

Inoculación de en el olmo campestre: La humedad del suelo como factor que influye en la manifestación de síntomas

A. SOLLA; M. BURÓN; L. GIL

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

RESUMEN

Se pretende observar la respuesta de *U. minor* a la grafiosis ante tratamientos dobles de riego alto y riego bajo. Réplicas de dos ejemplares de *Ulmus minor* fueron plantadas en macetas y divididas en dos grupos. En cada grupo se practicó un tratamiento de riego diferente: riego inicial alto seguido de riego bajo (AB), y riego inicial bajo seguido de riego alto (BA). El cambio de riego se realizó el 29 de mayo de 1998, a los 15 días de inocular las plantas con una suspensión de esporas de *Ophiostoma novo-ulmi* (n=6). Se dejaron plantas sin inocular en las cuales se midieron una serie de parámetros fisiológicos relacionados con el estado hídrico y se midieron los diámetros de los vasos del xilema (n=3). Los olmos inoculados sometidos a AB mostraron mayores marchitamientos que los olmos inoculados sometidos a BA. Del mismo modo los olmos control sometidos a AB desarrollaron, mientras duró el tratamiento inicial, vasos de mayores diámetros que los olmos control sometidos a BA. Se piensa que la formación de vasos de grandes diámetros permite una mayor difusión del patógeno, y facilita la cavitación de los mismos debido al efecto combinado grafiosis y estrés hídrico.

P.C.: Humedad del suelo, parámetros hídricos, vasos del xilema, *Ulmus minor*, *Ophiostoma novo-ulmi*.

SUMMARY

The response of *U. minor* to Dutch elm disease is observed following double treatments of high-level and low-level watering. Replicates of two *Ulmus minor* trees were planted in pots and divided into two groups. In each group a different watering regime was applied: high-level watering followed by low-level watering (HL), and low-level watering followed by high-level watering (LH). The changeover between treatments took place on 29th May, 1998, 15 days after inoculation of the plants with *Ophiostoma novo-ulmi* spores (n=6). In a control group containing non-inoculated plants, a series of physiological parameters related to water content were measured, as well as xylem diameters (n = 3). The inoculated elms under the HL regime showed greater wilting than those under LH. Similarly, during the period up to 29th May the control elms under HL developed greater vessel diameters than the control elms under LH. It is thought that the formation of greater vessel diameters enables greater diffusion of the pathogen, and facilitates cavitation within them due to the combined effect of Dutch elm disease and water stress.

K.W.: Soil humidity, hydric parameters, xylem vessels, *Ulmus minor*, *Ophiostoma novo-ulmi*.

INTRODUCCIÓN, MATERIAL Y MÉTODOS

Todo programa de mejora frente a una enfermedad requiere el desarrollo de métodos precisos para evaluar la resistencia de los individuos seleccionados. En los trabajos dedicados a la mejora del olmo en España, dentro del convenio suscrito entre la DGCONA y la UPM, se inocula artificialmente con grafiosis desde que se comprobó que este método produce efectos similares a las infecciones provocadas por mordeduras de escolítidos.

Para seleccionar adecuadamente se hace necesario conocer si un árbol es resistente *per se* o lo es debido a factores externos que le confieren resistencia. La expresión de síntomas por grafiosis depende de factores edáficos y climáticos (SMALLEY & KAIS 1966; SUTHERLAND *et al.* 1997). Se desconoce en qué grado la humedad del suelo es un factor influyente. El contenido de agua en el suelo, determina la disponibilidad de agua para la planta lo que influye en la expansión celular y en el tamaño de los vasos del xilema (LOVISOLO & SCHUBERT 1998). Olmos con vasos de gran diámetro son más susceptibles a la grafiosis que olmos con vasos de pequeño diámetro (SINCLAIR *et al.* 1975; SOLLA & GIL 2001), luego es de esperar que olmos que desarrollen grandes vasos debido a disponibilidad de agua abundante (**A**) manifiesten mayores síntomas que olmos que desarrollen vasos pequeños debido a una disponibilidad de agua baja (**B**). Se plantea la hipótesis adicional de que si tras la inoculación los olmos son sometidos a un régimen de riego escaso, los síntomas incrementarán debido al efecto añadido del estrés hídrico.

