

# LONGITUD Y DIÁMETRO DE LOS VASOS DEL XILEMA EN *ULMUS MINOR* Y EN *U. MINOR* X *U. PUMILA*

A. SOLLA; M. RUÍZ-VILLAR; M. BURÓN; D. LÓPEZ; J. C. LÓPEZ; L. GIL

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

## RESUMEN

Olmos con pequeños diámetros de los vasos del xilema son más resistentes que olmos con mayores diámetros. Del mismo modo, olmos de dos y de tres savias son más resistentes que olmos de mayores edades. Con el presente trabajo se pretende conocer en el olmo cómo varía, con la edad, las dimensiones de los vasos tanto en diámetro como en longitud. Se utilizaron ramas de tres ejemplares de *U. minor* y de un ejemplar de *U. minor* x *U. pumila*. En cada ejemplar se cortaron ramas de 2 a 7 años ( $n = 3$ ). La longitud de los vasos se obtuvo midiendo el flujo de gas a través de las ramas, cortadas en longitudes cada vez menores. Los diámetros de los vasos se midieron haciendo cortes al microtomo y considerando el último anillo de crecimiento. Los mayores vasos se hallaron en las ramas más largas y representaron, respecto al total de los vasos, un porcentaje muy reducido. A mayor edad, las longitudes y los diámetros medios de los vasos aumentaron, aunque para *U. minor* los valores se estabilizaron a partir de los 5 años. Se observó una relación directa entre las dimensiones de los vasos y la susceptibilidad de *U. minor* y de *U. minor* x *U. pumila* a la grafiosis.

**P.C.:** Vasos del xilema, edad, resistencia, *Ulmus minor*, *Ulmus pumila*, *Ophiostoma novo-ulmi*.

## SUMMARY

Elms with small xylem vessel diameters are more resistant than elms with those of larger diameters. Similarly, two and three year old elms are more resistant than older elms. In the present work the influence of elm age on vessel dimensions is investigated in terms of diameter and length. Branches were used from three *U. minor* trees and one *U. minor* x *U. pumila* tree. In each elm branches of 2 to 7 years of age were used ( $n = 3$ ). Vessel length was obtained by measuring the flow of gas along branches that were cut into progressively shorter lengths. Vessel diameters were measured using microtome cuts and by considering the last ring of growth. The largest vessels were found in the longest branches but represented only a small proportion with respect to the total number of vessels. The average lengths and diameters of the vessels increased with age, though for *U. minor* these values stabilized for ages of 5 years and onwards. A direct relationship was observed between vessel dimensions and susceptibility to Dutch elm disease in *U. minor* and in *U. minor* x *U. pumila*.

**K.W.:** Xylem vessels, age, resistance, *Ulmus minor*, *Ulmus pumila*, *Ophiostoma novo-ulmi*.

## INTRODUCCIÓN, MATERIAL Y MÉTODOS

El olmo campestre (*Ulmus minor* Mill.) tiene sus vasos en disposición de poros en anillo. Durante la primavera es altamente susceptible a la grafiosis (*Ophiostoma novo-ulmi* Brasier), se piensa debido a que en este momento sólo dispone de vasos de grandes dimensiones. La longitud y el diámetro de los elementos del xilema son factores que inciden en la resistencia del olmo a la grafiosis. Olmos con pequeños diámetros de los vasos del xilema son más resistentes que olmos con mayores diámetros (McNABB *et al.* 1970; SINCLAIR *et al.* 1975; SOLLA 2000). Del mismo modo, olmos de dos y de tres savias son más resistentes que olmos de mayores edades (HEYBROEK 1957; SOLLA *et al.* 2001). Con el presente trabajo se pretende conocer en el olmo cómo varían, con la edad: 1), las longitudes y diámetros máximos de los vasos del xilema; y 2), las distribuciones, en clases de longitud y de diámetro, de dichos vasos.

El material vegetal utilizado fueron ramas de tres genotipos de *U. minor* y de un genotipo de *U. minor* x *U. pumila* (tabla 1). Los árboles fueron propagados vegetativamente en 1991 y plantados en un banco clonal en el Centro de Mejora Genética Forestal de Puerta de Hierro (Madrid), en 1993. Se utilizaron ramas de entre dos a siete años de edad. Entre mayo y junio del año 2000 se cortaron tres ramas por cada genotipo y edad.

