

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE
INGENIEROS DE MONTES**

FACTORES ANATÓMICOS Y QUÍMICOS DEL XILEMA
DE *Ulmus minor* Mill. RELACIONADOS CON LA
RESISTENCIA A *Ophiostoma novo-ulmi* Brasier

TESIS DOCTORAL

JUAN ANTONIO MARTÍN GARCÍA
Ingeniero de Montes

2006

DEPARTAMENTO DE SILVOPASCICULTURA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE
INGENIEROS DE MONTES

**FACTORES ANATÓMICOS Y QUÍMICOS DEL XILEMA DE
Ulmus minor Mill. RELACIONADOS CON LA
RESISTENCIA A *Ophiostoma novo-ulmi* Brasier**

JUAN ANTONIO MARTÍN GARCÍA
Ingeniero de Montes

DIRECTORES:

ALEJANDRO SOLLA HACH
Doctor Ingeniero de Montes

LUIS GIL SÁNCHEZ
Doctor Ingeniero de Montes

2006



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

Tribunal nombrado por el Magfco. y Excmo. Sr. Rector de la Universidad Politécnica de Madrid, el día.....dede 200....

Presidente: _____

Vocal: _____

Vocal: _____

Vocal: _____

Secretario: _____

Suplente: _____

Suplente: _____

Realizado el acto de defensa y lectura de la Tesis el día.....de.....de 200.. en la E.T.S.I. / Facultad.....

EL PRESIDENTE

LOS VOCALES

EL SECRETARIO

Agradecimientos

Quiero dar las gracias a todas aquellas personas que, mediante su colaboración, han hecho posible la realización del presente trabajo:

A los dos directores de esta tesis: al profesor Alejandro Solla, por su dedicación a la hora de enseñarme a trabajar en el entorno científico, desde diseñar los ensayos hasta redactar los artículos, y por la gran ayuda que me ha brindado; y al profesor Luis Gil, por haber hecho posible mi debut en el mundo de la investigación, por la visión y el entusiasmo por la ciencia que me ha transmitido, y por sus consejos, siempre certeros, en todos los ámbitos.

A todo el personal del Centro de Mejora Genética Forestal Puerta de Hierro, en especial a Marga, Sara, David y Dani, por su trabajo indispensable en la obtención y conservación del material vegetal y de los hongos utilizados en los ensayos. Al profesor Francisco Masedo, por su colaboración en el laboratorio de la Unidad de Anatomía de la ETSI de Montes. A todos mis compañeros de la Unidad de Anatomía, siempre dispuestos a prestarme su ayuda cuando lo he necesitado. A la DGB por su apoyo financiero, en particular a Salustiano Iglesias por la colaboración prestada desde el Servicio de Material Genético.

Al profesor Luis García, por permitirme la utilización de la infraestructura de la Unidad de Tecnología de la Madera de la ETSI de Montes, y del programa informático Biometría.

Al profesor Stephen Woodward, por recibirme en su laboratorio de Patología Vegetal de la Universidad de Aberdeen, y a todo su equipo científico, en especial a William Bodles y Liz Beckett, por la ayuda prestada durante mi estancia en Escocia. A la Dra. Alison Coats por instruirme en el manejo del microscopio FT-IR.

Al profesor Manuel Antonio Coimbra, por acogerme con tanta amabilidad en su laboratorio del Departamento de Química la Universidad de Aveiro. A su equipo de colaboradores: la Dra. Ivonne Delgadillo, el Dr. Antonio Barros, y la Dra. Silvia Rocha, por sus sugerencias y aportaciones a la hora de realizar los estudios. A Alex Ferreira, por su indispensable asistencia técnica en el laboratorio.

A mi familia y amigos, ante todo por haber soportado mis agobios y crisis, y a Yolanda, por haber sido durante estos cuatro años mi apoyo constante.

ÍNDICE

RESUMEN / SUMMARY	i
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El olmo común	1
1.2. La enfermedad de la grafiosis	2
1.3. Factores relacionados con la resistencia de los olmos a la grafiosis	5
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAL Y MÉTODOS	13
3.1. Lugar de estudio	13
3.2. Evaluación de la susceptibilidad	14
3.3. Toma de datos	15
3.3.1. Influencia de la edad de la planta en la resistencia y su relación con la anatomía del xilema	15
3.3.2. Variación estacional de la diferenciación del xilema y su relación con la resistencia	16
3.3.3. Cambios químicos en brinzales de <i>Ulmus minor</i> en respuesta a la inoculación con <i>Ophiostoma novo-ulmi</i>	18
3.3.4. Cambios químicos en clones resistentes y susceptibles de <i>Ulmus minor</i> tras la inoculación con <i>Ophiostoma novo-ulmi</i>	19
3.3.5. Marcadores metabólicos de resistencia en olmos sanos	20
3.4. Procesado de datos y análisis estadístico	20
4. RESULTADOS	23
4.1. Influencia de la edad de la planta en la resistencia y su relación con la anatomía del xilema	23
4.2. Variación estacional de la diferenciación del xilema y su relación con la resistencia	25
4.3. Cambios químicos en brinzales de <i>Ulmus minor</i> en respuesta a la inoculación con <i>Ophiostoma novo-ulmi</i>	28
4.4. Cambios químicos en clones resistentes y susceptibles de <i>U. minor</i> tras la inoculación con <i>O. novo-ulmi</i>	30
4.5. Marcadores metabólicos de resistencia en olmos sanos	32
5. DISCUSIÓN	37
6. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	49
7. BIBLIOGRAFÍA	53
8. ANEXO DE PUBLICACIONES	63
(1) Solla A., Martín J.A., Ouellette G., Gil L. 2005. Influence of plant age on symptom development in <i>Ulmus minor</i> following inoculation by <i>Ophiostoma novo-ulmi</i> . Plant Disease. 89 :1035-1040.	
(2) Solla A., Martín J.A., Corral P. and Gil L. 2005. Seasonal changes in wood formation of <i>Ulmus pumila</i> and <i>U. minor</i> and its relation with Dutch elm disease. New Phytologist. 166 :1025-1034.	
(3) Martín J.A., Solla A., Woodward S., Gil L. 2005. FT-IR spectroscopy as a new method for evaluating host resistance in the Dutch elm disease complex. Tree Physiology. 25 :1331-1338.	
(4) Martín J.A., Solla A., Coimbra M.A., Gil L. 2005. Metabolic distinction of <i>Ulmus minor</i> xylem tissues after inoculation with <i>Ophiostoma novo-ulmi</i> . Phytochemistry. 66 :2458-2467.	
(5) Martín J. A., Solla A., Coimbra M.A., Gil L. Evidence of lignin, starch, cellulose and pectin components, as metabolic markers for screening elms resistant to <i>Ophiostoma novo-ulmi</i> . Manuscrito enviado a Tree Physiology.	

