

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA Y ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE
ACCESIONES DE CEBOLLA FRENTE A
Peronospora destructor Berk. Casp.**

por

Mariana ARIAS PANDOLFO

**TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Ingeniero Agrónomo**

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2014**

Tesis aprobada por:

Director:

Ing. Agr. Guillermo Galván

Ing. Agr. Pablo H. González

Ing. Agr. Margarita García

Fecha: 3 de junio de 2014

Autor:

Mariana Arias Pandolfo

AGRADECIMIENTOS

A Tata, que le hubiese emocionado mucho este momento, que siempre estuvo pendiente y preocupado... “tu vida siempre estuvo cerca y esto es verdad, vida, tu vida fue una hermosa vida, tu vida transformo la mía...y eran los tiempos de la primavera, dejaste tu sonrisa en ella y esto es verdad...” (Fito Páez, El tema de Piluso)

A mi familia, que me impulso a seguir, que me enseñó el valor del esfuerzo, que me apoyó y estuvo siempre.

A Lal, que es una mujer luchadora, que todos los días me enseña a seguir con valentía. Gracias por estar conmigo incondicionalmente en todos los momentos de mi vida, por estar pendiente de toda mi carrera y apoyarme.

A los compañeros de vida que he encontrado en el camino, que han sido y son incondicionales. Gracias por todo su apoyo.

A Guillermo, que me ha enseñado no solo de cebollas sino que de la vida. Has sido un tutor incondicional y a lo largo de todo el tiempo que hemos trabajado juntos se ha transformado en un buen amigo. Gracias.

A los compañeros funcionarios del CRS: Nati, Victor, Jara y Quito. Gracias por trabajar conmigo, regalarme su compañía, su paciencia, su apoyo, sus palabras y su sencillez. Les estaré por siempre agradecida.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VIII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. EL CULTIVO DE CEBOLLA EN URUGUAY.....	1
1.2. CONTROL DEL MILDIÚ DE LA CEBOLLA.....	2
1.3. HIPÓTESIS Y PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	3
1.4. OBJETIVOS.....	4
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	5
2.1. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO.....	5
2.2. EL MILDIÚ DE LA CEBOLLA.....	6
2.3. RESISTENCIA A <i>Peronospora destructor</i>	12
2.4. METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA.....	14
2.4.1. <u>Evaluación a campo</u>	14
2.4.2. <u>Ensayos con hojas sueltas</u>	15
2.4.3. <u>Relaciones histológicas en la evaluación de la resistencia</u>	15

3.	<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	20
3.1.	AJUSTE DE LAS TÉCNICAS DE INOCULACIÓN.....	20
3.1.1.	<u>Ajuste de la metodología de aplicación del inóculo sobre la superficie de la hoja</u>	20
3.1.2.	<u>Ensayo de inoculación en trozos de hojas</u>	21
3.1.2.1.	Material vegetal.....	21
3.1.2.2.	Descripción del ensayo.....	22
3.1.2.3.	Análisis de los resultados.....	22
3.1.3.	<u>Ensayo de inoculación con gotas en plantas</u>	23
3.1.3.1.	Material vegetal.....	23
3.1.3.2.	Descripción del ensayo.....	24
3.1.3.3.	Análisis de los resultados.....	25
3.2.	EVALUACIÓN DE GERMOPLASMA EN DOS FOTOPERÍODOS.....	28
3.2.1.	<u>Material vegetal</u>	28
3.2.2.	<u>Descripción del ensayo</u>	28
3.2.3.	<u>Análisis estadístico</u>	30
3.3.	ENSAYO DE SENSIBILIDAD A CAMPO.....	31
3.3.1.	<u>Material vegetal</u>	31
3.3.2.	<u>Descripción del ensayo</u>	33
3.3.3.	<u>Análisis estadístico</u>	33
3.4.	EVALUACIÓN DE RELACIONES HISTOLÓGICAS AL MICROSCOPIO.....	37
3.4.1.	<u>Primera etapa de evaluación</u>	37
3.4.1.1.	Material vegetal.....	37
3.4.1.2.	Descripción del ensayo.....	38
3.4.1.3.	Análisis de los resultados.....	38

3.4.2. <u>Segunda etapa de evaluación</u>	38
3.4.2.1. Material vegetal.....	38
3.4.2.2. Descripción del ensayo.....	39
3.4.2.3. Análisis de los resultados.....	40
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	43
4.1. AJUSTE DE LA TÉCNICA DE INOCULACIÓN.....	43
4.1.1. <u>Ajuste de la metodología de aplicación del inóculo sobre la superficie de la hoja</u>	43
4.1.2. <u>Ensayo de inoculación en trozos de hojas</u>	43
4.1.3. <u>Ensayo de inoculación puntual en planta</u>	46
4.2. EVALUACIÓN DE GERMOPLASMA EN DOS FOTOPE- RÍODOS.....	48
4.3. RESULTADOS DEL ENSAYO A CAMPO.....	51
4.3.1. <u>Severidad</u>	51
4.3.2. <u>Peso promedio de bulbo</u>	53
4.4. EVALUACIÓN DE PREPARADOS HISTOLÓGICOS AL MICROSCOPIO.....	56
4.4.1. <u>Primera etapa de evaluación histológica</u>	56
4.4.2. <u>Segunda etapa de evaluación histológica</u>	58
4.4.2.1. Estructuras fúngicas y tinciones.....	58
4.4.2.2. Evaluación cuantitativa de infecciones a campo	64
4.4.2.3. Evaluación del proceso de infección en trozos de hojas en el laboratorio.....	67
5. <u>CONCLUSIONES</u>	73
6. <u>RESUMEN</u>	75

7.	<u>SUMMARY</u>	77
8.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	79
9.	<u>APÉNDICES</u>	84

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Accesiones utilizadas en el ensayo de inoculación en trozos de hojas.....	21
2. Accesiones utilizadas en el ensayo de inoculación de <i>Peronospora destructor</i> (Pd) con gotas en plantas.....	24
3. Accesiones de cebolla y <i>Allium fistulosum</i> que se incluyeron en el ensayo de respuesta a <i>Peronospora destructor</i> bajo dos fotoperiodos.....	27
4. Asignación porcentual a cada una de las clases o categorías utilizadas en la evaluación.....	31
5. Accesiones de cebolla y <i>Allium fistulosum</i> que se incluyeron en el ensayo de respuesta a <i>Peronospora destructor</i> bajo dos fotoperiodos.....	32
6. Asignación porcentual a cada una de las clases o categorías utilizadas en la evaluación.....	34
7. Accesiones de cebolla y <i>Allium fistulosum</i> que se incluyeron en el ensayo de respuesta a <i>Peronospora destructor</i> a nivel histológico.....	37
8. Accesiones de cebolla y <i>Allium fistulosum</i> que se incluyeron en el ensayo de respuesta a <i>Peronospora destructor</i> a nivel histológico en la segunda etapa de análisis.....	39
9. Test de comparación de medias de cada accesión, promedio de los dos fotoperiodos evaluados.....	49
10. Severidad para cada accesión en el ensayo a campo.....	52
11. Peso medio de bulbo para cada accesión en el ensayo a campo.....	54

12. Proporción de zoosporangios germinados, zoosporangios germinados y penetrados, y el total de zoosporangios activos para cada accesión.....	71
--	----

Figura No.

1. Haustorios de <i>Oomycetes</i> con una estructura de cuello y cabeza en el patosistema (A) <i>Plasmopara vitícola</i> y vid, tinción con stains-all; y (B) <i>Hyaloperonospora parasítica</i> en <i>Brassicac</i> , tinción con azul de tolueno.....	18
2. Esquema de las inoculaciones controladas en trozos de hojas separados de la planta.....	22
3. Esquema de las inoculaciones con gotas en plantas en macetas.....	25
4. Peso medio de bulbo en función de la severidad a campo de <i>Peronospora destructor</i> . Los símbolos y colores distinguen las accesiones de día corto (DC), día intermedio (DI) y día largo (DL)....	56
5. Predominancia de <i>Stemphillium vesicarium</i> en la primera etapa de evaluaciones histológicas.....	57
6. Zoosporangio de <i>Peronospora destructor</i> liberando zoosporas o germinando.....	57
7. Observaciones en la primera etapa de evaluaciones histológicas. (A) Estoma que tendría una infección enquistada en la cavidad subestomática (al centro), mientras que los otros estomas no tienen infección. (B) Célula de la epidermis (al centro, más oscura) con una reacción de hipersensibilidad ante la infección de los estomas adyacentes. Tinciones con azul de tolueno.....	57
8. Hoja con mancha de <i>P. destructor</i> con una infección natural esporulando, colectada a campo. Tinción con Calcofluor +acridine orange. (A) enfoque de la epidermis, y (B) del parénquima subepidermico. Las flechas indican infecciones de las cavidades subestomáticas.....	60

9. Zoosporangios de <i>Peronospora destructor</i> penetrando por el estoma. (A,B) diferentes planos de enfoque de la misma imagen. Tinción con Eosin Y. (A) Dos zoosporangios penetrando por el mismo estoma; las flechas indican la posición de los apresorios. (B) infección inicial o enquistamiento (flecha) de la cavidad subestomática.....	61
10. Evaluación de tinciones de tejidos del patógeno con Stains-All. (A) Zoosporangio germinado, con estructuras teñidas de naranja al interior, y puntuaciones violáceas en la hifa de penetración (B) Zoosporangios que germinaron y que alcanzaron las cavidades subestomáticas en el cultivar Regia, tinción con Stains-All.....	62
11. (A) Zoosporangio germinado con infección subestomática que se extiende entre las células del parénquima, tinción con toluidine blue. (B) infecciones del parénquima de la hoja iniciadas en las cavidades subestomáticas, tinción con acridina orange + clacofluor; (C) infección subestomática que se empieza a extender en el sentido del largo de la hoja. La flecha indica un posible apresorio con la estructura de cuello y cabeza, de acuerdo a lo descrito en la literatura. Tinción con acridina orange + clacofluor. (D) Estoma con infección subestomática y estoma sano. Con esta tinción (calcofluor + toluidine blue) se observan los núcleos de las células guarda de los estomas.....	63
12. Distribución de la observación de 100 estomas de hojas colectadas a campo con manchas típicas de <i>Peronospora destructor</i> con esporulación visible, para Pantanoso, Pantanoso x Regia F1 y Regia, en el número de estomas (S) sanos; (E) esporulando; (I) con infección subestomática; (I+E) con infección subestomática y esporulación. Los datos son promedios de 4 muestras de campo. Las flechas en las fotografías indican la posición de estomas representativos de cada categoría.....	66

13. (A, B) zoosporangios germinados sin penetrar a las 24 horas de la inoculación. (C) zoosporangios germinados y penetrando por un estoma a las 48 horas desde la inoculación (D) Zoosporangio germinado y penetrando por un estoma en INIA Valenciana. En una célula de la epidermis adyacente al punto de penetración, el núcleo se trasladó junto al punto de infección, presenta paredes engrosadas (más oscuras que el resto de la epidermis), y probablemente tiene una reacción de hipersensibilidad..... 68
14. Proceso de infección en trozos de hojas en el laboratorio para seis accesiones, como la proporción de zoosporangios germinados, y zoosporangios germinados y penetrados por los estomas a diferentes tiempos desde la inoculación. Los datos son promedios de cuatro preparados, con evaluación de 50 zoosporangios por preparado..... 70
-

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL CULTIVO DE CEBOLLA EN EL URUGUAY

La cebolla (*Allium cepa* L.) es una hortaliza que en cuanto a su importancia económica ocupa, en Uruguay, el tercer lugar entre las hortalizas, después de la papa y el tomate, medido por el aporte al Valor Bruto de Producción. La cebolla ocupa además el primer lugar entre las hortalizas en cuanto al número de productores que la cultivan (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2009). En la zafra 2013 ocupó el segundo lugar en cuanto a la superficie sembrada (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2014).

En Uruguay se consumen 7,5 kg/ año/ persona, siendo de las hortalizas más consumidas. Dependiendo del mes, la cebolla ocupa desde el cuarto al séptimo lugar entre las frutas y hortalizas en los ingresos al Mercado Modelo (URUGUAY. MGAP. DIGEGRA, 2013).

Existen dos zonas de producción bien marcadas. La zona sur (que comprende principalmente los departamentos de Montevideo y Canelones), siendo la cebolla para conservación poscosecha la principal estrategia de producción. La zona litoral norte (Salto) es la otra zona de producción importante, siendo las cebollas precoces y de rápida comercialización la principal estrategia de producción.

Teniendo en cuenta las zafras de los últimos cinco años, el rendimiento promedio de la zona sur es de 14,8 toneladas y en la zona litoral norte de 17,5 toneladas por hectárea. Considerando el mismo periodo, se sembraron en promedio 1405 hectáreas en la zona sur y 400 ha en la zona litoral norte. Teniendo en cuenta estos datos, la zona sur representa en promedio el 75% de la producción de cebolla nacional y el 80% del área sembrada. Por otro lado, a nivel nacional la zona litoral norte representa el 25% en cuanto a la producción y el 20% del área sembrada de cebolla en el país (URUGUAY. MGAP. DIGEGRA, 2013).

La cebolla es un cultivo que, si bien cada uno de los cultivares tiene un momento específico de cosecha, a nivel país la cosecha de cebolla se extiende

desde setiembre, para los cultivares más precoces del litoral norte, hasta los cultivares más tardíos de la zona sur que se cosechan en enero-febrero.

La cebolla es un rubro de almacenamiento, dependiendo de las características del cultivar o población local y de las condiciones de almacenamiento, entre otras condiciones. Las cebollas tienen un periodo de conservación que puede extenderse hasta julio-agosto.

Actualmente los cultivares disponibles presentan susceptibilidad a enfermedades foliares que generan pérdidas de rendimiento, aumento de los costos de producción y un aumento en los riesgos (Galván, 2011). Dentro de estas enfermedades se destaca el mildiú causado por *Peronospora destructor*.

1.2. CONTROL DEL MILDIÚ DE LA CEBOLLA

El mejoramiento genético en cebollas en Uruguay ha generado cultivares con muy buenas características productivas, que fueron ampliamente adoptados por los productores. Sin embargo se presentan susceptibles frente a esta enfermedad (Galván, 2011).

El mildiú de la cebolla causado por *P. destructor* puede causar desde la muerte de plantas, disminución en el rendimiento hasta problemas en la conservación. A nivel de campo su control se basa en la aplicación periódica de agrotóxicos (fungicidas), lo cual significa un alto número de aplicaciones por temporada (Maeso, 2005). El INIA Las Brujas ha desarrollado un sistema de alarma para esta enfermedad para nuestras condiciones ambientales. Este sistema se basa en la determinación de los periodos en que se presentan condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad. Este sistema se diseñó para un tamaño mínimo de planta de 20 cm. Los cálculos que permiten determinar los periodos de riesgo de esporulación, tienen en cuenta la temperatura promedio diurna y nocturna, periodos de humedad relativa mayor a 95% y condiciones de precipitación (Maeso, 2005). Sin embargo, el sistema de alarma detecta frecuentes y numerosos períodos de condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad, por lo que no se ha logrado disminuir significativamente el número de aplicaciones de agrotóxicos.

La resistencia genética aparece entonces como una alternativa eficaz, económica y ambientalmente amigable, siendo un objetivo ampliamente difundido en los programas de mejoramiento. Esta estrategia contribuye significativamente a racionalizar las medidas de manejo en los predios con producción convencional y a potencial los programas de producción integrada y orgánica (Galván, 2011).

En la Tesis de maestría de Colnago (2010) se evaluó la respuesta del germoplasma local a *P. destructor*. Se encontró que distintas accesiones de cebolla respondían de forma diferente frente al patógeno. En general, las variedades tardías (día largo) presentaron una mayor resistencia que las variedades precoces (día corto) y semi-precoces (intermedio). Sin embargo, no se conoce si esa respuesta parcialmente resistente a la enfermedad está asociada al estado fenológico, ya que en variedades de día largo la bulbificación ocurre tardíamente, y el cultivo está en crecimiento vegetativo al momento de la enfermedad (Colnago, 2010).

Por otro lado, se identificó la variedad Regia, de origen brasilero, con una respuesta de resistencia parcial a la enfermedad y ciclo intermedio (Galván, 2011). Estas fuentes de resistencia podrían tener diferentes orígenes, pero serían una puerta al desarrollo de cultivares resistentes.

1.3. HIPÓTESIS Y PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo se realizó con las siguientes hipótesis:

- el inicio de la bulbificación tiene un efecto significativo en la respuesta a *P. destructor* en diversos cultivares.
- la edad de las plantas, y consecuentemente de las hojas expandidas, también influye en la respuesta a este patógeno.
- existen genes de resistencia específicos en cultivares como Regia que confieren resistencia a *Peronospora destructor* (medible en menor incidencia y/o severidad de la enfermedad).
- tanto la resistencia asociada a la etapa juvenil como la resistencia debida a genes específicos determinan menor tasa de formación de haustorios y de crecimiento del patógeno dentro del tejido foliar.

1.4. OBJETIVOS

Esta tesis tuvo por objetivos:

- (1) ajustar la metodología de inoculación en condiciones controladas para el patosistema *Allium cepa*- *Peronospora destructor*.
- (2) evaluar la influencia del estado de desarrollo y el inicio de la bulbificación en la respuesta de diferentes accesiones de cebolla a *P. destructor*, patógeno causante del mildiu de la cebolla.
- (3) diagnosticar las diferencias entre accesiones susceptibles y resistentes en el proceso de la enfermedad a nivel histológico.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO

La cebolla es una especie bienal. En el primer año se desarrolla el bulbo, todo el crecimiento de esta estación es vegetativo. En el segundo año de crecimiento se desarrolla la fase reproductiva, se desarrollan las inflorescencias y las semillas (Brewster, 1994). En la primera estación de crecimiento, responde al fotoperiodo para bulbificar. Si bien varios factores ambientales inciden sobre el proceso de bulbificación, este factor es desencadenante de la bulbificación determinando el inicio de esta nueva etapa de desarrollo. La planta de cebolla tiene respuesta de día largo y cualitativa al fotoperiodo, es decir que la bulbificación se desencadena una vez que en el proceso de alargamiento de los días se supera determinadas horas de luz (fotoperiodo crítico). Si no se supera el fotoperiodo crítico, no hay bulbificación (Dogliotti et al., 2011).

Cada una de las accesiones de cebolla responden a un fotoperiodo crítico diferente, aunque todas bulbifican frente al alargamiento de los días (Brewster, 1994). En el país se clasifican las accesiones de acuerdo al fotoperiodo al cual responden. Quedan definidas con este criterio tres clases o categorías: las que responden a un fotoperiodo crítico más corto se denominan variedades de día corto (DC), las que responden a fotoperiodo de día intermedio (DI) y las variedades que responden a fotoperiodos más largos (DL) denominadas variedades de día largo (Dogliotti et al., 2011).

Para la producción de cebolla, comercialmente se dispone de cultivares nacionales y cultivares importados. Además existen otros orígenes de la semilla sembrada, ya que hay productores que siembran poblaciones locales.

Un cultivar es un taxón que ha sido seleccionado por un atributo en particular o combinaciones de atributos. Es claramente distinto (de otros cultivares), uniforme y estable. Cuando se lo propaga por medios apropiados, retiene esas características (ICNCP, 1995)

Respecto a lo que significa una variedad local o criolla no existe un acuerdo en que aspectos son los que definen una variedad local y por lo tanto

no hay acuerdo en una definición única. Zeven (1995) define las variedades criollas como una variedad con una alta capacidad para tolerar estreses bióticos y abióticos, resultando en una alta estabilidad en rendimiento y en un nivel intermedio de rendimiento bajo sistemas agrícolas de bajos insumos. Esta definición resalta la adaptación de las variedades locales al medio en el cual se desarrollaron y se conservan, su rusticidad. En cambio, Louette et al. (1997) definieron a las variedades criollas como una variedad de los agricultores, que no ha sido seleccionada por programas formales de mejoramiento. Esta definición introduce al agricultor como el que mantiene y reproduce estas variedades. En el mismo año, Teshome et al. (1997) definieron a las variedades locales como una población de plantas variables, adaptadas a condiciones agroclimáticas locales que es nominada, seleccionada y mantenida por agricultores tradicionales para cumplir sus necesidades sociales, económicas, culturales y ecológicas. Por tanto, estos autores plantearon que las variedades locales y los agricultores son interdependientes, necesitan una da la otra para su supervivencia. Esta última definición engloba los conceptos manejados en las dos definiciones anteriores.

Tanto los cultivares introducidos como las poblaciones locales (criollas), pueden tener diferentes respuestas a las principales enfermedades del cultivo. El cultivo de cebolla es afectado por múltiples enfermedades foliares a lo largo de su ciclo de crecimiento. Las enfermedades más importantes que justifican las medidas de control a nivel de campo en Uruguay son las causadas por *Botrytis squamosa*, *Alternaria porri*, *Stemphylium vesicarium* y *Peronospora destructor* (González et al., 2011).

2.2. EL MILDIÚ DE LA CEBOLLA

El mildiu causado por *Peronospora destructor* es una de las enfermedades de mayor importancia económica a nivel mundial en la producción de cebolla. Pérdidas de rendimiento de entre 30-70% de la producción de cebolla, se dan por el ataque de este patógeno (van der Doorn, 1959). En Uruguay, actualmente constituye la principal enfermedad foliar del cultivo. Para el control de *P. destructor* actualmente se utilizan productos químicos disponibles en el mercado, que no logran un control adecuado y eficiente, lo que provoca un alto uso de estos agrotóxicos con riesgos para el productor y para el ambiente (Maeso, 2005). Esta situación determina la

importancia de encontrar formas de control complementarias para esta enfermedad (Scholten et al., 2008). La resistencia genética a *P. destructor* aparece como una alternativa posible.

Una planta presenta enfermedad cuando una o varias de las funciones fisiológicas son alteradas. Son dos los factores que pueden causar alteraciones en estas funciones: los organismos patógenos o determinadas condiciones del ambiente físico (Agrios, 2005). Enfermedad también se define como cualquier alteración fisiológica de la planta (o parte importante de la planta) debida a uno o varios factores de stress, cuyo resultado es la manifestación en la planta de síntomas. El o los síntomas en las plantas son una alteración o desviación del crecimiento y/o desarrollo normal de una planta que es causada por la enfermedad (Niks y Lindhout, 2004).

El mildiu de la cebolla es una enfermedad foliar (Schwartz y Mohan, 2008). Los síntomas son resultado de la reacción de la planta ante el agente que ocasiona enfermedad, la reacción comienza y se concentra en la zona enferma desde donde se difunden y se hacen visibles produciendo cambios histológicos (Agrios, 2005). Los síntomas típicos de esta enfermedad foliar son manchas ovales o cilíndricas de color verde amarillo pálido a café. Estas manchas, además de aparecer en las hojas, también aparecen en los escapos florales (González et al., 2011).

Peronospora destructor es un parásito obligado, biotrofo, del Reino *Stramenopiles*, phillum *Chromoalveolates*, clase *Oomycete*. Un parásito obligado es aquel que vive permanentemente durante todo el ciclo de su vida (o parte de él) en estrecha relación con el hospedante, organismo vivo del que toma los nutrientes, se alimenta, pero como resultado le genera un daño para el hospedero (Niks y Lindhout, 2004). El parásito puede vivir tanto dentro como fuera del organismo, el cual le provee el alimento (Agrios, 2005).

La palabra patógeno significa “generador de enfermedad”, es todo aquel microorganismo que explota las plantas para su alimentación (Niks y Lindhout, 2004). Todo organismo patógeno que se alimenta del tejido vivo del hospedante se denomina biotrofo. Para esto, forman haustorios en las células del hospedero las cuales permanecen vivas más allá de la presencia de estas estructuras del patógeno. Los haustorios invaginan la membrana sin penetrar

en el citoplasma (Niks y Lindhout, 2004). También, biotrofo, se lo toma como sinónimo de biofago o parásito obligado, ya que sólo pueden crecer y reproducirse en el hospedante (Agrios, 2005). Este último concepto introduce la necesidad de las células vivas para la reproducción, que no es más que la perpetuación del patógeno en el tiempo.

