

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**RELACIONES HISTOPATOLÓGICAS Y BASES GENÉTICAS  
DE LA RESISTENCIA A *Peronospora destructor* EN CEBOLLA**

**por**

**Mariana ARIAS PANDOLFO**

TESIS presentada como uno de los  
requisitos para obtener el título de  
Magíster en Ciencias Agrarias  
opción vegetal

MONTEVIDEO

URUGUAY

2019

Tesis aprobada por el tribunal integrado por la Lic. Dra. María Inés Ponce de León, Ing. Agr. Dr. Esteban Vicente e Ing. Agr. Dra. Sandra Alaniz, el 19 de diciembre de 2019.

Autora: Ing. Agr. Mariana Arias Pandolfo.

Director: Ing. Agr. Dr. Guillermo A. Galván, Codirector: Ing. Agr. Dr. Gustavo Giménez.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis hijas Elena e Inés y a mi compañero Manuel por acompañarme con mucha paciencia y empatía en este proceso. Agradezco a toda mi familia que me ha apoyado y brindado tiempo que me ayudó a escribir.

Muchas gracias a mis compañeros de trabajo del Centro Regional Sur que me han brindado su apoyo y ayuda para realizar este trabajo, especialmente a Oscar “Quito” Costa y a Natalia Curbelo, compañera de largas horas de evaluaciones, trillas y plantaciones.

Agradezco profundamente a Eilyn Mena por su tiempo, apoyo y acompañamiento en el preparado y análisis de las muestras para las observaciones al microscopio. También a Inés Ponce de León por su seguimiento y guía en este proceso. Gracias por su tiempo y dedicación.

Finalmente, agradezco a mi tutor Guillermo Galván que me ha acompañado y guiado en todo el proceso.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN .....	II
AGRADECIMIENTOS .....	III
RESUMEN .....	VI
SUMMARY .....	VII
1. <b><u>INTRODUCCIÓN</u></b> .....	1
1.1. ANTECEDENTES .....	1
1.1.1. <b><u>Cultivares de cebolla en Uruguay y mejoramiento por resistencia</u></b> .....	1
1.1.2. <b><u>Patrones cuantitativos histopatológicos</u></b> .....	3
1.2. EL PATOSISTEMA <i>Allium cepa</i> – <i>Peronospora destructor</i> .....	4
1.3. LA RESISTENCIA DE LAS PLANTAS A LOS PATÓGENOS .....	8
1.4. RELACIONES HISTOPATOLÓGICAS .....	14
1.5. OBJETIVOS .....	15
2. <b><u>EVALUACIÓN DE LA SEGREGACIÓN DE LA RESISTENCIA A <i>Peronospora destructor</i> EN CEBOLLA</u></b> .....	16
2.1. RESUMEN .....	16
2.2. SUMMARY .....	17
2.3. INTRODUCCIÓN.....	17
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
2.4.1. <b><u>Segregación de la resistencia proveniente de Regia</u></b> .....	19
2.4.2. <b><u>Evaluación de líneas avanzadas PxR F1S2 y poblaciones regeneradas</u></b> .....	21
2.5. RESULTADOS .....	24
2.5.1. <b><u>Evaluación de la resistencia en familias segregantes</u></b> .....	24
2.5.2. <b><u>Evaluación de líneas avanzadas PXR F1S2 y poblaciones regeneradas</u></b> .....	29
2.5.3. <b><u>Observaciones histológicas del tejido infectado</u></b> .....	34
2.6. DISCUSIÓN.....	43
2.7. AGRADECIMIENTOS .....	48

2.8. BIBLIOGRAFÍA .....	48
3. <u>RELACIONES HISTOPATOLÓGICAS ENTRE CEBOLLA (<i>Allium cepa</i></u> <u>L.) Y <i>Peronospora destructor</i> Berk. Casp.</u> .....	51
3.1. RESUMEN .....	51
3.2. SUMMARY .....	52
3.3. INTRODUCCIÓN.....	52
3.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
3.5. RESULTADOS .....	55
3.6. DISCUSIÓN.....	58
3.7. AGRADECIMIENTOS .....	60
3.8. BIBLIOGRAFÍA .....	61
3. <u>DISCUSIÓN GENERAL</u> .....	63
4. <u>CONCLUSIONES</u> .....	67
5. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	68
6. <u>ANEXOS</u> .....	73

## RESUMEN

El mildiú causado por *Peronospora destructor* (Pd) es una enfermedad foliar muy destructiva y de difícil control del cultivo de cebolla (*Allium cepa* L.). La resistencia genética es una forma de control económica y ambientalmente amigable. El análisis de las relaciones histopatológicas podría contribuir a determinar los mecanismos de defensa y su asociación con la durabilidad de la resistencia. En este trabajo se analizó la segregación de la resistencia en seis progenies de cruzamientos entre cultivares nacionales con la variedad “Regia”, las respuestas de líneas avanzadas y las relaciones histopatológicas en variedades susceptibles y resistentes. Plantas F1 de seis cruzamientos se autofecundaron, y se evaluó la respuesta de las progenies F1S1. En cinco progenies, las segregaciones de la severidad de Pd mostraron segregación transgresiva hacia la susceptibilidad, salvo en el cruzamiento “INIA Fagro Dulce” x “Regia”, el único en el que “Regia” fue dador de polen. La herencia recesiva de la resistencia podría estar asociada a mecanismos de pérdida de susceptibilidad. En otro ensayo se evaluó el comportamiento de once líneas avanzadas “Regia” x “Pantanos del Sauce” F1S2 y poblaciones regeneradas a partir del intercruzamiento de esas líneas. La severidad se evaluó en dos momentos y se relacionó con diferencias cuantitativas histológicas. Las líneas F1S2, que ya habían tenido un proceso de selección, tuvieron un comportamiento intermedio entre los padres tanto en la severidad a campo como a nivel histológico, con diferencias significativas entre las líneas. La severidad a campo se correlacionó negativamente con la proporción de estomas sanos, con diferencias significativas entre líneas para la proporción de estomas sanos, esporulados y con infección subestomática. La variedad “Regia” presentó la menor severidad a campo y mayor porcentaje de estomas sanos. Una selección de las líneas avanzadas podría generar un cultivar con resistencia a Pd, en comparación con los cultivares actualmente utilizados. Por último, se compararon las respuestas de defensa histológicas de “Pantanos del Sauce”, “Regia” y una línea “Regia x Pantanos”. Se observaron hifas del patógeno entre las células del parénquima en empalizada pero nunca en el parénquima esponjoso. La acumulación de compuestos fenólicos no se observó necesariamente asociada a las infecciones. No se observaron deposiciones de calosa.

**Palabras clave:** Oomycete, resistencia parcial, segregación de la resistencia.

**Histopathological relationships and genetic basis of resistance against  
*Peronospora destructor* in onion**

**SUMMARY**

The mildew caused by *Peronospora destructor* (Pd) is a very destructive and hard to control leaf disease of onion (*Allium cepa* L.). Genetic resistance is an economic and environmentally friendly way of disease control. The analysis of histopathological relations could contribute to determine defence mechanisms and their association with durability of resistance. In this research, the segregation of Pd resistance was analysed in six offspring between local cultivars and 'Regia' variety, as well as the response of six advanced lines and histopathological relations in susceptible and resistant varieties. F1 plants from six crosses were selfed and F1S1 were evaluated. In five progenies, segregations in Pd severity were skewed towards the susceptible parent with transgressive segregation towards susceptibility, except in the cross 'INIA Fagro Dulce' x 'Regia', the only cross with 'Regia' as pollen donor. The recessive inheritance of Pd resistance could be associated with loss of susceptibility mechanisms. In another experiment, the response of eleven F1S2 lines 'Regia' x 'Pantanos del Sauce' were evaluated, as well as populations regenerated from intercrossing these lines. Pd severity was scored two times and related with histological quantitative differences. F1S2 lines, which have had an earlier selection process, showed an intermediate behaviour between the parents, both in Pd severity and histological variables, with significant differences among lines. Severity was negatively correlated with the proportion of healthy stomata, with significant differences among lines in the proportion of healthy, sporulated and stomata carrying sub-stomatal infections. 'Regia' presented the lowest severity and the highest percentage of health stomata. Selected breeding lines could generate a Pd resistant cultivar in comparison to currently grown cultivars. Finally, histological plant defence responses were compared for 'Pantanos del Sauce', 'Regia' and a 'Regia x Pantanos' breeding line. Hyphae were observed between the cells of the palisade parenchima, but never in the spongy parenchima. Cumulated phenolic compounds were not necessarily associated to pathogen infection. Callose depositions were not observed.

**Keywords:** Oomycete, partial resistance, segregation of resistance.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. ANTECEDENTES**

La cebolla (*Allium cepa* L.) es una de las principales hortalizas, presente en la cultura alimentaria de países en todos los continentes (Brewster 2008). Es una de las hortalizas más consumidas. En Uruguay se consumen 8 kg por persona por año (Observatorio granjero, 2015). En nuestro país es una hortaliza de gran importancia por su área de cultivo y volumen de producción, y con importancia social dada por el número de empresas o productores y trabajadores involucrados (MGAP-DIEA 2014). Ocupa el tercer lugar en cuanto al valor bruto de producción (después de la papa y el tomate), es la tercera hortaliza en cuanto a los volúmenes de ingreso al Mercado Modelo y ocupa el segundo lugar en cuanto a la superficie (Observatorio granjero, 2015).

#### **1.1.1. Cultivares de cebolla en Uruguay y mejoramiento por resistencia**

Los cultivares más difundidos son de origen nacional, desarrollados por los programas de mejoramiento del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) y del Centro Regional Sur (CRS) de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República (MGAP-DIEA, 2008; Vicente et al. 2010). La adaptación productiva o ecofisiológica expresada en el rendimiento y conservación poscosecha, la calidad de los bulbos, y la resistencia a enfermedades son los principales objetivos del mejoramiento genético (Vicente et al. 2010). Desde los años ochenta, estas instituciones desarrollaron acciones coordinadas en la región hortícola Sur para el mejoramiento genético de cebolla (Vicente et al., 2010).

Los cultivares nacionales disponibles actualmente presentan muy buenas características productivas, por lo que fueron adoptados ampliamente por los productores. Sin embargo, presentan susceptibilidad a enfermedades foliares como la mancha blanca causada por *Botrytis squamosa* y el mildiú causado por *Peronospora destructor* Berk. Casp. Dadas las condiciones climáticas de Uruguay, ambas enfermedades son de difícil control, comprometiendo el rendimiento del cultivo, y conducen a la aplicación de agroquímicos en repetidas ocasiones en la

temporada productiva. El control químico lleva a aumentos en los costos de producción y riesgos para el ambiente y la salud (Galván, 2011). Por esta razón, la generación de cultivares nacionales que mantengan las características productivas y que además incorporen resistencia a estas enfermedades foliares es de interés para el sector productivo.

El mejoramiento genético en Uruguay ha tenido un rol estratégico en aquellos cultivos en los que existen programas en curso, contribuyendo a la competitividad de la producción nacional y a la independencia tecnológica. La resistencia genética es una forma de control de enfermedades económica y ambientalmente amigable, por lo que es un objetivo extendido en los programas de mejoramiento genético de cultivos.

En Uruguay se realizó una búsqueda de fuentes de resistencia a *Peronospora destructor*. En el período 2007-2011 se evaluaron diferencias cuantitativas en el germoplasma local y se encontró menor susceptibilidad en variedades criollas de día largo que en el grupo intermedio y de día corto (Colnago et al. 2012). Esa diferencia podría ser dependiente del estado fisiológico del cultivo dado por el inicio de la bulbificación en el momento en el que las condiciones ambientales son más favorables para la enfermedad. Por tanto, esta resistencia sería difícilmente transferible a cultivares de diferente ciclo.

Por otro lado, se encontraron algunas variedades criollas y variedades de tipo intermedio con resistencia parcial frente a *Peronospora destructor* (Galván et al. 2016a). Por ejemplo, el cultivar “Naqué” tuvo una incidencia inicial similar a cultivares susceptibles, pero menor severidad que éstos a lo largo de la estación de crecimiento, por lo que tendría componentes de resistencia que limitan el desarrollo de las infecciones establecidas. La variedad “Regia”, de origen brasilero, fue la variedad de mayor resistencia parcial con valores de severidad significativamente inferiores a los cultivares susceptibles (Galván et al. 2011; Galván et al. 2016a).

Desde 2010 se realizaron cruzamientos entre la variedad “Regia” y “Pantanos del Sauce CRS” para combinar en la progenie la resistencia a peronóspora de la primera con las características agronómicas favorables de la segunda. Las plantas F1 se autofecundaron para obtener líneas F1S1 que

permitieran evaluar la segregación entre líneas (prueba de progenie de las plantas F1). De un total de 59 líneas “Regia x Pantanoso” evaluadas en 2013 y 2014 en el CRS, solo 9 y 7 líneas no difirieron de “Regia” en cada año, por lo que la segregación fue sesgada hacia la susceptibilidad de Pantanoso (Galván et al. 2016a).

En INIA Salto Grande se utilizó la resistencia de “Naqué” en cruzamientos con “INIA Casera”, y posteriormente en un cruzamiento “Regia x (Naqué x Casera)” se combinaron diferentes fuentes de resistencia (población SG12). Ocho líneas de medios hermanos SG12 seleccionadas y evaluadas en 2015 tuvieron valores de severidad intermedios entre los parentales ‘Regia’ y ‘Naqué x Casera’, con distribución sesgada hacia el padre más susceptible. Preliminarmente, se planteó como hipótesis que la resistencia de “Regia” estaría determinada por varios genes de efecto aditivo y eventualmente recesivos, lo cual deberá ser estudiado con herramientas moleculares y nuevas poblaciones.

Diez líneas F1S1 resistentes fueron seleccionadas en el CRS y se autofecundaron para producir líneas F1S2. Se identificaron y seleccionaron un 50% de líneas F1S2 como resistentes, provenientes de seis líneas F1S1 seleccionadas. Este resultado es promisorio hacia el desarrollo de un cultivar que combine la resistencia con buena adaptación productiva.

### **1.1.2. Patrones cuantitativos histopatológicos**

El análisis de las relaciones histopatológicas podría contribuir a determinar los mecanismos de defensa activados y su asociación con la durabilidad de la resistencia. Las observaciones del proceso de infección y de las respuestas de la planta constituyen un abordaje para el estudio de las relaciones planta patógeno complementario a la evaluación de la resistencia (Ponce de León et al., 2012; Rodríguez et al., 2014).

Se realizaron observaciones histológicas de manchas de peronóspora con esporulación visible colectadas de los ensayos a campo (Galván et al. 2016b). ‘Regia’ tuvo una proporción de estomas sanos significativamente mayor que el testigo susceptible “Pantanoso del Sauce” (33 vs 62 %), menor proporción de

colonización subestomática (14 vs 31%) y de estomas con esporangióforos emergiendo a través de ellos (28 vs. 46 %). Para ocho líneas de medios hermanos seleccionadas en INIA Salto Grande de la población “Regia x (Naqué x Casera)”, la correlación Pearson entre la proporción de estomas sanos y la severidad de la enfermedad en la parcela en el momento de evaluación fue  $r = -0,96$ , y la correlación con la severidad promedio de seis momentos (semanas) de evaluación fue  $r = -0,72$  ( $p < 0,05$ ;  $n = 12$ ) (Galván et al., 2016b).

Por otro lado, se estudió el proceso de infección mediante la inoculación de hojas sueltas en laboratorio. A las 48 hpi, 5-9 % de los esporangios estaban germinados y/o penetrando el estoma en el cultivar “Pantanos del Sauce” y otras accesiones susceptibles, mientras que para “Regia”, los estomas colonizados se encontraron a las 72 hpi con una proporción de esporangios germinados significativamente menor (2-3%) (Galván et al. 2016a). Este componente analizado estaría asociado a mecanismos de reconocimiento entre el hospedero y el patógeno que son previos al establecimiento de la infección. Preliminarmente, se ha concluido que diferencias en el proceso de infección y en la tasa de colonización del mesófilo foliar serían componentes de la resistencia parcial en Regia (Galván et al. 2016a).

## **1.2. EL PATOSISTEMA *Allium cepa* – *Peronospora destructor***

La mancha púrpura, mildiú o peronóspora causada por *Peronospora destructor* Berk. Casp. es una enfermedad foliar del cultivo de cebolla (*Allium cepa* L.) (Schwartz y Mohan 2008). *Peronospora destructor* pertenece a la clase *Oomycete*, un grupo de organismos eucariotas, heterótrofos (se nutren por absorción), de crecimiento filamentoso, que producen esporas (Lamour y Kamoun 2009). Su pared celular está compuesta por polisacáridos incluyendo celulosa, glucanos, pero no quitina. El micelio es cenocítico y son diploides durante la mayor parte de su ciclo de vida, salvo cuando se forman los gametangios (Hardham, 2007).

Los *Oomycetes* pertenecen al supergrupo *Stramenopila*, en el que se encuentran las algas verdeazuladas, aunque la monofilia del supergrupo es discutida

(Kamoun et al. 2015; Lamour y Kamoun 2009). Son un grupo diverso de organismos, morfológicamente similares a los hongos, pero están más cercanamente relacionados a organismos que viven en medios acuáticos tales como las algas marrones y diatomeas (Adhikari et al., 2013). Los oomycetes patógenos de las plantas causan enfermedades devastadoras para especies cultivadas, ornamentales y silvestres. No sólo son el grupo de patógenos de dicotiledóneas más importante, sino que también patógenos como *Phyium* son causa de disminución de rendimiento de cereales (Adhikari et al., 2013).

Los mildius verdaderos son causados por un grupo de *Oomycetes* que pertenecen a la familia *Peronosporaceae*. Todas las especies de esta familia, dentro de la cual se encuentra *Peronospora destructor*, son parásitos obligados y producen mildius en numerosas plantas que incluyen a la mayoría de las hortalizas y gramíneas cultivadas. Son principalmente tizones del follaje que se propagan con mucha rapidez en tejidos verdes y jóvenes (hojas, ramas pequeñas, y frutos). La reproducción y propagación rápida hace que las enfermedades que causan ocasionen pérdidas considerables en periodos cortos (Agrios, 2005).

El mildiú de la cebolla es una enfermedad foliar de gran importancia en Uruguay. Dado que las condiciones predisponentes se dan con frecuencia en la primavera, el desarrollo de sus síntomas es devastador, y las pérdidas de rendimiento pueden ser mayores al 50% (González et al. 2011).

Es un patógeno biótrofo obligado, excepto en las fases de propagación en el espacio y el tiempo. Completa su ciclo de vida en estrecha relación con el hospedante alimentándose y viviendo sobre el tejido vegetal vivo y, como resultado, genera el daño en el hospedero (Niks y Lindhout, 2004). Para nutrirse del hospedero este tipo de patógeno genera haustorios, que invaginan la membrana celular del hospedero sin penetrar en el citoplasma, y las células vegetales permanecen vivas más allá de la presencia de estas estructuras (Niks y Lindhout, 2004).

Los oomycetes producen esporas asexuales, y en algunas especies como *P. destructor*, estos esporangios son dehiscentes. La liberación de zoosporas como estructura ligada al inicio de infección está más asociado a oomycetes de suelo que

encuentran, en periodos de inundación alternados, agua libre por donde desplazarse y diseminarse. Sin embargo, en los oomycetes aéreos es más común la germinación directa del esporangio ya que están más asociados a la dispersión por viento y los períodos de agua libre sobre la superficie de las partes aéreas de la planta son más reducidos (Hardham, 2007). Las observaciones del proceso de infección para *Peronospora destructor* confirman que predomina la germinación de los esporangios directamente, sin liberación de zoosporas (Galván et al. 2016a).

Los esporangios son multinucleados y se forman por expansión del ápice de la hifa. Permanecen multinucleadas hasta que se desencadena la formación de las zoosporas, las cuales son uninucleadas. El período multinucleado puede prolongarse mucho en el tiempo. En la zoosporogénesis, dos flagelos se desarrollan de los cuerpos basales del ápice de cada núcleo. Una vez formadas, las zoosporas son liberadas por el ápice del esporangio que se abre por diferencia de presión hidrostática. La movilidad de las zoosporas se da por la acción de los dos flagelos que emergen del centro de la superficie ventral de la célula. Sobre la superficie de la planta, la zoospora es capaz de enquistar, perder los flagelos y segregar una sustancia adhesiva que le permite fijarse al hospedero (Hardham, 2007).

En las especies que son patógenos foliares, la hifa que se desarrolla a partir del esporangio penetra al hospedero a través de los poros estomáticos. Los oomycetes biotrofos generan en el hospedero una mínima desorganización o trastorno. Como en el caso de *P. destructor*, los oomycetes que penetran a través del estoma desarrollan una vesícula en la cámara subestomática, previo a la ramificación de la hifa a través del espacio intercelular (Hardham, 2007).

*Peronospora* adquiere los nutrientes a través de la formación de haustorios, principalmente en células del mesófilo. El desarrollo de esta estructura involucra la degradación localizada de la pared celular y la invaginación de la membrana celular de la planta (Hardham, 2007). En colonizaciones exitosas, se da la esporulación con el desarrollo de estructuras asexuales (esporangios) sobre la superficie de la hoja o estructuras sexuales (oospora) dentro del tejido del hospedero (Hardham, 2007).

Los principales síntomas causados por *Peronospora destructor* son áreas ovales de infección sobre las hojas y escapos florales de hasta 10-15 cm de largo,

con un color verde claro, a veces clorótico, de aspecto aceitoso sobre las cuales se observa la esporulación en esporangióforos como una felpa gris-violácea (Schwartz y Mohan 2008, González et al. 2011). Para que el proceso de infección se desencadene es necesario que exista agua libre sobre la superficie de la hoja, temperatura óptima de 17°C, humedad relativa superior a 90% y baja luminosidad (Marcuzzo y Vaz Moraes, 2017).

El control químico es efectivo, aunque su aplicación tiene consecuencias negativas sobre el ambiente, la salud de trabajadores y consumidores y la economía de los productores. Se han implementado sistemas de alarmas en base a las condiciones ambientales que el patógeno requiere para la infección, con lo cual se busca realizar el control químico solamente en los momentos necesarios (Lorbeer et al. 2002). Sin embargo, con los sistemas de alarma se sigue requiriendo un número importante de aplicaciones en las condiciones de Uruguay, así como en otras regiones del mundo (Maeso 2000, Scholten et al. 2007).

*Peronospora destructor* afecta la cebolla y otras especies del género *Allium* (Kofoet y Zinkernagel 1989). No se disponía de resistencia genética completa en la base genética del cultivo de cebolla para esta enfermedad (Kofoet y Zinkernagel 1989), hasta que se introgresó el gen *Pd* proveniente de *Allium roylei* (Scholten et al. 2007). El gen se encuentra en una posición telomérica del cromosoma 3 (van Heusden et al. 2000). Recientemente se desarrollaron marcadores asociados al gen *Pd* que permiten su rápida detección y la selección asistida (Kim et al. 2016). Si bien la resistencia se ha utilizado exitosamente para el desarrollo de cultivares resistentes, infecciones de *P. destructor* sobre *A. roylei* se determinaron experimentalmente (Galván et al. 2011, Vu et al. 2012). Hasta el presente, se desconocen los mecanismos moleculares de la resistencia y la proteína codificada por el gen *Pd*. El análisis de las relaciones histopatológicas podría contribuir a determinar los mecanismos de defensa activados, y su asociación con la durabilidad.

Diversos sistemas de marcadores moleculares han sido utilizados en el análisis genético de cebolla, reseñados por Klaas y Friesen (2002) y por Khosa et al. (2016). El desarrollo de la genómica en cebolla dista del alcanzado para otras

especies cultivadas y para especies modelo, debido al enorme tamaño del genoma, al ciclo bienal de la especie y la menor importancia económica (Kik, 2002). Al comparar el genoma completo de *Hyaloperonospora arabidopsidis*, un oomycete patógeno obligado, con el del hemibiotrofo *Phytophthora infestans*, Baxter et al. (2010) encontraron como principales diferencias que *H. arabidopsidis* tiene menor representación de efectores y proteínas relacionadas a la patogénesis, de enzimas para la asimilación de compuestos inorgánicos, y de proteínas asociadas con la formación de zoosporas y su movilidad.

### **1.3. LA RESISTENCIA DE LAS PLANTAS A LOS PATÓGENOS**

Muchos de los microorganismos asociados a las plantas son patógenos que perjudican el crecimiento e interfieren con la reproducción de las plantas (Jones y Dangl, 2006). Las plantas angiospermas han desarrollado complejos mecanismos de señalización y defensa que les permiten protegerse contra el ataque de los patógenos. El reconocimiento de la presencia del patógeno desencadena un amplio rango de reacciones inducidas entre las que se incluyen el incremento de las especies reactivas del oxígeno (ROS), síntesis de compuestos antimicrobianos, fortalecimiento de la pared celular e inducción de genes y proteínas asociadas a la resistencia (Ponce de León et al., 2012). Para satisfacer una demanda cada vez mayor de producción de alimentos, la clásica introducción de nuevas fuentes de resistencia en los programas de mejoramiento deberá complementarse cada vez más con la caracterización funcional de la resistencia y con su estrategia de utilización en la producción (Vleeshouwers y Oliver 2014).