Se utilizaron dos genotipos de la especie *Ulmus minor* Miller, el primero ubicado en el parque de La Casa de Campo, Madrid (M-CC 1), y el segundo en Madrideojos, Toledo (TO-MD 3). Los árboles fueron propagados en 1996 por estaquillado de raíz, y las réplicas trasplantadas al año siguiente a macetas de 25 cm de diámetro. Se utilizó tierra de textura franco arenosa enriquecida con turba (80:20 v/v). En el momento de la inoculación, los olmos tenían tres savias y una altura próxima a 1,2 m. Las plantas fueron divididas en dos grupos denominados **BA** y **AB**, haciendo referencia a riego abundante (**A**) y bajo (**B**). Se pretendió estresar inicialmente al grupo **BA** frente al grupo **AB**, para obtener vasos del xilema de menor diámetro. Una vez

inoculada la planta se buscó el efecto contrario, es decir, estresar al segundo grupo frente al primero.

Los tratamientos se iniciaron el 5 de abril de 1998, 20 días antes de la brotación de los árboles. El grupo **BA** fue regado a capacidad de campo una vez por semana y **AB** fue regado a capacidad de campo dos veces por semana (9:00 h). Los olmos se inocularon el 14 de mayo del mismo año y a los 15 días de las inoculaciones se invirtió el régimen de riego: **BA** se regó a capacidad de campo dos veces por semana y **AB** fue regado una sola vez ($n = 9$). Seis plantas se inocularon y tres se dejaron como controles para la evaluar su estado hídrico y estudiar su histología.

Las inoculaciones se hicieron con una cepa de *Ophiostoma novo-ulmi* Brasier de raza NAN. La cepa fue aislada en 1996 de un ejemplar de *U. minor* localizado en Orense y tuvo un crecimiento *in vitro* en AM (20° C) próximo a los 6 mm/día. La metodología de inoculación se describe en TCHERNOFF (1965). Para evaluar la susceptibilidad de las plantas se registraron los marchitamientos foliares los días 10, 15, 20, 30, 40, 60 y 120 tras las inoculaciones.

Antes y después de inocular se realizaron mediciones del contenido del agua en el sustrato (WSC) en todas las macetas mediante sondas de 15 cm conectadas a un TDR. Una primera medición se realizó el 13 de mayo de 1998 a las 7:30 h, un día antes de las inoculaciones. El mismo día y sobre la planta control se hicieron mediciones del potencial hídrico (Ψ ; MPa) y la conductancia estomática (g_s ; $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Ψ se registró a las 7:00 h (Ψ_a) y a las 14:00 h (Ψ_m) y g_s se midió a las 14:00 h. Una segunda medición se hizo al mes siguiente (14 de junio), a los 15 días de incrementar el riego en **BA** y de disminuirlo en **AB**. Se hicieron dos mediciones por planta sobre hojas apicales.

El estudio histológico se realizó en diciembre de 1999 sobre los elementos del xilema de las plantas control. Las mediciones se realizaron dentro del anillo correspondiente al año de las inoculaciones, tomándose porciones transversales de los tallos principales. La obtención de secciones y la definición de sectores dentro de cada sección se hizo según SOLLA & GIL (2001). En tres sectores por sección se midieron los diámetros interiores de los vasos, a partir de los cuales se calculó la superficie transversal conductora (STC) y las conductancias hidráulicas teóricas relativas (CH; μm^2). STC se obtuvo de dividir el área que ocupan los vasos en un sector entre la comprendida por dicho sector y multiplicando este cociente por 100. CH se calculó sumando la cuarta potencia de los radios de los vasos ($\sum r_n^4$) y dividiendo por el área del sector. Los datos obtenidos fueron normalizados mediante la transformación $\arcsen(x/100)^{1/2}$. Tras realizarse ANOVAs multifactoriales se compararon las medias mediante tests LSD. El programa estadístico utilizado fue Statgraphics Plus v2.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra la evolución del marchitamiento medio de los dos genotipos de *U. minor* sometidos a los dos regímenes de riego. En las plantas inoculadas (**i**), el riego inicial abundante seguido de riego bajo (**AB_i**) origina mayores marchitamientos que el régimen de riego contrario (**BA_i**) ($P \leq 0.01$). Esto confirma la hipótesis de que el estado hídrico de *U. minor* es un factor que influye en la sintomatología debida a la grafiosis. Los controles (**c**) del grupo **AB_c** mostraron en el día 30 un marchitamiento cercano al 20 % a consecuencia del riego bajo. El rebrote fue inmediato y al final del ensayo el marchitamiento medio para las plantas **AB_c** se redujo al 9 %.