RESUMEN

Las poblaciones de *Ulmus minor* europeas se encuentran seriamente amenazadas por la grafiosis, la enfermedad más devastadora y difundida de los olmos. El patógeno, *Ophiostoma novo-ulmi*, se desarrolla en el interior de los vasos del xilema causando su cavitación. Este proceso origina marchitamiento foliar y, en la casi totalidad los casos, la muerte del árbol. En el presente trabajo, se ha estudiado en *U. minor* la variación de la susceptibilidad con la edad y su posible relación con la variación de las características anatómicas del xilema, y se ha comparado la formación estacional del xilema en *U. minor* con la de una especie tolerante a la grafiosis, *U. pumila*. Asimismo, se ha aplicado espectroscopía de infrarrojo de transformada de Fourier (FT-IR), junto con técnicas de análisis multivariante, para analizar cambios metabólicos en tejidos de xilema de *U. minor* infectados con *O. novo-ulmi*, y para comparar perfiles metabólicos de olmos de diferente grado de resistencia. Los resultados mostraron resistencia juvenil en olmos de dos y tres savias. Se observó una relación significativa entre la variación de la susceptibilidad con la edad y la variación de determinados factores anatómicos. Un menor diámetro medio de los vasos, una menor conductancia hidráulica teórica, y una menor proporción de vasos de grandes dimensiones en la madera temprana se asociaron con mayores niveles de resistencia. Se piensa que estos factores contribuyen a una menor expansión del patógeno por el sistema vascular y a una mayor facilidad para la compartimentación de la enfermedad. *U. minor* formó vasos de mayores diámetros que *U. pumila* al comienzo del periodo vegetativo, pero a partir del 15 de junio los diámetros de los vasos fueron mayores en *U. pumila*. Tras la inoculación de *U. minor* con *O. novo-ulmi*, se produjo una reducción en los niveles de polisacáridos del xilema y un aumento en los niveles de compuestos fenólicos. Se observó la formación de barreras de compartimentación de la enfermedad, formadas por células de parénquima axial suberizadas. A los 15 días tras la inoculación, individuos de *U. minor* resistentes presentaron mayores niveles de almidón que individuos susceptibles. Se diferenciaron químicamente tejidos sanos de xilema de *U. minor* y *U. pumila*, así como de individuos resistentes y susceptibles de *U. minor*. Nuevamente, contenidos elevados de almidón se asociaron con niveles elevados de resistencia, lo cual puede estar relacionado con una mayor capacidad energética del árbol para activar los mecanismos de defensa. No obstante, otros componentes químicos, tales como los niveles de celulosa, lignina y pectina, también contribuyeron a la distinción entre grupos de susceptibilidad. Los resultados confirman que la resistencia de los olmos a la grafiosis es de carácter poligénico, actuando factores de resistencia preexistentes a la infección, como las dimensiones de los elementos vasculares o la composición química del xilema, y factores inducidos por la infección, como la formación de barreras de compartimentación o la producción de compuestos fenólicos.

SUMMARY

The European *Ulmus minor* populations are seriously threatened by the Dutch elm disease (DED), the most devastating and widespread disease of elms. The pathogen, *Ophiostoma novo-ulmi*, spreads within the xylem vessels causing their cavitation. This process originates foliar wilting and, in most cases, the tree death. In the present work, the influence of plant age on *U. minor* susceptibility to DED, and its possible relation with the variation of anatomical factors of the xylem, has been studied. Furthermore, the seasonal changes in xylem formation of *U. minor* have been compared to those of the tolerant *U. pumila* species. Finally, in order to analyse metabolic changes in *U. minor* xylem tissues infected with *O. novo-ulmi*, and to compare metabolic profiles of elms of different resistance level Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy, coupled with chemometric methods, has been applied. The results showed juvenile resistance in 2 and 3 year-old elms. A significant relation was observed between the susceptibility changes with age and the changes of certain anatomical factors. Lower mean vessel diameter, lower theoretical hydraulic conductance, and lower proportion of large vessels in the earlywood were associated with higher resistance levels. It is thought that these factors contribute to a lower pathogen spread through the vascular system, and allows compartmentalization of the disease. *U. minor* formed larger vessels than *U. pumila* at the beginning of the season, but, up to June 15 vessels were larger for *U. pumila*. After the inoculation with *O. novo-ulmi*, reduced levels of xylem polysaccharides were detected, together with increased levels of phenolic compounds. Barrier zones for pathogen compartmentalization, formed by suberized axial parenchyma cells, were observed in infected trees. Fifteen days after inoculation, resistant *U. minor* trees presented higher levels of starch, relative to susceptible trees. Chemical differences were found between healthy xylem tissues of *U. minor* and *U. pumila*, as well as between resistant and susceptible *U. minor* trees. Again, enhanced levels of starch seemed to be involved in tree resistance, which could be associated with higher energy capability for defensive responses. Other chemical components, such as cellulose, lignin, and pectin levels, also contributed to the distinction among susceptibility groups. The results confirm that the resistance of elms against DED is polygenic, acting preformed factors such as xylem vessel size or xylem chemical composition, and factors activated by the infection, such as barrier zone formation, or the production of phenolic compounds.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El olmo común

