumento de la actividad POX no fue significativo y disminuyó respecto a los 7 dds, esto a pesar de que el IE provocado por FOC UR06 siguió siendo moderado y sin diferencias significativas con el observado los 7 dds. En cuanto al perfil de isoformas, no se observaron cambios en las radículas de plántulas expuestas a UR06 con relación a las no expuestas (Figura 4.5 B).

Como se comenta en la sección 1.1.6, la polifuncionalidad y diversidad de las POX hace difícil asignarles un rol particular en la defensa [81]. La inducción de ciertas peroxidasas se ha vinculado a la resistencia en algunos patosistemas, mientras que en otros con la respuesta al daño provocado por el patógeno durante el desarrollo de la infección [85]. En nuestro caso de estudio parecen participar en una temprana y sostenida respuesta basal ante la presencia del patógeno y en mecanismos de respuesta al daño causado por FOC. La respuesta frente al patógeno se sostiene en que a los 3 dds la actividad POX aumenta cuando aún no hay síntomas de la enfermedad y que frente a la cepa UR06 esta actividad aumenta en Pantanoso en todo el período evaluado a pesar de no causar FBR. La respuesta al daño se fundamenta en que frente a la cepa más virulenta la actividad POX muestra aumentos más acentuados tanto en Pantanoso como en *A. fistulosum*.

Del análisis de los perfiles de isoformas de POX por isoelectroenfoque, no surge que se induzca en radículas de Pantanoso o *A. fistulosum*, alguna isoforma específica por la exposición a FOC. Los cambios en los perfiles de isoformas durante el desarrollo de las plántulas en el período evaluado muestran que a los 3 dds predominan las isoformas ácidas mientras que a los 11 dds predominan las básicas. La única isoforma que aparece durante todo el período es la de pI 4,8. Estos cambios no impiden que la actividad

aumente en todo el período ante la exposición al patógeno, lo que indica que, o bien distintas isoperoxidasas cumplen roles similares en distintos momentos en la respuesta a FOC, o la isoforma de pl 4,8 es la involucrada en esta respuesta. La aparición más temprana de isoformas básicas en *A. fistulosum* podrían explicar sus mayores incrementos en la actividad POX ante el daño causado por la cepa más virulenta del patógeno a los 7 dds, aun cuando el desarrollo de la enfermedad fue similar que en Pantanoso.

4.2.2 Cambios en las actividades GLU y QUIT

A los 3 dds no se observaron cambios significativos en la actividad β -1,3-glucanasa (GLU) en ninguna de las dos especies hospederas provocados por la exposición a FOC. A los 7 dds ambas cepas del patógeno provocaron aumentos de la actividad GLU en ambas especies, sin significancia estadística en *A. fistulosum* (Figura 4.4 y 4.6). Frente a la cepa UR06, las radículas de Pantanoso mostraron un aumento significativo de la actividad GLU (LFC= 0,25) mientras que en *A. fistulosum* fue algo menor (LFC= 0,18) y sin significancia estadística. No obstante, los LFC de ambas especies no presentaron diferencias significativas. Los aumentos en la actividad GLU ante la cepa NL93186 fueron mayores que los provocados por UR06 y al igual que con esta cepa son mayores en Pantanoso (LFC= 0,70) que en *A. fistulosum* (LFC= 0,42), pero sin diferencias significativas. A los 11 dds, frente a la cepa UR06, la actividad GLU no presenta variaciones respecto al control en ninguna de las dos especies.

Al igual que para POX, la actividad GLU participaría en distintos mecanismos de respuesta a FOC en Pantanoso y *A. fistulosum*. Por un lado, estarían involucradas en una respuesta basal a la presencia del patógeno independiente del daño causado, como se evidencia en el hecho de que la actividad GLU aumentó por la exposición a UR06 en Pantanoso a pesar de no desarrollarse la enfermedad. A diferencia de POX, la participación de las GLU en esta respuesta sería más tardía y transitoria. Además de participar en esta respuesta basal, la actividad GLU participaría en la repuesta al daño causado por FOC como lo indica su mayor aumento en ambas especies frente a la cepa más agresiva (NL93186).

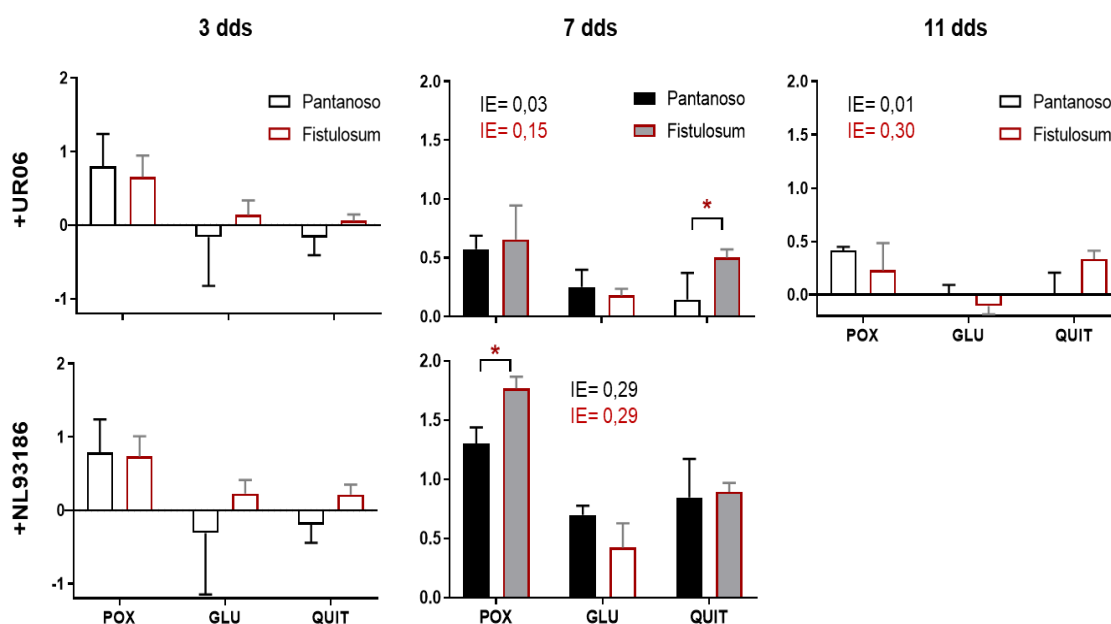


Figura 4.6. Cambios, expresados como LFC, en las actividades POX, GLU y QUIT en plántulas de *A. cepa* var. Pantanoso y *A. fistulosum* durante los ensayos de desafío frente a cepas de FOC. Se presentan para cada día de muestreo (dds) los cambios provocados por las cepas UR06 (arriba) y NL93186 (abajo) con relación al control no enfrentado a FOC. Para cada gráfico el eje de las ordenadas corresponde a LFC. Las barras en blanco indican que no hubo cambios estadísticamente significativos respecto a la actividad enzimática del control. Se indica con asterisco diferencias estadísticamente significativas entre los LFC de ambas especies a los 7 dds para determinada actividad ($p < 0,05$). Se indica el índice de enfermedad (IE) provocado por la cepa de FOC en Pantanoso (negro) y *A. fistulosum* (rojo) a los 7 y 11 dds.

La actividad quitinasa (QUIT), a los 3 dds no se vio afectada por la exposición a FOC en ninguna de las dos especies. A partir de los 7 dds esta actividad aumenta en las radículas de plántulas en los casos en que se desarrolló la enfermedad (Figuras 4.4 y 4.6). Así, frente a la cepa NL93186 ambas especies presentaron aumentos significativos y similares en la actividad QUIT (LFC de 0,85 y 0,89) en concordancia con los índices de enfermedad provocados por esta cepa (IE= 0,29 en ambas especies). Ante la cepa UR06, no se observaron aumentos significativos de la actividad QUIT en Pantanoso, que no desarrolló la enfermedad. En *A. fistulosum* que presentó un desarrollo moderado de FBR (IE= 0,15), el aumento de la actividad QUIT fue significativamente mayor que en Pantanoso con un LFC= 0,50, pero menor al provocado por la cepa NL93186 en consonancia con un menor desarrollo de la enfermedad. A los 11 dds la cepa UR06 provocó aumento de la actividad QUIT en radículas de *A. fistulosum* (LFC= 0,33) sin

significancia estadística. Estos resultados indican que la actividad QUIT participa en los mecanismos de respuesta al daño provocados por FOC en Pantanoso y *A. fistulosum*.

Como se comenta en el capítulo introductorio, la participación de β -1,3-glucanasas y quitinasas en los mecanismos de respuesta a patógenos aporta a la resistencia en algunos patosistemas y se vincula a respuestas no eficientes en la contención del patógeno en otros [82], [85]. En un trabajo que implicó análisis transcriptómico y silenciamiento de genes, se encontró que la inducción de la expresión de genes que codifican para quitinasas en raíces de pepino (*Cucumis sativus*) juega un rol importante en la resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* [125]. En lo que refiere a especies del género *Allium*, Anisimova y colaboradores vincularon la expresión de β -1,3-glucanasas y quitinasas a la resistencia del ajo (*Allium sativum*) a *Fusarium proliferatum* [106]. En nuestro caso de estudio, ambas enzimas aumentan su actividad en respuesta al daño causado por FOC haciendo parte de una respuesta ineficiente en su contención tanto en *A. cepa* como en *A. fistulosum*. Sin embargo, las GLU parecen participar además en respuestas que logran contener el avance del patógeno al menos ante cepas de baja virulencia como es el caso de la cepa UR06 frente a *A. cepa* variedad Pantanoso.

4.2.3 Diferencias en la respuesta en Pantanoso y *A. fistulosum*

Si bien no se pudo obtener material vegetal a los 11 dds de las plántulas enfrentadas a la cepa más virulenta de FOC, que era uno de los propósitos que nos habíamos planteado, el análisis de las actividades enzimáticas a los 7 dds permitió establecer diferencias en las respuestas frente a cepas de distinta virulencia en Pantanoso y *A. fistulosum*. Como se observa en la Figura 4.6, las respuestas enzimáticas de ambas especies a las dos cepas de FOC fueron similares en los tres momentos de muestreo. Las diferencias más significativas se observaron a los 7 dds. Una de ellas es el mayor aumento de la actividad POX en *A. fistulosum* frente a la cepa NL93186 a pesar de que el nivel de afectación causado por esta cepa fue el mismo en ambas especies. Esto da indicios de que, frente a cepas virulentas, las repuestas a FOC que involucran la actividad POX son más acentuadas en *A. fistulosum*, lo que contribuiría a los mayores niveles de resistencia reportados en varios antecedentes en comparación con *A. cepa*. En nuestro caso, si bien a los 11 dds el nivel de afectación frente a esta cepa fue menor en *A. fistulosum* que en Pantanoso, las diferencias no fueron significativas. La otra diferencia

significativa a los 7 dds, fue el mayor aumento de la actividad QUIT en *A. fistulosum* frente a la cepa UR06, diferencia atribuible al daño causado por el patógeno dado que Pantanoso no fue afectada por esta cepa mientras que *A. fistulosum* se mostró moderadamente susceptible. A los 11dds se observa el mismo efecto y aunque la diferencia en los LFC de las actividades QUIT de ambas especies no fueron significativas para $p < 0,05$, la probabilidad de que fueran iguales fue $< 0,1$.

Como se comenta al final del Capítulo 1, en un trabajo previo publicado por nuestro grupo, se reportó que las actividades de POX y GLU aumentaban en *A. cepa* y *A. fistulosum* en respuesta al daño causado por el patógeno [34]. En esta tesis mostramos que en respuesta a FOC, las tres actividades analizadas aumentan en respuesta al daño causado por el patógeno en ambas especies lo que es particularmente evidente para la actividad QUIT. Sin embargo, en Pantanoso, las actividades POX y GLU estarían involucradas además en mecanismos de respuesta capaces de detener el avance del patógeno en las radículas, ante cepas de poca virulencia.

CAPÍTULO 5 – RESPUESTA DE *A. CEPA* Y *A. FISTULOSUM* FRENTE A *B. SQUAMOSA* Y EFECTO DEL BIOREND® COMO INDUCTOR DE RESISTENCIA

El tizón de la hoja causado por *Botrytis squamosa* (BLB), como se describe en la sección 1.1.2, es una enfermedad foliar de la cebolla muy extendida, que en nuestro país afecta al cultivo durante todo el ciclo. En la sección 1.1.3 se señaló que *A. fistulosum* puede utilizarse como fuente de alta resistencia a este patógeno dado la falta de tales fuentes en la base genética del cultivo.

Como antecedente a esta tesis, nuestro grupo obtuvo resultados preliminares que mostraron que, frente a aislamientos nacionales de *B. squamosa*, *A. fistulosum* se comporta como resistente mientras que *A. cepa* es susceptible. Estos resultados se obtuvieron en ensayos de desafío en que se inocularon plantas adultas con el patógeno realizándose la evaluación de síntomas a los 11 ddi. También en ensayos preliminares, observamos que la aplicación de Biorend® (quitosano comercial) previo a la inoculación con el patógeno, disminuía la susceptibilidad de *A. cepa* a *B. squamosa*.

Con el objetivo de estudiar la evolución de la respuesta de *A. cepa* y *A. fistulosum* frente a *B. squamosa*, en el marco de esta tesis se realizaron ensayos de desafío en los que se enfrentaron plantas adultas a una cepa del patógeno. Se evaluaron los síntomas y las actividades enzimáticas a distintos tiempos (dds) como se describe en la sección 2.4. El propósito fue vincular el avance de la enfermedad en un período de 8 días con los cambios en las actividades de las enzimas en estudio. Además de las actividades POX, GLU y QUIT, se evaluaron los cambios en la actividad de enzimas vinculadas al estrés oxidativo. Se estudió además el efecto de la aplicación de quitosano comercial (Biorend®) sobre el desarrollo de la enfermedad, incorporando en los ensayos de desafío grupos de plantas tratadas con este producto previo a ser inoculadas con el patógeno. Como forma de confirmar que los síntomas observados fueron provocados por *B. squamosa*, se realizaron análisis por microscopía. En este capítulo se presentan y discuten los resultados de estos ensayos.

5.1 Evaluación de síntomas

En el primer ensayo, se enfrentaron plantas de dos variedades de *A. cepa* (Pantanoso y Naqué) y una accesión de *A. fistulosum* (UR13005) de 118 dds, frente a *B. squamosa* cepa Bs-UR05. Como se describe en la sección 2.4.3, tres días antes de la inoculación, un grupo de plantas de cada genotipo fue tratado con quitosano comercial (Biorend®), y otro grupo se mantuvo como control. Al momento de la inoculación la mitad de las plantas de cada grupo fueron asperjadas con agua y la otra mitad con una suspensión de conidios del patógeno. La evaluación de síntomas se realizó a los 4 y 8 días ddi por estimación del porcentaje de tejido afectado en la tercera y cuarta hoja más joven (Hojas 3 y 4). Los resultados de este ensayo (Ensayo 1) se presentan en la Tabla 5.1, Figura 5.1 y en el Anexo 5.I. No se presentan resultados de los tratamientos sin inocular, ya sean con o sin tratamiento con quitosano comercial, dado que no se desarrollaron síntomas. Lo mismo ocurre en los otros dos ensayos y para todos los tratamientos en *A. fistulosum*.

Tabla 5.1. Porcentaje de tejido afectado en hojas de cebolla variedades Pantanoso y Naqué expuestas a *B. squamosa* con y sin pretratamiento con quitosano comercial.

Tiempo (ddi)	Tratamiento	Ensayo 1				Ensayo 2				Ensayo 3	
		Pantanoso		Naqué		Pantanoso		Naqué		Pantanoso	
		H3	H4	H3	H4	H3	H4	H3	H4	H3	H4
2	+ <i>B.sq.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4a	0,5a
	Ind. + <i>B.sq.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3a	0,7ab
4	+ <i>B.sq.</i>	0,9a*	2,2	1,1	2,7ab*	-	-	-	-	0,6a	2,1b
	Ind. + <i>B.sq.</i>	0,4a*	1,4	0,8	1,6a*	-	-	-	-	0,3a	1,0ab
8	+ <i>B.sq.</i>	2,9b*	5,7	2,4	6,5b*	1,0	2,2	0,8	2,5	2,6b	6,1c
	Ind. + <i>B.sq.</i>	0,9a*	2,9	0,9	1,7a*	0,3	0,9	0,7	1,6	0,5a	1,2ab

Se presentan para los tres ensayos, los promedios del % de área de tejido afectado en las hojas 3 (H3) y 4 (H4) de plantas de cebolla de las variedades Pantanoso y Naqué expuestas a *B. squamosa* (+*B.sq.*) en distintos días desde la inoculación (ddi). Los tratamientos que incluyeron la aplicación de quitosano comercial previo a la inoculación se indican como Ind. +*B.sq.* Para cada columna se indica con letras diferencias estadísticamente significativas entre grupos de datos ($p < 0,05$, * $p < 0,1$). Se destaca en negrita casos en que hubo diferencias significativas entre las plantas tratadas y las sin tratar con quitosano comercial para determinado ddi.

Se observó que, mientras *A. fistulosum* no fue afectada por el patógeno, las dos variedades de cebolla evaluadas mostraron grados similares de severidad (Tabla 5.1 y Figura 5.1). En las plantas inoculadas sin pretratar con quitosano comercial (tratamiento +*B.sq.*), los síntomas aumentaron más del doble entre los 4 y 8 ddi en ambas hojas de las dos variedades pero, debido al escaso número de repeticiones y la dispersión de los datos, estos cambios tuvieron significancia estadística solo en la hoja 3 de Pantanoso (ver Anexo 5.I).

La aplicación de quitosano comercial, previo a la inoculación, disminuyó la afectación provocada por el patógeno en hojas de las dos variedades de cebolla. Este efecto, aunque se observa desde los 4 ddi, tuvo significancia estadística a los 8 ddi en la hoja 3 de la variedad Pantanoso y en la hoja 4 de la variedad Naqué. En esos casos la reducción en el área afectada, cuando se compara con las plantas expuestas sin pretratar, fue de 69% en el primer caso y 73% en el segundo. Se observa para ambas variedades que los síntomas provocados por el patógeno se desarrollaron con mayor intensidad entre los 4 y los 8 ddi en plantas sin pretratar con quitosano comercial comparadas con las pretratadas, siendo el efecto más claro en Naqué.

Para confirmar lo observado en el Ensayo 1, se realizó un segundo ensayo con las mismas características (Ensayo 2) pero utilizando plantas de 162 dds y evaluando síntomas sólo a los 8 ddi. Al igual que en el primer ensayo, *A. fistulosum* no desarrolló síntomas mientras que las dos variedades de cebolla tuvieron niveles de síntomas similares. A los 8 ddi el desarrollo de síntomas en este ensayo fue menor a lo observado en el Ensayo 1, y si bien se observó una disminución de los síntomas en las plantas pretratadas con quitosano, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 5.1, Figura 5.1). El menor desarrollo de síntomas en este ensayo podría deberse a diferencias en la respuesta de las plantas debido a su estado fenológico. En el Ensayo 1 las plantas tenían 118 dds mientras que en Ensayo 2 tenían 162 dds y como se vio en el Capítulo 3 la actividad basal de enzimas vinculadas a la patogénesis como las quitinasas aumenta con la edad en hojas de estas variedades por lo que sus niveles de susceptibilidad a patógenos fúngicos podrían disminuir. Galván y colaboradores [12] también vincularon

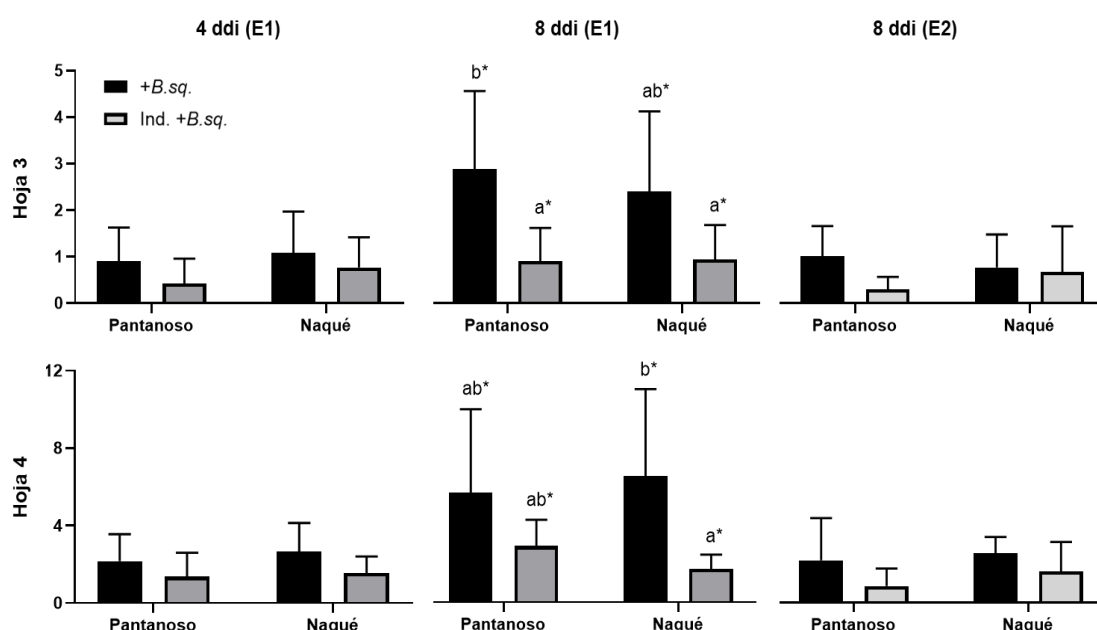


Figura 5.1. Porcentaje de área afectada por *B. squamosa* (+B.sq.) en las hojas 3 y 4 de las variedades de cebolla Pantanoso y Naqué a los 4 y 8 ddi en el Ensayo 1 (E1) y a los 8 ddi en el Ensayo 2 (E2). Los tratamientos que implicaron aplicación previa de quitosano comercial se indican como Ind. +B.sq. Para los gráficos correspondientes a los 8 ddi en el Ensayo 1 se indica con letras diferencias estadísticamente significativas entre grupos de datos (*p<0,1).

características morfológicas como la serosidad de las hojas y el vigor vegetativo con una menor susceptibilidad a *B. squamosa*, características que varían con la edad de la planta, pero que no fueron analizadas en nuestro trabajo. Sin embargo, como se desarrolla a continuación y se observa en la Tabla 5.1, en un ensayo posterior (Ensayo 3) con plantas de 206 dds, los niveles de susceptibilidad mostrados por Pantanoso a Bs-Ur05 fueron similares a los de las plantas de 118 dds.

Como se observa en la Figura 5.1 las respuestas a los distintos tratamientos en Pantanoso y Naqué no presentaron diferencias. Esto indica que ambas variedades presentaron un nivel de susceptibilidad similar a la cepa Bs-UR05 y que respondieron de la misma forma al pretratamiento con quitosano comercial disminuyendo su susceptibilidad al patógeno. Galván y colaboradores [12] estudiaron la variabilidad de la respuesta a *B. squamosa* entre cultivares nacionales e introducidos en Uruguay, observándose que estas dos variedades se encontraban entre las menos susceptibles y presentaban respuestas similares, lo que se confirma en nuestro trabajo.

En un tercer ensayo (Ensayo 3) se optó por realizar un mayor número de repeticiones por tratamiento para tener resultados estadísticamente más concluyentes. Dado que Pantanoso y Naqué mostraron comportamientos similares en los ensayos anteriores, se utilizó solo la variedad Pantanoso y la accesión UR13005 de *A. fistulosum*. Este ensayo se realizó a finales de setiembre con plantas de 206 dds por lo que la cebolla estaba entrando en la etapa de bulbificación. Las evaluaciones de síntomas se hicieron a los 2, 4 y 8 ddi. Los resultados se presentan en la Tabla 5.1 y la Figura 5.2 que también incorpora los resultados de Pantanoso en el Ensayo 1 a fines comparativos. En la Figura 5.3 se presentan imágenes de hojas de Pantanoso sometidas a los distintos tratamientos a los 8 ddi.