El estado hídrico del suelo es el principal condicionante del estado hídrico de la planta. Los valores de WSC, Ψ_a , Ψ_m , y g_s para las plantas sometidas a riego inicial bajo fueron significativamente menores a los valores de las plantas sometidas a riego inicial alto ($P \leq 0.01$) (tabla 1). Por el contrario, a los 15 días de cambiar el riego, la planta **AB_c** estuvo sensiblemente más estresada que la planta **BA_c**, con unos valores de Ψ_a , Ψ_m , E y g_s menores ($P \leq 0.01$).

El diámetro de los vasos del xilema parece estar involucrado en la respuesta observada. La disponibilidad de agua para la planta influye en el tamaño de los vasos del xilema (LOVISOLO & SCHUBERT 1998), y así se observa en los cortes histológicos realizados (fotos 1 y 2). Se identificaron tres zonas diferentes dentro del anillo de crecimiento de 1998 para las plantas del grupo **BA_c**. La primera zona, al inicio del anillo (zona 1), tuvo vasos de gran diámetro dispuestos de una forma similar a los de la madera

temprana observada en 1999. El diámetro medio de los vasos fue 57,9 μm (tabla 2). Seguidamente se observó una segunda zona (zona 2) con vasos de diámetro medio de 20,3 μm , inferiores a los de la zona anterior ($P \leq 0.01$). El paso de la zona 1 a la zona 2 se caracterizó por la presencia de una densa banda de células de parénquima leñoso, de escasa luz, en disposición desordenada. A continuación de la zona 2 se observó otra banda de células de parénquima, dispuestas en empalizada, dando origen a la zona 3 hasta el final del anillo. El inicio del tratamiento de riego bajo (**B**) se correspondió con el inicio de la zona 2, es decir, cuando el anillo tuvo 266 μm de grosor. Del mismo modo, el inicio del tratamiento de riego abundante (**A**) se correspondió con el inicio de la zona 3.

En las secciones realizadas al grupo **AB_c** únicamente se distinguieron *de visu* dos zonas (foto 2). El tratamiento de riego **A** no permitió diferenciar, en el anillo, el inicio de la zona 2. Dado que antes de los tratamientos el grupo de plantas **AB_c** estuvo sometido a las mismas condiciones que el grupo de plantas **BA_c**, se asume que el inicio de la zona 2 para **AB_c** tuvo lugar cuando el anillo alcanzó el mismo grosor medio que **BA_c**, es decir, 266 μm .

La susceptibilidad del olmo a la grafiosis se ha relacionado en ocasiones con la formación de la madera temprana (TCHERNOFF 1965). Cualquier mecanismo que afecte a la normal formación de la madera temprana disminuye la susceptibilidad real de la planta. Así sucede ante trasplantes durante el invierno, injertos, o ante la inyección de reguladores del crecimiento (TCHERNOFF 1965; BRENER & BECKMAN 1968). La zona 2 de las plantas del grupo **AB_c** se correspondió con la madera temprana típica de la especie, mientras que la zona 2 de **BA_c** fue más parecida a la madera tardía. El mayor período de formación de la madera temprana en **AB** posibilitó la formación de más vasos de mayores diámetros, lo que se tradujo en una mayor STC y CH en la zona 2 (tabla 2). Los factores que favorecen la multiplicación y la difusión del patógeno a través de los elementos vasculares conducen a mayores síntomas (TCHERNOFF 1965). Los mayores valores de STC y de CH para la planta **AB**, en la zona 2, permitieron una mayor difusión del patógeno y de sus toxinas frente a la planta **BA**. En **AB** y durante los 15 días siguientes a la infección, el agua en el suelo fue abundante, luego no hubo limitaciones en cuanto al intercambio gaseoso y en cuanto al flujo de savia, y la transmisión de la enfermedad fue mayor que en plantas sometidas a estrés hídrico.