Los oomycetes patógenos son capaces de secretar proteínas efectoras, como enzimas degradativas que alteran la fisiología del hospedero y le facilitan la colonización (Adhikari et al., 2013). La activación de alguna de esas respuestas celulares es común para plantas susceptibles y resistentes, y el resultado de la interacción dependerá de la habilidad de percibir al patógeno y la rapidez con la que el hospedero desencadene una respuesta de defensa (Ponce de León et al., 2012).

Las plantas responden ante los patógenos mediante dos ramas principales del sistema inmune: una que reconoce y responde a moléculas que son comunes a muchas clases de microorganismos (patógenos o no) y otra que responde a factores

de virulencia de un patógeno específico (Jones y Dangl, 2006). El primer mecanismo es de resistencia general o basal contra los microorganismos con los cuales las plantas conviven, lo que determina que sólo algunos de estos microorganismos puedan infectar y alimentarse del tejido vivo. En estos casos, en los que el microorganismo termina siendo exitoso, se reconoce como patógeno o parásito de la especie vegetal involucrada (hospedera), y coevolucionaron con las plantas sobre las cuales tienen habilidad patogénica o parasítica (Niks et al. 2011).

El segundo mecanismo es de mayor especificidad, está asociado a la relación planta patógeno y es el resultado de la coevolución de una planta y un patógeno. Las plantas desarrollaron diversos mecanismos de resistencia frente a los patógenos, que determinan una variabilidad en las reacciones observadas en una especie frente a un patógeno, desde la susceptibilidad hasta la ausencia total de síntomas. Los mecanismos de resistencia activa se inician con el reconocimiento del patógeno a nivel de la membrana celular, a partir de lo cual se genera una cascada de reacciones que llevan a una reprogramación del funcionamiento celular y a señales de carácter sistémico en la planta (Panstruga et al. 2009).

El primer mecanismo de resistencia general es activado por el reconocimiento, a través de receptores del hospedero (PRR, *plant recognition receptors*), de patrones moleculares asociados al patógeno (PAMP, *pathogen associated molecular patterns*), tempranamente activados después del contacto entre el patógeno y el hospedero. Estos patrones de reconocimiento del hospedero pueden reconocer patrones de patógenos y de otros microorganismos que no son patógenos (MAMP, *microbial associated molecular pattern*). Si un PAMP es reconocido por PRR desencadenan una respuesta en la planta (PTI, *PAMP triggered immunity*) denominada inmunidad desencadenada por PAMP (Jones y Dangl, 2006).

Las respuestas desencadenadas por PAMP o MAMP convergen en un limitado número de rutas de señalización que dan lugar a un conjunto común de reacciones PTI. Existe limitada variación en la capacidad de respuesta de una especie vegetal, una especie de planta reconoce sólo un subconjunto de PAMP

potenciales. De todas maneras, ni los PAMP ni los PRR son invariables en el tiempo y están sujetos a la selección natural (Jones y Dangl, 2006).

En muchos casos los patógenos son capaces de sobrepasar esos mecanismos de defensa mediante proteínas denominadas *efectores*, que contribuyen a la virulencia del patógeno y son proteínas que bloquean los sistemas de reconocimiento de la planta interfiriendo en la respuesta PTI. Cuando el patógeno es exitoso se da una reacción de susceptibilidad mediada por efectores (Jones y Dangl, 2006). Es entonces que las plantas desarrollaron el reconocimiento de los efectores mediante proteínas específicas, denominadas genéricamente R, que desencadenan nuevas cascadas de reacciones y mecanismos de defensa (Chisholm et al. 2006). Un efector del patógeno específico es reconocido por una de las proteínas R desencadenando una respuesta denominada inmunidad mediada por efectores (ETI, *effector triggered immunity*). Esta respuesta es posterior a la generada por la PTI, pero con efectos más amplificados. La reacción mediada por efectores y proteínas R genera resistencia por hipersensibilidad (HR) lo que causa la muerte celular programada de las células en las que el hospedero y el patógeno generaron contacto íntimo (Jones y Dangl, 2006). Las proteínas codificadas por genes R tienen en común un núcleo NBS conservado, y cadenas constituidas por regiones con repetidos ricos en leucina (LRR) típicamente variables activas en el reconocimiento de moléculas del patógeno (Hammond Kosak y Parker, 2003).

Los efectores de Oomycetes probablemente actúan dentro de la célula del hospedero, los cuales son reconocidos por las proteínas R. Las proteínas haustoriales llevan señales peptídicas que se exportan y pueden funcionar dentro de la célula de la planta. Aún no se conoce cómo se vinculan estas proteínas con la célula hospedera. Patógenos del grupo de los Oomycetes como *Phytophthora infestans* tienen moléculas R típicas, como las que tienen un dominio CC (*coiled coin*), que a su vez se relacionan con moléculas de avirulencia típicas de estos patógenos como los efectores RxLR (Morgan y Kamoun 2007).

La habilidad diferencial de los oomycetes patógenos para producir diferentes enzimas hidrolíticas que actúan en diferentes complejos moleculares,

determina la estrategia de infección, el rango de hospederos y los diferentes mecanismos de virulencia (Adhikari et al., 2013).

Las enzimas carbohidrato-activas (CAZymes) están involucradas en la biosíntesis y degradación de diversos glycoconjugados, oligosacáridos y polisacáridos y tienen un rol central en el quiebre de la pared celular del hospedero funcionando como factor de patogenicidad. Estas enzimas también pueden estar involucradas en la biosíntesis, quiebre y modificación de la pared celular del propio oomycete y de polisacáridos estructurales como parte del crecimiento y desarrollo. La comparación del contenido de CAZymes podría proveer información sobre la diversidad metabólica de los oomycetes patógenos (Adhikari et al., 2013).

Los efectores de Oomycetes son proteínas modulares (Schornack et al. 2009). Los efectores llevan una señal N-terminal peptídica que regula la secreción. Los efectores citoplasmáticos tienen motivos conservados del N-terminal que son requeridos para la translocación al hospedero. El C-terminal acarrea el módulo con la actividad bioquímica del efector. Los RxLR son un tipo de efector de Oomycetes, que suprimen la respuesta de defensa del hospedero. Sin embargo, algunos de esos efectores pueden ser reconocidos por los receptores del sistema inmune de la planta, y se desencadena la muerte celular programada como respuesta de defensa del hospedero (Adhikari et al., 2013). La clase puntual de efectores YxSL[RK] ha sido encontrada en varios oomycetes patógenos. Estos efectores guardan similitud en secuencia y posición con el motivo RxLR, y pertenecen a la familia de proteínas segregadas que cumplen con la función de efectores (Adhikari et al., 2013).

Los motivos RxLR ligados al motivo EER están vinculados al transporte de las proteínas efectoras. Estos motivos están sobrerrepresentados y posicionalmente comprimidos en los secretomas de los oomycetes. Tienen conjuntos complejos y diversos de genes efectores RxLR que están sujetos a la evolución. La selección positiva ha actuado en paralelo a las familias de genes RxLR con sesgo hacia el dominio C-terminal (Adhikari et al., 2013).

El análisis comparativo de los Stramenopiles indica que los oomycetes patógenos son capaces de secretar numerosas moléculas que actúan como efectores.

Sin embargo, la sobre-representación de algunos genes que codifican efectores y proteínas hidrolíticas reflejan adaptaciones específicas; significando diferencias entre oomycetes de vida necrotrófica, hemibiótrofa y biotrofa. El grupo de oomycetes patógenos biotrofos tienen dramáticamente reducida la representación de los motivos RxLR y otras proteínas patogénicas como enzimas hidrolíticas de la pared celular y transportadores. Estas diferencias en los ricos repertorios de efectores candidatos están asociadas a la coevolución y adaptación de cada uno de los patógenos con el sistema inmune de las plantas hospederas (Adhikari et al., 2013).

Los efectores que permiten a los patógenos reconocer la PTI son reconocidos por las proteínas R, que son proteínas asociadas a la resistencia a enfermedades y son específicos. Si un efector es reconocido por una correspondiente proteína R, una respuesta ETI se desencadena. Al efector reconocido se lo denomina proteína de avirulencia (Jones y Dangl, 2006).

Los genes de los efectores están generalmente asociados con elementos genéticos móviles o teloméricos y son comúnmente observados como presencia o ausencia de polimorfismos a través de las razas bacterianas o fúngicas. La ETI puede ser también suprimida a través de la evolución de los efectores del patógeno que lo suprimen directamente (Jones y Dangl, 2006). La reacción de hipersensibilidad típicamente no se extiende más allá de las células infectadas, lo cual frena o retrasa el desarrollo del patógeno en algunas interacciones como en los biotrofos y hemibiótrofos. Esta reacción no siempre es visible, ni es siempre requerida para la ETI (Jones y Dangl, 2006).

Las proteínas de resistencia están involucradas en el reconocimiento del patógeno y en la consiguiente activación de la respuesta innata de defensa (Takken et al., 2006) Poco se sabe sobre los requerimientos de las proteínas R para su activación. El dominio LRR parece actuar como un regulador negativo que bloquea la activación inapropiada del NB. Su activación involucra cambios conformacionales intra e intermoleculares (Jones y Dangl, 2006). Takken et al. (2006) propusieron que el dominio NB-ARC de las proteínas de resistencia tienen un dominio funcional ATPasa que regula la activación de las proteínas R. El

reconocimiento de los efectores Avr (RxLR) y las proteínas de la planta R (NB-LRR) puede ser directo o puede requerir una o más moléculas que las vinculen, en un reconocimiento indirecto (Jones y Dangl, 2006).

Existen otros compuestos vinculados a la resistencia del hospedero frente a patógenos. Algunas hormonas vegetales se han vinculado a la resistencia de la planta hospedera. El ácido salicílico, los jasmonatos y el etileno se conocen, además de su rol como reguladores de crecimiento, como promotores de los mecanismos de defensa. El ácido salicílico está vinculado a las señales contra organismos biotrofos, vinculado a la resistencia basal y a la activación de la resistencia sistémica adquirida (SAR). Los jasmonatos y el etileno se les conoce como hormonas vinculadas a señales contra patógenos necrotrofos e insectos. Otras hormonas alteran el balance entre estas hormonas (Jones y Dangl, 2006).

La activación de las proteínas R induce la vía del ácido salicílico diferencial y respuestas dependientes de especies reactivas del oxígeno (ROS). La reacción oxidativa que acompaña la ETI es dependiente de la NADPH-oxidasa, y reprime la muerte celular dependiente del ácido salicílico en las células alrededor del sitio de infección (Jones y Dangl, 2006).

Los efectores suprimen la PTI para establecer una relación de susceptibilidad, los efectores del patógeno suprimen la primera barrera del sistema inmune de la planta por interacción con proteínas específicas del hospedero. Existen otro tipo de efectores que en lugar de interferir en la cascada de defensa activan reguladores negativos del sistema inmune (Pavan et al., 2010). Estos genes (genes S) codifican factores de susceptibilidad y la pérdida de función de estos genes confieren resistencia. La pérdida de función (recesivo) confiere resistencia y no altera el desarrollo normal de la planta (Pavan et al., 2010).

Se conocen genes S que en estado recesivo confieren resistencia a enfermedades: en cebada se conoce el gen *mlo* (Pavan et al., 2010) y en tomate, el gen *ol-2* confiere resistencia al oidio y está asociada a la formación de papilas (Pavan et al., 2007). Pocos genes S han sido incorporados en cultivares debido a la dificultad de incorporar esta resistencia recesiva por mejoramiento tradicional

(Pavan et al., 2007). Los genes S confieren una resistencia durable y de amplio espectro (Pavan et al, 2010).

Los mecanismos de resistencia basal o reconocimiento de PAMP pueden determinar niveles de resistencia cuantitativa. Genotipos susceptibles al patógeno pueden mostrar diferencias cuantitativas en los niveles de infección claramente observables en ensayos a campo (Niks et al. 2011). Generalmente, esas diferencias cuantitativas se expresan como la modificación de parámetros epidemiológicos (componentes de la resistencia) que llevan a un enlentecimiento del desarrollo de la enfermedad. Esas diferencias cuantitativas en la respuesta a la enfermedad de diferentes genotipos hospederos pueden ser utilizadas en el mejoramiento genético, reduciendo los efectos negativos sobre el rendimiento del cultivo y contribuyendo a un manejo integrado de la enfermedad (Niks et al. 2011). A diferencia de la resistencia basada en genes R, la base genética de la resistencia parcial es poligénica y ha demostrado ser duradera (Niks et al. 2011).

#### **1.4. RELACIONES HISTOPATOLÓGICAS**

Las observaciones histológicas del proceso de infección y de las respuestas de la planta constituyen otro abordaje para el estudio de las relaciones planta-patógeno (Ponce de León et al. 2012; Rodríguez et al. 2014). No solamente difieren obviamente entre genotipos susceptibles y resistentes, sino que las respuestas y los momentos en que éstas ocurren difieren entre genotipos resistentes, por lo que las observaciones histológicas pueden ser una herramienta para el análisis de los mecanismos involucrados en la resistencia y sus bases moleculares.

Las plantas son capaces de responder rápidamente ante la infección de un oomycete. Las respuestas que han sido documentadas incluyen un rápido aumento de la concentración del  $Ca^{2+}$  citoplasmático, agregación de citoplasma y formación de deposiciones de pared celular frente a la hifa invasora, reorganización del citoesqueleto y del sistema de endomembrana, formación de especies reactivas del oxígeno, síntesis de proteínas asociadas a la patogénesis y fitoalexinas, y muerte celular por hipersensibilidad (Hardham, 2007).

El análisis de las relaciones histopatológicas podría contribuir a determinar los mecanismos de defensa activados y su asociación con la durabilidad de la

resistencia. Por ejemplo, en el reconocimiento de efectores por los productos de los genes R, las reacciones ocurren después de la formación de haustorios, culminando en la hipersensibilidad en la que muere la célula que se intentó infectar con cambios en el metabolismo de las células vecinas (Niks et al. 2011; Ponce de León et al. 2012). En cambio, en la resistencia basada en el reconocimiento de PAMPs, las respuestas son pre-haustoriales, e involucran el engrosamiento de las paredes celulares con la formación de papilas, acumulación de proteínas de defensa en el apoplasto (quitinasas, peroxidasas, fitoalexinas, etc.), aumento de las especies reactivas del oxígeno y otros cambios, pero no se observa típicamente la muerte celular por hipersensibilidad (Niks et al. 2011; Ponce de León et al. 2012).

En el caso de Oomycetes, las paredes celulares están formadas por celulosa y  $\beta$ -glucano (Bouwmeester et al., 2009), compuestos también presentes en las paredes celulares del tejido vegetal, lo cual dificulta diferenciar las estructuras del patógeno. No obstante, se dispone de tinciones diferenciales (Hoch et al. 2005; Kortekamp 2005) que se han ajustado en nuestro grupo de trabajo (Ponce de León et al. 2011, Galván et al. 2016a).

## **1.5. OBJETIVOS**

El objetivo general de esta tesis fue analizar la segregación de la resistencia a *Peronospora destructor* y las relaciones histopatológicas en la variedad “Regia” y otras fuentes de resistencia.

Los objetivos específicos fueron:

- (1) Evaluar la base genética de la resistencia en la variedad de cebolla “Regia” frente al patógeno *Peronospora destructor* y características poscosecha a través de familias segregantes obtenidas a partir de cruzamientos, mediante prueba de progenie.
- (2) Estudiar el comportamiento frente a *Peronospora destructor* y en características poscosecha de líneas F1S2 “Regia x Pantanoso del Sauce CRS” que ya cuentan con dos ciclos de selección, y el comportamiento de poblaciones regeneradas a partir de esas líneas F1S2, en comparación con los cultivares nacionales, en ensayo a campo y a nivel histológico.

(3) Comprender cuáles son las reacciones de defensa del hospedero que explican los diferentes niveles de resistencia a la enfermedad a nivel de campo y el proceso de infección.

## **2. SEGREGACIÓN DE LA RESISTENCIA A *Peronospora destructor*** **EN CEBOLLA**<sup>1</sup>

### **2.1. RESUMEN**

El mildiú de la cebolla causado por *Peronospora destructor* es una enfermedad muy destructiva. La resistencia genética es una forma de control económica y ambientalmente amigable. En este trabajo se analizó la segregación de la resistencia en seis progenies de cruzamientos entre cultivares nacionales y la variedad “Regia”. Las plantas F1 se autofecundaron y se evaluaron las progenies F1S1. La segregación de la severidad fue sesgada hacia susceptibilidad con segregación transgresiva, salvo en un cruzamiento “Dulce” x “Regia”, el único en el que “Regia” fue dador de polen. La herencia recesiva podría estar asociada a mecanismos de pérdida de susceptibilidad. En otro ensayo, se evaluaron líneas avanzadas F1S2 “Regia” x “Pantanos del Sauce” en dos momentos (agosto y noviembre 2017), en la severidad, en diferencias cuantitativas histopatológicas y en características agronómicas. Las líneas F1S2, que ya habían tenido un proceso de selección, fueron intermedias entre los padres. La severidad de cada línea se relacionó con diferencias cuantitativas histológicas (proporción de estomas sanos e infectados). “Regia” presentó la menor severidad y el mayor porcentaje de estomas sanos. Líneas F1S2 no se diferenciaron de los cultivares control en el rendimiento, la calidad de los bulbos y la conservación poscosecha, y podrían generar un cultivar resistente en comparación con los cultivares actualmente utilizados.

**Palabras clave:** Oomycete, resistencia parcial, segregación de la resistencia.

### **2.2. SUMMARY**

**Segregation of resistance against *Peronospora destructor* in onion.** Onion mildew caused by *Peronospora destructor* is a very destructive leaf disease. Genetic resistance is an economic and environmentally friendly way of disease

---

<sup>1</sup> Este capítulo está preparado en base a las normas editoriales de “Agrociencia Uruguay”, para ser publicado como Arias et al. “Segregación de la resistencia a *Peronospora destructor* en cebolla”.

control. In this research, the segregation of mildew resistance was analysed in six offspring from crosses between national cultivars and the variety 'Regia'. F1 plants were selfed and F1S1 progenies were evaluated. The segregations in mildew severity were skewed towards susceptibility, with transgressive segregation, except in 'Dulce' x 'Regia', the only cross in which 'Regia' was the pollen donor. The recessive inheritance could be associated with loss of susceptibility mechanisms. In another experiment, the response of advanced F1S2 lines 'Regia' x 'Pantanos del Sauce' were evaluated in two times (August and November 2017), in disease severity, histological quantitative differences, and agronomic traits. F1S2 lines, which have had an earlier selection process, showed an intermediate behaviour between the parents in Pd severity. Disease severity was correlated with histological differences (proportion of health and infected stomata). 'Regia' presented the lowest severity and the highest percentage of healthy stomata. F1S2 lines did not differ from control cultivars in bulb yield, quality traits and postharvest behaviour, and could be used to develop a mildew resistant cultivar in comparison to currently grown cultivars.

**Keywords:** Oomycete, partial resistance, segregation of resistance.

### 2.3. INTRODUCCIÓN

La mancha púrpura, mildiú o Peronospora causada por *Peronospora destructor* Berk. Casp. es una de las enfermedades foliares más importantes del cultivo de cebolla (*Allium cepa* L.) <sup>(1)</sup>. Bajo condiciones ambientales predisponentes, el desarrollo es devastador y las pérdidas de rendimiento en bulbos o en producción de semillas mayores al 50% <sup>(2)</sup>. Los síntomas son áreas ovales sobre hojas y escapos florales de 10-15 cm de largo con color verde claro a clorótico, de aspecto aceitoso, sobre las cuales posteriormente se observa la esporulación como una felpa gris-violácea <sup>(1,2)</sup>.

Se dispone de control químico efectivo, aunque su aplicación tiene consecuencias negativas sobre el ambiente, la salud de trabajadores y consumidores y la rentabilidad del cultivo. Se han implementado sistemas de alarmas en base a las

condiciones ambientales para la infección, con lo cual se busca realizar el control químico solamente en los momentos más predisponentes <sup>(3)</sup>. Sin embargo, con los sistemas de alarma se sigue requiriendo un número alto de aplicaciones (10 a 14) en Uruguay y otras regiones del mundo <sup>(4,5)</sup>.

La resistencia hospedera es una forma de control de enfermedades económica y ambientalmente amigable, por lo que es un objetivo extendido en los programas de mejoramiento genético de cultivos <sup>(6)</sup>. Aunque algunos trabajos pioneros reportaron resistencia a *Peronospora destructor* en líneas rojas de cebolla <sup>(7,8)</sup>, no se dispone de cultivares con resistencia genética completa <sup>(9)</sup>. Más recientemente, se introgresó el gen *Pd* proveniente de *Allium roylei* <sup>(5)</sup>. Los mecanismos de resistencia basal o de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) pueden determinar niveles de resistencia parcial. Generalmente, esas diferencias cuantitativas se expresan como parámetros epidemiológicos que llevan a un enlentecimiento de la enfermedad. Esas diferencias pueden ser utilizadas en el mejoramiento genético, reduciendo los efectos negativos sobre el rendimiento del cultivo y contribuyendo a un manejo integrado de la enfermedad <sup>(6)</sup>. A diferencia de la resistencia basada en genes R, la base genética de la resistencia parcial es poligénica y ha demostrado ser duradera <sup>(6)</sup>.

*Peronospora destructor* es un patógeno difícil para trabajar en investigación y en selección por resistencia <sup>(10)</sup>. No puede ser cultivado y la esporulación y por tanto la producción de inóculo, solo ocurre en plantas adultas <sup>(1,4)</sup>. Por tanto, existe una gran dependencia de la ocurrencia de la enfermedad en condiciones naturales para realizar el trabajo de selección. Desde 2010, el Centro Regional Sur ha realizado cruzamientos entre Regia y Pantanoso del Sauce CRS para combinar en la progenie la resistencia a Peronóspora de la primera con las características agronómicas favorables de la segunda <sup>(10)</sup>. En INIA Salto Grande se utilizó la resistencia de Naqué en cruzamientos con INIA Casera, y posteriormente en un cruzamiento Regia x (Naqué x Casera) se combinaron fuentes de resistencia <sup>(11)</sup>. Preliminarmente, se ha planteado como hipótesis que la resistencia de Regia estaría determinada por varios genes de efecto aditivo y eventualmente recesivos. En

observaciones histológicas de manchas de *Peronospora* con esporulación visible colectadas de los ensayos a campo, la proporción de estomas infectados se correlacionó positivamente con la severidad (<sup>10, 11</sup>). Por otro lado, se estudiaron las primeras etapas del proceso de infección. Las diferencias observadas sugieren que un mecanismo de resistencia estaría asociado al reconocimiento entre el hospedero y el patógeno previo al establecimiento de la infección (<sup>10</sup>).

El conocimiento de la base genética de la resistencia proveniente de Regia contribuiría a su utilización eficiente en la selección. Los objetivos de este trabajo fueron estudiar la segregación de la resistencia a *P. destructor* y características agronómicas usando como fuente de resistencia la variedad Regia, y evaluar el comportamiento y la calidad de los bulbos de líneas avanzadas de mejoramiento seleccionadas por resistencia a *P. destructor*.

## **2.4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.4.1. Segregación de la resistencia proveniente de Regia**

En 2014 se realizaron 13 cruzamientos para generar poblaciones segregantes. Las progenies F1 fueron resultado de cruzamientos individuales (planta a planta) de la variedad “Regia” con cultivares nacionales. Las plantas F1 se forzaron a florecer en 2015 mediante siembra temprana (febrero) y se autofecundaron mediante embolsado de las umbelas para formar líneas F1S1 de cada progenie. Se sembraron todas las semillas F1 obtenidas de los cruzamientos, y las plantas F1 que no florecieron y formaron bulbos, fueron plantadas nuevamente como bulbos en 2016 para autofecundarlas.

En 2015 se realizaron nuevos cruzamientos con Regia como fuente de resistencia parcial. La descendencia F1 de cada cruzamiento y las líneas F1S1 de 2014 se sembraron tempranamente en almácigos en febrero de 2016, se trasplantaron en junio, y en la primavera se autofecundaron mediante aislamiento de cada umbela. De cada cruzamiento se obtuvo una familia de plantas F1, y de cada una de esas plantas autofecundadas una línea F1S1. La trilla se realizó manteniendo la identidad de la familia y la línea.

En 2017 se realizó el ensayo comparativo de líneas F1S1 por familia presentado en este trabajo. El ensayo comprendió 14 familias segregantes de las cuales se contaba con suficiente número de líneas y semillas para el ensayo a campo. El ensayo se realizó en el Centro Regional Sur (CRS) de la Facultad de Agronomía, Progreso, Canelones, Uruguay. La siembra de los almácigos se realizó entre el 20 y 24 de abril, el trasplante entre el 16 y el 22 de agosto 2017. La cosecha de las líneas se realizó de acuerdo al vuelco del follaje, en la primera quincena de diciembre, y los bulbos se almacenaron bajo techo, en un galpón ventilado.