Para determinar la longitud máxima de los elementos conductores del xilema se conectó el extremo proximal de cada rama a una bombona de gas ( $N_2$ ) a presión. El extremo distal se sumergió en un recipiente con agua y se fueron cortando segmentos a intervalos de 1 cm de longitud hasta que salieron las primeras burbujas (figura 1).

Para estudiar las distribuciones de longitudes de los vasos se siguió la metodología propuesta por ZIMMERMAN & JEJE (1981), basada en la inyección de gas a presión y la medición del flujo saliente. Para una longitud de rama  $L_i$  [cm], sometida en su extremo proximal a una presión  $P$  [psi], el flujo de gas  $F_i$  [ $ml\ min^{-1}$ ] saliente por el extremo distal estará en directa relación con el número de vasos ( $N_i$ ), abiertos entre ambos extremos:

$$N_i = \frac{F_i \cdot L_i}{P - P_e}$$

$P_e$  es la presión umbral necesaria para que comience a salir el gas por el extremo distal. Para calcular el flujo, el extremo distal se sumergió en agua y el gas se recogió en una probeta invertida, llena de agua (figura 1; foto 1). El tiempo que tardó en descender la columna de agua fue cronometrado ( $n=6$ ). Las presiones utilizadas fueron 2, 3, 5, 10 y 15 psi (1 psi = 6,9 kPa). En cada longitud de rama se utilizaron dos presiones diferentes para deducir el valor de  $P_e$ . Las ramas se cortaron sucesivamente a intervalos de 20 cm y se volvió a medir el flujo, cada vez mayor a medida que la rama se fue acortando.

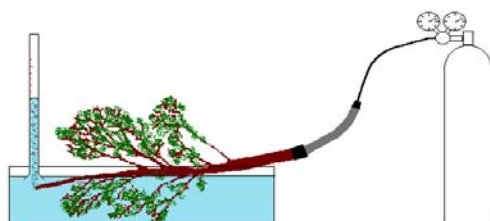
Las superficies de ambos extremos de la rama se suavizaron mediante una cuchilla, con el fin de evitar que los tejidos desgarrados dificultaran el paso del aire. Los anillos de crecimiento anteriores al año 2000 fueron sellados con plastilina en el extremo proximal. La puesta a punto del método supuso un mes de trabajo, debido entre otros motivos a pérdidas de aire en las juntas del circuito. Las uniones de los tubos de PVC, además de llevar teflón y juntas de goma, fueron recubiertas en su parte interior y exterior con masilla. Para las ramas más gruesas se utilizaron tubos de caucho conectados a la bombona mediante reductores de riego (foto 2).

El número de vasos en cada longitud ( $N_i$ ) junto con el número de vasos medidos en el extremo proximal ( $N_o$ ) se ajustaron a una curva de regresión. La curva de regresión fue transformada a una curva acumulativa y luego a un diagrama de barras.  $N_o$  se midió al microscopio en secciones transversales de 20  $\mu m$  practicadas en cada rama. Para el conteo se utilizó una cámara digital acoplada al microscopio y conectada a un PC, conteniendo un software específico. Los diámetros de los elementos conductores del xilema se midieron, en el último anillo, en las mismas secciones utilizadas para el cálculo de  $N_o$ . Diámetros menores a 40  $\mu m$  fueron obviados debido a su escasa contribución a la capacidad conductora. En cada rama se determinó el diámetro máximo y se calcularon las distribuciones de los diámetros en clases diamétricas de 20  $\mu m$ .

Los diámetros y las longitudes de los vasos fueron sometidas a un ANOVA unifactorial, considerándose como factor la edad y la especie. Previamente se comprobó la normalidad de los datos. Para comparar las medias se aplicaron tests LSD ( $P \leq 0.05$ ). El programa estadístico utilizado fue Statgraphics Plus v2.1.

**Tabla 1.** Especificaciones del material vegetal utilizado.

Especie	Genotipo	Procedencia	Altitud (m)	Entorno
<i>Ulmus minor</i>	M-CC 1	Madrid, Casa de Campo	600	Parque
	M-DV 1	Madrid, Dehesa de la Villa	660	Parque
	V-AN 3	Valencia, Andilla	860	Masa natural
<i>U. minor</i> x <i>U. pumila</i>	M-PZ 3	Madrid, Pezuela de las Torres	760	Parque



**Figura 1.** Método utilizado para medir la longitud máxima y la distribución de longitudes de los elementos conductores del xilema, en ramas de ejemplares de *U. minor* y de *U. minor* x *U. pumila*. Un gas a presión se introduce a través de la rama y éste se recoge en el extremo distal de la misma.