Al igual que sucede en otras enfermedades vasculares el marchitamiento producido por grafiosis se debe a la cavitación de los vasos del xilema (NEWBANKS et al. 1983) y a pérdidas de conductancia hidráulica (MELCHING & SINCLAIR 1975). A los 15 días de las inoculaciones, los árboles del grupo **AB** cambian a un riego bajo. Este riego ha estresado las plantas en tal grado que las réplicas control mostraron marchitamiento (figura 1). Los marchitamientos foliares y las cavitaciones en el xilema se suceden en abundancia cuando la tensión de la savia supera un valor crítico específico. Es fácil que se hayan producido cavitaciones adicionales por estrés hídrico en las plantas sometidas a **AB** debido a los bajos valores del potencial hídrico registrados en las plantas control (tabla 1). Las cavitaciones por estrés hídrico se producen principalmente en los vasos de mayor diámetro (LOGULLO *et al.* 1995), lo que hace al grupo **AB** más susceptible que al grupo **BA**. Lo anterior hace sospechar que el efecto combinado grafiosis y estrés hídrico, una vez realizada la inoculación, provocó mayores marchitamientos que cualquiera de los dos efectos por separado.

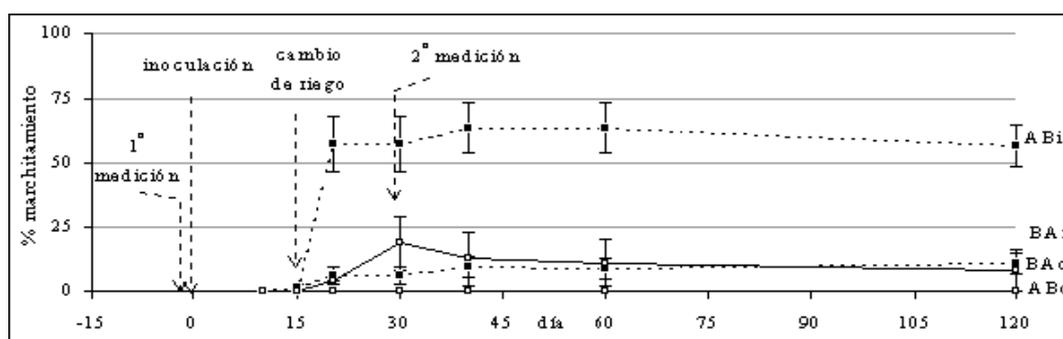
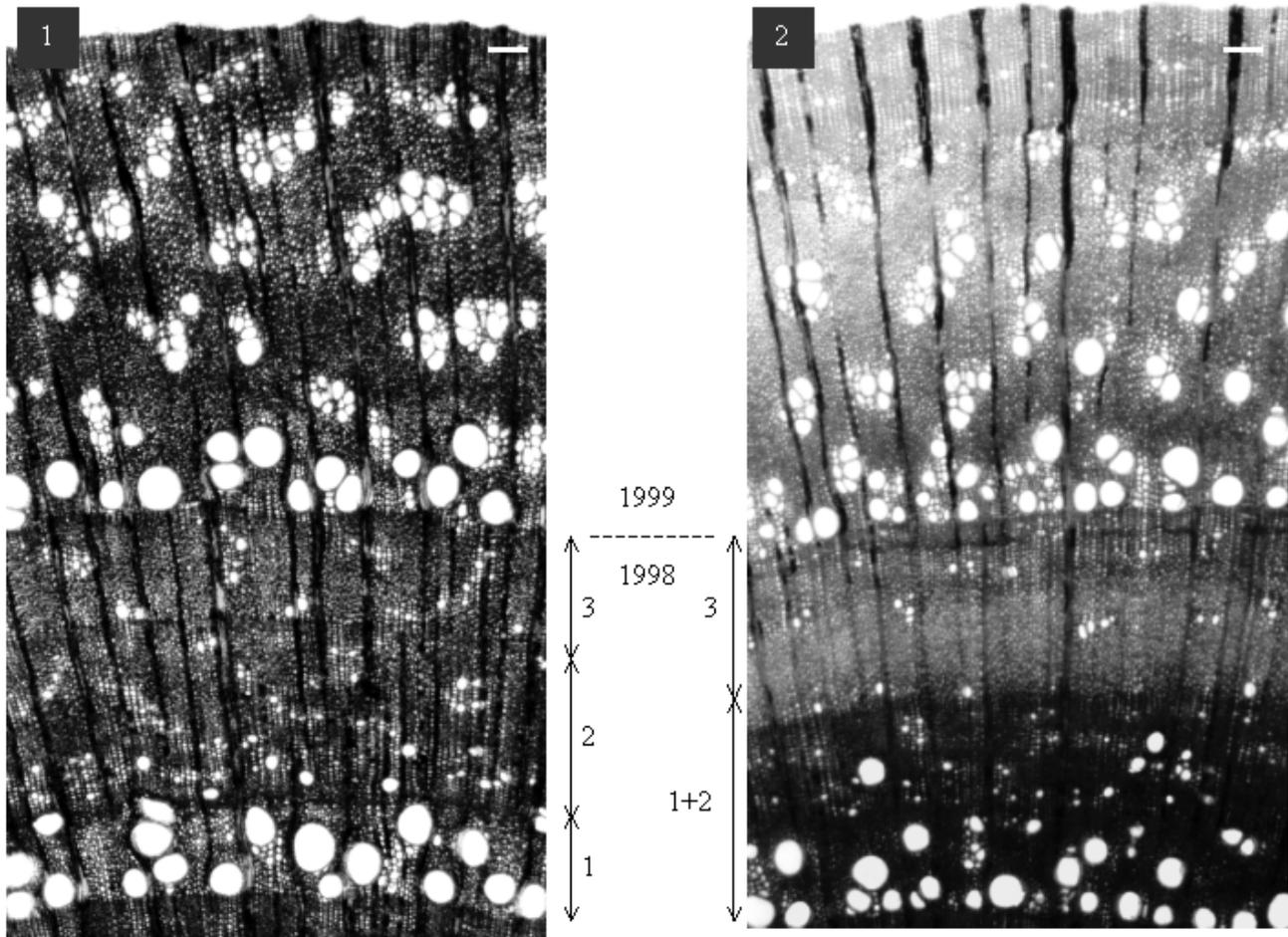