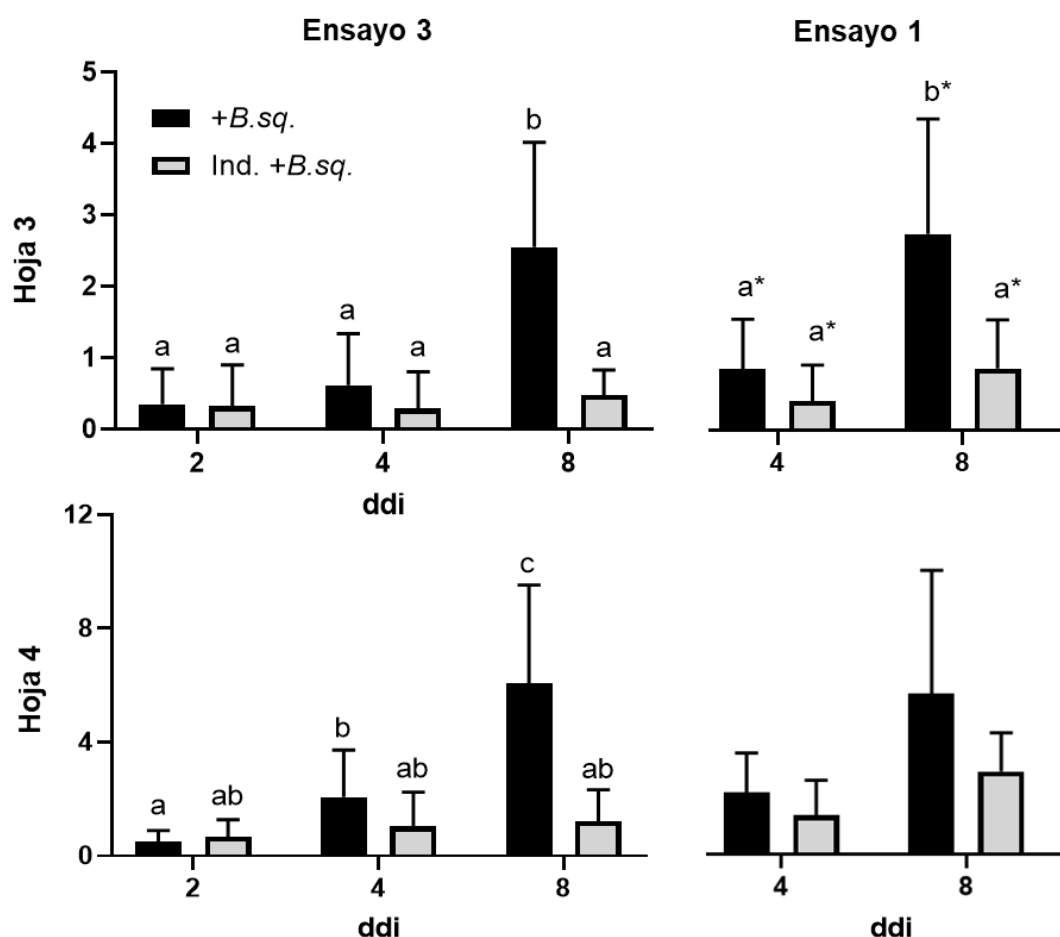


Figura 5.2. Porcentaje de área afectada por *B. squamosa* (+*B.sq.*) en las hojas 3 y 4 de cebolla variedad Pantanoso en los Ensayos 3 y 1. En el eje de las abscisas se indica los días desde la inoculación (ddi) al momento de la evaluación. Los tratamientos que implicaron aplicación previa de quitosano comercial se indican como Ind. +*B.sq.* Para cada gráfico, se indican con letras diferentes las diferencias estadísticamente significativas entre grupos de datos ($p < 0,05$, $*p < 0,1$).

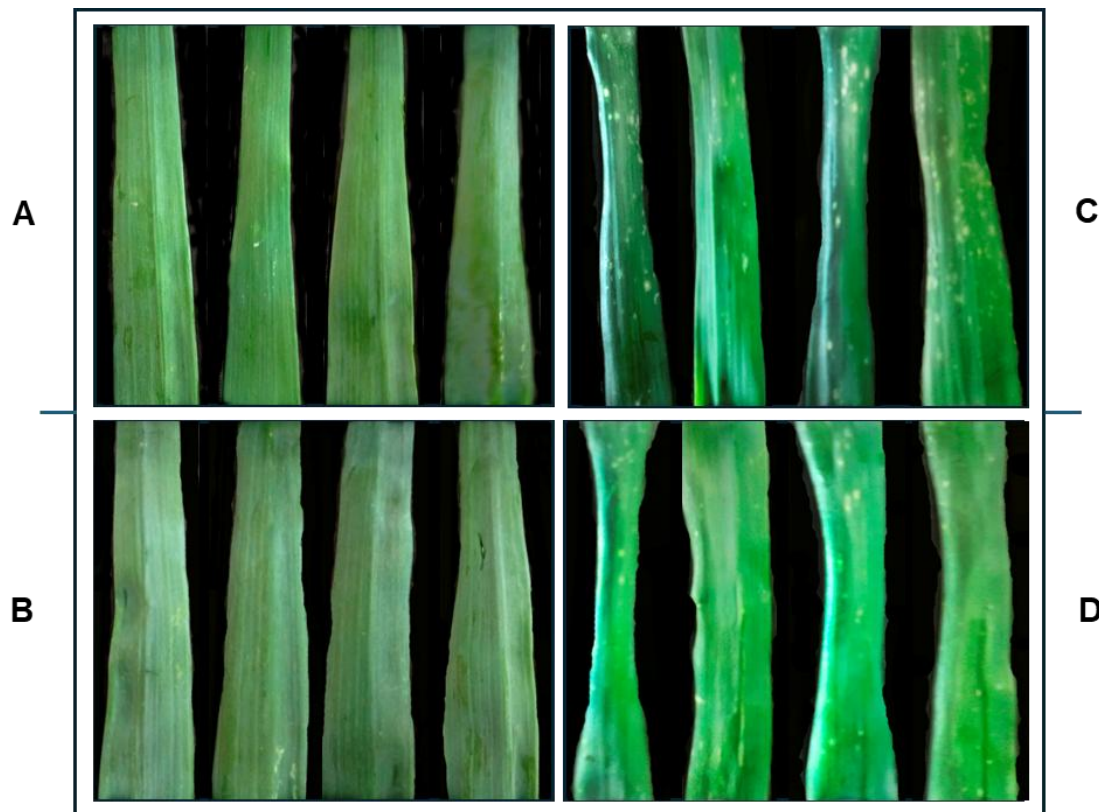


Figura 5.3. Imágenes de secciones de hojas de cebolla variedad Pantanoso a los 8 ddi. (A) Controles sin inocular; (B) Tratadas con quitosano comercial sin inocular; (C) Inoculadas con Bs-UR05; (D) Tratadas con quitosano comercial e inoculadas con Bs-UR05.

Las tendencias observadas en los ensayos anteriores quedaron confirmadas en el Ensayo 3. La accesión de *A. fistulosum* no se vio afectado por *B. squamosa* confirmando su alta resistencia a este patógeno como ya ha sido reportado en trabajos anteriores [37]. Pantanoso mostró un bajo desarrollo de síntomas los días 2 y 4 ddi mostrando niveles de afectación mayores a los 8 ddi similares a los observados en el Ensayo 1 (Tabla 5.1, Figura 5.2). El efecto del quitosano comercial en la reducción de síntomas fue evidente a los 8 ddi reduciendo el área foliar afectada en torno al 80 % tanto en hoja 3 como en hoja 4. En la hoja 4 se observa claramente el progreso de la enfermedad en las plantas inoculadas con Bs-UR05 sin tratamiento previo, mientras que en las pretratadas con quitosano comercial no se observa aumento de síntomas en el período evaluado.

En el Ensayo 1, la reducción de síntomas a los 8 ddi en plantas de cebolla pretratadas con quitosano comercial fue en torno al 70% del área foliar afectada en los casos en que se vieron diferencias estadísticamente significativas ($\alpha=0,1$), mientras que en el Ensayo 3 la reducción fue en torno al 80%. En el Ensayo 1 las plantas tenían 118 dds y estaban

en etapa de desarrollo y crecimiento de las hojas mientras que en el Ensayo 3 estaban comenzando la etapa de bulbificación. En un trabajo realizado recientemente, cuya publicación está en revisión (se anexa a esta tesis), también evaluamos compuestos basados en quitosano, y encontramos que redujeron el desarrollo de síntomas de BLB en plantas de cebolla de la variedad Regia pero que su efecto difiere según el estado fenológico de la planta, mostrando un mayor efecto en la etapa de bulbificación lo que confirmaría lo observado en esta tesis.

5.2 Análisis por microscopía

Con el propósito de confirmar que las machas necróticas en las hojas con síntomas de BLB fueron provocadas por *B. squamosa*, se realizaron observaciones por microscopía óptica de los tejidos afectados. Como se comenta en la sección 2.4.5, trozos de hojas inoculadas con el patógeno fueron decoloradas y luego teñidas con azul de anilina 0.1% en lactofenol para visualizar estructuras fúngicas. Se analizaron muestras del Ensayo 3 obtenidas a los 2, 4 y 8 ddi.

En la Figura 5.4 A se observan conidios de *B. squamosa* desprendiéndose de los conidióforos producidos a partir de esclerocios. La muestra corresponde a una suspensión de esporas sin filtrar obtenida de sumergir esclerocios germinados en agua estéril con Tween 20 al 0,1%. En la Figuras 5.4 B y C se observa cómo a las 48 h de depositados sobre la epidermis de las hojas de Pantanoso, los conidios germinaron y formaron apresorios sobre las paredes anticlinales de las células epidérmicas a partir del tubo germinativo. En el caso C el conidio se depositó sobre un estoma pero al parecer el tubo germinativo no ingresó a través de éste al interior del mesófilo dado que se observan apresorios sobre pared anticlinal. La Figura 5.4 D corresponde a la epidermis de una hoja de Pantanoso tratada con quitosano comercial tres días antes de la inoculación con *B. squamosa*. Se observa el conidio germinado sobre el estoma y la ausencia de apresorio lo que puede indicar que el tubo germinativo ingresó al interior de la hoja a través del estoma. Se observa un menor desarrollo del tubo germinativo que en los casos B y C que corresponden a plantas que no fueron pretratadas con quitosano comercial.

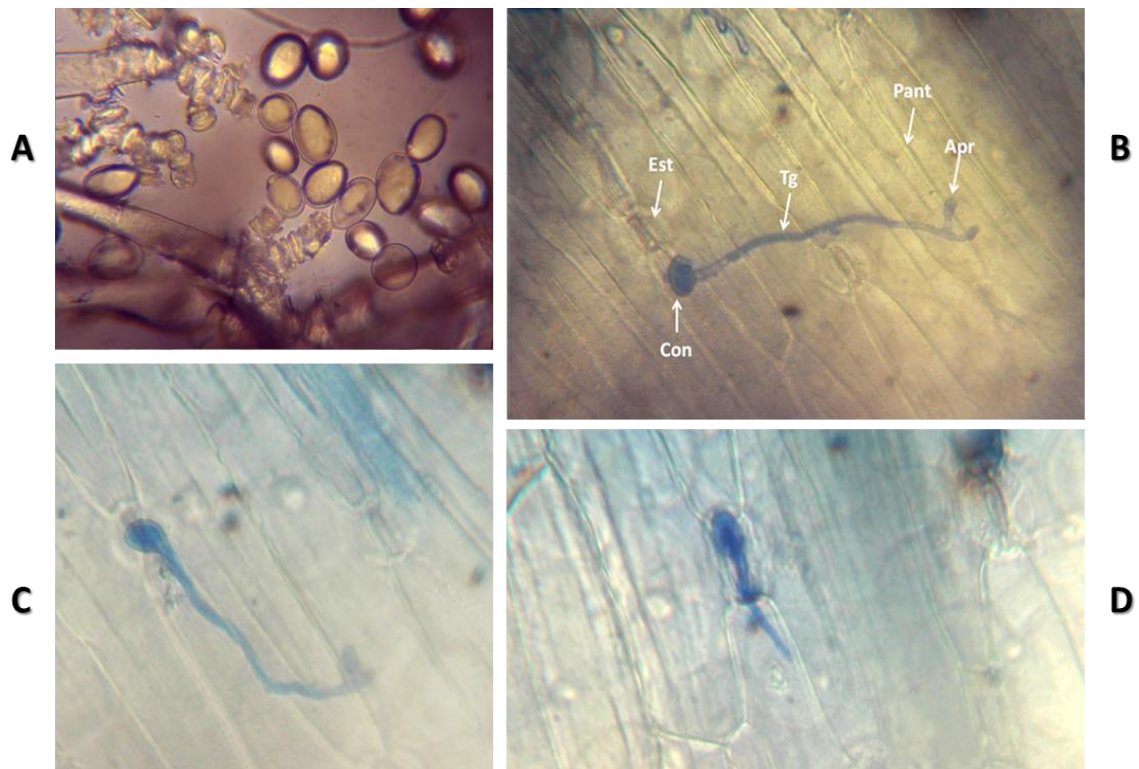


Figura 5.4. Conidios de *B. squamosa* en suspensión y germinados sobre epidermis de hojas de Pantanoso a los 2 ddi. **(A)** Conidios en suspensión desprendidos de los conidióforos; **(B)** Conidio (Con) germinado y estructuras asociadas. Se observa la formación de apresorios (Apr) sobre pared anticlinal de una célula de la epidermis. (Tg: tubo germinativo; Pant: pared anticlinal; Est: estoma); **(C)** Conidio germinado sobre estoma. Se observa el desarrollo del tubo germinativo y apresorios sobre paredes anticlinales; **(D)** Conidio germinado sobre estoma con tubo germinativo ingresando al mesófilo en planta pretratada con quitosano comercial.

Las Figuras 5.5 A, B y C, corresponden a muestras de hojas tomadas 4 ddi. En A se observa el desarrollo de hifas al interior de una hoja de Pantanoso mostrando el progreso de la invasión de los tejidos por *B. squamosa*. En B se observa un conidio y el tubo germinativo, pero no el desarrollo de hifas sobre la epidermis de una hoja de Pantanoso pretratada con quitosano comercial. En C se observa un conidio germinado con apresorios formados sobre la epidermis de una hoja de *A. fistulosum*. Esta imagen muestra que los conidios de *B. squamosa* son capaces de germinar y formar apresorios sobre la epidermis de hojas de *A. fistulosum*, pero la ausencia posterior de desarrollo de manchas necróticas indica que no logran colonizar con éxito el interior de la hoja.

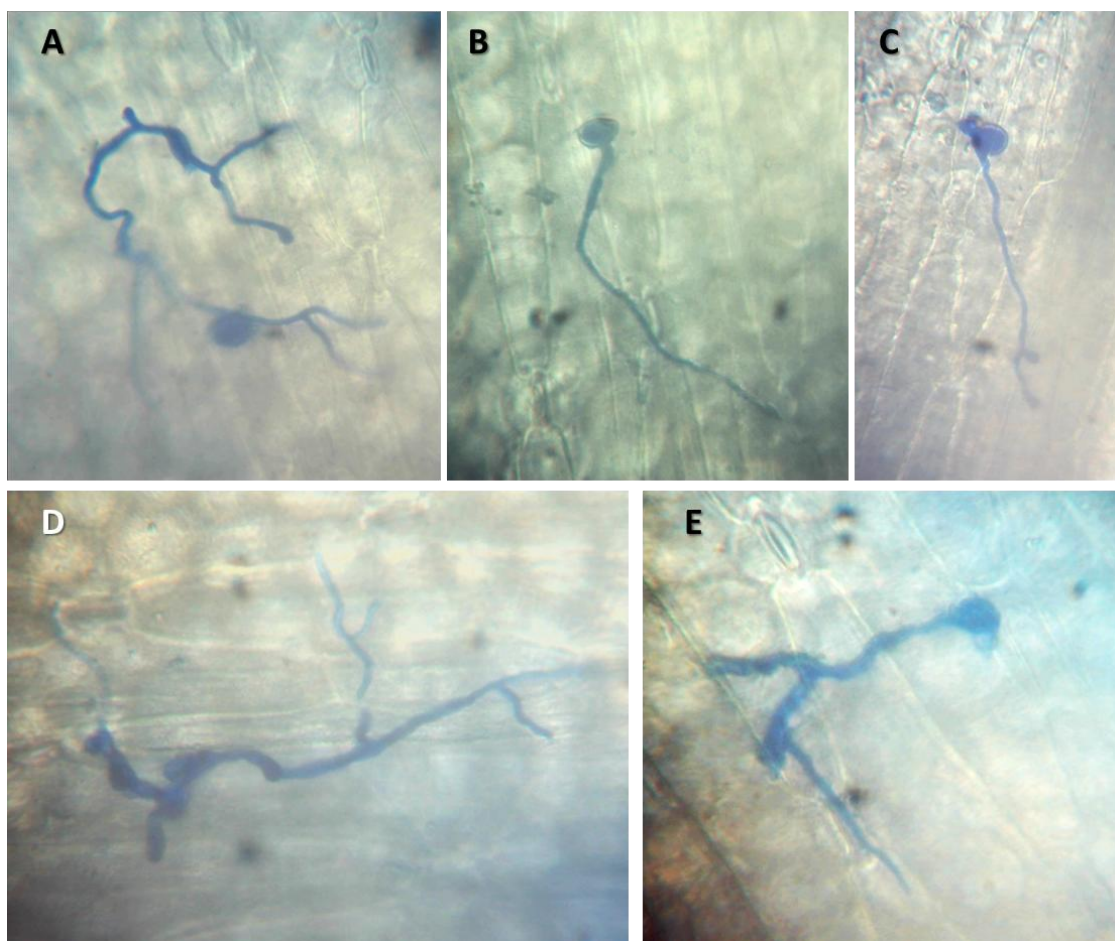


Figura 5.5. Desarrollo del tubo germinativo e hifas de *B. squamosa* a los 4 y 8 ddi en hojas de Pantanoso y *A. fistulosum*. **(A)** Conidio e hifas en hoja de Pantanoso a los 4 ddi; **(B)** Conidio y tubo germinativo sobre epidermis de hoja de planta de Pantanoso pretratada con quitosano comercial a los 4 ddi. **(C)** Conidio germinado con tubo germinal y apresorios sobre epidermis de hoja de *A. fistulosum* a los 4 ddi. **(D)** Hifas en hoja de Pantanoso a los 8 ddi. **(E)** Conidio, tubo germinativo y apresorios sobre epidermis de hoja de planta de Pantanoso pretratada con quitosano comercial a los 8 ddi. Se observa desarrollo de hifa.

Las Figuras 5.5 D y E corresponden a muestras de hojas tomadas 8 ddi. En D se observa el desarrollo de hifas de *B. squamosa* en una hoja de Pantanoso. En E se observa un conidio germinado con tubo germinativo y apresorios además del desarrollo incipiente de una hifa. Esta imagen corresponde a la epidermis de una hoja de Pantanoso pretratada con quitosano comercial.

Del análisis de las imágenes generadas mediante microscopía óptica, se evidencia que los síntomas visualizados corresponden a la colonización de los tejidos de las hojas por

B. squamosa. Se observa para todos los momentos de muestreo un retraso en el desarrollo de las estructuras invasivas del hongo en las plantas pretratadas con quitosano comercial.

5.3 Evaluación de la respuesta enzimática

5.3.1 Enzimas vinculadas al estrés oxidativo

A partir de muestras del Ensayo 1 colectadas a los 0, 2, 4 y 8 ddi, se analizaron las actividades de enzimas vinculadas al estrés oxidativo: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX) y peroxidasa (POX). Como se describe en la sección 2.5.1 los extractos para los ensayos enzimáticos se prepararon a partir de la tercera hoja más joven de cada planta. Si bien los síntomas se evaluaron en la hoja 3 y la hoja 4, la elección de la tercera hoja responde a que algunas hojas 4 mostraban signos de iniciar la etapa de senescencia, fenómeno que altera la actividad de las enzimas en estudio. Además, la probabilidad de que otros factores que influyen en la actividad de las enzimas, como la presencia de microorganismos o heridas mecánicas ocurran, es mayor en las hojas de más edad que en las más jóvenes.

En la tabla 5.2 se presenta el promedio de las actividades enzimáticas determinadas según accesión, tratamiento y día de muestreo. En el Anexo 5.II se presentan los resultados completos con el análisis estadístico para los casos en que se encontraron diferencias significativas. A diferencia de los demás ensayos en que la actividad POX se determinó utilizando *o*-dianisidina como sustrato, para este ensayo se utilizó guayacol (ver sección 2.5.5).

Al momento de la inoculación con *B. squamosa*, la actividad de las enzimas evaluadas en las plantas tratadas tres días antes con quitosano comercial (tratamiento con la leyenda Ind.), no varió respecto de las plantas control. La única excepción fue la actividad APX en *A. fistulosum* que aumentó al doble en las plantas pretratadas. Como se observa en la Figura 5.6 y la Tabla 5.2, este efecto fue transitorio dado que a partir de los 2 ddi las diferencias de esta actividad en las plantas tratadas respecto al control no fueron significativas. Se observa que esta actividad no aumenta por la presencia del patógeno en ninguna de las accesiones evaluadas, se desarrollen o no síntomas. Esto da

indicios de que la presencia de quitosano desata respuestas de defensa transitorias en *A. fistulosum* en las que están involucradas las APX.

En Pantanoso y Naqué, la inoculación con *B. squamosa* provocó aumentos en las actividades CAT y POX no observándose cambios en las actividades SOD y APX. Los aumentos observados fueron significativos para la actividad CAT a partir de los 4 ddi, momento en que también aumentó la actividad POX, pero sin significancia estadística. Como se observa en la Figura 5.7, los aumentos en la actividad POX fueron mayores a

Tabla 5.2. Actividades enzimáticas vinculadas al estrés oxidativo en *A. fistulosum* y variedades de cebolla Pantanoso y Naqué enfrentadas a *B. squamosa* con y sin pretratamiento con quitosano comercial.

Ddi	Tratamiento	Naqué				Pantanoso				<i>A. fistulosum</i>			
		CAT	SOD	APX	POX	CAT	SOD	APX	POX	CAT	SOD	APX	POX
0	Control	9,7	6,7	10,1	1,8	9,5	7,0	6,6	3,1	11,7	4,6	5,9a	6,0
	Ind.	10,1	6,8	7,7	1,8	10,3	6,8	5,8	2,8	9,7	5,0	12,0b	5,1
2	Control	8,1	6,7	9,3	2,0	11,0	5,8	7,1	4,4	8,6	5,5	7,7ab	6,7
	Ind.	8,7	7,3	10,1	2,5	8,8	6,9	6,2	4,4	11,8	5,4	9,2b	5,9
	+B.sq.	7,5	7,8	8,6	2,4	9,6	5,9	7,4	4,7	7,9	5,8	5,3a	5,0
	Ind. +B.sq.	8,4	6,6	9,0	3,4	9,5	8,3	7,6	4,4	11,9	6,3	6,1a	6,6
4	Control	7,3a	6,0	8,2	2,5	7,7a	6,1	7,0	4,4	8,2a	4,3	5,4	7,1
	Ind.	7,9ab	6,2	8,5	3,0	8,0ab	4,9	6,7	5,3	9,9ab	3,9	7,6	9,2
	+B.sq.	10,5b	5,8	6,7	6,5	10,2b	6,0	6,1	7,5	11,7b	3,7	6,9	8,7
	Ind. +B.sq.	7,9ab	5,9	6,5	5,6	9,5ab	4,9	6,7	7,2	12,3b	3,8	8,3	8,5
8	Control	9,6a	6,9	8,1	2,1a	6,3a	6,1	8,0	3,5a	8,7	6,8	7,0	7,9
	Ind.	8,2a	5,4	7,4	2,9a	6,7ab	4,9	8,2	4,5a	11,3	6,3	6,4	9,6
	+B.sq.	13b	6,4	7,2	9,4b	7,3b	4,8	8,0	7,4b	9,2	6,1	6,1	8,8
	Ind. +B.sq.	7,9a	6,4	7,8	4,3a	7,3ab	6,4	8,0	5,9a	11,4	6,4	5,5	7,1

Promedios de las actividades enzimáticas (CAT, Catalasa; SOD, Superóxido dismutasa; APX, Ascorbato peroxidasa; POX, Peroxidasa) expresadas en Unidades de Enzima por gramo de tejido liofilizado (UE/g). Para las actividades CAT y SOD las UE/g se presentan en centenas para facilitar su visualización. Para cada accesión, actividad y día de muestreo (ddi, días desde la inoculación) se indica con letras diferencias estadísticamente significativas entre grupos de datos ($p < 0,05$). Se resalta en negrita valores con diferencias significativas respecto al control. La ausencia de letras indica que no hubo diferencias entre los distintos tratamientos. Los tratamientos que implicaron el uso de quitosano comercial se indican como Ind.

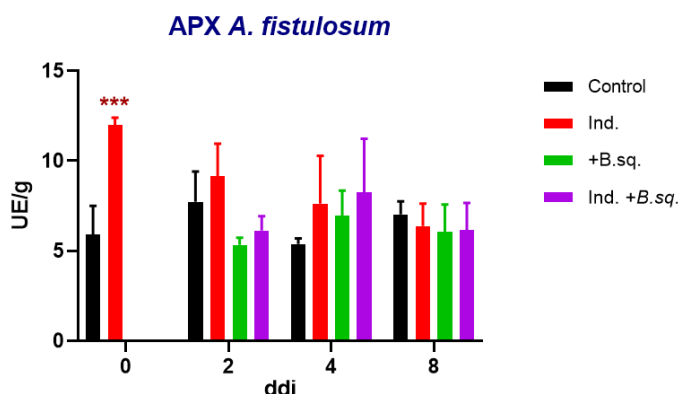


Figura 5.6. Actividad ascorbato peroxidasa (APX) en hojas de *A. fistulosum* sometidas a distintos tratamientos indicados en la leyenda. En el eje de las abscisas se indican los días desde la inoculación (ddi) con *B. squamosa* (+*B.sq.*). Se indica con asteriscos diferencias significativas respecto al control (** $p < 0,001$).

