

# INFLUENCIA DE LA EDAD EN LA RESISTENCIA DE EJEMPLARES DE *Ulmus minor* A LA GRAFIOSIS

A. SOLLA; M. RUÍZ-VILLAR; M. BURÓN; L. GIL

Unidad de Anatomía, Fisiología y Mejora Genética. ETSI de Montes. UPM. Paseo de las Moreras s/n, 28040-Madrid

## RESUMEN

En el programa de mejora español se inoculan anualmente numerosos ejemplares de *Ulmus minor* Mill., con el fin de seleccionar los más resistentes. Debido a que los olmos se inoculan a diferentes edades, interesa conocer la influencia de la edad en la resistencia. Cuatro genotipos de *U. minor* y un genotipo de *U. minor* x *U. pumila* L. fueron propagados vegetativamente desde 1994 hasta 1999. Las réplicas obtenidas cada año (n = 6) se inocularon el 17 de mayo de 2000 con una suspensión de esporas de una cepa agresiva de grafiosis. Al final de la temporada, los ejemplares de *U. minor* de 2 savias mostraron un marchitamiento medio de  $8 \pm 3$  % (ES), significativamente menor al mostrado por los ejemplares de 3 savias ( $34 \pm 5$  %) ( $P \leq 0.01$ ). Las réplicas de 4, 5, 6 y 7 savias manifestaron un marchitamiento próximo a 50 %. Los resistencia juvenil observada coincide con la descrita anteriormente para *U. x hollandica* y *U. americana*. Se concluye que, para la correcta selección de ejemplares resistentes, es necesario inocular cuando los árboles tengan al menos 4 savias.

**P.C.:** Edad, resistencia, *Ulmus minor*, *Ulmus pumila*, *Ophiostoma novo-ulmi*.

## SUMMARY

In the Spanish elm breeding program numerous *Ulmus minor* Mill. trees are inoculated annually in order to select those which are most resistant. As elms are inoculated at different ages it is of interest to establish the influence elm age has on resistance. Four *U. minor* trees and one *U. minor* x *U. pumila* L. tree were cloned from 1994 to 1999. The replicates obtained each year (n = 6) were inoculated on 17th May, 2000 with a spore suspension from an aggressive strain of Dutch elm disease. At the end of the season the 2-year *U. minor* trees showed wilting of  $8 \pm 3$  % (ES), significantly lower than that shown by 3-year trees ( $34 \pm 5$  %) ( $P \leq 0.01$ ). The elms of 4, 5, 6 and 7 years showed wilting of around 50%. The resistance observed in younger trees reflects similar findings reported for *U. x hollandica* and *U. americana*. It is concluded that for the correct selection of resistant elms it is necessary to inoculate when they are less than 4 years old.

**K.W.:** Age, resistance, *Ulmus minor*, *Ulmus pumila*, *Ophiostoma novo-ulmi*.

## INTRODUCCIÓN, MATERIAL Y MÉTODOS

Ante la grafiosis, los programas de mejora y selección ofrecen esperanzas a largo plazo para el olmo. En el programa de mejora español, se inoculan anualmente numerosos ejemplares de *Ulmus minor* Mill. con el fin de seleccionar los más resistentes (SOLLA *et al.* 1999). Por un lado, interesa conocer la influencia de la edad en la resistencia para proceder a una correcta selección. Por otro lado, resulta útil determinar la edad mínima en que los olmos manifiestan su resistencia real para proceder a su selección, lo antes posible, y acortar así los ciclos de mejora. No existen trabajos previos que hayan estudiado la influencia de la edad en la resistencia de *U. minor* a la grafiosis, aunque existen citas para otras especies (CAROSELLI & FELDMAN 1951; WENT 1954; HEYBROECK 1957; SCHREIBER & STIPES 1967).

En el presente trabajo, réplicas de olmos de seis edades diferentes fueron inoculadas artificialmente con *Ophiostoma novo-ulmi* Brasier para: 1), observar la velocidad con que se inician los primeros síntomas, y 2), evaluar el diferente grado de marchitamiento manifestando a lo largo de una temporada.