Además de los patógenos biotrofos, están los patógenos considerados necrotrofos, los que se alimentan de tejido vegetal que ellos mismo matan inmediatamente a través de toxinas y de enzimas que degradan las paredes celulares vegetales, para lograr la infección del hospedero (Bouwmeester et al., 2009). Los hemibiotrofos son patógenos que tienen un metabolismo intermedio entre los biotrofos y los necrotrofos. Estos infectan tejido vivo y luego de que la infección ocurre, matan las células de la planta hospedera. Estos dos últimos tipos de patógenos se pueden cultivar fácilmente a nivel de laboratorio en medios de cultivos. Por otra parte los hongos biotrofos, tales como *P. destructor* son muy difíciles de cultivar en el laboratorio (Niks y Lindhout, 2004), lo que conlleva una gran dificultad al momento de realizar estudios con inoculaciones artificiales ya que la experimentación queda sujeta a la estacionalidad de la aparición del signo de la enfermedad. Generalmente los patógenos de estos grupos están especializados para infectar la parte aérea de la planta, principalmente las hojas, tal como es el caso de *P. destructor* (Niks y Lindhout, 2004).

Los hongos hemibiotrofos y biotrofos son los enemigos naturales hacia los que se dirigen los mayores esfuerzos de mejoramiento genético por resistencia. Probablemente esto responde a que en los huéspedes de estos dos grupos de enemigos naturales existen múltiples genes de resistencia completamente efectivos (Niks y Lindhout, 2004).

Estos patógenos generalmente son policíclicos. Es decir, que por cada estación de cultivo (hospedero) este enemigo natural o patógeno completa más de un ciclo de reproducción sexual o asexual (Niks y Lindhout, 2004).

Los hongos y los oomycetes son organismos pequeños, eucariotas, generalmente microscópicos, que producen esporas. Son heterótrofos, carecen de clorofila. Son ramificados, a menudo filamentosos y tienen paredes celulares formadas por quitina, celulosa o ambos componentes (Agrios, 2005). Las

paredes celulares de los oomycetes, entre los cuales se encuentra *Peronospora destructor*, están formadas por celulosa y β -glucano (Bouwmeester et al., 2009).

Tienen un soma vegetativo, denominado **micelio**, compuesto por filamentos microscópicos, continuos, más o menos alargados y ramificados que presentan las paredes celulares bien definidas. A cada uno de estos filamentos que componen al soma o micelio se le denomina **hifa**, y es a través de las puntas de estas estructuras desde donde crece el hongo. El micelio puede ser cenocítico, como es el caso de *P. destructor* (micelio formado por células multinucleadas, continuas y tubulares) o septado (células uni o binucleadas, Agrios, 2005).

Peronospora destructor, al igual que todos los oomycetes se reproduce principalmente por la producción de esporas. Las esporas son estructuras reproductoras o especializadas para la propagación del hongo; pueden estar compuestas por una o varias células (Agrios, 2005). A lo largo del ciclo de vida del patógeno, se distinguen esporas de dos orígenes: asexuales (multiplicación imperfecta, estado anamórfico) o sexuales (reproducción perfecta, estado telomórfico).

Las esporas asexuales se originan por la división del micelio sin que ocurra cariogamia o meiosis. En los *Oomycetes* (tal como es *P. destructor*) estas esporas se forman dentro de un saco que se denomina esporangio, que se forma sobre una estructura denominada esporangióforo. El esporangióforo, tanto como los esporangios y las esporas tienen una morfología diferente y característica para cada una de las especies de hongos. Las esporas se diseminan cuando el esporangio se rompe y éstas son liberadas. En los *Oomycetes* las esporas generadas asexualmente son flageladas, lo que le permite un cierto movimiento. Estas esporas se denominan **zoosporas**. Los esporangios que las contienen toman la denominación de **zoosporangio** y los esporangióforos, **zoosporangióforos**. En *P. destructor* los zoosporangios tienen forma de limón y los zoosporangióforos son arborescentes.

De la mayoría de los hongos se conoce la fase de reproducción sexual. En los *Oomycetes* los gametos son de forma diferente (anteridio y oogonio), y al cigoto que forman se le denomina **oófera**. Cuando los núcleos que provienen de los gametos, núcleos sexuales, se fusionan en el cigoto se forma un núcleo

diploide (2n). Por lo general las primeras divisiones celulares después de la formación del cigoto son divisiones meióticas. Como resultado de estas divisiones meióticas los hongos tienen durante todo su ciclo de vida núcleos haploides (n), hasta que éstos se fusionan para formar el cigoto (Agrios, 2005).

La esporulación es el proceso por el cual el hongo produce esporas que le permiten dispersarse y generar nuevas infecciones. Este proceso para *P. destructor* requiere ausencia de luz, temperaturas entre 4.7 y 20.6°C y una humedad relativa igual o superior al 95% (Hildebrand y Sutton, 1982), durante más de seis horas. Estas condiciones se dan de forma prolongada durante la noche. La relación entre las condiciones ambientales y la liberación de esporas aún no están determinadas, si bien se sabe que éstas son liberadas durante el día (Bashi y Aylor, 1983).

Se denomina inóculo a toda parte de cualquier patógeno que pueda generar infección (Agrios, 2005). El inóculo son esporas u otros propágulos del enemigo natural (patógeno o parásito) los cuales al entrar en contacto con la planta hospedera pueden generar una infección exitosa o no (Niks y Lindhout, 2004).

Existen dos tipos de inóculo: el inóculo primario y el inóculo secundario. El primero se refiere a las estructuras, generalmente de origen sexual (en el caso de *P. destructor*, la oósfera) que dispersan el patógeno en el tiempo, y le permiten sobrevivir de una temporada de cultivo a la otra. El segundo tipo, el inóculo secundario, se desarrolla en las infecciones primarias, lesiones que genera la enfermedad (síntoma), de origen asexual y le permite al patógeno dispersarse en el espacio.

El inóculo primario genera las infecciones primarias, que introducen la enfermedad en el cultivo o la inician en la temporada. El inóculo secundario genera infecciones secundarias, que dispersa la infección dentro del cultivo. La infección primaria en el caso de *P. destructor* se genera a partir de la germinación de la oósfera, estructura de sobrevivencia que pasa de una estación de cultivo a la siguiente. *Peronospora destructor* es un patógeno obligado, por lo que persiste en restos del cultivo o en el suelo (Schwartz y Mohan, 2008). También sobrevive en bulbos como micelio, o puede dispersarse en las semillas (González et al., 2011). Las oosferas germinan mediante tubos

germinales, pero en unos cuantos casos producen un esporangio no diferenciado que produce zoosporas (en forma similar a como ocurre con el inóculo secundario).

El inóculo secundario está conformado por los esporangios asexuales que se forman en los extremos de la estructura arborescente del esporangióforo. La dispersión del inoculo secundario es a través del viento. Por este medio es que los zoosporangios logran alcanzar nuevas plantas e iniciar una nueva infección. Las zoosporas pueden sobrevivir durante un día post liberación, o de tres a cinco días si permanecen en el zoosporangio (Hildebrand y Sutton 1982, Leach et al. 1982). Cuando las condiciones ambientales son favorables se da la esporulación del patógeno sobre las hojas que aparece como el signo de color gris a violeta (Schwartz y Mohan 2008, González et al. 2011). El período de latencia o tiempo desde la infección a la esporulación es de 10 a 16 días (Hildebrand y Sutton, 1982), aunque se datan periodos de latencia de 15 a 20 días en el germoplasma local de cebolla (Colnago, 2010).

La inoculación es la llegada del inóculo a la planta. A nivel de campo esto se da naturalmente. De todas maneras, cuando se trabaja en condiciones controladas, el término "inoculación" se refiere a la aplicación de esporas u otros propágulos del enemigo natural sobre o en la planta hospedera (Niks y Lindhout, 2004). Para que el proceso de infección se desencadene se requiere agua libre sobre las hojas y temperaturas entre 1 y 25°C, siendo la óptima 13°C. Cuando las temperaturas se encuentran entre 3 y 14 °C, la infección requiere de 2 a 6 horas. Este tiempo se incrementa cuando las temperaturas se incrementan.

Una vez que las zoosporas del patógeno llegan a la planta, infectan al huésped mediante la penetración a través de las aberturas naturales (estomas, heridas) y crece a través del espacio intercelular. Posteriormente, penetra en las células del huésped a través de los haustorios (Agrios, 2005). También se ha descrito la germinación de los zoosporangios directamente, formando una hifa especializada (penetration peg) que penetra a través de estomas (Li et al., 2011).

2.3. RESISTENCIA A *Peronospora destructor*

El estudio y la explotación de la genética de la resistencia a enfermedades de las plantas es un hecho bastante reciente (Agrios, 2005). Es a principios de 1900 que comienzan los primeros estudios de la herencia de la resistencia de las plantas a las enfermedades. Estos estudios comenzaron en 1905 con Biffen quien describió la herencia mendeliana para el patosistema trigo-*Fusarium*. Los estudios continuaron, pero es recién en 1956 que Flor comprobó lo que hoy se denomina relación gen a gen (Flor, 1956). La teoría de la relación gen a gen establece que para cada gen de resistencia de la planta hay un correspondiente gen de avirulencia en el patógeno. Se produce una reacción de reconocimiento por la cual, ese gen de resistencia de la planta se expresa fenotípicamente (Niks y Lindhout, 2004). También en el año 1956 Gaüman propuso la hipersensibilidad como una forma de resistencia en la que mueren en la planta algunas de sus células en torno a la infección del patógeno para aislarlo y así no permitir que la infección avance.

En 1963 Vanderplank distinguió dos grupos de resistencias que han sido muy utilizados posteriormente: la resistencia vertical (resistencia específica a la raza, tipo de resistencia que es efectiva solamente a genotipos específicos de un patógeno, avirulento (Niks y Lindhout, 2004), y la resistencia horizontal, resistencia no específica a la raza. Esta última resistencia es específica para una especie de patógeno, pero inespecífica para todos los genotipos de esa especie (Niksy Lindhout, 2004). Muller propuso en 1961, y Cruickshank lo confirmó y amplió dos años después, que la resistencia de las plantas a las enfermedades se deben a fitoalexinas, metabolitos antimicrobianos de las plantas que no se encuentran en las plantas sanas (Agrios, 2005).

En Uruguay se dispone de variabilidad genética en la respuesta a *P. destructor* como para seleccionar cultivares de cebolla más resistentes. La variabilidad genética se encuentra en cultivares provenientes de programas de mejoramiento que son comercializados, y variedades locales que provienen de productores que multiplican ellos mismos la semilla (Galván, 2011). En la Tesis de maestría de Colnago (2010) se evaluó la respuesta del germoplasma local a *P. destructor*. Se encontró que distintas accesiones de cebolla respondían de forma diferente frente al patógeno. En general, las variedades tardías (día largo)

presentaron una mayor resistencia que las variedades precoces (día corto) y semi-precoces (intermedio).

Se plantearon varias posibilidades para explicar los resultados diferenciales entre los distintos cultivares (Colnago, 2010). Se deja abierta la interrogante de que si la edad y el estado de desarrollo de la planta de cebolla influyen la respuesta diferencial entre variedades.

A diferencia de otras enfermedades en la que las plantas se vuelven más resistentes a medida que avanzan en sus estados de desarrollo (Develey-Riviére y Galaina, 2007). En este caso, a medida que la planta va alcanzando un mayor estado de madurez la susceptibilidad a este patógeno se incrementa, más aun cuando comienza la etapa de bulbificación. Aun sembradas simultáneamente (Colnago, 2010), las variedades más tempranas alcanzarían esta etapa de bulbificación y de mayor susceptibilidad cuando las condiciones ambientales son más favorables para el desarrollo de esta enfermedad. Sin embargo, las más tardías llegarían a la etapa adulta cuando las condiciones ambientales ya no son tan favorables. Esto podría ser una causa por la que estas últimas cebollas son menos afectadas, ya que por el ciclo evaden las condiciones ambientales favorables en el momento de mayor susceptibilidad fisiológica.

Una segunda hipótesis que explique las diferencias entre los cultivares podría ser la resistencia genética activa. En ese caso la planta activaría mecanismos de defensa que enlentecen el crecimiento del patógeno y alargan el periodo de latencia (Niks et al., 2011). Esa resistencia podría explotarse para ser transferida a las variedades de día corto e intermedio que son más susceptibles a esta enfermedad, ya que sería una resistencia no dependiente del estado fisiológico. Un ejemplo de este tipo sería el cultivar Regia (de ciclo intermedio o semi-precoc), que presenta un alto nivel de resistencia a *P. destructor* (Galván, 2011).

Este mayor o menor grado de resistencia se denomina resistencia parcial, es la resistencia que resulta en una reducción del tipo de la epidemia a pesar de un tipo de infección susceptible. En el caso de la resistencia parcial la única forma de determinar el nivel de resistencia es directamente en experimentos policíclicos (a campo), aunque se pueden medir algunos de los

componentes de la resistencia en pruebas monocíclicas (Niks y Lindhout, 2004).

Frecuentemente, especies emparentadas a las especies cultivadas son utilizadas como fuente de resistencia a enfermedades en esos cultivos (Hajjar y Hodgkin, 2007). La resistencia a *P. destructor* también se ha investigado en especies cercanas a la cebolla. En el caso de *Allium roylei*, se encontró resistencia completa y monogénica (Kofoet et al., 1990). Se ha explotado el alto nivel de resistencia a *P. destructor* disponible en *A. roylei*, mediante cruzamientos interespecíficos e introgresión (Scholten et al., 2008).

2.4. METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA

2.4.1. Evaluación a campo

Para medir el éxito de la instalación de la enfermedad en un cultivo se definen dos conceptos fundamentales: incidencia y severidad (Agrios, 2005). La primera es una medición a nivel de cultivo y la segunda a nivel de planta. La incidencia es una medida de la dispersión de la enfermedad entre las unidades del cultivo, y se cuantifica generalmente como el porcentaje de plantas afectadas por la enfermedad. La severidad es una medida de la cantidad de enfermedad presente sobre una planta, o un promedio de plantas. En el caso de manchas foliares, se define como el porcentaje de tejido afectado por la enfermedad. El grado de la expresión fenotípica de la resistencia en la planta hospedera, o el grado de severidad es afectada por múltiples factores: la presencia de alelos de resistencia, que determinan la respuesta para una determinada base genética en el genotipo del patógeno, el estado de desarrollo de la planta, y factores ambientales como la temperatura y la humedad relativa (Niks y Lindhout, 2004). En el caso de las enfermedades policíclicas y de dispersión aérea, que es el caso de *P. destructor*, el parámetro que más interesa medir en evaluaciones a campo es la severidad.

Por otro lado, el diseño experimental en evaluaciones a campo debe minimizar la denominada “interferencia entre parcelas” (Niks y Lindhout, 2004). Este fenómeno implica que parcelas de genotipos resistentes puedan estar más atacadas en un ensayo que en cultivos comerciales, por la influencia de parcelas vecinas de genotipos susceptibles. Los genotipos susceptibles,

generan una presión de inóculo mayor que la que enfrentaría el genotipo resistente. Para evitar esta interferencia, se toman medidas que tiendan a homogeneizar la presión de inóculo en el ensayo, como el intercalado de surcos con un único cultivar o genotipo (Niks y Lindhout, 2004).

2.4.2. Ensayos con hojas sueltas

Una posibilidad de evaluar la resistencia en plantas adultas es hacerlo en trozos de plantas expuestas al patógeno. En este caso hay que considerar que los resultados de estas pruebas no siempre son los mismos que en un ensayo de evaluación de resistencia a campo. Sin embargo, permite realizar varias repeticiones de una misma planta. Es importante que la evaluación de los trozos de plantas se realicen al poco tiempo de la instalación del ensayo y que cada uno de estos estén expuestos a la misma cantidad de inóculo para que las diferencias observadas no sean producto de una exposición diferencial al patógeno (Niks y Lindhout, 2004).

2.4.3. Relaciones histológicas en la evaluación de resistencia

La resistencia determina el fracaso o enlentecimiento en el establecimiento de la enfermedad en comparación con genotipos susceptibles, fenómeno que también puede ser comprobado en preparados microscópicos (Galván, 2010).

Para el patosistema *Brassica – Hyaloperonospora parasitica*, un *Oomicete* al igual que *P. destructor*, a nivel histológico se ha encontrado que no hay diferencias entre especies hospederas susceptibles y resistentes en la etapa de infección, pero sí en la formación de haustorios para el establecimiento de la biotrofia (Li et al., 2011). Sin embargo, hasta el momento no han sido comunes los estudios con *Oomicetes* de la relación a nivel histológico, estudios que podrían determinar la presencia de reacciones de hipersensibilidad, e inferir los mecanismos bioquímicos asociados y la durabilidad de la resistencia.

Kortekamp (2005) investigó sobre métodos de tinción para el estudio de *Plasmopara viticola* en trozos de hojas infectadas. Plantea que para el caso de las enfermedades en las que el patógeno pasa la mayor parte del tiempo dentro

de la hoja (como *Plasmopara viticola* la cual describe Kortekamp, característica que comparte con *P. destructor*) se requieren técnicas de tinción especiales. En los análisis microscópicos es deseable que las técnicas utilizadas permitan visualizar y diferenciar las células del huésped y las estructuras parasíticas. Estas estructuras tienen similitudes en cuanto a su constitución, especialmente las paredes celulares, que en el caso de *Peronospora destructor* están formadas por celulosa y β -glucano (Bouwmeester et al., 2009), y el contenido de quitina en la pared es discutido. Por este motivo, se vuelve fundamental encontrar una técnica que permita diferenciarlas claramente.

Varias tinciones e iluminadores ópticos son exitosos en la visualización de hifas, vesículas, haustorios, gametangias y oosporas. La determinación química de las estructuras teñidas es difícil, ya que es difícil diagnosticar con certeza (dada su similar constitución) si estamos frente a estructuras del patógeno obligado o a células de la planta (Kortekamp, 2005).

Las tinciones y los iluminadores ópticos de fluorescencia pueden ser usados solos o en combinación. Kortekamp (2005) señaló la importancia de establecer bien estas técnicas o implementar nuevas técnicas que puedan ayudar a identificar y diferenciar las estructuras infecciosas y su composición química en secciones delgadas de material vegetal infectado. El autor propone para secciones semi-delgadas (1,0 μ m) de trozos de hojas infectadas, la fijación con etanol, y posterior imbibición en metacrilato. A continuación, el autor ensayó varias técnicas de tinción durante 5 minutos con:

- (a) 0.01% acridina naranja (CI46005) en agua destilada.
- (b) Solución saturada de Blankophor RKH (CI 508150) en metanol
- (c) 0.01% calcoflour blanco M2R (iluminador fluorescente 28 CI 40622) en 0.075 M buffer fosfato pH 8.
- (d) 0.1% Carboxyfluorescein
- (e) 0.1% Chlorazole negro E en agua destilada.
- (f) 0.1% Eosin B (CI 45400) en agua destilada.
- (g) 0.5% Primulin (CI 49000) en agua destilada.
- (h) 0.05% Toluidine azul O (CI 52040) en agua de la canilla pH7.
- (i) 0.01% *Stains-all* disuelto previamente en una pequeña cantidad de etanol y luego diluido en agua destilada de pH 7.

Finalmente, todos los trozos de hoja infectados los examinó con microscopio de luz y epifluorescente. Las imágenes fueron fotografiadas.

Con la tinción de Toluidine azul O se obtuvo una visión general, y se observaron todas las estructuras típicas de infección: hifas, vesículas, apresorio y haustorio. Con esta tinción las paredes celulares del patógeno mostraron metacromasia (la célula del patógeno se tiñó de un color diferente a la tinción que se le aplica). El citoplasma del patógeno se tiñó de azul y las paredes se tiñeron de rojizo. La hifa infectiva, vesicular y apresorio se observaron fácilmente. Las paredes celulares de la planta también se tiñeron de rojo pero más pálido que el patógeno (Kortekamp, 2005).

Con la tinción con Stains-all fue posible distinguir la planta del patógeno. Se logró observar la hifa intercelular que desarrolla varios haustorios en la célula de la planta, la cabeza y el cuello de los haustorios así como también se distinguieron la pared celular de la planta y del hongo. El hongo se tiñe de rosado, y las estructuras de la planta se tiñeron de azul- púrpura (Kortekamp, 2005).

Con la doble tinción de acridina naranja y calcofluor blanco, la hifa absorbe principalmente el iluminador óptico y muestra un color azul blanquecino, mientras que el haustorio muestra solo afinidad con la acridina naranja. En tanto, la doble tinción con carboxyfluorescein y calcofluor blanco acentúa la pared celular del hongo y la cabeza del haustorio (Figura 1). También se distinguieron las paredes celulares de los esporangióforos, y las células guardas de los estomas están enfatizadas (Kortekamp, 2005).

La doble tinción con Primulin y Blankophor RKH fluorescente acentuó la pared celular del hongo. Chlorazole Black E permitió ver el oogonio y el anteridio; y con Eosin B se distinguió la oospora (Kortekamp, 2005).

Existen otros estudios a nivel histológico en los que se estudió el patosistema *Plasmopara viticola* y *Vitis* sp., en los que se utilizaron diferentes técnicas de tinción para lograr la visualización y diferenciación de las estructuras del patógeno y las de la planta hospedera. Gindro et al. (2003) estudiaron la susceptibilidad de dos cultivares de *Vitis vinifera* y dos variedades interespecíficas al downy mildew, evaluada en racimos de uva, con microscopio

electrónico. Cada uno de los cultivares fueron inoculados con *Plasmopara viticola* en tres momentos de desarrollo diferentes. Las muestras fueron examinadas con microscopio y se les midió la síntesis de estilbenos.

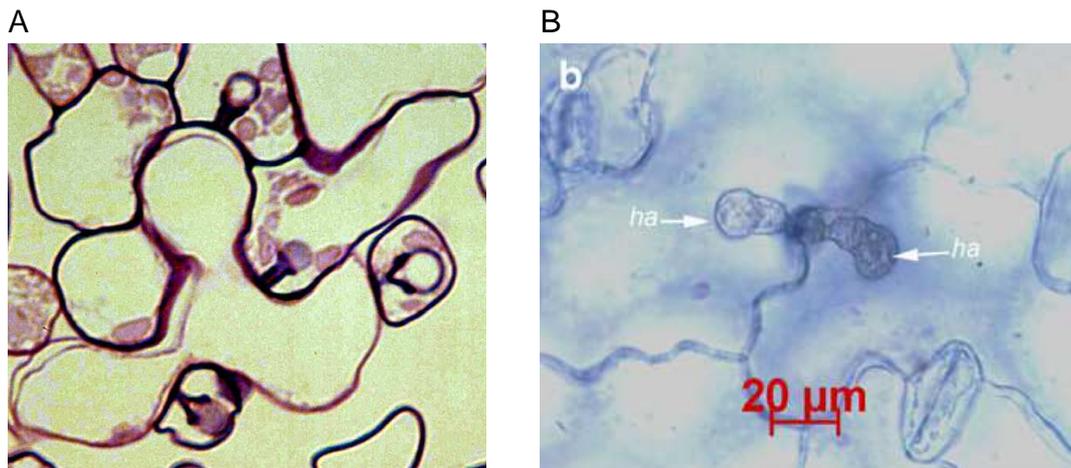


Figura 1. Haustorios de Oomycetes con una estructura de cuello y cabeza en el patosistema **(A)** *Plasmopara viticola* y vid (Kortekamp, 2005), tinción con stains-all; y **(B)** *Hyaloperonospora parasitica* en Brassicas (Li et al., 2011), tinción con azul de tolueno.

Los preparados se fijaron con osmium tetroxido vapor (solución acuosa 2% OsO_4 (m/v) y 3% CrO_3 (v/v)) por cuatro horas a temperatura ambiente en cámara húmeda. Después se deshidrataron en soluciones seriadas de acetona de 10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100% (v/v), colocándolos diez minutos en hielo a cada uno. Se secaron con CO_2 de acuerdo al método del punto crítico de secado (critical point dryer, Baltech) recubierto con platino. Las observaciones se realizaron con microscopio electrónico de barrido, diez veces por ejemplar, a las 24 y 120 horas después de la infección. Para las observaciones en microscopio de luz brillante y epifluorescente, se realizó una tinción con azul de tolueno similar a la ya descrita por Kortekamp (2005).

Gindro et al. (2003) encontraron con esta metodología diferencias significativas en los pedúnculos, el raquis y la caliptra en la estructura estomática entre los cultivares resistentes y susceptibles. Los cultivares resistentes mostraron modificaciones a nivel estomático en pedicelos,

receptáculos y raquis. Los estomas presentan varias grietas alrededor, células guardas desestructuradas y en algunos casos el colapso total de la apertura estomática debido a la superposición por el desarrollo del tejido epidérmico. En el ovario, algunos estomas mostraron material sólido dentro de la apertura estomática, lo que hace que el estoma parezca que está cerrado. En los cultivares susceptibles no se encontraron modificaciones estomáticas. En accesiones de vid susceptibles se generó esporulación del patógeno mientras que en las accesiones resistentes no se produjo esporulación (Gindro et al., 2003).