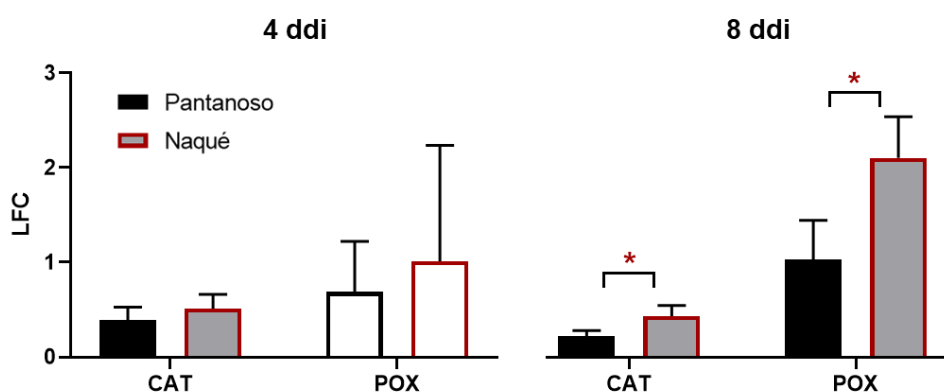


Figura 5.7. Cambios, expresados como LFC, en las actividades CAT y POX en hojas de *A. cepa* var. Pantanoso y Naqué enfrentadas a *B. squamosa*. Se presentan para los días 4 y 8 ddi los cambios provocados por la cepa Bs-UR05 en plantas sin pretratar con quitosano comercial con relación al control no enfrentado al patógeno. Las barras en blanco indican que no hubo cambios estadísticamente significativos respecto a la actividad enzimática del control. Se indica con asterisco diferencias estadísticamente significativas entre los LFC de ambas especies para determinada actividad ($p < 0,05$).

los de la actividad CAT y más pronunciados en Naqué que en Pantanoso, con diferencias significativas entre los LFCs de las dos variedades para las dos actividades a los 8 ddi (los valores de LFC y el análisis estadístico está disponible en el Anexo 5.II). En plantas pretratadas con quitosano comercial, la inoculación con *B. squamosa* también produjo aumentos de la actividad POX desde los 4 ddi pero de menor magnitud y sin diferencias significativas respecto de la actividad de los controles.

Como se observa en la Figura 5.1, el desarrollo de síntomas entre los 4 y 8 ddi fue mayor en las plantas inoculadas sin pretratar con quitosano comercial que en las pretratadas.

Esto indica que las actividades CAT y POX aumentan en respuesta al daño causado por el patógeno dado que sus aumentos fueron más moderados en las plantas pretratadas. Esto es de esperar dado el rol que cumplen estas enzimas en la detoxificación de especies reactivas del oxígeno las cuales se producen como consecuencia de la invasión de los tejidos de la planta por el patógeno[88].

Si bien se observó que Naqué a los 8ddi mostró mayores niveles de respuesta en el aumento de las actividades CAT y POX que Pantanoso, ambas variedades desarrollaron síntomas similares en las hojas 3 (ver Tabla 5.1 y Figura 5.1 correspondiente al Ensayo 1), por lo que esta respuesta más acentuada en Naqué, no se tradujo en una menor susceptibilidad al patógeno.

En *A. fistulosum*, que no desarrolló síntomas frente a Bs-UR05, se observó un aumento significativo de la actividad CAT a los 4 ddi en plantas inoculadas sin pretratar y pretratadas con quitosano comercial. Esto indica, que en esta especie las ROS juegan un rol en la contención efectiva del patógeno.

5.3.2 Enzimas vinculadas a la patogénesis

De las muestras colectadas del Ensayo 3 a los 0, 2, 4 y 8 ddi, correspondientes a hojas de cebolla de la variedad Pantanoso y *A. fistulosum* se analizaron las actividades POX, GLU, QUIT y NAG. Los extractos para los ensayos enzimáticos se prepararon a partir de la tercera hoja más joven de cada planta como se describe en la sección 2.5.1.

En la tabla 5.3 se presenta el promedio de las actividades determinadas según accesión, tratamiento y día de muestreo. En el Anexo 5.III se presentan los resultados completos con el análisis estadístico para los casos en que se encontraron diferencias significativas. La actividad NAG no mostró variaciones ante ningún tratamiento en ambas especies por lo que los resultados de sus actividades se presentan sólo en el Anexo 5.III. Para este ensayo la actividad POX se determinó utilizando *o*-dianisidina como sustrato tal como se evaluó a lo largo de la tesis (a excepción de los resultados descritos en la sección anterior en donde se utilizó puntualmente guayacol como sustrato).

Al momento de la inoculación con el patógeno (0 ddi), las plantas de Pantanoso tratadas previamente con quitosano comercial (Biorend® al 2%, aprox. 0.5 mg/mL de quitosano) mostraron un aumento de 1,5 veces en la actividad quitinasa respecto a las plantas

control. Este efecto no se observó en *A. fistulosum* ni para las demás actividades. La relevancia de este resultado radica en que, a los tres días de aplicado, el quitosano comercial (Biorend®) indujo la actividad quitinasa por lo que actúa como inductor de resistencia. Este efecto fue transitorio dado que dos días después ya no se observan diferencias significativas en esta actividad entre las plantas tratadas y las plantas control.

Estos resultados fueron confirmados en otro trabajo que realizamos posteriormente [126], utilizando plantas de la variedad de cebolla Regia de edad similar a la utilizada en el Ensayo 3 y la cepa de *B. squamosa* utilizada en esta tesis. En ensayos realizados in vitro, Biorend® inhibió el crecimiento de la cepa de *B. squamosa* Bs-UR05, por lo que la

Tabla 5.3. Actividades enzimáticas en *A. fistulosum* y Pantanoso enfrentadas a *B. squamosa* con y sin pretratamiento con quitosano comercial.

Ddi	Tratamiento	Pantanoso			<i>A. fistulosum</i>		
		POX	GLU	QUIT	POX	GLU	QUIT
0	Control	33	15	155a	51	22	247
	Ind.	35	17	237b	52	32	236
2	Control	34ab	25	198a	53a	27ab	262c
	Ind.	31a	27	181a	46a	20a	213b
	+ <i>B.sq.</i>	47c	34	291b	84b	34b	168a
	Ind. + <i>B.sq.</i>	45bc	27	323b	60a	25ab	147a
4	Control	29a	24a	223a	38ab	25	207
	Ind.	30a	28ab	286ab	36a	26	223
	+ <i>B.sq.</i>	44b	37bc	377c	68c	27	193
	Ind. + <i>B.sq.</i>	35ab	41c	340bc	54bc	26	182
8	Control	39a	28a	293a	27a	34	350ab
	Ind.	36a	27a	379a	29a	43	386b
	+ <i>B.sq.</i>	73b	77c	726c	38ab	43	258a
	Ind. + <i>B.sq.</i>	47a	48b	530b	46b	41	258a

Promedios de las actividades enzimáticas (POX, Peroxidasas; GLU, Glucanasas; QUIT, Quitinasas) expresadas en Unidades de Enzima por gramo de tejido liofilizado (UE/g). Para cada especie, actividad y día de muestreo (ddi) se indica con letras diferencias estadísticamente significativas entre grupos de datos ($p < 0,05$). Se resalta en negrita valores con diferencias significativas respecto al control. La ausencia de letras indica que no hubo diferencias entre los distintos tratamientos. Los tratamientos que implicaron el uso de quitosano comercial se indican como Ind.

inducción de la actividad quitinasa confirma el efecto dual del quitosano (inhibitorio del crecimiento e inductor de resistencia) en la reducción de la enfermedad en el patosistema en estudio. Este efecto dual del quitosano y su capacidad de inducir la actividad QUIT ha sido reportado para otros patosistemas [127], [128].

En cuanto a los cambios en las actividades enzimáticas durante la progresión de la enfermedad en Pantanoso, la inoculación con *B. squamosa* produjo aumentos en todas las actividades enzimáticas evaluadas con excepción de la actividad N-acetil- β -glucosaminidasa (NAG). En la actividad QUIT se observaron cambios significativos desde los 2 ddi que se acentuaron con el progreso de la enfermedad mostrando a los 8 ddi diferencias entre las plantas con y sin pretratamiento en concordancia con el menor desarrollo de síntomas (ver Tabla 5.1, Ensayo 3, H3). La respuesta de la actividad GLU fue similar a la respuesta de las QUIT, pero con cambios significativos a partir de los 4 ddi. La actividad POX aumentó en respuesta al patógeno desde los 2 ddi con aumentos significativos sólo en las plantas sin pretratamiento con quitosano comercial.

En la Figura 5.2 vimos que la diferencia en los síntomas en la hoja 3 entre las plantas inoculadas con o sin pretratamiento con quitosano comercial, comienzan a ser significativos a los 8 ddi. Se observa además que el desarrollo de los síntomas avanza en las plantas sin pretratar mientras que no muestran cambios en las plantas pretratadas. Como se observa ahora en la Figura 5.8, los cambios en las actividades enzimáticas muestran patrones similares al de la evolución de síntomas, siendo los aumentos más drásticos a los 8 ddi en las plantas inoculadas sin pretratar con quitosano comercial. Esto indica que estas actividades enzimáticas están asociadas al daño causado por el patógeno. Sin embargo, la inducción temprana de la actividad QUIT podría estar implicada en la contención de *B. squamosa* como se evidencia en el menor desarrollo de síntomas en las plantas tratadas con quitosano comercial.

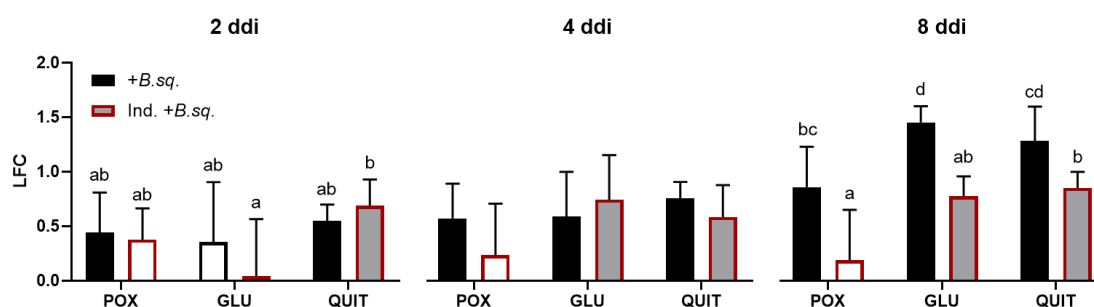


Figura 5.8. Cambios respecto al control a los 2, 4 y 8 ddi, expresados como LFC, en las actividades POX, GLU y QUIT en hojas de *A. cepa* var. Pantanoso enfrentadas a *B. squamosa* sin (+*B.sq.*) o con (ind. +*B.sq.*) pretratamiento con quitosano comercial. Las barras en blanco indican que no hubo cambios estadísticamente significativos respecto a la actividad enzimática del control. Se indica con letras diferencias estadísticamente significativas entre los LFC de las actividades para cada día ($p < 0,05$).

En *A. fistulosum*, que no desarrolló síntomas, la inoculación con la cepa Bs-UR05 provocó un aumento significativo en la actividad POX a partir de los 2ddi. Esto indica que esta actividad participa en una respuesta de defensa eficiente en *A. fistulosum* frente a *B. squamosa*. Es de señalar que en el análisis de las actividades de enzimas vinculadas al estrés oxidativo desarrollado en el apartado anterior no se observó este aumento en la actividad POX. En ese caso, se trató de muestras obtenidas de un ensayo con plantas de menos edad y se contó con un número menor de repeticiones lo que dificulta el establecimiento de diferencias significativas. Asimismo, la actividad POX se determinó con un sustrato alternativo (guayacol en lugar de *o*-dianisidina) como se describe en la sección 2.5.5. Se observó además en esta especie, que la actividad QUIT disminuyó en plantas expuestas al patógeno a los 2 ddi. Esto podría deberse a un mecanismo de inhibición de esta actividad por parte de *B. squamosa* ineficiente en su intento por colonizar las hojas de *A. fistulosum*. Han y colaboradores han postulado recientemente nuevos mecanismos en la interacción hospedero-patógeno que involucran la inhibición de la actividad o de la inducción de PRs, entre ellas las QUIT, de la planta [65]. De todas formas, parece ser claro que las QUIT no están implicadas en el éxito de *A. fistulosum* en contener el avance de *B. squamosa*.

Por último, en lo que refiere al perfil de isoformas de peroxidasas presentes en hojas, en la Figura 5.9 se presentan zimogramas basados en isoelectrenfoque. Se aprecia que

la inoculación con *B. squamosa* indujo la actividad de isoformas ácidas de POX en ambas especies con una mayor diversidad en Pantanoso. Mientras en ambas especies se indujo una isoforma de pI 3,5, en Pantanoso se indujeron además isoformas de pI 4,2 y 3,3. Estas tres isoformas ácidas inducidas por *B. squamosa* ya las habíamos observado en hojas de Pantanoso colonizadas por *Peronospora destructor* tomadas de cultivos a campo (imagen disponible en Anexo 5.IV). Nuestro grupo había reportado la inducción de una isoperoxidasa de pI aproximado a 3,5 en hojas de plántulas de Pantanoso expuestas a *F. oxysporum* [34]. Varios grupos han reportado la inducción de POX de pI cercano a 3,5 en distintas especies de plantas frente a distintos patógenos asignándoles roles vinculados a la lignificación de la pared celular en algunos casos y actividad microbiana en otros [84], [122], [129]. Nuestros resultados confirman que estas isoformas ácidas actúan como PRs pero no son determinantes del éxito de la planta en la contención del patógeno. En cuanto a las isoformas constitutivas, *A. fistulosum* presenta mayor diversidad de isoformas básicas presentando isoformas de pI 8,5; 8,2 y 7,9 que podrían estar implicadas en las respuestas de defensa eficientes frente a *B. squamosa*.

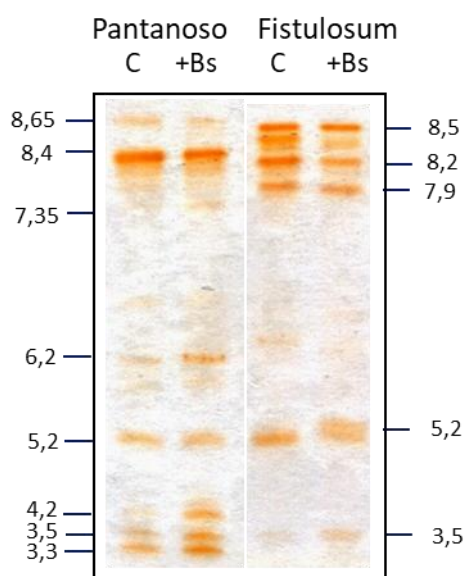


Figura 5.9. Perfiles de isoformas de POX obtenidos mediante zimogramas basados en isoelectroenfoque. Las muestras corresponden a hojas de Pantanoso y *A. fistulosum* no expuestas (C) y expuestas a *B. squamosa* (+Bs) a los 8 ddi. A los lados de las figuras se indican valores de pI de las bandas.

CAPÍTULO 6 – CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6.1 Conclusiones

Durante el desarrollo de esta Tesis de Maestría nos propusimos contribuir al conocimiento sobre el rol de enzimas vinculadas a la patogénesis (peroxidasas (POX), glucanasas (GLU) y quitinasas (QUIT)) en las respuestas de defensa de la cebolla (*Allium cepa*) y su especie emparentada *Allium fistulosum*, frente *Fusarium oxysporum* y *Botrytis squamosa*.

Para ello nos planteamos una serie de objetivos vinculados a hipótesis con relación a las cuales se detallan a continuación las principales conclusiones.

Objetivo 1 – Determinar las variaciones en las actividades enzimáticas POX, GLU y QUIT durante la germinación de cebolla y de A. fistulosum.

Hipótesis vinculada: Durante la germinación, las actividades POX, GLU y QUIT evolucionan de forma diferencial en *A. cepa* y *A. fistulosum*.

Se observó que *A. fistulosum* presenta una mayor velocidad de germinación y una mayor tasa de crecimiento relativa que *A. cepa* variedad Pantanoso por lo que sus plántulas son más vigorosas. Además, las plántulas de *A. fistulosum* presentaron aumentos más temprano en las actividades POX, GLU y QUIT en comparación con *A. cepa* y diferencias en los perfiles de isoformas de POX. Este mayor vigor en las plántulas y las diferencias en los cambios y perfiles de las actividades enzimáticas analizadas podrían vincularse a los mayores niveles de resistencia a FBR reportados para *A. fistulosum*.

En cuanto a la adquisición de resistencia temprana (a los 7 dds) a FBR en ambas especies, si bien los aumentos en las actividades enzimáticas fueron más tempranos en *A. fistulosum*, también *A. cepa* mostró aumentos similares para las actividades POX y GLU cuando se considera todo el período evaluado (0 a 7dds). Se observó que en ambas especies cambia el perfil de isoformas de POX en ese período, pasando a predominar las isoformas básicas, algunas de ellas con actividad en las radículas, las cuales podrían estar implicadas en mecanismos de defensa basal que aporten a su resistencia a FBR.

Objetivo 2- Determinar las variaciones en las actividades enzimáticas POX, GLU y QUIT a largo del ciclo de cultivo de cebolla.

Hipótesis vinculada: Los niveles de actividad de estas enzimas varían a lo largo del ciclo de cultivo de *A. cepa*, con cambios asociados a su estado fenológico.

De la evolución de las actividades enzimáticas durante el ciclo de cultivo de cuatro variedades de cebolla se concluye que las actividades QUIT y NAG podrían jugar un rol en el mantenimiento del bulbo como estructura de conservación y resistencia.

De las cuatro variedades evaluadas, Brava es la que presentó mayores diferencias. Mientras en las otras variedades las actividades QUIT y NAG aumentaron con la edad de la planta, en Brava no hubo correlación. El hecho de que esta variedad sea la más susceptible a *B. squamosa* de las cuatro, da indicios de que el bajo nivel de actividad de QUIT y NAG en hojas al final del ciclo de cultivo contribuye a su susceptibilidad.

De la evolución de las isoformas de POX se concluye que durante el desarrollo de la planta adulta predominan las isoformas básicas en todos los órganos quedando restringidas las isoformas ácidas a la raíz o a su expresión transitoria, presumiblemente en respuesta a algún tipo de estrés. La diversidad de isoformas disminuye al final del ciclo cuando se da la formación y crecimiento del bulbo. En la raíz, las isoformas ácidas presentan heterogeneidad en su glicosilación. Del seguimiento de las isoformas de POX durante la germinación y el ciclo de cultivo en *A. cepa*, se postula que la isoforma de pI 8,2 podría contribuir a la resistencia de la cebolla a FOC en la etapa de crecimiento de la planta.

En lo que refiere a diferencias en el perfil de isoformas de POX entre las distintas variedades, no se encontraron polimorfismos. Las diferencias, que fueron pocas, se encontraron en la edad de la planta a la que se producen los cambios en los perfiles de isoformas.

Objetivo 3- Estudiar la respuesta de A. cepa y A. fistulosum frente a F. oxysporum siguiendo la evolución de síntomas y los cambios de las actividades enzimáticas POX, GLU y QUIT.

Hipótesis vinculada: La exposición de *A. cepa* y *A. fistulosum* frente a *F. oxysporum* provoca aumentos en las actividades POX, GLU y QUIT con respuestas más intensas y/o tempranas en la especie más resistente.

Del desarrollo de síntomas frente a cepas de FOC de distinta virulencia, se concluye que la mayor resistencia de *A. fistulosum* a FBR con relación a *A. cepa*, si bien se da en general, no se cumple en todos los casos y esto depende de la variedad de cebolla evaluada, la cepa de *Fusarium* y el vigor de la semilla utilizada.

Frente a FOC, las actividades POX, GLU y QUIT aumentan en *A. cepa* y *A. fistulosum* en respuesta al daño causado por el patógeno, mostrando POX respuestas tempranas anteriores a la aparición de síntomas. En *A. cepa* las actividades POX y GLU estarían involucradas en respuestas de defensa capaces de detener el avance del patógeno, ante cepas de poca virulencia. En ninguna de las dos especies se inducen isoformas de POX específicas por la presencia del FOC, sin embargo, se observa la presencia más temprana de isoformas básicas en *A. fistulosum*.

Objetivos 4 y 5- Estudiar la respuesta de A. cepa y A. fistulosum frente a B.squamosa siguiendo la evolución de síntomas y los cambios de las actividades enzimáticas POX, GLU y QUIT. Evaluar el efecto del Biorend® (quitosano comercial) como inductor de resistencia en A. cepa y A. fistulosum frente a B.squamosa.

Hipótesis vinculadas: La exposición de *A. cepa* y *A. fistulosum* frente a *B. squamosa* provoca aumentos en las actividades POX, GLU y QUIT con respuestas más intensas y/o tempranas en la especie más resistente.

La aplicación de Biorend® previo a la inoculación con el patógeno reduce la severidad de los síntomas causados por *B. squamosa* en *A. cepa* y *A. fistulosum*, aumentando las actividades POX, GLU y QUIT y/o induciendo aumentos más intensos y/o tempranos luego de la inoculación.

A. fistulosum no se vio afectado por *B. squamosa* confirmando su alta resistencia a este patógeno. Los conidios de *B. squamosa* son capaces de germinar y formar apresorios sobre la epidermis de hojas de *A. fistulosum*, pero no logran colonizar con éxito el interior de la hoja.

La aplicación en *A. cepa* de quitosano comercial (Biorend®) tres días antes de la exposición al patógeno, limita el progreso de la enfermedad y reduce los síntomas de forma evidente a los 8 ddi. Del análisis de las imágenes generadas mediante microscopía óptica, se evidencia un retraso en el desarrollo de las estructuras invasivas del hongo en las plantas pretratadas con quitosano comercial. El efecto del quitosano comercial en la reducción de síntomas es mayor en plantas en etapa de bulbificación.

Con relación a las actividades enzimáticas, la aplicación en *A. cepa* de quitosano comercial, produjo un aumento en la actividad QUIT a los tres días de aplicado. Este aumento es transitorio no observándose dos días después. Esto confirma la acción como inductor de resistencia del Biorend® en el patosistema *A. cepa* – *B. squamosa*.

En *A. cepa*, frente a *B. squamosa* las actividades POX, GLU y QUIT estuvieron asociadas al daño causado por el patógeno aumentando a medida que progresó la enfermedad. Los aumentos fueron más tempranos en POX y QUIT que en GLU. La inducción temprana de la actividad QUIT por la aplicación de quitosano comercial podría estar implicada en la contención de *B. squamosa*. En *A. fistulosum*, la actividad POX participa en una respuesta de defensa eficiente frente a *B. squamosa*.

Con relación al perfil de isoperoxidasas, la exposición a *B. squamosa* indujo la actividad de isoformas ácidas de POX en ambas especies con una mayor diversidad en *Pantanosus*. Estas isoformas ácidas actúan como PRs pero no son determinantes del éxito de la planta en la contención del patógeno. En cuanto a las isoformas constitutivas, *A. fistulosum* presenta mayor diversidad de isoformas básicas presentando isoformas de pI 8,5; 8,2 y 7,9 que podrían estar implicadas en las respuestas de defensa eficientes frente a *B. squamosa*.

Del análisis de actividades enzimáticas vinculadas al estrés oxidativo, se evidenció que la aplicación de quitosano desata respuestas de defensa transitorias en *A. fistulosum* en las que están involucradas las APX. En *A. cepa*, las actividades CAT y POX aumentan en respuesta al daño causado por el patógeno. En *A. fistulosum*, la actividad CAT juega un rol en la contención efectiva del patógeno probablemente vinculado al metabolismo de las ROS.

6.2 Perspectivas

En estrecha relación con el trabajo realizado durante esta tesis, desde el Área Bioquímica del DepBio y el Departamento de Producción Vegetal del CRS hemos establecido una colaboración con el grupo que lidera la Dra. Silvana Alborés del Área Microbiología del DepBio de Facultad de Química. A través de esta colaboración participamos del proyecto FMV _2021_1 _167206, "Desarrollo de nanohíbridos para aplicaciones en el sector agrícola" (Responsable: Dra. S. Alborés) y como resultado de estos trabajos recientemente se publicó el artículo Nanomaterials for the control of the onion phytopathogen *Botrytis squamosa* [126].

En el marco de este proyecto utilizamos el antecedente de esta tesis de Maestría para estudiar el efecto de distintos compuestos basados en quitosano en el patosistema *A. cepa* - *B. squamosa*. Los compuestos utilizados fueron además del quitosano comercial (Biorend®), quitosano puro de sigma, nanopartículas de quitosano y nanohíbridos de plata-quitosano. Los ensayos se realizaron utilizando plantas adultas de cebolla de la variedad Regia (susceptible al patógeno) en dos momentos distintos de su desarrollo. Los resultados obtenidos fueron relevantes encontrando que nano compuestos basados en quitosano tienen efecto como inductores de resistencia.

Estos hallazgos abren la posibilidad de estudiar más en profundidad el uso de compuestos basados en quitosano en este y otros patosistemas, ajustando parámetros como la concentración, momento y frecuencia de aplicación y otros que sean de utilidad para su uso luego por los agricultores y continuar profundizando en las bases bioquímicas de la resistencia inducida.

El interés creciente en las alternativas al control químico en el manejo de las enfermedades de las plantas hace de la resistencia inducida un área en desarrollo. La identificación de compuestos amigables con el ambiente y la salud de las personas y la optimización de su uso como inductores de resistencia en distintos patosistemas son aportes imprescindibles para que se transformen una herramienta aplicable por los agricultores. La línea de trabajo desarrollada en esta tesis va en esa dirección.

ANEXOS

Anexo 3.I

% de germinación de semillas de *A. cepa* variedad Pantanoso y *A. fistulosum* hasta 7 días después de puestas a germinar

	Día	Repeticiones									% Germ	
		1			2			3				
		Germ	N	% Germ	Germ	N	% Germ	Germ	N	% Germ	$\bar{X}$	σ
<i>A. cepa</i> var. Pantanoso	1	3	100	3,0	0	100	0,0	0	100	0,0	1,0	1,7
	2	1	100	1,0	6	100	6,0	4	100	4,0	3,7	2,5
	4	97	100	97,0	97	100	97,0	97	100	97,0	97,0	0,0
	7	100	100	100,0	99	100	99,0	100	100	100,0	99,7	0,6
<i>A. fistulosum</i>	1	0	120	0,0	0	120	0,0	0	120	0,0	0,0	0,0
	2	42	110	38,2	57	115	49,6	62	110	56,4	48,0	9,2
	4	108	120	90,0	99	119	83,2	107	120	89,2	87,5	3,7
	7	98	105	93,3	105	115	91,3	98	105	93,3	92,7	1,2

N, total de semillas

Multiple t tests utilizando el método de Holm-Sidak de comparaciones múltiples.