El estudio se realizó sobre cinco genotipos, cuatro de la especie *Ulmus minor* Miller y un híbrido de *U. minor* x *Ulmus pumila* L. (tabla 1). Desde 1994 hasta 1999 los árboles se propagaron vegetativamente por estaquillado de raíz. Al año siguiente de su propagación, las réplicas fueron plantadas a un marco de 0,9 m x 0,9 m, en una parcela experimental ubicada en Puerta de Hierro (Madrid). El diseño de la parcela fue de dos bloques completos al azar (figura 1). Rodeando a la parcela se estableció una línea borde de olmos propagados entre 1994 y 1997.

El 17 de mayo de 2000 se inocularon los árboles de la parcela con una cepa de *O. novo-ulmi*, raza NAN. La cepa fue aislada en placas de Petri en 1995 a partir de un ramillo apical de un ejemplar de *U. minor* infectado, ubicado en Valencia. Como medio de aislamiento se utilizó extracto de agar malta (AM) al 2 %, con cicloheximida ( $0,10 \text{ g l}^{-1}$ ), y sulfato de estreptomina ( $0,13 \text{ g l}^{-1}$ ) (BRASIER 1981). Desde su aislamiento, el hongo fue conservado en nevera a 4 °C y repicado cada cuatro a seis meses. Durante el mes

previo a las inoculaciones se repicó semanalmente sobre placas con AM, y se cultivó a 20 °C en oscuridad. En estas condiciones su crecimiento *in vitro* fue 6,5 mm/día.

La semana antes de inocular se introdujeron tres piezas de 2 x 2 mm de micelio en frascos Erlenmeyer conteniendo medio líquido de Tchernoff (TCHERNOFF 1965). La composición del medio fue 20 g de glucosa, 2 g de L-asparagina, 1,5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g de MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, 20 mg de ZnSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, 10 mg de FeCl<sub>3</sub>, 1 mg de vitamina B<sub>1</sub> (tiamina), y 1 mg de vitamina B<sub>6</sub> (piridoxina) en 1 l de agua destilada esterilizada. Los frascos se agitaron durante tres días, a 125 rpm, y a temperatura del laboratorio. Las esporas desarrolladas en el medio fueron filtradas, centrifugadas (1.000 g; 20 min.) e introducidas en agua destilada esterilizada. Las inoculaciones en los árboles se hicieron con una jeringuilla esterilizada, practicándose antes un corte transversal en el tronco principal del árbol, con una navaja, hasta llegar al anillo xilemático del año. Los cortes se hicieron a una altura aproximada de 10 cm sobre el nivel del suelo, en la cara norte del árbol. Sobre la hoja de la navaja se vertió 0,1 ml de una suspensión de esporas a una concentración de 10<sup>6</sup> conidios/ml, la cual fue rápidamente absorbida por el árbol.