El diseño fue de bloques desbalanceados con tres repeticiones, atendiendo a la disponibilidad de semilla por familia. Se incluyeron cuatro cultivares testigo de comportamiento conocido en cada repetición: Pantanoso del Sauce, Regia, Naqué e INIA Casera. Cada parcela constó de veinte plantas, en cuatro filas de cinco plantas cada una. En el período 7 al 10 de noviembre se evaluó la severidad como porcentaje de tejido afectado en todas las plantas de la parcela, con una escala ordinal de 0-5 (Cuadro 1). Se registró la fecha de cosecha de cada parcela, y se realizó una evaluación poscosecha de los bulbos. Las variables medidas fueron el peso del bulbo, diámetro mayor, diámetro menor, color, forma y motivo de descarte en caso de que correspondiera (bacteriosis, fusariosis, brotación, etc.). Se calculó para cada línea el peso promedio del bulbo, el cociente entre el diámetro mayor y el diámetro menor, la frecuencia de cada una de las formas y de los colores.

**Cuadro 1.** Escala ordinal para la evaluación de severidad de *Peronospora destructor*, expresada como porcentaje de área foliar afectada.

<b>Clase</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Severidad	0	$0 < x \leq 5$	$5 < x \leq 15$	$15 < x \leq 30$	$30 < x \leq 50$	$x > 50$

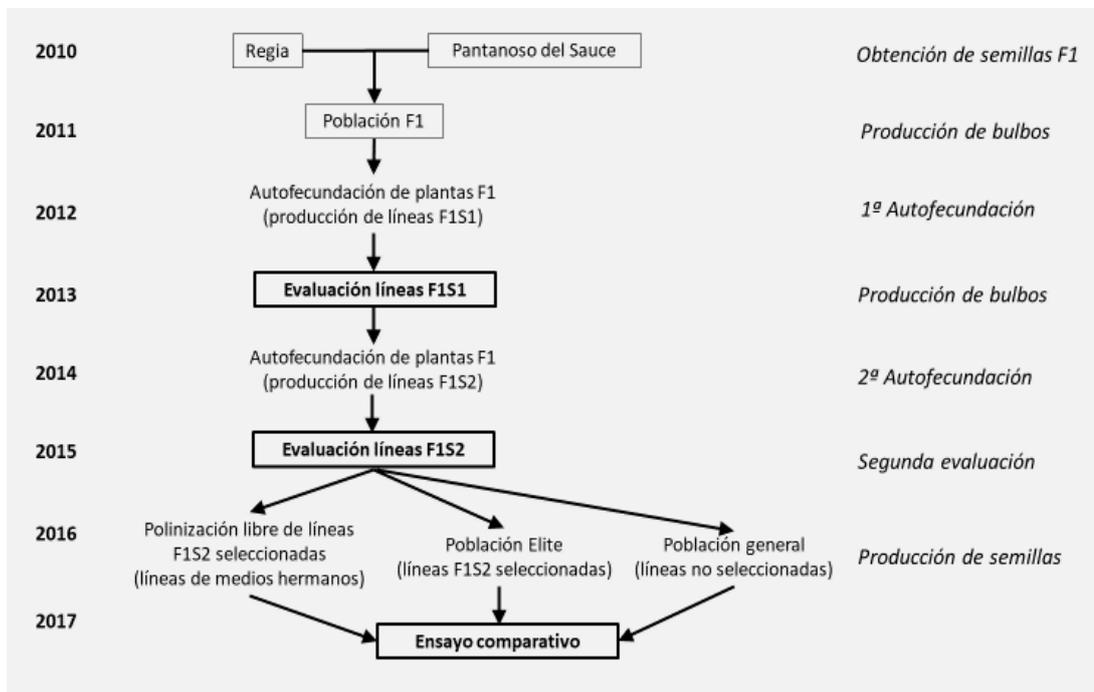
**Cuadro 2.** Familias segregantes generadas para evaluación de la resistencia a *Peronospora destructor*.

<b>Familia</b>	<b>Cruzamiento</b>	<b>Número de líneas F1S1</b>
15601	Regia x Naqué	15
15605	Regia x Santina	74
14603	Regia x Casera	22
14606	Regia x INIA Fagro Dulce	12
14609	Regia x Pantanoso del Sauce	14
14611	INIA Fagro Dulce x Regia	29

La severidad de *Peronospora* y las variables agronómicas se evaluaron en las 14 familias segregantes, pero finalmente en este trabajo se presentan 6 de las 14 familias, aquellas que contaban con 12 o más líneas F1S1 (Cuadro 2). La severidad se analizó mediante el test no paramétrico Kruskal-Wallis <sup>(12)</sup>. Para las familias que tuvieron diferencias significativas entre líneas se realizó una prueba de comparación de medias Tukey en INFOSTAT <sup>(13)</sup>.

#### **2.4.2. Evaluación de líneas avanzadas PXR F1S2**

En un segundo trabajo, se evaluaron once líneas F1S2 seleccionadas por resistencia a *P. destructor* a partir de cruzamientos anteriores (2010) entre Regia y el cultivar Pantanoso del Sauce CRS (Figura 1). Bulbos F1 se autofecundaron para obtener líneas F1S1, de las cuales se seleccionaron diez líneas por su resistencia. A partir de esas líneas se realizó una autofecundación para generar líneas F1S2 que se evaluaron en 2015 por su resistencia, y se seleccionaron 42 líneas F1S2 (4,2 líneas S2 en promedio por cada línea S1). Luego de un segundo ciclo de selección, 13 líneas F1S2 se seleccionaron para polinizar libremente en 2016, y se mantuvieron por identificación materna (líneas de medios hermanos).



**Figura 1.** Esquema de mejoramiento para complementar características agronómicas de Pantanoso del Sauce con la resistencia a *Peronospora destructor* de Regia, que condujo al ensayo comparativo en 2017 que se presenta en este trabajo con 13 líneas obtenidas por libre polinización de bulbos F1S2, y las poblaciones regeneradas “Elite” y “General”.

La evaluación de estas 13 líneas F1S2 en 2017 se presenta en este trabajo. Además, se incluyó una población “PXR elite”, obtenida de la interpolinización libre de las 13 líneas F1S2 seleccionadas por su resistencia, y otra población “PXR general” obtenida de la interpolinización libre de las 31 líneas F1S2 no seleccionadas ( $42 - 13 = 31$  líneas). La siembra de almácigo se realizó el 24 de abril, y el trasplante el 17 de agosto 2017 en el Centro Regional Sur (CRS), Progreso, Canelones. Se incluyeron Pantanoso del Sauce CRS, Regia, Casera, Santina y Naqué como cultivares control. Se realizó la caracterización de las líneas en la respuesta a *P. destructor* en dos momentos (agosto y noviembre), y en las características agronómicas y de calidad.

El diseño del ensayo fue de bloque completos al azar con cuatro repeticiones. Cada parcela se conformó por 48 plantas (4 filas de 12 plantas cada una). A fin de asegurar y uniformizar la ocurrencia de la enfermedad, el ensayo se realizó con mínimas intervenciones de control químico y se instaló en una parcela en la que se había cultivado cebolla en los años anteriores. Se intercalaron canteros del cultivar susceptible Pantanoso del Sauce para homogeneizar la presión de inóculo.

Se realizaron dos evaluaciones de la severidad de *Peronospora destructor* en agosto y noviembre, en base a las diez plantas centrales de la parcela con una escala ordinal de 0-5 (Cuadro 1). En el segundo momento de evaluación, INIA Casera y Regia ya habían comenzado a volcar y el follaje estaba senescente, por lo que no se incluyeron en el análisis. Los datos se analizaron mediante el test de Kruskal-Wallis <sup>(10)</sup> y prueba de comparación de medias Tukey. Las variables agronómicas cuantitativas se analizaron con ANAVA, y para las que se encontraron diferencias significativas se realizó una prueba Tukey en INFOSTAT <sup>(11)</sup>.

Al evaluar la severidad, se tomaron cuatro muestras de cada repetición de tejido afectado y con esporulación visible para el análisis histológico cuantitativo. Trozos de 2 x 2 cm de mancha afectada fueron aclaradas durante 48 horas en alcohol etílico 95%, con cambio de alcohol cada 24 horas, y posteriormente se conservaron en alcohol etílico 95%. La tinción para las evaluaciones cuantitativas se realizó mediante inmersión 5 min en 0.01% Calcofluor blanco <sup>(12, 13)</sup> y se observaron con microscopio. Para cada una de las muestras se contaron 100 estomas asignando la proporción a las siguientes clases: estomas sano (S), estomas con esporulación (E) y estomas con infección subestomática visible (I). Para las proporciones, se realizó una transformación cuadrática y se analizaron mediante ANAVA y prueba de Tukey en INFOSTAT <sup>(11)</sup>.

Se realizó un análisis multivariado (PCA) que comprendió la severidad de *Peronospora* en cada momento de evaluación a campo, la proporción de estomas sanos en el análisis histológico, y variables agronómicas (peso medio del bulbo, porcentaje de conservación poscosecha, porcentaje de floración prematura). Se utilizó el software PAST <sup>(14)</sup>.

## 2.5. RESULTADOS

### 2.5.1. Evaluación de la resistencia en familias segregantes

La severidad de *Peronospora destructor* se evaluó mediante prueba de progenie en seis familias segregantes obtenidas de cruzamientos entre cultivares nacionales y Regia como fuente de resistencia. La prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov (Plataforma R) probó la distribución normal de las líneas para cuatro familias, pero no para las familias 15601 y 14611.

Las familias segregantes Regia x Santina (15605), Regia x Casera (14603) y Regia x INIA Fagro Dulce (14606) mostraron diferencias significativas entre líneas en la severidad (Cuadro 3). En todas las familias, algunas líneas no difirieron significativamente de Regia, aun cuando Regia presentó la menor severidad promedio en todos los casos. En tanto, no se encontraron diferencias significativas entre líneas en las familias Regia x Naqué (15601), Regia x Pantanoso del Sauce (14609) e INIA Fagro Dulce x Regia (14611). La baja diferenciación en estas tres últimas familias estaría explicada por la variabilidad entre repeticiones y la menor respuesta diferencial entre las líneas.

La Figura 2 presenta histogramas de frecuencias de severidad para cada familia, y los cuatro cultivares utilizados como control y como padres de cruzamientos. En cuatro de las seis progenies la segregación de las líneas F1S1 fue sesgada hacia la respuesta del padre susceptible. Regia x Naqué (15601) y Regia x Casera (14603) presentaron segregación sesgada con transgresividad hacia susceptibilidad, con líneas más susceptibles que el padre susceptible. En el cruzamiento Regia x Santina (15605), todos los individuos fueron intermedios entre los padres con distribución sesgada hacia Santina, el padre susceptible, mientras que para Regia x Pantanoso (14609) la distribución de las líneas fue normal, con respuestas intermedias entre los padres (Figura 2).

Finalmente, se evaluaron dos cruzamientos recíprocos, Regia x INIA Fagro Dulce (14606) e INIA Fagro Dulce x Regia (14611). En ambas progenies todas las líneas tuvieron un comportamiento intermedio entre los padres (Figura 2). En el cruzamiento que Regia actuó como madre (14606), la segregación fue intermedia

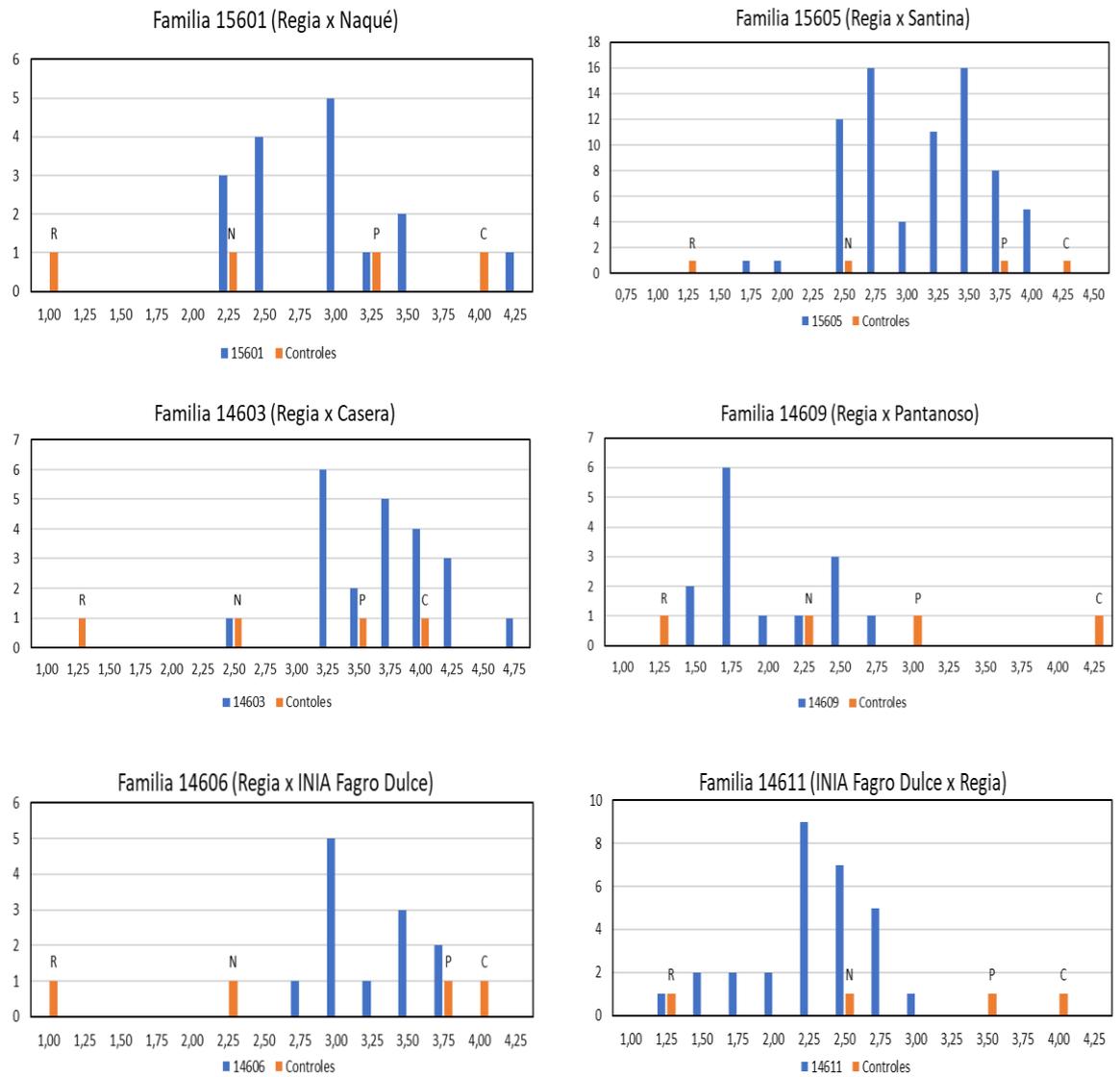
entre los padres y sesgada hacia la susceptibilidad, en forma similar a las segregaciones ya descritas. Sin embargo, en el cruzamiento en que Regia actuó como dador de polen (14611), el comportamiento de la progenie fue intermedio y sesgado hacia la resistencia.

**Cuadro 3.** Prueba de comparación de medias (Tukey) dentro de las tres familias segregantes para las que se encontraron diferencias significativas entre líneas. Para cada una de las familias se incluyeron cultivares controles.

Identificación	Familias segregantes <sup>a</sup>		
	15605 Regia x Santina	14603 Regia x Casera	14606 Regia x Dulce
<i>Cultivares controles</i>			
Regia	1,10 a	1,10 a	0,75 a
Naqué	2,35 ab	2,26 a	2,05 a
Pantanoso	3,50 bc	3,30 abc	3,53 bc
Casera	4,18 c	4,00 abc	4,00 c
<i>Líneas FIS1 <sup>b</sup></i>			
Segregación	4 (1,63-1,83) a	3 (2,50-3,12) a	1 (2,54) a
	10 (2,35-2,48) ab	4 (3,20-3,24) ab	3 (2,74-2,77) ab
	42 (2,50-3,40) abc	11 (3,26-4,00) abc	6 (2,80-3,40) abc
	10 (3,46-3,53) bc	2 (4,18-4,20) bc	2 (3,37-3,48) bc
	7 (3,69-3,90) c	2 (4,25-4,53) c	2 (3,52-3,64) c
<i>Total de líneas</i>	<u>74</u>	<u>22</u>	<u>14</u>

<sup>a</sup> Dentro de cada columna, las medias seguidas de una misma letra no difieren en forma significativa ( $p \leq 0,05$ ).

<sup>b</sup> Se indica el número de líneas FIS1, seguido del rango de severidad, para cada grupo con diferencias estadísticas.



**Figura 2.** Histogramas de distribución de la severidad en las líneas F1S1 por familia. Las barras de color azul representan el número de líneas F1S1 y las barras de color rojizo son los cultivares control Regia (R), Naqué (N), Pantanoso del Sauce CRS (P) e INIA Casera (C).

**Cuadro 4.** Evaluación de la segregación de características agronómicas para las seis familias segregantes F1S1 y los cuatro cultivares control.

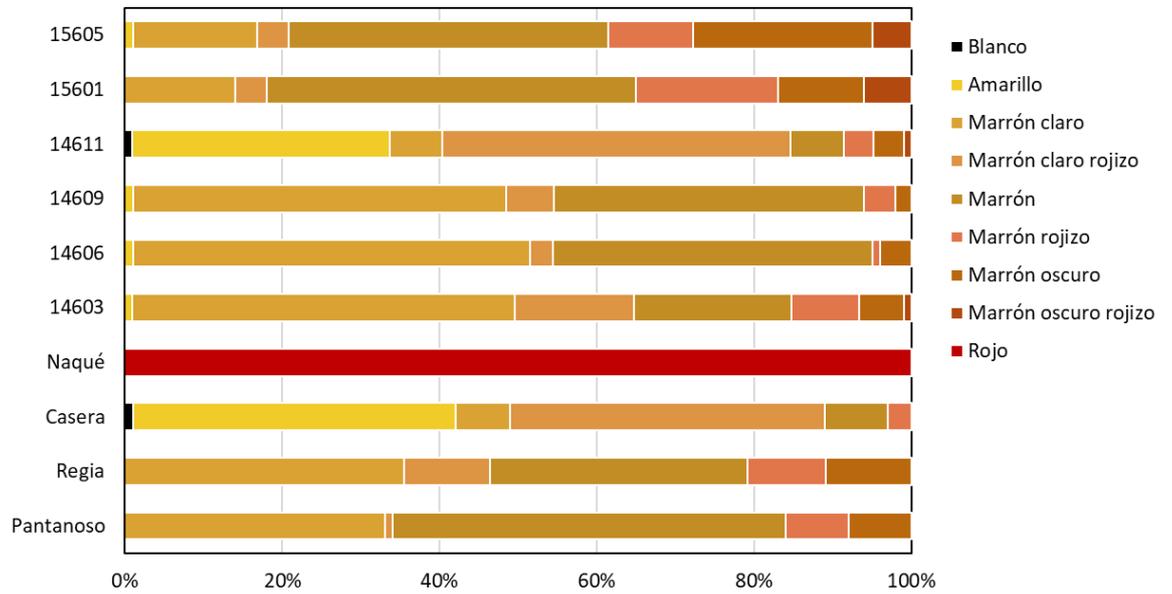
<b>Familia</b>	<b>Peso promedio del bulbo (g)</b>	<b>Cerrado del cuello</b>	<b>Conservación (%)</b>
<i>Controles</i>			
Pantanoso del Sauce	110,3	20,1	84,9
Regia	104,6	7,2	33,7
INIA Casera	63,3	9,4	40,2
Naqué	65,1	16,1	69,3
<i>Progenies de cruzamientos</i>			
14603	64,3	12,0	73,5
14606	72,5	13,4	66,4
14609	62,8	12,9	68,8
14611	80,9	11,6	71,9
15601	78,5	9,6	32,9
15605	126,6	12,4	61,5

Cerrado del cuello: cociente entre el diámetro mayor y diámetro menor.

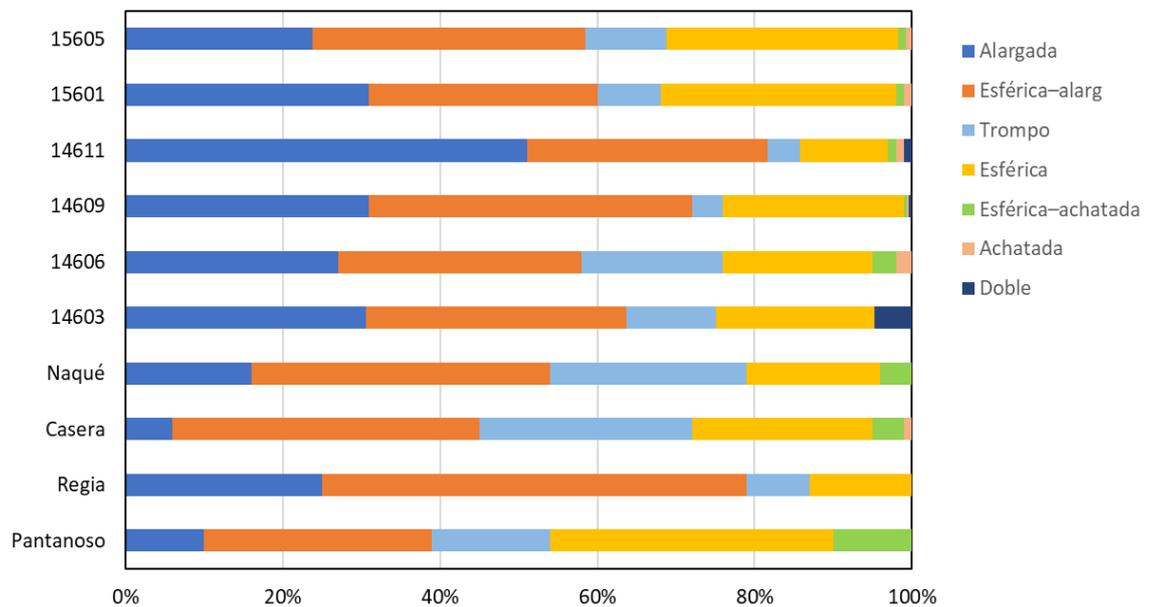
Conservación poscosecha: porcentaje de bulbos sanos comerciales en mayo.

#### **Análisis estadístico???**

En la evaluación de características agronómicas, Pantanoso del Sauce CRS presentó el mayor peso promedio del bulbo, cerrado del cuello y mejor conservación poscosecha (Cuadro 4). La familia Regia x Santina fue la que presentó en promedio mejor peso promedio del bulbo, superior a los cultivares control, lo que indica la expresión de vigor híbrido. Cinco de las seis progenies presentaron cerrado de cuello y conservación poscosecha con valores intermedios entre los padres, superiores a Regia (Cuadro 4).



**Figura 3.** Segregación del color de las catáfilas externas del bulbo en categorías de colores, para las seis poblaciones segregantes y cuatro cultivares control (referencia (ej. descriptores IPGRI, UPOV)).



**Figura 4.** Evaluación de la segregación de la forma de los bulbos para las familias segregantes S1F1 y cuatro cultivares control.

En la segregación del color se observó mayor diversidad dentro de las familias segregantes que dentro de los cultivares (Figura 3), aun cuando cultivares mejorados tienen variabilidad en el color de bulbos como variedades de polinización abierta. La mayor proporción de individuos fueron marrón claro a marrón para todas las progenies. Aparecen tonalidades rojizas asociadas a las coloraciones amarronadas. La frecuencia de bulbos completamente blancos o amarillos es baja, con mayor frecuencia en la progenie INIA Fagro Dulce x Regia.

La segregación de la forma del bulbo tuvo una mayor diversidad dentro de las familias segregantes que dentro de los cultivares (Figura 4). Dentro de los cultivares se observó variabilidad en la forma, ya que son variedades de polinización abierta, inclusive en la variedad 'Regia'. La mayoría de los individuos se concentraron en los grupos esférica alargada, trompo y esférica. Dentro de las poblaciones F1S1 se observó segregación sesgada hacia bulbos alargados y esférico-alargados. La presencia de bulbos achatados fue baja, aunque este tipo de bulbos se encontró en todas las poblaciones (Figura 4).

### **2.5.2. Evaluación de líneas avanzadas PxR F1S2**

Once líneas avanzadas F1S2 Regia x Pantanoso del Sauce CRS y dos poblaciones regeneradas a partir de esas líneas fueron evaluadas en su respuesta a *Peronospora destructor*, con cinco cultivares nacionales. La evaluación de la severidad se realizó en dos momentos, agosto y noviembre de 2017. Se encontraron diferencias significativas entre materiales genéticos en los dos momentos de evaluación (Kruskall-Wallis,  $p < 0,05$ ). No se encontraron diferencias significativas entre los momentos de evaluación (para  $p$ -valor = 0,05 ni 0,10), ni en la interacción entre momento de evaluación y material genético. Se realizó una prueba de comparación de medias para cada momento de evaluación (Cuadro 5).