En otra investigación, Boso y Kassemeyer (2008) estudiaron la susceptibilidad de diferentes cultivares de uva de vino Europeas frente a downy mildew. Utilizaron discos de hojas inoculados, los cuales fueron aclarados con KOH 1M y teñidos con anilina azul de acuerdo con Kiefer et al. (2002). Se analizaron las muestras con microscopio epifluorescente.

Con esta tinción lograron observar la colonización del hongo, las vesículas subestomáticas formadas a través de la hifa primaria, y el haustorio primario. Se observó la elongación de la hifa invadiendo el espacio intercelular y los haustorios.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. AJUSTE DE LAS TÉCNICAS DE INOCULACIÓN

3.1.1. Ajuste de la metodología de aplicación del inóculo sobre la superficie de la hoja

Se realizaron pruebas de inoculación con cuatro técnicas diferentes. Todas estas técnicas se implementaron sobre plantas enteras de la accesión Pantanoso del Sauce CRS.

El inóculo se tomó de plantas que se encontraban esporulando en el campo, temprano en la mañana (desde las 8 a las 9 horas). Se llevaron las hojas colectadas al laboratorio, y se realizó un raspaje de la zona de esporulación con un isopo de algodón. Estos isopos se colocaron en un vaso de bohemia con agua corriente, y por agitación fueron liberando las zoosporas. Se logró una suspensión de agua con zoosporangios, con una concentración estimada en 10^4 zoosporangios por ml (Kofoet y Zinkernagel, 1989), la cual fue utilizada posteriormente para realizar la inoculación. Se controló la concentración de zoosporangios por mililitro en cámara de Neubauer.

En un primer momento se probaron dos técnicas. La primera consistió en asperjar el follaje de las plantas (previamente humedecido) con la suspensión de zoosporas, y la segunda en la distribución de la solución de zoosporas en dos de las hojas del follaje, también previamente humedecidas, con un cotonete. Cada una de las macetas se puso en cámara húmeda. Todas las plantas en macetas inoculadas se colocaron en la cámara de crecimiento. En esta primera inoculación de prueba las plantas permanecieron tres días en la cámara con una temperatura diurna de 14 °C, temperatura nocturna de 12 °C y 12 horas de luz. Posteriormente se retiraron de la cámara, se dejaron bajo condiciones ambientales en cámara húmeda durante cuatro días, luego de transcurrido este período, se les quitó la cámara húmeda. Se reembolsaron 17 días después de la inoculación para generar condiciones de esporulación.

En el segundo momento se probaron dos técnicas diferentes a las dos anteriormente mencionadas. En la primera se asperjó el follaje de las plantas con la solución de esporas, sin humedecimiento previo. En el segundo caso la inoculación se realizó colocando sobre las hojas previamente humedecidas el inóculo seco con pincel, en este caso no en todo el follaje sino que en dos de las hojas. Estas plantas inoculadas permanecieron ocho días en la cámara de crecimiento en las mismas condiciones que en la inoculación de prueba anterior. Luego permanecieron en condiciones ambientales sin cámara húmeda. Se volvieron a colocar las plantas en cámara húmeda 14 días post inoculación.

3.1.2. Ensayo de inoculación en trozos de hojas

3.1.2.1. Material vegetal

Con este ensayo se pretendió observar la respuesta de diferentes variedades a la inoculación con *P. destructor*, en hojas separadas de la planta, con una cantidad de solución inoculadora conocida y constante. Se tomaron cuatro accesiones de cebolla (Cuadro 1).

Cuadro 1. Accesiones utilizadas en el ensayo de inoculación en trozos de hojas.

Accesión	Ciclo ^a	Respuesta a Pd ^a	Origen
Caballero	DI	Moderadamente resistente	Población local
Takmark	DC	Moderadamente resistente	Cultivar F1, Holanda
UR9719	DI	Susceptible	Población local
<i>Allium galanthum</i>	— ^c	Moderadamente susceptible ^{a,b}	Especie emparentada ^d

^a Clasificadas de acuerdo a los requerimientos para bulbificar, como día corto (DC) o día intermedio (DI). Evaluaciones realizadas en el Centro Regional Sur (Galván 2011, Colnago et al. 2012).

^b Kofoet y Zinkernagel (1989).

^c No bulbifica.

^d Center for Genetic Resources (CGR), Wageningen, Holanda.

3.1.2.2. Descripción del ensayo

Se colocó en un taper una hoja de papel absorbente, humedecido con 60 μL de agua. Sobre esta hoja de papel se colocaron tres trozos de hojas recién retirados de la planta. De cada una de las variedades se realizaron cuatro repeticiones, es decir cuatro tapers, con tres trozos de hojas cada uno (Figura 2).

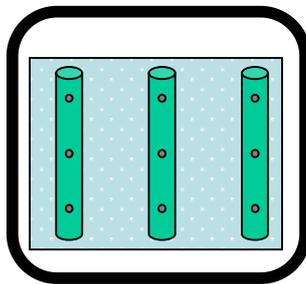


Figura 2. Esquema de las inoculaciones controladas en trozos de hojas separados de la planta.

La suspensión inoculante se obtuvo de la misma manera que para el caso de las inoculaciones anteriores. Luego se procedió a colocar sobre cada una de las hojas tres gotas de la solución de esporas de volumen 10 μL . Después de inoculadas se colocaron los tapers tapados en la cámara con temperatura diurna de 14°C y nocturna de 12°C, y 12 horas de luz.

Luego de tres días en estas condiciones se evaluó cada uno de los trozos de hoja en cuanto al estado de la misma. Después se continuó con cada una de las gotas colocadas sobre estas hojas, indicando el estado de la gota y el avance de la enfermedad en torno a la inoculación.

3.1.2.3. Análisis de los resultados

En este ensayo la evaluación de los resultados se realizó con un carácter descriptivo o cualitativo, ya que el fin de este ensayo era definir la metodología hacia las inoculaciones para el trabajo histológico. Es por este motivo que en

este caso interesa saber cuáles son los factores que hay que tener en cuenta en este tipo de inoculaciones.

Se tomaron dos criterios de interés los cuales se observaron en todas unidades experimentales. El primero tiene que ver con la capacidad de las hojas de permanecer turgentes una vez separadas de la planta madre. En este caso se evaluó el porcentaje de las hojas que permaneció verde y con un buen nivel de turgencia. Interesa saber si esta es una característica dependiente de la accesión o si es igual para todas las accesiones. Sería entonces una característica relacionada únicamente a la especie y por lo tanto sólo interesaría conocer el tiempo en que todas permanecen turgentes. El segundo criterio tiene que ver con el desarrollo de los síntomas y la descripción de la sintomatología de cada uno de los puntos de inoculaciones. En este caso interesa si ese desarrollo es una característica generalizable para cada accesión o depende de cada uno de los puntos en el que se depositó la gota de inoculación.

En resumen, se evaluó para cada una de las repeticiones de cada accesión el porcentaje de hojas verdes como indicador del estado de conservación de las hojas, el porcentaje de inoculaciones localizadas con síntomas y sin síntomas. Además se realizó una descripción de los síntomas observados y la generalización en los casos que correspondió.

3.1.3. Ensayo de inoculación con gotas en plantas

3.1.3.1. Material vegetal

El ensayo se instaló el día 25 de octubre. Se tomaron dos accesiones de cebolla (Naqué, Valenciana Martínez) y la accesión de *A. fistulosum* (Cuadro 2). De la primera y la segunda se incluyeron cuatro macetas y de la última dos macetas.

Las dos accesiones de cebolla seleccionadas tienen características contrastantes. Mientras “Naqué” es un cultivar de ciclo corto, que responde como una accesión moderadamente susceptible, “Valenciana Martínez” es una accesión que es de día largo y que responde a *P. destructor* como moderadamente resistente.

Cuadro 2. Accesiones utilizadas en el ensayo de inoculación de *Peronospora destructor* (Pd) con gotas en plantas.

Variedad	Ciclo ^a	Respuesta a Pd ^a	Origen de la accession
Naqué	DC	Moderadamente susceptible	Cultivar nacional
Valenciana Martínez	DL	Moderadamente resistente	Población local
<i>Allium fistulosum</i>	— ^c	Especie hospedera ^{a, b}	Especie emparentada ^d

^a Clasificadas de acuerdo a los requerimientos para bulbificar, como día corto (DC) o día largo (DL). Evaluaciones realizadas en el Centro Regional Sur (Galván 2011, Colnago et al. 2012).

^b Kofoet y Zinkernagel (1989).

^c No bulbifica.

^d Accesoión UR05010, cultivada, colectada en Uruguay.

3.1.3.2. Descripción del ensayo

De cada una de las plantas se eligieron dos hojas, una con un desarrollo más reciente que la otra y con un estado sanitario bueno. En cada una de estas se colocó una cinta indicadora. Se realizó una inoculación localizada, la primera a tres cm por debajo de la cinta indicadora y las sucesivas a tres cm entre ellas, de volumen de solución de esporas conocida, 5 µL (Figura 3). Así se obtuvieron tres gotas por hoja y dos hojas por planta. Se preparó la solución de esporas de la misma manera que en los dos ensayos anteriores.

Luego de inoculadas se procedió a colocarles una bolsa previamente humedecida, fijada a la maceta con una banda elástica. Posteriormente se las colocó en la cámara en condiciones controladas a una temperatura diurna de 14 °C, temperatura nocturna de 12°C durante cuatro días.

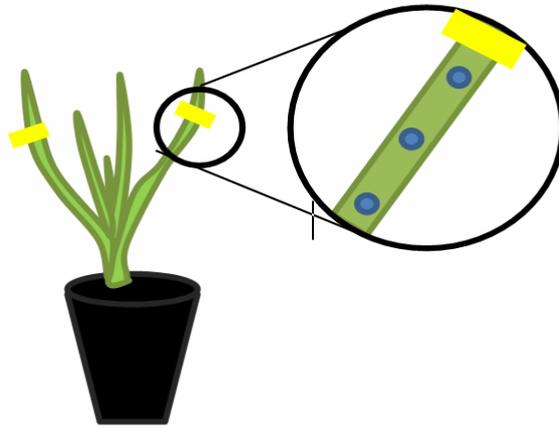


Figura 3. Esquema de las inoculaciones con gotas en plantas en macetas.

Las plantas fueron evaluadas el día 6 de noviembre (12 ddi). Se midió el avance de la mancha en torno a cada una de las gotas y el estado de la hoja inoculada en general.

3.1.3.3. Análisis de los resultados

El análisis de los resultados que se recogieron en este ensayo se llevó adelante con un carácter cualitativo, ya que el propósito de este ensayo fue evaluar la respuesta de las plantas sometidas a inoculaciones puntuales en cuanto al desarrollo de síntomas y el tipo de síntomas desarrollados

Para hacer el análisis cualitativo se estudiaron los datos recogidos en la evaluación de las plantas inoculadas intentando encontrar patrones o coincidencias entre y dentro de cada una de las accesiones. Las coincidencias entre las accesiones permitieron hacer generalizaciones en cuanto a lo transversal entre ellas. Las diferencias entre las accesiones y coincidencias dentro de cada una de las accesiones permitieron hacer generalizaciones en tanto lo transversal dentro de cada una de las accesiones estudiadas.

Las generalizaciones no se estudiaron solamente en cuanto a las coincidencias y diferencias entre las accesiones estudiadas sino que también

en cuanto a la respuesta de cada una de las hojas inoculadas. Cuando se realizó en registro de los datos se separó la información por accesión y por edad de la hoja inoculada. Para todas las accesiones se inocularon dos hojas por planta. Al momento de la evaluación se separó la información de cada una de las accesiones en cuanto a la hoja más recientemente formada y la hoja que se formó primero en el tiempo respecto a la otra. Esta diferenciación al momento del registro permitió obtener generalizaciones en cuanto a la reacción que muestran las accesiones frente a *P. destructor* en tejido foliar con diferente edad.

Los criterios que se tomaron para realizar las generalizaciones mencionadas tanto desde el punto de vista de las accesiones como de la edad de la hoja inoculada son dos y se mencionan a continuación:

- desarrollo o no de sintomatología asociada a la gota de solución de esporangios en cada una de las inoculaciones puntuales.
- tipo de síntomas desarrollados a partir de la inoculación puntual.

En resumen, en este ensayo se obtienen rasgos comunes y diferentes frente la reacción a la inoculación puntual entre dos cultivares contrastantes en sus características y una especie emparentada en cuanto a la reacción frente a *P. destructor*, y la reacción de cada uno de ellos en el tejido foliar con diferente estado de desarrollo.

Cuadro 3. Accesiones de cebolla y *Allium fistulosum* que se incluyeron en el ensayo de respuesta a *Peronospora destructor* bajo dos fotoperiodos.

Variedad	Ciclo ^a	Respuesta a Pd ^a	Origen de la accesión
Pantanos del Sauce CRS	DI	Susceptible	Cultivar nacional
INIA Casera	DC	Susceptible	Cultivar nacional
Regia	DI	Moderadamente resistente	Cultivar extranjero
Naqué	DC	Moderadamente susceptible	Cultivar nacional
Valenciana INIA Las Brujas	DL	Moderadamente resistente	Cultivar nacional
Canarita CRS	DI	Susceptible	Cultivar nacional
Naqué x Casera	DC	Susceptible	Cruzamiento
INIA Blanca LB01	DC	Susceptible	Cultivar nacional
INIA Fagro Dulce	DC	Susceptible	Cultivar nacional
Texas Early Grano 502	DC	Susceptible	Cultivar extranjero
Valenciana Martínez	DL	Moderadamente resistente	Población local
UR8903	DI	Moderadamente susceptible	Población local
UR8819	DL	Moderadamente susceptible	Población local
Caballero	DL	Moderadamente resistente	Población local
<i>Allium fistulosum</i> ^c	s/d	Especie hospedera ^{a, b}	Especie emparentada
UR9102/ 8902	DI	Moderadamente susceptible	Población local

^a De acuerdo a evaluaciones realizadas en el Centro Regional Sur (Galván 2011, Colnago et al. 2012).

^b Kofoet y Zinkernagel (1989).

^c Accesión UR05010, cultivada, colectada en Uruguay.

s/d: sin dato, no bulbifica.

3.2. EVALUACIÓN DE GERMOPLASMA EN DOS FOTOPERÍODOS

3.2.1. Material vegetal

Para la instalación del ensayo de evaluación de la respuesta del germoplasma local y cultivares en dos fotoperiodos, se definió la utilización de 14 accesiones de cebolla y una accesión de *Allium fistulosum*. En el Cuadro 3 se mencionan las accesiones utilizadas y características de interés para el desarrollo del trabajo, como lo son el ciclo (el cual hace referencia al fotoperiodo necesario para el inicio de la bulbificación), y la respuesta a *Peronospora destructor* en cuanto a la sensibilidad, y el origen de cada uno de los materiales.

3.2.2. Descripción del ensayo

El 13 de abril de 2012 se instaló el almácigo a nivel de campo, en el cual se sembraron las variedades anteriormente mencionadas. El objetivo de esta etapa del ensayo fue el de obtener plantines con tres a cuatro hojas y un largo de diez centímetros aproximadamente. El almácigo se sembró en canteros previamente solarizados, en filas transversales al cantero, con una distancia entre filas de diez centímetros.

Se realizó el transplante de los plantines a macetas 47 días después de la siembra. Se realizaron 16 macetas de cada una de las variedades, con una planta por maceta. Se utilizaron plantines con el mismo tamaño y macetas con el mismo volumen (12 cm de diámetro, 1,36 litros), y con una mezcla de tierra y compost.

Estas plantas permanecieron creciendo en macetas en condiciones ambientales durante 78 días. Luego se colocaron las macetas completamente al azar en un solarío con temperatura (20 °C) y fotoperiodo controlados. El solarío se dividió en las mesadas correspondientes al fotoperíodo largo (14 horas de luz) y fotoperíodo corto (8 horas de luz). En cada mesada se colocó la misma cantidad de plantas de cada una de las accesiones en cada fotoperíodo. Luego de recibir el tratamiento de fotoperiodo durante 40 días, se inoculó una maceta por variedad y por fotoperíodo, en tres ocasiones diferentes (repeticiones en el tiempo).

Para realizar la inoculación se realizó una colecta de inóculo a nivel de campo. Se tomaron hojas con esporulación de *P. destructor* de cultivos del CRS. La colecta de inóculo se realizó desde las 8 a las 9 horas en todas las repeticiones.

Una vez tomadas las hojas con esporulación del campo se prosiguió a realizar un raspaje de la zona con esporulación con un isopo de algodón, que posteriormente se colocó en un vaso de bohemia con agua corriente para que liberaran los zoosporangios mediante agitación. De esta manera se logró una suspensión de agua con zoosporangios, con una concentración estimada en 10^4 zoosporangios por ml (Kofoet y Zinkernagel, 1989), la cual fue utilizada posteriormente para realizar la inoculación. A esta suspensión de esporas se le agregó un adherente, Tween, tres gotas cada 100 ml. En cada oportunidad en la que se inoculó se controló que la solución tuviera la misma concentración de zoosporas. Esta observación se realizó al microscopio.

Para llevar adelante las inoculaciones que se incluyen en el ensayo se tomaron dos plantas de cada variedad, cada una correspondiente a cada uno de los fotoperiodos evaluados. Se realizaron tres inoculaciones, la segunda a los 3 días de la primera y la tercera a los 8 días. A cada planta se le marcaron dos hojas completamente expandidas, una más vieja y otra más nueva. A estas dos hojas se las inoculó utilizando la técnica del isopo, y posteriormente se las colocó en cámara húmeda.

Las plantas inoculadas se las colocó en una cámara de condiciones controladas (incubadora) con una temperatura diurna de 14°C, temperatura nocturna de 12°C y 12 horas de luz. Las plantas de las tres repeticiones fueron evaluadas de 11 a 19 días después de la inoculación, según la repetición. En cada una de las hojas inoculadas se registró la sintomatología desarrollada, las características de la misma y la severidad de la enfermedad. Se evaluó el porcentaje de tejido afectado, y en el caso que ameritara se describió la sintomatología (en caso de que el síntoma desarrollado fuera particular). Las plantas que tuvieron mejor comportamiento en cuanto a resistencia al desarrollo de la enfermedad, se conservaron y se les realizó otra evaluación, desde 16 a 24 días después de la inoculación.

3.2.3. Análisis estadístico

Se definió la unidad experimental como el conjunto de las dos hojas inoculadas de cada una de las plantas en macetas que fueron sometidas a los tratamientos.

Los tratamientos a los que se sometieron cada una de las unidades experimentales fueron por un lado el componente genético, dado por cada una de las accesiones involucradas en el ensayo y por otra parte los dos diferentes estados de desarrollo logrados por la exposición de todas las accesiones a diferentes fotoperíodos. En definitiva se evaluaron quince accesiones en dos estados de desarrollo cada una, por lo que son 30 tratamientos diferentes.

Se realizaron tres repeticiones, tres inoculaciones. Dados los 30 tratamientos y las tres repeticiones quedaron definidas para este ensayo 90 unidades experimentales.

Se evaluó para cada una de las unidades experimentales la severidad (porcentaje del tejido vegetal inoculado que presenta síntomas). Posteriormente se construyó una escala ordinal discreta que representa un rango de valores porcentuales. Teniendo en cuenta el rango de variación obtenida en los porcentajes estimados, se generaron 6 clases o categorías a las cuales se les asignó un rango de porcentaje de severidad cada vez más amplio. Es decir, que la primera categoría presenta una diferencia menor entre el máximo y el mínimo que la siguiente, y así sucesivamente (Cuadro 4). La variable de respuesta entonces queda definida como el rango porcentual de tejido afectado.

Para el análisis de los datos se ajustó un modelo lineal generalizado, con una distribución χ^2 de la variable. Dado que la distribución de los datos no es Normal y además la variable de respuesta con la que se trabajó no es continua, no se cumplen los supuestos necesarios para ajustar un modelo de distribución normal que se analice a través de un ANAVA.

Las hipótesis estadísticas que se plantearon fueron:

- hipótesis nula (H_0): las medias de todos los tratamientos son iguales ($\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$)
- hipótesis alterna (H_a): existe al menos una media diferente.

El criterio de decisión tomado es el siguiente: si chi-cuadrado es mayor a 23,685 (valor crítico para 14 grados de libertad del error) entonces se rechaza la hipótesis nula con $\alpha = 0,05$ probabilidad de cometer error de tipo I (error de tipo I: rechazo la hipótesis nula siendo esta cierta); si chi-cuadrado es menor al valor crítico, no rechazo la H_0 con $\beta = 0,05$ probabilidad de cometer error de tipo II (error de tipo II: no rechazo la H_0 , siendo esta falsa).

Cuadro 4. Asignación porcentual a cada una de las clases o categorías utilizadas en la evaluación.

Clase/ Categoría	1	2	3	4	5	6
Rango porcentual de severidad	0-5	5-15	15-30	30-50	50-73	73-100%

Desde una perspectiva agronómica, lo que plantea el juego de hipótesis es que en el primer caso si la H_0 es cierta entonces: ni las accesiones como componente genético, ni el estado de desarrollo dado por los fotoperíodos, ni la interacción de estos dos factores influyen o generan diferencias en el comportamiento frente a *P. destructor*. En el caso de que se rechace la hipótesis nula entonces entendemos que existe un efecto dado por el componente genético, por el estado de desarrollo o por la interacción de estos dos factores.

3.3. ENSAYO DE SENSIBILIDAD A CAMPO

3.3.1. Material vegetal

Para el ensayo a campo de evaluación de la respuesta del germoplasma local y cultivares, se utilizaron 15 accesiones de cebolla que se listan en el Cuadro 5. Además se mencionan el ciclo, los antecedentes en cuanto a la respuesta a *Peronospora destructor*, y el origen de cada uno de los materiales.

Cuadro 5. Accesiones de cebolla y *Allium fistulosum* que se incluyeron en el ensayo de respuesta a *Peronospora destructor* bajo dos fotoperiodos.

Variedad	Ciclo ^a	Respuesta a Pd ^a	Origen de la accession
Pantanoso del Sauce CRS	DI	Susceptible	Cultivar nacional
INIA Casera	DC	Susceptible	Cultivar nacional
Regia	DI	Moderadamente resistente	Cultivar extranjero
Naqué	DC	Moderadamente susceptible	Cultivar nacional
Valenciana INIA Las Brujas	DL	Moderadamente resistente	Cultivar nacional
Canarita CRS	DI	Susceptible	Cultivar nacional
Naqué x INIA Casera	DC	Susceptible	Cruzamiento
INIA Blanca LB01	DC	Susceptible	Cultivar nacional
INIA Fagro Dulce	DC	Susceptible	Cultivar nacional
Texas Early Grano 502	DC	Susceptible	Cultivar extranjero
Valenciana Martínez	DL	Moderadamente resistente	Población local
UR8903	DI	Moderadamente susceptible	Población local
UR8819	DL	Moderadamente susceptible	Población local
Caballero	DL	Moderadamente resistente	Población local
UR9102/ 8902	DI	Moderadamente susceptible	Población local

^a De acuerdo a las evaluaciones realizadas en el Centro Regional Sur (Galván 2011, Colnago et al. 2012).

^b Kofoet y Zinkernagel (1989).

^c Accesoión UR05010, cultivada, colectada en Uruguay.

s/d: sin dato, no bulbifica.

3.3.2. Descripción del ensayo

El objetivo de este ensayo fue evaluar la respuesta de diferentes variedades de cebolla a *Peronospora destructor* en condiciones de campo, lo que permite evaluar la respuesta en las condiciones que experimentan todos los cultivos de los productores del sur del país.

Para la instalación se utilizó la técnica que se utiliza a nivel predial: almácigo- transplante. Se sembró almácigo para todas las variedades incluidas en el ensayo con el fin de obtener plantines más o menos homogéneos para el transplante. Los plantines se recogieron el 26 de junio, y se trasplantaron un día después.

En el ensayo a campo no se realizaron inoculaciones artificiales, se esperó que la enfermedad ocurra naturalmente. Para incrementar la posibilidad de que se de enfermedad, el cultivo se instaló en un cuadro en el que en años anteriores ya se había instalado un ensayo con objetivos similares.