El olmo común (*Ulmus minor* Miller *sensu latissimo*) (Fig. 1) es un árbol caducifolio ampliamente distribuido por el sur de Europa (Fig. 2). Su estación típica la constituyen las llanuras aluviales o terrenos de vega con suelos profundos, preferiblemente de granulometrías finas y riqueza en carbonatos, aunque puede vivir también en sustratos arenosos (García-Nieto *et al.*, 2003). Los olmos comparten con el hombre una intensa relación cultural originada por los múltiples usos antiguos de esta especie, entre los que destacan la utilización de sus hojas y ramillos como alimento para el ganado, y su madera para carretería y construcción naval (Heybroek, 1993; Gil *et al.*, 2003). La frondosidad de su copa, junto con su capacidad para vivir en suelos poco aireados, ha posibilitado su frecuente utilización como árbol ornamental en el entorno urbano. La excelente capacidad de propagación vegetativa de los olmos ha facilitado su difusión por el hombre. La importancia que adquiere el cultivo de la vid en épocas del Imperio Romano propició la introducción de olmos de origen italiano en la Península Ibérica para ser usados como soporte de vides (Gil *et al.*, 2004). Entre estos olmos se encuentra el llamado Atinío, que constituye la base del *U. minor* var. *vulgaris*. La introducción del olmo siberiano (*U. pumila* L.) en el área de distribución natural del olmo común, ha producido cambios en su estructura genética gracias a la hibridación, muchas veces espontánea, aunque

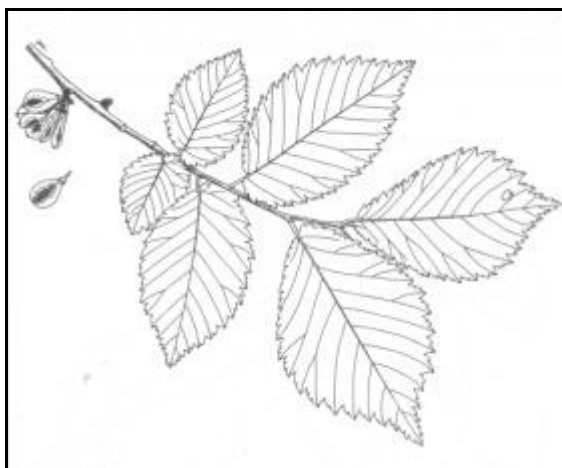


Fig. 1. Ramilla y sámaras de *Ulmus minor* (Adaptado de Collin *et al.*, 2003).

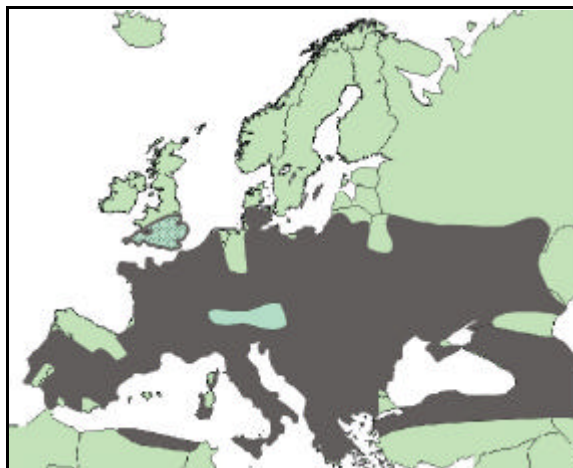


Fig. 2. Distribución geográfica de *Ulmus minor* (Adaptado de Collin *et al.*, 2003).

limitada al ámbito urbano (Gil *et al.*, 2003). El olmo siberiano alcanzó una gran difusión durante el siglo XX ante la aparición de la enfermedad de la grafiosis, cuando las olmedas de *U. minor* de grandes dimensiones comenzaron a registrar altas mortandades, que no afectaron a *U. pumila* por la tolerancia que posee.

1.2. La enfermedad de la grafiosis

La grafiosis del olmo es una enfermedad vascular causada por los hongos patógenos *Ophiostoma ulmi* (Buisman) Nannf. y *O. novo-ulmi* Brasier (Fig. 3). El primero se caracteriza por tener un menor crecimiento y virulencia que *O. novo-ulmi*, por lo que se les conoce como especie no agresiva y especie agresiva respectivamente (Brasier, 2000). Dos grandes pandemias de grafiosis tuvieron lugar en Europa y Norteamérica durante el siglo XX. La primera de ellas, observada a principios de siglo, fue causada por *O. ulmi* y supuso la desaparición de entre el 10 y el 40% de los olmos existentes en diferentes países (Peace, 1960). La aparición de la segunda pandemia durante los años 70, debido a *O. novo-ulmi*, condujo a la desaparición masiva de los olmos comunes adultos (Brasier, 2000) (Fig. 4). Cuando la grafiosis apareció en Europa, una serie de coleópteros del género *Scolytus* (escolítidos o barrenillos del olmo) compartían con el olmo una estrecha relación. Esta relación se remonta hasta mediados del Holoceno, ya que las larvas de estos insectos se alimentan del floema de olmos decaídos, moribundos, o recién muertos (Pajares *et al.*, 2003). La aparición del hombre como agente difusor del hongo a larga distancia mediante el transporte de madera infectada, junto con su impacto en los olmos, al haberlos manipulado durante siglos, supuso de manera involuntaria, pero decisiva, la propagación de la grafiosis. Los escolítidos, ante la llegada de la enfermedad se convirtieron en sus principales vectores, y encontraron en los olmos debilitados o muertos por grafiosis un abundante material para su reproducción y desarrollo, resultando en una relación mutualista que ha supuesto la desaparición de varios millones de olmos (Pajares *et al.*, 2003) (Fig. 5).

La grafiosis puede transmitirse de un árbol a otro a través de injertos radiculares, pero lo frecuente es que se transmita a través de escolítidos. Esto ocurre cuando los huevos de los