Se comparan para cada día las **diferencias en los porcentajes de germinación entre ambas especies.**

Día	Significant?	P value	Mean of Pantanoso	Mean of Fistulosum	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P Value
1	No	0,3739	1	0	1	1	1	4	0,373901
2	Yes	0,0013	3,67	48,1	-44,4	5,5	8,07	4	0,003845
4	Yes	0,0113	97	87,5	9,53	2,15	4,44	4	0,022491
7	Yes	0,0007	99,7	92,6	7,03	0,745	9,44	4	0,00281

Anexo 3.II

Peso Fresco de semillas y plántulas de *A. cepa* variedad Pantanoso y *A. fistulosum* hasta 7 días después de puestas a germinar

		Repeticiones										
		1			2			3			mg/pl	
	Día	Peso (mg)	N	Peso/pl (mg)	Peso (mg)	N	Peso/pl (mg)	Peso (mg)	N	Peso/pl (mg)	$\bar{X}$	σ
<i>A. cepa</i> var. Pantanoso	0*	214	50	4,28	195	50	3,90	212	50	4,24	4,14	0,21
	1	713	100	7,13	727	100	7,27	656	100	6,56	6,99	0,38
	2	749	100	7,49	743	100	7,43	702	100	7,02	7,31	0,26
	4	919	100	9,19	906	100	9,06	943	100	9,43	9,23	0,19
	7	1801	100	18,01	1849	100	18,49	1818	100	18,18	18,23	0,24
<i>A.</i> <i>fistulosum</i>	0*	105	50	2,10	100	50	2,00	105	50	2,10	2,07	0,06
	1	479	120	3,99	431	120	3,59	461	120	3,84	3,81	0,20
	2	441	110	4,01	503	115	4,37	486	110	4,42	4,27	0,22
	4	694	120	5,78	629	119	5,29	684	120	5,70	5,59	0,27
	7	1254	105	11,94	1351	115	11,75	1330	105	12,67	12,12	0,48

* Día 0 corresponde al peso de las semillas

Los análisis estadísticos son en base a los datos de los días 1 a 7.

	Pantanoso	Fistulosum	Criterio de Información de Akaike	
k different for each data set			Comparison of Fits	
Best-fit values			Simpler model	k same for all data sets
Y0	5,046	2,675	Probability it is correct	40,75%
k	0,1808	0,2137	Alternative model	k different for each data set
Doubling Time	3,834	3,243	Probability it is correct	59,25%
Std. Error			Ratio of probabilities	1,45
Y0	0,3093	0,1832	Preferred model	k different for each data set
k	0,0105	0,0113	Difference in AICc	0,7483
Goodness of Fit				
Degrees of Freedom	10	10	Prueba F	
R square	0,9693	0,9764	Comparison of Fits	
Absolute Sum of Squares	7,743	3,177	Null hypothesis	k same for all data sets
Sy.x	0,8799	0,5637	Alternative hypothesis	k different for each data set
			P value	0,0722
k same for all data sets			Conclusion (alpha = 0.05)	Do not reject null hypothesis
Best-fit values			Preferred model	k same for all data sets
Y0	4,795	3,052	F (DFn, DFd)	3,604 (1, 20)
k	0,1901	0,1901		
Doubling Time	3,646	3,646		
Std. Error				
Y0	0,233	0,1656		
k	0,008026	0,008026		
Goodness of Fit				
Degrees of Freedom (Global)		21		
R square	0,967	0,966		
Absolute Sum of Squares	8,312	4,576		

Anexo 3.III

Actividades enzimáticas en semillas y plántulas de *A. cepa* variedad Pantanoso y *A. fistulosum* durante la germinación

	Día	Actividades enzimáticas (UE/g)									
		Peroxidasas					Glucanasas				
		1	2	3	$\bar{X}$	σ	1	2	3	$\bar{X}$	σ
<i>A. cepa</i> var. Pantanoso	0*	1,1	1,0	1,5	1,2	0,3	0,3	0,0	0,0	0,1	0,1
	1	2,0	2,0	1,9	2,0	0,1	0,4	0,4	1,2	0,7	0,4
	2	2,6	2,7	2,7	2,7	0,1	0,3	0,8	0,6	0,6	0,2
	4	7,0	10,1	11,5	9,5	2,3	6,6	7,5	9,5	7,8	1,5
	7	25,6	29,7	31,3	28,9	2,9	19,9	19,1	18,3	19,1	0,8
<i>A. fistulosum</i>	0*	0,3	0,3	0,3	0,3	0,0	0,1	0,0	0,3	0,1	0,2
	1	0,4	0,3	0,4	0,4	0,1	1,6	0,2	0,2	0,7	0,8
	2	1,1	0,9	1,0	1,0	0,1	0,9	0,2	0,3	0,5	0,4
	4	17,7	12,0	17,9	15,9	3,4	15,6	16,3	10,6	14,2	3,1
	7	25,6	29,0	28,7	27,8	1,9	18,4	21,2	16,3	18,6	2,5

Se presentan los resultados en UE por gramo de tejido liofilizado para cada una de las tres repeticiones y los promedios correspondientes con su desvío estándar.

Cada valor se obtuvo de realizar los ensayos enzimáticos por triplicado.

La definición de UE para cada actividad se puede encontrar en la sección 2.5 de Materiales y Métodos.

* Día 0 corresponde a las actividades en semillas

Mutiple t-test para POX. Se comparan las actividades de cada día entre las dos especies

	Significant?	P value	Mean of Pantanoso	Mean of Fistulosum	Difference	SE of difference	t ratio	df
Día 0	Yes	0,00415	1,2	0,3	0,9	0,15	5,9	4
Día 1	Yes	0,000004	2	0,37	1,6	0,047	34	4
Día 2	Yes	0,000015	2,7	1	1,7	0,067	25	4
Día 4	No	0,054186	9,5	16	-6,3	2,3	2,7	4
Día 7	No	0,614233	29	28	1,1	2	0,55	4

Post Anova Uncorrected Fisher's LSD test. Diferencias en la actividad POX en días consecutivos de muestro en Pantanoso

Alpha	0,05					
Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Individual P Value	
Día 0 vs. Día 1	-0,77	-1,6 to 0,032	No	ns	0,0539	
Día 1 vs. Día 2	-0,7	-0,95 to -0,45	Yes	**	0,0067	
Día 2 vs. Día 4	-6,9	-12 to -1,3	Yes	*	0,0339	
Día 4 vs. Día 7	-19	-21 to -18	Yes	***	0,0004	

Post Anova Uncorrected Fisher's LSD test. Diferencias en la actividad POX en días consecutivos de muestro en Fistulosum

Alpha	0,05					
Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Individual P Value	
Día 0 vs. Día 1	-0,067	-0,21 to 0,077	No	ns	0,1835	
Día 1 vs. Día 2	-0,63	-0,78 to -0,49	Yes	**	0,0028	
Día 2 vs. Día 4	-15	-23 to -6,8	Yes	*	0,0157	
Día 4 vs. Día 7	-12	-23 to -0,35	Yes	*	0,0473	

Mutiple t-test para GLU. Se comparan las actividades de cada día entre las dos especies

	Significant?	P value	Mean of Pantanoso	Mean of Fistulosum	Difference	SE of difference	t ratio	df
Día 0	No	0,758	0,1	0,15	-0,043	0,13	0,33	4
Día 1	No	0,9672	0,68	0,7	-0,023	0,53	0,044	4
Día 2	No	0,7007	0,55	0,45	0,1	0,25	0,41	4
Día 4	Yes	0,0337	7,8	14	-6,3	2	3,2	4
Día 7	No	0,7858	19	19	0,44	1,5	0,29	4

Post Anova Uncorrected Fisher's LSD test. Diferencias en la actividad GLU en días consecutivos de muestro en Pantanoso

Alpha	0,05				
Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
Día 0 vs. Día 1	-0,57	-1,8 to 0,68	No	ns	0,1883
Día 1 vs. Día 2	0,12	-1,0 to 1,3	No	ns	0,6912
Día 2 vs. Día 4	-7,3	-11 to -3,8	Yes	*	0,012
Día 4 vs. Día 7	-11	-17 to -5,6	Yes	*	0,0133

Post Anova Uncorrected Fisher's LSD test. Diferencias en la actividad GLU en días consecutivos de muestro en Fistulosum

Alpha	0,05				
Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
Día 0 vs. Día 1	-0,55	-2,7 to 1,6	No	ns	0,3878
Día 1 vs. Día 2	0,25	-0,88 to 1,4	No	ns	0,4401
Día 2 vs. Día 4	-14	-21 to -6,2	Yes	*	0,0157
Día 4 vs. Día 7	-4,5	-8,3 to -0,60	Yes	*	0,0381

Mutiple t-test para QUIT. Se comparan las actividades de cada día entre las dos especies

	Significant?	P value	Mean of Pantanoso	Mean of Fistulosum	Difference	SE of difference	t ratio	df
Día 0	No	0,7313	49	50	-1,8	4,9	0,38	3
Día 1	No	0,3739	63	54	9,3	9,3	1	4
Día 2	No	0,1988	63	53	10	6,7	1,5	4
Día 4	Yes	0,007	45	75	-30	5,9	5,1	4
Día 7	Yes	0,0011	37	66	-29	3,4	8,4	4

Post Anova Uncorrected Fisher's LSD test. Diferencias en la actividad QUIT en días consecutivos de muestro en Pantanoso

Alpha	0,05				
Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
Día 0 vs. Día 1	-15	-27 to -2,6	Yes	*	0,0225
Día 1 vs. Día 2	0	-11 to 11	No	ns	>0,9999
Día 2 vs. Día 4	18	7,4 to 29	Yes	**	0,0042
Día 4 vs. Día 7	8,3	-2,6 to 19	No	ns	0,1183

Post Anova Uncorrected Fisher's LSD test. Diferencias en la actividad QUIT en días consecutivos de muestro en Fistulosum

Alpha	0,05				
Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
Día 0 vs. Día 1	-3,7	-20 to 13	No	ns	0,6354
Día 1 vs. Día 2	1	-16 to 18	No	ns	0,8965
Día 2 vs. Día 4	-22	-39 to -5,3	Yes	*	0,0149
Día 4 vs. Día 7	9,3	-7,4 to 26	No	ns	0,2416

Cambios en las actividades enzimáticas (LFC) de *A. cepa* variedad Pantanoso y *A. fistulosum* durante la germinación

		LFC de las actividades enzimáticas entre días consecutivos de muestreo														
		Peroxidasas					Glucanasas					Quitinasas				
		1	2	3	$\bar{X}$	σ	1	2	3	$\bar{X}$	σ	1	2	3	$\bar{X}$	σ
Período	0 - 1	0,7	0,7	0,7	0,7	0,0	2,1	2,0	3,5	2,6	0,8	0,3	0,2	0,6	0,4	0,2
	1 - 2	0,4	0,5	0,5	0,4	0,0	-1,2	0,2	-0,2	-0,4	0,7	0,1	0,0	-0,2	0,0	0,1
	2 - 4	1,4	1,9	2,1	1,8	0,4	3,6	3,8	4,1	3,8	0,3	-0,4	-0,6	-0,5	-0,5	0,1
	4 - 7	1,4	1,6	1,7	1,6	0,2	1,3	1,3	1,2	1,3	0,1	-0,3	-0,3	-0,4	-0,3	0,1
<i>A. fistulosum</i>	0 - 1	0,4	-0,1	0,5	0,3	0,4	3,5	0,7	0,5	1,6	1,6	0,0	-0,2	0,4	0,1	0,3
	1 - 2	1,6	1,3	1,5	1,5	0,2	0,3	-1,7	-1,4	-0,9	1,1	-0,1	-0,3	0,3	0,0	0,3
	2 - 4	4,1	3,6	4,2	4,0	0,3	5,1	5,2	4,6	4,9	0,3	0,5	0,7	0,3	0,5	0,2
	4 - 7	0,7	0,9	0,9	0,8	0,1	0,4	0,6	0,2	0,4	0,2	-0,3	-0,1	-0,1	-0,2	0,1

Se presentan los resultados de LFC (log fold change) de las actividades enzimáticas entre días consecutivos de muestreo para ambas especies. En negrita se destacan valores correspondientes a cambios significativos de la actividad en el período evaluado. Los resultados corresponden, para cada repetición, al $\log_2$ del cociente entre la actividad al final del período sobre el promedio de la actividad al comienzo del período.

Mutiple t-test para variaciones en POX. Se comparan los LFC de cada período entre las dos especies

Período	Significant?	P value	Mean of Pantanoso	Mean of Fistulosum	Difference	SE of difference	t ratio	df
0 - 1	No	0,104808	0,7	0,26	0,44	0,21	2,1	4
1 - 2	Yes	0,000368	0,44	1,5	-1	0,091	11	4
2 - 4	Yes	0,001725	1,8	4	-2,1	0,29	7,5	4
4 - 7	Yes	0,001655	1,6	0,8	0,79	0,1	7,5	4

Mutiple t-test para variaciones en GLU. Se comparan los LFC de cada período entre las dos especies

Período	Significant?	P value	Mean of Pantanoso	Mean of Fistulosum	Difference	SE of difference	t ratio	df
0 - 1	No	0,409379	2,6	1,6	0,98	1,1	0,92	4
1 - 2	No	0,515915	-0,39	-0,92	0,53	0,74	0,71	4
2 - 4	Yes	0,010757	3,8	4,9	-1,1	0,25	4,5	4
4 - 7	Yes	0,001471	1,3	0,38	0,9	0,12	7,8	4

Mutiple t-test para variaciones en QUIT. Se comparan los LFC de cada período entre las dos especies

Período	Significant?	P value	Mean of Pantanoso	Mean of Fistulosum	Difference	SE of difference	t ratio	df
0 - 1	No	0,25614	0,39	0,08	0,31	0,23	1,3	4
1 - 2	No	0,862281	-0,0033	-0,037	0,033	0,18	0,18	4
2 - 4	Yes	0,001332	-0,5	0,49	-0,98	0,12	8	4
4 - 7	No	0,257627	-0,3	-0,19	-0,11	0,083	1,3	4

Anexo 3.IV

Actividades enzimáticas durante el ciclo de cultivo de cuatro variedades de *A. cepa*.

	POX							GLU						
	30-May	30-Jun	4-Ago	9-set	8-Oct	17-Nov	12-Dic	30-May	30-Jun	4-Ago	9-set	8-Oct	17-Nov	12-Dic
Pantanoso	<i>44</i>	<i>75</i>	<i>110</i>	<i>146</i>	<i>175</i>	<i>215</i>	<i>240</i>	<i>44</i>	<i>75</i>	<i>110</i>	<i>146</i>	<i>175</i>	<i>215</i>	<i>240</i>
Raíz	153	196	292	290	344	173	252	78	78	66	43	71	40	88
Tallo	34	27	16	14	21	7	3	25	19	2	3	4	2	3
Hojas	58	52	35	19	23	20	29	13	22	19	14	44	43	21
Casera	<i>63</i>	<i>94</i>	<i>129</i>	<i>165</i>	<i>194</i>	<i>234</i>		<i>63</i>	<i>94</i>	<i>129</i>	<i>165</i>	<i>194</i>	<i>234</i>	
Raíz	144	184	378	210	243	171		59	67	22	27	68	34	
Tallo	24	16	31	14	6	5		11	8	6	2	2	0	
Hojas	66	33	39	31	25	55		17	19	25	23	56	47	
Naqué	<i>63</i>	<i>94</i>	<i>129</i>	<i>165</i>	<i>194</i>	<i>234</i>		<i>63</i>	<i>94</i>	<i>129</i>	<i>165</i>	<i>194</i>	<i>234</i>	
Raíz	111	114	264	229	187	168		66	59	65	22	52	24	
Tallo	16	8	7	8	5	3		3	13	3	2	3	0	
Hojas	58	36	12	21	21	50		25	35	22	29	58	36	
Brava		<i>56</i>	<i>91</i>	<i>127</i>	<i>156</i>	<i>196</i>	<i>221</i>		<i>56</i>	<i>91</i>	<i>127</i>	<i>156</i>	<i>196</i>	<i>221</i>
Raíz		174	287	218	201	129	267		96	62	22	40	34	28
Tallo		77	38	8	10	10	3		47	13	0	3	0	2
Hojas		143	62	13	52	24	58		54	28	6	26	16	46

Se presentan las actividades peroxidasa (POX) y β -1,3-glucanasa (GLU) en distintos órganos para cuatro variedades de cebolla según fecha de muestreo.

Las actividades se expresan en UE/g. En cursiva se indica la edad de la planta en dds.

Actividades enzimáticas durante el ciclo de cultivo de cuatro variedades de *A. cepa*.

	QUIT							NAG						
	30-May	30-Jun	4-Ago	9-set	8-Oct	17-Nov	12-Dic	30-May	30-Jun	4-Ago	9-set	8-Oct	17-Nov	12-Dic
Pantanoso	<i>44</i>	<i>75</i>	<i>110</i>	<i>146</i>	<i>175</i>	<i>215</i>	<i>240</i>	<i>44</i>	<i>75</i>	<i>110</i>	<i>146</i>	<i>175</i>	<i>215</i>	<i>240</i>
Raíz	129	137	185	226	266	219	371	1027	606	1255	1375	1717	856	580
Tallo	115	95	74	65	85	25	33	834	376	367	273	479	176	195
Hojas	85	142	135	175	227	217	222	457	599	810	561	960	1090	831
Casera	<i>63</i>	<i>94</i>	<i>129</i>	<i>165</i>	<i>194</i>	<i>234</i>		<i>63</i>	<i>94</i>	<i>129</i>	<i>165</i>	<i>194</i>	<i>234</i>	
Raíz	125	146	187	226	272	244		991	620	1354	921	668	770	
Tallo	59	75	106	61	28	30		375	276	615	360	330	246	
Hojas	112	164	207	215	289	313		531	401	956	491	1040	1112	
Naqué	<i>63</i>	<i>94</i>	<i>129</i>	<i>165</i>	<i>194</i>	<i>234</i>		<i>63</i>	<i>94</i>	<i>129</i>	<i>165</i>	<i>194</i>	<i>234</i>	
Raíz	165	130	282	248	369	261		1068	708	1389	1076	1529	508	
Tallo	82	92	78	69	60	38		351	285	271	304	420	154	
Hojas	124	179	117	250	227	213		534	632	617	599	1256	1061	
Brava		<i>56</i>	<i>91</i>	<i>127</i>	<i>156</i>	<i>196</i>	<i>221</i>		<i>56</i>	<i>91</i>	<i>127</i>	<i>156</i>	<i>196</i>	<i>221</i>
Raíz		211	154	130	254	196	170		821	893	500	770	574	647
Tallo		82	97	31	41	45	24		654	449	146	44	214	105
Hojas		201	145	100	238	109	167		699	641	305	679	390	634

Se presentan las actividades quitinasa (QUIT) y N-acetil- β -glucosaminidasa (NAG) en distintos órganos para cuatro variedades de cebolla según fecha de muestreo.

Las actividades se expresan en UE/g. En cursiva se indica la edad de la planta en dds.

Anexo 4.I

Conteo de plantines totales y normales de *A. cepa* variedad Pantanoso y *A. fistulosum* expuestos a FOC (cepas UR06 y NL93186)

Día 7		Plantines Totales					X	σ	Plantines Normales					X	σ
A. fistulosum	Control	17	20	21	21	20	19,3	2,3	17	19	19	20	20	18,6	2,2
		23	17	16	19				22	15	16	19			
	+ NL93186	15	14	16	17	10	15,4	3,4	11	12	14	15	8	13,1	3,1
		17	11	21	18				14	10	18	16			
	+UR06	20	19	18	21	15	17,4	3,1	18	18	18	19	13	15,8	3,1
		14	18	20	12				12	15	18	11			
Pantanoso	Control	28	28	30	28	29	28,7	0,9	28	28	30	26	28	28,0	1,5
		30	28	29	28				30	27	29	26			
	+ NL93186	24	28	23	24	24	24,1	2,8	21	26	19	20	19	19,9	3,7
		18	25	24	27				12	21	19	22			
	+ UR06	28	27	27	29	27	27,9	0,9	26	27	27	27	26	27,1	1,2
		29	28	27	29				29	27	26	29			
Día 11		Plantines Totales					X	σ	Plantines Normales					X	σ
A. fistulosum	Control	22	16	23	19	18	20,4	2,7	19	14	18	16	16	17,0	1,8
		20	23	24	19				16	19	19	16			
	+ NL93186	10	12	7	8	6	10,1	2,8	3	5	2	5	1	4,6	2,6
		12	14	13	9				4	10	5	6			
	+ UR06	8	18	15	15	14	15,7	3,4	5	16	13	12	9	11,9	3,5
		16	18	20	17				11	11	16	14			
Pantanoso	Control	28	29	29	29	28	28,0	1,4	28	27	28	25	26	25,6	3,1
		26	27	30	26				21	26	29	20			
	+ NL93186	9	9	1	14	8	8,6	5,2	6	5	0	6	3	4,1	3,1
		2	18	8	8				0	10	3	4			
	+ UR06	30	26	28	28	29	27,8	1,8	26	23	26	25	26	25,2	2,0
		28	29	28	24				23	29	26	23			

Diferencias en el conteo de plantines normales el Día 7 en Pantanoso.

Alpha	0,05			
Holm-Sidak's multiple comparisons test Mean Diff, Significant? Summary Adjusted P Value				
Control vs. +UR06	0,8889	No	ns	0,4390
Control vs. +NL93186	8,111	Yes	****	<0,0001
+UR06 vs. +NL93186	7,222	Yes	****	<0,0001

Diferencias en el conteo de plantines normales el Día 11 en Pantanoso.

Alpha	0,05			
Holm-Sidak's multiple comparisons test Mean Diff, Significant? Summary Adjusted P Value				
Control vs. +UR06	0,3333	No	ns	0,8030
Control vs. +NL93186	21,44	Yes	****	<0,0001
+UR06 vs. +NL93186	21,11	Yes	****	<0,0001

Diferencias en el conteo de plantines normales el Día 7 en *A. fistulosum*.

Alpha	0,05			
Holm-Sidak's multiple comparisons test Mean Diff, Significant? Summary Adjusted P Value				
Control vs. +UR06	2,778	Yes	*	0,0484
Control vs. +NL93186	5,444	Yes	***	0,0009
+UR06 vs. +NL93186	2,667	No	ns	0,0945

Diferencias en el conteo de plantines normales el Día 11 en *A. fistulosum*.

Alpha	0,05			
Holm-Sidak's multiple comparisons test Mean Diff, Significant? Summary Adjusted P Value				
Control vs. +UR06	5,111	Yes	***	0,0005
Control vs. +NL93186	12,44	Yes	****	<0,0001
+UR06 vs. +NL93186	7,333	Yes	****	<0,0001

Diferencias en el conteo de plantines totales el Día 7 en Pantanoso.

Alpha	0,05			
Holm-Sidak's multiple comparisons test Mean Diff, Significant? Summary Adjusted P Value				
Control vs. +UR06	0,7778	No	ns	0,3624
Control vs. +NL93186	4,556	Yes	****	<0,0001
+UR06 vs. +NL93186	3,778	Yes	***	0,0003

Diferencias en el conteo de plantines totales el Día 11 en Pantanoso.

Alpha	0,05			
Holm-Sidak's multiple comparisons test Mean Diff, Significant? Summary Adjusted P Value				
Control vs. +UR06	0,2222	No	ns	0,8877
Control vs. +NL93186	19,44	Yes	****	<0,0001
+UR06 vs. +NL93186	19,22	Yes	****	<0,0001

Diferencias en el conteo de plantines totales el Día 7 en *A. fistulosum*.

Alpha	0,05			
Holm-Sidak's multiple comparisons test Mean Diff, Significant? Summary Adjusted P Value				
Control vs. +UR06	1,889	No	ns	0,3057
Control vs. +NL93186	3,889	Yes	*	0,0314
+UR06 vs. +NL93186	2,000	No	ns	0,3057

Diferencias en el conteo de plantines totales el Día 11 en *A. fistulosum*.

Alpha	0,05			
Holm-Sidak's multiple comparisons test Mean Diff, Significant? Summary Adjusted P Value				
Control vs. +UR06	4,778	Yes	**	0,0024
Control vs. +NL93186	10,33	Yes	****	<0,0001
+UR06 vs. +NL93186	5,556	Yes	**	0,0012

Anexo 4.II

Índices de enfermedad (IE) en *A. cepa* variedad Pantanoso y *A. fistulosum* expuestos a FOC (cepas UR06 y NL93186).

Calculados a partir de conteo de plantines totales (IE totales) y plantines normales (IE normales).