**Foto 1.** Detalle de una medición del gas saliente por el extremo distal en una rama de 4 años de un ejemplar de *U. minor* x *U. pumila* (MPZ 3). El gas se recoge en una probeta invertida llena de agua, y el tiempo es cronometrado



**Foto 2.** Tubos de caucho y de PVC utilizados para inyectar gas en las ramas. El extremo de la izquierda se conecta con el extremo proximal de la rama, y el de la derecha se conecta a una bombona.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El vaso de mayor longitud midió 307 cm y se halló en la rama más larga de las utilizadas (371 cm), de 6 años de edad y perteneciente al genotipo M-CC 1. En la misma rama se observó el vaso de mayor luz, con 202  $\mu\text{m}$  de diámetro. Los vasos más largos pertenecieron a las ramas más largas en el 91 % de los casos. No obstante, los vasos de mayores diámetros pertenecieron a las ramas más largas en el 52 % de los casos. Se obtuvo una relación significativa entre las longitudes máximas y los diámetros máximos ( $r^2 = 0,70$ ;  $P \leq 0,001$ ). Cabe esperar que si se utilizaran ramas de mayor edad y longitud, se encontrarían mayores longitudes y diámetros máximos. En ramas de los géneros *Quercus* y *Fraxinus* se han hallado vasos de hasta 10 m de longitud (ZIMMERMAN & JEJE 1981).

En cuanto a las longitudes medias de los vasos, ramas de 2, 3 y 4 años no mostraron diferencias significativas entre sí, con valores próximos a 12 cm (tabla 2). Para estas edades, más del 75 % de los vasos tuvieron una longitud comprendida entre 0 y 20 cm (figura 2a), confirmando a lo observado en otras leñosas (ZIMMERMAN & JEJE 1981). Las longitudes medias empezaron a diferenciarse significativamente, en *U. minor*, a partir de los 5 años, y en *U. minor* x *U. pumila* a partir de los 6 años. A edades mayores la longitud media se mantiene constante. No se obtuvieron diferencias significativas entre las longitudes medias de *U. minor* y de *U. minor* x *U. pumila*. No obstante, el ejemplar híbrido presentó, en ramas de 5, 6 y 7 años, una mayor proporción de vasos de más largos que los ejemplares de *U. minor* (figura 2a).

Los diámetros medios de los vasos tuvieron una relación directa con las longitudes medias de los vasos ( $r^2 = 0,53$ ;  $P \leq 0,001$ ). Ello es acorde con anteriores estudios (HANDLEY 1936; GREENIDGE 1952; ZIMMERMANN 1983). Los menores diámetros medios se encontraron en ramas de 2 años, y les siguieron los encontrados en ramas de 3 y 4 años (tabla 2). Ramas de 2 años tuvieron sus vasos en disposición de poros difusos, y la estructura de poros en anillo no se observó hasta el tercer año, de manera similar a los resultados obtenidos en *Ulmus americana* L. por SINCLAIR *et al.* (1975). Los mayores diámetros medios de vasos para *U. minor* se encontraron en ramas de 6 años, sin haber diferencias con los de ramas de 5 y de 7 años. El diámetro medio de los vasos del ejemplar híbrido fue mayor al diámetro medio de los vasos de los ejemplares de *U. minor* ( $P \leq 0,01$ ), a consecuencia de una mayor proporción de vasos de más diámetro (tabla 2b). Este resultado confirma lo observado en un estudio previo (SOLLA & GIL 2001).