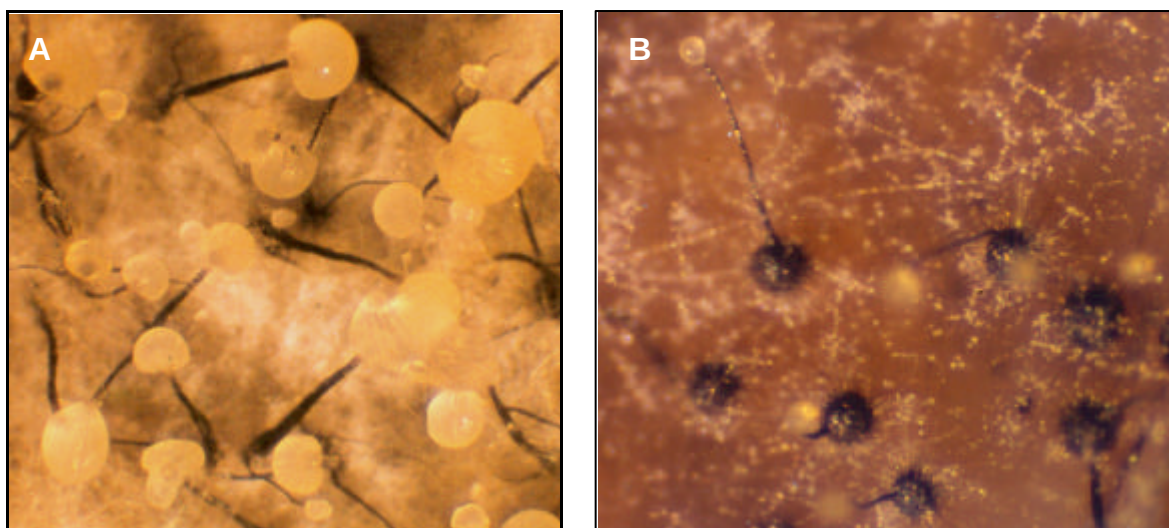


Fig. 3. Cuerpos de fructificación de *Ophiostoma novo-ulmi*: **(A)** coremios conteniendo conidios o esporas asexuadas; **(B)** peritecios conteniendo ascoporas o esporas sexuadas.

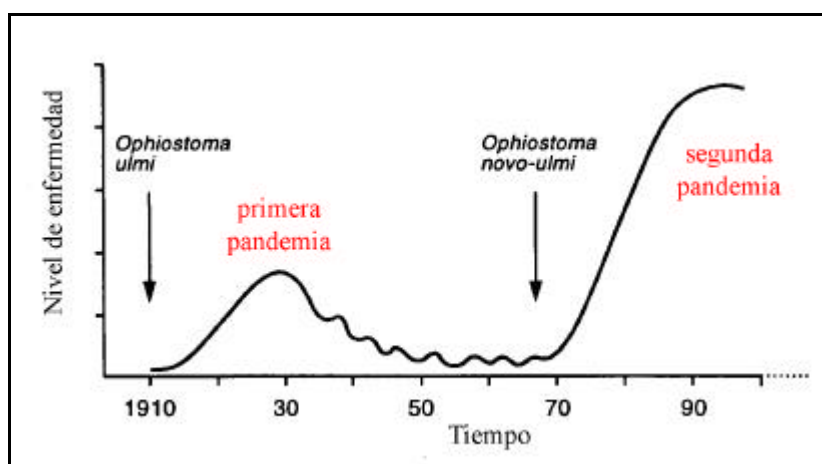


Fig. 4. Evolución aproximada del impacto de las dos pandemias de grafiosis en Europa (modificado de Brasier, 2000).



Fig. 5. Olmos secos debido a la grafiosis en la olmeda de Rivas-Vaciamadrid, Madrid.

insectos eclosionan de abril a septiembre y, portando en su cuerpo esporas del patógeno, vuelan hacia las copas de olmos sanos para alimentarse en las ramas más jóvenes y en sus horcaduras (Pajares *et al.*, 2003). En su alimentación, el escolítido perfora la corteza alcanzando el sistema vascular de la planta (Fig. 6). La infección se produce por la diseminación de esporas en las heridas de alimentación, donde encuentran un medio favorable para su germinación y crecimiento.

Una vez dentro del sistema vascular del árbol, el hongo se multiplica con facilidad originando micelio que se alimenta de los nutrientes de la savia (Singh y Smalley, 1969), o degradando las paredes celulares (Scheffer y Elgersma, 1982) (Fig. 7). Las microhifas del hongo atraviesan las membranas de las punteaduras o los microporos para llegar a la célula vecina, donde origina esporas que son arrastradas por el flujo de savia. Micelio, esporas y productos secretados, tales como ceratoulmina y otras toxinas, disminuyen la tensión superficial de la savia, con lo que se posibilita la entrada y expansión de una burbuja de aire que hace cavitarse el vaso invadido (Russo *et al.*, 1981; Takai y Richards, 1978).

Una vez rota la columna, el hongo queda disperso a lo largo del elemento conductor y el fenómeno se repite en otros vasos. A medida que éstos cavitan, a mayor tensión se ve sometida la savia de los vasos restantes, causando la entrada y expansión de más burbujas de aire. El proceso se produce en cascada ocasionando una rápida evolución del marchitamiento foliar en el árbol infectado. Además de la cavitación de los vasos, hay evidencias de la acción directa del patógeno en las células cambiales y en las células de parenquima axial y radial, causando alteraciones y deformaciones en sus paredes celulares y protoplastos (Ouellette y Rioux, 1992).

1.3. Factores relacionados con la resistencia de los olmos a la grafiosis

En la resistencia de los olmos a la grafiosis intervienen mecanismos de defensa pasivos, constituidos por factores existentes en el árbol antes de la infección (factores preexistentes), y mecanismos de defensa activos, inducidos por la acción del patógeno (factores inducidos). Diversos parámetros anatómicos y fisiológicos se han descrito como



Fig. 6. *Scolytus scolytus* realizando una mordedura de alimentación en la horcadura de una ramilla de olmo.

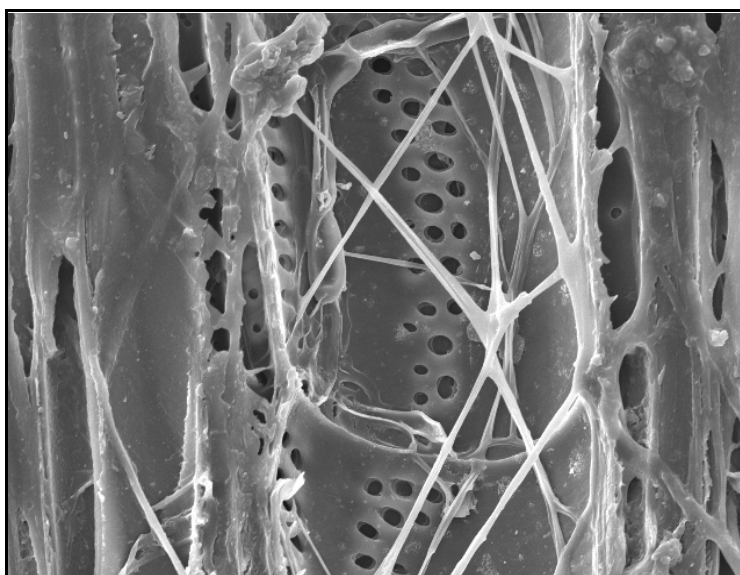


Fig. 7. Hifas de *Ophiostoma novo-ulmi* en el interior de un elemento vascular de *Ulmus minor*, observadas mediante microscopía electrónica de barrido.