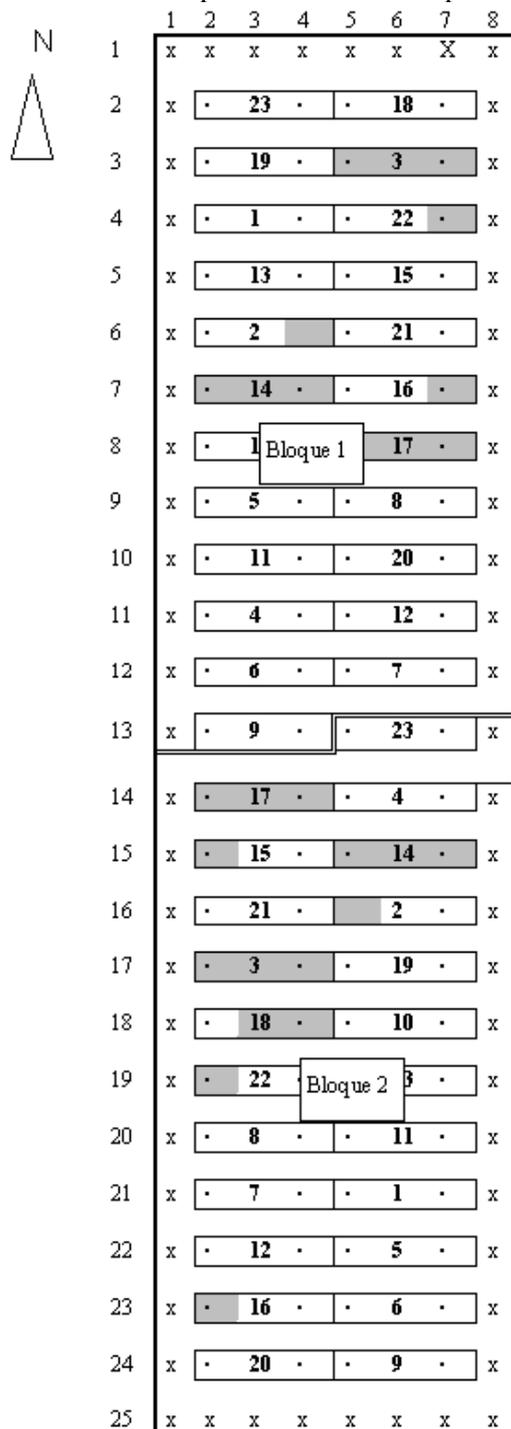
Para observar la velocidad con que se inician los síntomas se revisó diariamente cada ejemplar desde el día de las inoculaciones hasta el día 14. Los árboles se puntuaron con un índice de entre 0 a 3 según sus hojas apicales estuvieran turgentes (0), comenzando a decaer (1), arrugadas (2) o secas (3) (figura 2). La susceptibilidad de los árboles se evaluó en función del porcentaje de marchitamiento foliar observado en la copa. Se hicieron nueve revisiones con una periodicidad aproximada de 15 días, desde el día de la inoculación hasta el día 120.

**Tabla 1.** Material vegetal utilizado en el estudio de la influencia de la edad en la resistencia a la grafiosis. Se indican las réplicas por edad de los olmos inoculados con *Ophiostoma novo-ulmi* y el número de la unidad experimental en la parcela.

Especie	Genotipo	Réplicas por edad <sup>1</sup>					
		2 savias	3 savias	4 savias	5 savias	6 savias	7 savias
<i>U. minor</i>	M-CC 1	6 (19)	-	6 (9)	-	6 (4)	6 (1)
	M-DV 1	6 (20)	5 (15)	6 (10)	-	6 (5)	-
	V-AN 3	6 (21)	4 (16)	6 (11)	-	-	4 (2)
	ZA-TR 3	4 (22)	-	6 (12)	-	6 (6)	-
<i>U. minor</i> x <i>U. pumila</i>	M-PZ 3	6 (23)	4 (18)	6 (13)	6 (8)	6 (7)	-

<sup>1</sup>Los guiones indican que no se dispuso de planta para esa edad.

Para el análisis estadístico, los porcentajes de marchitamiento al final de la temporada fueron normalizados mediante la transformación  $\arcsen(x/100)^{1/2}$ . Sobre estos valores se realizó un ANOVA multifactorial tomándose como factores el bloque, la edad y el genotipo. Dado que los datos estuvieron desequilibrados se utilizó el procedimiento GLM (SAS Institute Inc.), a partir del cual se obtuvieron medias ponderadas. Para comparar las medias se aplicaron tests de Tukey.



**Figura 1.** Parcela de inoculación utilizada para el estudio de la influencia de la edad en la resistencia de *U. minor* a la grafiosis. Los números indican unidades experimentales (n=3), y las "x" árboles de la línea borde. Las unidades sombreadas son marras producidas durante los años anteriores al ensayo.



**Figura 2.** Índices utilizados para evaluar los síntomas foliares iniciales de olmos inoculados con *Ophiostoma novo-ulmi*: hojas sanas (0), decaídas (1), arrugadas (2) y secas (3).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Lo más destacable de los resultados fue el diferente comportamiento frente a la grafiosis de los olmos

de 2 y de 3 savias frente a los de 4, 5, 6 y 7 savias. Los genotipos de *U. minor* y de *U. minor* x *U. pumila* de 2 y de 3 savias mostraron mayor resistencia. Esta resistencia juvenil se ha podido constatar tanto en la aparición de los síntomas iniciales como en los marchitamientos observados a lo largo de la temporada (figura 3).