En este cuadro se marcaron las parcelas de dos metros de largo sobre el suelo encanterado. En cada una de las parcelas se plantaron 60 plantines, en tres filas de 20 cada una. De cada una de las accesiones se instalaron cuatro parcelas, en un diseño completamente aleatorizado.

Se realizó una evaluación de la superficie foliar afectada de todas las plantas de la fila del medio de cada una de las parcelas y se les asignó un nivel de enfermedad correspondiente a una escala ordinal de evaluación (Cuadro 6).

Este ensayo se cosechó progresivamente. A medida que las accesiones alcanzaron al menos el 50% de los individuos con el follaje volcado, se fueron cosechando. Se realizó una evaluación poscosecha en la que se midió el rendimiento total (en peso y número de bulbos cosechados) y el rendimiento comercial (peso de los bulbos comerciales y número de bulbos comerciales).

3.3.3. Análisis estadístico

En el ensayo a campo se midieron dos variables: la primera es la severidad de las accesiones de cebolla a *P. destructor*, la segunda tiene que ver con el rendimiento de cada variedad medido como peso promedio comercial del bulbo. Por este motivo se realiza un análisis para cada una de las variables.

Para la severidad se evaluaron las 20 plantas centrales de cada una de las parcelas, para todas las variedades en todas las repeticiones. La unidad experimental es la parcela, el conjunto de esas 20 plantas evaluadas. El tratamiento aplicado a cada una de las unidades experimentales es cada una de las accesiones sometidas a evaluación según su resistencia a *P. destructor* (15 tratamientos). Los tratamientos fueron asignados a cada parcela sin restricciones en la aleatorización (completamente al azar). De cada una de las accesiones se realizaron cuatro repeticiones, y quedaron definidas 60 unidades experimentales.

Cuadro 6. Asignación porcentual a cada una de las clases o categorías utilizadas en la evaluación.

Clase/ Categoría	0	1	2	3
Rango porcentual de severidad	0%	1-10%	10-50%	50-100%

En base a las evaluaciones de severidad (porcentaje del tejido vegetal inoculado que presenta síntomas), se construyó una escala ordinal discreta que representa un rango de valores porcentuales. Se generaron cuatro clases o categorías a las cuales se les asignó un rango de porcentaje de severidad cada vez más amplio. Es decir, que cada categoría presenta una diferencia menor entre el máximo y el mínimo que la siguiente (Cuadro 6).

Para el análisis de los datos se ajustó un modelo lineal generalizado, con una distribución χ^2 de la variable. Dado que la distribución de los datos no es Normal y además la variable de respuesta con la que se trabajó no es continua, no se cumplen los supuestos necesarios para ajustar un modelo de distribución normal que se analice a través de un ANAVA.

Las hipótesis estadísticas que se plantearon fueron:

- hipótesis nula (H_0): las medias de todos los tratamientos son iguales ($\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$)
- hipótesis alterna (H_a): existe al menos una diferente.

El criterio de decisión tomado es el siguiente: si chi-cuadrado es menor a 0.05 entonces se rechaza la hipótesis nula con α probabilidad de cometer error de tipo I (error de tipo I: rechazo la hipótesis nula siendo esta cierta); si chi-cuadrado es mayor a 0.05 no rechazo la H_0 con β probabilidad de cometer error de tipo II (error de tipo II: no rechazo la H_0 , siendo esta falsa).

Desde una perspectiva agronómica lo que plantea el juego de hipótesis es que en el primer caso si la H_0 es cierta entonces: accesiones como componente genético influyen o generan diferencias en el comportamiento frente a *P. destructor*. En el caso de que se rechace la hipótesis nula entonces entendemos que existe un efecto de las accesiones sobre la respuesta de cada una frente a este patógeno.

En cuanto al peso y número de bulbos comerciales que es la otra variable que se evaluó en este ensayo, se cosecharon todas las plantas de todas las parcelas, se descolaron cada una de las cebollas y se evaluaron según estas dos variables mencionadas al inicio.

Para estas variables la unidad experimental es el conjunto de bulbos comerciales de cada una de las parcelas. Dados los 15 tratamientos y las cuatro repeticiones quedan definidas 60 unidades experimentales.

Se construyó una variable de respuesta o variable dependiente con ambas mediciones (peso comercial y número de bulbos comerciales). Esta variable es el peso promedio de los bulbos comerciales, es por esto que la unidad experimental se definió como el conjunto de los bulbos comerciales de cada parcela.

Como la variable tiene distribución normal y el diseño fue sin restricciones en la aleatorización se analizó con un diseño completamente al azar. El modelo queda construido de la siguiente manera:

$$Y_{ij} = \mu + A_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

- Y_{ij} : variable de respuesta, peso promedio de los bulbos comerciales.
- μ : media poblacional.
- A_i : efecto de la i -ésima accesión.
- ε_{ij} : error experimental.

Las hipótesis estadísticas son:

- hipótesis nula (H_0): la media de los tratamientos son iguales.
- hipótesis alterna (H_a): existe al menos una diferente.

Desde una perspectiva agronómica la hipótesis nula representa la situación en la que el peso promedio de los bulbos comerciales en el promedio de los tratamientos no se encontró suficiente evidencia para diferenciar las medias. La hipótesis alterna plantea la situación en la que las media de las accesiones en cuanto al peso promedio de los bulbos comerciales.

El criterio de decisión que se utilizó para la prueba estadística fue el siguiente:

- si el p-valor es menor a 0.05 entonces se rechaza la H_0 con α probabilidad de cometer error de tipo I. Esto quiere decir que el diseño y el análisis permitió separar accesiones con medias diferentes, es decir que hay suficiente evidencia estadística para afirmar que la H_0 es falsa (existe al menos una accesión que tiene un comportamiento diferente en cuanto al peso promedio del bulbo comercial).
- si el p-valor es mayor a 0.05 entonces no se ha conseguido suficiente evidencia para rechazar la H_0 . Esto quiere decir que ni el diseño ni el análisis estadístico lograron detectar diferencias suficientemente grandes para decir que el peso medio del bulbo de al menos una de las accesiones se diferencia del resto (todas las medias son iguales, es decir que las accesiones (genética) no generan diferencias notables estadísticamente en el peso promedio del bulbo).

Luego de realizar ambos análisis estadísticos se procedió a calcular el coeficiente de correlación entre la severidad en el ensayo de campo y el peso promedio del bulbo comercial con el fin de comprobar que estas dos variables están relacionadas. Al ser el mismo ensayo en el que se midieron ambas variables es posible calcular el coeficiente de correlación entre las dos variables.

La hipótesis previa al cálculo del coeficiente de correlación (R) fue que las accesiones que presentan mayor nivel de severidad tienen menor peso promedio del bulbo. Por otra parte las accesiones que iban a presentar los menores niveles de severidad se corresponderían con pesos de bulbo mayores.

Por este motivo es que se espera que el coeficiente de correlación sea negativo y alto.

Además se realizó una gráfica que relaciona en el eje de las abscisas (x, variable independiente) el nivel de severidad y en el eje de las ordenadas el peso medio de bulbos comerciales (y, variable dependiente). Se relacionaron de esta manera ya que la hipótesis es que la severidad afecta el peso promedio de los bulbos comerciales.

3.4. EVALUACIÓN DE RELACIONES HISTOLÓGICAS AL MICROSCOPIO

3.4.1. Primera etapa de evaluación

3.4.1.1. Material vegetal

En una primera etapa de experimentación se utilizaron cuatro accesiones para la evaluación de su comportamiento frente a *P. destructor*. Las accesiones seleccionadas presentan, según la bibliografía, diferente comportamiento frente al patógeno en ensayos a campo y en solarío, por lo que se justifica estudiar las diferencias a nivel histológico (Cuadro 7).

Cuadro 7. Accesiones de cebolla y *Allium fistulosum* que se incluyeron en el ensayo de respuesta a *Peronospora destructor* a nivel histológico.

Variedad	Ciclo ^a	Respuesta a Pd ^a	Origen de la accesión
Pantanoso del Sauce CRS	DI	Susceptible	Cultivar nacional
Regia	DI	Moderadamente resistente	Cultivar extranjero
Valenciana Martínez	DL	Moderadamente resistente	Población local
<i>Allium fistulosum</i>	s/d	Especie hospedera ^{a, b}	Especie emparentada ^c

^a De acuerdo a evaluaciones realizadas en el Centro Regional Sur (Galván 2011, Colnago et al. 2012).

^b Kofoet y Zinkernagel (1989).

^c Accesión UR05010, cultivada, colectada en Uruguay.

s/d: sin dato, no bulbifica.

3.4.1.2. Descripción del ensayo

Se tomaron hojas de cada una de las accesiones. Se cortaron en trozos y se las colocó sobre un papel absorbente humedecido al igual que en el ensayo de trozos de hojas (descrito en 3.1.2, pg. 20). El ensayo incluyó cuatro repeticiones (tapers) por accesión.

A cada una de las muestras se las colocó en condiciones controladas, al igual que en el ensayo de trozos de hoja. Luego de 4 días se quitaron de la cámara, y se cortaron trozos de hojas en torno a las gotas de inoculación con el tamaño adecuado para observación al microscopio (aprox. 10 x 15 mm).

Cada uno de los trozos cortados se manipuló con cuidado para no remover estructuras del patógeno en superficie, y se aclaró con alcohol etílico 95% durante 24 horas para extraer la clorofila. Posteriormente, se lavaron con cuidado por inmersión en agua, y se conservaron mediante inmersión en glicerol a 4°C. La observación al microscopio se realizó en los días posteriores. Para ello, los preparados se tiñeron con anilina azul durante 5 minutos. Luego se enjuagaron en agua de la canilla y se colocaron sobre un portaobjeto con una gota de agua. Luego se coloca un cubreobjeto y se observó en el microscopio. Luego cada uno de los preparados se conservó en glicerol.

3.4.1.3. Análisis de los resultados

En esta etapa solo se pudo realizar una evaluación de los preparados con carácter descriptivo. Interesa saber cómo se da el proceso de infección y como es la interacción planta- patógeno para cada una de las accesiones.

3.4.2. Segunda etapa de evaluación

3.4.2.1. Material vegetal

Se realizaron dos ensayos que analizaron las relaciones planta-patógeno a nivel histológico. Para la realización del primer ensayo se tomaron muestras de hojas con infecciones naturales esporuladas del cultivar Pantanoso del Sauce, el cultivar Regia y la descendencia del cruzamiento entre estos dos cultivares (Regia x Pantanoso F1) que se realizó a fin de explotar la resistencia de Regia en el desarrollo de un nuevo cultivar nacional.

Se realizó un segundo ensayo con inoculación de trozos de hojas de seis accesiones con diferente reacción frente a la enfermedad en ensayos de campo y solarío, en las que se evaluó el proceso de infección a nivel histológico (Cuadro 8).

3.4.2.2. Descripción del ensayo

Bajo la hipótesis de que pudieran observarse a nivel histológico diferencias en el nivel de esporulación, se tomaron hojas del campo con síntomas de la enfermedad que estuviesen esporulando de cada una de las accesiones a evaluar. Se cortaron en trozos del tamaño adecuado para la observación al microscopio, y se colocaron en placas de Petri etiquetadas cada una de las accesiones por separado en alcohol etílico 95% para aclararlos durante 24 horas.

Cuadro 8. Accesiones de cebolla y *Allium fistulosum* que se incluyeron en el ensayo de respuesta a *Peronospora destructor* a nivel histológico en la segunda etapa de análisis.

Variedad	Ciclo ^a	Respuesta a Pd ^a	Origen de la accesión
Pantanoso del Sauce CRS	DI	Susceptible	Cultivar nacional
Regia	DI	Moderadamente resistente	Cultivar extranjero
Regia x Pantanoso F1	DI		Cruzamiento
Naqué	DC	Moderadamente resistente	Cultivar nacional
INIA Valenciana	DL	Moderadamente resistente	Cultivar nacional
<i>Allium fistulosum</i>	s/d	Moderadamente resistente ^{a,b}	Especie emparentada ^c

^a De acuerdo a evaluaciones realizadas en el Centro Regional Sur (Galván 2011, Colnago et al. 2012).

^b Kofoet y Zinkernagel (1989).

^c Accesión UR05010, cultivada, colectada en Uruguay.

s/d: sin dato, no bulbifica.

Luego de que los trozos de hojas perdieron la clorofila, se procedió a teñirlos con varias técnicas, las cuales probó Kortekamp (2005) para el patosistema *Plasmopara viticola*- vid.

Se evaluaron varias tinciones, algunas simples y otras en combinación. Las tinciones simples evaluadas fueron:

- 0,01% Acridina naranja (Sigma-Aldrich) en agua destilada
- 0,1% Eosin Y (Sigma-Aldrich) en agua destilada
- 0,05% Toludine azul O en agua de la canilla
- 0.01 % Stains All (Sigma-Aldrich)

Las tinciones en combinación que se utilizaran para la evaluación de muestras fueron:

- 0,01% Acridina naranja en combinación con 0.01% Calcofluor (Sigma-Aldrich)
- 0,05% Toludine azul O en combinación con 0,01% Calcofluor

La exposición de los trozos a cada una de las tinciones fue durante cinco minutos (Kortekamp, 2005). Luego se colocaron en portaobjetos etiquetados, identificando el nombre de la accesión y la tinción. Encima de los trozos de hojas se colocan dos gotas de agua y un cubreobjeto. Luego de las observaciones, para conservar los preparados se los colocó en glicerina.

3.4.2.3. Análisis de los resultados

En este ensayo se han analizado los resultados de los preparados desde dos aspectos: cualitativo y cuantitativo. En el análisis cualitativo se describieron las particularidades observadas en las diferentes accesiones, en muestras tomadas del campo, para todas las tinciones aplicadas. Interesó describir tanto las estructuras del patógeno, como las de la planta y la interacción entre ellas.

Para cada una de las tinciones utilizadas se observó qué estructuras (tanto del patógeno como de la planta) fueron teñidas de diferente coloración o con diferente intensidad de color; qué estructuras se logran observar con cada una de las tinciones.

Para cada una de las accesiones (hospederas) se analizó la estructura estomática. Como fue planteado por Gindro et al. (2003) para el patosistema

Plasmopara viticola- Vid, las accesiones resistentes difieren de las susceptibles en la estructura estomática (mecanismo de defensa).

Para el patógeno se pretendió observar con cada una de las tinciones las estructuras infecciosas (hifas, zoosporangios, zoosporangióforos, haustorios y apresorios). También se registró la presencia de estructuras en la interacción huésped patógeno para cada una de las accesiones estudiadas: estrategias de la planta frente al patógeno (hipersensitividad, engrosamiento de paredes celulares) y estrategias de infección del patógeno (presencia de haustorios, avance de la infección en el tejido).

En el análisis cuantitativo se procedió a la observación de 100 estomas de cuatro preparados (repeticiones) de cada accesión teñidos con toluidine azul O. Las cuatro repeticiones se prepararon a partir de cuatro muestras de hojas independientes para cada una de las accesiones.

Se realizaron cuatro categorías para clasificar los estomas observados teniendo en cuenta la presencia o ausencia de enfermedad y las características de la infección:

- estomas sanos (sin mancha y sin esporulación)
- estomas con mancha y con esporulación
- estomas con esporulación y sin manchas
- estomas con mancha y sin esporulación.

Para analizar los datos, la variable construida fue la proporción de estomas dentro de cada categoría (es decir, número de estomas sanos en una muestra de 100 estomas, x sanos/ 100).

Las preguntas de investigación fueron las siguientes:

- (a) si existen diferencias significativas entre las accesiones en cuanto a la proporción de los estomas sanos;
- (b) si existen diferencias significativas entre las accesiones en cuanto a la proporción de estomas con diferentes categorías de infección;
- (c) si existen diferencias significativas en cuanto a la distribución de las categorías de estomas entre cada una de las accesiones; y

(d) si el cruzamiento Regia x Pantanoso (F1) tiene un comportamiento intermedio en comparación con los padres, en cuanto a las características mencionadas en las categorías estomáticas.

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el análisis no paramétrico Kruskal-Wallis con el software Genstat 16 (VSN International Ltd.). Este análisis permite concluir si diferentes muestras pertenecen a la misma población para evaluaciones en escalas ordinales. Se analizó si existían diferencias significativas para cada una de las categorías de estomas entre las tres muestras de las accesiones.

El análisis se basa en asignar a cada observación un valor de acuerdo al ranking global, y estima la probabilidad de que el ranking total de cada tratamiento (accesión) sea diferente de otras. Esta es una prueba a cola derecha, por lo que si el estadístico H con distribución χ^2 es mayor a un H crítico con una probabilidad asociada de 0.05, entonces las distribuciones de los datos son significativamente diferentes. Si H es menor que el H crítico entonces no tengo suficiente evidencia para afirmar que los datos son significativamente diferentes.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. AJUSTE DE LA TÉCNICA DE INOCULACIÓN

4.1.1. Ajuste de la metodología de aplicación del inoculo sobre la superficie de la hoja

Todas las técnicas de inoculación que fueron probadas lograron generar síntomas de infección en las accesiones para las que fueron aplicadas. Estas técnicas si bien lograron infección tuvieron diferentes resultados. La inoculación en seco fue la que logró los mejores resultados. Con esta metodología se lograron manchas más similares a las manchas que ocurren en el campo. Incluso con esta metodología se logró que aparezca esporulación sobre las hojas. Este resultado es similar al obtenido por Colnago (2010), y se explica porque el transporte por el viento (en seco) de los zoosporangios es la forma natural de diseminación de la enfermedad (Hildebrand y Sutton, 1984).

Sin embargo, esta metodología de inoculación no permitió controlar la concentración de zoosporangios que se aplica a cada uno de los eventos de inoculación. Por otra parte los métodos en los que se aplica una solución de zoosporangios se logra controlar de mejor manera la concertación de zoosporangios por mililitro en la solución y además la cantidad de la solución inoculante que se aplica en cada uno de los eventos de inoculación.

La decisión de utilizar uno u otro método de inoculación es un balance entre encontrar precisión en cada uno de los eventos de inoculación, y entonces poder hacer comparaciones entre los resultados de inoculación, o lograr buenas manchas, y más nivel de infección en cada una de ellas. La decisión entonces de utilizar uno u otro método de inoculación va a depender de los objetivos del ensayo que se lleve adelante.

4.1.2. Ensayo de inoculación en trozos de hojas

La evaluación de los trozos de hojas inoculadas se realizó a los tres días post inoculación con el fin de que las características de las hojas extraídas no se diferenciaron de las que presentan en la planta. Esta es una de las limitantes que presenta este tipo de ensayo, que se acentúa con enfermedades de

desarrollo lento como lo es el mildew de la cebolla. Nos enfrentamos a una enfermedad de desarrollo lento y a la capacidad de la hoja de conservarse es limitada. Hay que encontrar el momento de evaluación para el ensayo haciendo un balance de estos dos elementos: la capacidad de la enfermedad de desarrollarse en ese tiempo para poder evaluarla y la capacidad de la hoja de conservarse en buenas condiciones para que los resultados del ensayo sean válidos.

Al momento de la evaluación se observó que las accesiones presentaban diferentes niveles de conservación del estado inicial de las hojas. *Allium galanthum* fue la accesión que presentó el 100% de las hojas verdes, con el nivel de turgencia más elevado de todos los trozos del ensayo y por tanto el mejor estado de conservación. A esta accesión la siguió la variedad criolla 9719, que en el caso de la inoculación en seco presentó un 66% de las hojas verdes y turgentes y el 34% restantes cloróticas y con un menor estado de turgencia que al inicio del experimento. Para la misma accesión en la inoculación con gotas de la suspensión con esporas, el 55% de los trozos de hojas se conservó verde y con un buen nivel de turgencia, mientras que el 45% restante presentó coloración clorótica y pérdida de turgencia. La accesión Takmark presentó el 77% de las hojas inoculadas con clorosis y con una pérdida acentuada de la turgencia. Por último, la variedad criolla Caballero presentó una clorosis mayor en todos los trozos de hojas y una avanzada pérdida de turgencia.

En cuanto al desarrollo de los síntomas, en *A. galanthum* un 86% de las gotas de inoculación no presentaron síntomas asociados a la enfermedad. El resto de las gotas desarrollaron manchas violáceas que oscilaron entre 1 – 1,5 cm de diámetro asociadas a la inoculación. En una de las hojas se observó una coloración en general más clorótica que en el resto de las hojas con zonas necróticas asociadas a las gotas de inoculación.

La accesión 9719 cuando se inoculó con gotas de suspensión de esporangios, en ninguno de los casos se desarrollaron síntomas asociados a éstas. En la inoculación en seco se desarrolló en múltiples zonas de inoculación un crecimiento de esporulación rodeada de un halo clorótico asociado. La esporulación se expande de forma concéntrica a la esporulación colocada en seco.

En el caso de la accesión Takmark sólo en una de las gotas de inoculación se desarrolló una mancha de coloración violácea, de similares características que las que se observaron en *A. galanthum*, aunque de dimensiones menores (0,5 cm de diámetro). En las demás gotas no se observaron síntomas.

Por último en la accesión Caballero, ninguno de los casos mostró síntomas asociados a la inoculación. Se desarrolló un micelio blanquecino sobre las zonas de las hojas que estaban en un estado de descomposición creciente.

La instalación de la enfermedad en los trozos de hojas no se logró en todas las ocasiones. El estado de las hojas al momento de la evaluación no fue en todas las accesiones el óptimo o el deseado, aunque de todas maneras, independientemente del estado de las mismas, en todos los casos se encontraron puntos de inoculación que no habían desarrollado infección. Esto no necesariamente quiere decir que la hoja haya desarrollado un mecanismo de resistencia frente al patógeno. En los casos donde se encontraron síntomas, estos tuvieron una expresión similar entre ellos aunque no se corresponden con los síntomas típicos encontrados a nivel de campo.

Como fue planteado por Niks y Lindhout (2004), hay que considerar que en estos ensayos de trozos de hojas, los resultados no siempre son los mismos que en el ensayo de campo. Además hay que encontrar el balance entre el tiempo de desarrollo de los síntomas (que es lo visible) de la enfermedad y lo que podemos medir para realizar comparaciones, y la conservación de las hojas.

En el caso en el que el inóculo se colocó en seco, la enfermedad se desarrolló con más facilidad que en el caso de las gotas de suspensión de esporas. Este resultado se corresponde con el hecho de que a nivel de campo las esporas son dispersadas por el viento y llegan a la hoja en seco, más allá de que posteriormente requieran humedad y agua libre sobre la superficie foliar para el inicio de la infección (Hildebrand y Sutton, 1984). La humedad ambiente en este caso está dada por la hoja de papel humedecido que se colocó debajo de las hojas.

Frente a este tipo de ensayo hay accesiones que se conservaron mejor y por tanto serían más propicias para evaluar resistencia ya que conservan mejor su estado inicial. Por ejemplo *A. galanthum* se conservó muy bien, y en algunos

casos en otras accesiones se logró observar síntomas asociados a la inoculación. Sin embargo, accesiones como Caballero a los tres días de inoculadas se mostraron completamente en un proceso de descomposición avanzado y colonizado por otros patógenos o saprófitos en todas las repeticiones. En este caso no se puede saber si la enfermedad en estudio se instaló antes de que las hojas llegaran al tercer día en el estado anteriormente descrito.

Para realizar este tipo de ensayo, aun cuando el objetivo sea el estudio de la relación planta-patógeno, se requiere anteriormente conocer la capacidad de las hojas de conservarse de cada una de las accesiones a evaluar, para planificar la evaluación del ensayo. Esta capacidad de conservación depende de la accesión y de la edad o estado de desarrollo de las plantas. Además hay que conocer cuál es el mínimo tiempo de desarrollo de los síntomas de la enfermedad. Puede que en las diferentes accesiones la enfermedad se desarrolle con tiempos diferentes, y en este caso el atraso en el desarrollo de la misma podría deberse a mecanismos de resistencia de la planta que enlentecen este proceso.

4.1.3. Ensayo de inoculación puntual en planta

En este ensayo se compararon tres accesiones, todas con una estructura genética diferente. Naqué es un cultivar comercial nacional, Valenciana Martínez es una población local y *Allium fistulosum* que es una especie emparentada a la cebolla. Las tres accesiones comparten, que previo al ensayo se espera que se comporten como accesiones moderadamente resistentes.