factores de resistencia preexistentes. Dentro de una misma especie, se han observado relaciones positivas entre el diámetro medio de los vasos del xilema y la susceptibilidad a la grafiosis (McNabb *et al.*, 1970; Solla y Gil, 2002a). Estas relaciones se basan en que el flujo de savia y la velocidad máxima a través de un vaso es directamente proporcional a la cuarta potencia del radio del vaso (Zimmermann, 1983) y, por tanto, a mayores diámetros de vasos, la cantidad y velocidad de propágulos y toxinas del patógeno transportadas por el flujo de savia son mayores. Sin embargo, mediciones recientes han mostrado que individuos de la especie resistente *U. pumila* tienen un mayor diámetro medio de vasos y

una mayor densidad de vasos que individuos susceptibles de *U. minor* (datos no publicados).

La distribución de los vasos en la madera de olmo es en anillo poroso, caracterizada por la formación de grandes vasos o poros durante la primavera (madera temprana) (Fig. 8). A continuación se forma la madera tardía, con vasos de menor tamaño y mayor proporción de fibras. Esta distribución representa una ventaja hidráulica respecto a la de poros difusos, ya que en primavera los recursos hídricos son abundantes y la disponibilidad de vasos grandes permite difundir la savia con mayor eficiencia. Esta ventaja se convierte en desventaja ante enfermedades vasculares, pues si los vasos de primavera se ven afectados, el árbol no dispondrá de otros para el transporte de savia (Solla y Gil, 2003a). La proporción de vasos grandes dentro del anillo de crecimiento es, por tanto, otro factor a tener en cuenta en estudios de resistencia. Se hipotetiza que olmos con una mayor proporción de vasos a partir de un determinado diámetro son más susceptibles que olmos con menor proporción, aún teniendo el mismo diámetro medio. Investigaciones con *U. × hollandica* Mill. (Heybroek, 1957), *U. americana* L. (Neely, 1968; Wright, 1968), y *U. minor* (Mittempergher y la Porta, 1993; Solla *et al.*, 2000), han descrito resistencia juvenil en individuos menores de cuatro años. Los olmos sufren cambios morfológicos y fisiológicos al desarrollarse

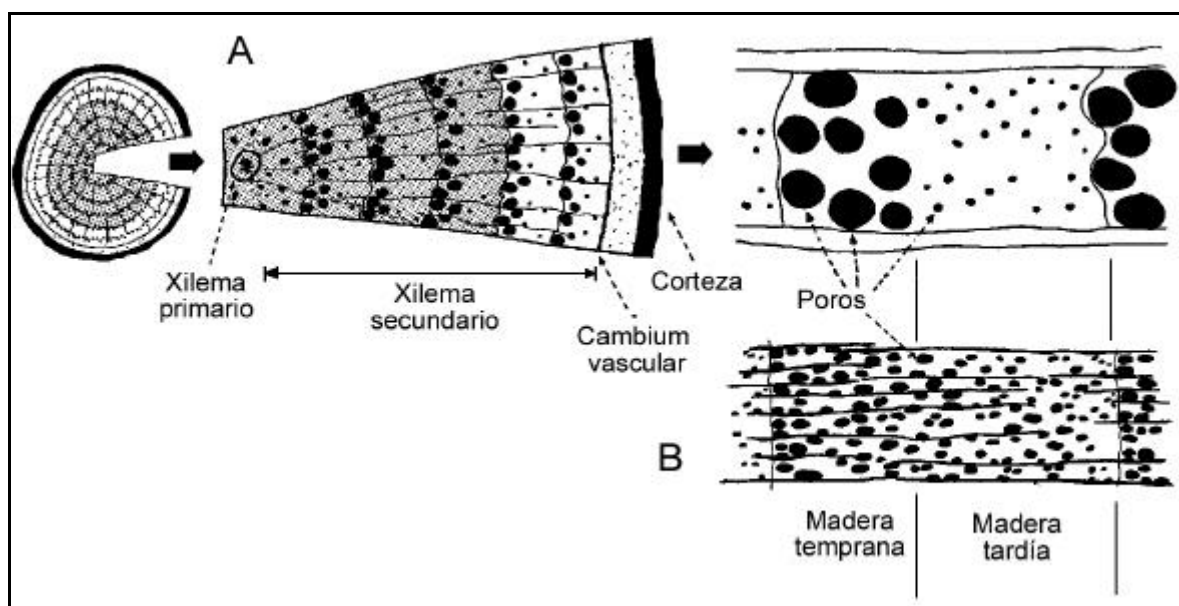


Fig. 8. (A) Sección transversal de un tallo de *Ulmus* sp., mostrando una distribución de vasos en anillo poroso. **(B)** Detalle de un anillo de crecimiento de *Acer* sp., mostrando una distribución de vasos en poros difusos. (Adaptado de Tainter, 2001).

desde su etapa juvenil hasta convertirse en un árbol adulto. En ramas de *U. minor* y *U. americana* de uno a tres años de edad, se observó que los diámetros medios de los vasos del xilema y la disposición de los vasos en el anillo de crecimiento varían con la edad (Sinclair *et al.*, 1975; Solla y Gil, 2002a). Es probable que estos cambios anatómicos afecten al grado de susceptibilidad del árbol durante su etapa de desarrollo. Otro de los factores que favorecen la difusión del patógeno a través de los elementos vasculares es la conductividad hidráulica, la cual se ha mostrado mayor en individuos de alta susceptibilidad en las especies *U. americana* (Melching y Sinclair, 1975) y *U. × hollandica* (Elgersma, 1970). En un estudio con *U. minor*, se encontraron relaciones positivas entre la susceptibilidad a la grafiosis en olmos de seis y siete savias y los valores de conductancia estomática y conductividad hidráulica foliar específica (Solla *et al.*, 2001).