Día 7		IE totales					X	σ	IE Normales					X	σ
<i>A. fistulosum</i>	+NL93186	0,22	0,28	0,17	0,12	0,48	0,20	0,18	0,41	0,35	0,25	0,19	0,57	0,29	0,17
		0,12	0,43	-0,09	0,07				0,25	0,46	0,03	0,14			
	+ UR06	-0,03	0,02	0,07	-0,09	0,22	0,10	0,16	0,03	0,03	0,03	-0,02	0,3	0,15	0,17
		0,28	0,07	-0,03	0,38				0,35	0,19	0,03	0,41			
Pantanoso	+NL93186	0,16	0,02	0,2	0,16	0,16	0,16	0,10	0,25	0,07	0,32	0,29	0,32	0,29	0,13
		0,37	0,13	0,16	0,06				0,57	0,25	0,32	0,21			
	+ UR06	0,02	0,06	0,06	-0,01	0,06	0,03	0,03	0,07	0,04	0,04	0,04	0,07	0,03	0,04
		-0,01	0,02	0,06	-0,01				-0,04	0,04	0,07	-0,04			

Día 11		IE totales					X	σ	IE Normales					X	σ
<i>A. fistulosum</i>	+NL93186	0,51	0,41	0,66	0,61	0,71	0,51	0,14	0,82	0,71	0,88	0,71	0,94	0,73	0,15
		0,41	0,32	0,36	0,56				0,76	0,41	0,71	0,65			
	+ UR06	0,61	0,12	0,27	0,27	0,32	0,23	0,17	0,71	0,06	0,24	0,29	0,47	0,30	0,20
		0,22	0,12	0,02	0,17				0,35	0,35	0,06	0,18			
Pantanoso	+NL93186	0,68	0,68	0,96	0,5	0,71	0,69	0,19	0,77	0,8	1	0,77	0,88	0,84	0,12
		0,93	0,36	0,71	0,71				1	0,61	0,88	0,84			
	+ UR06	-0,07	0,07	0	0	-0,04	0,01	0,06	-0,02	0,1	-0,02	0,02	-0,02	0,01	0,08
		0	-0,04	0	0,14				0,1	-0,13	-0,02	0,1			

Se presentan los resultados de análisis estadísticos para los IE calculados a partir del conteo de plantines normales.

Diferencias entre Pantanoso y *A. fistulosum* en el IE frente a UR06.

Holm-Sidak's multiple comparisons test. Alpha 0,05.

	Significant?	P value	Mean of Fistulosum	Mean of Pantanoso	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P Value
Día 7 Yes		0,0482	0,152	0,0322	0,120	0,0561	2,14	16,0	0,04825
Día 11 Yes		0,0011	0,301	0,0122	0,289	0,0729	3,96	16,0	0,00224

Diferencias entre Pantanoso y *A. fistulosum* en el IE frente a NL93186.

Holm-Sidak's multiple comparisons test. Alpha 0,05.

	Significant?	P value	Mean of Fistulosum	Mean of Pantanoso	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P Value
Día 7 No		0,938983	0,2944	0,2889	0,005556	0,07144	0,07776	16,00	0,938983
Día 11 No		0,120325	0,7322	0,8389	-0,1067	0,06500	1,641	16,00	0,226172

Diferencias en IE en Pantanoso según cepa de FOC.

Holm-Sidak's multiple comparisons test. Alpha 0,05.

	Significant?	P value	Mean of +NL93186	Mean of +UR06	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P Value
Día 7 Yes		<0,0001	0,29	0,032	0,26	0,046	5,5	16	<0,0001
Día 11 Yes		9,6228e-012	0,84	0,012	0,83	0,048	17	16	1,9245e-011

Diferencias en IE en *A. fistulosum* según cepa de FOC.

Holm-Sidak's multiple comparisons test. Alpha 0,05.

	Significant?	P value	Mean of +NL93186	Mean of +UR06	Difference	SE of difference	t ratio	df	Adjusted P Value
Día 7 No		0,0877	0,29	0,15	0,14	0,078	1,8	16	0,0877
Día 11 Yes		0,0001	0,73	0,30	0,43	0,085	5,1	16	0,0002

Anexo 4.III

Actividades enzimáticas en plántulas de *A. cepa* variedad Pantanoso y *A. fistulosum* expuestas a FOC (cepas UR06 y NL93186)

			Actividades enzimáticas (UE/g)														
			Peroxidasas					Glucanasas					Quitinasas				
dds	Tratamiento		1	2	3	$\bar{X}$	σ	1	2	3	$\bar{X}$	σ	1	2	3	$\bar{X}$	σ
A. cepa var. Pantanoso	3	Control	1,5	1,3		1,4	0,2	1,8	2,3		2,1	0,3	74	72		73	1
		+ UR06	2,0	3,0		2,5	0,7	1,3	2,6		1,9	0,9	73	58		65	11
		+ 93186	1,9	3,0		2,5	0,8	2,5	1,1		1,8	1,0	72	57		64	11
	7	Control	27	23		25	3	89	88	92	90	2	206	213	236	218	15
		+ UR06	41	36	35	37	3	120	101	101	107	11	214	228	288	243	40
		+ 93186	69	58	59	62	6	153	148	138	146	8	481	410	308	400	87
	11	Control	25	18	29	24	5		89	87	88	1		249	306	277	41
		+ UR06	33	31		32	1	92	85		89	5	308	254		281	38
	A. fistulosum	3	Control	1,0	1,2		1,1	0,1	1,2	1,6		1,4	0,3	53	65		59
+ UR06			1,5	2,0		1,8	0,4	1,4	1,7		1,6	0,2	64	59		62	4
+ 93186			1,6	2,1		1,9	0,4	1,8	1,5		1,7	0,2	73	64		69	6
7		Control	10	11		10	0,7	111	127		119	12	268	295		281	19
		+ UR06	19	15		17	2,3	139	131		135	5	412	386		399	19
		+ 93186	34	38		36	2,5	177	145		161	23	542	503		523	27
11		Control	9,0	10		9,3	0,4	121	132		127	8	251	292		272	29
		+ UR06	12	10		11	1,9	113	123		118	7	356	329		343	19

Se presentan los resultados en UE por gramo de tejido liofilizado (UE/g) para cada repetición y los promedios correspondientes con su desvío estándar. Cada valor se obtuvo de realizar los ensayos enzimáticos por triplicado. La definición de UE para cada actividad se puede encontrar en la sección 2.5 de Materiales y Métodos.

Se presentan para cada especie, análisis estadísticos que comparan para cada día y actividad resultados entre el tratamiento control y los inoculados con FOC (Multiple t-test). Para los 7 dds se compara para cada actividad los resultados de los tres tratamientos entre sí (ANOVA)

Mutiple t-test para POX Pantanso. Se comparan las actividades de cada día entre el Control y +UR06

dds	Significant?	P value	Mean of Control	Mean of +UR06	Difference	SE of difference	t ratio	df
3	No	0,1637	1,4	2,5	-1,1	0,51	2,2	2
7	Yes	0,0227	25	37	-12	2,8	4,3	3
11	No	0,1418	24	32	-8	4	2	3

Mutiple t-test para POX Pantanso. Se comparan las actividades de cada día entre el Control y +NL93186

dds	Significant?	P value	Mean of Control	Mean of +NL93186	Difference	SE of difference	t ratio	df
3	No	0,2011	1,4	2,5	-1,1	0,56	1,9	2
7	Yes	0,0043	25	62	-37	4,8	7,8	3

Post Anova Holm-Sidak's multiple comparisons test. Diferencias entre tratamientos para la actividad POX Pantanso 7 dds

Holm-Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Control vs. +UR06	-12,3	Yes	*	0,0281
Control vs. +NL93186	-36,9	Yes	***	0,0008
+UR06 vs. +NL93186	-24,6	Yes	**	0,002

Mutiple t-test para GLU Pantanso. Se comparan las actividades de cada día entre el Control y +UR06

dds	Significant?	P value	Mean of Control	Mean of +UR06	Difference	SE of difference	t ratio	df
3	No	0,839	2,1	1,9	0,15	0,65	0,23	2
7	No	0,0519	90	107	-18	6,4	2,7	4
11	No	0,9033	88	89	-0,5	3,6	0,14	2

Mutiple t-test para GLU Pantanso. Se comparan las actividades de cada día entre el Control y +NL93186

dds	Significant?	P value	Mean of Control	Mean of +NL93186	Difference	SE of difference	t ratio	df
3	No	0,7686	2,1	1,8	0,25	0,74	0,34	2
7	Yes	0,0002	90	146	-57	4,6	12	4

Post Anova Holm-Sidak's multiple comparisons test. Diferencias entre tratamientos para la actividad GLU Pantanso 7 dds

Holm-Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Control vs. +UR06	-17,7	Yes	*	0,0324
Control vs. +NL93186	-56,7	Yes	***	0,0003
+UR06 vs. +NL93186	-39	Yes	**	0,0017

Mutiple t-test para QUIT Pantanoso. Se comparan las actividades de cada día entre el Control y +UR06

dds	Significant?	P value	Mean of Control	Mean of +UR06	Difference	SE of difference	t ratio	df
3	No	0,426	73	66	7,5	7,6	0,99	2
7	No	0,3641	218	243	-25	24	1	4
11	No	0,9371	278	281	-3,5	39	0,089	2

Mutiple t-test para QUIT Pantanoso. Se comparan las actividades de cada día entre el Control y +NL93186

dds	Significant?	P value	Mean of Control	Mean of +NL93186	Difference	SE of difference	t ratio	df
3	No	0,378	73	65	8,5	7,6	1,1	2
7	Yes	0,0234	218	400	-182	51	3,6	4

Post Anova Holm-Sidak's multiple comparisons test. Diferencias entre tratamientos para la actividad QUIT Pantanoso 7 dds

Holm-Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Control vs. +UR06	-25	No	ns	0,6024
Control vs. +NL93186	-182	Yes	*	0,0214
+UR06 vs. +NL93186	-157	Yes	*	0,0274

Mutiple t-test para POX Fistulosum. Se comparan las actividades de cada día entre el Control y +UR06

dds	Significant?	P value	Mean of Control	Mean of +UR06	Difference	SE of difference	t ratio	df
3	No	0,1372	1,1	1,8	-0,65	0,27	2,4	2
7	No	0,0616	11	17	-6,6	1,7	3,8	2
11	No	0,3413	9,3	11	-1,7	1,4	1,2	2

Mutiple t-test para POX Fistulosum. Se comparan las actividades de cada día entre el Control y +NL93186

dds	Significant?	P value	Mean of Control	Mean of +NL93186	Difference	SE of difference	t ratio	df
3	No	0,1083	1,1	1,9	-0,75	0,27	2,8	2
7	Yes	0,0065	11	36	-26	2,1	12	2

Post Anova Holm-Sidak's multiple comparisons test. Diferencias entre tratamientos para la actividad POX Fistulosum 7 dds

Holm-Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Control vs. +UR06	-6,61	Yes	*	0,0459
Control vs. +NL93186	-25,4	Yes	**	0,0032
+UR06 vs. +NL93186	-18,7	Yes	**	0,0052

Mutiple t-test para GLU Fistulosum. Se comparan las actividades de cada día entre el Control y +UR06

dds	Significant?	P value	Mean of Control	Mean of +UR06	Difference	SE of difference	t ratio	df
3	No	0,6094	1,4	1,6	-0,15	0,25	0,6	2
7	No	0,2155	119	135	-16	8,9	1,8	2
11	No	0,3712	127	118	8,5	7,4	1,1	2

Mutiple t-test para GLU Fistulosum. Se comparan las actividades de cada día entre el Control y +NL93186

dds	Significant?	P value	Mean of Control	Mean of +UR06	Difference	SE of difference	t ratio	df
3	No	0,4226	1,4	1,7	-0,25	0,25	1	2
7	No	0,1468	119	161	-42	18	2,3	2

Post Anova Holm-Sidak's multiple comparisons test. Diferencias entre tratamientos para la actividad GLU Fistulosum 7 dds

Holm-Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Control vs. +UR06	-16	No	ns	0,3673
Control vs. +NL93186	-41,8	No	ns	0,1951
+UR06 vs. +NL93186	-25,8	No	ns	0,3378

Mutiple t-test para QUIT Fusarium. Se comparan las actividades de cada día entre el Control y +UR06

dds	Significant?	P value	Mean of Control	Mean of +UR06	Difference	SE of difference	t ratio	df
3	No	0,7376	59	62	-2,5	6,5	0,38	2
7	Yes	0,0243	281	399	-118	19	6,3	2
11	No	0,1016	272	343	-71	25	2,9	2

Mutiple t-test para QUIT Fistulosum. Se comparan las actividades de cada día entre el Control y +NL93186

dds	Significant?	P value	Mean of Control	Mean of +NL93186	Difference	SE of difference	t ratio	df
3	No	0,3328	59	69	-9,5	7,5	1,3	2
7	Yes	0,0093	281	523	-241	23	10	2

Post Anova Holm-Sidak's multiple comparisons test. Diferencias entre tratamientos para la actividad QUIT Fistulosum 7 dds

Holm-Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Control vs. +UR06	-118	Yes	*	0,0219
Control vs. +NL93186	-241	Yes	**	0,0048
+UR06 vs. +NL93186	-124	Yes	*	0,0219

Cambios en las actividades enzimáticas (LFC) en plántulas de *A. cepa* variedad Pantanoso y *A. fistulosum* expuestas a FOC (cepas UR06 y NL93186)

			LFC de las actividades enzimáticas respecto al control														
			Peroxidasas					Glucanasas					Quitinasas				
			1	2	3	$\bar{X}$	σ	1	2	3	$\bar{X}$	σ	1	2	3	$\bar{X}$	σ
	dds	Tratamiento															
A. cepa var. Pantanoso	3	+ UR06	0,49	1,11		0,80	0,44	-0,63	0,31		-0,16	0,66	0,00	-0,34		-0,17	0,24
		+ 93186	0,47	1,11		0,79	0,45	0,28	-0,90		-0,31	0,84	-0,02	-0,37		-0,19	0,25
	7	+ UR06	0,70	0,54	0,48	0,58	0,11	0,42	0,16	0,17	0,25	0,15	-0,03	0,06	0,40	0,15	0,23
		+ 93186	1,46	1,21	1,25	1,31	0,13	0,77	0,72	0,62	0,70	0,08	1,14	0,91	0,50	0,85	0,32
	11	+ UR06	0,44	0,39		0,41	0,04	0,07	-0,04		0,01	0,08	0,15	-0,13		0,01	0,20
A. fistulosum	3	+ UR06	0,45	0,86		0,65	0,29	0,00	0,28		0,14	0,20	0,12	0,00		0,06	0,08
		+ 93186	0,54	0,93		0,74	0,28	0,36	0,10		0,23	0,19	0,31	0,12		0,21	0,13
	7	+ UR06	0,84	0,56		0,70	0,20	0,22	0,14		0,18	0,06	0,55	0,45		0,50	0,07
		+ 93186	1,70	1,84		1,77	0,10	0,57	0,28		0,42	0,20	0,95	0,84		0,89	0,08
	11	+ UR06	0,41	0,05		0,23	0,25	-0,16	-0,05		-0,10	0,08	0,39	0,28		0,33	0,08

Se presentan, para cada especie y día de muestreo, los resultados de LFC (log fold change) calculados a partir de las actividades enzimáticas en las plántulas expuestas a cada una de las cepas de FOC y su correspondiente control. Los resultados corresponden, para cada repetición, al $\log_2$ del cociente entre la actividad en las plántulas expuestas a la cepa de FOC (UR06 o NL93186) sobre el promedio de la actividad en las plántulas no expuestas (control), para cada especie y día de muestreo. Se presentan los promedios de las repeticiones con su correspondiente desvío estándar. En negrita se destacan valores correspondientes a cambios significativos de la actividad entre el control y el tratamiento con FOC.

A continuación, se presenta el **análisis estadístico de la comparación de los LFC entre ambas especies**. Se presenta el análisis de los casos en que se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Multiple t-test para los LFC de las actividades enzimáticas entre los tratamientos +UR06 y Control a los 7 dds.

Se comparan los LFC de cada actividad entre las dos especies

	Significant?	P value	Mean of Pantanoso	Mean of Fistulosum	Difference	SE of difference	t ratio	df
POX	No	0,6143	0,57	0,66	-0,082	0,16	0,52	9
GLU	No	0,6652	0,25	0,18	0,07	0,16	0,45	9
QUIT	Yes	0,0486	0,14	0,5	-0,36	0,16	2,3	9

Mutiple t-test para los LFC de las actividades enzimáticas entre los tratamientos +NL93186 y Control a los 7 dds.

Se comparan los LFC de cada actividad entre las dos especies

	Significant?	P value	Mean of Pantanoso	Mean of Fistulosum	Difference	SE of difference	t ratio	df
POX	Yes	0,024	1,3	1,8	-0,46	0,17	2,7	9
GLU	No	0,1381	0,7	0,43	0,28	0,17	1,6	9
QUIT	No	0,7984	0,85	0,9	-0,045	0,17	0,26	9

Anexo 5.I

Porcentaje de área afectada por *B. squamosa* en hojas *A. cepa* var. Pantanoso y Naqué para los tres ensayos realizados.

Ensayo 1			HOJA 3						HOJA 4					
			% de área afectada				X	σ_{n-1}	% de área afectada				X	σ_{n-1}
Pantanoso	4 ddi	+B.sq.	1,7	0,7	1,2	0	0,9	0,7	3,8	2,5	1,9	0,5	2,2	1,4
		Ind.+B.sq.	1,1	0,6	0	0	0,4	0,5	1,9	2,8	0	0,7	1,4	1,2
	8 ddi	+B.sq.	3,7	2,5	0,7	4,6	2,9	1,7	4,5	2,4	3,7	12	5,7	4,3
		Ind.+B.sq.	0,5	1,6	1,4	0,1	0,9	0,7	2,6	1,9	4,9	2,2	2,9	1,4
Naqué	4 ddi	+B.sq.	2,1	0	1,4	0,8	1,1	0,9	4,5	0,9	2,9	2,3	2,7	1,5
		Ind.+B.sq.	1,4	1,2	0	0,5	0,8	0,6	1,6	2,7	0,6	1,2	1,6	1,0
	8 ddi	+B.sq.	2,5	1,2	1,1	4,8	2,4	1,7	6,7	2,8	3,7	13	6,5	4,5
		Ind.+B.sq.	1,3	1,8	0,2	0,5	0,9	0,8	1,5	1,5	1,1	2,8	1,7	0,2

Ensayo 2

Pantanoso	8 ddi	+B.sq.	0,9	1,9	0,8	0,4	1,0	0,6	0,8	1,1	4,7	2,2	2,2
		Ind.+B.sq.	0,5	0,3	0		0,3	0,3	0	0,8	1,8	0,9	0,9
Naqué	8 ddi	+B.sq.	0,6	0,2	0,5	1,8	0,8	0,7	1,9	3,5	2,2	2,5	0,9
		Ind.+B.sq.		1,8	0,2	0	0,7	1,1	3,1	2,7	0,6	0	1,6

Ensayo 3

Pantanoso	2 ddi	+B.sq.	0,7	0	1,2	0	0,4	0,5	0,4	0,5	0,6	0	0,5	0,4
			0,2	0					0,3	1,2				
		Ind.+B.sq.	0	0,6	0	1,4	0,3	0,6	0,6	1,2	0	1,5	0,7	0,6
			0	0					0,7	0				
	4 ddi	+B.sq.	0,2	0	1,7	0	0,6	0,7	2,1	0	3,6	1,3	2,1	1,7
			0,5	1,3					1	4,4				
		Ind.+B.sq.	1,3	0	0,3	0,1	0,3	0,5	3,4	1	0,4	0,8	1,0	1,2
			0	0					0,7	0				
8 ddi	+B.sq.	0,4	3,7	3,2	2,9	2,6	1,5	2,5	5,5	5,5	11	6,1	3,5	
	Ind.+B.sq.	0,3	0	0,4	0,8	0,5	0,4	2,3	0	0,6	2	1,2	1,1	
		0,8												

Ensayo 1

Mutiple t-test para % área afectada en Pantanosos Hoja 3.

Se comparan para cada ddi los % en plantas expuestas a B. squamosa sin (+ B.sq) y con (Ind. + B.sq.) pretratamiento con quitosano comercial

Alpha	0,1							
	Significant?	P value	Mean of +B.sq.	Mean of Ind. +B.sq.	Difference	SE of difference	t ratio	df
4 ddi	No	0,3316	0,9	0,43	0,48	0,45	1,1	6
8 ddi	Yes	0,0749	2,9	0,91	2	0,92	2,2	6

Mutiple t-test para % área afectada en Pantanosos Hoja 4.

Se comparan para cada ddi los % en plantas expuestas a B. squamosa sin (+ B.sq) y con (Ind. + B.sq.) pretratamiento con quitosano comercial

Alpha	0,1							
	Significant?	P value	Mean of +B.sq.	Mean of Ind. +B.sq.	Difference	SE of difference	t ratio	df
4 ddi	No	0,4185	2,2	1,4	0,81	0,93	0,87	6
8 ddi	No	0,2704	5,7	2,9	2,8	2,3	1,2	6

Mutiple t-test para % área afectada en Naqué Hoja 3.

Se comparan para cada ddi los % en plantas expuestas a B. squamosa sin (+ B.sq) y con (Ind. + B.sq.) pretratamiento con quitosano comercial

Alpha	0,1							
	Significant?	P value	Mean of +B.sq.	Mean of Ind. +B.sq.	Difference	SE of difference	t ratio	df
4 ddi	No	0,5974	1,1	0,77	0,31	0,55	0,56	6
8 ddi	No	0,1696	2,4	0,94	1,5	0,94	1,6	6

Mutiple t-test para % área afectada en Naqué Hoja 4.

Se comparan para cada ddi los % en plantas expuestas a B. squamosa sin (+ B.sq) y con (Ind. + B.sq.) pretratamiento con quitosano comercial

Alpha	0,1							
	Significant?	P value	Mean of +B.sq.	Mean of Ind. +B.sq.	Difference	SE of difference	t ratio	df
4 ddi	No	0,2378	2,7	1,5	1,1	0,86	1,3	6
8 ddi	Yes	0,0821	6,5	1,7	4,8	2,3	2,1	6

Ensayo 3

Mutiple t-test para % área afectada en Pantanosos Hoja 3.

Se comparan para cada ddi los % en plantas expuestas a B. squamosa sin (+ B.sq) y con (Ind. + B.sq.) pretratamiento con quitosano comercial

Alpha	0,05							
	Significant?	P value	Mean of +B.sq.	Mean of Ind. +B.sq.	Difference	SE of difference	t ratio	df
2 ddi	No	0,9456	0,35	0,3283	0,02167	0,3095	0,07	10
4 ddi	No	0,3878	0,62	0,295	0,325	0,36	0,903	10
8 ddi	Yes	0,0176	2,55	0,48	2,07	0,6701	3,089	7

Mutiple t-test para % área afectada en Pantanosos Hoja 3.

Se comparan los % entre distintos ddi en plantas expuestas a B. squamosa sin (+ B.sq) o con (Ind. + B.sq.) pretratamiento con quitosano comercial.

	Significant?	P value	Mean of 2 ddi	Mean of 4 ddi	Difference	SE of difference	t ratio	df
+B.sq.	No	0,467	0,35	0,62	-0,27	0,3571	0,756	10
Ind. +B.sq.	No	0,9172	0,3283	0,295	0,03333	0,3128	0,107	10
	Significant?	P value	Mean of 4 ddi	Mean of 8 ddi	Difference	SE of difference	t ratio	df
+B.sq.	Yes	0,023	0,62	2,55	-1,93	0,6877	2,806	8
Ind. +B.sq.	No	0,5107	0,295	0,48	-0,185	0,2701	0,685	9

Mutiple t-test para % área afectada en Pantanosos Hoja 4.

Se comparan para cada ddi los % en plantas expuestas a B. squamosa sin (+ B.sq) y con (Ind. + B.sq.) pretratamiento con quitosano comercial

Alpha 0,05

	Significant?	P value	Mean of +B.sq.	Mean of Ind. +B.sq.	Difference	SE of difference	t ratio	df
2 ddi	No	0,5775	0,4917	0,6633	-0,1717	0,2981	0,576	10
4 ddi	No	0,2464	2,067	1,033	1,033	0,8393	1,231	10
8 ddi	Yes	0,0366	6,075	1,22	4,855	1,813	2,678	6

Mutiple t-test para % área afectada en Pantanosos Hoja 4.

Se comparan los % entre distintos ddi en plantas expuestas a B. squamosa sin (+ B.sq) o con (Ind. + B.sq.) pretratamiento con quitosano comercial.