Los primeros síntomas a *O. novo-ulmi* se registraron a los seis días. En plantas de 7, 6, 5 y 4 savias, los índices de sintomatología inicial no difirieron significativamente entre sí a lo largo de los 14 días de observación. Transcurrieron entre cinco y seis días desde el momento en que las hojas comenzaron a decaer (días 6-7) hasta que se secaron completamente (días 11-12). En plantas de 3 savias y a partir del día 8, los índices fueron significativamente menores a los índices de las plantas de mayor edad ( $P \leq 0,01$ ). Las plantas de 2 savias no mostraron síntoma alguno salvo algunas hojas decaídas en los genotipos M-DV 1 y ZA-TR 3.

Los marchitamientos foliares observados a lo largo del ensayo siguieron una evolución ascendente, estabilizándose en todas las edades y genotipos a partir del día 30 de inocular (figura 3). A los 120 días, los olmos de 2 savias manifestaron un marchitamiento medio ponderado de  $8,1 \pm 3,0$  % (media  $\pm$  ES;  $n = 28$ ), menor al manifestado por los olmos de 3 savias ( $33,9 \pm 4,7$  %) ( $P \leq 0,01$ ). Los olmos de 4, 5, 6 y 7 savias manifestaron marchitamientos medios de  $53,2 \pm 2,9$  %,  $46,8 \pm 7,2$  %,  $50,0 \pm 3,3$  % y  $47,9 \pm 4,5$  % respectivamente. Estos valores no difirieron estadísticamente entre sí, pero fueron mayores al marchitamiento en plantas de 3 savias ( $P \leq 0,10$ ). Se distinguieron dos grupos de susceptibilidad: a los 120 días, los genotipos M-CC1, M-PZ 3 y M-DV 1 manifestaron porcentajes medios de marchitamiento de  $29,4 \pm 3,6$ ,  $31,5 \pm 3,2$  y  $34,5 \pm 3,7$ , inferiores a los valores  $48,6 \pm 4,4$  y  $55,9 \pm 3,8$ , manifestados por ZA-TR 3 y V-AN 3 respectivamente ( $P \leq 0,01$ ). No hubo diferencias significativas entre bloques ni interacciones significativas edad - genotipo.