Pocos trabajos han contemplado el estudio de factores preexistentes de resistencia de tipo químico en olmos. Extractos de semillas y brinzales de olmos de hasta siete meses de edad contienen ácido cáprico, una sustancia inhibitoria de la germinación de esporas de *O. ulmi* (Schreiber, 1970; Doskotch *et al.*, 1975). Sin embargo, esta sustancia no ha podido ser asociada con la resistencia a la grafiosis en especies resistentes o en genotipos resistentes de *U. americana*. Estudios recientes sugieren la implicación de los polisacáridos constitutivos de la pared celular de las plantas en la resistencia a enfermedades (Vorwerk *et al.*, 2004). Es posible que este tipo de factores estén también implicados en la resistencia de los olmos a la grafiosis.

Los factores de resistencia inducidos se originan con la finalidad principal de compartimentar al patógeno en una región del xilema, impidiendo su expansión en el tejido (Hubbes, 2004). El mecanismo de resistencia inducido probablemente más efectivo a largo plazo consiste en la formación de barreras de compartimentación (Ouellette y Rioux, 1992). Estas barreras suelen estar formadas por bandas de células de parénquima axial con compuestos fenólicos de actividad antifúngica en su interior, y con paredes celulares fuertemente lignificadas o suberizadas, lo que les confiere resistencia a la degradación (Ouellette y Rioux, 1992; Pearce, 1996). Mediante estas barreras, el árbol evita la expansión radial del patógeno hacia el cambium vascular, permitiendo que la actividad cambial genere un nuevo xilema a salvo de tejidos infectados que garantice el suministro de agua y nutrientes (Shigo y Tippet, 1981; Bonsen *et al.*, 1985). La formación de zonas

de barrera ha sido descrita en individuos de *U. americana* y *U. × hollandica* infectados con *O. ulmi* (Shigo y Tippet, 1981; Bonsen *et al.*, 1985, Ouellette y Rioux, 1992), así como en otras especies forestales, tales como *Quercus robur* L., *Acer saccharinum* L., o *Fagus sylvatica* L. (Pearce, 1996), como consecuencia de heridas mecánicas o infecciones. Por otra parte, la compartimentación vertical del patógeno se logra mediante la formación de tilosas y geles, que bloquean el lumen del vaso (Ouellette y Rioux, 1992) (Fig. 9).

Junto con la formación de barreras de compartimentación, se han descrito acumulaciones de ciertos compuestos fungitóxicos de bajo peso molecular, denominados mansononas, en el xilema de olmos infectados. La acumulación de mansononas mostró una relación positiva con la resistencia cuando brinzales de la especie susceptible *U. americana* y la especie resistente *U. pumila* fueron inoculados con cepas agresivas y no agresivas de

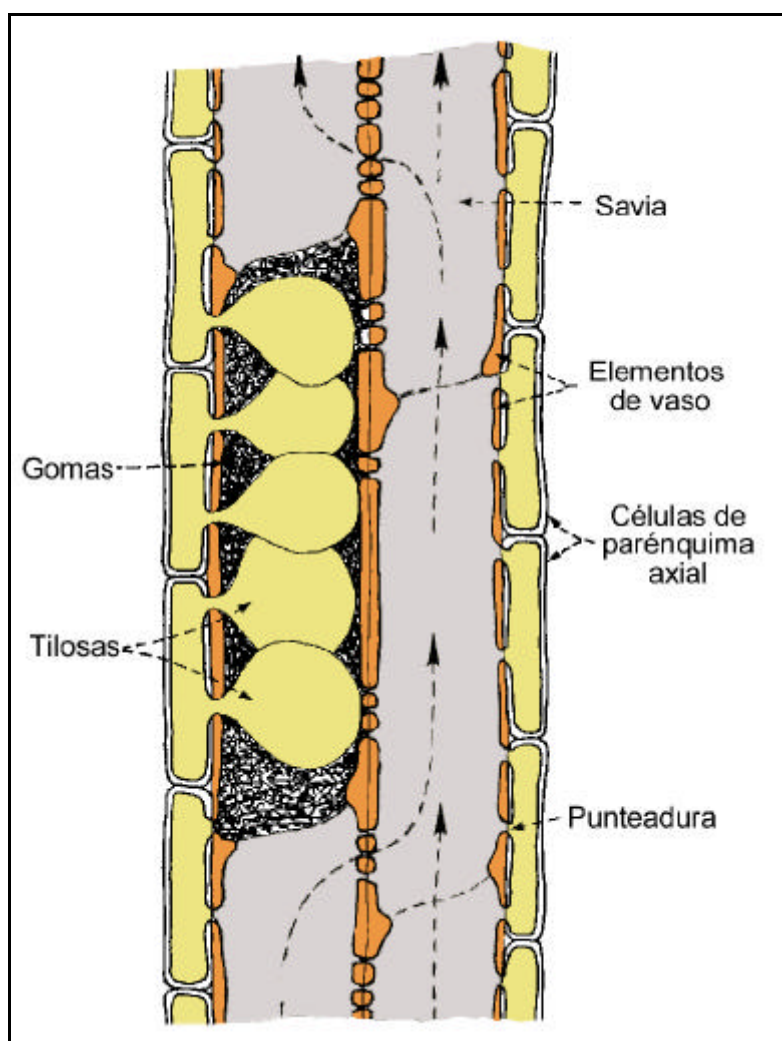


Fig. 9. Sección longitudinal del xilema de *Ulmus minor*, mostrando un vaso ocluido por gomas y tilosas (Adaptado de Tainter, 2001).

O. ulmi (Duchesne *et al.*, 1985). En un estudio posterior, también con *U. americana*, se comprobó que cepas no agresivas de *O. ulmi* inducían más cantidad de mansononas que cepas agresivas, sugiriendo que la agresividad del patógeno dependía de la inducción de este tipo de compuestos (Duchesne *et al.*, 1990). La rápida acumulación de mansononas parece ser importante en dificultar la invasión en los estados iniciales de infección, hasta que otros mecanismos de resistencia más efectivos, como la formación de zonas de barrera, tengan lugar (Ouellette y Rioux, 1992).

2. OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo son:

- Determinar la variación de la susceptibilidad de *U. minor* a *O. novo-ulmi* con la edad, y su posible relación con la variación de factores anatómicos de la madera temprana.
- Describir cambios estacionales en la formación del xilema en *U. minor* y *U. pumila* y su posible implicación en el diferente grado de resistencia de ambas especies a *O. novo-ulmi*.
- Describir cambios en la composición química del xilema de olmos causados por *O. novo-ulmi*, y observar posibles diferencias de acuerdo al grado de resistencia del árbol.
- Identificar posibles marcadores metabólicos de resistencia que permitan distinguir entre tejidos sanos de xilema de olmos de diferente grado de resistencia a *O. novo-ulmi*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio

Los olmos utilizados en los diferentes ensayos que componen el presente trabajo se localizan en el Centro Nacional de Mejora Genética Forestal Puerta de Hierro, Madrid (Fig. 10). La mayor parte de estos olmos han sido propagados a partir de individuos de *U. minor* y de híbridos *U. minor* × *U. pumila* de diferentes localidades españolas. También se han utilizado individuos resistentes de *U. pumila* procedentes de China, proporcionados en 1989 por el Instituto de Investigación Forestal y de la Naturaleza de Wageningen (Holanda). El material vegetal se incluye dentro del Programa español para la evaluación, conservación y mejora genética de los recursos genéticos de los olmos ibéricos, iniciado en 1986 en convenio de colaboración entre la E.T.S.I. de Montes de la Universidad Politécnica de Madrid y la D.G.B. del Ministerio de Medio Ambiente. La propagación se realizó a partir de estaquillas de raíz o de semillas de polinización abierta, según la metodología descrita por Burón *et al.* (2003). Un año después de su propagación, los olmos fueron plantados en parcelas con un diseño de bloques al azar. El suelo de estas parcelas es de textura arcillo-arenosa, y es enmendado anualmente con materia orgánica para favorecer la retención de agua, y regado mediante aspersores durante primavera y verano según sea necesario. El material vegetal ha sido caracterizado mediante marcadores moleculares de



Fig.10. Parcela de olmos en el Centro Nacional de Mejora Genética Forestal Puerta de Hierro, Madrid.

isoenzimas (Cogolludo-Agustín *et al.*, 2000) y de ADN nuclear (Gil *et al.*, 2004).

3.2. Evaluación de la susceptibilidad

Con el doble objetivo de clasificar el material vegetal en función de su resistencia a *O. novo-ulmi*, y de estudiar posibles cambios metabólicos en tejidos de xilema causados por la enfermedad, se practicaron inoculaciones artificiales con esporas del patógeno. Se seleccionaron cepas de *O. novo-ulmi* de rápido crecimiento *in vitro* y alta virulencia. Estas cepas fueron aisladas en placas de Petri a partir de ramillos apicales de olmos infectados de diferentes localidades españolas. Como medio se utilizó extracto de agar-malta al 2%. Para su conservación, se mantuvieron en nevera a 4 °C y fueron repicados cada cuatro a seis meses.

La semana antes de inocular, se introdujeron tres piezas de 2 × 2 mm de micelio en frascos Erlenmeyer conteniendo medio líquido de Tchernoff (Tchernoff, 1965). Los frascos se agitaron durante tres días, a 125 rpm, y a temperatura del laboratorio. Las esporas desarrolladas en el medio fueron filtradas, centrifugadas e introducidas en agua destilada esterilizada. La concentración de esporas del inóculo se ajustó mediante una placa Thomas a 10⁶ esporas/ml. Las inoculaciones se realizaron a finales de abril o principios de mayo mediante una jeringuilla esterilizada. Se practicó un corte transversal en la base del tronco principal de cada árbol con una navaja, hasta alcanzar el anillo xilemático (Fig. 11). Sobre la hoja de la navaja se vertió 0,1 ml de suspensión de esporas, la cual fue rápidamente absorbida por el árbol.

En árboles de 10 años de edad, y con objeto de observar respuestas metabólicas a la enfermedad, las inoculaciones se practicaron en la base de ramas de cinco años. Para evaluar la susceptibilidad de las plantas se registraron los porcentajes de marchitamiento foliar. Se realizó un seguimiento de los síntomas desde el día 5 hasta el día 120 tras la inoculación. Se asignaron a los árboles niveles de susceptibilidad alta, media y baja, de acuerdo con su porcentaje de marchitamiento en el día 60 tras la inoculación: 100-67, 66-34, y 33-0%, respectivamente (Solla y Gil, 2002a).



Fig. 11. Inoculación artificial de esporas de *Ophiostoma novo-ulmi*.

3.3. Toma de datos

3.3.1. Influencia de la edad de la planta en la resistencia y su relación con la anatomía del xilema

Se utilizaron cuatro clones de *U. minor* y un clon de *U. minor* × *U. pumila*, de 2 a 7 años de edad (Tabla 1 de Anexo 1). Un día después de ser inoculados, los árboles fueron ligeramente heridos en la base del tronco para marcar el xilema formado por el cambium hasta ese momento (Fig. 12). Las muestras de segmentos de tronco se tomaron a la altura

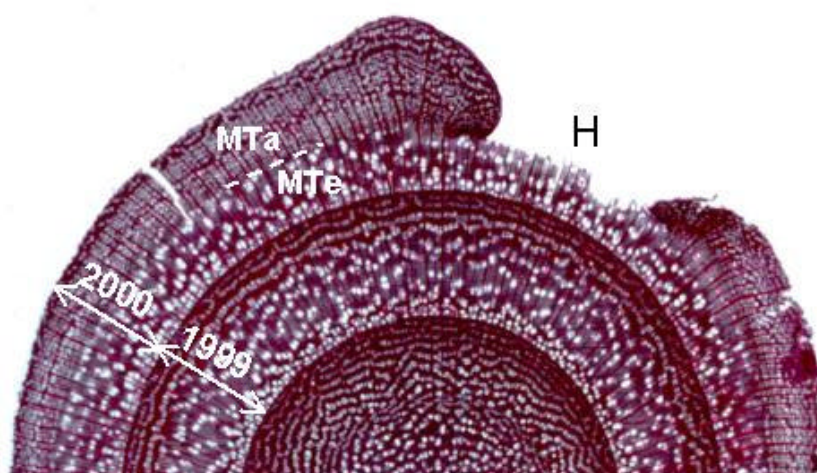


Fig. 12. Sección transversal del tallo principal de un individuo de *Ulmus minor* de 4 años de edad. Se aprecia la herida (H) practicada para marcar el momento de la inoculación, la diferencia entre madera temprana (MTe) y madera tardía (MTa), y los dos últimos anillos de crecimiento correspondientes a los años 1999 y 2000.