La variedad Regia fue la que presentó menor severidad, y los cultivares Pantanoso del Sauce, Santina y Casera se comportaron como susceptibles, fueron los que tuvieron mayor severidad. El cultivar Naqué tuvo un comportamiento intermedio, moderadamente susceptible. Las líneas avanzadas Regia por Pantanoso (RxP) y las poblaciones "PxR elite" y "PxR general" tuvieron un comportamiento

intermedio entre los padres (Cuadro 5). Como era esperado, “PxR general” fue más susceptible que “PxR elite”, ya que en la interpolinización de la elite intervinieron las once líneas más resistentes del ciclo de selección anterior.

**Cuadro 5.** Evaluaciones de severidad para los dos momentos: agosto y noviembre 2017. Prueba de comparación de medias (Tukey) entre los diferentes materiales.

Identificación	Agosto	Noviembre
Regia	0,81 a	1,00 a
22E	1,61 b	1,98 d
22D	1,86 bc	1,58 bc
22B	1,95 cd	1,45 b
10 A	2,00 cde	3,26 jk
PxR elite	2,05 cde	2,28 ef
22F	2,11 cde	2,11 de
Naqué	2,24 def	1,83 cd
9B	2,26 ef	2,44 fg
10B	2,43 fg	2,80 hi
10D	2,44 fg	2,51 fgh
5 A	2,45 fg	2,44 fg
5B	2,44 fg	2,68 ghi
10E	2,75 gh	3,18 j
PxR general	2,84 h	2,86 i
Pantanos del Sauce	3,81 i	4,15 m
Santina	3,90 i	3,56 kl
Casera	4,23 i	3,95 lm

Medias seguidas de una misma letra no son significativamente diferentes (p=0,05).

En la evaluación en agosto, las líneas 22E, 22D, 22B y 10A fueron las que presentaron menor severidad después de Regia. La regeneración “PxR general” se comportó significativamente mejor que las variedades más susceptibles (Pantanoso del Sauce, Santina y Casera), pero tuvo mayor severidad que las líneas PxR en evaluación. Si bien se diferenció del padre susceptible, con la población “PxR general” no se alcanzó un gran avance en la resistencia. En el segundo momento de evaluación, Regia fue el material más resistente y significativamente diferente de los demás (Cuadro 5). Las líneas 22B, 22D y 22E fueron las que nuevamente encabezaron el ranking de resistencia después de Regia. Para la mayoría de los materiales genéticos, la severidad aumentó en el segundo momento de evaluación.

Sin embargo, 22F, 5A y ‘PxR general’ permanecieron con niveles de severidad similares en las dos evaluaciones (Cuadro 5). Los materiales moderadamente resistentes 22D, 22B y Naqué presentaron menor severidad en la segunda evaluación. Por el contrario, la línea 10A presentó alta resistencia inicial, pero baja resistencia en la segunda evaluación.

No se encontraron diferencias significativas para el peso promedio del bulbo ( $p$ -valor = 0,176). Se encontraron diferencias en la conservación poscosecha ( $p$ -valor < 0,001) (Cuadro 6). Los cultivares Pantanoso del Sauce CRS y Naqué presentaron una conservación poscosecha superior al 90% al igual que “PxR general”, y las líneas avanzadas 22B, 22D, 22F, 5B y 10E. En el otro extremo, la línea 22E fue la que presentó menor conservación poscosecha (61,8 %) y se diferenció estadísticamente de todos los materiales, seguida del cultivar Santina y las líneas 10B y 10 A (Cuadro 6).

La línea 22E mostró mayor floración prematura y se diferenció estadísticamente. Se identificó un grupo intermedio para floración prematura compuesto por el cultivar Santina y las líneas 10A y la 10B. Los otros materiales mostraron bajo porcentaje de floración.

**Cuadro 6.** Evaluación poscosecha de las líneas avanzadas y los cultivares evaluados: conservación poscosecha (porcentaje), porcentaje de floración, color y forma predominante.

<b>Identificación</b>	<b>Conservación</b>		<b>Floración</b>		<b>Color</b>	<b>Forma predominante</b>
	<b>(%)</b>		<b>(%)</b>			
22E	61,8	a	37,5	f	<b>BR</b>	Esférica – alargada
Santina	78,3	b	20,5	e	<b>B</b>	Esférica – alargada
10B	80,3	bc	18,0	de	<b>BCR</b>	Esférica – alargada
10 <sup>a</sup>	83,3	bcd	15,3	bcde	<b>B</b>	Esférica – achatada
10D	85,5	bcde	12,0	abcde	<b>BC</b>	Trompo
9B	86,0	bcde	8,0	abcd	<b>B</b>	Trompo
PXR elite	87,8	bcde	8,3	abcd	<b>BC</b>	Esférica
5 <sup>a</sup>	88,8	bcde	6,5	abcd	<b>BR</b>	Trompo
Regia	89,0	bcde	4,0	abc	<b>BC</b>	Esférica – alargada
22B	91,0	bcde	7,5	abcd	<b>BR</b>	Trompo
22D	91,8	cde	4,5	abc	<b>BC</b>	Trompo
Pantanoso	92,0	cde	3,0	abc	<b>BO</b>	Esférica
22F	92,0	cde	6,5	abcd	<b>BR</b>	Esférica
5B	92,8	cde	4,5	abc	<b>B</b>	Trompo
10E	94,8	de	4,5	abcd	<b>BO</b>	Trompo
PXR general	95,5	de	1,5	ab	<b>B</b>	Esférica
Naqué	96,8	e	0,0	a	<b>R</b>	Esférica – alargada

Para cada columna, medias seguidas de una misma letra no son significativamente diferentes ( $p>0,05$ ). Color: (**B**: bronceado, **BR**: bronceado-rojizo; **BC**: bronceado claro; **BCR**: bronceado claro-rojizo; **BO**: bronceado oscuro; **R**: roja).

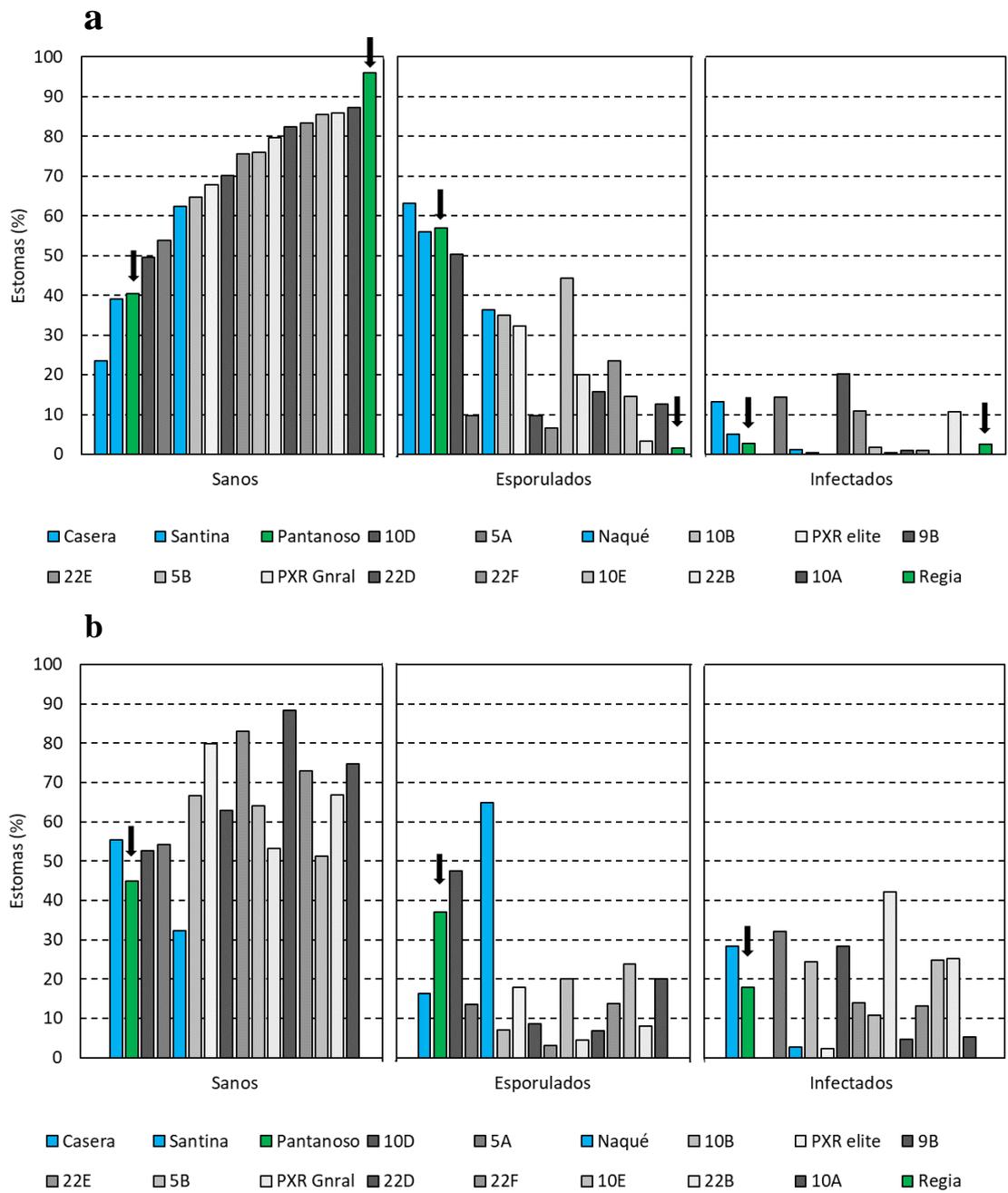
### **2.5.3. Observaciones histológicas del tejido infectado**

Se caracterizó la composición del tejido infectado de muestras colectadas a campo al evaluar la severidad (agosto y noviembre). Para los dos momentos, el conteo de estomas sanos para las líneas PXR y las dos poblaciones regeneradas fue intermedio entre los padres Regia y Pantanoso del Sauce CRS (Figura 5), resultado similar a la evaluación de severidad (Cuadro 5).

En agosto se observó alta proporción de estomas esporulados y menor proporción de infecciones subestomáticas que en noviembre. En cortes transversales con micrótopo se concluyó que las manchas que se ven como infecciones subestomáticas son lesiones viejas. Los bordes que se observan más oscuros son producto del colapso de las células muertas. Se encontraron diferencias significativas entre los materiales evaluados para la proporción de estomas sanos en agosto y noviembre ( $p$  valor  $< 0,0001$ ) y se realizó una prueba Tukey.

En términos generales, los materiales estudiados presentaron mayor proporción de estomas sanos en agosto que en noviembre (Cuadro 7). En agosto, Regia presentó la mayor proporción de estomas sanos y se diferenció estadísticamente de los demás materiales evaluados. La proporción de estomas esporulados y de estomas con infección subestomática en Regia fue de 1,6 % y 2,8 % respectivamente. Pantanoso del Sauce, en la primera evaluación, tuvo 40,4 % de estomas sanos, 58,9 % esporulados y 2,8 % de estomas con infección subestomática. Los estomas sanos en Pantanoso del Sauce aumentaron en noviembre (45 %), las infecciones subestomáticas aumentaron (17,9 %) y disminuyó la proporción de estomas esporulados (Figura 5).

Las líneas 10 A, 22B, 10E, 22F y 22D fueron las que presentaron menor proporción de estomas sanos después de Regia. La población “PXR elite” tuvo mayor proporción de estomas sanos que “PXR general”, diferencia estadísticamente significativa. El cultivar que presentó menor proporción de estomas sanos fue INIA Casera, significativamente diferente a los demás cultivares para esta variable. El cultivar Naqué fue intermedio para estomas sanos y se diferenció estadísticamente de otros cultivares evaluados (Cuadro 7).



**Figura 5.** Histogramas de frecuencia de estomas sanos, esporulados y con infección visible de la cámara subestomática para todas las líneas y los cultivares evaluados en (a) agosto y (b) noviembre. Las flechas indican la posición de los padres (Regia y Pantanoso del Sauce CRS, columnas verdes) para cada variable. En noviembre no fueron evaluadas INIA Casera ni Regia por su avanzado estado de senescencia.

**Cuadro 9.** Porcentaje de estomas sanos, esporulados o con infección subestomática de *Peronospora destructor* para los dos momentos de evaluación: agosto y noviembre 2017.

Identificación	Estomas sanos		Estomas esporulados				Estomas infectados	
	agosto (%)	noviembre (%)	agosto (%)	noviembre (%)	agosto (%)	noviembre (%)	agosto (%)	noviembre (%)
Regia	95,9 a	-	1,6 a	-	2,5 cde	-		
10 A	87,3 b	74,8 c	12,7 de	20,0 de	0 a	5,3 c		
22B	85,9 b	66,8 d	3,4 b	8,0 b	10,9 f	25,2 f		
10E	85,4 bc	51,3 ef	14,6 e	23,8 f	0 a	24,9 f		
22F	83,3 bc	73,0 c	15,8 ef	13,8 c	0,9 abc	13,2 d		
22D	82,4 bc	88,4 a	6,7 c	6,9 b	10,7 f	4,7 c		
PXR general	79,7 cd	53,3 ef	20,0 fg	4,5 a	0,3 ab	42,3 h		
5B	75,9 d	64,1 d	9,8 d	20,1 ef	14,3 f	10,8 d		
22E	75,6 de	83,0 b	23,5 g	2,1 a	0,9 abcd	13,9 d		
9B	70,1 ef	62,9 d	9,7 d	8,7 b	20,2 g	28,4 i g		
PXR Elite	67,8 fg	79,9 b	32,2 h	19,9 d	0 a	2,3 b		
10B	64,6 gh	66,6 d	35,0 h	7,0 b	0,3 ab	24,4 f		
Naqué	62,4 h	32,4 h	36,4 h	64,9 i	1,2 abcd	2,7 b		
5 A	53,8 i	54,3 ef	44,4 i	13,6 c	1,85 bcde	32,1 g		
10D	49,4 i	52,6 f	50,4 ij	47,4 h	0 a	0 a		
Pantanos del Sauce	40,4 j	45,0 g	56,9 jk	37,1 g	2,7 de	17,9 e		
Santina	39,1 j	55,4 e	55,9 jk	16,3 cd	5,0 e	28,4 fg		
INIA Casera	23,5 k	-	63,2 k	-	13,3 f	-		

Prueba de comparación de medias (Tukey). Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Las líneas 22 presentaron un comportamiento intermedio entre los padres, con proporciones de estomas sanos más cercanas a Regia que a Pantanoso (Figura 5). La línea 22D fue la que mostró mayor proporción de estomas sanos y se diferenció de todos los otros materiales. La línea 22E y “PXR Elite” siguieron a la línea 22D. En la población “PXR general” y en Naqué los estomas sanos disminuyeron significativamente en la segunda evaluación. Pantanoso continuó como uno de los cultivares con menor proporción de estomas sanos, con diferencia significativa. En las muestras del primer momento de evaluación, Naqué presentó esporangios inmaduros, mientras que el resto de los controles mostraron esporangios maduros, incluso algunos que ya habían desarrollado una hifa capaz de iniciar una infección secundaria.

Se encontraron diferencias significativas para la proporción de estomas con esporulación en agosto y en noviembre ( $p$ - valor  $< 0,0001$ ) (Cuadro 9). En la evaluación de agosto, Regia presentó la menor proporción de estomas esporulados, con diferencia significativa. Las líneas 22B y 22D fueron las siguientes, con diferencia significativa con los otros materiales.

La línea 9B fue intermedia en proporción de estomas sanos, pero cuando se ordenan por estomas con esporulación se posicionó en cuarto lugar. En la proporción de estomas con infección subestomática, 9B fue el material vegetal que presentó mayor infección, con diferencias estadísticamente significativas. La línea 5B tuvo un comportamiento similar a la línea 9B. Los cultivares que presentaron mayor proporción de estomas esporulados fueron INIA Casera, Pantanoso del Sauce y Santina. Las líneas con mayor proporción de estomas esporulados fueron 10D y 5 A.

En la evaluación de noviembre las líneas 22E y ‘PXR general’ fueron las que presentaron menor proporción de estomas esporulados, diferencia estadísticamente significativa con otros materiales. Las líneas 22D, 10B, 22B y 9B fueron las siguientes, sin diferencias significativas entre ellas. Las variedades Pantanoso del Sauce, Naqué, y la línea 10D fueron las que presentaron mayor proporción de estomas con esporulación.

Los materiales evaluados se diferenciaron menos por la proporción de estomas con la cámara subestomática infectada que por la proporción de estomas sanos y de estomas esporulados (Cuadro 9). En agosto, las líneas 10D, 10E, 10 A y la

población “PXR Elite” no tuvieron estomas con infección subestomática (Cuadro 9). Las líneas 22D, 22B, 5B y 9B e ‘INIA Casera’ fueron los materiales que presentaron mayor proporción de estomas con infección subestomática.

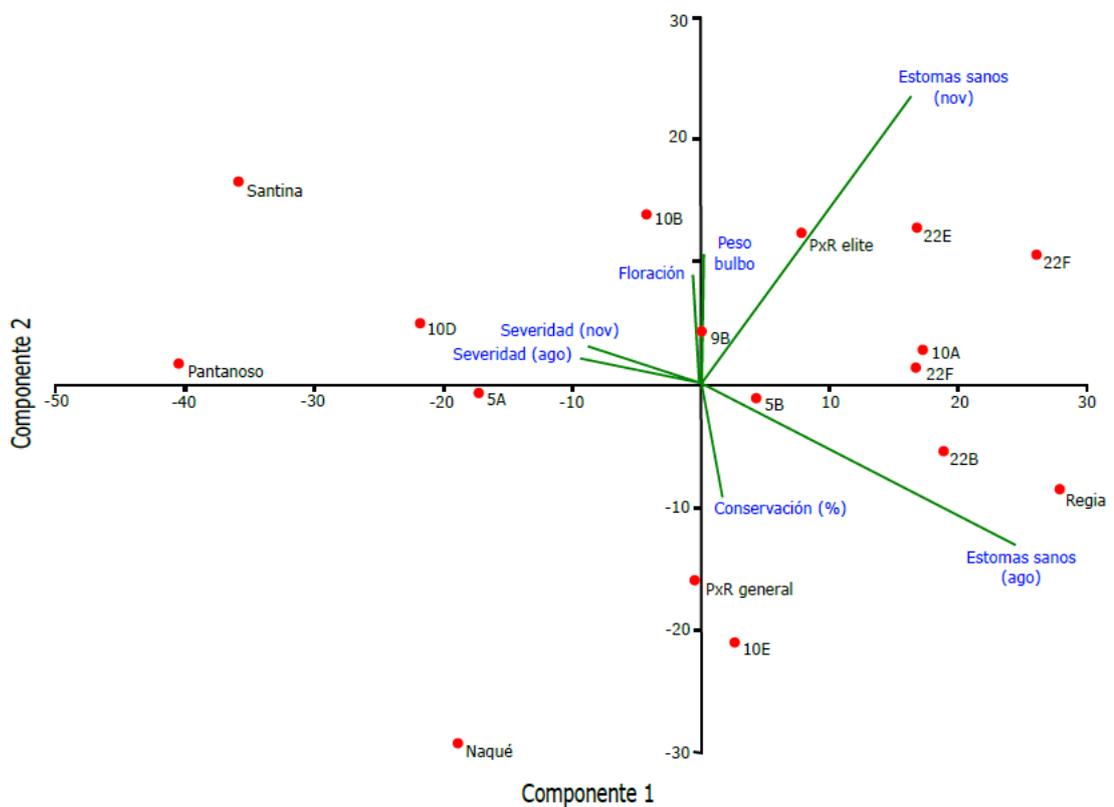
Los materiales 22E, “PXR elite”, Pantanoso del Sauce y Santina mostraron un aumento en la proporción de estomas sanos de una evaluación a la otra, principalmente por la disminución de los estomas con esporulación. Sin embargo, en la línea 10D la esporulación no presenta grandes cambios en la evolución de la proporción de estomas con esporulación y el cambio en los estomas enfermos se debió a la disminución de estomas con infección subestomática. En las líneas 5 A y 10B se observaron cambios en la composición de estomas enfermos de agosto a noviembre, con un aumento en la proporción de estomas con infección subestomática y un descenso en la proporción de estomas esporulados.

La correlación entre la evaluación de la severidad de *Peronospora destructor* con la proporción de estomas sanos para los dos momentos de evaluación fue negativa ( $r = -0,73$ ; P-valor = 0,0008). La correlación entre la severidad y la proporción de estomas con esporulación fue positiva (0,57; p valor = 0,01). La severidad se correlacionó mejor con la proporción de estomas sanos que con la esporulación.

En el análisis de Componentes Principales (PCA), el componente principal 1 explicó el 34,0 % de la varianza, mientras que el componente principal 2 explicó el 23,2 % de la varianza (Figura 4). Los vectores de severidad y de proporción de estomas sanos explican la mayor variación para el componente principal 1. Los vectores conservación poscosecha, floración y peso del bulbo explican la mayor variación para el componente principal 2.

Las variables severidad en agosto y noviembre se ubicaron en sentido opuesto a las variables proporción de estomas sanos, lo que refleja que las variables están correlacionadas negativamente. Los materiales que más se asociaron a los vectores de severidad fueron Pantanoso del Sauce y Santina, seguidos por las líneas 10D y 5 A. En el sentido opuesto a los vectores de severidad se ubicaron Regia, en la posición más distal, seguida de las líneas 22B, 22D, 22F, 22E y 10 A. El peso promedio del bulbo y el porcentaje de floración indican que pueden ser variables independientes de

la resistencia, y por lo tanto se pueden seleccionar simultáneamente. El vector de la variable conservación fue opuesto al porcentaje de floración, indicando que materiales con mayor porcentaje de floración prematura tuvieron menos conservación poscosecha. Los materiales más asociados al vector conservación fueron “PxR general”, Naqué, 5 A y 10E (Figura 4).



**Figura 4.** Análisis de componentes principales para las líneas avanzadas de cruzamientos ‘Regia’ x ‘Pantanos del Sauce’, los cultivares parentales y cultivares controles, en variables de respuesta a *Peronospora destructor* y variables agronómicas.

## 2.6. DISCUSIÓN

El alto nivel de resistencia parcial de 'Regia' ha sido consistente, tanto en este trabajo como en evaluaciones anteriores <sup>(8)</sup>. En el análisis de Regia como fuente de resistencia, la segregación en las progenies ha sido cuantitativa y variable. Esto da indicios de que son varios los mecanismos de resistencia parcial presentes. Ante los diversos resultados obtenidos, debe tenerse en cuenta la diversidad genética entre individuos dentro de las variedades de polinización abierta, incluyendo a la variedad Regia como fuente de resistencia parcial.

Cuatro de las seis progenies estudiadas tuvieron segregación de la severidad sesgada hacia la susceptibilidad. Este resultado también es coincidente con resultados anteriores <sup>(8)</sup>. En el cruzamiento Regia x Pantanoso del Sauce la segregación fue intermedia entre los padres, respuesta esperada cuando la resistencia es parcial, de expresión cuantitativa, y por lo tanto están involucrados genes de efectos acumulativos. En general, la resistencia parcial es una característica de herencia cuantitativa, explicada por genes con efectos menores <sup>(7)</sup>. Cuando se estudian progenies provenientes de cruzamientos biparentales, como en este trabajo, se espera encontrar una segregación cuantitativa continua <sup>(7)</sup>.

Los cruzamientos de Regia con Naqué, INIA Fagro Dulce, Santina e INIA Casera presentaron segregaciones sesgadas hacia la susceptibilidad. Naqué es moderadamente susceptible y tiene un tipo de respuesta muy específica: es tempranamente colonizada, con valores altos de incidencia en evaluaciones tempranas en la estación de crecimiento pero que no llevan a valores altos de severidad al final de la temporada <sup>(8)</sup>. Sin embargo, líneas de este cruzamiento fueron tan o más susceptibles que Naqué, con segregación transgresiva. En esta progenie en que los dos padres tienen cierto grado de resistencia, era esperable que segregaran de forma normal o que algunos individuos acumularan alelos favorables para la resistencia provenientes de los dos padres. La segregación transgresiva implica que ambos padres portan genes para el rasgo de interés, y si los alelos de ambos padres son diferentes pueden acumularse en individuos de la progenie, y se obtendría un nivel de resistencia mayor que en ambos padres <sup>(15)</sup>. En el caso Regia x Naqué la segregación fue hacia la susceptibilidad, lo que estaría causado por la acumulación

de alelos desfavorables o combinaciones epistáticas que confieren susceptibilidad en algunos individuos.

Aghnoum y Niks <sup>(15)</sup> encontraron que la segregación transgresiva es un fenómeno muy común en cebada cuando se estudia la resistencia parcial al oidio. Una gran diversidad de genes de efecto cuantitativo contribuye a la resistencia a la enfermedad. De acuerdo con los resultados en el presente trabajo, se deduce que la resistencia a *P. destructor* estaría explicada por numerosos genes y se requiere la acumulación de estos alelos favorables para la expresión de altos niveles de resistencia.