Naqué presentó para todas las repeticiones mayor nivel de enfermedad en la hoja más vieja de las dos hojas por planta que se inocularon. Esta es una reacción que se espera encontrar cuando se trabaja con *P. destructor*, ya que los órganos van adquiriendo mayor susceptibilidad a medida que tienen más edad. Para el caso de la hoja vieja (considerando el promedio de todas las repeticiones) el 75% de las gotas de inoculación presentaron síntomas asociados a la inoculación. De ese 75% que desarrolló síntomas todas mostraron un halo clorótico en torno a la inoculación de 3 mm de ancho promedio y el 50% del total mostró una necrosis que avanza con clorosis desde la punta de la hoja hacia la base. Sólo el 25% de las gotas de inóculo colocadas sobre las hojas no desarrollaron síntomas. Del total de hojas nuevas inoculadas

un tercio de las gotas desarrollaron un halo clorótico en torno a la gota, mientras que dos tercios de las gotas no presentaron ninguna sintomatología asociada.

Valenciana Martínez siguió el mismo patrón de comportamiento en cuanto a que las hojas viejas se enfermaron más que las hojas nuevas. El 100% de las hojas viejas desarrollaron una necrosis desde la punta de la hoja, que avanza hacia la base con un frente clorótico. Para las hojas nuevas, todas las repeticiones tuvieron el mismo comportamiento: un tercio de las gotas presentaron un halo clorótico de 1 mm de diámetro en promedio, mientras que los dos tercios restantes no presentan sintomatología asociada a la inoculación.

Allium fistulosum no presentó diferencias en el comportamiento de las dos hojas evaluadas. Tanto la hoja vieja como la hoja nueva inoculadas mostraron el mismo comportamiento. El 50 % de las inoculaciones puntuales mostraron un leve halo clorótico en torno a la gota de suspensión de esporas. El otro 50% de las inoculaciones se presentó sin sintomatología asociada.

Las tres accesiones evaluadas presentaron un nivel de enfermedad de medio a bajo. Se comportaron como accesiones moderadamente resistentes. Si bien desde un punto de vista cualitativo, de estas tres accesiones, la que se comportó como más susceptible fue Naqué, seguida por Valenciana Martínez y luego por *A. fistulosum*. En este ensayo no se construyó ni se evaluó a través de una variable cuantitativa que permita a través de un análisis estadístico colocar claramente a estas tres accesiones en el orden ya mencionado.

Aun cuando el objetivo de este ensayo era evaluar la metodología de inoculación, no se pudo contar con una variedad susceptible como control. Todas las accesiones evaluadas se comportaron de acuerdo a lo esperado. Si bien Naqué es una accesión de día intermedio, grupo predominantemente susceptible (Colnago et al., 2012), es de las que presenta mejor comportamiento frente a *P. destructor*. Valenciana Martínez es una accesión de día largo por lo que se espera que tenga un buen comportamiento, incluso mejor que las menos susceptibles de día intermedio (Colnago et al., 2012). Respecto a *A. fistulosum* es una especie emparentada que en la bibliografía se cita como una accesión moderadamente resistente (Kofet y Zinkernagel, 1989).

El comportamiento de Naqué (menos resistente) respecto al comportamiento de Valenciana Martínez está dentro de las hipótesis de investigación a evaluar. Las condiciones ambientales en las que se

desarrollaron las dos accesiones son las mismas, así que existen dos factores que podrían explicar este fenómeno: por un lado en componente genético asociado a cada una de las accesiones y por otro lado el estado de desarrollo de cada una de las accesiones.

4.2. EVALUACIÓN DE ACCESIONES EN DOS FOTOPERÍODOS

En las condiciones en que se realizó este ensayo, la mayoría de las hojas inoculadas presentaron un nivel de necrosis importante o total al momento de la evaluación. Sin embargo, esta sintomatología no es un síntoma típico, ni una respuesta claramente atribuible a la inoculación con *Peronospora destructor*. De hecho, el crecimiento de las plantas fue muy pobre desde que se colocaron en el solarío, y las plantas no presentaron diferencias visibles en el grado de bulbificación como se esperaba. Al momento de la inoculación, las plantas no tenían buen vigor, y este hecho condicionó el resultado de la inoculación.

El modelo de análisis del ensayo considera que las diferencias en la respuesta a *P. destructor* están dadas en primer lugar por el efecto de cada una de las accesiones interactuando con un fotoperiodo dado, que en este ensayo pretende determinar dos estados de desarrollo diferentes. En segundo lugar se consideran las variaciones en severidad dadas por el componente genético de cada una de las accesiones. Por último considera el efecto en la severidad que está dado por los dos estados de desarrollo que se quieren evaluar, bulbificando y sin bulbificar, que se obtienen a partir de la aplicación de los dos fotoperiodos.

La interacción entre la accesión y el estado de desarrollo no fue significativa. No se encontró suficiente evidencia para decir que las diferencias en severidad estén dadas por la interacción entre los dos factores. Como no es significativa no se estudió la interacción. En cuanto al estado de desarrollo, como factor de variación del modelo de análisis, la variación entre la media del estado de desarrollo fue menor que la variación dentro de las medias del factor. No se encontró evidencia suficiente para afirmar que las medias sean diferentes.

Cuadro 9. Test de comparación de medias de cada accesión, promedio de los dos fotoperíodos evaluados.

Accesiones	Media ^a Tukey ^b
Casera	6,00a
Regia	6,00a
Canarita	6,00a
Valenciana Martinez	6,00a
UR8903	6,00a
UR8819	6,00a
Naqué x Casera	5,75a
INIA Blanca	5,75a
Pantanoso	5,50a b
Naqué	5,50a b
INIA Fagro Dulce	5,50a b
Caballero	5,50a b
Valenciana Las Brujas	5,00a b
UR9102/UR8902	4,25 b
<i>A. fistulosum</i>	2,75 c

^a Escala ordinal arbitraria de evaluación de severidad, de 1 (planta sana) a 6 (100% necrosis en la hoja inoculada), elaborada en base al porcentaje estimado de área foliar afectada.

^b Medias seguidas de la misma letra no difieren estadísticamente (Tukey $p < 0,05$).

En ninguno de los términos del modelo en que es considerado el estado de desarrollo como fuente de variación se encontraron evidencias para decir que existen diferencias significativas en cuanto a la severidad de la enfermedad entre las medias dadas por el estado de desarrollo.

La hipótesis de investigación sobre la incidencia del estado de desarrollo en el progreso de la enfermedad queda contestada en este análisis de resultados. En las condiciones en las que se desarrolló este ensayo no se logró

generar evidencias suficientes para encontrar diferencias significativas dadas por el estado de desarrollo (análisis mediante Modelo Lineal Generalizado). Esto tiene dos lecturas: en primer lugar se podría decir que el estado de desarrollo de la planta no afecta directamente el comportamiento de la planta frente a la enfermedad, por lo tanto la hipótesis queda refutada. Por otro lado se puede decir que este ensayo tal como fue planteado, y en las condiciones en que fue llevado adelante, no permitió generar evidencia suficiente para comprobar la hipótesis planteada y que tal vez con otro ensayo planteado diferente, estas diferencias se revelarían.

Sólo para el efecto dado por el componente genético de cada una de las accesiones la variación entre las medias de las accesiones es mayor que la variación dentro de las accesiones, por lo que existe suficiente evidencia para decir que al menos una de las medias de las variedades es diferente en cuanto a la severidad.

Las accesiones no tuvieron el comportamiento esperado, de acuerdo a los antecedentes. Se realizó una prueba de comparación múltiple de las medias de las accesiones para identificar las diferencias significativas entre éstas (Cuadro 9). En este análisis de comparación de medias se pudieron observar tres grandes grupos de respuesta. Un primer grupo formado por las accesiones que tuvieron peor comportamiento frente al patógeno (Casera, Regia, Canarita, Valenciana Martínez, UR8903, UR8819, INIA Blanca), a las que sólo se les asignó solo la letra *a* en el Cuadro 9. Este grupo mostró una necrosis completa o muy alta al momento de la evaluación en todas las repeticiones. Un segundo grupo de comportamiento intermedio en el que se encuentran todas las accesiones a las que se les asignó la letra *b* (Pantanoso del Sauce, Naqué, INIA Fagro Dulce, Caballero, Valenciana Las Brujas, UR9102/UR8902), y por último, con un nivel de síntomas muy inferior, la accesión *Allium fistulosum*, la cual fue asignada con la letra *c*.

Las accesiones no tuvieron el mismo comportamiento en el ensayo en el solarío que recibieron luz y fotoperíodos artificiales, que en el ensayo que se desarrolló naturalmente en condiciones de campo (sección siguiente, 4.3). Si bien el comportamiento no puede considerarse solo como una respuesta a la Peronospora, con necrosis generalizada en toda la hoja, llaman la atención Regia y Valenciana Martínez, que en evaluaciones de campo anteriores (Galván, 2010) y en el solarío (Colnago, 2010) se comportaron como moderadamente resistentes. Tampoco se corresponde con resultados

anteriores, el comportamiento intermedio de INIA Fagro Dulce, que es considerada muy susceptible a *Peronospora* (Galván, 2010).

Las demás accesiones tuvieron un comportamiento relativo esperado, aunque cabe reiterar que los síntomas evaluados en este ensayo, están muy influenciados por las malas condiciones de crecimiento en el solarío, y por el estado de envejecimiento relativo de las hojas en cada accesión.

4.3. RESULTADOS DEL ENSAYO A CAMPO

En el ensayo a campo, al momento de evaluación la incidencia de *Peronospora destructor* fue total o con valores muy altos para todas las accesiones. Esto es esperable para una enfermedad foliar que se disemina rápidamente. Por tanto, se presentan los resultados de la severidad (como porcentaje de tejido infectado) y el peso comercial promedio de los bulbos (medición que se realizó en poscosecha).

4.3.1. Severidad

Para evaluar la respuesta de las diferentes variedades en la severidad a *P. destructor* se construyó una escala ordinal, por lo que los datos no tienen distribución normal. El análisis se realizó con un modelo lineal generalizado. En el Cuadro 10 se distingue claramente que la accesión Regia es significativamente diferente a todas las demás accesiones, siendo la que presenta menor nivel de susceptibilidad a *P. destructor*. El resto de las accesiones se presenta como una cascada de valores, entre los que no se distinguen claramente grupos de respuesta diferentes.

De todas maneras, se pueden diferenciar tres grupos (aunque no claramente como en el caso de Regia). El primero, más susceptible, en el que se involucran las accesiones a las que se les asigna la letra a (Naqué x Casera, UR8819, Casera, Valenciana Las Brujas y Pantanoso del Sauce). El segundo grupo involucra las accesiones que tienen un comportamiento intermedio en cuanto a la susceptibilidad a este patógeno, las accesiones UR8903, Canarita e INIA Blanca. Por último, el tercer grupo involucra las accesiones a las cuales se les asignó la letra f, que forman el grupo que presentó mayor resistencia a *P. destructor*, pero significativamente menor que Regia. En este grupo se incluyen las accesiones Caballero, INIA Fagro Dulce, UR9102/UR8902, Valenciana Martínez y Naqué.

Cuadro 10. Severidad para cada accesión en el ensayo a campo.

Variedad	Ciclo	Severidad
Naqué x Casera	DC	2.179a
UR8819	DI-DL	2.154a b
Casera	DC	2.091a b c
Valenciana Las Brujas	DL	2.090a b c
Pantanoso	DI	2.087a b c
UR8903	DI-DL	2.038 b c d
Canarita	DI	2.026 b c d e
INIA Blanca	DC	2.000 c d e
Caballero (población local)	DL	1.986 c d e f
INIA FagroDulce	DC	1.941 d e f
UR9102	DI-DL	1.919 d e f
Valenciana Martínez	DL	1.897 e f
Naqué	DC	1.855 f
Regia	DC-DI	1.635 g
<u>Media</u>		<u>1.994</u>

^a La evaluación se realizó en una escala ordinal de 0 (planta sana) a 3 (más de 50% del área foliar afectada).

^b Medias seguidas de la misma letra, no difieren estadísticamente. Test de Tuckey, $p < 0,05$.

En el informe final FPTA250 (Galván, 2011), se reseña el estudio de la respuesta de diferentes accesiones locales y cultivares introducidos frente al patógeno *P. destructor*. En ese caso, se encontró resistencia parcial en cultivares de día largo en comparación con los cultivares de día intermedio y de día corto. Esto coincide para la accesión Valenciana Martínez aunque no para el cultivar Valenciana INIA Las Brujas que en el presente ensayo tuvo un comportamiento más susceptible. Esta resistencia la asocia al estado fisiológico al momento en que aparece la enfermedad o podría ser una respuesta de defensa activa dada por genes de resistencia. En este último caso, la

resistencia podría más fácilmente transferirse desde estos cultivares que mostraron un mejor comportamiento frente al patógeno a los cultivares de día corto y de día intermedio (Colnago et al., 2012).

Tampoco se corresponde el comportamiento intermedio de INIA Blanca con los resultados reportados por Galván (2011), cuando este cultivar se ubicó en el grupo de los más susceptibles en varios ensayos. Naqué se destacó en su comportamiento frente a *P. destructor* en este estudio. Esto es consistente con los resultados obtenidos con los resultados de este ensayo.

Regia, que es un cultivar de día intermedio, en este estudio presentó los niveles más altos de resistencia de todo el ensayo, y consecuentemente dentro del germoplasma de día corto y de día intermedio. Esto coincide con los resultados anteriores (Galván, 2011), y confirma el potencial de esta accesión como fuente de resistencia en el mejoramiento de cebolla de día intermedio y día corto. Efectivamente, Regia está siendo utilizado en cruzamientos con germoplasma adaptado a las condiciones de cultivo nacionales.

4.3.2. Peso promedio de bulbo

En función de que el número de plantas por parcela no se mantuvo constante hasta la poscosecha, se tomó el peso medio de los bulbos como indicador del crecimiento y rendimiento de cada accesión (Cuadro 11). En el análisis de las diferencias en el peso medio del bulbo la única accesión que se distingue claramente de las otras es Naqué x Casera. Es la accesión que presentó significativamente menor peso de bulbo.

El resto de las accesiones se presentan como una cascada de valores que no se distinguen claramente en grupos. De todas maneras se pueden distinguir dos grupos más arbitrariamente: uno compuesto por todas las accesiones de mayor peso de bulbo, a las que se les asignó la letra *a*, y otro grupo formado por las accesiones con menor peso de bulbo, a las cuales se les asignó la letra *d*.

El grupo formado por las accesiones con mayor peso de bulbo comprende a Regia, UR8819, UR9102/UR8902, Valenciana Martinez, UR8903, Pantanoso del Sauce, Naqué y Caballero. El segundo grupo incluye las accesiones Canarita, Valenciana Las Brujas, INIA Fagro Dulce, INIA Blanca y Casera. Estas son las accesiones que presentaron un comportamiento intermedio en cuanto al peso promedio de bulbo.

En el caso de algunas accesiones se observó una correspondencia entre el comportamiento en las dos variables. Por ejemplo en el caso de Regia, es la accesión que presentó mejor comportamiento en cuanto a la severidad y también el mejor peso de bulbo. Por otro lado la accesión Naqué x Casera presentó el menor peso de bulbo y el peor comportamiento en cuanto a la severidad. Dadas estas correspondencias entre otras observadas se procedió a calcular el coeficiente de correlación entre estas dos variables. Esto es posible ya que estas dos variables son medidas en el mismo ensayo.

Cuadro 11. Peso medio de bulbo para cada accesión en el ensayo a campo.

Accesión	Ciclo	Peso medio (g)
Regia	DC-DI	117,5a
UR8819	DI-DL	112,1a
UR9102/UR8902	DI-DL	110,2a
Valenciana Martinez	DL	106,7a
UR8903	DI-DL	104,8a b
Pantanos del Sauce	DI	99,1a b c
Naqué	DC	97,7a b c
Caballero	DL	96,3a b c
Canarita	DI	85,1 b c d
Valenciana Las Brujas	DL	78,7 c d
INIA Fagro Dulce	DC	78,2 c d
INIA Blanca	DC	78,1 c d
Casera	DC	68,8 d
Naqué x Casera	DC	45,6 e
<u>Promedio del ensayo</u>		<u>91,4</u>

Medias seguidas de la misma letra, no difieren estadísticamente. Test de Tuckey, $p < 0,05$.

El coeficiente de correlación entre la severidad de *Peronospora* y el peso medio del bulbo fue $r = -0.550$. La correlación es negativa; eso quiere decir que a mayor severidad menor peso de bulbo. De todas maneras este coeficiente es medio. Es decir que, si bien la severidad de esta enfermedad foliar está correlacionada con el rendimiento medido como peso medio del bulbo, este no es el único factor que hace el rendimiento. Este resultado se corresponde con el obtenido por Cortizas y Noguez (2010). Una correlación similar, negativa pero relativamente baja, fue encontrada por Rachetti (2010) para el rendimiento de variedades locales de zanahoria y los niveles de *Cercospora carotae* en hoja. Hay un componente genético, que es importante y que determina el potencial máximo de cada variedad.

Si se ajusta una curva de regresión entre las dos variables considerando la severidad como variable independiente y el peso de bulbo como variable dependiente (dado que queremos observar cómo afecta la severidad al peso medio del bulbo), se ajusta un modelo lineal de primer grado con un coeficiente de regresión $R^2 = 0.3033$ (Figura 4).

El mildew es una enfermedad foliar, por lo que disminuye el área foliar de la planta, y a su vez disminuye la duración del área foliar. En este cultivo, esta reducción resulta particularmente importante dado que una vez iniciada la bulbificación las hojas detienen su crecimiento y todos los asimilados se parten hacia el bulbo (Dogliotti et al., 2011). Esta podría ser la explicación para que la severidad de una enfermedad estuviera correlacionada negativamente con el rendimiento comercial de las accesiones.

Las accesiones de día intermedio presentaron un patrón más disperso y menos claro en el gráfico que en las accesiones de día corto y las de día largo (Figura 4). En efecto, los dos últimos grupos mencionados muestran una tendencia clara: a mayor severidad menor peso promedio de bulbo. En el caso de las accesiones de día intermedio hay algunos casos, por ejemplo UR8819, en las que más allá de presentar un alto nivel de severidad el peso de bulbo también es alto. Esos datos que salen de la tendencia bajan el coeficiente de correlación, pero se explican por el componente genético que determina una alta adaptación productiva, y es el principal factor que condiciona el rendimiento del cultivo.

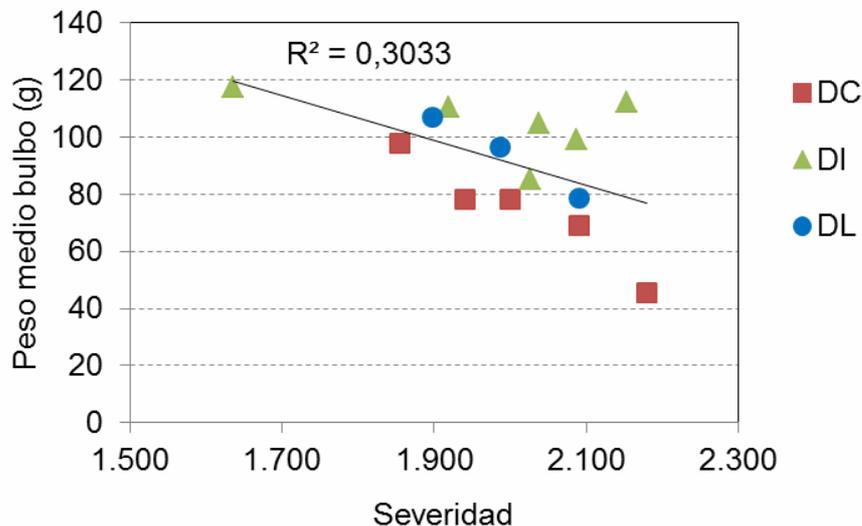


Figura 4. Peso medio de bulbo en función de la severidad a campo de *Peronospora destructor*. Los símbolos y colores distinguen las accesiones de día corto (DC), día intermedio (DI) y día largo (DL).

4.4. EVALUACIÓN DE PREPARADOS HISTOLÓGICOS AL MICROSCOPIO

4.4.1. Primera etapa de evaluación histológica

Se evaluaron trozos de hojas inoculadas con *P. destructor* a los tres días post inoculación con el fin de que las características de las hojas extraídas no se diferenciaron de las que presentan en la planta. Esta metodología, se utilizó para estudiar las relaciones histológicas entre cada accesión y el patógeno. Como ya fue mencionado para las evaluaciones en trozos de hojas, al momento de la evaluación se observó que las accesiones presentaban diferentes niveles de conservación de las hojas. *Allium galanthum* tuvo mejor conservación que las cuatro accesiones de cebolla evaluadas. Para realizar este tipo de ensayo, aun cuando el objetivo sea el estudio de la relación planta-patógeno a nivel histológico, se requiere conocer la capacidad de las hojas de conservarse separadas de la planta, en relación con el mínimo tiempo de desarrollo de los síntomas de la enfermedad. Puede que en las diferentes accesiones la enfermedad se desarrolle con tiempos diferentes, y en este caso el atraso en su desarrollo podría deberse a mecanismos de resistencia de la planta que enlentecen el proceso.

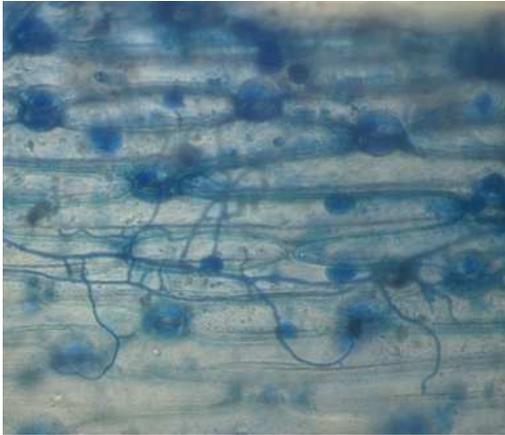


Figura 5. Predominancia de *Stemphylium vesicarium* en la primera etapa de evaluaciones histológicas.



Figura 6. Zoosporangio de *Peronospora destructor* liberando zoosporas o germinando.

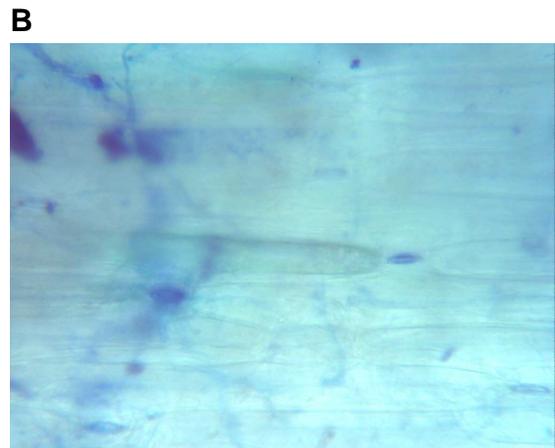
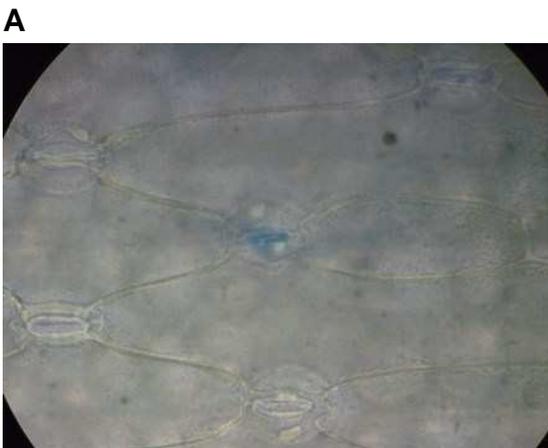


Figura 7. Observaciones en la primera etapa de evaluaciones histológicas. **(A)** Estoma que tendría una infección enquistada en la cavidad subestomática (al centro), mientras que los otros estomas no tienen infección. **(B)** Célula de la epidermis (al centro, más oscura) con una reacción de hipersensibilidad ante la infección de los estomas adyacentes. Tinciones con azul de tolueno.

En las observaciones al microscopio, en esta primera etapa de análisis a nivel histológico de la interacción planta-patógeno se comprobó que el inóculo de *P. destructor* utilizado se había contaminado con *Stemphylium vesicarium*, otro patógeno presente y que dificultó la observación. En este trabajo, el inóculo

de *Peronospora* se preparó a partir de hojas infectadas en condiciones de campo. *Peronospora destructor* tiene un proceso de infección más lento que *Stemphylium*, por lo que al microscopio se observó claramente el crecimiento de las hifas y apresorios de *Stemphylium* (como muestra la Figura 5).