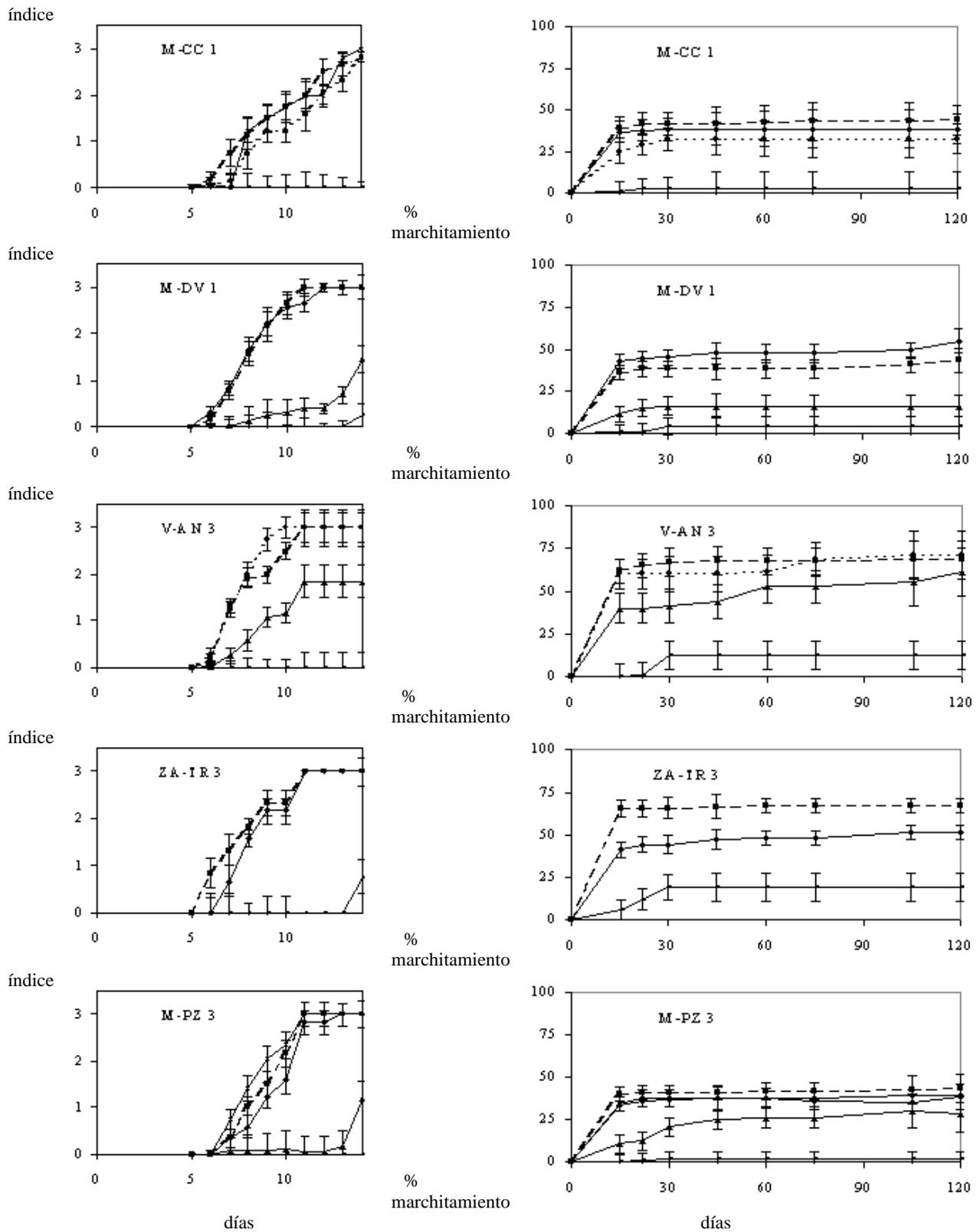
La resistencia juvenil observada en el presente trabajo coincide con la descrita anteriormente en *Ulmus x hollandica* Miller (WENT 1954; HEYBROEK 1957) y en *U. americana* L. (CAROSELLI & FELDMAN 1951). Según estos autores, olmos de dos años no manifiestan síntomas, y sólo lo hacen al tercero ante un rápido crecimiento. HEYBROEK (1957) sitúa el salto de susceptibilidad justo antes o durante la floración, y lo relaciona con las alteraciones morfológicas y fisiológicas que sufre la planta en ese momento, tras las cuales la resistencia se estabiliza. Otros autores, sin embargo, no han encontrado resistencia juvenil en plantitas híbridas entre *U. x hollandica* y *U. wallichiana*, y en plantitas de *U. americana* (ARISUMI & HIGGINS 1961; SMALLEY 1963; TCHERNOFF 1965).

De los resultados obtenidos se deduce que la susceptibilidad de *U. minor* a la grafiosis se estabiliza a partir de las cuatro savias. En *U. americana* se ha observado que a partir de los cuatro años la susceptibilidad y el período de susceptibilidad tienden a disminuir (SMALLEY & KAIS 1966). En un ensayo realizado, plantas de cuatro savias alcanzaron marchitamientos del 20 % por encima de las de ocho savias (SCHREIBER & STIPES 1967).

Se plantea la hipótesis de que la anatomía vascular juegue un importante papel en la variación de la susceptibilidad según la edad. Las dimensiones de los elementos vasculares del xilema se han relacionado en ocasiones con la susceptibilidad de *Ulmus* sp. (ELGERSMA 1970; SINCLAIR 1975). Olmos con vasos de gran diámetro son más susceptibles que olmos con vasos de menor diámetro, se piensa debido a que posibilitan una mayor difusión de la

Sintomatología inicial

Sintomatología a lo largo de la temporada



**Figura 3.** Sintomatología manifestada por cuatro genotipos de *U. minor* (M-CC 1, M-DV 1, V-AN 3 y ZA-TR 3) y un genotipo de *U. minor* x *U. pumila* (M-PZ 3) tras su inoculación con *Ophiostoma novo-ulmi*. Se dan los valores medios para árboles de 2 (-), 3 (s), 4 (n), 5 (x), 6 (♦) y 7 (●) savias ( $n \geq 4$ ). Las barras verticales son errores estándar.

enfermedad en el interior de la planta y debido a que son más difíciles de compartimentar, como mecanismo de defensa. En la actualidad se están levantando los árboles inoculados para proceder al estudio anatómico de los vasos del anillo infectado. En un trabajo paralelo a éste (SOLLA *et al.* 2001) se han medido las dimensiones de los elementos vasculares del xilema en ramas de distintas edades, para los mismos genotipos. A mayor edad de la rama, mayores diámetros y longitudes medias de los elementos del xilema.