	Significant?	P value	Mean of 2 ddi	Mean of 4 ddi	Difference	SE of difference	t ratio	df
+B.sq.	Yes	0,0475	0,49	2,1	-1,6	0,7	2,3	10
Ind. +B.sq.	No	0,5194	0,66	1	-0,37	0,55	0,67	10
	Significant?	P value	Mean of 4 ddi	Mean of 8 ddi	Difference	SE of difference	t ratio	df
+B.sq.	Yes	0,0372	2,1	6,1	-4	1,6	2,5	8
Ind. +B.sq.	No	0,8115	1	1,2	-0,19	0,76	0,25	8

Anexo 5.II

Actividades enzimáticas vinculadas al estrés oxidativo en hojas de *A. cepa* variedad Naqué enfrentadas a *B. squamosa* con y sin pretratamiento con quitosano comercial

ddi Tratamiento			Actividades enzimáticas (UE/g)																							
			Catalasas						Superóxido dismutasas						Ascorbato peroxidasas						Peroxidasas					
			1	2	3	4	$\bar{X}$	σ	1	2	3	4	$\bar{X}$	σ	1	2	3	4	$\bar{X}$	σ	1	2	3	4	$\bar{X}$	σ
A. cepa var. Naqué	0	Control	9,7		8,4	10,9	9,7	1,3	6,9	5,6	6,9	7,6	6,7	0,8	9,9	11,3	8,3	10,8	10,1	1,3	1,9	1,1	2,5		1,8	0,7
		Ind.	11,1	11,3	9,9	8,2	10,1	1,4	5,6	7,6	7,0	7,1	6,8	0,9	6,5	5,8	11,3	6,9	7,7	2,5	2,6	1,5	1,7	1,6	1,8	0,5
	2	Control	6,1	8,6	9,6		8,1	1,8	6,1	5,7	6,6	8,3	6,7	1,1	11,1	9,0	8,6	8,4	9,3	1,2	2,5	1,7	1,9	1,7	2,0	0,4
		+B.sq.		8,0		7,1	7,5	0,6	7,2	7,4	8,1	8,5	7,8	0,6	9,1	8,2	8,6	8,4	8,6	0,4	2,8			2,0	2,4	0,5
		Ind.		8,1	8,8	9,1	8,7	0,5	6,2	6,2	7,9	8,9	7,3	1,3	10,4	8,5	10,0	11,4	10,1	1,2		1,6	1,1	4,7	2,5	1,9
		Ind.+B.sq.		8,6	9,7	6,8	8,4	1,5	6,4	7,3	5,7	7,0	6,6	0,7	8,7	9,4	8,1	9,9	9,0	0,8	4,3	3,4	1,5	4,3	3,4	1,3
	4	Control	6,1	7,9	6,0	9,2	7,3	1,5	6,0	6,3	5,9	5,6	6,0	0,3	8,0	5,5	8,8	10,4	8,2	2,0	3,5			1,5	2,5	1,5
		+B.sq.	9,4	11,9	9,9	10,6	10,5	1,1	5,8	5,8	5,7		5,8	0,1	5,1	5,6	8,7	7,3	6,7	1,6		3,4	2,8	13,4	6,5	5,9
		Ind.		10,1	8,0	5,6	7,9	2,3	5,1	6,5		7,0	6,2	1,0	9,0	9,1	6,1	9,7	8,5	1,6	3,2		2,9		3,0	0,2
		Ind.+B.sq.	9,8	6,4	6,0	9,5	7,9	2,0	6,9	5,8	5,8	5,2	5,9	0,7	8,2	5,6	5,8	6,5	6,5	1,2	7,6	3,8		5,5	5,6	1,9
	8	Control	8,1	11,1	9,7		9,6	1,5	6,9	6,6	7,7	6,6	6,9	0,5	8,6	6,8	8,5	8,5	8,1	0,9		3,2	1,0		2,1	1,6
		+B.sq.	13,2	13,6	13,6	11,5	13,0	1,0	7,7		5,2		6,4	1,8	5,2	8,3	8,4	6,7	7,2	1,5	12,4		6,8	9,0	9,4	2,8
		Ind.	6,1	10,5		8,1	8,2	2,2	6,7	5,4	4,2		5,4	1,3	7,4	5,8	7,5	9,0	7,4	1,3		4,0	1,7	3,1	2,9	1,2
		Ind.+B.sq.		9,7	7,6	6,5	7,9	1,7	6,4		7,1	5,7	6,4	0,7	6,7	6,8	9,1	8,7	7,8	1,2	7,8	2,3	2,2	4,9	4,3	2,7

Se presentan los resultados en UE por gramo de tejido liofilizado (UE/g) para cada repetición y los promedios correspondientes con su desvío estándar. Cada valor se obtuvo de realizar los ensayos enzimáticos por triplicado. La definición de UE para cada actividad se puede encontrar en la sección 2.5 de Materiales y Métodos. Para las actividades CAT y SOD las UE/g se presentan en centenas.

Actividades enzimáticas vinculadas al estrés oxidativo en hojas de *A. cepa* variedad Pantanoso del Sauce enfrentadas a *B. squamosa* con y sin pretratamiento con quitosano comercial

ddi Tratamiento			Actividades enzimáticas (UE/g)																								
			Catalasas						Superóxido dismutasas						Ascorbato peroxidasas						Peroxidasas						
			1	2	3	4	$\bar{X}$	σ	1	2	3	4	$\bar{X}$	σ	1	2	3	4	$\bar{X}$	σ	1	2	3	4	$\bar{X}$	σ	
A. cepa var. Pantanoso	0	Control	8,3	8,9	9,2	11,5	9,5	1,4	7,0	4,4	8,5	7,9	7,0	1,8	5,8	7,1	6,1	7,5	6,6	0,8	3,8				2,4	3,1	1,0
		Ind.	11,4	8,8	9,4	11,7	10,3	1,4	6,2	6,5	7,4	7,3	6,8	0,6	4,9	6,3	5,4	6,6	5,8	0,8	2,8				2,9	2,8	0,1
	2	Control	11,6	9,4	5,1		8,7	3,3	4,8	5,2		7,5	5,8	1,4	4,0	8,8	8,5		7,1	2,7	4,8	3,1	5,3		4,4	1,2	
		+B.sq.		9,3		10,0	9,6	0,5	4,3	8,2	5,9	5,3	5,9	1,6	6,9	7,2	6,9	8,8	7,4	0,9	5,4	1,5	9,2	2,7	4,7	3,4	
		Ind.	9,3	10,2	7,3	8,5	8,8	1,2	6,6	6,5	7,9	6,5	6,9	0,7	8,1	6,3	5,4	5,1	6,2	1,3	3,9	5,3	2,7	5,9	4,4	1,4	
		Ind.+B.sq.	7,7	8,9	12,3	9,2	9,5	1,9	7,6	6,5	9,5	9,4	8,3	1,5	7,2	7,9	7,9	7,5	7,6	0,3	4,1	5,9	3,0	4,7	4,4	1,2	
	4	Control		6,9	7,9	8,3	7,7	0,7	4,8	5,8	7,6	6,3	6,1	1,2	7,1	8,0	5,7	7,3	7,0	1,0	3,8	10,2	2,3	1,4	4,4	4,0	
		+B.sq.	9,9	11,7	9,5	9,6	10,2	1,0	6,9	5,1	6,3	5,6	6,0	0,8	7,1	5,9	6,1	5,4	6,1	0,7	10,9	6,1	5,5		7,5	3,0	
		Ind.	7,3	6,2	8,9	9,5	8,0	1,5	5,1	3,8	4,9	5,7	4,9	0,8	5,4	7,4	7,2	6,9	6,7	0,9	8,9		5,1	2,1	5,3	3,4	
		Ind.+B.sq.	11,7	7,3	11,5	7,4	9,5	2,4	4,4	4,8	5,5	5,1	4,9	0,5	6,6	6,9	6,2	7,1	6,7	0,4	8,6	8,6	7,3	4,3	7,2	2,0	
	8	Control		6,0	6,7	6,0	6,3	0,4	5,9	4,7	6,9	7,1	6,1	1,1	6,9	7,7	8,6	9,0	8,0	1,0		2,7	3,4	4,5	3,5	0,9	
		+B.sq.	6,8	7,5	7,2	7,5	7,3	0,3	4,8	6,6	3,8	4,0	4,8	1,3	6,7	7,3	10,8	7,1	8,0	1,9	5,8	5,4	9,3	9,2	7,4	2,1	
		Ind.	6,3	6,8	7,6	6,1	6,7	0,6	5,6	4,8		4,2	4,9	0,7	7,1	7,3	9,3	9,2	8,2	1,2			4,9	4,2	4,5	0,5	
		Ind.+B.sq.	10,1	5,6	7,8	5,8	7,3	2,1	4,5	6,7	6,9	7,4	6,4	1,3	8,1	6,1	7,2	10,9	8,0	2,0	5,1		6,7		5,9	1,2	

Se presentan los resultados en UE por gramo de tejido liofilizado (UE/g) para cada repetición y los promedios correspondientes con su desvío estándar. Cada valor se obtuvo de realizar los ensayos enzimáticos por triplicado. La definición de UE para cada actividad se puede encontrar en la sección 2.5 de Materiales y Métodos. Para las actividades CAT y SOD las UE/g se presentan en centenas.

Actividades enzimáticas vinculadas al estrés oxidativo en hojas de *A. fistulosum* enfrentadas a *B. squamosa* con y sin pretratamiento con quitosano comercial

ddi Tratamiento			Actividades enzimáticas (UE/g)																							
			Catalasas						Superóxido dismutasas						Ascorbato peroxidadas						Peroxidasas					
			1	2	3	4	$\bar{X}$	σ	1	2	3	4	$\bar{X}$	σ	1	2	3	4	$\bar{X}$	σ	1	2	3	4	$\bar{X}$	σ
A. fistulosum	0	Control	12,5	10,7	12,0	11,7	0,9	3,3	3,1	6,1	6,1	4,6	1,7	4,2		6,1	7,4	5,9	1,6		2,5	9,7	5,7	6,0	3,6	
		Ind.	8,1	12,4	9,5	8,8	9,7	1,9	5,3	6,0	5,0	3,5	5,0	1,0	12,3	12,1	12,2	11,4	12,0	0,4	3,1	4,5	2,9	10,0	5,1	3,3
	2	Control	10,0	12,4	5,9	6,2	8,6	3,1	5,3	6,0	5,6	5,2	5,5	0,3	5,4	9,3	8,5	7,7	7,7	1,7	9,0		4,3		6,7	3,3
		+B.sq.		8,1	10,4	7,6	8,7	1,5	4,7	5,7	6,5	6,3	5,8	0,8		5,1	5,8	5,1	5,3	0,4	3,8	7,0	4,2	4,9	5,0	1,5
		Ind.	10,2	12,0	12,2	12,7	11,8	1,1	5,2	5,3	5,9	5,2	5,4	0,3	9,4	7,6	11,6	8,0	9,2	1,8	5,8		6,0		5,9	0,1
		Ind.+B.sq.			10,4	13,4	11,9	2,1	6,4	7,2	5,0	6,4	6,3	0,9	5,3		6,2	6,9	6,1	0,8			9,6	3,5	6,6	4,3
	4	Control	8,4	7,9	7,1	9,6	8,2	1,1	4,8	5,3	3,3	3,7	4,3	0,9	4,9	5,5	5,6	5,5	5,4	0,4	10,6	9,8	3,8	4,3	7,1	3,6
		+B.sq.	13,9	13,6	10,7	8,5	11,7	2,6		6,0	2,5	2,6	3,7	2,0	7,5	5,4	8,6	6,3	6,9	1,4		6,2	11,2	8,6	8,7	2,5
		Ind.	8,1	9,3	11,4	10,7	9,9	1,5	4,3		4,8	2,7	3,9	1,1	3,9	7,7	8,9	10,0	7,6	2,6	9,7	5,3	10,5	11,3	9,2	2,7
		Ind.+B.sq.	13,5	12,1	13,4	10,3	12,3	1,5	3,6	3,7	3,8	4,3	3,8	0,3	12,4	5,9	6,3	8,4	8,3	3,0		12,4	7,8	5,2	8,5	3,7
	8	Control	7,8	9,7		8,7	8,7	0,9	5,9	7,7	6,9		6,8	0,9	8,1	6,8	6,7	6,5	7,0	0,7			8,8	7,0	7,9	1,2
		+B.sq.	7,8	6,4	13,5		9,2	3,7	5,5		5,5	7,2	6,1	1,0	4,2	7,9	6,4	5,7	6,1	1,5		6,6	16,1	3,8	8,8	6,4
		Ind.	11,1	11,4	13,9	8,5	11,3	2,2	6,9	6,0	6,0	6,3	6,3	0,5	8,2	6,2	5,7	5,4	6,4	1,3	9,1	12,7	9,3	7,3	9,6	2,2
		Ind.+B.sq.	12,1	8,5	13,7		11,4	2,7	7,0	7,3	5,2	6,1	6,4	0,9	6,4	5,0	5,1	8,2	6,2	1,5	9,2	8,2	6,7	4,2	7,1	2

Se presentan los resultados en UE por gramo de tejido liofilizado (UE/g) para cada repetición y los promedios correspondientes con su desvío estándar. Cada valor se obtuvo de realizar los ensayos enzimáticos por triplicado. La definición de UE para cada actividad se puede encontrar en la sección 2.5 de Materiales y Métodos. Para las actividades CAT y SOD las UE/g se presentan en centenas.

Se presentan para cada especie y actividad, **análisis estadísticos** que comparan, para cada día, diferencias entre el tratamiento control y los inoculados con *B. squamosa* (Multiple t-test). Se presentan sólo los que dieron alguna diferencia estadísticamente significativa. Para los casos en que los resultados de más de un tratamiento difirieron del control, se comparan todos los tratamientos entre sí (ANOVA).

Mutiple t-test para CAT Naqué. Se comparan las actividades de cada día entre el Control y +B.sq								
	Significant?	P value	Mean of Control	Mean of +B.sq.	Difference	SE of difference	t ratio	df
2	No	0,7178	8,1	7,6	0,55	1,4	0,4	3
4	Yes	0,0155	7,3	10	-3,2	0,94	3,3	6
8	Yes	0,0161	9,6	13	-3,3	0,94	3,6	5
Mutiple t-test para CAT Pantanoso. Se comparan las actividades de cada día entre el Control y +B.sq								
	Significant?	P value	Mean of Control	Mean of +B.sq.	Difference	SE of difference	t ratio	df
2	No	0,727	8,7	9,7	-0,95	2,5	0,38	3
4	Yes	0,0168	7,7	10	-2,5	0,7	3,5	5
8	Yes	0,0144	6,2	7,3	-1	0,28	3,7	5
Mutiple t-test para CAT Fistulosum. Se comparan las actividades de cada día entre el Control y +B.sq								
	Significant?	P value	Mean of Control	Mean of +B.sq.	Difference	SE of difference	t ratio	df
2	No	0,9714	8,6	8,7	-0,075	2	0,038	5
4	Yes	0,0481	8,3	12	-3,4	1,4	2,5	6
8	No	0,8343	8,7	9,2	-0,5	2,2	0,22	4
Post Anova Holm-Sidak's multiple comparisons test. Diferencias entre tratamientos para la actividad CAT Fistulosum 4 ddi								
Alpha	0,05							
Holm-Sidak's multiple	Mean Diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value				
Control vs. Ind.	-1,625	No	ns	0,2102				
Control vs. +B.sq.	-3,425	Yes	*	0,0324				
Control vs. Ind. +B.sq.	-4,075	Yes	*	0,0182				

Mutiple t-test para POX Naqué. Se comparan las actividades de cada día entre el Control y +B.sq								
	Significant?	P value	Mean of Control	Mean of +B.sq.	Difference	SE of difference	t ratio	df
2	No	0,2964	2	2,4	-0,45	0,38	1,2	4
4	No	0,4362	2,5	6,5	-4	4,5	0,9	3
8	Yes	0,0481	2,1	9,4	-7,3	2,3	3,2	3
Mutiple t-test para POX Pantanoso. Se comparan las actividades de cada día entre el Control y +B.sq								
	Significant?	P value	Mean of Control	Mean of +B.sq.	Difference	SE of difference	t ratio	df
2	No	0,8918	4,4	4,7	-0,3	2,1	0,14	5
4	No	0,3147	4,4	7,5	-3,1	2,8	1,1	5
8	Yes	0,0324	3,5	7,4	-3,9	1,3	2,9	5
Mutiple t-test para POX Fistulosum. Se comparan las actividades de cada día entre el Control y +B.sq								
	Significant?	P value	Mean of Control	Mean of +B.sq.	Difference	SE of difference	t ratio	df
2	No	0,4029	6,7	5	1,7	1,8	0,93	4
4	No	0,5543	7,1	8,7	-1,5	2,4	0,63	5
8	No	0,8597	7,9	8,8	-0,93	4,9	0,19	3
Mutiple t-test para APX Fistulosum. Se comparan las actividades de cada día entre el Control e Ind.								
	Significant?	P value	Mean of Control	Mean of Ind.	Difference	SE of difference	t ratio	df
0	Yes	0,0007	5,9	12	-6,1	0,81	7,5	5
2	No	0,2921	7,7	9,2	-1,4	1,2	1,2	6
4	No	0,1434	5,4	7,6	-2,3	1,3	1,7	6
8	No	0,4061	7	6,4	0,65	0,73	0,89	6
Post Anova Holm-Sidak's multiple comparisons test. Diferencias entre tratamientos para la actividad APX Fistulosum 2 ddi								
Alpha	0,05							
Holm-Sidak's multiple	Mean Diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value				
Ind. vs. Control	1,425	No	ns	0,1835				
Ind. vs. +B.sq.	3,817	Yes	*	0,0159				
Ind. vs. Ind. +B.sq.	3,017	Yes	*	0,0372				

Cambios en las actividades enzimáticas (LFC) en hojas de *A. cepa* variedades Naqué y Pantanoso del Sauce enfrentadas a *B. squamosa* con y sin pretratamiento con quitosano comercial

			LFC de las actividades enzimáticas respecto al control											
			Catalasas						Peroxidasas					
ddi	Tratamiento		1	2	3	4	$\bar{X}$	σ	1	2	3	4	$\bar{X}$	σ
<i>A. cepa</i> var. Naqué	4	+ <i>B.sq.</i>	0,36	0,71	0,44	0,53	0,51	0,15		0,43	0,18	2,42	1,01	1,23
		Ind.+ <i>B.sq.</i>	0,42	-0,20	-0,29	0,38	0,08	0,37	1,61	0,59		1,15	1,12	0,51
	8	+ <i>B.sq.</i>	0,46	0,50	0,50	0,26	0,43	0,12	2,55		1,68	2,08	2,10	0,44
		Ind.+ <i>B.sq.</i>		0,01	-0,35	-0,58	-0,30	0,30	1,89	0,09	0,03	1,21	0,80	0,90
<i>A. cepa</i> var. Pantanoso	4	+ <i>B.sq.</i>	0,35	0,59	0,31	0,32	0,39	0,14	1,30	0,45	0,31		0,69	0,53
		Ind.+ <i>B.sq.</i>	0,60	-0,08	0,57	-0,06	0,26	0,38	0,95	0,96	0,72	-0,05	0,65	0,47
	8	+ <i>B.sq.</i>	0,13	0,26	0,20	0,27	0,21	0,07	0,73	0,61	1,39	1,38	1,03	0,42
		Ind.+ <i>B.sq.</i>	0,69	-0,15	0,32	-0,12	0,19	0,40	0,53		0,93		0,73	0,29

Se presentan, para cada variedad y día de muestreo, los resultados de LFC (log fold change) calculados a partir de las actividades enzimáticas en plantas expuestas a *B. squamosa* con (Ind.+*B.sq.*) y sin (+*B.sq.*) pretratamiento con quitosano comercial y su correspondiente control. Los resultados corresponden, para cada repetición, al $\log_2$ del cociente entre la actividad en las plantas expuestas a *B. squamosa* sobre el promedio de la actividad en las plantas no expuestas (control), para cada variedad y día de muestreo. Se presentan los promedios de las repeticiones con su correspondiente desvío estándar. En negrita se destacan valores correspondientes a cambios significativos de la actividad entre el control y el tratamiento indicado.

A continuación, se presenta el **análisis estadístico de la comparación de los LFC entre ambas especies**. Se presenta el análisis de los casos en que se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Mutiple t-test para los LFC en la actividad CAT a los 8 ddi. Se comparan los en Pantanoso y Naqué para los tratamientos indicados

Tratamiento	Significant?	P value	Mean of Pantanoso	Mean of Naqué	Difference	SE of difference	t ratio	df
+B.sq.	Yes	0,0172	0,22	0,43	-0,22	0,066	3,3	6
Ind. +B.sq.	No	0,1355	0,19	-0,31	0,49	0,28	1,8	5

Mutiple t-test para los LFC en la actividad POX a los 8 ddi. Se comparan los en Pantanoso y Naqué para los tratamientos indicados

Tratamiento	Significant?	P value	Mean of Pantanoso	Mean of Naqué	Difference	SE of difference	t ratio	df
+B.sq.	Yes	0,0209	1,0	2,1	-1,1	0,32	3,3	5
Ind. +B.sq.	No	0,9186	0,73	0,81	-0,075	0,69	0,11	4

Anexo 5.III

Actividades enzimáticas en hojas de *A. cepa* variedad Pantanoso del Sauce enfrentadas a *B. squamosa* con y sin pretratamiento con quitosano comercial

			Actividades enzimáticas (UE/g)																															
			POX								GLU								QUIT								NAG							
			1	2	3	4	5	6	$\bar{X}$	σ	1	2	3	4	5	6	$\bar{X}$	σ	1	2	3	4	5	6	$\bar{X}$	σ	1	2	3	4	5	6	$\bar{X}$	σ
A. cepa var. Pantanoso	ddi	Tratamiento																																
	0	Control	29 37 24 42						33	8	22 15 16 9						15	5	159 173 140 165 137						155	16	10,5 11,2 11,4 11,5 9,7 11,1						11	0,7
		Ind.	31 41 36 42 28 33						35	6	28 11 9 27 11						17	9	168 233 250 262 284 226						237	40	9,1 9,5 9,1 10,5 9,6 9,4						10	0,5
	2	Control	34 25 36 22 52						34	12	35 28 33 12 19						25	10	171 212 241 171 195						198	30	11,6 8,9 11,3 11,3 10,1 11,5						11	1,1
		Ind.	42 26 30 27 30						31	6	7 48 31 31 24 21						27	13	154 192 143 249 166						181	42	9,8 10,2 9,7 12,0 11,7 10,2						11	1,0
		+B.sq.	32 40 61 59 39 52						47	12	39 43 44 39 21 19						34	11	245 323 281 289 322 285						291	29	11,6 11,5 10,9 10,5 10,2 9,6						11	0,8
		Ind.+B.sq.	38 51 34 56 44						45	9	25 32 16 36						27	9	285 407 307 347 269						323	56	9,6 11,4 9,3 12,5 11,6 9,3						11	1,4
	4	Control	33 34 20 33 24						29	6	15 28 31 24 25 19						24	6	220 225 278 166 180 268						223	45	9,8 9,9 14,2 11,0 11,3 13,4						12	1,8
		Ind.	26 33 13 30 45 36						30	11	17 35 28 31 29						28	7	179 319 231 390 312						286	82	13,9 14,0 11,3 14,7 12,4 10,8						13	1,6
		+B.sq.	43 34 60 45 36						44	10	34 23 54 42 32 35						37	10	424 335 388 337 403						377	40	15,2 12,3 13,8 13,1 10,3 13,8						13	1,7
		Ind.+B.sq.	39 26 22 48 41						35	11	46 39 46 48 24						41	10	399 431 286 275 308						340	71	13,6 10,7 9,4 14,3 10,1 10,5						11	2,0
	8	Control	38 50 44 29 36						39	8	33 28 26 41 13						28	10	288 249 351 315 263						293	41	10,0 11,0 11,3 12,3 12,3						11	1,0
		Ind.	31 45 23 63 25 32						36	15	37 25 19 31 21 28						27	7	398 394 338 412 337 396						379	33	10,9 11,7 8,3 10,3 9,1 10,1						10	1,2
+B.sq.		75 83 48 64 94						73	18	66 83 82 77						77	8	638 939 525 792 735						726	157	12,0 10,4 14,8 9,4 14,7						12	2,4	
Ind.+B.sq.		35 32 41 62 63						47	15	55 51 46 41						48	6	456 582 540 543						530	53	10,9 11,2 12,6 11,3						11	0,7	

Se presentan los resultados en UE por gramo de tejido liofilizado (UE/g) para cada repetición y los promedios correspondientes con su desvío estándar. Cada valor se obtuvo de realizar los ensayos enzimáticos por triplicado. La definición de UE para cada actividad se puede encontrar en la sección 2.5 de Materiales y Métodos. Para la actividad NAG las UE/g se presentan en centenas.

Actividades enzimáticas en hojas de *A. fistulosum* enfrentadas a *B. squamosa* con y sin pretratamiento con quitosano comercial

			Actividades enzimáticas (UE/g)																															
			POX								GLU								QUIT								NAG							
			1	2	3	4	5	6	$\bar{X}$	σ	1	2	3	4	5	6	$\bar{X}$	σ	1	2	3	4	5	6	$\bar{X}$	σ	1	2	3	4	5	6	$\bar{X}$	σ
A. <i>fistulosum</i>	0	Control	63	47	37	49	46	64	51	10	28	22		12	27		22	7	226	293	164	273	276		247	53	7,6	10,4	6,8	7,1	7,3	8,5	7,9	1,3
		Ind.	26	59	49	32	59	88	52	22	13	41	39	21	36	40	32	12	230	269	196		140	344	236	77	6,2	7,0	7,3	6,5	9,5		7,3	1,3
	2	Control	62	54	45	51		55	53	6	14	31	22	48	26	22	27	12	239	252	280	244		295	262	24	7,4	8,4	6,9	7,4	6,1	9,0	7,5	1,0
		Ind.	68	36	42	48		36	46	13	21	26	14	18			20	5	213	188	173	224	275	206	213	35	5,8	7,3	9,6	8,1	5,7		7,3	1,7
		+B.sq.		91		87	66	92	84	12	30	45	38	27	41	20	34	9	160	195	170	150		201	175	22	9,4	7,0	7,6	6,9	7,4		7,7	1,0
		Ind.+B.sq.	92	34	60	57	54	65	60	19	28		24	20	23	28	25	3	158	192	153	116	153	156	155	24	8,1	5,4	6,6	7,0	5,2	6,6	6,5	1,1
	4	Control	37	47	25	33	40	50	38	9	16	21	45	12	38	19	25	13	229	273	184	200	172	184	207	38	9,5	8,3	8,0	7,1	6,9	8,1	8,0	0,9
		Ind.	47	21	41	38	26	44	36	11		26	29	28	18	32	26	5	247	253	213	248	165	211	223	34	7,8	7,0	6,8	10,6	8,1	6,5	7,8	1,5
		+B.sq.		53	78	70	51	91	68	17		22	26	33	27	24	27	4	239	128	167	188	272	166	193	53	8,3	9,3	7,5		8,4	8,9	8,5	0,7
		Ind.+B.sq.	63	79	57	50	34	41	54	16	26	24	22	32	19	30	26	5	142	143	142	203		278	182	60	10,4	9,7	8,6	7,4	8,4	8,3	8,8	1,1
	8	Control		25	21	22	36	30	27	6	33	32		44	32	28	34	6	355			266	370		330	57	9,5	4,2	10,4	9,0	9,1	9,3	8,6	2,2
		Ind.	29			47	19	22	29	13	34		64	45	27	44	43	14	389	431		367	292		370	58	8,6	8,9	9,5	10,4	10,5	9,7	10	0,8
		+B.sq.	33	53	36		26	40	38	10	39	67	62	24	41	23	43	19	309	276	258	214	267	224	258	35	11,3	7,8	7,1	7,0	9,8	7,1	8,3	1,8
		Ind.+B.sq.		39	49	45		49	46	5	53	55	30	34	42	28	41	12	206	200	304	275	385	175	258	79	6,1	7,3	7,4	11,5	12,6		9,0	2,9

Se presentan los resultados en UE por gramo de tejido liofilizado (UE/g) para cada repetición y los promedios correspondientes con su desvío estándar. Cada valor se obtuvo de realizar los ensayos enzimáticos por triplicado. La definición de UE para cada actividad se puede encontrar en la sección 2.5 de Materiales y Métodos. Para la actividad NAG las UE/g se presentan en centenas.