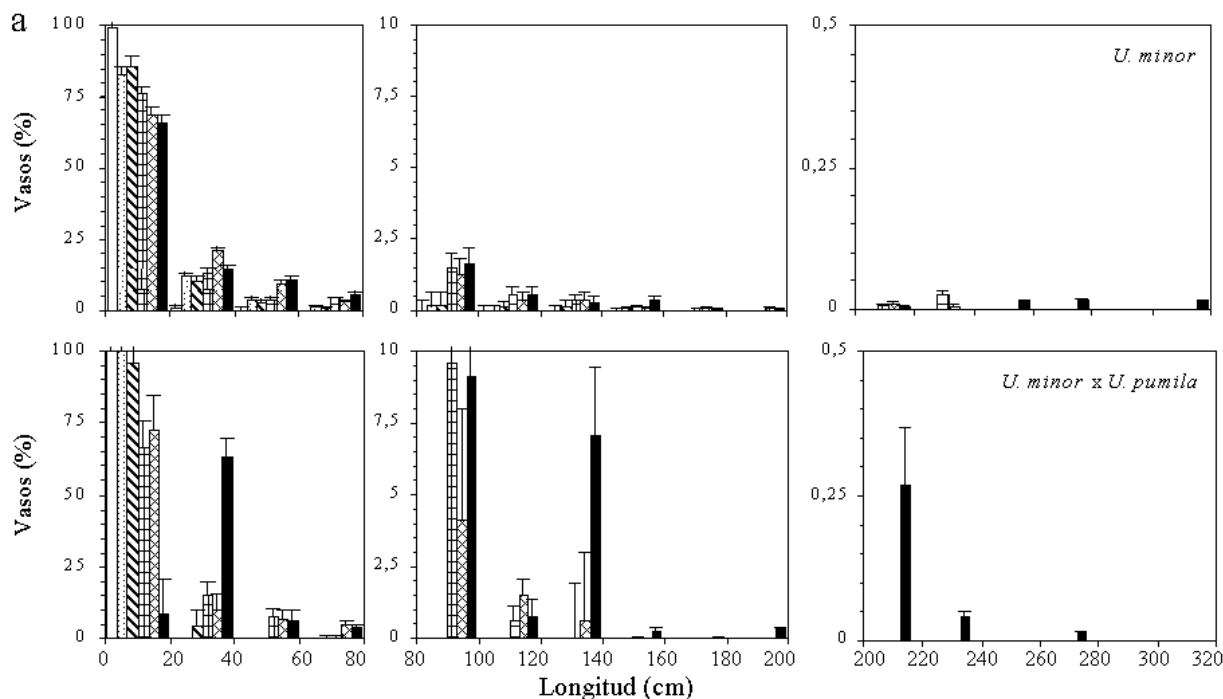
Una gran proporción de vasos de pequeña longitud implica una seguridad para las plantas ante el estrés hídrico. El embolismo de un vaso corto provoca menores pérdidas en la conducción de agua que un embolismo de un vaso largo, dado que abarca un tramo menor en la rama (TYREE 1993). Este concepto se podría relacionar con la grafiosis, dado que el marchitamiento que origina *Ophiostoma novo-ulmi* se debe a la pérdida de conducción por embolismos en los vasos (NEWBANKS *et al.* 1983).

La presencia de vasos de pequeña longitud y de escasa luz se han propuesto como mecanismos de resistencia a la grafiosis dado que limitan la

difusión pasiva de las esporas de *O. novo-ulmi* y sus toxinas a través de la planta (MCNABB *et al.* 1970; SINCLAIR *et al.* 1975). Asumiendo que árboles de 2, 3, 4, 5, 6 y 7 savias tuvieran una distribución de sus vasos similar a la encontrada aquí para ramas de 2, 3, 4, 5, 6 y 7 años, se podría relacionar esta distribución con la variación de la resistencia según la edad. En el trabajo de SOLLA *et al.* (2001), réplicas de 2 y de 3 savias de los genotipos utilizados muestran resistencia a la grafiosis. En réplicas de mayor edad, el marchitamiento manifestado es significativamente.

**Tabla 2.** Longitudes y diámetros medios de los elementos vasculares del xilema en ramas de 2 a 7 años de edad para tres genotipos de *U. minor* y un genotipo de *U. minor* x *U. pumila* (n=3). Letras distintas en cada fila indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ).

Especie	Edad (años)							Media $\pm$ ES
	2	3	4	5	6	7		
L (cm)	<i>U. minor</i> 10 a	<i>U. minor</i> 15 ab	<i>U. minor</i> 14 ab	<i>U. minor</i> 19 bc	<i>U. minor</i> 24 c	<i>U. minor</i> 23 c	17,6 $\pm$ 1,6	
$\varnothing$ ( $\mu$ m)	<i>U. minor</i> 10 a	<i>U. minor</i> 10 a	<i>U. minor</i> 11 a	<i>U. minor</i> 25 a	<i>U. minor</i> 23 a	<i>U. minor</i> 45 b	20,7 $\pm$ 6,0	
	<i>U. minor</i> 45 a	<i>U. minor</i> 61 b	<i>U. minor</i> 67 bc	<i>U. minor</i> 78 cd	<i>U. minor</i> 83 d	<i>U. minor</i> 81 cd	68,9 $\pm$ 4,0	
	<i>U. minor</i> x <i>U. pumila</i> 53 a	<i>U. minor</i> x <i>U. pumila</i> 54 a	<i>U. minor</i> x <i>U. pumila</i> 62 a	<i>U. minor</i> x <i>U. pumila</i> 75 a	<i>U. minor</i> x <i>U. pumila</i> 116 b	<i>U. minor</i> x <i>U. pumila</i> 129 b	80,9 $\pm$ 8,7	