En el caso de *P. destructor* se observó la apertura o germinación de zoosporangios y la liberación de las zoosporas (Figura 6). En el período evaluado, no se observó germinación de las esporas ni crecimiento de hifas. Sin embargo, se observaron estructuras en las cavidades subestomáticas (Figura 7A) que corresponderían a zoosporas enquistadas descritas por la literatura (Gindro et al. 2003, Agrios 2005). No se encontraron diferencias entre accesiones en la cantidad de quistes formados. También se observó una célula de la epidermis con una coloración más oscura (Figura 7B). Este cambio corresponde a una reacción de hipersensibilidad (HS), de acuerdo a lo observado en otros Oomycetes (Kamoun et al. 1999, Li et al. 2011) y en los primeros estadios de hemi-saprófitos (Rodríguez et al., 2014). La célula con HS tiene dos estomas adyacentes que tendrían infecciones enquistadas del patógeno. A fin de continuar ajustando las técnicas histológicas para estudios cuantitativos que expliquen las diferencias en la resistencia a campo, se realizó una segunda etapa de evaluación.

4.4.2. Segunda etapa de evaluación al microscopio

En la segunda etapa de evaluaciones de las relaciones histológicas planta-patógeno, se realizaron dos trabajos: (1) evaluación al microscopio de infecciones naturales esporulando, muestreadas a campo, y (2) evaluación de la proporción de zoosporangios infectivos en trozos de hojas inoculados en el laboratorio. Se presentan y se discuten las estructuras del patógeno observadas con cada una de las tinciones ensayadas.

4.4.2.1. Estructuras fúngicas y tinciones

En la evaluación de las manchas extraídas de las plantas con síntomas y signos se pudieron observar varias estructuras del patógeno y de la planta. En la Figura 8 se observa un trozo de hoja con mancha esporulando, teñida con acridina naranja, con dos enfoques diferentes. La imagen 6A corresponde a un enfoque por encima de la epidermis mientras que en la imagen 6B se observa el tejido subepidérmico. En la imagen A se puede observar que las estructuras de *P. destructor* se tiñen de un color anaranjado más intenso y oscuro que las

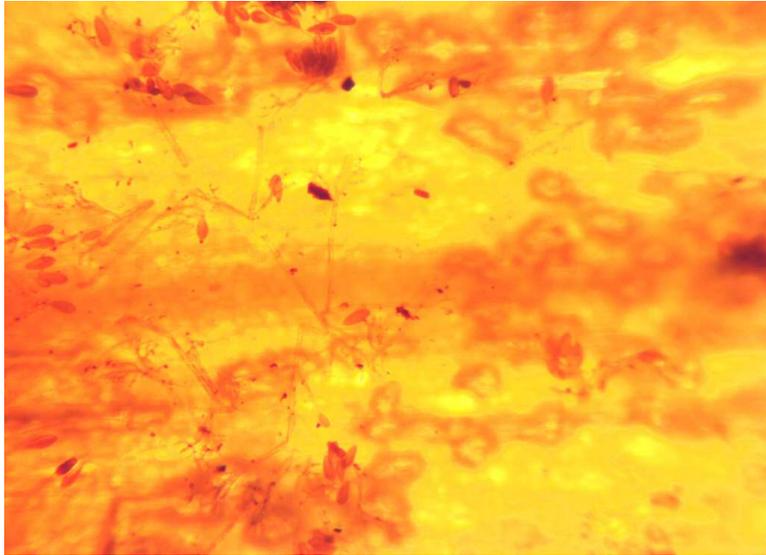
estructuras de la planta. Se puede observar por encima de la epidermis de la hoja la esporulación: los zoosporangioforos arborescentes con los zoosporangios. De color anaranjado más brillante se observa la epidermis de la hoja. Inmediatamente por debajo se observan zonas (manchas) de coloración más oscura que es la infección que desarrolla el patógeno entre las células del parénquima sub-epidérmico.

La imagen B de la Figura 8 se muestra el mismo trozo de hoja, en la misma zona, pero en este se observa las células del parénquima (redondas). Se observan claramente de coloración más oscuras los contornos de las zonas de crecimiento del patógeno. Se observó en todos los preparados que la infección de las células del parénquima comienza con el alojamiento del patógeno en la cámara sub-estomática (indicadas mediante flechas). Luego el patógeno se extiende y continúa su crecimiento, preferentemente en el sentido de las nervaduras de las hojas. Posteriormente, el patógeno puede desarrollar una ramificación lateral, y continúa su crecimiento paralelo a la primera zona desarrollada y a las nervaduras. Realiza un dibujo similar a la que queda en una pared de ladrillos entre los ladrillos.

La observación del comportamiento de *P. destructor* en el proceso de infección en la primera etapa de evaluación del tejido foliar infectados y con síntomas y signos visibles se observaron zoosporangios abiertos liberando las zoosporas. Las zoosporas tal como cita la bibliografía son la estructura de infección del patógeno. Estas zoosporas ingresan a la apertura estomática, allí se enquistan y comienza el proceso de infección y colonización del patógeno.

En esta segunda etapa de evaluación, se observó en muchos preparados de diferentes accesiones que los zoosporangios germinan directamente; desarrollan una hifa que se adhiere a la epidermis mediante un apresorio, y continúa creciendo hasta que encuentra una apertura estomática donde penetra. Una vez que ingresa a la planta a través del estoma se aloja en la cámara subestomática, la coloniza y desde ahí comienza el crecimiento del patógeno entre las células parenquimáticas. Esta estructura que se desarrolla entre las células de la planta crece de forma paralela a las nervaduras de la hoja, y luego continúa con el desarrollo de un crecimiento perpendicular a la misma, y continúa con un nuevo crecimiento principalmente paralelo a las nervaduras.

A



B

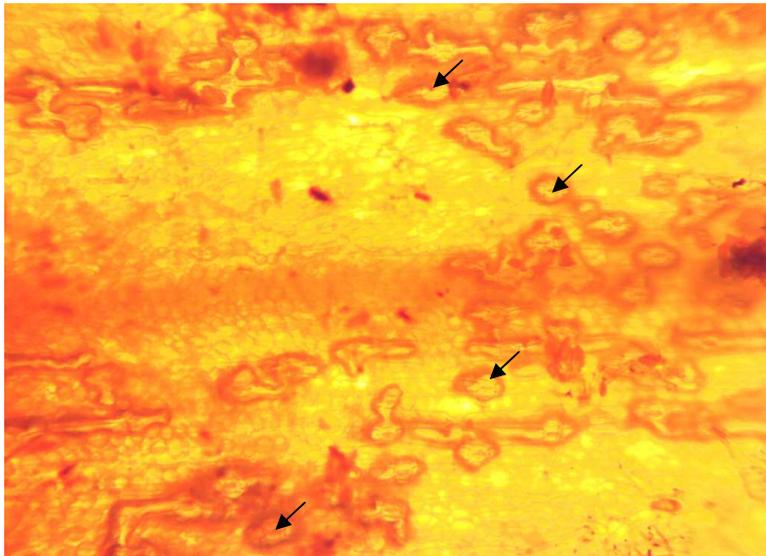


Figura 8. Hoja con mancha de *P. destructor* con una infección natural esporulando, colectada a campo. Tinción con Calcofluor +acridine orange. (A) enfoque de la epidermis, y (B) del parénquima sub-epidérmico. Las flechas indican infecciones de las cavidades subestomáticas.

En la Figura 9 se muestran dos imágenes (A y B) en las que se pueden observar dos zoosporangios que han germinado y están penetrando en el estoma. La tinción que se utilizó en este preparado es Eosin Y. Con esta tinción se distinguen por la intensidad de la coloración las estructuras del huésped de las del patógeno. La pared de los zoosporangios y el contenido de los mismos se tiñe de color rosado oscuro, en coincidencia con lo reportado por Kortekamp (2005) para *Plasmopara viticola*. Del mismo color se tiñe la hifa que germina de este y se observa, con la misma coloración la estructura del hongo que penetra en el estoma. Las paredes celulares de la planta se tiñen de un color más claro, así como también lo hace el contenido celular de las células de la planta. Es por esta diferencia en la coloración entre el patógeno y el huésped que se puede observar claramente en la Figura 9B que lo que se encuentra dentro de la apertura estomática forma parte de las estructuras de *P. destructor*.

La Figura 9A es un enfoque por encima de la epidermis, en donde se visualizan dos zoosporangios germinados y que se encuentran penetrando. La hifa crece y se observa un punto de apoyo de esta sobre el tejido vegetal (célula de la epidermis) en donde forma un apresorio (indicado con una flecha), estructura que le permite fijarse a la planta. El crecimiento de esta hifa continúa para luego penetrar en la apertura estomática.

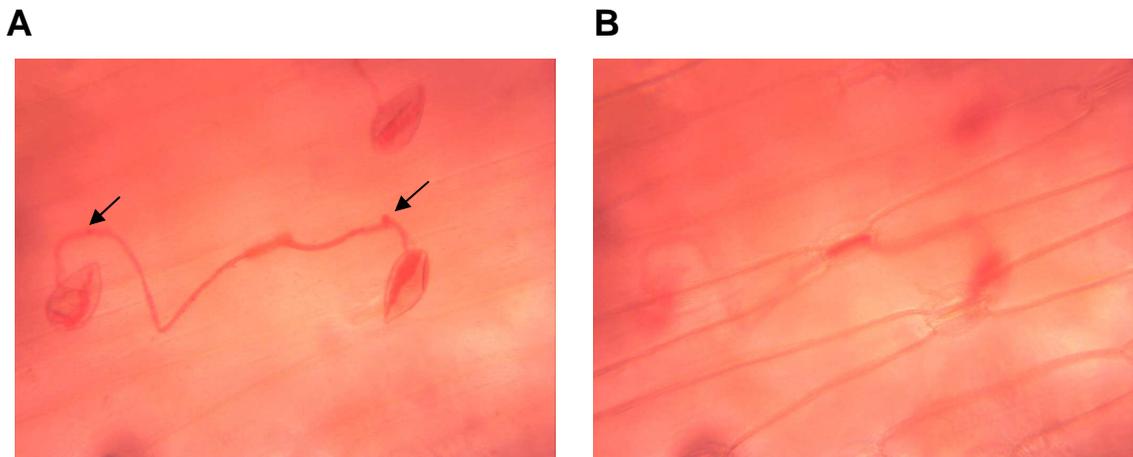


Figura 9. Zoosporangios de *Peronospora destructor* penetrando por el estoma. (A,B) diferentes planos de enfoque de la misma imagen. Tinción con Eosin Y. (A) Dos zoosporangios penetrando por el mismo estoma; las flechas indican la posición de los apresorios. (B) infección inicial o enquistamiento (flecha) de la cavidad subestomática.

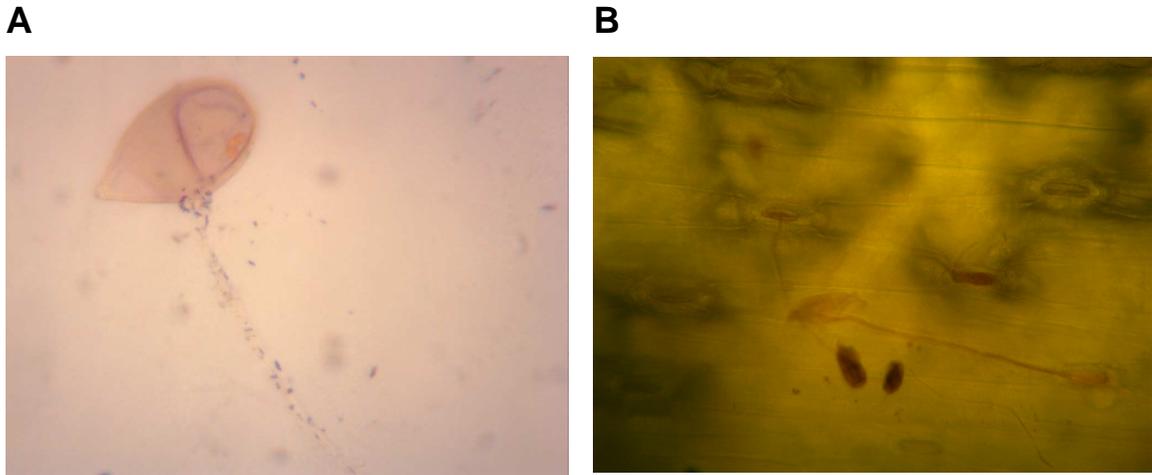


Figura 10. Evaluación de tinciones de tejidos del patógeno con Stains-All. (A) Zoosporangio germinado, con estructuras teñidas de naranja al interior, y puntuaciones violáceas en la hifa de penetración (B) Zoosporangios que germinaron y que alcanzaron las cavidades sub-estomáticas en el cultivar Regia, tinción con Stains-All.

La Figura 10 presenta evaluaciones realizadas con Stains-All, en base a Kortekamp (2005), una tinción que permitió lograr diferentes coloraciones contrastantes en los tejidos del patógeno y la planta, por lo que se debería seguir probando su utilización.

La imagen A de la Figura 11 muestra una tinción con toluidine azul. Con esta tinción se puede observar en un azul intenso y más oscuro las estructuras del patógeno (zoosporangios, hifa y límites del área de infección del oomycete en la infección subestomática). En esta imagen se puede observar lo que se describió para la figura anterior, un zoosporangio germinado penetrando por un estoma. Se observa como este zoosporangio que penetra a través de la hifa logra colonizar al huésped, con el crecimiento de la hifa entre las células parenquimáticas. Luego que el patógeno coloniza la cámara subestomática por la que penetró, continua creciendo y desplazando las células del parénquima, las cuales presentan una reacción frente al patógeno, tal como se puede observar en la imagen 11B. En la trayectoria de crecimiento del patógeno va colonizando otras cámaras subestomáticas, como se puede apreciar en la imagen A de la misma figura.

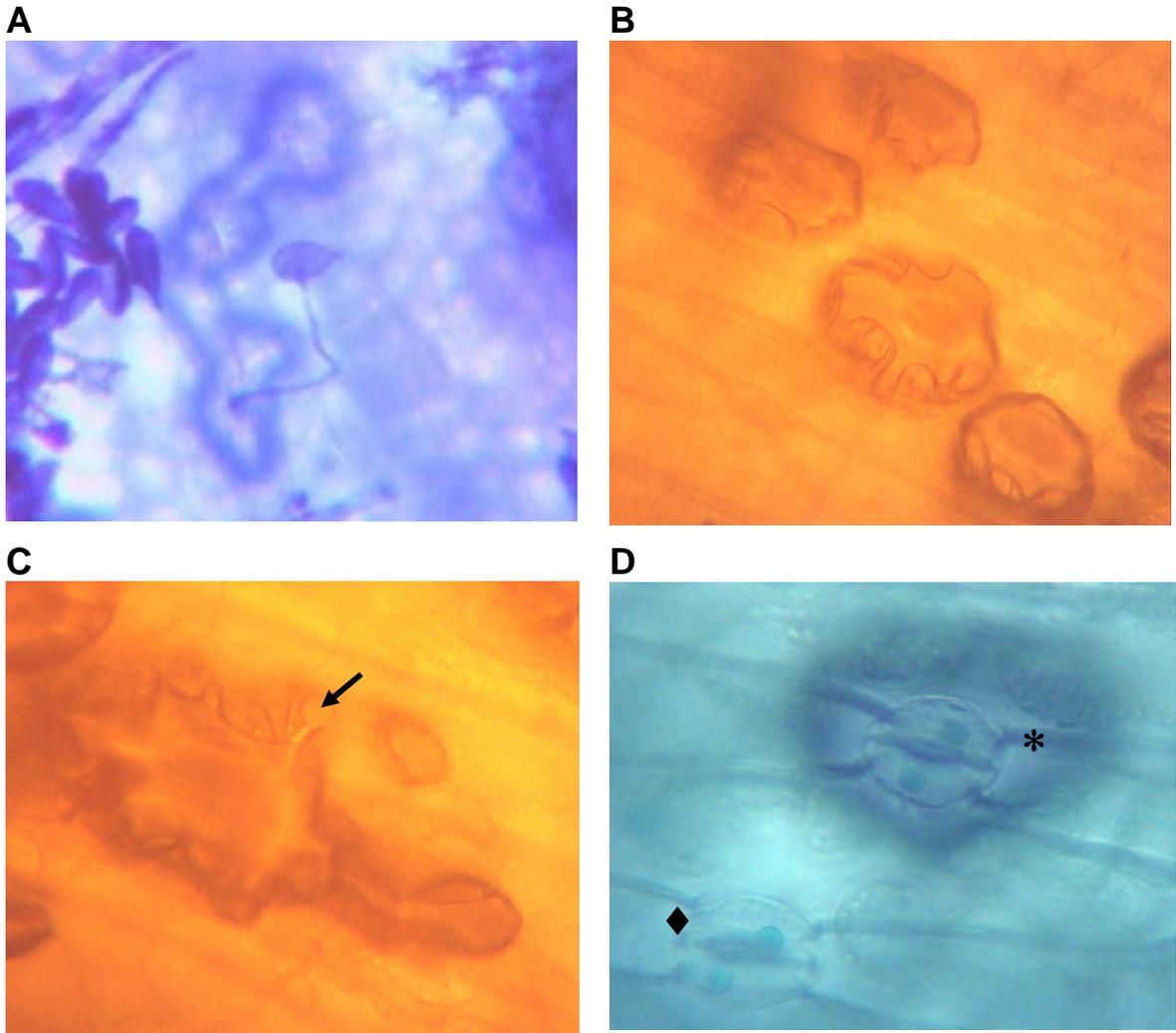


Figura 11. (A) Zoosporangio germinado con infección subestomática que se extiende entre las células del parénquima, tinción con toluidine blue. (B) infecciones del parénquima de la hoja iniciadas en las cavidades subestomáticas, tinción con acridina orange + clacofluor; (C) infección subestomática que se empieza a extender en el sentido del largo de la hoja. La flecha indica un posible apresorio con la estructura de cuello y cabeza, de acuerdo a lo descrito en la literatura. Tinción con acridina orange + clacofluor. (D) Estoma con infección subestomática(*) y estoma sano (◆). Con esta tinción (calcofluor + toluidine blue) se observan los núcleos de las células guarda de los estomas.

En la Figura 11B se pueden observar varias infecciones independientes que han colonizado las cámaras subestomáticas. La tinción utilizada para las imágenes 11B y 11C es compuesta: Acridina naranja + Calcofluor. Con esta tinción se pueden distinguir las paredes de la planta hospedera de coloración anaranjada brillante, y las paredes de las células del patógeno de coloraciones más oscuras, mientras que las zonas de interacción planta-patógeno aparecen de color amarronado.

En la imagen 11C se señala con una flecha la formación de un posible haustorio, según lo que describen Kortekamp (2005) para el patosistema *Plasmopara viticola* – vid, y Li et al. (2011) para observaciones de *Hyaloperonospora parasítica* colonizando especies del género *Brassica*. Se observa en la zona de interacción entre el patógeno y el huésped una estructura que tiene un cuello y una cabeza, en coincidencia con lo que describen estos autores. Esta estructura es la forma que tiene el patógeno de alimentarse del contenido celular de las células del huésped.

No se lograron observar muchas estructuras de este tipo, aunque deberían haber muchas, en toda la zona de contacto entre la infección del hongo y las células de la planta. La falta de visualización puede deberse a que esta tinción no permite observarlos fácilmente, o a que el plano de observación no favorece la visualización de los mismos. Kortekamp (2005) realizó estas observaciones con secciones semidelgadas (cortes con micrótopo) en lugar de observar desde el haz de la hoja en profundidad con el micrométrico. De todos modos, no hay observaciones de este tipo publicadas para *Peronospora destructor*, y se desconoce si el patógeno realiza haustorios abundantes en el proceso de infección del huésped.

En la imagen D de la misma figura se muestran dos estomas teñidos con toluidine azul + clacofluor. Se señala un estoma que está sano, y se observa con una coloración azul muy clara y brillante la cámara subestomática sin presencia del patógeno. Por otro lado se observa el oscurecimiento de la cámara subestomática en el estoma que está infectado.

4.4.2.2. Evaluación cuantitativa de infecciones de campo

En el proceso de evaluación de las hojas del cultivo a campo con síntomas y signo se evaluaron las diferencias en la respuesta a *P. destructor*

en cuanto a la proporción del número de estomas con infección en la cavidad sub-estomática, estomas infectados y esporulados, así como estomas que solo presentaron esporulación. Esta evaluación se realizó para tres accesiones: el cultivar Pantanoso del Sauce (susceptible), Regia (moderadamente resistente, con limitada esporulación a campo), y la F1 del cruzamiento Regia x Pantanoso del Sauce (Figura 12). Mediante la prueba estadística se encontraron diferencias significativas entre las accesiones para cada uno de los tipos estomáticos que se analizaron.

Para las observaciones de estomas sanos, la accesión Regia fue la que presentó mayor número dentro de esta categoría (Figura 12). Este resultado se podría corresponder con lo que se observa a nivel de campo. Regia muestra un nivel de resistencia importante, con una esporulación visible muy limitada, que se podría expresar a nivel histológico con un mayor nivel de estomas sanos al momento que otras accesiones que son más susceptibles presentan un menor conteo de estomas sanos. Esta tendencia tiene que ser más estudiada y profundizada ya que la resistencia de Regia podría deberse a mecanismos que impiden la infección de las hojas. En el otro extremo, la accesión Pantanoso del Sauce fue la accesión que presentó menor número de estomas sanos. La F1 del cruzamiento Regia x Pantanoso presentó un comportamiento intermedio entre sus parentales para esta categoría (Figura 12).

En las categorías en que se contabilizaron los estomas que presentan infecciones sub-epidérmicas (I), y la categoría de infecciones sub-epidérmicas con esporulación (I+E), la accesión de mayor conteo fue Pantanoso del Sauce CRS, el cruzamiento de Regia por Pantanoso tuvo un comportamiento intermedio sin diferencia significativa con Pantanoso, mientras que para Regia se registró el menor conteo. Este menor registro de Regia puede corresponderse con la resistencia de esta accesión observada a nivel de campo. En este sentido, se puede suponer que la resistencia se deba a que si bien el patógeno infecta, generalmente no logra desarrollar una infección exitosa dentro del parénquima.

En cuanto a la categoría de estomas que presentan esporulación (E) pero no se observa por debajo de ellos infección o tejido subepidérmico infectado, las accesiones evaluadas tuvieron diferente comportamiento. Regia presentó significativamente mayor conteo en esta categoría, seguida por Pantanoso del Sauce CRS, y por último con el menor conteo el cruzamiento

Regia por Pantanoso, aunque sin diferencia significativa entre estas dos últimas (Figura 12). Si bien estas observaciones se realizaron a partir de manchas esporuladas colectadas en el campo, es inesperado que Regia tenga esporulación similar (sumando E con I+E) que Pantanoso, ya que la evaluación de las parcelas a campo (macrosíntomas) muestra generalmente un menor de manchas esporuladas.

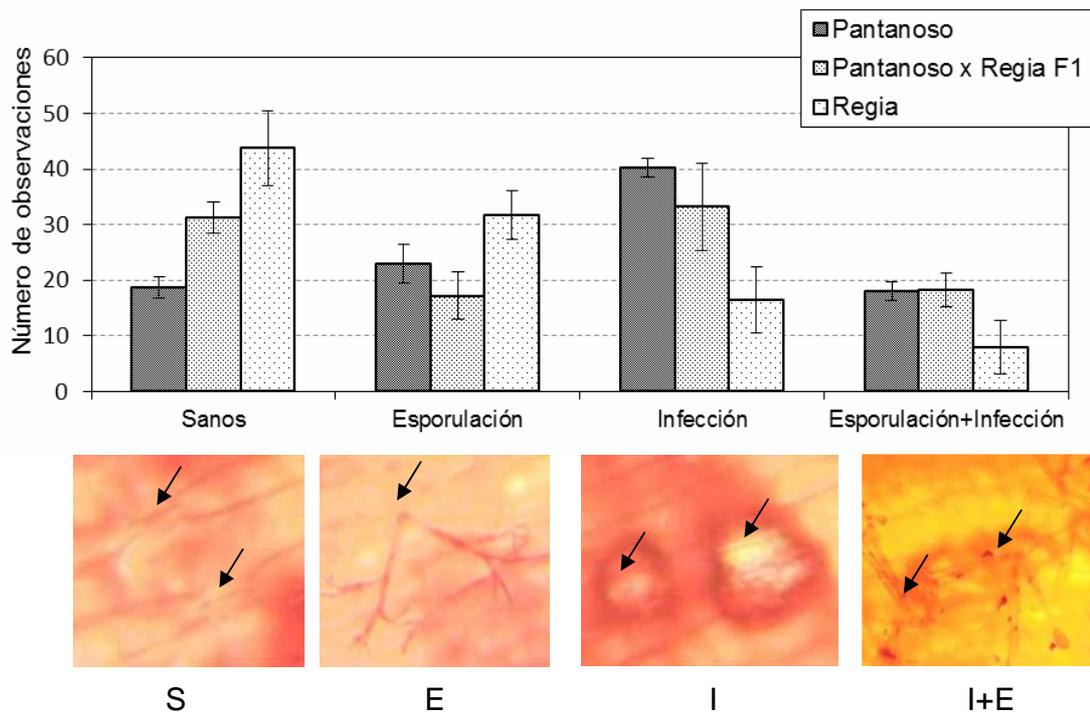


Figura 12. Distribución de la observación de 100 estomas de hojas colectadas a campo con manchas típicas de *Peronospora destructor* con esporulación visible, para Pantanoso, Pantanoso x Regia F1 y Regia, en el número de estomas (S) sanos; (E) esporulando; (I) con infección subestomática; (I+E) con infección subestomática y esporulación. Los datos son promedios de 4 muestras de campo. Las flechas en las fotografías indican la posición de estomas representativos de cada categoría.