## CONCLUSIONES

Réplicas de *Ulmus minor* de dos o tres savias manifiestan resistencia juvenil a la grafiosis, luego no son adecuadas para evaluar la susceptibilidad de un determinado ejemplar. A partir de las cuatro savias la resistencia se estabiliza, edad a partir de la cual se podrán inocular y seleccionar los individuos resistentes. A partir de los 30 días de las inoculaciones el porcentaje de marchitamiento se estabiliza para toda la temporada, luego bastará evaluar la resistencia de los individuos a los 60 días de su inoculación.

## AGRADECIMIENTOS

A Santiago González por la ayuda en el análisis estadístico. El trabajo se ha desarrollado en el marco de un convenio suscrito entre la DGCONA (Ministerio de Medio Ambiente) y la ETSI de Montes (UPM).

## BIBLIOGRAFÍA

- ARISUMI, T. & HIGGINS, D. J.; (1961). *Effects of Dutch elm disease on seedling elms*. *Phytopathology*. **51**,847-850.
- BRASIER, C. M.; (1981). *Laboratory investigation of Ceratocystis ulmi*. En: *Compendium of Elm Diseases*. Stipes R. J. & Campana R. J. (Ed.). Am. Phy. Society: St. Paul, Minnesota. 76-79.
- CAROSELLI, N. E. & FELDMAN, A. W.; (1951). *Dutch elm disease in young elm seedlings*. *Phytopathology*. **41**,46-51.
- ELGERSMA, D. M. (1970). *Length and diameter of xylem vessels as a factors in resistance of elms to Ceratocystis ulmi*. *Neth. J. Plant. Pathol.* **76**,179-182.
- HEYBROEK, H. M.; (1957). *Elm breeding in the Netherlands*. *Silvae Genetica*. **6**,112-117.
- SCHREIBER, L. R. & STIPES, R. J. (1967). *The effect of inoculum spore concentration on the development of foliar symptoms of Dutch Elm Disease*. *Phytopathology*. 1269 (nota).
- SINCLAIR, W. A.; ZAHAND, J. P.; MELCHING, J. B.; (1975). *Anatomical markers for resistance of Ulmus americana to Ceratocystis ulmi*. *Phytopathology*. **65**,349-352.
- SMALLEY, E. B. & KAIS, A. G.; (1966). *Seasonal variations in the resistance of various elm species to Dutch elm Disease*. En: *Breeding pest-resistant trees, Proc NATO/NSF*, Gerhold, H. D. & Schreiner, E. J. (Ed.); McDermott, R. E.; Winieski, J. A. Pergamon Press, Elmsford, NY 279-287.
- SMALLEY, E. B.; (1963). *Seasonal fluctuations in susceptibility of young elm seedlings to Dutch elm disease*. *Phytopathology*. **53**,846-853.
- SOLLA, A.; MENÉNDEZ, Y.; BURÓN, M.; IGLESIAS, S.; GIL, L.; (1999). *Programa español para la conservación y mejora de Ulmus minor Miller*. *Montes*. **56**,5-12.
- SOLLA, A.; RUÍZ-VILLAR, M; BURÓN, M.; LÓPEZ, D.; LÓPEZ, J. C.; GIL, L.; (2001). *Longitud y diámetro de los vasos del xilema en Ulmus minor y en U. minor x U. pumila*. *Actas del III Congreso Forestal Español*. Granada, octubre de 2001.
- TCHERNOFF, V.; (1965). *Methods for screening and for the rapid selection of elms for resistance to Dutch elm disease*. *Acta Bot. Neerl.* **14**,409-452.
- WENT, J. C.; (1954). *The Dutch Elm Disease. Summary of fifteen years hybridisation and selection work (1937-1952)* *Tijdschr. Plziekte*. **60**,109-127.