Figura 1. Evolución media de los porcentajes de marchitamiento de dos genotipos de *U. minor* al ser sometidos a los tratamientos de riego: **BA**, inicial bajo seguido de riego alto; **AB**, contrario. Los tratamientos

se iniciaron el 5 de abril de 1998 y el cambio de riego tuvo lugar el 29 de mayo del mismo año. Los símbolos corresponden a los valores medios de doce réplicas inoculadas (i) con *O. novo-ulmi* (⋯; ●) y de seis réplicas control (c) sin inocular (—; □). Las barras verticales son errores estándar.



Fotos 1 y 2. Parte de los anillos de crecimiento de los años 1998 y 1999 en réplicas control del genotipo TO-MD 3 bajo los tratamientos: **BA_c**, riego bajo antes de los 15 días de las inoculaciones, y abundante luego (izquierda); **AB_c**, tratamiento contrario (derecha). La barra mide 100 μm.

Tabla 1. Contenido de agua en el suelo (WSC), potenciales hídricos al amanecer (Ψ_a) y al mediodía (Ψ_m), y tasas de transpiración (E) y conductancias estomáticas (g_s) al mediodía en plantas control de dos genotipos de *U. minor* sometidos a los tratamientos: **BA_c**, riego bajo antes de los 15 días de las inoculaciones, y abundante luego; **AB_c**, tratamiento contrario. Se dan los valores correspondientes a dos mediciones sobre seis plantas, el día previo a las inoculaciones (1ª medición) y al mes de las inoculaciones (2ª medición).