**Figura 2.** Distribuciones, en clases de longitud (a) y de diámetro (b), de los vasos del xilema en ramas de 2 (□), 3 (▤), 4 (▥), 5 (▦), 6 (▧) y 7 (▨) años de edad. Las barras corresponden a los valores medios en ramas de tres ejemplares de *U. minor* (n=9) y en ramas de un ejemplar de *U. minor* x *U. pumila* (n=3). Las líneas verticales son errores estándar.

mayor aunque no diferente entre las distintas edades. Se aprecia una relación directa entre el marchitamiento manifestado y las dimensiones de los vasos mostrados en la tabla 2. No obstante, el salto de susceptibilidad a partir de las 4 savias no se corresponde con un salto en las dimensiones de los vasos para ramas de 4 años, luego la anatomía de elementos vasculares no refleja todas las diferencias de susceptibilidad. Dada la naturaleza poligénica de la enfermedad de la grafiosis (TOWNSEND & SCHREIBER 1976), otros factores han de estar implicados.

## CONCLUSIONES

En ejemplares de *U. minor* y de *U. minor* x *U. pumila*, los mayores vasos, tanto en diámetro como en longitud se hallan en las ramas más largas. Los grandes vasos representan respecto al total un porcentaje muy reducido, inferior al 25 % para vasos con diámetros mayores a 160  $\mu$ m, e inferior al 1 % para vasos con longitudes mayores a 1,4 m. A mayor edad, las longitudes y los diámetros medios de los vasos tienden a aumentar, aunque para *U. minor* los valores se estabilizan a partir de los 5 años. Se observa una relación directa entre las dimensiones de los vasos y la susceptibilidad de *U. minor* y de *U. minor* x *U. pumila* a la grafiosis.

## AGRADECIMIENTOS

A la Cátedra de Tecnología de la Madera de la ETSI de Montes de Madrid, en especial al Dr. Luis García, por permitir la utilización de su equipo microscópico digital. A Isaac Lázaro por adaptar el software a nuestras necesidades. 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

- GREENIDGE, K. N. H.; (1952). *An approach to the study of vessel length in hardwood species*. Am. J. Bot. **39**, 570-574
- HANDLEY, W. R. C.; (1936). *Some observations on the problem of vessel length determination in woody dicotyledons*. New Phytol. **35**, 456-471.
- McNABB, H. S. (Jr); HEYBROEK, H. M.; McDONALD, W. L.; (1970). *Anatomical factors in resistance to Dutch Elm Disease*. Neth. J. Plant. Pathol. **76**, 196-204.
- 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.
- SOLLA, A. & GIL, L.; (2001). *Relationship between vessel diameter and Dutch elm disease in Ulmus minor Miller*. For. Pathol. En prensa.
- SOLLA, A.; (2000). *Mejora genética de Ulmus minor Miller: selección de individuos resistentes a la grafiosis*. Tesis Doctoral. ETSI de Montes. UPM. 136 pp.
- SOLLA, A.; RUÍZ-VILLAR, M.; BURÓN, M.; GIL, L.; (2001). *Influencia de la edad en la resistencia de ejemplares de Ulmus minor a la grafiosis*. Actas del III Congreso Forestal Español. Granada, Octubre de 2001.
- TOWNSEND, A. M. & SCHREIBER, L. R.; (1976). *Resistance of hybrid elm progenies to Ceratocystis ulmi*. Phytopathology. **66**, 1107-1110.
- TYREE, M. T.; (1993). *Theory of vessel-length determination: the problem of nonrandom vessel distribution*. Can. J. Bot. **71**, 297-302.
- ZIMMERMANN, M. H. & JEJE, A.; (1981). *Vessel-length distribution in stems of some American woody plants*. Can. J. Bot. **59**, 1882-1892.
- ZIMMERMANN, M. H.; (1983). *Xylem structure and the ascent of sap*. Springer Verlag, New York. 143 pp.