Se presentan para cada especie y actividad, análisis estadísticos que comparan, para cada día, diferencias entre el tratamiento control y los inoculados con *B. squamosa* (Multiple t-test). Se presentan sólo los que dieron alguna diferencia estadísticamente significativa.

Para los casos en que los resultados de más de un tratamiento difirieron del control, se comparan los tratamientos entre sí (ANOVA).

Mutiple t-test para POX Pantanoso. Se comparan las actividades de cada día entre el Control y +B.sq

	Significant?	P value	Mean of Control	Mean of +B.sq.	Difference	SE of difference	t ratio	df
2	No	0,0945	34	47	-13	7,2	1,9	9
4	Yes	0,0255	29	44	-15	5,4	2,7	8
8	Yes	0,0049	39	73	-33	8,7	3,8	8

Mutiple t-test para POX Fistulosum. Se comparan las actividades de cada día entre el Control y +B.sq

	Significant?	P value	Mean of Control	Mean of +B.sq.	Difference	SE of difference	t ratio	df
2	Yes	0,0017	53	84	-31	6,2	4,9	7
4	Yes	0,0046	39	69	-30	8	3,7	9
8	No	0,0747	27	38	-11	5,3	2	8

Post Anova Holm-Sidak's multiple comparisons test. Diferencias entre tratamientos para la actividad POX Fistulosum 8 ddi

Alpha	0,05				
Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
Control vs. Ind.	-2,5	-15 to 10	No	ns	0,686
Control vs. +B.sq.	-11	-23 to 1,2	No	ns	0,0741
Control vs. Ind. +B.sq.	-19	-31 to -6,0	Yes	**	0,0071
Ind. vs. +B.sq.	-8,4	-21 to 4,4	No	ns	0,1812
Ind. vs. Ind. +B.sq.	-16	-30 to -2,8	Yes	*	0,0211
+B.sq. vs. Ind. +B.sq.	-7,9	-21 to 4,8	No	ns	0,2044

Mutiple t-test para GLU Pantanoso. Se comparan las actividades de cada día entre el Control y +B.sq

	Significant?	P value	Mean of Control	Mean of +B.sq.	Difference	SE of difference	t ratio	df
2	No	0,2033	25	34	-8,8	6,4	1,4	9
4	Yes	0,0241	24	37	-13	4,9	2,7	10
8	Yes	0,0001	28	77	-49	6,2	7,8	7

Post Anova Uncorrected Fisher's LSD test. Diferencias entre tratamientos para la actividad GLU Pantanoso 4 ddi

Alpha	0,05				
Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
Control vs. Ind.	-4,3	-15 to 6,4	No	ns	0,409
Control vs. +B.sq.	-13	-23 to -2,7	Yes	*	0,016
Control vs. Ind. +B.sq.	-17	-28 to -6,2	Yes	**	0,004
Ind. vs. +B.sq.	-8,7	-19 to 2,1	No	ns	0,1081
Ind. vs. Ind. +B.sq.	-13	-24 to -1,4	Yes	*	0,0302
+B.sq. vs. Ind. +B.sq.	-3,9	-15 to 6,8	No	ns	0,4528

Post Anova Uncorrected Fisher's LSD test. Diferencias entre tratamientos para la actividad GLU Pantanoso 8 ddi

Alpha	0,05				
Control vs. Ind.	1,4	-8,8 to 12	No	ns	0,779
Control vs. +B.sq.	-49	-60 to -38	Yes	****	<0,0001
Control vs. Ind. +B.sq.	-20	-31 to -8,8	Yes	**	0,0018
Ind. vs. +B.sq.	-50	-61 to -39	Yes	****	<0,0001
Ind. vs. Ind. +B.sq.	-21	-32 to -11	Yes	***	0,0008
+B.sq. vs. Ind. +B.sq.	29	17 to 41	Yes	***	0,0001

t-test para QUIT Pantanoso. Se comparan las actividades para el 0 ddi entre el Control y +Ind.

	Significant?	P value	Mean of Control	Mean of Ind.	Difference	SE of difference	t ratio	df
0	Yes	0,0019	155	237	-82	19	4,3	9

Mutiple t-test para QUIT Pantanoso. Se comparan las actividades de cada día entre el Control y +B.sq

	Significant?	P value	Mean of Control	Mean of +B.sq.	Difference	SE of difference	t ratio	df
2	Yes	0,0005	198	291	-93	18	5,2	9
4	Yes	0,0002	223	377	-155	26	6	9
8	Yes	0,0003	293	726	-433	72	6	8

Post Anova Uncorrected Fisher's LSD test. Diferencias entre tratamientos para la actividad QUIT Pantanoso 2 ddi

Alpha	0,05				
Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
Control vs. Ind.	17,2	-36,12 to 70,52	No	ns	0,5053
Control vs. +B.sq.	-92,83	-143,9 to -41,78	Yes	**	0,0013
Control vs. Ind. +B.sq.	-125	-178,3 to -71,68	Yes	***	0,0001
Ind. vs. +B.sq.	-110	-161,1 to -58,98	Yes	***	0,0003
Ind. vs. Ind. +B.sq.	-142,2	-195,5 to -88,88	Yes	****	<0,0001
+B.sq. vs. Ind. +B.sq.	-32,17	-83,22 to 18,88	No	ns	0,2013

Post Anova Uncorrected Fisher's LSD test. Diferencias entre tratamientos para la actividad QUIT Pantanoso 4 ddi

Alpha	0,05				
Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
Control vs. Ind.	-63,37	-141,5 to 14,72	No	ns	0,1051
Control vs. +B.sq.	-154,6	-232,7 to -76,48	Yes	***	0,0006
Control vs. Ind. +B.sq.	-117	-195,1 to -38,88	Yes	**	0,0057
Ind. vs. +B.sq.	-91,2	-172,8 to -9,640	Yes	*	0,0305
Ind. vs. Ind. +B.sq.	-53,6	-135,2 to 27,96	No	ns	0,1835
+B.sq. vs. Ind. +B.sq.	37,6	-43,96 to 119,2	No	ns	0,3444

Post Anova Uncorrected Fisher's LSD test. Diferencias entre tratamientos para la actividad QUIT Pantanoso 8 ddi

Alpha	0,05				
Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
Control vs. Ind.	-85,97	-196,4 to 24,51	No	ns	0,1185
Control vs. +B.sq.	-432,6	-548,0 to -317,2	Yes	****	<0,0001
Control vs. Ind. +B.sq.	-237,1	-359,4 to -114,7	Yes	***	0,0008
Ind. vs. +B.sq.	-346,6	-457,1 to -236,2	Yes	****	<0,0001
Ind. vs. Ind. +B.sq.	-151,1	-268,9 to -33,31	Yes	*	0,0152
+B.sq. vs. Ind. +B.sq.	195,6	73,16 to 317,9	Yes	**	0,0038

Post Anova Uncorrected Fisher's LSD test. Diferencias entre tratamientos para la actividad QUIT Fistulosum 2 ddi

Alpha	0,05				
Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
Control vs. Ind.	49	14 to 84	Yes	**	0,0086
Control vs. +B.sq.	87	50 to 123	Yes	****	<0,0001
Control vs. Ind. +B.sq.	107	73 to 142	Yes	****	<0,0001
Ind. vs. +B.sq.	38	3,2 to 73	Yes	*	0,0341
Ind. vs. Ind. +B.sq.	59	25 to 92	Yes	**	0,0016
+B.sq. vs. Ind. +B.sq.	21	-14 to 55	No	ns	0,2309

Post Anova Uncorrected Fisher's LSD test. Diferencias entre tratamientos para la actividad QUIT Fistulosum 8 ddi

Alpha	0,05				
Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Individual P Value
Control vs. Ind.	-39	-137 to 58	No	ns	0,4036
Control vs. +B.sq.	72	-18 to 163	No	ns	0,1091
Control vs. Ind. +B.sq.	73	-18 to 163	No	ns	0,1069
Ind. vs. +B.sq.	112	29 to 194	Yes	*	0,0114
Ind. vs. Ind. +B.sq.	112	30 to 195	Yes	*	0,0111
+B.sq. vs. Ind. +B.sq.	0,5	-73 to 74	No	ns	0,9887

Cambios en las actividades enzimáticas (LFC) en hojas de *A. cepa* variedad Pantanoso y *A. fistulosum* enfrentadas a *B. squamosa* con y sin pretratamiento con quitosano comercial

			LFC de las actividades enzimáticas respecto al control																							
			POX									GLU								QUIT						
			1	2	3	4	5	6	$\bar{X}$	σ	1	2	3	4	5	6	$\bar{X}$	σ	1	2	3	4	5	6	$\bar{X}$	σ
Ddi	Tratamiento																									
A. cepa var. Pantanoso	2	+B.sq.	-0,07	0,24	0,85	0,80	0,20	0,61	0,44	0,4	0,62	0,77	0,79	0,64	-0,29	-0,42	0,35	0,6	0,31	0,71	0,51	0,54	0,70	0,53	0,55	0,1
		Ind.+B.sq.	0,17	0,58	0,02	0,72	0,39		0,38	0,3		0,01	0,31	-0,68	0,52		0,04	0,5	0,52	1,04	0,63		0,81	0,44	0,69	0,2
	4	+B.sq.	0,58	0,26	1,06	0,64	0,31		0,57	0,3	0,54	-0,06	1,19	0,83	0,46	0,55	0,58	0,4		0,93	0,59	0,80	0,60	0,85	0,75	0,2
		Ind.+B.sq.	0,44	-0,14	-0,38	0,74	0,51		0,24	0,5	0,95	0,72		0,97	1,03	0,04	0,74	0,4	0,84	0,95	0,36	0,30		0,46	0,58	0,3
	8	+B.sq.	0,94	1,08	0,30	0,71	1,26		0,86	0,4	1,24	1,56	1,55	1,46			1,45	0,1	1,12	1,68	0,84	1,43	1,33		1,28	0,3
		Ind.+B.sq.	-0,19	-0,28	0,06	0,66	0,69		0,19	0,5	0,97		0,86	0,72	0,54		0,77	0,2		0,64	0,99	0,88	0,89		0,85	0,2
A. fistulosum	2	+B.sq.		0,77		0,71	0,30	0,78	0,64	0,2	0,15	0,74	0,48	0,00	0,60	-0,41	0,26	0,4	-0,72	-0,43	-0,63	-0,81		-0,38	-0,59	0,2
		Ind.+B.sq.	0,78	-0,67	0,18	0,11	0,02	0,30	0,12	0,5	0,04		-0,18	-0,46	-0,21	0,02	-0,16	0,2	-0,73	-0,45	-0,78	-1,18	-0,77	-0,75	-0,78	0,2
	4	+B.sq.		0,47	1,01	0,86	0,40	1,24	0,79	0,4		-0,18	0,08	0,40	0,11	-0,05	0,07	0,2	0,20	-0,69	-0,31	-0,14	0,39	-0,32	-0,14	0,4
		Ind.+B.sq.	0,72	1,03	0,57	0,38	-0,18	0,07	0,43	0,4	0,06	-0,05	-0,18	0,34	-0,43	0,27	0,00	0,3	-0,54	-0,53	-0,55	-0,03		0,42	-0,25	0,4
	8	+B.sq.	0,29	0,99	0,41		-0,02	0,58	0,45	0,4	0,22	1,00	0,88	-0,49	0,28	-0,54	0,22	0,7	-0,10	-0,26	-0,36	-0,63	-0,31	-0,56	-0,37	0,2
		Ind.+B.sq.		0,54	0,85	0,75		0,88	0,76	0,2	0,65	0,72	-0,15	0,00	0,32	-0,24	0,22	0,4	-0,68	-0,72	-0,12	-0,27	0,22	-0,92	-0,41	0,4

Se presentan, para cada especie y día de muestreo, los resultados de LFC (log fold change) calculados a partir de las actividades enzimáticas en plantas expuestas a *B. squamosa* con (Ind.+*B.sq.*) y sin (+*B.sq.*) pretratamiento con quitosano comercial y su correspondiente control. Los resultados corresponden, para cada repetición, al $\log_2$ del cociente entre la actividad en las plantas expuestas a *B. squamosa* sobre el promedio de la actividad en las plantas no expuestas (control), para cada especie y día de muestreo. Se presentan los promedios de las repeticiones con su correspondiente desvío estándar. En negrita se destacan valores correspondientes a cambios significativos de la actividad entre el control y el tratamiento indicado.

A continuación, se presenta el **análisis estadístico de la comparación de los LFC de las distintas actividades en Pantanoso**. Se presenta el análisis de los casos en que se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Multiple t-test para los LFC de las actividades enzimáticas entre los tratamientos +B.sq o Ind. +B.sq. y Control a los 2 ddi.

Se comparan los LFC de las actividades GLU y QUIT

	Significant?	P value	Mean of GLU	Mean of QUIT	Difference	SE of difference	t ratio	df
+B.sq.	No	0,4158	0,35	0,55	-0,2	0,23	0,85	10
Ind. +B.sq.	Yes	0,0417	0,04	0,69	-0,65	0,26	2,5	7

Multiple t-test para los LFC de las actividades enzimáticas entre los tratamientos +B.sq o Ind. +B.sq. y Control a los 8 ddi.

Se comparan los LFC de cada actividad según tratamiento

	Significant?	P value	Mean of +B.sq.	Mean of Ind. +B.sq.	Difference	SE of difference	t ratio	df
POX	Yes	0,0353	0,86	0,19	0,67	0,26	2,5	8
GLU	Yes	0,0012	1,5	0,77	0,68	0,12	5,7	6
QUIT	Yes	0,0427	1,3	0,85	0,43	0,17	2,5	7

Multiple t-test para los LFC de las actividades enzimáticas entre los tratamientos +B.sq o Ind. +B.sq. y Control a los 8 ddi.

Se comparan los LFC de las actividades POX y GLU

	Significant?	P value	Mean of POX	Mean of GLU	Difference	SE of difference	t ratio	df
+B.sq.	Yes	0,0204	0,86	1,5	-0,59	0,2	3	7
Ind. +B.sq.	No	0,0506	0,19	0,77	-0,58	0,25	2,4	7

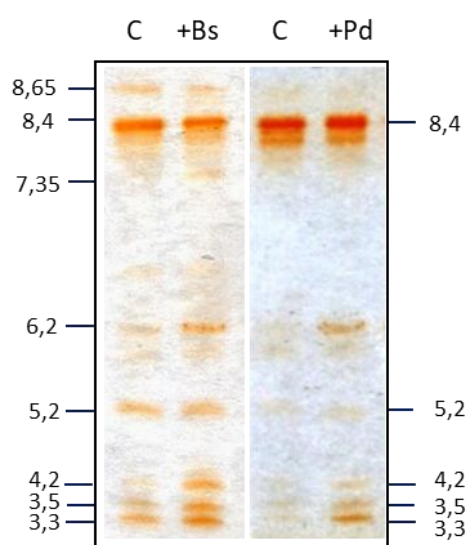
Multiple t-test para los LFC de las actividades enzimáticas entre los tratamientos +B.sq o Ind. +B.sq. y Control a los 8 ddi.

Se comparan los LFC de las actividades POX y QUIT

	Significant?	P value	Mean of POX	Mean of QUIT	Difference	SE of difference	t ratio	df
+B.sq.	No	0,0896	0,86	1,3	-0,42	0,22	1,9	8
Ind. +B.sq.	Yes	0,0296	0,19	0,85	-0,66	0,24	2,7	7

Anexo 5.IV

Perfiles de isoformas de POX obtenidos mediante zimogramas basados en isoelectroenfoque. Las muestras corresponden a hojas de Pantanoso con síntomas de *Botrytis squamosa* (+Bs) o *Peronóspora destructor* (+Pd). C corresponde a hojas sin síntomas.



Bibliografía

- [1] P. Leroux, 'Chemical Control of Botrytis and its Resistance to Chemical Fungicides', *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, pp. 195–222, 2007, doi: 10.1007/978-1-4020-2626-3_12.
- [2] W. Shao, Y. Zhao, and Z. Ma, 'Advances in understanding fungicide resistance in botrytis cinerea in China', *Phytopathology*, vol. 111, no. 3, pp. 455–463, Mar. 2021, doi: 10.1094/PHYTO-07-20-0313-IA.
- [3] E. R. Araújo, D. P. Alves, and F. S. Higashikawa, 'Cultivar resistance and chemical, biological and fertilizer treatments for controlling Botrytis leaf blight of onion', *Trop Plant Pathol*, vol. 43, no. 2, pp. 160–164, Apr. 2018, doi: 10.1007/s40858-017-0193-x.
- [4] A. Khar, G. A. Galván, and H. Singh, 'Allium Breeding Against Biotic Stresses', in *Genomic Designing for Biotic Stress Resistant Vegetable Crops*, Springer International Publishing, 2022, pp. 233–259. doi: 10.1007/978-3-030-97785-6_6.
- [5] G. Galván, H. González, and F. Vilaró, 'Estado actual de la investigación en poblaciones locales de hortalizas en Uruguay y su utilización en el mejoramiento', *Agrociencia - Sitio en Reparación*, vol. 9, no. 1–2, pp. 115–122, 2005, doi: 10.2477/VOL9ISS1-2PP115-122.
- [6] C. S. Cramer, S. Mandal, S. Sharma, S. S. Nourbakhsh, I. Goldman, and I. Guzman, 'Recent advances in onion genetic improvement', *Agronomy*, vol. 11, no. 3, Mar. 2021, doi: 10.3390/agronomy11030482.
- [7] A. Jaldo and Ma. Delia, 'Un análisis de la producción y comercio internacional de cebolla. Situación y perspectivas de la cadena de valor en Argentina', 2017.
- [8] FAOSTAT, 'Food and Agriculture Organization', Roma, Italia. Accessed: Jul. 07, 2024. [Online]. Available: <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>
- [9] DIEA-MGAP, 'ANUARIO ESTADÍSTICO AGROPECUARIO 2023', 2023. Accessed: Jul. 11, 2024. [Online]. Available: <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2023/ANUARIO2023WEB.pdf>

- [10] Ma. N. Ackermann and A. Díaz, 'Horticultura: Situación y perspectivas. OPYPa Oficina de Programación y Política Agropecuaria. Anuario 2021', 2021. [Online]. Available: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/opypa>
- [11] G. A. Galván *et al.*, 'Genetic variation among Fusarium isolates from onion, and resistance to Fusarium basal rot in related Allium species', *Eur J Plant Pathol*, vol. 121, no. 4, pp. 499–512, 2008, doi: 10.1007/s10658-008-9270-9.
- [12] G. Galvan, P. H. Gonzalez, and A. Reggio, 'Onion leaf blight caused by Botrytis squamosa in Uruguay and the differential response of local cultivars', 2004. [Online]. Available: <http://www.bspp.org.uk/icpp98/5.1/4.html>
- [13] C. S. Cramer, 'Breeding and genetics of Fusarium basal rot resistance in onion', *Euphytica*, vol. 115, no. 3, pp. 159–166, 2000, doi: 10.1023/A:1004071907642.
- [14] D. Le, K. Audenaert, and G. Haesaert, 'Fusarium basal rot: profile of an increasingly important disease in Allium spp.', Jun. 01, 2021, *Springer Science and Business Media Deutschland GmbH*. doi: 10.1007/s40858-021-00421-9.
- [15] S. Sharma, S. Mandal, and C. S. Cramer, 'Recent Advances in Understanding and Controlling Fusarium Diseases of Alliums', *Horticulturae*, vol. 10, no. 5, May 2024, doi: 10.3390/horticulturae10050527.
- [16] G. Galván *et al.*, 'Evaluación de la respuesta a peronospora y fusarium en cebolla: síntesis de resultados 2007-2009.', *INIA Serie Actividades de Difusión; 600*, pp. 33–41, 2010. Accessed: Jul. 16, 2024. [Online]. Available: <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/11464/1/sad-600-p.33-41.pdf>
- [17] E. Straley, J. C. Marzu, and M. J. Havey, 'Genetic analyses of resistance to Fusarium basal rot in onion', *Horticulturae*, vol. 7, no. 12, Dec. 2021, doi: 10.3390/horticulturae7120538.
- [18] C. B. Michielse and M. Rep, 'Pathogen profile update: Fusarium oxysporum', *Mol Plant Pathol*, vol. 10, no. 3, pp. 311–324, May 2009, doi: 10.1111/J.1364-3703.2009.00538.X.

- [19] C. Alabouvette, C. Olivain, Q. Migheli, and C. Steinberg, 'Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*', Nov. 2009. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03014.x.
- [20] A. Taylor, V. Vágány, A. C. Jackson, R. J. Harrison, A. Rainoni, and J. P. Clarkson, 'Identification of pathogenicity-related genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*', *Mol Plant Pathol*, vol. 17, no. 7, pp. 1032–1047, Sep. 2016, doi: 10.1111/MPP.12346.
- [21] A. Taylor *et al.*, 'Assembly and characterisation of a unique onion diversity set identifies resistance to *Fusarium* basal rot and improved seedling vigour', *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 132, no. 12, pp. 3245–3264, Dec. 2019, doi: 10.1007/s00122-019-03422-0.
- [22] M. B. F. Steentjes, O. E. Scholten, and J. A. L. van Kan, 'Peeling the onion: Towards a better understanding of botrytis diseases of onion', *Phytopathology*, vol. 111, no. 3, pp. 464–473, Mar. 2021, doi: 10.1094/PHYTO-06-20-0258-IA.
- [23] A. R. Garfinkel, 'The history of botrytis taxonomy, the rise of phylogenetics, and implications for species recognition', *Phytopathology*, vol. 111, no. 3, pp. 437–454, Mar. 2021, doi: 10.1094/PHYTO-06-20-0211-IA/ASSET/IMAGES/LARGE/PHYTO-06-20-0211-IAF4.JPEG.
- [24] G. Holz, S. Coertze, and B. Williamson, 'The ecology of Botrytis on plant surfaces', in *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, and N. Delen, Eds., Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2007, ch. 2, pp. 9–27.
- [25] J. W. Lorbeer, A. M. Seyb, M. de Boer, and J. E. van den Ende, 'Botrytis species on bulb crops', in *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, and N. Delen, Eds., Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2007, ch. 15, pp. 273–294.
- [26] G. Agrios, *Plant pathology: Fifth edition*, vol. 9780080473. Academic Press, 2004. doi: 10.1016/C2009-0-02037-6.
- [27] J. Glazebrook, 'Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens', *Annu Rev Phytopathol*, vol. 43, no. 1, pp. 205–227, 2005, doi: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923.

- [28] R. Finkers *et al.*, 'Insights from the first genome assembly of Onion (*Allium cepa*)', *G3: Genes/Genomes/Genetics*, vol. 11, no. 9, 2021, doi: 10.1093/G3JOURNAL/JKAB243.
- [29] P. Yang *et al.*, 'AlliumDB: a central portal for comparative and functional genomics in Allium', *Hortic Res*, vol. 11, no. 2, Feb. 2024, doi: 10.1093/HR/UHAD285.
- [30] G. Galvan, H. Gonzalez Idiarte, and S. Sollier, 'Productive adaptation of onion (*Allium cepa* L.) landraces used for post-harvest storage', *Acta Horti*, vol. 433, no. May 1997, pp. 165–170, 1997, doi: 10.17660/ActaHorti.1997.433.15.
- [31] A. R. Alan, M. A. Mutschler, A. Brants, E. Cobb, and E. D. Earle, 'Production of gynogenic plants from hybrids of *Allium cepa* L. and *A. roylei* Stearn', *Plant Science*, vol. 165, no. 6, pp. 1201–1211, 2003, doi: 10.1016/S0168-9452(03)00327-3.
- [32] O. E. Scholten AE A W van Heusden AE L I Khrustaleva AE K Burger-Meijer AE R A Mank AE R G C Antonise AE J L Harrewijn AE W Van haecke AE E H Oost AE R J Peters AE C Kik *et al.*, 'The long and winding road leading to the successful introgression of downy mildew resistance into onion', *Euphytica* 2007 156:3, vol. 156, no. 3, pp. 345–353, Mar. 2007, doi: 10.1007/S10681-007-9383-9.
- [33] G. Holz and P. S. Knox-Davies, 'RESISTANCE OF ONION SELECTIONS TO FUSARIUM OXYSPORUM F. SP. CEPAE* (Met opsomming in Afrikaans)', 1974.
- [34] P. Galeano, P. H. González, L. F. Fraguas, and G. A. Galván, 'Age-related resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. cepae and associated enzymatic changes in seedlings of *allium cepa* and *A. fistulosum*', *Trop Plant Pathol*, vol. 39, no. 5, pp. 374–383, 2014, doi: 10.1590/S1982-56762014000500004.
- [35] G. A. Galván Vivero, 'Resistance to *Fusarium* basal rot and response to arbuscular mycorrhizal fungi in *Allium*', Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, 2009.
- [36] D. Le, M. Ameye, S. Landschoot, K. Audenaert, and G. Haesaert, 'Phenology-regulated defence mechanisms as drivers for *Fusarium* basal rot in onion (*Allium cepa*)', *Plant Pathol*, vol. 71, no. 6, pp. 1440–1453, Aug. 2022, doi: 10.1111/ppa.13574.