Medición	Tratamiento BA_c				Tratamiento AB_c			
	WSC %	Ψ_a MPa	Ψ_m MPa	g_s mmol m ⁻² s ⁻¹	WSC %	Ψ_a MPa	Ψ_m MPa	g_s mmol m ⁻² s ⁻¹
1ª (13.05.98)	11,9	- 1,9	- 2,7	14	22,6	- 0,2	- 1,3	72
2ª (14.06.98)	22,9	- 0,3	- 1,1	48	12,7	- 2,6	- 3,3	3

Tabla 2. Valores medios obtenidos al medir los diámetros de los vasos del xilema de dos genotipos de *U. minor* (n = 6). Las plantas estuvieron sometidas a los tratamientos de riego: **BA_c**, inicial bajo seguido de riego alto; **AB_c**, tratamiento contrario. Letras distintas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

Tratamiento	Zona	Ø medio	STC ¹	CH ²
		(μm)	(%)	(μm ²)
BA_c	1	57,9 b	21,1 c	143,0 c
	2	20,3 a	1,9 a	0,9 a
	3	21,9 a	2,8 a	1,3 a
AB_c	1	61,3 b	20,4 c	126,1 c
	2	34,9 b	9,1 b	25,0 b
	3	20,1 a	2,0 a	1,2 a

¹Superficie transversal conductora: superficie que ocupan los vasos respecto a la total.

²Conductancia hidráulica teórica relativa: suma de las cuartas potencias de los radios vasculares contenidos en un sector entre el área del sector.

CONCLUSIONES

En los programas de selección de planta resistente conviene, a la hora de realizar los test patológicos, someter a las plantas a las condiciones más desfavorables ante la enfermedad. Se concluye que para que ejemplares de *U. minor* manifiesten su susceptibilidad potencial máxima interesa que desarrollen al máximo sus vasos del xilema antes de ser inoculados. Ello se logra evitando el trasplante durante el invierno previo a las inoculaciones y procurando que las plantas tengan el mayor crecimiento posible mediante riegos abundantes. En los años de inoculaciones, las plantas no se regarán durante el verano para causar en las plantas un estrés hídrico que incremente los síntomas por grafiosis.

AGRADECIMIENTOS

A Yolanda Menéndez por la colaboración prestada. 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

- BRENER, W. D. & BECKMAN, C. H.; (1968). *A mechanism of enhanced resistance to Ceratocystis ulmi in American elms treated with sodium trichloro-phenylacetate*. *Phytopathology*. **58**,555-561.
- LO GULLO, M. A.; SALLEO, S.; PIACERI, E. C.; ROSSO, R.; (1995). *Relations between vulnerability to xylem embolism and xylem conduit dimensions in young trees of Quercus cerris*. *Plant Cell Environ.***18**,661-669.
- LOVISOLO, C. & SCHUBERT, A.; (1998). *Effects of water stress on vessel size and xylem hydraulic conductivity in Vitis vinifera*. *J. Exp. Bot.* **49**, 693-700.
- MELCHING, J. B. & SINCLAIR, W. A.; (1975). *Hydraulic conductivity of stem internodes relates to resistance of American elms to Ceratocystis ulmi*. *Phytopathology*. **65**,643-645.
- NEWBANKS, D.; BOSH, A.; ZIMMERMAN, M. H.; (1983). *Evidence for xylem dysfunction by embolization in Dutch elm disease*. *Phytopathology*. **73**,1060-1063.
- 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: *Proc NATO/NSF, Breeding pest-resistant trees*. Ed. por GERHOLD, H. D. Pergamon Press, Elmsford, NY. pp. 279-287.
- SOLLA, A. & GIL, L.; (2001). *Diameter of xylem vessels as a factor in resistance of Ulmus minor Miller to Ophiostoma novo-ulmi*. *For. Path.* En prensa.
- SUTHERLAND, M. L.; PEARSON, S.; BRASIER, C. M.; (1997). *The influence of temperature and light on defoliation levels of elm by Dutch elm disease*. *Phytopathology*. **87**,576-581.
- 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.