La herencia sesgada hacia la susceptibilidad en la F1S1 podría indicar, además, que los alelos involucrados en la respuesta resistente son recesivos. El cruzamiento con variedades susceptibles impide la expresión fenotípica de estos alelos, que sólo se pueden manifestar en homocigosis y quedan enmascarados en los heterocigotos. Han sido reportados varios ejemplos de genes de susceptibilidad que confieren resistencia por pérdida de función <sup>(16)</sup>. Por ejemplo, el gen *mlo* en cebada que en estado recesivo confiere resistencia al oidio causado por *Blumeria graminis* f.sp. *horedi* <sup>(16)</sup>, así como un gen de la misma familia reduce la susceptibilidad al oidio en *Vitis vinifera* <sup>(17)</sup>.

El cruzamiento INIA Fagro Dulce x Regia fue el único que tuvo segregación sesgada hacia la resistencia, y también el único en el que Regia actuó como dador de polen. Este resultado es indicativo de la presencia de efectos recíprocos, si bien se requerirán mayores estudios, ya que las familias segregantes estuvieron formadas por pocas líneas, y el cultivar INIA Fagro Dulce no fue expresamente incluido como control. Es necesario corroborar si la herencia de la resistencia está influenciada por genes citoplasmáticos que se heredan con la madre. En este caso, la expresión de la resistencia parcial en Regia podría ser inhibida en sus progenies por la interacción de alelos del padre susceptible con genes citoplasmáticos provenientes de Regia. En cruzamientos recíprocos de maíz, Gonzalo et al. <sup>(18)</sup> estudiaron efectos genéticos recíprocos para varias características fenotípicas, e identificaron y mapearon genes nucleares que intervienen en efectos recíprocos. Hay poco consenso sobre la importancia relativa y la explotación sistemática de los efectos de la herencia

recíproca. En general estos efectos no son consistentes en todos los ambientes ni en todos los entornos genéticos <sup>(18)</sup>.

En este trabajo se realizó únicamente evaluación fenotípica de la resistencia. Se requerirá contar con familias segregantes más grandes para comprender con mayor precisión la base genética de la resistencia, en estudios que permitan integrar marcadores moleculares para determinar la base genética y los mecanismos involucrados. Cuando los efectos son sólo aditivos, la acumulación de alelos favorables resulta en mayores niveles de resistencia. Para el mildiú de la lechuga, han sido reportadas una gran variedad de interacciones entre loci que intervienen en la resistencia cuantitativa, lo cual dificulta la herencia de la resistencia y su estudio <sup>(19)</sup>. La identificación de loci cuantitativos podría brindar información sobre la presencia y abundancia de genes involucrados en la resistencia parcial frente a *P. destructor* en las familias segregantes.

Las líneas avanzadas F1S2 mostraron un comportamiento intermedio entre los padres. Esto se observó para las once líneas en la evaluación de agosto y para nueve de las once líneas en noviembre. Este comportamiento es esperable debido a que estas líneas ya habían sido sometidas a un ciclo de selección, pero ninguna alcanzó el nivel de resistencia de Regia, resultado indicativo de la base genética compleja de esta característica. Al igual que para otras características complejas como el rendimiento y la adaptación, realizar más de un ciclo de cruzamiento con Regia podría contribuir a un mayor nivel de resistencia en las progenies.

La resistencia de los materiales en los que disminuye la severidad a medida que avanza la estación de crecimiento (por ejemplo, 22D, 22B y la variedad Naqué) estaría asociada a la dificultad del patógeno para reproducirse y generar infecciones secundarias en el hospedero. Estos mecanismos de resistencia desencadenados una vez que la infección inicial está instalada también comprenden defensas del tipo sistémicas. Por ejemplo, la vía del ácido salicílico es activada contra patógenos biótropos, como *Peronospora destructor*, y vinculada a mecanismos de defensa sistémica adquirida (SAR) que implican la inducción de defensas en tejidos alejados al foco de infección <sup>(21)</sup>.

Por el contrario, la línea 10 A presentó una baja severidad inicial, pero alta severidad al final de la temporada. La resistencia inicial indica que el hospedero tendría barreras para la instalación de la infección, pero una vez que el patógeno logra superarlas, las infecciones secundarias ocurren sin resistencia del hospedero.

La severidad y la proporción de estomas enfermos (esporulados o estomas con infección subestomática) en observaciones histopatológicas miden parámetros diferentes. Con la severidad se evalúa la proporción del tejido de la planta afectado, mientras que la evaluación a nivel histológico apunta a caracterizar el tejido infectado. Si bien son variables independientes, se encontró que están altamente correlacionadas.

Las diferencias en la composición del total de estomas enfermos pueden explicar diferentes mecanismos involucrados. La reducción del desarrollo de la epidemia es debida a varios componentes de la resistencia parcial: aumento del periodo de latencia, menor frecuencia de la infección y menor producción de esporas (<sup>7</sup>). Los cambios entre una evaluación y otra pueden deberse a diferentes procesos: dificultad del patógeno para colonizar el tejido del hospedero o dificultad para reproducirse y por lo tanto generar inóculo para infecciones secundarias.

Este estudio contribuyó a conocer las diferencias entre los materiales evaluados en cuanto a los componentes de la resistencia parcial. Por un lado, las diferencias en la capacidad del patógeno de reproducirse en el tejido del hospedero a través de la proporción de estomas con esporulación. Por otro lado, la capacidad de colonización del tejido del hospedero a través de la proporción de estomas con infección en la cámara subestomática. En Regia y materiales que presentaron menor severidad, el tejido infectado estuvo compuesto por mayor proporción de estomas sanos. La proporción de estomas sanos comparativamente baja dentro del tejido infectado podría tomarse como variable para la selección.

Además de la resistencia, las líneas avanzadas se evaluaron para variables de interés agronómico como el peso y la calidad de los bulbos. En comparación con los cultivares nacionales no se encontraron diferencias significativas para el peso promedio del bulbo, lo que implica, que las líneas avanzadas seleccionadas por resistencia tienen un potencial similar a cultivares nacionales comerciales. En la

conservación poscosecha, color y forma del bulbo, hay diversidad entre líneas y con respecto a los cultivares. Con estas líneas se ha avanzado en resistencia y existe diversidad entre y dentro de las líneas para seleccionar por características agronómicas. El siguiente paso será seleccionar las líneas con mayor resistencia parcial, y ajustar las características agronómicas hacia la liberación de una variedad de polinización abierta con buenas características agronómicas y moderadamente resistente a *P. destructor*.

La conservación poscosecha y la severidad resultaron independientes en el análisis multivariado, por lo que se puede seleccionar por resistencia a *Peronospora destructor* sin que afecte la conservación poscosecha. Lo mismo sucede con el porcentaje de floración, ya que líneas como la 22F, 22B, 22D mostraron baja severidad frente a *P. destructor*, alto porcentaje de conservación poscosecha y bajo porcentaje de floración.

En síntesis, se encontró un comportamiento recesivo de la resistencia de 'Regia' y la ocurrencia de efectos recíprocos, pero la determinación de la base genética de la resistencia requerirá estudios que involucren poblaciones segregantes más grandes y marcadores moleculares. Las líneas más resistentes no alcanzaron el nivel de resistencia de Regia. No obstante, permitirían el desarrollo de un cultivar de polinización abierta resistente a *Peronospora destructor* en comparación con los cultivares nacionales disponibles, con características agronómicas favorables.

## **2.7. AGRADECIMIENTOS**

La primera autora agradece la Beca del Sistema Nacional de Becas (SNB-ANII) que posibilitó este trabajo.

## **2.8. BIBLIOGRAFÍA**

1. Schwartz HF, Mohan SK. 2008. Compendium of onion and garlic diseases. St Paul: APS Press. 54p.
2. González PH, Colnago P, Peluffo S, González Idiarte H, Zipitria J, Galván G.A. 2011. Quantitative studies on downy mildew (*Peronospora destructor* Berk. Casp.) affecting onion seed production in southern Uruguay. European Journal of Plant Pathology, 129: 303 – 314.

3. Lorbeer, J. W., Kuhar T. P., Hoffmann M. P. (2002). Monitoring and forecasting for disease and insect attack in onions and *Allium* crops within IPM strategies. In H.D. Rabinowitch & L. Currah (Ed.), *Allium crop science: recent advances* (pp. 293–310). CABI Publishing.
4. Maeso D, Arboleya J, Fernández S, Suárez C, Medina V. 2000. Evaluación de un sistema de pronóstico para el control de enfermedades foliares en diferentes cultivares de cebolla. En: *Presentación de resultados experimentales en ajo y cebolla: Reunión de divulgación*. Montevideo: INIA. (Actividades de difusión; 223). Pp. 17 – 29.
5. Scholten OE, Van Heusden AW, Khrustaleva LI, Burger-Meijer K, Mank RA, Antonise RGC, Harrewijn JL, Van Haecke W, Oost EH, Peters RJ, Kik C. 2007. The long and winding road leading to the successful introgression of downy mildew resistance into onion. *Euphytica*, 156: 345 – 353.
6. Niks RE, Parlevliet JE, Lindhout P, Bai Y. 2011. *Breeding crops with resistance to diseases and pests*. Enfield : Enfield Pub & Distribution Co. 200p.
7. Jones H.A., Porter, D.R., Leach, L.D. 1939. Breeding for resistance to onion downy mildew caused by *Peronospora destructor*. *Hilgardia* 12(9): 531-550.
8. Warid W., Tims, E.C. 1952. Studies on the inheritance of resistance to downy mildew studies in onion incited by *Peronospora destructor*. *Phytopathology* 42: 22.
9. Kofoet A, Zinkernagel V. 1989. Resistance to downy mildew (*Peronospora destructor* (Berk.) Casp.) in *Allium* species. *Journal of Plant Disease and Protection*, 97(1): 13 -23.
10. Galván, G.A.; Arias, M.; González, P.H.; Curbelo, N.; Peluffo, S. 2016. Selection for resistance and histopathological relationships in the onion ‘Regia’ against downy mildew (*Peronospora destructor*). *Acta Horticulturae* 1143:15-22.
11. Galván, G.A.; Vicente, E.; Arias, M., González Rabelino, P. 2016b. Selección por resistencia a *Peronospora destructor* en el mejoramiento genético de cebolla (*Allium cepa* L.). Congreso Latinoamericano de genética, 16°. Montevideo, Uruguay. *Journal of Basic and Applied Genetics* 27 (1)S:295.

12. Siegel, S., 1956. Non-parametric statistics for the behavioral sciences. McGraw-Hill Book Co., New York, 312 pp.
13. Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2018. Centro de Transferencia InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
12. 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.
13. Arias, M.; González, P.H.; Galván, G.A. 2015. Análisis histológico del proceso de infección de *Peronospora destructor*, causante del mildiú de la cebolla (resumen). En: Jornada Nacional de Fitopatología, 3<sup>a</sup>. Montevideo, Uruguay. p.28.
14. Hammer Ø, Harper, D.A.T., Ryan P.D. 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* 4(1): 9p.
15. Aghnoum, R.; Niks, R.E.; (2011). Transgressive segregation for very low and high levels of basal resistance to powdery mildew in barley. *Journal of plant physiology*. 168. 45-50. doi:10.1016/j.jplph.2010.09.005
16. Pavan, S., Jacobsen, E., Visser, R.G.F. Bai, Y. (2010) Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. *Molecular Breeding*, 25:1-12.
17. Pessina, S.; Lenzi, L.; Perazzolli, M.; Campa, M.; Della Costa, L.; Urso, S.; Valé G.; Salamini, F. y Malnoy, M. (2016). Knockdown of MLO genes reduces susceptibility to powdery mildew in grapevine. *Horticulture Research* 3: 16016.
18. Gonzalo M., Vyn T., Holland J.B., McIntyre L.M., 2007. Mapping reciprocal effects interactions with density stress in *Zea mays* L. *Heredity* 99, 14-30.
19. Den Boer, E.; Pelgrom, K.T.B.; Zhang, N.W.; Visser, R.G.F.; Niks, R.E.; Jeuken, M.J.W. (2014) Effects of stacked quantitative resistences to downy mildew in lettuce do not simply add up. *Theoretical and applied genetics* 127(8): 1805-16.
21. Díaz-Puentes, L. N. (2012). Resistencia sistémica adquirida mediada por el ácido salicílico. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 10:257-267.

### **3. RELACIONES HISTOPATOLÓGICAS ENTRE CEBOLLA (*Allium cepa* L.) Y *Peronospora destructor* Berk. Casp.**<sup>2</sup>

#### **3.1. RESUMEN**

El mildiú de la cebolla causado por *Peronospora destructor* es una de las enfermedades más importantes del cultivo y de difícil control. Las observaciones histológicas del proceso de infección y de las respuestas de la planta constituyen un abordaje valioso para conocer las enfermedades y la identificación de variabilidad genética en la planta hospedera para el mejoramiento genético por resistencia. El objetivo de este trabajo fue observar respuestas de defensa de la planta y estudiar diferencias a nivel histológico entre materiales genéticos de cebolla con comportamientos diferentes a campo frente a *P. destructor*. Se tomaron muestras de hojas sanas y de hojas con manchas típicas con signo de la enfermedad del cultivar Pantanoso del Sauce CRS (PS, susceptible), Regia (resistencia parcial), y una línea del cruzamiento Regia x PS (moderadamente susceptible). Se realizaron cortes de hoja transversales con vibrátomo y las muestras fueron coloreadas con tinciones específicas para observar respuestas de defensa del genotipo hospedero. Las muestras fueron observadas al microscopio con luz transmitida y con filtro UV, según la tinción. Se observó que las hifas del patógeno se desarrollan sólo en el mesófilo en empalizada, y en ninguno de los genotipos la infección se expande al parénquima esponjoso. Diferencias anatómicas en la estructura del mesófilo en empalizada entre Regia y PS podría ser uno de los componentes asociados a la respuesta resistente de Regia. No se observaron deposiciones de calosa, y la acumulación de compuestos fenólicos no necesariamente se vio asociada a los sitios de infección. Es necesario continuar indagando para conocer las respuestas de defensa en esta fuente de resistencia parcial.

Palabras clave: oomycete, resistencia cuantitativa, respuestas de defensa.

---

<sup>2</sup> Este capítulo está preparado en base a las normas editoriales de “Agrociencia Uruguay”, para ser publicado como Arias et al. “Relaciones histopatológicas entre cebolla (*Allium cepa* L.) y *Peronospora destructor* Berk. Casp.”.

## 3.2. SUMMARY

### **Histopathological relationships between onion (*Allium cepa* L.) and *Peronospora destructor* Berk. Casp.**

Onion mildew caused by *Peronospora destructor* is one of the main onion cultivation and a hard to control diseases. Histological observations of the infection process and plant defense responses constitute a valuable approach to understand crop diseases and to identify host genetic variability for resistance breeding. The objectives of this research were to observe plant defense responses and to analyze histological differences between genetic materials with a range of field behavior against *P. destructor*. Samples from health leaves and mildew spotted leaves were collected, from the cultivar Pantanoso de Sauce CRS (PS), susceptible, Regia (partial resistant) and a breeding line PS x Regia (moderately susceptible). Leaves were catted out using a vibratome, and the samples were stained with specific stains to observe host defense responses. Samples were observed under microscope with transmitted light and UV filter, according to the staining. *Peronospora destructor* hyphae were observed only within the palisade parenchima, and the infection did not expand to the spongy parenchima in any genotype. Anatomical differences between Regia and PS palisade parenchima could be a component associated to resistant response in 'Regia'. Callose depositions were not identified. Cumulated phenolic compound were observed, but not clearly associated to pathogen infection. Further research is needed to understand partial resistance in Regia.

Keywords: oomycete, quantitative resistance, defence responses

## 3.3. INTRODUCCION

El mildiú del cultivo de cebolla (*Allium cepa* L.) causado por *Peronospora destructor* (Pd) es una enfermedad foliar muy destructiva y de difícil control <sup>(1)</sup>. Los mildiús son causados por oomicetes de la familia *Peronosporaceae*, parásitos obligados y causantes de enfermedades severas en numerosas plantas que incluyen a la mayoría de las hortalizas y gramíneas cultivadas <sup>(1)</sup>. El mildiú es un patógeno

obligado, por lo que se establece una relación íntima entre las membranas celulares de la planta y el patógeno, y se generan oportunidades para el reconocimiento y la activación de respuestas de defensa <sup>(2)</sup>.

En zonas en que las temperaturas durante el crecimiento del cultivo se encuentran entre 1 – 23 °C y ocurren periodos prolongados de hoja mojada, el desarrollo de síntomas es devastador, y las pérdidas de rendimiento mayores al 50% <sup>(3)</sup>. El control químico de Pd es efectivo, aunque su aplicación tiene consecuencias ambientales y una percepción social negativa (+). La resistencia de la planta hospedera es una forma de control de enfermedades económica y ambientalmente amigable <sup>(4)</sup>.

En Uruguay, algunas variedades criollas y cultivares de tipo intermedio tuvieron buen comportamiento frente a *Peronospora*. El cultivar Naqué tuvo una incidencia inicial similar a cultivares susceptibles, pero menor severidad que éstos a lo largo de la estación de crecimiento, por lo que tendría componentes de resistencia que limitan el desarrollo posterior de las infecciones establecidas (Galván et al. 2011). La variedad “Regia”, de origen brasilero, fue la de mayor resistencia parcial con valores de severidad significativamente inferiores a los cultivares susceptibles <sup>(5, 6)</sup>. No se disponía de resistencia genética completa en la base genética del cultivo de cebolla para esta enfermedad <sup>(7)</sup>, hasta que recientemente se introgresó el gen *Pd* proveniente de *Allium roylei* <sup>(8)</sup>.

El análisis de las relaciones histopatológicas podría contribuir a determinar los mecanismos de defensa activados por la planta hospedera y su asociación con la durabilidad de la resistencia <sup>(9)</sup>. Las observaciones del proceso de infección y de las respuestas de la planta histológicas constituyen otro abordaje para el estudio de las relaciones planta patógeno <sup>(9)</sup>. La presencia del patógeno puede desencadenar cambios anatómicos como el engrosamiento de la pared celular, deposiciones de callosa en los sitios de penetración, y cambios bioquímicos como la acumulación de peróxido de hidrógeno y otras especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico (NO) y aumentos de los niveles de calcio <sup>(9, 10, 11)</sup>.

en algún lugar debería estar explicado que implica la deposición de calosa y de compuestos fenólicos para luego mencionarlos en los resultados

El objetivo de este trabajo fue analizar las relaciones histopatológicas en la variedad Regia utilizada como fuente de resistencia, en comparación con el cultivar Pantanoso del Sauce CRS (susceptible) y con una línea del cruzamiento Regia x Pantanoso del Sauce CRS (comportamiento intermedio).

### **3.4. MATERIALES Y MÉTODOS**

Se compararon las reacciones histológicas de tres materiales con diferente comportamiento frente a *P. destructor*, ya estudiados en los ensayos de severidad a campo: “Pantanoso del Sauce CRS” (susceptible), “Regia” (resistencia parcial) y la línea PXR 10A resultado del cruzamiento de Pantanoso del Sauce CRS x Regia (intermedia). Se tomaron muestras de tejido foliar sano, y del tejido infectado con manchas típicas y esporulación visible de plantas a campo en las que la enfermedad ocurrió naturalmente. Los trozos de hojas fueron aclarados con alcohol 95% durante 48 h, con recambio del alcohol a las 24 horas. Luego, las muestras se conservaron en alcohol 95%. Se realizaron cortes transversales en las muestras de hojas con vibrátomo. Para los materiales “Pantanoso del Sauce CRS” y “PXR” el grosor de los cortes fue de 9  $\mu\text{m}$ , mientras que para el cultivar Regia fue de 10,5  $\mu\text{m}$ .

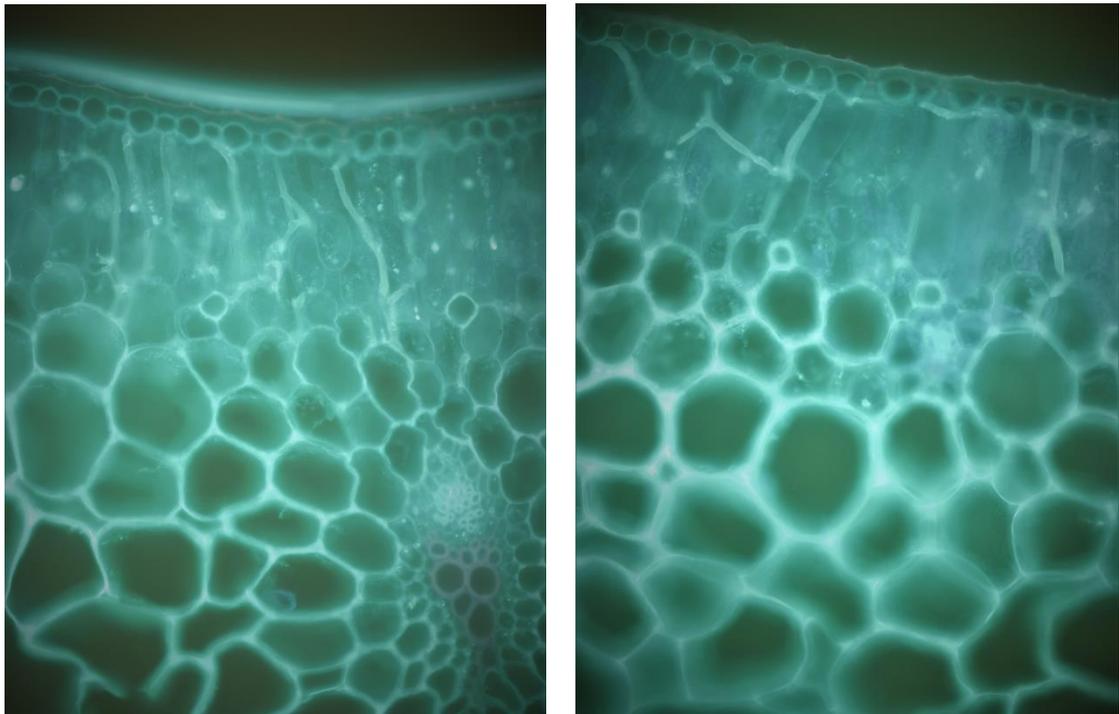
Para la evaluación de diferencias en las dimensiones de las células del parénquima en empalizada, se midieron diez células al azar en cada material genético, y se realizó un análisis de varianza en INFOSTAT (<sup>12</sup>).

Para la observación diferencial de estructuras del patógeno, las muestras de todos los materiales fueron tratadas con una tinción de Solofenil flavine 7 GFE 0,1% en agua durante 10 min y se observaron con microscopía de epifluorescencia (filtro ultravioleta). Para la observación de algunas respuestas de defensa de la planta frente al patógeno se utilizaron dos tinciones: (1) Safranina-O 0,01% en etanol 50% durante 15 minutos para observar la incorporación de compuestos fenólicos; y (2) azul de metilo 0,01% en solución buffer fosfato pH 7.0 durante 30 minutos, con microscopía de epifluorescencia (luz ultravioleta), para encontrar deposiciones de calosa.

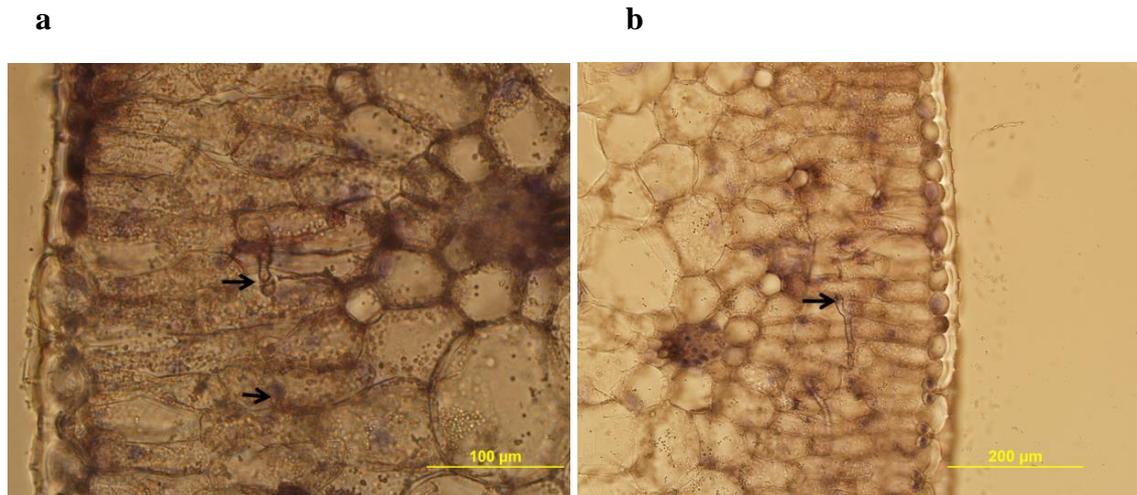
### 3.5. RESULTADOS

Se realizaron observaciones histopatológicas cualitativas que contribuyeran en tres materiales vegetales con comportamientos contrastantes: el cultivar ‘Pantanosos del Sauce CRS’ con comportamiento susceptible, la variedad ‘Regia’ que es la fuente de resistencia parcial, y la línea PXR 10A, derivada de los dos materiales anteriores y que tiene comportamiento intermedio entre los dos padres en la severidad de la enfermedad evaluada a campo.