Las manchas en las que se observaron los estomas son manchas que se tomaron del ensayo a campo de medición de *P. destructor*. Esto tiene como desventaja que no se conoce con precisión a cuantos días después de la infección se realizó la observación para cada muestra y para cada accesión.

Por otro lado, esta metodología contempla la realidad del campo, ya que si se está evaluando el comportamiento de las accesiones, este ensayo permite observar en ese momento el avance de la enfermedad y cómo se expresa a nivel histológico la enfermedad. Si el mecanismo de defensa de las accesiones resistentes como Regia, está asociado a un enlentecimiento del proceso de infección, o si la infección se inicia después, entonces, al ser evaluadas el mismo día quedan contempladas estas diferencias que ocurren en los cultivos a campo, que son en definitiva los cultivos en las mismas condiciones de los productores.

Se requiere ajustar más las técnicas de estudio de las relaciones planta-patógeno para el patosistema cebolla - *P. destructor*, ya que a nivel histológico podrían encontrarse las claves de la resistencia de algunas accesiones y los mecanismos que desarrollan frente al patógeno, que en definitiva son los que a nivel de campo explican un mejor o peor comportamiento frente a la enfermedad.

4.4.2.3. Evaluación del proceso de infección en trozos de hojas en el laboratorio

En el proceso de evaluación de las hojas del cultivo a campo con síntomas y signo se encontraron zoosporangios germinados. Es decir que el inicio de la infección en *P. destructor*-*Allium cepa* se da por la germinación de los zoosporangios que se han diseminado y se encuentran sobre la hoja. Luego de esta observación se procedió a realizar un ensayo para analizar el proceso de infección con inoculaciones controladas en trozos de hojas. Este ensayo se hizo para seis accesiones, y se realizaron observaciones a las 24, 48, 72, 96 y 168 horas post-inoculación (hpi). La observación a las 168 hpi (7 días), no se realizó para Regia ni para Naqué, ya que los trozos de hojas no tenían buen estado de conservación. Las observaciones cuantitativas se realizaron sobre 100 zoosporangios, con 4 repeticiones por accesión (a diferencia del ensayo anterior en el que se contabilizaron estomas).

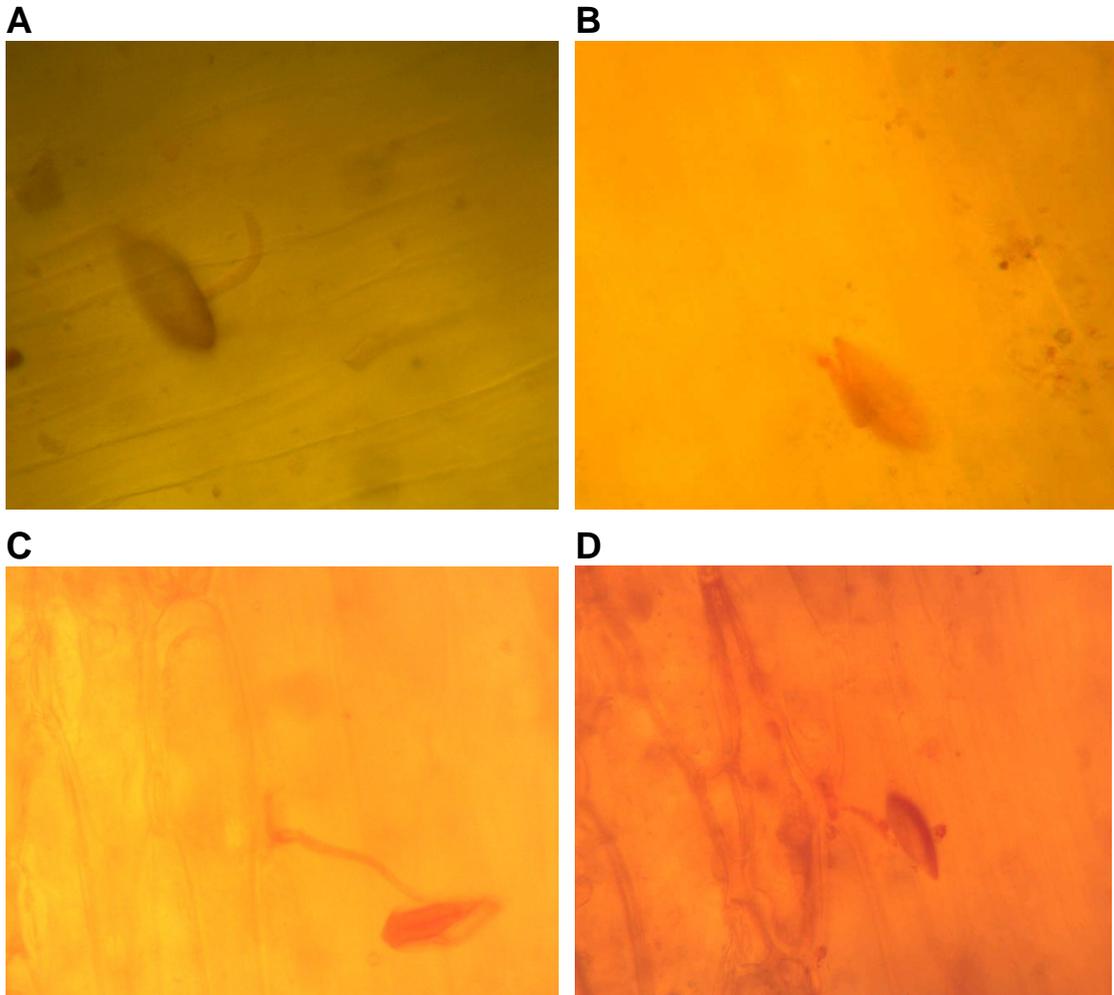


Figura 13. (A, B) zoosporangios germinados sin penetrar a las 24 horas de la inoculación. (C) zoosporangios germinados y penetrando por un estoma a las 48 horas desde la inoculación (D) Zoosporangio germinado y penetrando por un estoma en INIA Valenciana. En una célula de la epidermis adyacente al punto de penetración, el núcleo se trasladó junto al punto de infección, presenta paredes engrosadas (más oscuras que el resto de la epidermis), y probablemente tiene una reacción de hipersensibilidad. Tinciones con Acridine + Calcofluor.

A las 24 hpi, se encontraron los primeros zoosporangios germinados (Figura 13, imágenes A y B), aunque hasta ese momento no se observaron zoosporangios que alcanzaran y penetraran los estomas. Para todas las accesiones, a las 48 hpi ya se comenzó a observar el inicio de la penetración de las hifas que emergieron de los zoosporangios por las aberturas estomáticas (Figura 10, imágenes C y D), excepto para Regia y para *Allium fistulosum*.

Además, como se puede observar en la imagen 13D para INIA Valenciana, en algunos casos se pudo ver indicios de que la célula epidérmica más próxima al estoma penetrado presentaba una reacción posiblemente de hipersensibilidad, de acuerdo a la literatura para otros patosistemas (Li et al. 2011, Rodríguez et al. 2014). La coloración oscura se asocia con el engrosamiento de la pared celular, deposición de calosa, y al inicio del proceso de catálisis enzimática (glucanasas, peroxidasas) que lleva a la muerte celular (Kamoun et al., 1999).

Para *Allium fistulosum* y Regia, los primeros estomas infectados se encontraron a las 72 hpi. Un retraso en el proceso de infección en estas dos accesiones se correspondería con el buen comportamiento a campo frente a esta enfermedad, y podría ser un componente de la resistencia parcial.

No obstante, la infección más tardía de *A. fistulosum* y Regia difiere del resultado reportado por Li et al. (2011) en especies de Brassicas no hospederas de *Hyaloperonospora parasítica*. En esos casos, el proceso de infección no se distinguió de accesiones susceptibles, y la resistencia no hospedera se manifestó más tardíamente.

El Cuadro 12 presenta el análisis estadístico para el ensayo comparativo del proceso de infección. Como la última observación realizada a los 7 días (168 hpi) no incluyó todas las accesiones, se realizó un análisis excluyendo esa observación, y otro con todos los momentos de observación.

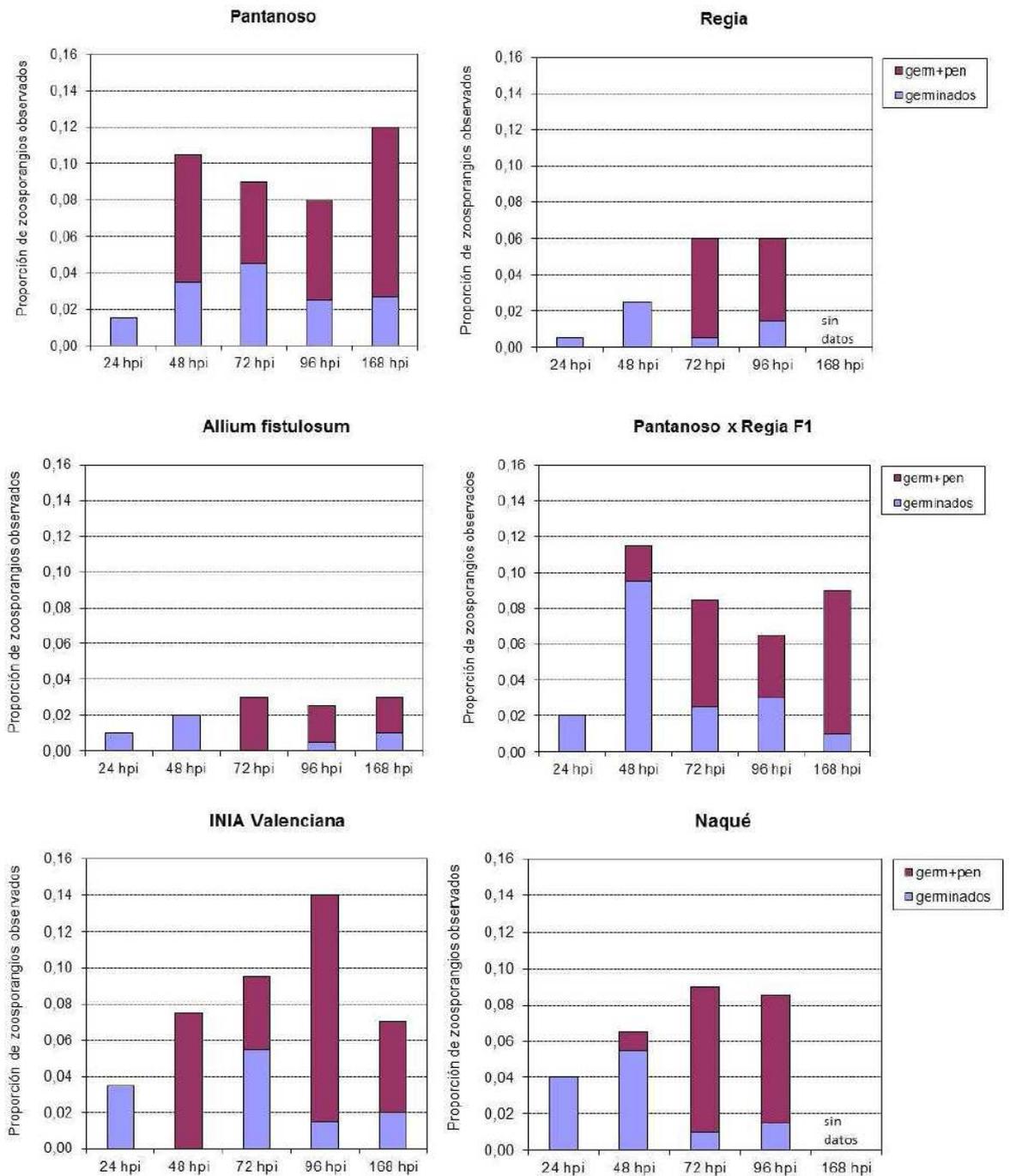


Figura 14. Proceso de infección en trozos de hojas en el laboratorio para seis accesiones, como la proporción de zoosporangios germinados (■), y zoosporangios germinados y penetrados por los estomas (■) a diferentes tiempos desde la inoculación. Los datos son promedios de cuatro preparados, con evaluación de 50 zoosporangios por preparado.

Cuadro 12. Proporción (%) de zoosporangios germinados (G), zoosporangios germinados y penetrados (P), y el total de zoosporangios activos (G+P) para cada accesión. Las medias estimadas en la primera columna son promedios de observaciones realizadas cada 24 horas en los primeros cuatro días después de la inoculación (1-4 dpi), y las medias estimadas de la segunda columna incluyen las observaciones realizadas a los 7 dpi (1-7 dpi).

Accesión	Zoosporangios germinados (G)		Zoosporangios germinados y penetrados (P)		Total (G+P)	
	1- 4 dpi	1-7 dpi	1-4 dpi	1-7 dpi	1-4 dpi	1-7 dpi
<i>Allium fistulosum</i>	0.09 b	0.90 c	1.51 b	1.29 c	2.13 b	2.19 c
Regia	1.25 b	1.29 bc	4.21 ab	3.23 bc	3.75 b	4.52 bc
Regia x Pantanoso	4.25 a	3.96 a	3.94 ab	3.30 abc	7.13 a	7.26 ab
Pantanoso CRS	3.00 ab	2.93 ab	5.28 a	4.66 ab	7.25 a	7.59 a
Naqué	3.00 ab	2.54 abc	6.52 a	5.08 ab	7.00 a	7.62 a
INIA Valenciana	2.63 ab	2.57 abc	6.32 a	5.77 a	8.63 a	8.33 a
MDS	<u>2.15</u>	<u>2.02</u>	<u>2.75</u>	<u>2.52</u>	<u>3.02</u>	<u>3.18</u>
Cultivar	0.024	0.024	0.003	0.003	<0.001	<0.001
Momento	NS	NS	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Interacción	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Las accesiones difirieron significativamente en el porcentaje de zoosporangios germinados (G), en el porcentaje de zoosporangios germinados y penetrados (P), y en la proporción total de zoosporangios activos (G+P). Además, la proporción de zoosporangios activos (G+P) fue significativamente menor a las 24 hpi, con 2,1% promedio de todas las accesiones, que en los muestreos siguientes (6,8% a las 48 hpi, 7,5% a las 72 hpi, y 7,6% a las 96 hpi). Sin embargo, no fue significativa la interacción entre accesiones y momentos de evaluación para ninguna de las variables (G, P, G+P). La ausencia de interacción implica que la proporción de zoosporangios activos difirió entre las accesiones, para el promedio de las observaciones realizadas,

pero que el aumento de esa proporción (tasa) con el correr de los días fue similar para todas las accesiones.

Los cultivares Pantanoso del Sauce CRS (testigo susceptible), INIA Valenciana y Naqué, presentaron una reacción similar, con niveles crecientes de zoosporangios penetrados hasta las 172 hpi en el caso de Pantanoso del Sauce, y 96 hpi para INIA Valenciana. Las proporciones máximas observadas de zoosporangios activos (G+P) llega a máximos de 12-14 % para “Pantanoso del Sauce CRS”, “INIA Valenciana” y el cruzamiento “Pantanoso x Regia F1”, y 8-9% para “Naqué” (Figura 14). Estos valores difieren marcadamente de los reportados por Li et al. (2011) para *Hialoperonospora* parasítica, que presentó germinación por encima de 90% cuando fue inoculada en distintas especies de Brassicas, y 43% in vitro (sobre un portaobjetos).

Los cultivares “INIA Valenciana” y “Naqué”, en general alcanzan niveles de *Peronospora* menores que “Pantanoso del Sauce CRS” en ensayos de evaluación a campo. Sin embargo, no se encontraron diferencias en los primeros estadios de la infección entre estos tres cultivares, por lo que existirían mecanismos más tardíos de enlentecimiento del desarrollo de la enfermedad. En el caso de “INIA Valenciana”, se observó la reacción de hipersensibilidad, que típicamente aparece después de la formación de haustorios (Niks y Lindhout, 2004). Futuros estudios a nivel histológico con inoculación de plantas enteras, permitirían el análisis de un período más largo del proceso de infección sin que se deterioren las hojas a estudiar.

Allium fistulosum alcanzó los menores valores, con un máximo acumulado de 2-3% de esporas activas (G+P). La variedad “Regia” también tuvo un resultado que se corresponde con su buen comportamiento a campo, alcanzando un máximo de 6% de zoosporangios activos (G+P). El cultivar “Regia” fue significativamente menor que las otras accesiones de cebolla en cuanto al conteo de zoosporangios penetrados (P) y al total de zoosporangios activos (G+P) (Cuadro 12). En síntesis, los resultados de este ensayo indicarían que diferencias en el proceso de infección pueden ser uno de los componentes de la resistencia parcial en *Allium fistulosum*, y en la variedad “Regia”, en tanto que no sería el caso para “INIA Valenciana” ni “Naqué”, que en el proceso de infección no se distinguieron del cultivar susceptible “Pantanoso del Sauce CRS”.

5. CONCLUSIONES

En la investigación de la resistencia a *Peronospora destructor* de la cebolla, la elección de la metodología de inoculación dependerá de los objetivos. Las metodologías permiten optar entre la precisión del control y uniformidad (asperjado) y la cantidad y calidad de sintomatología que se desarrolla en cada evento de inoculación (inoculación en seco). Se necesita encontrar una técnica de inoculación que permita conjugar un buen nivel de enfermedad y desarrollo de sintomatología como en el campo, y además un nivel de precisión entre los eventos de inoculación que permita comparaciones estadísticas.

Al momento de realizar ensayos en trozos de hojas hay que estudiar previamente la capacidad de las hojas de conservarse una vez separadas de la planta. Una vez que se tiene esta información hay que acompañarla con el ciclo de la enfermedad.

En el ensayo de evaluación a campo se destacó el comportamiento de la accesión Regia, la cual presentó el mejor comportamiento frente a la enfermedad, en cuanto al peso promedio del bulbo y en cuanto a la severidad. Este menor nivel de severidad se correspondió con los resultados de las evaluaciones al microscopio del proceso de infección. Regia presentó el menor conteo de zoosporangios penetrados y de zoosporangios activos.

El peso promedio del bulbo se correlaciona con la severidad en forma significativa y negativa para las accesiones de día corto y de día largo, para las cuales una mayor severidad de la enfermedad representa un menor peso promedio del bulbo. Sin embargo para las accesiones de día intermedio esta correlación no es tan clara ya que algunas accesiones presentaron buen peso de bulbo a pesar de una alta severidad.

Todas las tinciones que se utilizaron permiten diferenciar las estructuras del patógeno y de la planta. Sin embargo cada una de ellas difiere en las estructuras que resaltan. La tinción con Acridina naranja y Calcofluor es la que se destacó para realizar las observaciones del proceso de infección, ya que se logran distinguir muy claramente las estructuras del patógeno como de la planta.

Para lograr estas tinciones es necesario tomar muestras destructivas ya que se deben decolorar previo a las tinciones. Sería conveniente, para profundizar en el conocimiento del proceso de infección, encontrar una metodología que permita continuar la observación sobre el mismo punto de infección.

Se observaron dos estrategias de infección del patógeno. Por un lado zoosporangios que se abren para liberar zoosporas y por otro, zoosporangios que germinan directamente, desarrollan una hifa, un apresorio y penetran por aberturas estomáticas. El patógeno coloniza la cámara subestomática y desde ahí continúa infectando los espacios intercelulares. La esporulación ocurre siempre por los estomas, con estructuras arborescentes (zoosporangioforos con zoosporangios).

El crecimiento de las hifas a nivel subestomático y dentro del parénquima foliar, se da predominantemente de forma paralela a las nervaduras, hasta alcanzar otras cavidades subestomáticas. Las zonas infectadas posteriormente se ramifican de forma perpendicular, para continuar el crecimiento de la nueva zona colonizada en sentido paralelo a las nervaduras.

A las 24 horas desde la inoculación, ya se encuentran zoosporangios germinados, aunque no penetrando. Esta información es pertinente a la hora de pensar las estrategias de control de la enfermedad, en un sistema de pronóstico de eventos de infección. Esta puede ser una de las razones por las que las medidas de control químico no son lo suficientemente efectivas.

La resistencia parcial observada a campo para la accesión Regia puede deberse a que el patógeno no logra desarrollar de forma exitosa infecciones subestomáticas. Además, Regia presentó menor cantidad de zoosporangios penetrados y activos, por lo que se puede concluir que esta dificultad que presenta la accesión para desarrollar el proceso de infección puede ser uno de los componentes de la resistencia parcial en Regia.

6. RESUMEN

Peronospora destructor es el organismo causal de la principal enfermedad foliar de la cebolla (*Allium cepa* L.). Los cultivares desarrolladas a nivel nacional son susceptibles frente a esta enfermedad. Existe germoplasma que presenta resistencia parcial, como Regia, pero no se conocen los mecanismos que la explican. Esta tesis tuvo por objetivos ajustar la metodología de inoculación en condiciones controladas para el patosistema *Allium cepa* - *Peronospora destructor*, evaluar la influencia del inicio de la bulbificación en la respuesta de accesiones a esta enfermedad, y analizar las diferencias entre accesiones susceptibles y resistentes en el proceso de infección a nivel histológico. Se llevaron adelante varios ensayos. En primer lugar, se realizó un ajuste de las técnicas de inoculación artificial, comparando cuatro metodologías de aplicación del inóculo. Además se realizó un ensayo de inoculación en trozos de hojas separadas de la planta para cuatro accesiones con inoculación con suspensión de esporas. Otro trabajo realizado fue la evaluación de 15 accesiones de cebolla en solarío con dos fotoperíodos (10 y 14 horas) a fin de evaluar la interacción entre el inicio de la bulbificación y la resistencia a *P. destructor*. Además, se realizó un ensayo de sensibilidad a campo para evaluar la respuesta de 15 accesiones de cebolla, para las cuales se midió la severidad y el peso promedio del bulbo. El último capítulo de la tesis evaluó relaciones planta-patógeno histológicas, evaluando manchas colectadas a campo y el proceso de infección en condiciones controladas. Se encontró que la elección de la técnica de inoculación depende de los objetivos. La inoculación con una suspensión de esporas brinda mayor precisión, mientras que la inoculación en seco resultó el método más exitoso. Cuando se realizan ensayos con trozos de hojas hay que tener en cuenta el tiempo que lleva el proceso de infección, y el tiempo que las hojas permanecen turgentes y verdes luego de retiradas de la planta. En el ensayo de evaluación de las accesiones en dos fotoperíodos en condiciones controladas las plantas se etiolaron, por lo que al momento de las inoculaciones no se encontraban en las condiciones óptimas. Se encontró una tendencia a que las accesiones que estaban expuestas a fotoperíodo corto y por tanto no tenían desencadenado el proceso de bulbificación, se comportaron mejor frente a la enfermedad. En el ensayo a campo, la accesión Regia se destacó en cuanto a la baja severidad y el alto peso promedio del bulbo. La

correlación entre estas dos variables fue alta y negativa para las accesiones de día corto y de día largo, y menor para las accesiones de día intermedio. A nivel histológico, se logró observar la estrategia de infección donde los zoosporangios germinan dando una hifa que desarrolla un apresorio y penetra a través de los estomas colonizando la cámara subestomática. En el estudio de manchas esporulando a campo, Regia tuvo una proporción de estomas sanos significativamente mayor que en Pantanoso (44 vs 19%), y menor colonización del patógeno (16 vs 40%) en las cavidades subestomáticas y el parénquima. En segundo lugar, se estudiaron los primeros estadios del proceso de infección en trozos de hojas en el laboratorio. Se observó a las 24 horas post inoculación (hpi) zoosporangios germinados para todas las accesiones, lo cual tiene implicancias en las medidas de control de la enfermedad. A las 48 hpi, 8-10% de los zoosporangios germinados alcanzaron e infectaron las cavidades subestomáticas en Pantanoso y otras variedades susceptibles, y no en Regia y *A. fistulosum*, para las cuales solo se encontraron estomas colonizados a las 72 hpi en proporciones de 6 y 2% respectivamente. Diferencias en el proceso de infección y en la tasa de colonización del parénquima foliar serían componentes de la resistencia parcial en Regia.