- [37] L. Currah and R. B. Maude, 'Laboratory tests for leaf resistance to *Botrytis squamosa* in onions', 1984.
- [38] J. N. de Vries, W. A. Wietsma, and T. de Vries, 'Introgression of leaf blight resistance from *Allium roylei* Stearn into onion (*A. cepa* L.)', *Euphytica*, vol. 62, no. 2, pp. 127–133, Jan. 1992, doi: 10.1007/BF00037938/METRICS.
- [39] P. T. Hyde *et al.*, 'Evaluation of Onion (*Allium cepa* L.) Lines and Hybrids Possessing Bs1 for Resistance against Multiple Isolates of *Botrytis squamosa*', *Crop Sci*, vol. 55, no. 1, pp. 136–145, Jan. 2015, doi: 10.2135/CROPSCI2014.03.0255.
- [40] O. E. Scholten *et al.*, 'SNP-markers in *Allium* species to facilitate introgression breeding in onion', *BMC Plant Biol*, vol. 16, no. 1, pp. 1–10, Aug. 2016, doi: 10.1186/S12870-016-0879-0/TABLES/4.
- [41] S. N. Panter and D. A. Jones, 'Age-related resistance to plant pathogens', *Adv Bot Res*, vol. 38, pp. 251–280, 2002, doi: 10.1016/s0065-2296(02)38032-7.
- [42] R. Hammerschmidt, 'Being an adult plant sometimes has its advantages', *Physiol Mol Plant Pathol*, vol. 89, pp. 5–6, 2015, doi: 10.1016/j.pmpp.2015.02.006.
- [43] M. P. Develey-Rivière and E. Galiana, 'Resistance to pathogens and host developmental stage: A multifaceted relationship within the plant kingdom', *New Phytologist*, vol. 175, no. 3, pp. 405–416, 2007, doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02130.x.
- [44] A. Casassola, S. P. Brammer, M. S. Chaves, J. A. Martinelli, F. Stefanato, and L. A. Boyd, 'Changes in gene expression profiles as they relate to the adult plant leaf rust resistance in the wheat cv. Toropi', *Physiol Mol Plant Pathol*, vol. 89, pp. 49–54, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.pmpp.2014.12.004.
- [45] S. M. Esmail, A. A. Aboulila, and D. A. El-Moneim, 'Variation in several pathogenesis - Related (PR) protein genes in wheat (*Triticum aestivum*) involved in defense against *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*', *Physiol Mol Plant Pathol*, vol. 112, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.pmpp.2020.101545.

- [46] M. J. Stadnik and O. D. Dhingra, 'Reaction of onion seeds and seedlings to *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepa* and its relation to bulb basal rot', *Fitopatol Bras*, 1995.
- [47] H. F. Schwartz and S. K. Mohan, 'Compendium of onion and garlic diseases and pests.', *Compendium of onion and garlic diseases and pests.*, no. Ed.2, 2007.
- [48] C. M. J. Pieterse, C. Zamioudis, R. L. Berendsen, D. M. Weller, S. C. M. Van Wees, and P. A. H. M. Bakker, 'Induced systemic resistance by beneficial microbes', *Annu Rev Phytopathol*, vol. 52, pp. 347–375, 2014, doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102340.
- [49] A. Hudson, A. Mullens, S. Hind, T. Jamann, and P. Balint-Kurti, 'Natural variation in the pattern-triggered immunity response in plants: Investigations, implications and applications.', *Mol Plant Pathol*, vol. 25, no. 3, pp. 1–20, Mar. 2024, doi: 10.1111/MPP.13445.
- [50] J. D. G. Jones and J. L. Dangl, 'The plant immune system', Nov. 16, 2006. doi: 10.1038/nature05286.
- [51] A. F. Ross, 'Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants', *Virology*, vol. 14, no. 3, pp. 340–358, Jul. 1961, doi: 10.1016/0042-6822(61)90319-1.
- [52] R. van Peer, ' Induced Resistance and Phytoalexin Accumulation in Biological Control of Fusarium Wilt of Carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r ', *Phytopathology*, vol. 81, no. 7, p. 728, 1991, doi: 10.1094/PHYTO-81-728.
- [53] G. Wei, 'Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria', *Phytopathology*, vol. 81, no. 12, p. 1508, 1991, doi: 10.1094/PHYTO-81-1508.
- [54] S. Alstrom, 'INDUCTION OF DISEASE RESISTANCE IN COMMON BEAN SUSCEPTIBLE TO HALO BLIGHT BACTERIAL PATHOGEN AFTER SEED BACTERIZATION WITH RHIZOSPHERE PSEUDOMONADS', *Journal of General and Applied Microbiology*, vol. 37, no. 6, pp. 495–501, 1991, doi: 10.2323/JGAM.37.495.

- [55] Y. Yu, Y. Gui, Z. Li, C. Jiang, J. Guo, and D. Niu, 'Induced Systemic Resistance for Improving Plant Immunity by Beneficial Microbes', Feb. 01, 2022, *MDPI*. doi: 10.3390/plants11030386.
- [56] N. Aerts, M. Pereira Mendes, and S. C. M. Van Wees, 'Multiple levels of crosstalk in hormone networks regulating plant defense', *Plant Journal*, vol. 105, no. 2, pp. 489–504, Jan. 2021, doi: 10.1111/TPJ.15124.
- [57] A. Martinez-Medina *et al.*, 'Recognizing Plant Defense Priming', *Trends Plant Sci*, vol. 21, no. 10, pp. 818–822, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.tplants.2016.07.009.
- [58] W. Desmedt, B. Vanholme, and T. Kyndt, 'Plant defense priming in the field: a review', in *Recent highlights in the discovery and Optimization of Crop Protection Products*, 2021, pp. 87–124. Accessed: Aug. 03, 2024. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128210352000450>
- [59] M. J. Reinders, M. M. Riemens, and J. Bremmer, 'The future of crop protection in Europe', *Innovate UK Knowledge Transfer Network*, no. February, p. 44, Nov. 2021, doi: 10.2861/086545.
- [60] T. Reglinski, N. Havis, H. J. Rees, and H. de Jong, 'The Practical Role of Induced Resistance for Crop Protection', May 01, 2023, *American Phytopathological Society*. doi: 10.1094/PHYTO-10-22-0400-IA.
- [61] R. S. Riseh, M. Hassanisaadi, M. Vatankhah, S. A. Babaki, and E. A. Barka, 'Chitosan as a potential natural compound to manage plant diseases', *Int J Biol Macromol*, vol. 220, pp. 998–1009, Nov. 2022, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2022.08.109.
- [62] L. C. van Loon, W. S. Pierpoint, T. Boller, and V. Conejero, 'Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins', *Plant Mol Biol Report*, vol. 12, no. 3, pp. 245–264, 1994, doi: 10.1007/BF02668748.
- [63] S. Ali *et al.*, 'Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance', Jul. 01, 2018, *Elsevier GmbH*. doi: 10.1016/j.micres.2018.04.008.

- [64] C. dos Santos and O. L. Franco, 'Pathogenesis-Related Proteins (PRs) with Enzyme Activity Activating Plant Defense Responses', Jun. 01, 2023, *MDPI*. doi: 10.3390/plants12112226.
- [65] Z. Han and R. Schneider, 'Dual functionality of pathogenesis-related proteins: defensive role in plants versus immunosuppressive role in pathogens', *Front Plant Sci*, vol. 15, p. 1368467, Aug. 2024, doi: 10.3389/FPLS.2024.1368467/BIBTEX.
- [66] L. C. van Loon, M. Rep, and C. M. J. Pieterse, 'Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants', *Annu Rev Phytopathol*, vol. 44, no. 1, pp. 135–162, 2006, doi: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425.
- [67] F. Passardi *et al.*, 'PeroxiBase: The peroxidase database', *Phytochemistry*, vol. 68, no. 12, pp. 1605–1611, Jun. 2007, doi: 10.1016/j.phytochem.2007.04.005.
- [68] 'Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)'. Accessed: Oct. 24, 2024. [Online]. Available: <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/EC1/11/1/>
- [69] B. Savelli *et al.*, 'RedoxiBase: A database for ROS homeostasis regulated proteins', *Redox Biol*, vol. 26, p. 101247, Sep. 2019, doi: 10.1016/J.REDOX.2019.101247.
- [70] 'RedOxiBase'. Accessed: Oct. 24, 2024. [Online]. Available: <https://redoxibase.toulouse.inrae.fr/classes/classes>
- [71] J. Shigeto and Y. Tsutsumi, 'Diverse functions and reactions of class III peroxidases', *New Phytologist*, vol. 209, no. 4, pp. 1395–1402, Mar. 2016, doi: 10.1111/NPH.13738.
- [72] C. D. T. Freitas, J. H. Costa, T. A. Germano, R. de O. Rocha, M. V. Ramos, and L. P. Bezerra, 'Class III plant peroxidases: From classification to physiological functions', Apr. 01, 2024, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.130306.
- [73] F. Passardi, D. Longet, C. Penel, and C. Dunand, 'The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants', *Phytochemistry*, vol. 65, no. 13, pp. 1879–1893, Jul. 2004, doi: 10.1016/j.phytochem.2004.06.023.
- [74] Y. Wang, Q. Wang, Y. Zhao, G. Han, and S. Zhu, 'Systematic analysis of maize class III peroxidase gene family reveals a conserved subfamily involved in abiotic stress

- response', *Gene*, vol. 566, no. 1, pp. 95–108, Jul. 2015, doi: 10.1016/J.GENE.2015.04.041.
- [75] K. G. Welinder *et al.*, 'Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*', *Eur J Biochem*, vol. 269, no. 24, pp. 6063–6081, 2002, doi: 10.1046/J.1432-1033.2002.03311.X.
- [76] L. Almagro, L. V. Gómez Ros, S. Belchi-Navarro, R. Bru, A. Ros Barceló, and M. A. Pedreño, 'Class III peroxidases in plant defence reactions', *J Exp Bot*, vol. 60, no. 2, pp. 377–390, Feb. 2009, doi: 10.1093/JXB/ERN277.
- [77] N. C. Veitch, 'Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme', *Phytochemistry*, vol. 65, no. 3, pp. 249–259, 2004, doi: 10.1016/j.phytochem.2003.10.022.
- [78] M. Quiroga *et al.*, 'A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin', *Plant Physiol*, vol. 122, no. 4, pp. 1119–1127, 2000, doi: 10.1104/PP.122.4.1119.
- [79] E. Hilaire *et al.*, 'Vascular defense responses in rice: peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening', *Mol Plant Microbe Interact*, vol. 14, no. 12, pp. 1411–1419, 2001, doi: 10.1094/MPMI.2001.14.12.1411.
- [80] B. K. Kristensen, K. Burhenne, and S. K. Rasmussen, 'Peroxidases and the metabolism of hydroxycinnamic acid amides in Poaceae', *Phytochem. Rev.*, vol. 3, no. 1–2, pp. 127–140, Jan. 2004, doi: 10.1023/B:PHYT.0000047800.59980.6E.
- [81] K. Sasaki *et al.*, 'Ten Rice Peroxidases Redundantly Respond to Multiple Stresses Including Infection with Rice Blast Fungus', 2004.
- [82] C. Silvar, F. Merino, and J. Díaz, 'Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*', *J Plant Physiol*, vol. 165, no. 10, pp. 1120–1124, Jul. 2008, doi: 10.1016/J.JPLPH.2007.11.008.
- [83] P. F. Dowd and E. T. Johnson, 'Association of a specific cationic peroxidase isozyme with maize stress and disease resistance responses, genetic

- identification, and identification of a cDNA coding for the isozyme', *J Agric Food Chem*, vol. 53, no. 11, pp. 4464–4470, Jun. 2005, doi: 10.1021/jf0404750.
- [84] P. A. Gay and S. Tuzun, 'Temporal and spatial assessment of defense responses in resistant and susceptible cabbage varieties during infection with *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*', *Physiol Mol Plant Pathol*, vol. 57, no. 5, pp. 201–210, 2000, doi: 10.1006/pmpp.2000.0299.
- [85] C. Pritsch, C. P. Vance, W. R. Bushnell, D. A. Somers, T. M. Hohn, and G. J. Muehlbauer, 'Systemic expression of defense response genes in wheat spikes as a response to *Fusarium graminearum* infection', *Physiol Mol Plant Pathol*, vol. 58, no. 1, pp. 1–12, Jan. 2001, doi: 10.1006/PMPP.2000.0308.
- [86] O. Wally, J. Jayaraj, and Z. Punja, 'Comparative resistance to foliar fungal pathogens in transgenic carrot plants expressing genes encoding for chitinase, β -1,3-glucanase and peroxidase', *Eur J Plant Pathol*, vol. 123, no. 3, pp. 331–342, Mar. 2009, doi: 10.1007/s10658-008-9370-6.
- [87] H. Ray, D. S. Douches, and R. Hammerschmidt, 'Transformation of potato with cucumber peroxidase: expression and disease response', *Physiol Mol Plant Pathol*, vol. 53, no. 2, pp. 93–103, Aug. 1998, doi: 10.1006/PMPP.1998.0164.
- [88] S. Azarabadi, H. Abdollahi, M. Torabi, Z. Salehi, and J. Nasiri, 'ROS generation, oxidative burst and dynamic expression profiles of ROS-scavenging enzymes of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) in response to *Erwinia amylovora* in pear (*Pyrus communis* L)', *Eur J Plant Pathol*, vol. 147, no. 2, pp. 279–294, Feb. 2017, doi: 10.1007/s10658-016-1000-0.
- [89] H. Liu *et al.*, 'Plant immunity suppression by an $\text{exo-}\beta$ -1,3-glucanase and an elongation factor 1 α of the rice blast fungus', *Nat Commun*, vol. 14, no. 1, Dec. 2023, doi: 10.1038/s41467-023-41175-z.
- [90] N. A. R. Gow, J.-P. Latge, and C. A. Munro, 'The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function', *Microbiol Spectr*, vol. 5, no. 3, May 2017, doi: 10.1128/microbiolspec.funk-0035-2016.

- [91] T. Perrot, M. Pauly, and V. Ramírez, 'Emerging Roles of β -Glucanases in Plant Development and Adaptative Responses', *Plants*, vol. 11, no. 9, p. 1119, May 2022, doi: 10.3390/PLANTS11091119.
- [92] M. R. Tucker *et al.*, 'Exploring the role of cell wall-related genes and polysaccharides during plant development', Jun. 01, 2018, *MDPI AG*. doi: 10.3390/plants7020042.
- [93] D. H. Hwang, S. T. Kim, S. G. Kim, and K. Y. Kang, 'Comprehensive Analysis of the Expression of Twenty-Seven β -1, 3-Glucanase Genes in Rice (*Oryza sativa* L.)', *Mol Cells*, vol. 23, no. 2, pp. 207–214, Apr. 2007, doi: 10.1016/S1016-8478(23)07375-2.
- [94] N. Dahiya, R. Tewari, and G. S. Hoondal, 'Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: A review', Aug. 2006. doi: 10.1007/s00253-005-0183-7.
- [95] S. O. Shobade, O. A. Zabolina, and M. Nilsen-Hamilton, 'Plant root associated chitinases: structures and functions', *Front Plant Sci*, vol. 15, 2024, doi: 10.3389/fpls.2024.1344142.
- [96] A. Malik and Preeti, 'Purification and properties of plant chitinases: A review', *J Food Biochem*, vol. 43, no. 3, p. e12762, Mar. 2019, doi: 10.1111/JFBC.12762.
- [97] A. Grover, 'Plant Chitinases: Genetic Diversity and Physiological Roles', *CRC Crit Rev Plant Sci*, vol. 31, no. 1, pp. 57–73, Jan. 2012, doi: 10.1080/07352689.2011.616043.
- [98] R. Hüchelhoven, 'Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility', Jun. 2008. doi: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094325.
- [99] Z. Minic, 'Physiological roles of plant glycoside hydrolases', Mar. 2008. doi: 10.1007/s00425-007-0668-y.
- [100] H. Mérida *et al.*, 'Non-branched β -1,3-glucan oligosaccharides trigger immune responses in *Arabidopsis*', *Plant Journal*, vol. 93, no. 1, pp. 34–49, Jan. 2018, doi: 10.1111/tpj.13755.
- [101] E. Jongedijk *et al.*, 'Synergistic activity of chitinases and β -1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants', *Euphytica: International*

- Journal of Plant Breeding*, vol. 85, no. 1, pp. 173–180, 1995, doi: 10.1007/BF00023946/METRICS.
- [102] C. B. Lawrence, N. P. Singh, J. Qiu, R. G. Gardner, and S. Tuzun, 'Constitutive hydrolytic enzymes are associated with polygenic resistance of tomato to *Alternaria solani* and may function as an elicitor release mechanism', *Physiol Mol Plant Pathol*, vol. 57, no. 5, pp. 211–220, Nov. 2000, doi: 10.1006/PMPP.2000.0298.
- [103] P. Gupta, I. Ravi, and V. Sharma, 'Induction of β -1,3-glucanase and chitinase activity in the defense response of *Eruca sativa* plants against the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*', *J Plant Interact*, vol. 8, no. 2, pp. 155–161, Jun. 2013, doi: 10.1080/17429145.2012.679705.
- [104] A. P. Salim *et al.*, 'Defense responses in tomato landrace and wild genotypes to early blight pathogen *Alternaria solani* infection and accumulation of pathogenesis-related proteins', *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, vol. 44, no. 12, pp. 1147–1164, Jul. 2011, doi: 10.1080/03235408.2010.482763.
- [105] R. Aggarwal, S. Purwar, L. Kharbikar, and S. Gupta, 'Induction of a wheat β -1,3-glucanase gene during the defense response to *Bipolaris sorokiniana*', *Acta Phytopathol Entomol Hung*, vol. 46, no. 1, pp. 39–47, Jun. 2011, doi: 10.1556/APhyt.46.2011.1.5.
- [106] O. K. Anisimova, A. V. Shchennikova, E. Z. Kochieva, and M. A. Filyushin, 'Pathogenesis-related genes of pr1, pr2, pr4 and pr5 families are involved in the response to fusarium infection in garlic (*Allium sativum* L.)', *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 13, p. 6688, Jul. 2021, doi: 10.3390/IJMS22136688/S1.
- [107] J. G. Fuchs, Y. Moënne-Loccoz, and G. Défago, 'Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Strain Fo47 Induces Resistance to *Fusarium Wilt* in Tomato', *Plant Dis*, vol. 81, no. 5, pp. 492–496, 1997, doi: 10.1094/PDIS.1997.81.5.492.
- [108] D. Zappacosta, R. Delhey, and N. Curvetto, 'Growth and enzyme activity in roots and calli of resistant and susceptible *Allium* lines as influenced by sterile culture filtrates of *Phoma terrestris*', 2003.

- [109] S. R. McLusky, M. H. Bennett, M. H. Beale, M. J. Lewis, P. Gaskin, and J. W. Mansfield, 'Cell wall alterations and localized accumulation of feruloyl-3'-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by *Botrytis allii* are associated with actin polarisation, peroxidase activity and suppression of flavonoid biosynthesis', *The Plant Journal*, vol. 17, no. 5, pp. 523–534, Mar. 1999, doi: 10.1046/J.1365-313X.1999.00403.X.
- [110] L. A. Turnbull *et al.*, 'Plant growth rates and seed size: A re-evaluation', *Ecology*, vol. 93, no. 6, pp. 1283–1289, 2012, doi: 10.1890/11-0261.1.
- [111] S. K. Krueger, A. A. Weinman, and W. H. Gabelman, 'Combining ability among inbred onions for resistance to *Fusarium* basal rot', *HORTSCIENCE*, 1989.
- [112] L. Franco Fraguas, F. Batista-Viera, and J. Carlsson, 'Preparation of high-density Concanavalin A adsorbent and its use for rapid, high-yield purification of peroxidase from horseradish roots', *Journal of Chromatography B*, vol. 803, no. 2, pp. 237–241, Apr. 2004, doi: 10.1016/J.JCHROMB.2003.12.023.
- [113] F. B. Abeles and L. E. Forrence, 'Temporal and Hormonal Control of β -1,3-Glucanase in *Phaseolus vulgaris* L', *Plant Physiol*, vol. 45, no. 4, p. 395, 1970, doi: 10.1104/PP.45.4.395.
- [114] P. Bernfeld, '[17] Amylases, α and β ', *Methods Enzymol*, vol. 1, no. C, pp. 149–158, Jan. 1955, doi: 10.1016/0076-6879(55)01021-5.
- [115] Y. S. Kim *et al.*, 'CHRK1, a Chitinase-Related Receptor-Like Kinase in Tobacco', *Plant Physiol*, vol. 123, no. 3, pp. 905–916, Jul. 2000, doi: 10.1104/PP.123.3.905.
- [116] E. Frändberg and J. Schnürer, 'Evaluation of a chromogenic chito-oligosaccharide analogue, p-nitrophenyl- β -D-N,N'-diacetylchitobiose, for the measurement of the chitinolytic activity of bacteria', *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 76, no. 3, pp. 259–263, Mar. 1994, doi: 10.1111/J.1365-2672.1994.TB01625.X.
- [117] S. Elavarthi and B. Martin, 'Spectrophotometric assays for antioxidant enzymes in plants', in *Plant Stress Tolerance. Methods in Molecular Biology*, vol. 639, R. Sunkar, Ed., Humana Press, 2010, ch. 16, pp. 273–281. doi: 10.1007/978-1-60761-702-0_16.

- [118] W. E. Finch-Savage, H. A. Clay, J. R. Lynn, and K. Morris, 'Towards a genetic understanding of seed vigour in small-seeded crops using natural variation in *Brassica oleracea*', *Plant Science*, vol. 179, no. 6, pp. 582–589, Dec. 2010, doi: 10.1016/J.PLANTSCI.2010.06.005.
- [119] F. Passardi, C. Cosio, C. Penel, and C. Dunand, 'Peroxidases have more functions than a Swiss army knife', Jul. 2005. doi: 10.1007/s00299-005-0972-6.
- [120] S. Dogliotti, P. Colnago, G. Galván, and L. Aldabe, *Bases Fisiológicas del crecimiento y desarrollo de los principales cultivos hortícolas Tomate (*Lycopersicum sculentum*), Papa (*Solanun tuberosum*) y Cebolla (*Allium cepa*)*. Montevideo: Facultad de Agronomía, 2011.
- [121] F. Boschi, 'Study of Phenotypic Characteristics and Analysis of Distinctness, Uniformity and Stability in Cultivars of Onion (*Allium cepa* L.) in Uruguay', *Agrociencia Uruguay*, vol. 18, no. 2, pp. 61–71, Dec. 2014, doi: 10.31285/AGRO.18.465.
- [122] A. V. Sorokan, B. R. Kuluev, G. F. Burkhanova, and I. V. Maksimov, 'RNA silencing of the anionic peroxidase gene impairs potato plant resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary', *Mol Biol*, vol. 48, no. 5, pp. 709–717, Oct. 2014, doi: 10.1134/S0026893314050124.
- [123] P. F. Caligiore Gei, J. G. Valdez, R. J. Piccolo, and C. R. Galmarini, 'Influence of *Fusarium* spp. isolate and inoculum density on resistance screening tests in onion', *Trop Plant Pathol*, vol. 39, no. 1, pp. 19–027, [Online]. Available: www.sbfito.com.br
- [124] A. Taylor *et al.*, 'Identification of differential resistance to six *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* isolates in commercial onion cultivars through the development of a rapid seedling assay', *Plant Pathol*, vol. 62, no. 1, pp. 103–111, Feb. 2013, doi: 10.1111/j.1365-3059.2012.02624.x.
- [125] J. Xu *et al.*, 'Chitinase chi 2 positively regulates cucumber resistance against *fusarium oxysporum* f. Sp. *cucumerinum*', *Genes (Basel)*, vol. 13, no. 1, p. 62, Jan. 2022, doi: 10.3390/GENES13010062/S1.

- [126] P. Galeano, N. Vásquez, H. Pardo, L. F. Fraguas, G. A. Galván, and S. Alborés, 'Nanomaterials for the control of the onion phytopathogen *Botrytis squamosa*', *Plant Nano Biology*, vol. 14, p. 100215, Nov. 2025, doi: 10.1016/J.PLANA.2025.100215.
- [127] R. S. Riseh, M. Hassanisaadi, M. Vatankhah, S. A. Babaki, and E. A. Barka, 'Chitosan as a potential natural compound to manage plant diseases', *Int J Biol Macromol*, vol. 220, pp. 998–1009, Nov. 2022, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2022.08.109.
- [128] S. C. Chun and M. Chandrasekaran, 'Chitosan and chitosan nanoparticles induced expression of pathogenesis-related proteins genes enhances biotic stress tolerance in tomato', *Int J Biol Macromol*, vol. 125, pp. 948–954, Mar. 2019, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2018.12.167.
- [129] F. A. Silva *et al.*, 'A peroxidase purified from cowpea roots possesses high thermal stability and displays antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*', *Biocatal Agric Biotechnol*, vol. 42, p. 102322, Jul. 2022, doi: 10.1016/J.BCAB.2022.102322.