Para todos los materiales se observó que la estructura que inicia la infección es el esporangio, que forma una hifa con una estructura adhesiva (apresorio), y que finalmente penetra a través de los estomas. Una vez que la hifa penetra por el estoma, coloniza la cámara subestomática. En todas las muestras analizadas, la colonización se dio sólo en el mesófilo en empalizada y no trasciende al mesófilo esponjoso (Figura 1).



**Figura 1.** Pantanosos del Sauce CRS. Crecimiento de las hifas del patógeno a través del mesófilo en empalizada. Se observan hifas que se desarrollan en profundidad en el tejido. Hay desarrollo de hifas enseguida por debajo de la epidermis en paralelo a la capa de células de la epidermis. Tinción con azul de metilo, observación con luz fluorescente (UV: emisión 420-425, excitación 340-380).



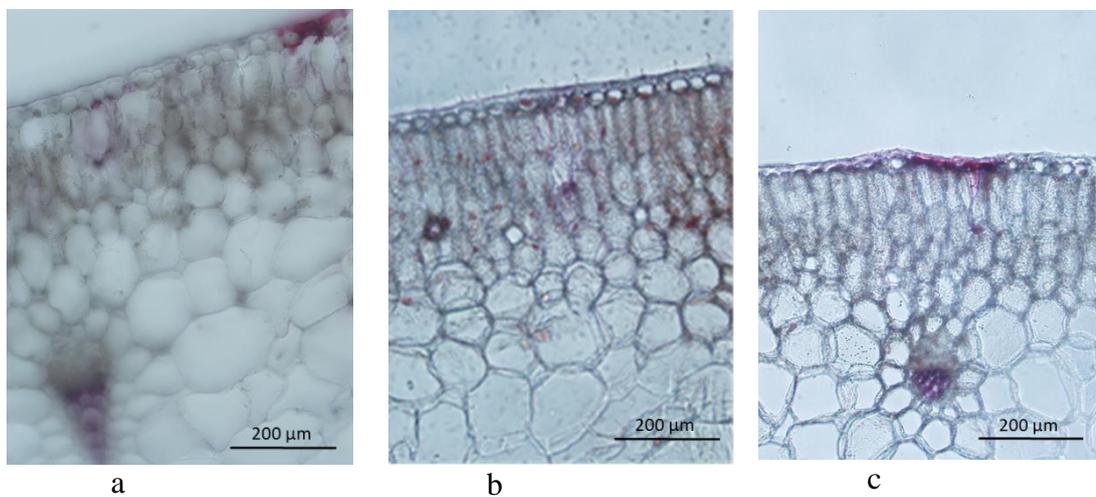
**Figura 2.** (a) Pantanoso del Sauce CRS y (b) línea PXR. Tinción con azul de metilo, observación con luz transmitida. Las flechas indican los haustorios, en los que se observa cuello y cabeza. Las estructuras de desarrollan en las células el mesófilo en empalizada.

Para los materiales Pantanoso y PXR se observaron haustorios como estructuras infectivas con cuello y cabeza que desarrolla el patógeno para nutrirse de las células del hospedero (Figura 2). Finalmente, el patógeno desarrolla un zoosporangióforo que emerge a través de los estomas y produce zoosporas, que son capaces de generar nuevas infecciones (infecciones secundarias).

Las hifas del patógeno se restringieron al parénquima en empalizada, para el cual 'Regia' presenta diferencias anatómicas, y no se extienden al parénquima esponjoso. Se observó acumulación de compuestos fenólicos, aunque no claramente asociados a la infección. No se observaron deposiciones de calosa.

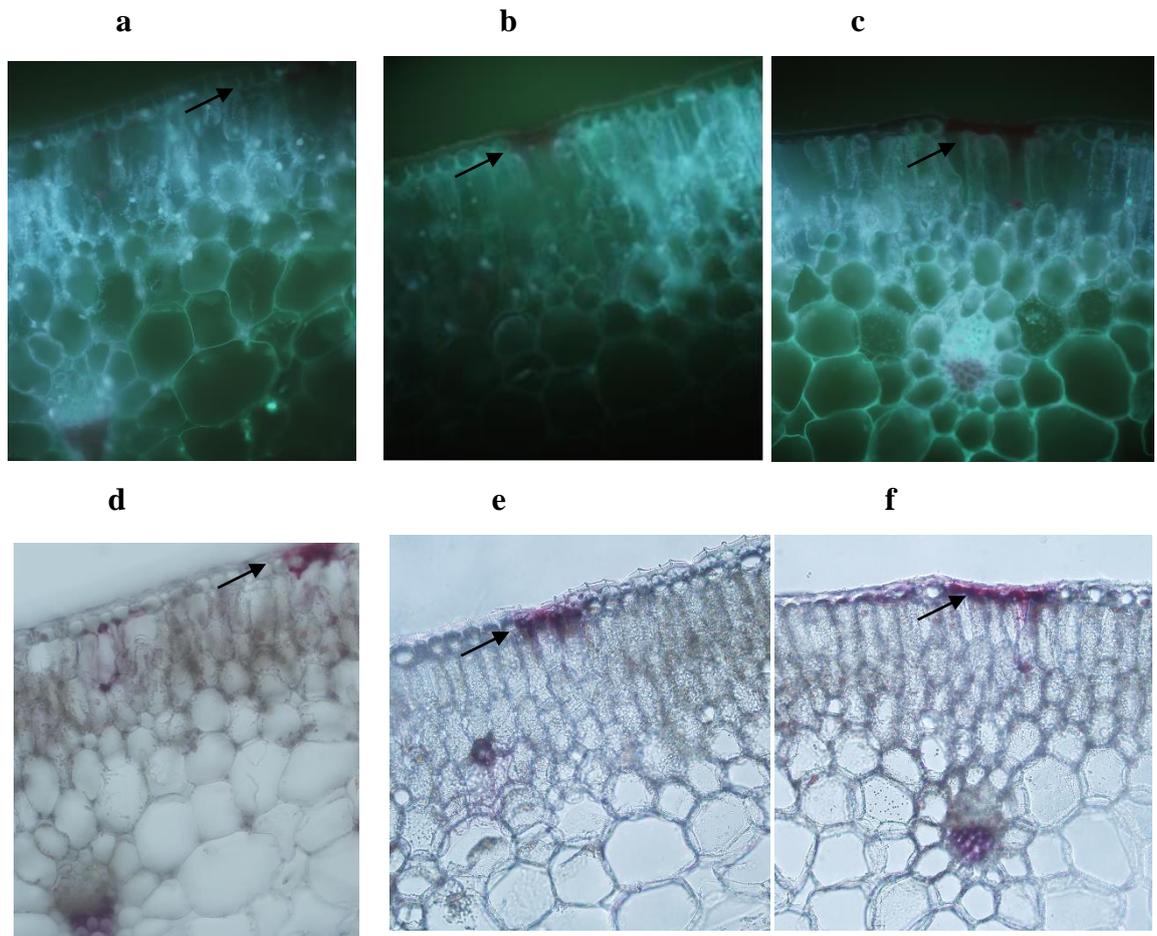
Se observaron diferencias en la estructura del mesófilo en empalizada entre los cultivares 'Regia' y los otros dos materiales (Figura 3). Las células del mesófilo en empalizada de 'Regia' son más globosas y el tejido está más desorganizado que los otros materiales. El mesófilo en empalizada de la línea PXR y de 'Pantanoso del Sauce' tiene células alargadas, cilíndricas, que están perfectamente ordenadas, entre las cuales se ha observado gran desarrollo de las hifas del patógeno. La relación entre

el largo y el ancho de las células del mesófilo (ratio L/A) fue significativamente diferente para Regia (1,69) en comparación con Pantanoso (3,15) y PXR (3,3) ( $p < 0.05$ ). No se observaron diferencias significativas entre ‘Pantanoso del Sauce’, que tiene comportamiento susceptible, y la línea PXR que tiene comportamiento intermedio.



**Figura 3.** Estructura del mesófilo de (a) Regia, (b) PXR y (c) Pantanoso del Sauce, con tinción de Safranina–O. Se observaron diferencias en el espesor del mesófilo en empalizada y en la estructura de las células que lo componen.

Se observó acumulación de compuestos fenólicos en los tres materiales analizados (Figura 4). Sin embargo, no siempre se asoció la presencia de fenoles con la presencia del patógeno en el tejido vegetal. También se procesaron muestras para observación de deposición de calosa, pero no se observó este mecanismo de resistencia para los materiales estudiados (Figura 5).



**Figura 4.** Cortes de (a, d) Regia, (b, e) línea PxR y (c, f) Pantanoso del Sauce CRS, teñidos con Safranina–O. Las imágenes superiores (a, b, c) son observaciones con luz ultravioleta y las imágenes inferiores (d, e, f) las mismas imágenes con luz transmitida. Se observaron deposiciones de compuestos fenólicos, pero no siempre asociados al crecimiento de las hifas del patógeno. Las flechas indican zonas de deposición de compuestos fenólicos.

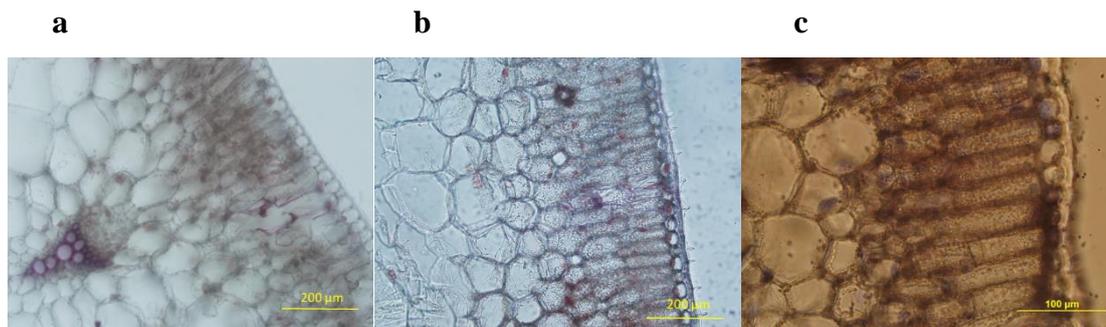
### 3.6. DISCUSIÓN

En las observaciones al microscopio de tejido infectado se observó que el patógeno coloniza sólo el mesófilo en empalizada y la infección no penetra en el mesófilo esponjoso. Las diferencias encontradas en la estructura del mesófilo en empalizada entre materiales de diferente comportamiento frente a la enfermedad

podrían ser un componente de la resistencia parcial de 'Regia'. El mesófilo en empalizada de 'Regia' en el que las células son más desordenadas y tienen menor relación largo/ancho, tiene similitud con el mesófilo esponjoso. Esta diferencia en la anatomía del tejido que es colonizado por el patógeno podría ser parte de la estrategia del hospedero para dificultar el desarrollo del patógeno una vez que ingresa al tejido.

El cultivar 'Pantanos del Sauce CRS' ha mostrado un comportamiento susceptible frente a la enfermedad, tanto en este trabajo como en trabajos anteriores (6). Sin embargo, es un cultivar que tiene buen rendimiento por su adaptación a las condiciones locales de producción, más allá de la ocurrencia de la enfermedad.

La línea PXR no mostró una estructura del mesófilo en empalizada intermedia entre los dos padres, mientras que tuvo un comportamiento intermedio en cuanto a la severidad evaluada a campo y a nivel histológico. Esto sugiere que, además de la diferencia estructural en el mesófilo hay otros componentes vinculados a la resistencia parcial en Regia.



**Figura 5.** Observaciones de tejido sano (controles) de (a) Regia, (b) PxR y (c) Pantanos del Sauce. No se observó acumulación de compuestos fenólicos, engrosamientos de pared o deposiciones de calosa para ninguno de los materiales vegetales.

Se identificó la presencia de haustorios en las células del mesófilo en empalizada. Las estructuras observadas son similares a las descritas por Kortekamp (2005) para el patosistema *Plasmopora viticola* – *Vitis vinicola*, en las que se puede observar un haustorio que invagina la membrana celular. La estructura tiene un cuello y una cabeza que se desarrolla dentro de la célula del hospedero, tal como fue descrito por Kortekamp (2005).

No se encontró asociación entre compuestos fenólicos y sitios de infección en Regia, que es la fuente de resistencia parcial, ni en la línea PXR que ha mostrado niveles intermedios de resistencia entre el padre susceptible y el resistente. Se analizó la presencia de compuestos fenólicos asociados a la infección como encontraron Ponce de León et al. (9) para *Phiscomitrella patens* ante la infección de *Botrytis cinerea*. Para este patosistema, observaron acumulación de compuestos fenólicos en torno a los sitios de penetración de las hifas. La acumulación de compuestos fenólicos ha sido reportada en lechuga infectada por *Bremia lactucae* (<sup>14</sup>), donde se distinguieron dos fases: primero una alta acumulación en los puntos de penetración y una segunda fase en la que la acumulación de compuestos fenólicos en la vacuola se activa luego de que se haya producido un daño irreversible en la membrana de la célula penetrada. En el presente estudio, no obstante, no se encontró deposición de compuestos fenólicos en los puntos de penetración, por lo que no sería un mecanismo que se active ante la presencia del patógeno.

El micelio del patógeno se observó en el mesófilo en empalizada, pero en ningún material se observó al patógeno en el mesófilo esponjoso. Diferencias en la anatomía del mesófilo podrían explicar un componente de la resistencia parcial de Regia. Se observó deposición de compuestos fenólicos en los tres materiales observados, pero no asociados a la presencia de patógeno. No se encontraron deposiciones de calosa. Ninguno de estos dos mecanismos formaría parte de las respuestas de resistencia de Regia.

### **3.7. AGRADECIMIENTOS**

La primera autora agradece la Beca del Sistema Nacional de Becas (SNB-ANII) que posibilitó este trabajo. Agradecemos a la Lic. Eilyn Mena Méndez por su asistencia

en los cortes con vibrátomo en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay.

### 3.8. BIBLIOGRAFÍA

1. Schwartz HF, Mohan SK. 2008. Compendium of onion and garlic diseases. St Paul: APS Press. 54p.
2. Bouwmeester K., Van Poppel M.J.A.P., Gövers F. (2009) Genome biology cracks enigmas of oomycete plant pathogens. *Annual Plant Reviews* 34: 102 - 133.
3. González PH, Colnago P, Peluffo S, González Idiarte H, Zipitria J, Galván G.A. 2011. Quantitative studies on downy mildew (*Peronospora destructor* Berk. Casp.) affecting onion seed production in southern Uruguay. *European Journal of Plant Pathology*, 129: 303 – 314.
4. Niks RE, Parlevliet JE, Lindhout P, Bai Y. 2011. Breeding crops with resistance to diseases and pests. Enfield : Enfield Pub & Distribution Co. 200p.
5. Galván, G.A. (2011) Mejoramiento genético por resistencia a enfermedades en Cebolla. Informe final del Proyecto INIA-FPTA 250. Montevideo, Uruguay, s.e. 100 p.
6. Galván, G.A.; Arias, M.; González, P.H.; Curbelo, N.; Peluffo, S. 2016. Selection for resistance and histopathological relationships in the onion ‘Regia’ against downy mildew (*Peronospora destructor*). *Acta Horticulturae* 1143:15-22.
7. Kofoet A, Zinkernagel V. 1989. Resistance to downy mildew (*Peronospora destructor* (Berk.) Casp.) in *Allium* species. *Journal of Plant Disease and Protection*, 97(1): 13 -23.
8. Scholten OE, Van Heusden AW, Khrustaleva LI, Burger-Meijer K, Mank RA, Antonise RGC, Harrewijn JL, Van Haecke W, Oost EH, Peters RJ, Kik C. 2007. The long and winding road leading to the successful introgression of downy mildew resistance into onion. *Euphytica*, 156: 345 – 353.
9. Ponce de Leon I., Schmelz E.A., Gaggero C., Castro A., Alvarez A., Montesano M. (2012) *Physcomitrella patens* activates reinforcement of the cell wall, programmed cell death and accumulation of evolutionary conserved defence signals, such as salicylic acid and 12-oxo-phytodienoic acid, but not jasmonic acid, upon *Botrytis cinerea* infection. *Molecular plant pathology* 13(8), 960–974.

10. Niks, R. E. 1983. Comparative histology of partial resistance and the nonhost reaction to leaf rust pathogens in barley and wheat seedlings. *Phytopathology* 73:60-64.
11. Rodríguez S., Silva, P.; Bentancur, O.; Gamba, F.; Pritsch. 2014. Histochemical characterization of early response to *Cochliobolus sativus* infection in selected barley genotypes. *Phytopathology* 104(7): 715-723.
12. Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2018. Centro de Transferencia InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
13. 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.
14. Bennet, M.; Gallagher, M.; Fagg, J.; Bestwick, C.; Paul, T.; Beale, M. y Mansfield, J. (1996). Hypersensitive reaction, membrane damage and accumulation of autofluorescent phenolics in lettuce cells challenged by *Bremia lactucae*. *The Plant Journal*. 9(6) 851 – 865.

### **3. DISCUSIÓN GENERAL**

La variedad 'Regia' se comportó consistentemente como un material con alto nivel de resistencia parcial a *P. destructor* en todas las evaluaciones y con todas metodologías usadas en este estudio. Además, esta resistencia parcial ha sido consistente también en el tiempo, como ha sido descrito por Galván et al. (2016a). Sin embargo, los resultados demuestran que no ha sido sencillo transferir esta resistencia a la descendencia. Luego de los cruzamientos realizados, muy pocos individuos de la descendencia lograron un nivel de resistencia parcial similar a 'Regia', y en general la segregación suele ser sesgada hacia la susceptibilidad. Aún más, si bien en algunos casos la diferencia no es significativa, ninguna línea de la progenie alcanza el nivel de resistencia de 'Regia'.

Cada vez que se realiza un cruzamiento con Regia hay segregación de la resistencia. Esta segregación permitirá seleccionar individuos que tienen mejor comportamiento frente a la enfermedad que el padre susceptible, aunque la complejidad de la base genética de la resistencia no ha permitido generar una población que reproduzca el nivel de resistencia de Regia.

Con los resultados obtenidos, se plantearon dos hipótesis que pueden ser complementarias y no necesariamente excluyentes. En la herencia de la resistencia de Regia podrían estar involucrados genes recesivos, genes de susceptibilidad que facilitan el reconocimiento de la planta hospedera y facilitan la penetración celular, y que han perdido la función en la variedad resistente. Este tipo de genes ha sido reseñado por Pavan et al. (2010). Otra hipótesis es que la herencia podría ser poligénica, con varios genes involucrados. Las resistencias poligénicas o cuantitativas son en general de baja heredabilidad, lo cual dificulta el trabajo en los programas de mejoramiento. El control ambiental en el proceso de selección puede aumentar la heredabilidad de la característica y acelerar el avance genético. La resistencia cuantitativa implica diferencias en los procesos involucrados en el desarrollo de la epidemia (Niks et al., 2014). Conocer esos procesos ayudaría a entender los mecanismos involucrados.

La resistencia recesiva resulta por mutaciones por pérdida de función de genes que codifican factores de susceptibilidad (genes S) (Pavan et al., 2010). La resistencia conferida por pérdida de función de genes S está asociada a la formación de papilas y es raza no específica para el caso del gen *ol-2* que confiere resistencia al oidio en tomate (Pavan et al. 2007). Este tipo de mecanismo de resistencia también ha sido reportado para otras especies como por ejemplo cebada (Pavan et al. 2010) o resistencia a *Bremia lactucae* en lechuga (den Boer et al., 2014). Es complicado trabajar con las resistencias recesivas en el mejoramiento tradicional, hay que seleccionar el alelo recesivo en la progenie autofecundada en varias generaciones (Pavan et al., 2007).

Diversos efectos génicos pueden estar involucrados en la resistencia parcial de 'Regia', que la convierten en una resistencia de herencia compleja y de difícil manejo. Debido a la presencia repetida de progenies con segregación transgresiva se infiere que en esta resistencia están involucrados varios genes de efecto cuantitativo, como fue descrito por ejemplo para la resistencia a *Blumeria graminis* de la cebada por Aghnoum y Niks (2011). La herencia sesgada hacia la susceptibilidad podría indicar que están involucrados genes de susceptibilidad, como se discutió antes, los cuales se expresarían fenotípicamente sólo en estado recesivo y que han sido reportados para el oidio de la vid (Pessina et al., 2016), entre muchos ejemplos. Por otro lado, cuando la herencia de la resistencia parcial está explicada por efectos aditivos se espera una curva normal de segregación, la segregación observada tuvo desvíos respecto a lo esperado. Además de los efectos aditivos, podrían estar involucrados efectos no aditivos, epistáticos, que lleven a que la acumulación de alelos favorables no tenga una respuesta lineal en el aumento de la resistencia (den Boer et al., 2014).

En todos los cruzamientos 'Regia' actuó como madre y la segregación fue sesgada hacia la susceptibilidad y en el caso de 14609 fue intermedia y sin sesgos. Sin embargo, en el cruzamiento en que 'Regia' actuó como dador de polen, la herencia fue intermedia y sesgada hacia la resistencia. Esto puede indicar que hay un efecto negativo sobre la herencia cuando 'Regia' actúa como madre y le pasa a su descendencia los genes citoplasmáticos. Con estos resultados, se deduce que esta

resistencia es cuantitativa y que puede haber interacción (epistasia) entre genes citoplasmáticos y nucleares involucrados en los mecanismos de resistencia. Alelos provenientes del padre susceptible tendrían un efecto de bloqueo sobre genes citoplasmáticos que confieren resistencia en 'Regia'. Es necesario realizar más cruzamientos recíprocos para confirmar y comprender los mecanismos involucrados en este fenómeno.

La selección sobre las líneas PXR F1S2 fue efectiva. Se logró avance genético en la resistencia parcial, y existe dentro de las poblaciones variabilidad para seleccionar por características agronómicas deseadas. La selección de estos materiales avanzados en el programa de mejoramiento por resistencia a *P. destructor* apunta ahora a afinar características de calidad del bulbo para lograr un cultivar que tenga menor severidad frente a *P. destructor* y una calidad similar a la de Pantanoso del Sauce (cultivar que ha sido ampliamente adoptado por los productores dadas sus características agronómicas).

En el análisis histológico se encontró una diferencia en la estructura en el mesófilo en empalizada entre los materiales analizados. 'Regia' mostró un mesófilo más desorganizado y con células más cúbicas. Sin embargo, los materiales PXR y Pantanoso no se diferenciaron en la forma de las células, pero si lo hicieron cuando se evaluó la severidad a *P. destructor*. Esto indica que, además de la diferencia estructural del mesófilo, hay otros mecanismos involucrados en la resistencia parcial que explican el comportamiento intermedio de PXR. Por otro lado, esta diferencia estructural podría no estar involucrada en los mecanismos de resistencia de la planta.

Bajo la hipótesis de que la diferencia estructural del mesófilo en empalizada esté parcialmente vinculada a la resistencia parcial de 'Regia' hay varios puntos que considerar. Primero, *P. destructor* es un patógeno que se desarrolla en el mesófilo en empalizada y no en el esponjoso, por lo que esta diferencia estructural podría impedir o dificultar el crecimiento de las hifas. En segundo lugar, esta estructura desorganizada de 'Regia' podría explicar parte de la resistencia parcial frente a *P. destructor* y la alta susceptibilidad a otros patógenos foliares de la cebolla. Si el primer y el segundo punto se confirman, entonces puede ser que este componente no se herede fácilmente ya que cuando se realiza selección no sólo se selecciona por

resistencia a *P. destructor* sino también por resistencia a otras enfermedades y calidad del bulbo. Por lo tanto, las progenies que son susceptibles a otras enfermedades y resistentes a *P. destructor* no continuarían en el programa de mejoramiento y sí las que heredan otros componentes de resistencia. Esto explicaría que la línea PXR tenga un nivel de resistencia mayor que ‘Pantanoso del Sauce’ y que no tenga la misma estructura del mesófilo de ‘Regia’.

Se observó deposición de compuestos fenólicos en los tres materiales observados. Estas deposiciones no se asociaron a la presencia de patógeno, sino que se probablemente se originan en otro tipo de daños. No se encontraron deposiciones de calosa. Ninguno de estos dos mecanismos formaría parte de las respuestas de resistencia de ‘Regia’.

Es necesario superar dificultades que ha presentado *P. destructor* para el trabajo en condiciones controladas, y ajustar una metodología que permita reproducir el ciclo de la enfermedad en condiciones controladas. Esto no sólo permitiría generar inóculo para realizar inoculaciones en cualquier momento del año, sino que también permitiría comparar materiales más rigurosamente. Para comprender más cabalmente los mecanismos de resistencia y susceptibilidad involucrados en los materiales ‘Regia’, ‘PXR’ y ‘Pantanoso del Sauce CRS’ es necesario descubrir cuáles son las respuestas de la planta frente al patógeno, comprender las respuestas basales o mecanismos de defensa pasiva y poder cuantificar la cantidad de patógeno en cada uno de los materiales con el mismo tiempo desde la inoculación, por ejemplo mediante q-PCR.

#### **4. CONCLUSIONES**

Se confirmó en la segregación predominante hacia la susceptibilidad de la resistencia parcial en Regia, en progenies entre Regia y variedades susceptibles. La excepción fue cuando Regia actuó como dador de polen. Mecanismos como la epistasis entre genes nucleares y citoplasmáticos podrían estar involucrados en esta respuesta. Es necesario realizar más cruzamientos recíprocos para confirmar este resultado.