Palabras clave: *Allium cepa*; Cebolla; Mildiú; *Peronospora destructor*; Proceso de infección; Resistencia a enfermedades.

7. SUMMARY

Peronospora destructor is the causal organism of the main onion (*Allium cepa* L.) leaf disease. Onion cultivars developed in Uruguay are susceptible to this disease. There is germoplasm with *Peronospora* partial resistance, like "Regia", but resistance mechanisms are unknown yet. The objectives of this thesis were: to set inoculation methodology under controlled conditions for the *Allium cepa-Peronospora destructor* pathosystem; to evaluate the influence of the onset of bulbing in the response of different accessions of onion to *P. destructor*, and to analyse differences between susceptible and resistant accessions in the disease processes at the histology level. Several experiments were done. First, the adjustment of artificial inoculation techniques was done, comparing four inoculation techniques. Furthermore, an inoculation assay was performed with detached pieces of leaves for four accessions, with a suspension of spores. Other performed trial was the evaluation of 15 onion accessions at the solarium with two daylengths (10 and 14 h a day) in order to study the interaction between the onset of bulbing and resistance to *P. destructor*. In addition, a field sensitivity test was done with the purpose of evaluating the reaction to *P. destructor* of 15 accessions, for which the severity and the bulb average weight were measured. The last chapter of the thesis evaluated plant pathogen histologic relationships, evaluating field collected spots and the infection process under controlled conditions. It was found that the objectives of the test determine which inoculation technique is the most suited. The inoculation with a spore suspension yielded more accuracy, whereas the inoculation with the dry technique is more successful. There are two interactive elements that determine the success or failure of detached leaf tests: the timespan of the infection process, and the leaf lifetime in which stay green and turgent. In the trial with two photoperiods, the plants were etiolated, so at inoculation time were not optimal. Plants which were exposed to a short photoperiod, so they were not bulbing, tend to have a better behavior than the plants in the long daylength. In the field test, Regia accession was outstanding due to its low severity and its high bulb average weight. The correlation between these two variables was high and negative for short day accessions and long day accessions, but not for medium day accessions. In the histological studies, an infection strategy where

zoosporangia germinate was observed, giving origin to a hypha that develops an appressorium, penetrates through stomata, colonize the substomatal chamber. In the study of field sporulating spots, Regia had a significantly higher proportion of healthy stomata than Pantanoso (44 vs 19%), and less colonization of the pathogen (16 vs 40%) in the substomatal cavities and parenchyma. Second, the early stages of the infection process were studied in the laboratory, using detached leaf pieces. It was observed germinated zoosporangia for all accessions at 24 hours post inoculation (hpi). This observation has implications for control measures of the disease. At 48 hpi, 8-10% of the germinated zoosporangia reached and infected the substomatal cavities in Pantanoso and other susceptible varieties, except for Regia and *A. fistulosum* accessions, for which only colonized stomata were found at 72 hpi in the proportions of 6 and 2% respectively. Differences in the infection process and the rate of colonization of leaf parenchyma would be components of partial resistance in Regia.

Keywords: *Allium cepa*; Onion; Mildew; *Peronospora destructor*; Infection process; Disease resistance.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. AGRIOS, G. N. 2005. Plant pathology. San Diego, Elsevier. 921 p.
2. BASHI, E.; AYLOR, D. E. 1983. Survival of detached sporangia of *Peronospora destructor* and *Peronospora tabacina*. Phytopathology. 72: 1135 – 1139.
3. BOSO, S.; KASSEMAYER, H. H. 2008. Different susceptibility of European grapevine cultivars for downy mildew. Vitis. 47: 39 – 49.
4. BOUWMEESTER, K.; VAN POPPEL, M. J. A. P.; GOVERS, F. 2009. Genome biology cracks enigmas of oomycete plant pathogens. Annual Plant Reviews. 34: 102 - 133.
5. BREWSTER, J. L. 1994. Onions and other vegetable *Alliums*. Wallingford, CAB International. 236 p.
6. BRICKELL, C. D.; ALEXANDER, C.; DAVID, J. C.; HETTERSCHEID, W. L. A.; LESLIE, A. C.; MALECOT, V.; XIAOBAI, J.; CUBEY, J. J. 2009. International code of nomenclator for cultivated plants. 8th. ed. Leuven, International Society for Horticultural Sciences. 206 p. (Serie Scripta Horticulturae no. 10).
7. COLNAGO, P. 2010. Evaluación de la respuesta a *Peronospora destructor* (Berk.) Casp. en el germoplasma local de cebolla. Tesis Maestría en Ciencias Agrarias. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 82 p.
8. _____, GONZÁLEZ, P. H., NOGUEZ, M., BENTANCUR, O., GALVÁN. G. A. 2012. Evaluación de la respuesta a *Peronospora destructor* (Berk.) Casp. en el germoplasma local de cebolla. Agrociencia. 16(1): 33 - 44.
9. CORTIZAS, J. M.; NOGUEZ, M. A. 2010. Evaluación de la resistencia a *Peronospora destructor* en el germoplasma local de cebolla. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 67 p.

10. DEVELEY-RIVIERE, M. P., GALIANA, E. 2007. Resistance to pathogens and host developmental stage; a multifaceted relationship within the plant kingdom. *New Phytologist*. 175: 405 - 416.
11. DOGLIOTTI, S; GALVÁN, G.; COLNAGO, P. 2011. Bases fisiológicas del crecimiento y desarrollo del cultivo de cebolla (*Allium cepa* L.). Montevideo, Facultad de Agronomía. 34 p.
12. FLOR, H. H. 1956. The complementary genetic systems in flax and flax rust. *Advances in Genetics*. 8: 29 - 54.
13. GALVÁN, G. 2010. Screening onions and related species for resistance to anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz). In: Miranda, M.; Lebeda, A. eds. Mass screening techniques for selecting crops resistant to disease. Vienna, Joint FAO-IAEA Division. pp. 309-319.
14. _____. 2011. Mejoramiento genético por resistencia a enfermedades en Cebolla. Informe final del Proyecto INIA-FPTA 250. Montevideo, Uruguay, s.e. 100 p.
15. GINDRO, K.; PEZET, R.; VIRET, O. 2003. Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections. *Plant Physiology and Biochemistry*. 41: 846 – 853.
16. GONZÁLEZ, P. H.; COLNAGO, P.; PELUFFO, S.; GONZÁLEZ IDIARTE, H.; ZIPITRIA, J.; GALVÁN, G. A. 2011. Quantitative studies on downy mildew (*Peronospora destructor* Berk. Cusp.) affecting onion seed production in southern Uruguay. *European Journal of Plant Pathology*. 129(2): 303 - 314.
17. HAJJAR, R; HODGKIN, T. 2007. The use of wild relatives in crop improvement; a survey of developments over the last 20 years. *Euphytica*. 156: 1 - 13.
18. HILDEBRAND, P. D.; SUTTON, J. C. 1982. Effects of weather variables on spore survival and infection of onion leaves by *Peronospora destructor*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 6: 119 – 126.

19. _____; _____. 1984. Weather variables in relation to an epidemic of onion Downy Mildew. *Phytopathology*. 72 (2): 219 – 224.
20. KAMOUN, S.; HUITEMA, E.; VLEESHOUWERS, V. G. A. A. 1999. Resistance to oomycetes; a general role for the hypersensitive response? *Trends in Plant Sciences*. 4: 196–200.
21. KIEFER, B.; RIEMANN, M.; BÜCHE, C.; KASSEMAYER, H. H.; NICK, P. 2002. The host guides morphogenesis and stomatal targeting in the grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. *Planta*. 215: 387-393.
22. KOFOET, A.; ZINKERNAGELI, V. 1989. Resistance to downy mildew (*Peronospora destructor* (Berk.) Casp.) in *Allium* species. *Journal of Plant Disease and Protection*. 97(1): 13 -23.
23. _____; KIK, C.; WIETSMA, W. A.; DE VRIES, J. N. 1990. Inheritance of resistance to downy mildew (*Peronospora destructor* (Berk.) Casp.) from *Allium roylei* Stearn in the backcross *Allium cepa* L. x (*A. roylei* x *A. cepa*). *Plant Breeding*. 105:144 – 149.
24. KORTEKAMP, A. 2005. Growth, occurrence and development of septa in *Plasmopara viticola* and other members of the *Peronosporaceae* using light- and epifluorescence-microscopy. *Mycological Research*. 109: 640 – 648.
25. LEACH, C. M.; HILDERBRAND, P. D.; SUTTON, J. C. 1982. Sporangium discharge by *Peronospora destructor*: influence of humidity, red-infrared radiation and vibration. *Phytopathology*. 72: 1056 –1056.
26. LI, H.; GE, X.; HAN, S.; SIVASITHAMPARAM, K.; BARBETTI, M. J. 2011. Histological responses of host and non-host plants to *Hyaloperonospora parasitica*. *European Journal of Plant Pathology*. 129: 221 – 232.
27. LOUETTE, D.; CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. 1997. *In situ* conservation of maize in Mexico; genetic diversity and maize seed management in a traditional community. *Economical Botany*. 51: 20 – 38.

28. MAESO, D. 2005. Enfermedades del cultivo de cebolla. In: Arboleya, J. ed. Tecnología para la producción de cebolla. Montevideo, INIA. pp. 151–188 (Boletín de Divulgación no. 88).
29. NIKS, R. E.; LINDHOUT, W. H. 2004. Curso sobre mejoramiento para resistencia a enfermedades y plagas. Wageningen, Wageningen University. 216 p.
30. _____; PARLEVLIT, J. E.; LINDHOUT, P.; BAI, Y. 2011. Breeding crops with resistance to diseases and pests. Wageningen, Wageningen Academic Publishers. 197 p.
31. RACHETTI, M. 2006. Colecta, caracterización y evaluación agronómica de poblaciones locales de zanahoria (*Daucus carota* L.) cultivadas en el sur de Uruguay. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 82 p.
32. RODRÍGUEZ, S.; SILVA, P.; BENTANCOR, O.; GAMBA, F.; PRITSCH, C. 2014. Histochemical characterization of early response to *Cochliobolus sativus* infection in selected barley genotypes. (en línea). *Phytopathology*. 104(7): 715-723. Consultado feb. 2014. Disponible en <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PHYTO-05-13-0133-R>.
33. SCHOLTEN, O. E.; VAN HEUSDEN, A. W.; KHRUSTALEVA, L. I.; BURGER-MEIJER, K.; MANK, R. A.; ANTONISE, R. G. C.; HARREWIJN, J. L.; VAN HAECKE, W.; OOST, E. H.; PETERS, R. J.; KIK, C. 2007. The long and winding road leading to the successful introgression of downy mildew resistance into onion. *Euphytica*. 156: 345 - 353.
34. SCHWART, H. F.; MOHAN, S. K. 2008. Compendium of onion and garlic diseases. St. Paul, MN, APS. 54 p.
35. TESHOME, A.; BAUM, B. R.; FAHRIG, L.; TORRANCE, J. K.; ARNASON, T. J.; LAMBERT, J. D. 1997. Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) landrace variation and classification in North Shewa and South Welo, Ethiopia. *Euphytica*. 97: 255 – 263.

36. URUGUAY. MINISTERIO DE GANADERÍA, AGRICULTURA Y PESCA. DIRECCION DE INVESTIGACIONES Y ESTADÍSTICAS AGROPECUARIAS. 2009. Encuestas hortícolas 2008; zonas Sur y litoral Norte. Montevideo. 27 p. (Serie Encuestas no. 277).
37. _____. _____. _____. 2014. Montevideo. 23 p. (Serie Encuestas no. 318).
38. _____. _____. DIRECCIÓN GENERAL DE LA GRANJA. 2013. Cebolla; panorama global y proyección del rubro. (en línea). Montevideo. 5 p. Consultado feb. 2014. Disponible en http://www.mercadomodelo.net/c/document_library/get_file?uuid=e88b7e48-d6f7-412a-96c8-a579fd082961&groupId=111098.
39. VAN DER DOORN, A. M. 1959. Investigations on the occurrence and the control of downy mildew (*Peronospora destructor*) in onions. European Journal of Plant Pathology. 65: 193 – 255.
40. ZEVEN, A. C. 1995. Landraces; a review of definitions and classifications. Euphytica. 104: 127 – 139.

9. APÉNDICES

1. Análisis de Kruskal-Wallis para la observación cuantitativa al microscopio de manchas esporulando colectadas a campo

Cultivar	H	E	I	I+E
P	16	38	18	28
P	19	40	20	21
P	20	42	18	20
P	20	41	13	23
R	43	25	4	28
R	53	13	6	28
R	37	12	15	36
R	42	16	7	35
PxR	33	23	21	23
PxR	32	35	20	13
PxR	27	42	14	17
PxR	33	33	18	16

Pantanosos	Regia	RxP	Pantanosos	Regia	RxP
16	43	33	1	9	6,5
19	53	32	2	10	5
20	37	27	3,5	7	4
20	42	33	3,5	8	6,5
			10	34	22

H 0,0769230769

25 289 121 435

H= 33,2307692308

Pantanosos	Regia	RxP	Pantanosos	Regia	RxP
38	25	23	8	5	4
40	13	35	9	2	7
42	12	42	11,5	1	11,5
41	16	33	10	3	6
			38,5	11	28,5

$$H = \frac{370,5625 \cdot 30,25 + 203,0625 \cdot 603,875}{46,2211538462}$$

Pantanosos	Regia	RxP	Pantanosos	Regia	RxP
18	4	21	7,5	1	9
20	6	20	8,5	2	8,5
18	15	14	7,5	6	5
13	7	18	4	3	7,5
			27,5	12	30

$$H = \frac{189,0625 \cdot 36 + 225 \cdot 450,0625}{34,3894230769}$$

Pantanosos	Regia	RxP	Pantanosos	Regia	RxP
28	28	23	7,5	7,5	6,5
21	28	13	5	7,5	1
20	36	17	4	9	3
23	35	16	6,5	8	2
			23	32	12,5

$$H = \frac{132,25 \cdot 256 + 39,0625 \cdot 427,3125}{32,6394230769}$$

	H	E	I	I+E
Estadístico H	33,23	46,22	34,37	32,64
H crítico	5,6923	5,6923	5,6923	5,6923
	Rechazo Ho	Rechazo Ho	Rechazo Ho	Rechazo Ho
p valor=0,049				

2. Análisis de máxima verosimilitud (REML) para la observación cuantitativa al microscopio de manchas esporulando colectadas a campo

***** REML Variance Components Analysis *****

Response Variate : CONTEO

Fixed model : Constant+CV+TIPO+CV.TIPO
No random model specified

Number of units : 48

* Residual term has been added to model

* Sparse algorithm with AI optimisation

*** Residual variance model ***

Term	Model(order)	Parameter	Estimate	S.e.
Residual	Identity	Sigma2	20.08	4.73

*** Wald tests for fixed effects ***

* Sequentially adding terms to fixed model

Fixed term	Wald statistic	d.f.	Wald/d.f.	Chi-sq prob
CV	0.00	2	0.00	1.000
TIPO	101.65	3	33.88	<0.001
CV.TIPO	156.42	6	26.07	<0.001

*** Table of predicted means for Constant ***

25.00 Standard error: 0.647

*** Table of predicted means for CV ***

Pantanoso	25.00
Regia	25.00
RegiaxPantanoso	25.00

Standard error of differences: 1.584

** Table of predicted means for TIPO ***

C/M-C/E	C/M-S/E	S/M-C/M	S/M-S/E
14.75	30.00	24.00	31.25

Standard error of differences: 1.830

*** Table of predicted means for CV.TIPO ***

CV/TIPO	C/M-C/E	C/M-S/E	S/M-C/M	S/M-S/E
Pantanoso	18.00 cd	40.25 a	23.00 c	18.75 cd
Regia	8.00 e	16.50 d	31.75 b	43.75 a
RegiaxPantanoso	18.25 cd	33.25 b	17.25 cd	31.25 b

Standard error of differences: 3.169

Mínima diferencia significativa: 6.21

3. Análisis de máxima verosimilitud (REML) para la observación cuantitativa al microscopio del proceso de infección

***** REML Variance Components Analysis *****

Response Variate : GERM (zoosporangios germinados)

Fixed model : Constant+CV+DAYS+CV.DAYS

No random model specified

Number of units: 105 (15 units excluded due to zero weights or missing values)

* Residual term has been added to model

* Sparse algorithm with AI optimisation

* All covariates centred

*** Residual variance model ***

Term	Model(order)	Parameter	Estimate	S.e.
Residual	Identity	Sigma2	0.000880	0.0001291

*** Wald tests for fixed effects ***

Fixed term	Wald statistic	d.f.	Wald/d.f.	Chi-sq prob
CV	12.94	5	2.59	0.024 *
DAYS	1.66	1	1.66	0.198
CV.DAYS	4.16	5	0.83	0.527

*** Table of predicted means for Constant ***

0.02364 Standard error: 0.002973

*** Table of predicted means for CV ***

A. fistulosum	0.00901	c
INIA val	0.02568	abc
naqué	0.02537	abc
Pantanoso	0.02928	ab
Regia	0.01289	bc
RxP	0.03958	a

Standard error of differences: Average 0.01029 MDS = 0.0201684

Maximum 0.01110

Minimum 0.009837

***** REML Variance Components Analysis *****

Response Variate : GERM (Analysis excluding the last evaluation, 168 hpi)

Fixed model : Constant+CV+DAYS+CV.DAYS

No random model specified

Number of units: 96

- * Residual term has been added to model
- * Sparse algorithm with AI optimisation
- * All covariates centred
- * Analysis is subject to the restriction on GERM

*** Residual variance model ***

Term	Model(order)	Parameter	Estimate	S.e.
Residual	Identity	Sigma2	0.000959	0.0001480

*** Wald tests for fixed effects ***

Fixed term	Wald statistic	d.f.	Wald/d.f	Chi-sq prob
CV	12.98	5	2.60	0.024 *
DAYS	0.78	1	0.78	0.377
CV.DAYS	3.17	5	0.63	0.674

*** Table of predicted means for Constant ***

0.02500 Standard error: 0.003161

*** Table of predicted means for CV ***

A. fistulosum	0.00875	b
INIA val	0.02625	ab
naqué	0.03000	ab
Pantanoso	0.03000	ab
Regia	0.01250	b
RxP	0.04250	a

Standard error of differences: 0.01095

Minimum statistical difference: 0.021462

***** REML Variance Components Analysis *****

Response Variate : GER_PEN (zoosporangios germinados y penetrados)
all available data including the last evaluation

Fixed model : Constant+CV+DAYS+CV.DAYS
No random model specified

Number of units: 105 (15 units excluded due to zero weights or missing values)

* Residual term has been added to model

* Sparse algorithm with AI optimisation

* All covariates centred

*** Residual variance model ***

Term	Model (order)	Parameter	Estimate	S.e.
Residual	Identity	Sigma2	0.00137	0.000201

*** Wald tests for fixed effects ***

Fixed term	Wald statistic	d.f.	Wald/d.f.	Chi-sq prob
CV	18.05	5	3.61	0.003 **
DAYS	29.12	1	29.12	<0.001 **
CV.DAYS	6.96	5	1.39	0.224

*** Table of predicted means for Constant ***

0.03888 Standard error: 0.003709

*** Table of predicted means for CV ***

A. fistulosum	0.01284	c
INIA val	0.05766	a
naqué	0.05080	ab
Pantanoso	0.04661	ab
Regia	0.03233	bc
RxP	0.03302	abc

Standard error of differences: Average 0.01284 MDS = 0.0251664
Maximum 0.01385
Minimum 0.01227

***** REML Variance Components Analysis *****

Response Variate : GER_PEN (zoosporangios germinados y penetrados)
 Analysis excluding the last evaluation, 168 hpi)

Fixed model : Constant+CV+DAYS+CV.DAYS

No random model specified

Number of units: 120

*** Residual variance model ***

Term	Model(order)	Parameter	Estimate	S.e.
Residual	Identity	Sigma2	0.00137	0.000201

*** Wald tests for fixed effects ***

Fixed term	Wald statistic	d.f.	Wald/d.f.	Chi-sq prob
CV	18.05	5	3.61	0.003 **
DAYS	29.12	1	29.12	<0.001 **
CV.DAYS	6.96	5	1.39	0.224

*** Table of predicted means for Constant ***

0.04630 Standard error: 0.004067

*** Table of predicted means for CV ***

A. fistulosum	0.01505	b
INIA val	0.06317	a
naqué	0.06520	a
Pantanososo	0.05281	a
Regia	0.04210	ab
RxP	0.03944	ab

Standard error of differences: Average 0.01402 MDS = 0.0274792

Maximum 0.01680

Minimum 0.01236

***** REML Variance Components Analysis *****

Response Variate : TOTAL zoosporangios "activos" (GERM + GERM+PEN)

Fixed model : Constant+CV+DAYS+CV.DAYS

No random model specified

Number of units: 105 (15 units excluded due to zero weights or missing values)

* Residual term has been added to model

* Sparse algorithm with AI optimisation

* All covariates centred

*** Residual variance model ***

Term	Model(order)	Parameter	Estimate	S.e.
Residual	Identity	Sigma2	0.00219	0.000321

*** Wald tests for fixed effects ***

Fixed term	Wald statistic	d.f.	Wald/d.f.	Chi-sq prob
CV	25.86	5	5.17	<0.001 **
DAYS	11.93	1	11.93	<0.001 **
CV.DAYS	2.96	5	0.59	0.706

*** Table of predicted means for Constant ***

0.06251 Standard error: 0.004688

*** Table of predicted means for CV ***

A. fistulosum	0.02185	c
INIA val	0.08334	a
Naqué	0.07617	a
Pantanoso	0.07589	a
Regia	0.04521	bc
RxP	0.07260	ab

Standard error of differences: Average 0.01623 MDS = 0.0318108

Maximum 0.01750

Minimum 0.01551

Average variance of differences: 0.0002638

***** REML Variance Components Analysis *****

Response Variate : TOTAL Analysis excluding the last evaluation, 168 hpi

Fixed model : Constant+CV+DAYS+CV.DAYS

No random model specified

Number of units : 96

* Residual term has been added to model

* Sparse algorithm with AI optimisation

*** Residual variance model ***

Term	Model(order)	Parameter	Estimate	S.e.
Residual	Identity	Sigma2	0.00190	0.000316

*** Wald tests for fixed effects ***

Fixed term	Wald statistic	d.f.	Wald/d.f.	Chi-sq prob
CV	25.95	5	5.19	<0.001 **
DAYS	26.11	3	8.70	<0.001 **
CV.DAYS	14.35	15	0.96	0.499 NS

*** Table of predicted means for Constant ***

0.05979 Standard error: 0.004447

*** Table of predicted means for CV ***

A. fistulosum	0.02125	b
INIA val	0.08625	a
Naqué	0.07000	a
Pantanoso	0.07250	a
Regia	0.03750	b
RxP	0.07125	a

Standard error of differences: 0.01541 MDS = 0.0302036

*** Table of predicted means for DAYS ***

1	2	3	4
0.02083 b	0.06750 a	0.07500 a	0.07583 a

Standard error of differences: 0.01258 MDS = 0.0246568

*** Table of predicted means for CV.DAYS ***

CV/DAYS	1	2	3	4
A. fistulosum	0.01000	0.02000	0.03000	0.02500
INIA val	0.03500	0.07500	0.09500	0.14000
naqué	0.04000	0.06500	0.09000	0.08500
Pantanoso	0.01500	0.10500	0.09000	0.08000
Regia	0.00500	0.02500	0.06000	0.06000
RxP	0.02000	0.11500	0.08500	0.06500

Standard error of differences: 0.03081