La determinación de la base genética de la resistencia requerirá mayores estudios que involucren poblaciones segregantes más grandes y marcadores moleculares. Con los resultados alcanzados se plantea como hipótesis para la herencia de la resistencia: genes de susceptibilidad (herencia recesiva) y herencia poligénica. Esto hace que esta resistencia sea difícil de heredar a las progenies.

La selección de las líneas más resistentes fue efectiva en severidad y características agronómicas, aunque las líneas avanzadas alcanzaron una respuesta intermedia que no reproduce el nivel de resistencia de Regia.

La menor severidad a campo en las líneas seleccionadas por resistencia se corresponde con una mayor proporción de estomas sanos en las lesiones, con una correlación positiva entre las variables.

Las líneas avanzadas permitirán el desarrollo de un cultivar resistente a *Peronospora destructor* en comparación con los cultivares nacionales disponibles.

Las hifas del patógeno colonizan solamente el mesófilo en empalizada, para ningún material se observa al patógeno en expansión hacia el mesófilo esponjoso. Diferencias en la estructura anatómica del mesófilo en empalizada podrían explicar un componente de la resistencia parcial de 'Regia', aunque este componente no es el que explica el comportamiento intermedio de la línea PXR.

## **5. BIBLIOGRAFÍA**

- Adhikari, B. N., Hamilton, J. P., Zerillo, M. M., Tisserat, N., Le ´vesque, C. A., Buell, C. R. 2013. Comparative Genomics Reveals Insight into Virulence Strategies of Plant Pathogenic Oomycetes. PLoS ONE 8(10): e75072. doi:10.1371/journal.pone.0075072
- Aghnoum, R.; Niks, R.E. 2011. Transgressive segregation for very low and high levels of basal resistance to powdery mildew in barley. Journal of Plant Physiology. 168. 45-50 doi:10.1016/j.jplph.2010.09.005
- Agrios G.N. 2005. Plant Pathology. Florida: Elsevier Academic Press. 921p.
- Baxter L, Tripathy S, Ishaque N, Clifton SW, Rogers J, Van den Ackerveken G, Jones JD, McDowell JM, Beynon J, Tyler BM. 2010. Signatures of adaptation to obligate biotrophy in the *Hyaloperonospora arabidopsidis* genome. Science 330(6010):1549-51.
- 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.
- Brewster J.L. 2008. Onions and other vegetable Alliums (2nd Ed). CABI Publishers. Series: Crop production science in horticulture, 15. 454 pp. Wallingford, UK.
- Chisholm S.T., Coaker G., Day B., Staskawicz B.J. 2006 Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. Cell 124(4):803-14.
- Colnago, P., 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.
- Den Boer, E.; Pelgrom, K.T.B.; Zhang, N.W.; Visser, R.G.F.; Niks, R.E.; Jeuken, M.J.W. 2014. Effects of stacked quantitative resistances to downy mildew in lettuce do not simply add up. Theoretical and Applied Genetics 127(8): 1805-16. Doi:10.1007/s00122-014-2342-7
- Galván, G.A. 2011. Mejoramiento genético por resistencia a enfermedades en Cebolla. Informe final del Proyecto INIA-FPTA 250. Montevideo, Uruguay, s.e. 100 p.

- Galván, G.A.; Arias, M.; González, P.H.; Curbelo, N.; Peluffo, S. 2016a. Selection for resistance and histopathological relationships in the onion 'Regia' against downy mildew (*Peronospora destructor*). *Acta Horticulturae* 1143:15-22.
- Galván, G.A.; Vicente, E.; Arias, M., González Rabelino, P. 2016b. Selección por resistencia a *Peronospora destructor* en el mejoramiento genético de cebolla (*Allium cepa* L.). Congreso Latinoamericano de genética, 16°. Montevideo, Uruguay. *Journal of Basic and Applied Genetics* 27 (1)S:295.
- González PH, Colnago P, Peluffo S, González Idiarte H, Zipitria J, Galván G.A. 2011. Quantitative studies on downy mildew (*Peronospora destructor* Berk. Casp.) affecting onion seed production in southern Uruguay. *European Journal of Plant Pathology*, 129: 303 - 314.
- Hammond-Kosack K.E.; Parker, J.E. 2003. Deciphering plant–pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology* 14:177–193.
- Hardham, A.R. 2007. Cell biology of plant – oomycete interactions. *Cellular Microbiology* 9(1), 31-39. Doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00833.x
- Hoch H.C., Galvani C.D., Szarowski D.H., Turner J.N. 2005. Two new fluorescent dyes applicable for visualization of fungal cell walls. *Mycologia* 97:580-588.
- Jones J. D. G. and Dangl J. L. 2006. The plant immune system. *Nature* Vol 444 DOI:10.1038/05286.
- Kamoun S. et al. 2015. The top ten oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 16(4): 413-434.
- Khosa J.S., McCallum J., Dhatt A.S., Macknight R.C. 2016. Enhancing onion breeding using molecular tools. *Plant Breeding* 135(1):9-20.
- Kik, C. 2002. Exploitation of wild relatives for the breeding of cultivated *Allium* species. In H. D. Rabinowitch & L. Currah (Eds.), *Allium crop science: Recent advances*. Wallingford: CABI Publishing. pp. 81–100.
- Kim S., Kim C.W., Choi M.S., Kim S. 2016. Development of a simple PCR marker tagging the *Allium roylei* fragment harbouring resistance to downy mildew (*Peronospora destructor*) in onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica* 208:561-569.

- Klaas M, Friesen N. 2002. Molecular markers in *Allium*. In: Rabinowitch HD, Currah L (eds.), *Allium* crop science: recent advances. CABI Publishing, p. 159-186. Wallingford-New York.
- Kofoet A, Zinkernagel V. 1989. Resistance to downy mildew (*Peronospora destructor* (Berk.) Casp.) in *Allium* species. *Journal of Plant Disease and Protection*, 97(1): 13-23.
- 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.
- Lamour K, Kamoun S. 2009. Oomycete genetics and genomics: diversity, interactions, and research tools (eds). John Wiley & Sons. 582 pp. Hoboken, New Jersey.
- Lorbeer, J. W., Kuhar T. P., Hoffmann M. P. 2002. Monitoring and forecasting for disease and insect attack in onions and *Allium* crops within IPM strategies. In H.D. Rabinowitch & L. Currah (Ed.), *Allium* crop science: recent advances (pp. 293–310). CABI Publishing.
- Maeso D, Arboleya J, Fernández S, Suárez C, Medina V. 2000. Evaluación de un sistema de pronóstico para el control de enfermedades foliares en diferentes cultivares de cebolla. En: Presentación de resultados experimentales en ajo y cebolla: Reunión de divulgación. Montevideo: INIA. (Actividades de difusión; 223). pp. 17 - 29.
- Marcuzzo, L.L.; Vaz Moraes, J.C. 2017. Efeito da temperatura e do fotoperíodo na germinação in vitro de esporângios de *Peronospora destructor*, agente etiológico do míldio da cebolla. *Summa Phytopathologica* 44(1):92-93.
- MGAP-DIEA 2014. Encuestas hortícolas 2013-14; zonas Sur y litoral Norte. Montevideo. 23 p. (Serie Encuestas no. 318).
- MGAP-DIEA 2008. Encuestas hortícolas 2008; zonas Sur y litoral Norte. Montevideo. 27 p. (Serie Encuestas no. 277).
- Morgan W., Kamoun S. 2007. RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. *Current Opinion in Microbiology* 10(4):332-338.

- Niks RE, Parlevliet JE, Lindhout P, Bai Y. 2011. Breeding crops with resistance to diseases and pests. Enfield : Enfield Pub & Distribution Co. 200p.
- Niks, R.E.; Lindhout, W.H. 2004. Curso sobre mejoramiento para resistencia a enfermedades y plagas. Wageningen UR-Preduza. Quito, Ecuador. 216p.
- Panstruga R., Parker J. E., Schulze-Lefert P. 2009. SnapShot: Plant immune response pathways. Cell 136:978e1.
- Pavan, S., Jacobsen, E., Visser, R.G.F. Bai, Y. 2010. Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. Molecular Breeding 25:1-12.
- Pavan, S., Zheng, Z., Borisova, M., van den Berg, P., Lotti, C., De Giovanni, C., Lindhout, P., de Jong, H., Ricciardi, L., Visser G. F.R., Bai, Y. 2007. Map- vs. homology-based cloning for the recessive gene *ol-2* conferring resistance to tomato powdery mildew. Euphytica. DOI 10.1007/s10681-007-9570-8
- Pessina, S.; Lenzi, L.; Perazzolli, M.; Campa, M.; Della Costa, L.; Urso, S.; Valé G.; Salamini, F. y Malnoy, M. 2016. Knockdown of MLO genes reduces susceptibility to powdery mildew in grapevine. Horticulture Research 3:16016.
- Ponce de León I. 2011. The Moss *Physcomitrella patens* as a Model System to Study Interactions between Plants and Phytopathogenic Fungi and Oomycetes. Journal of Pathogens. Vol. 2011: Article ID 719873, 6 p. DOI 10.4061/2011/719873.
- Ponce de León I., Schmelz E.A., Gaggero C., Castro A., Alvarez A., Montesano M. 2012. *Physcomitrella patens* activates reinforcement of the cell wall, programmed cell death and accumulation of evolutionary conserved defence signals, such as salicylic acid and 12-oxo-phytodienoic acid, but not jasmonic acid, upon *Botrytis cinerea* infection. Molecular Plant Pathology 13: 960–974.
- Rodríguez S., Silva, P.; Bentancur, O.; Gamba, F.; Pritsch. 2014. Histochemical characterization of early response to *Cochliobolus sativus* infection in selected barley genotypes. Phytopathology 104(7): 715-723.
- Scholten OE, Van Heusden AW, Khrustaleva LI, Burger-Meijer K, Mank RA, Antonise RGC, Harrewijn JL, Van Haecke W, Oost EH, Peters RJ, Kik C.

2007. The long and winding road leading to the successful introgression of downy mildew resistance into onion. *Euphytica*, 156: 345-353.
- Schornack, S.; Huitema, E.; Cano, L.M.; Bozkurt, T.O.; Oliva, R.; Van Damme, M.; Schwizer, S.; Raffaele, S.; Chaparro – García, A.; Farrer, R.; Segretin, M.E.; Bos, J. Hass, B.J.; Zody, M.C.; Nusbaum, C.; Win, J. Thines, M.; Kamoun, S. 2009. Ten things to know about oomycete effectors. *Molecular Plant Pathology*. Doi: 10.1111/j.1364-3703.2009.00593.x
- Schwartz HF, Mohan SK. 2008. Compendium of onion and garlic diseases. St Paul: APS Press. 54p.
- Takken, F.L.W.; Albrecht, M.; Tameling, W.I.L. 2006. Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* 9:383-390.
- Van Heusden A.W., Van Ooijen J.W., Vrielink-van Ginkel R., Verbeek W.H.J., Wiestma W.A., Kik C. 2000. A genetic map of an interspecific cross in *Allium* based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Theoretical and Applied Genetics* 100:118-126.
- Vicente C. E., Vilaró F., Rodríguez G., Galván G., González H., Spina W., Reggio A., Ibáñez, F. Pereira G., González, M. 2010. Cultivares de cebolla obtenidos por el mejoramiento genético nacional. *Revista INIA Uruguay* 22:29-32.
- Vleeshouwers V.G.A.A., Oliver R.P. 2014. Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens. *Molecular Plant Microbe Interactions* 27(3): 196-206.
- Vu H.Q., Yoshimatsu Y., Khrustaleva L.I., Yamauchi N., Masayoshi S. 2012. Alien genes introgression and development of alien monosomic addition lines from a threatened species, *Allium roylei* Stearn, to *Allium cepa* L. *Theoretical and Applied Genetics* 124(7):1241-57.

## **6. ANEXOS**

**Cuadro 1.** Evaluación de la segregación de características poscosecha para las seis familias segregantes F1S1 y los cuatro cultivares contoles: peso promedio del bulbo (PPB), cociente entre el diámetro mayor y diámetro menor (DM/dm), conservación poscosecha (%).

<b>FAMILIA</b>	<b>PPB</b>	<b>DM/dm</b>	<b>%CONS</b>	<b>COSECHA</b>
<b>14609</b>	<b>62,8</b>	<b>12,9</b>	<b>68,8</b>	
A	44,1	9,8	76,5	30-Nov
B	58,5	17,1	76,4	30-Nov
C	81,2	16,3	55,8	30-Nov
D	60,6	9,2	75	7-Dic
E	84,6	13,2	67	19-Dic
F	59,7	15,6	86,8	7-Dic
G	76,5	8,2	100	19-Dic
H	65,6	11,5	89,2	30-Nov
I	57,9	15,4	40	11-Dic
J	65,1	13,7	67,3	7-Dic
K	59,9	12,7	72,2	7-Dic
L	67,1	17,7	80	7-Dic
M	66	12,1	60	12-Dic
N	49,8	10,7	94	12-Dic
O	63,1	8,7	75	7-Dic
<b>14603</b>	<b>64,3</b>	<b>12</b>	<b>73,5</b>	
A	66,5	13,4	69,4	20-Nov
B	105,7	8,4	61,5	28-Nov
C	69,3	8,4	63,1	28-Nov
D	60,3	11,7	81,4	30-Nov
E	70,2	10,1	73,7	28-Nov
F	59	13,2	79,2	30-Nov
G	58,6	13,4	58,6	30-Nov

<b>FAMILIA</b>	<b>PPB</b>	<b>DM/dm</b>	<b>%CONS</b>	<b>COSECHA</b>
H	37,6	13,8	60,7	28-Nov
I	58,4	14,8	68,6	30-Nov
J	76,8	10,2	84,9	30-Nov
K	82,5	10,7	82,3	28-Nov
L	83,6	10,5	82,5	28-Nov
M	72,8	15,2	76,3	28-Nov
N	43	8,8	68,1	30-Nov
O	61,7	12	47,2	30-Nov
P	88,1	16,9	78,3	18-Dic
Q	56,4	13,4	80,9	9-Dic
R	66,3	10,3	75	28-Nov
S	81,1	10,3	64,7	30-Nov
T	59,8	8,6	42,1	9-Dic
U	45,8	18,7	91,7	9-Dic
<b>14606</b>	<b>72,5</b>	<b>13,4</b>	<b>66,4</b>	
A	60,6	19,3	54,5	19-Dic
B	57,9	15,8	60	5-Dic
C	49,3	8,7	45	19-Dic
D	66,4	14,7	49	7-Dic
E	56,1	39,6	50	19-Dic
F	41,6	12,6	30,7	6-Dic
G	93,1	14,2	75	7-Dic
H	111,4	14,1	80,1	14-Dic
I	68,1	15,7	70	6-Dic
J	68,3	13,4	69,2	12-Dic
K	63,2	10,9	66,7	30-Nov
L	66,7	10,4	62,5	6-Dic
M	79,9	14,8	81,6	7-Dic
<b>14611</b>	<b>80,9</b>	<b>11,6</b>	<b>71,9</b>	
A	81,5	9,9	84,1	6-Dic
B	98,9	8,4	57,1	19-Dic
C	79,9	16,3	66,7	19-Dic

<b>FAMILIA</b>	<b>PPB</b>	<b>DM/dm</b>	<b>%CONS</b>	<b>COSECHA</b>
D	74,3	6,8	89,5	6-Dic
E	82,6	30,6	78,6	19-Dic
F	69,5	18,9	68,7	6-Dic
G	77,5	14,1	82,4	6-Dic
H	70,8	19,7	82,9	7-Dic
I	78,8	11,9	83,3	6-Dic
J	91	9,3	80	7-Dic
K	91,5	14,9	85,7	6-Dic
L	116,7	20,1	88,2	6-Dic
M	136,3	19,3	68,7	19-Dic
N	57,9	24,2	70,6	30-Nov
Ñ	110	10,6	18,7	19-Dic
O	75	21,7	90,9	7-Dic
P	108,8	12,9	73,3	7-Dic
Q	81,7	12,9	83,3	7-Dic
R	68,8	7,8	53,8	30-Nov
S	71,5	9,9	62,3	19-Dic
T	85,9	11,9	68,4	6-Dic
U	92,7	12,1	60	6-Dic
V	54,3	11,8	86,8	30-Nov
W	91,5	10,9	86,5	19-Dic
X	68,8	9,1	81,2	7-Dic
Y	102,1	14,9	83,3	19-Dic
Z	63,6	7,4	26,3	30-Nov
<b>15601</b>	<b>78,5</b>	<b>9,6</b>	<b>32,9</b>	
A	83,7	7,4	24,2	4-Dic
B	87,9	7,9	21,5	28-Nov
C	52,7	7,9	9,4	20-Nov
D	112,6	11,4	36,8	4-Dic
E	67,1	9,8	36,8	4-Dic
F	103,4	28,7	58,8	4-Dic
G	46,3	4,7	15,8	28-Nov

<b>FAMILIA</b>	<b>PPB</b>	<b>DM/dm</b>	<b>%CONS</b>	<b>COSECHA</b>
H	50,9	20,2	38,9	4-Dic
I	72,3	9,7	23,5	4-Dic
J	90,1	8,1	20	4-Dic
K	59,3	4,9	5,6	20-Nov
L	88	13,2	25	18-Dic
M	79,1	8,6	48,6	4-Dic
N	101,7	12,2	57,6	4-Dic
O	86,2	8,7	36	11-Dic
P	85,1	9,7	64,3	4-Dic
<b>15605</b>	<b>126,6</b>	<b>12,4</b>	<b>61,5</b>	
A	99,5	13,6	64,8	5-Dic
B	95,1	10,8	66,7	5-Dic
C	101,1	13,2	68,3	5-Dic
D	127,1	8,7	61,5	4-Dic
E	127,1	14,7	51,2	5-Dic
F	141,4	10,2	26,3	18-Dic
G	131,5	13,3	65,2	7-Dic
H	117,9	15,4	12,2	5-Dic
I	118,7	10,8	15	5-Dic
J	149,7	13,9	18,7	18-Dic
K	125,2	18,5	52,6	18-Dic
L	134,7	9,5	15,8	5-Dic
M	150,9	13,4	55,6	18-Dic
N	88,9	7,7	48,6	5-Dic
Ñ	144,5	17,1	64,7	7-Dic
O	131,1	12,2	52,6	5-Dic
P	128,3	14,9	46,7	5-Dic
Q	103,9	15,1	73	4-Dic
R	128,1	10,3	56,3	5-Dic
S	128,4	12,2	46,2	4-Dic
T	137,7	10,5	73,3	5-Dic
U	127	10,5	84	5-Dic

<b>FAMILIA</b>	<b>PPB</b>	<b>DM/dm</b>	<b>%CONS</b>	<b>COSECHA</b>
V	125,1	17,4	77,5	4-Dic
W	154,7	15,4	68,4	5-Dic
X	124,9	11,9	52,8	5-Dic
Y	136,9	12,7	52,8	5-Dic
Z	147,3	14	64,7	7-Dic
A1	122,8	12,2	58,6	28-Nov
B1	134,7	14,7	75	5-Dic
C1	113,7	12,6	72,2	5-Dic
D1	106,7	12,5	70,9	4-Dic
E1	140,7	12,6	70,4	5-Dic
F1	138,3	11,5	77,5	18-Dic
G1	117,5	12,5	63,1	14-Dic
H1	141,5	17,8	65	5-Dic
I1	145,8	11,5	61,4	18-Dic
J1	135,4	15,2	53,3	14-Dic
K1	140	14,5	30	18-Dic
L1	168,5	12,7	21,4	18-Dic
M1	122,2	10,6	72,7	5-Dic
N1	121,9	15,2	70	18-Dic
Ñ1	138	11,8	59,4	18-Dic
O1	131,6	14,8	65,4	5-Dic
P1	121	13,9	75	10-Dic
Q1	174,2	14,7	77,8	4-Dic
R1	86,9	15,9	33,3	18-Dic
S1	128,2	13,5	72,2	5-Dic
T1	107,5	12,9	57,1	4-Dic
U1	145,9	14,9	68,9	5-Dic
V1	79,9	18,2	66,7	4-Dic
W1	111,9	15,4	72,9	5-Dic
X1	130,2	8,7	86,1	6-Dic
Y1	133,2	11,6	69,4	6-Dic
Z1	137,9	21,6	81,3	6-Dic

<b>FAMILIA</b>	<b>PPB</b>	<b>DM/dm</b>	<b>%CONS</b>	<b>COSECHA</b>
A2	104,7	10,5	42,8	14-Dic
B2	142,8	8,7	61,1	7-Dic
C2	77,9	10,1	6,3	4-Dic
D2	134	12,8	57,9	5-Dic
E2	127,5	9,9	62,5	12-Dic
Pantanosos	110,3	20,1	84,9	19-Dic
Regia	104,6	7,2	33,7	28-Nov
Casera	63,3	9,4	40,2	20-Nov
Naqué	65,1	16,1	69,3	14-Dic

**Cuadro 2.** Evaluación de la segregación de características poscosecha: color. Las categorías evaluadas fueron Blanca, bronceada blanquecina (BB), bronceado claro (BC), bronceado claro rojiza (BCR), bronceado (B), bronceado rojizo (BR), bronceado oscuro (BO), bronceado oscuro rojizo (BOR) y rojizo (R).

<b>FAMILIA</b>	<b>Blanca</b>	<b>BB</b>	<b>BC</b>	<b>BCR</b>	<b>B</b>	<b>BR</b>	<b>BO</b>	<b>BOR</b>	<b>R</b>
<b>14609</b>	<b>0,00</b>	<b>0,01</b>	<b>0,47</b>	<b>0,06</b>	<b>0,39</b>	<b>0,04</b>	<b>0,02</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
A	0,03	0,03	0,53	0,00	0,34	0,07	0,00	0,00	0,00
B	0,05	0,00	0,61	0,00	0,30	0,04	0,00	0,00	0,00
C	0,00	0,00	0,47	0,03	0,27	0,17	0,06	0,00	0,00
D	0,00	0,00	0,29	0,21	0,43	0,07	0,00	0,00	0,00
E	0,00	0,03	0,76	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
F	0,03	0,00	0,29	0,00	0,50	0,10	0,08	0,00	0,00
G	0,00	0,00	0,64	0,36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
H	0,00	0,00	0,54	0,03	0,43	0,00	0,00	0,00	0,00
I	0,00	0,00	0,54	0,33	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00
J	0,00	0,02	0,31	0,14	0,45	0,02	0,04	0,02	0,00
K	0,00	0,00	0,61	0,00	0,39	0,00	0,00	0,00	0,00
L	0,00	0,00	0,10	0,00	0,65	0,25	0,00	0,00	0,00
M	0,00	0,00	0,71	0,00	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00
N	0,00	0,00	0,12	0,00	0,76	0,00	0,12	0,00	0,00
O	0,00	0,00	0,59	0,29	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>14603</b>	<b>0,00</b>	<b>0,01</b>	<b>0,51</b>	<b>0,16</b>	<b>0,21</b>	<b>0,09</b>	<b>0,06</b>	<b>0,01</b>	<b>0,00</b>
A	0,00	0,00	0,63	0,06	0,31	0,00	0,00	0,00	0,00
B	0,00	0,00	0,46	0,15	0,23	0,08	0,00	0,08	0,00
C	0,00	0,00	0,10	0,37	0,00	0,53	0,00	0,00	0,00
D	0,00	0,02	0,66	0,12	0,10	0,10	0,00	0,00	0,00
E	0,00	0,37	0,37	0,05	0,16	0,05	0,00	0,00	0,00
F	0,00	0,00	0,55	0,00	0,39	0,06	0,00	0,00	0,00
G	0,02	0,03	0,52	0,00	0,41	0,02	0,00	0,00	0,00
H	0,00	0,00	0,57	0,21	0,14	0,08	0,00	0,00	0,00
I	0,00	0,00	0,34	0,37	0,09	0,02	0,00	0,00	0,00

<b>FAMILIA</b>	<b>Blanca</b>	<b>BB</b>	<b>BC</b>	<b>BCR</b>	<b>B</b>	<b>BR</b>	<b>BO</b>	<b>BOR</b>	<b>R</b>
J	0,00	0,00	0,52	0,15	0,23	0,08	0,00	0,02	0,00
K	0,00	0,03	0,56	0,23	0,12	0,03	0,30	0,00	0,00
L	0,00	0,00	0,17	0,37	0,20	0,26	0,00	0,00	0,00
M	0,00	0,00	0,40	0,43	0,07	0,10	0,00	0,00	0,00
N	0,00	0,00	0,68	0,04	0,19	0,09	0,00	0,00	0,00
O	0,00	0,00	0,48	0,26	0,23	0,03	0,00	0,00	0,00
P	0,00	0,02	0,63	0,03	0,23	0,07	0,02	0,00	0,00
Q	0,00	0,05	0,48	0,24	0,14	0,05	0,02	0,02	0,00
R	0,00	0,00	0,41	0,09	0,37	0,13	0,00	0,00	0,00
S	0,00	0,00	0,06	0,24	0,29	0,41	0,00	0,00	0,00
T	0,00	0,11	0,31	0,42	0,05	0,11	0,00	0,00	0,00
U	0,00	0,00	0,71	0,04	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>14606</b>	<b>0,00</b>	<b>0,01</b>	<b>0,51</b>	<b>0,03</b>	<b>0,41</b>	<b>0,01</b>	<b>0,04</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
A	0,00	0,00	0,54	0,10	0,36	0,00	0,00	0,00	0,00
B	0,00	0,00	0,51	0,02	0,43	0,00	0,04	0,00	0,00
C	0,00	0,30	0,47	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00
D	0,00	0,00	0,51	0,00	0,44	0,00	0,05	0,00	0,00
E	0,00	0,00	0,05	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00
F	0,00	0,00	0,75	0,08	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00
G	0,00	0,00	0,56	0,09	0,35	0,00	0,00	0,00	0,00
H	0,00	0,00	0,16	0,01	0,63	0,01	0,19	0,00	0,00
I	0,00	0,00	0,67	0,03	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00
J	0,00	0,00	0,69	0,03	0,25	0,03	0,00	0,00	0,00
K	0,00	0,02	0,61	0,07	0,28	0,00	0,02	0,00	0,00
L	0,00	0,03	0,31	0,03	0,60	0,03	0,00	0,00	0,00
M	0,00	0,00	0,68	0,00	0,32	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>14611</b>	<b>0,01</b>	<b>0,34</b>	<b>0,07</b>	<b>0,46</b>	<b>0,07</b>	<b>0,04</b>	<b>0,04</b>	<b>0,01</b>	<b>0,00</b>
A	0,00	0,31	0,01	0,54	0,03	0,10	0,10	0,01	0,00
B	0,00	0,37	0,02	0,61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C	0,00	0,42	0,08	0,28	0,14	0,08	0,08	0,00	0,00
D	0,00	0,32	0,00	0,68	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
E	0,00	0,50	0,15	0,21	0,07	0,07	0,07	0,00	0,00

<b>FAMILIA</b>	<b>Blanca</b>	<b>BB</b>	<b>BC</b>	<b>BCR</b>	<b>B</b>	<b>BR</b>	<b>BO</b>	<b>BOR</b>	<b>R</b>
F	0,00	0,26	0,00	0,60	0,07	0,07	0,07	0,00	0,00
G	0,00	0,47	0,00	0,47	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00
H	0,02	0,66	0,06	0,26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
I	0,06	0,06	0,00	0,88	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
J	0,00	0,35	0,23	0,32	0,05	0,05	0,05	0,00	0,00
K	0,06	0,43	0,00	0,48	0,03	0,03	0,00	0,00	0,00
L	0,00	0,23	0,06	0,47	0,24	0,24	0,00	0,00	0,00
M	0,07	0,20	0,20	0,46	0,07	0,07	0,00	0,00	0,00
N	0,03	0,39	0,03	0,42	0,10	0,10	0,03	0,00	0,00
Ñ	0,00	0,29	0,29	0,21	0,21	0,21	0,00	0,00	0,00
O	0,00	0,30	0,00	0,60	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00
P	0,07	0,00	0,00	0,57	0,29	0,29	0,07	0,00	0,00
Q	0,00	0,33	0,17	0,27	0,17	0,17	0,06	0,00	0,00
R	0,00	0,08	0,08	0,31	0,23	0,23	0,15	0,15	0,00
S	0,00	0,26	0,06	0,53	0,05	0,05	0,08	0,02	0,00
T	0,00	0,53	0,16	0,26	0,05	0,05	0,00	0,00	0,00
U	0,00	0,60	0,05	0,30	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00
V	0,06	0,25	0,02	0,49	0,06	0,06	0,06	0,06	0,00
W	0,00	0,35	0,03	0,54	0,05	0,05	0,00	0,03	0,00
X	0,00	0,20	0,00	0,60	0,13	0,13	0,07	0,00	0,00
Y	0,00	33,00	11,00	0,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Z	0,00	0,32	0,21	0,26	0,21	0,21	0,00	0,00	0,00
<b>15601</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,14</b>	<b>0,04</b>	<b>0,47</b>	<b>0,18</b>	<b>0,11</b>	<b>0,06</b>	<b>0,00</b>
A	0,00	0,00	0,24	0,03	0,30	0,21	0,12	0,10	0,00
B	0,00	0,00	0,38	0,31	0,31	0,00	0,00	0,00	0,00
C	0,00	0,00	0,07	0,00	0,89	0,00	0,04	0,00	0,00
D	0,00	0,00	0,18	0,06	0,18	0,41	0,11	0,06	0,00
E	0,00	0,00	0,05	0,00	0,42	0,21	0,32	0,00	0,00
F	0,00	0,00	0,00	0,00	0,53	0,12	0,35	0,00	0,00
G	0,00	0,00	0,17	0,00	0,83	0,00	0,00	0,00	0,00
H	0,00	0,00	0,09	0,00	0,55	0,00	0,36	0,00	0,00
I	0,00	0,00	0,06	0,06	0,18	0,15	0,23	0,32	0,00

<b>FAMILIA</b>	<b>Blanca</b>	<b>BB</b>	<b>BC</b>	<b>BCR</b>	<b>B</b>	<b>BR</b>	<b>BO</b>	<b>BOR</b>	<b>R</b>
J	0,00	0,00	0,38	0,08	0,38	0,16	0,00	0,00	0,00
K	0,00	0,00	0,00	0,00	0,77	0,23	0,00	0,00	0,00
L	0,00	0,00	0,08	0,00	0,84	0,08	0,00	0,00	0,00
M	0,00	0,00	0,16	0,03	0,29	0,44	0,05	0,03	0,00
N	0,00	0,00	0,15	0,00	0,53	0,17	0,12	0,03	0,00
O	0,00	0,00	0,12	0,08	0,53	0,23	0,04	0,00	0,00
P	0,00	0,00	0,31	0,08	0,46	0,15	0,00	0,00	0,00
<b>15605</b>	<b>0,00</b>	<b>0,01</b>	<b>0,16</b>	<b>0,04</b>	<b>0,41</b>	<b>0,11</b>	<b>0,23</b>	<b>0,05</b>	<b>0,00</b>
A	0,00	0,00	0,22	0,00	0,39	0,07	0,20	0,11	0,00
B	0,00	0,00	0,10	0,02	0,38	0,10	0,40	0,00	0,00
C	0,00	0,00	0,17	0,00	0,32	0,02	0,42	0,00	0,00
D	0,00	0,03	0,08	0,08	0,62	0,15	0,05	0,00	0,00
E	0,00	0,02	0,21	0,05	0,35	0,12	0,26	0,00	0,00
F	0,00	0,00	0,06	0,25	0,25	0,44	0,00	0,00	0,00
G	0,00	0,01	0,20	0,12	0,20	0,26	0,14	0,06	0,00
H	0,00	0,00	0,06	0,02	0,20	0,12	0,41	0,18	0,00
I	0,00	0,00	0,29	0,00	0,53	0,06	0,06	0,06	0,00
J	0,00	0,00	0,00	0,00	0,60	0,30	0,10	0,00	0,00
K	0,00	0,00	0,05	0,32	0,37	0,26	0,00	0,00	0,00
L	0,00	0,00	0,13	0,00	0,67	0,20	0,00	0,00	0,00
M	0,00	0,00	0,33	0,13	0,27	0,20	0,07	0,00	0,00
N	0,00	0,00	0,19	0,03	0,48	0,13	0,13	0,03	0,00
Ñ	0,00	0,00	0,06	0,06	0,53	0,15	0,09	0,12	0,00
O	0,00	0,00	0,05	0,00	0,58	0,11	0,16	0,11	0,00
P	0,00	0,08	0,17	0,08	0,50	0,17	0,00	0,00	0,00
Q	0,00	0,00	0,22	0,03	0,38	0,14	0,22	0,03	0,00
R	0,00	0,00	0,11	0,02	0,28	0,22	0,26	0,11	0,00
S	0,00	0,00	0,10	0,02	0,40	0,04	0,38	0,06	0,00
T	0,00	0,00	0,00	0,00	0,60	0,20	0,20	0,00	0,00
U	0,00	0,02	0,14	0,03	0,41	0,08	0,29	0,03	0,00
V	0,00	0,00	0,11	0,00	0,43	0,14	0,24	0,08	0,00
W	0,00	0,00	0,32	0,05	0,21	0,26	0,00	0,16	0,00

<b>FAMILIA</b>	<b>Blanca</b>	<b>BB</b>	<b>BC</b>	<b>BCR</b>	<b>B</b>	<b>BR</b>	<b>BO</b>	<b>BOR</b>	<b>R</b>
X	0,00	0,00	0,24	0,06	0,59	0,01	0,08	0,01	0,00
Y	0,00	0,03	0,13	0,00	0,50	0,09	0,16	0,09	0,00
Z	0,00	0,00	0,27	0,06	0,55	0,02	0,21	0,00	0,00
A1	0,00	0,00	0,35	0,07	0,55	0,12	0,09	0,04	0,00
B1	0,00	0,00	0,18	0,06	0,35	0,18	0,18	0,06	0,00
C1	0,00	0,03	0,12	0,09	0,53	0,06	0,21	0,00	0,00
D1	0,00	0,00	0,16	0,06	0,39	0,23	0,10	0,03	0,00
E1	0,00	0,00	0,08	0,00	0,36	0,03	0,53	0,00	0,00
F1	0,00	0,00	0,09	0,05	0,41	0,07	0,32	0,05	0,00
G1	0,00	0,00	0,22	0,11	0,44	0,11	0,17	0,06	0,00
H1	0,00	0,00	0,16	0,04	0,36	0,05	0,29	0,03	0,00
I1	0,00	0,00	0,19	0,00	0,35	0,06	0,26	0,11	0,00
J1	0,00	0,00	0,20	0,00	0,14	0,33	0,33	0,00	0,00
K1	0,00	0,00	0,32	0,00	0,53	0,05	0,05	0,05	0,00
L1	0,00	0,00	0,36	0,00	0,29	0,14	0,14	0,07	0,00
M1	0,00	0,00	0,24	0,00	0,45	0,11	0,16	0,04	0,00
N1	0,00	0,05	0,20	0,25	0,40	0,10	0,00	0,00	0,00
Ñ1	0,00	0,00	0,06	0,06	0,37	0,11	0,23	0,17	0,00
O1	0,00	0,00	0,21	0,00	0,27	0,10	0,37	0,06	0,00
P1	0,00	0,00	0,14	0,02	0,37	0,12	0,32	0,04	0,00
Q1	0,00	0,00	0,06	0,00	0,94	0,00	0,00	0,00	0,00
R1	0,00	0,00	0,27	0,00	0,67	0,06	0,00	0,00	0,00
S1	0,00	0,00	0,11	0,00	0,53	0,00	0,31	0,06	0,00
T1	0,00	0,00	0,08	0,00	0,46	0,38	0,08	0,00	0,00
U1	0,00	0,02	0,09	0,04	0,40	0,18	0,23	0,04	0,00
V1	0,00	0,06	0,11	0,17	0,39	0,00	0,27	0,00	0,00
W1	0,00	0,00	0,08	0,00	0,41	8,00	0,35	0,08	0,00
X1	0,00	0,00	0,20	0,00	0,34	0,03	0,43	0,00	0,00
Y1	0,00	0,00	0,10	0,00	0,45	0,18	0,22	0,05	0,00
Z1	0,00	0,03	0,39	0,06	0,23	0,06	0,19	0,03	0,00
A2	0,00	0,00	0,03	0,00	0,36	0,14	0,39	0,08	0,00
B2	0,00	0,00	0,17	0,02	0,71	0,08	0,02	0,00	0,00

<b>FAMILIA</b>	<b>Blanca</b>	<b>BB</b>	<b>BC</b>	<b>BCR</b>	<b>B</b>	<b>BR</b>	<b>BO</b>	<b>BOR</b>	<b>R</b>
C2	0,00	0,00	0,37	0,00	0,50	0,13	0,00	0,00	0,00
D2	0,00	0,00	0,21	0,00	0,47	0,00	0,24	0,08	0,00
E2	0,00	0,00	0,09	0,00	0,25	0,13	0,44	0,09	0,00
<b>Pantanosos</b>	0,00	0,00	0,33	0,01	0,50	0,08	0,08	0,00	0,00
<b>Regia</b>	0,00	0,00	0,39	0,12	0,36	0,11	0,12	0,00	0,00
<b>Casera</b>	0,01	0,41	0,07	0,40	0,08	0,03	0,00	0,00	0,00
<b>Naqué</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00

**Cuadro 3.** Evaluación de la segregación de características poscosecha: forma. Las categorías evaluadas fueron: alargada, esférica alargada (esf – alarg), trompo, esférica, esférica achatada (esf – achat), achatada y doble.

<b>FAMILIA</b>	<b>Alargada</b>	<b>Esf - alarg</b>	<b>Trompo</b>	<b>Esférica</b>	<b>Esf - achat</b>	<b>Achatada</b>	<b>Doble</b>
<b>14609</b>	<b>0,31</b>	<b>0,41</b>	<b>0,04</b>	<b>0,23</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
A	0,22	0,63	0,00	0,15	0,00	0,00	0,04
B	0,30	0,50	0,04	0,10	0,02	0,00	0,00
C	0,15	0,47	0,06	0,32	0,00	0,00	0,00
D	0,60	0,26	0,07	0,07	0,00	0,00	0,00
E	0,30	0,40	0,09	0,18	0,00	0,03	0,00
F	0,31	0,26	0,15	0,26	0,02	0,00	0,07
G	0,36	0,29	0,07	0,21	0,00	0,00	0,00
H	0,51	0,32	0,00	0,16	0,00	0,00	0,00
I	0,53	0,27	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00
J	0,19	0,44	0,02	0,35	0,00	0,00	0,00
K	0,33	0,39	0,11	0,17	0,00	0,00	0,00
L	0,10	0,55	0,00	0,35	0,00	0,00	0,00
M	0,28	0,36	0,00	0,36	0,00	0,00	0,00
N	0,25	0,38	0,00	0,38	0,00	0,00	0,00
O	0,41	0,24	0,00	0,35	0,00	0,00	0,00
<b>14603</b>	<b>0,32</b>	<b>0,35</b>	<b>0,12</b>	<b>0,21</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,05</b>
A	0,37	0,33	0,14	0,16	0,00	0,00	0,00
B	0,08	0,31	0,23	0,38	0,00	0,00	0,00
C	0,43	0,16	0,10	0,21	0,00	0,00	0,10
D	0,15	0,44	0,02	0,39	0,00	0,00	0,00
E	0,26	0,37	0,16	0,16	0,00	0,00	0,05
F	0,35	0,42	0,06	0,17	0,00	0,00	0,00
G	0,37	0,41	0,02	0,20	0,00	0,00	0,00
H	0,50	0,29	0,03	0,18	0,00	0,00	0,00
I	0,28	0,03	0,66	0,03	0,00	0,00	0,00
J	0,17	0,38	0,15	0,30	0,00	0,00	0,00

<b>FAMILIA</b>	<b>Alargada</b>	<b>Esf - alarg</b>	<b>Trompo</b>	<b>Esférica</b>	<b>Esf - achat</b>	<b>Achatada</b>	<b>Doble</b>
K	0,12	0,23	0,03	0,56	0,03	0,00	0,03
L	0,33	0,23	0,30	0,15	0,00	0,00	0,00
M	0,49	0,26	0,02	0,23	0,00	0,00	0,00
N	0,59	0,33	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00
O	0,24	0,34	0,15	0,25	0,00	0,00	0,02
P	0,19	0,59	0,03	0,19	0,00	0,00	0,00
Q	0,16	0,47	0,09	0,28	0,00	0,00	0,00
R	0,41	0,41	0,06	0,12	0,00	0,00	0,00
S	0,05	0,42	0,00	0,53	0,00	0,00	0,00
T	0,40	0,42	0,08	0,10	0,00	0,00	0,00
U	0,79	0,13	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>14606</b>	<b>0,27</b>	<b>0,31</b>	<b>0,18</b>	<b>0,19</b>	<b>0,03</b>	<b>0,02</b>	<b>0,00</b>
A	0,45	0,10	0,27	0,18	0,00	0,00	0,00
B	0,36	0,36	0,22	0,06	0,00	0,00	0,00
C	0,47	0,27	0,20	0,06	0,00	0,00	0,00
D	0,33	0,41	0,23	0,03	0,00	0,00	0,00
E	0,13	0,63	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00
F	0,33	0,33	0,18	0,08	0,00	0,08	0,00
G	0,06	0,22	0,50	0,19	0,03	0,00	0,00
H	0,07	0,13	0,01	0,54	0,17	0,08	0,00
I	0,40	0,30	0,23	0,07	0,00	0,00	0,00
J	0,49	0,31	0,13	0,07	0,00	0,00	0,00
K	0,30	0,42	0,10	0,18	0,00	0,00	0,00
L	0,19	0,22	0,31	0,25	0,03	0,00	0,00
M	0,18	0,42	0,11	0,29	0,00	0,00	0,00
<b>14611</b>	<b>0,50</b>	<b>0,30</b>	<b>0,04</b>	<b>0,11</b>	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>
A	0,30	0,35	0,05	0,30	0,00	0,00	0,00
B	0,27	0,39	0,16	0,18	0,00	0,00	0,00
C	0,45	0,43	0,03	0,10	0,00	0,00	0,00
D	0,42	0,16	0,11	0,31	0,00	0,00	0,00
E	0,50	0,42	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00
F	0,87	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

<b>FAMILIA</b>	<b>Alargada</b>	<b>Esf - alarg</b>	<b>Trompo</b>	<b>Esférica</b>	<b>Esf - achat</b>	<b>Achatada</b>	<b>Doble</b>
G	0,47	0,41	0,06	0,00	0,00	0,06	0,00
H	0,71	0,23	0,03	0,03	0,00	0,00	0,00
I	0,83	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
J	0,27	0,35	0,10	0,25	0,00	0,00	0,03
K	0,54	0,37	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00
L	0,29	0,41	0,06	0,24	0,00	0,00	0,00
M	0,33	0,60	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
N	0,61	0,36	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00
Ñ	0,21	0,21	0,43	0,15	0,00	0,00	0,00
O	0,70	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P	0,14	0,64	0,00	0,22	0,00	0,00	0,00
Q	0,56	0,38	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00
R	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S	0,77	0,17	0,02	0,04	0,00	0,00	0,00
T	0,32	0,47	0,05	0,16	0,00	0,00	0,00
U	0,65	0,25	0,00	0,05	0,05	0,00	0,00
V	0,86	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
W	0,59	0,30	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00
X	0,44	0,31	0,00	0,25	0,00	0,00	0,00
Y	0,50	0,33	0,00	0,17	0,00	0,00	0,00
Z	0,89	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>15601</b>	<b>0,31</b>	<b>0,29</b>	<b>0,08</b>	<b>0,30</b>	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>	<b>0,00</b>
A	0,24	0,27	0,18	0,24	0,00	0,07	0,00
B	0,38	0,23	0,31	0,08	0,00	0,00	0,00
C	0,78	0,11	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00
D	0,18	0,41	0,06	0,35	0,00	0,00	0,00
E	0,36	0,32	0,00	0,32	0,00	0,00	0,00
F	0,12	0,06	0,23	0,47	0,06	0,06	0,00
G	0,08	0,92	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
H	0,00	0,18	0,09	0,73	0,00	0,00	0,00
I	0,15	0,44	0,00	0,41	0,00	0,00	0,00
J	0,15	0,15	0,08	0,62	0,00	0,00	0,00

<b>FAMILIA</b>	<b>Alargada</b>	<b>Esf - alarg</b>	<b>Trompo</b>	<b>Esférica</b>	<b>Esf - achat</b>	<b>Achatada</b>	<b>Doble</b>
K	0,62	0,15	0,08	0,15	0,00	0,00	0,00
L	0,00	0,23	0,15	0,39	0,23	0,00	0,00
M	0,24	0,35	0,00	0,41	0,00	0,00	0,00
N	0,24	0,36	0,16	0,24	0,00	0,00	0,00
O	0,52	0,28	0,00	0,16	0,04	0,00	0,00
P	0,08	0,76	0,08	0,08	0,00	0,00	0,00
<b>15605</b>	<b>0,24</b>	<b>0,35</b>	<b>0,10</b>	<b>0,30</b>	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>	<b>0,00</b>
A	0,50	0,30	0,02	0,17	0,00	0,02	0,00
B	0,21	0,29	0,06	0,44	0,00	0,00	0,00
C	0,23	0,48	0,05	0,25	0,00	0,00	0,00
D	0,41	0,23	0,26	0,10	0,00	0,00	0,00
E	0,14	0,35	0,12	0,33	0,07	0,00	0,00
F	0,13	0,31	0,13	0,38	0,00	0,06	0,00
G	0,13	0,23	0,20	0,39	0,03	0,01	0,00
H	0,22	0,24	0,02	0,49	0,02	0,00	0,00
I	0,06	0,41	0,12	0,41	0,00	0,00	0,00
J	0,00	0,10	0,00	0,80	0,00	0,10	0,00
K	0,11	0,37	0,00	0,47	0,00	0,05	0,00
L	0,20	0,00	0,07	0,73	0,00	0,00	0,00
M	0,00	0,47	0,20	0,33	0,00	0,00	0,00
N	0,25	0,44	0,09	0,22	0,00	0,00	0,00
Ñ	0,18	0,38	0,09	0,29	0,06	0,00	0,00
O	0,36	0,26	0,11	0,37	0,00	0,00	0,00
P	0,08	0,33	0,08	0,25	0,25	0,00	0,00
Q	0,30	0,32	0,05	0,32	0,00	0,03	0,00
R	0,25	0,40	0,12	0,23	0,00	0,00	0,00
S	0,60	0,28	0,02	0,08	0,00	0,00	0,02
T	0,87	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
U	0,17	0,32	0,22	0,25	0,02	0,02	0,00
V	0,35	0,32	0,11	0,22	0,00	0,00	0,00
W	0,28	0,33	0,06	0,33	0,00	0,00	0,00
X	0,47	0,25	0,08	0,19	0,00	0,00	0,00

Y	0,06	0,28	0,13	0,53	0,00	0,00	0,00
Z	0,10	0,33	0,27	0,27	0,00	0,02	0,00
A1	0,35	0,40	0,02	0,23	0,00	0,00	0,00
B1	0,12	0,21	0,18	0,50	0,00	0,00	0,00
C1	0,24	0,24	0,32	0,21	0,00	0,00	0,00
D1	0,10	0,32	0,13	0,35	0,35	0,00	0,00
E1	0,27	0,42	0,04	0,27	0,00	0,00	0,00
F1	0,13	0,38	0,21	0,29	0,00	0,00	0,00
G1	0,11	0,50	0,11	0,28	0,00	0,00	0,00
H1	0,24	0,53	0,16	0,08	0,00	0,00	0,00
I1	0,20	0,46	0,15	0,15	0,00	0,04	0,00
J1	0,00	0,40	0,13	0,40	0,07	0,00	0,00
K1	0,21	0,42	0,26	0,11	0,00	0,00	0,00
L1	0,00	0,14	0,00	0,79	0,00	0,07	0,00
M1	0,24	0,27	0,05	0,42	0,00	0,02	0,00
N1	0,35	0,40	0,05	0,20	0,00	0,00	0,00
Ñ1	0,17	0,31	0,09	0,43	0,00	0,00	0,00
O1	0,04	0,27	0,06	0,60	0,02	0,02	0,00
P1	0,04	0,32	0,11	0,53	0,00	0,02	0,00
Q1	0,11	0,17	0,33	0,39	0,00	0,00	0,00
R1	0,27	0,33	0,07	0,33	0,00	0,00	0,00
S1	0,31	0,47	0,07	0,13	0,00	0,02	0,00
T1	0,08	0,54	0,08	0,30	0,00	0,00	0,00
U1	0,30	0,38	0,12	0,18	0,00	0,02	0,00
V1	0,39	0,44	0,11	0,06	0,00	0,00	0,00
W1	0,05	0,46	0,05	0,41	0,00	0,03	0,00
X1	0,26	0,40	0,08	0,26	0,00	0,00	0,00
Y1	0,08	0,41	0,04	0,43	0,04	0,00	0,00
Z1	0,13	0,29	0,10	0,45	0,03	0,00	0,00
A2	0,43	0,49	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00
B2	0,44	0,29	0,08	0,19	0,00	0,00	0,00
C2	0,89	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
D2	0,26	0,53	0,00	0,21	0,00	0,00	0,00

<b>FAMILIA</b>	<b>Alargada</b>	<b>Esf - alarg</b>	<b>Trompo</b>	<b>Esférica</b>	<b>Esf - achat</b>	<b>Achatada</b>	<b>Doble</b>
E2	0,31	0,33	0,08	0,27	0,02	0,00	0,00
Pantanosos	0,10	0,29	0,15	0,36	0,10	0,00	0,00
Regia	0,25	0,54	0,08	0,13	0,00	0,00	0,00
Casera	0,06	0,39	0,27	0,23	0,04	0,01	0,00
Naqué	0,16	0,38	0,25	0,17	0,04	0,00	0,00