de la marca causada por la herida, las cuales fueron introducidas inmediatamente en FAA (formaldehído-ácido acético-70% etanol, 5:5:90, v/v/v), para su fijación. Sobre estas muestras se practicaron cortes micrométricos transversales de 15 μm , que se tiñeron con safranina y fueron observados mediante un microscopio Olympus BX-50 conectado a un ordenador personal. Mediante el programa informático Biometría, desarrollado en el año 2000 por la Unidad de Tecnología de la Madera de la ETSI de Montes (UPM), se midieron los diámetros de los vasos formados desde el inicio del período vegetativo hasta el momento de la inoculación. Para realizar las mediciones, se seleccionaron al azar cuatro sectores separados entre sí 90°, cada uno definido por la superficie contenida entre dos o tres radios xilemáticos consecutivos. Para cada individuo se calculó el diámetro medio, la superficie transversal conductora (STC), y la conductancia hidráulica teórica relativa (CHT). La STC se calculó dividiendo el área ocupada por los vasos en un sector, entre el área total del sector, y multiplicando el resultado por 100. La CHT, basada en la ecuación de Hagen-Poiseuille (Giordano *et al.*, 1978), se calculó dividiendo el sumatorio de la cuarta potencia de los radios de los vasos de un sector, entre el área del sector.

3.3.2. Variación estacional de la diferenciación del xilema y su relación con la resistencia

Se utilizaron ramas de cuatro años de edad, pertenecientes a cuatro clones susceptibles de la especie *U. minor*, y a cuatro clones resistentes de la especie *U. pumila* (Tabla 1 de Anexo 2). Las ramas fueron heridas mensualmente desde el 15 de diciembre de 2000 hasta el 15 de diciembre de 2001, con objeto de marcar el incremento mensual del anillo de crecimiento. Las heridas se practicaron a lo largo de la longitud (L) de la rama, en sentido descendente, separadas entre sí una distancia de $L/14$ (Fig. 13). En febrero de 2002, las ramas se trocearon en segmentos a la altura de las heridas, los cuales fueron introducidos inmediatamente en FAA para su fijación. Sobre estos segmentos, se practicaron cortes micrométricos transversales de 15 μm que fueron observados con el equipo óptico-informático descrito en el apartado anterior. Para cada mes, se obtuvo el incremento radial del anillo de crecimiento mediante la medición de la distancia comprendida entre la superficie de la herida y el comienzo del anillo de crecimiento. Sobre el incremento de crecimiento correspondiente a cada mes, se obtuvo el diámetro medio de los vasos,

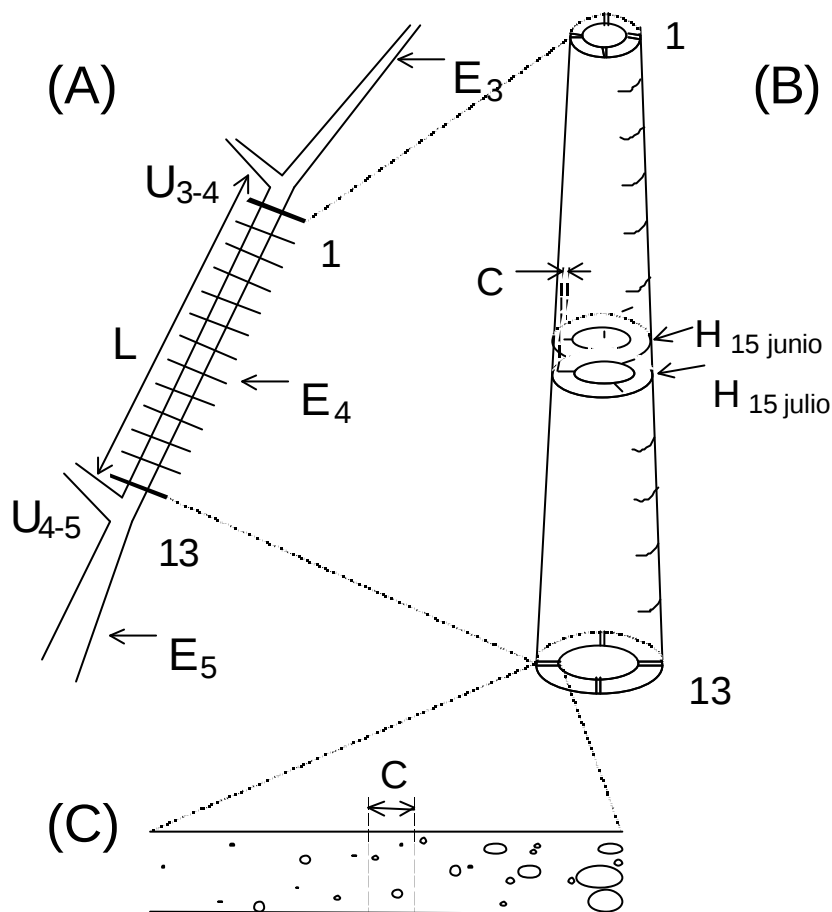


Fig. 13. Esquema de una rama de olmo sobre la que se midieron parámetros anatómicos tras realizar heridas a distancias de $L/14$, desde el 15 de diciembre de 2000 (1), hasta el 15 de diciembre de 2001 (13). **(A)** L, E y U indican la longitud de la rama, los entrenudos y las uniones entre ramas, respectivamente. Los subíndices indican la edad de la rama; **(B)** H y C indican la ubicación de las heridas y el incremento radial de crecimiento desde el 15 de junio al 15 de julio, respectivamente, y **(C)** detalle de un sector radial, donde C es el periodo de crecimiento desde el 15 de junio al 15 de julio.

STC, CHT, la densidad de vasos por mm^2 , el número de vasos agrupados, y el área de los grupos de vasos. Las mediciones se realizaron en cuatro sectores radiales de 500 μm de ancho, separados entre sí 90° (metodología detallada en Anexo 2).

La contribución de los vasos a la conductividad hidráulica se calculó dividiendo el diámetro de cada vaso elevado a la cuarta, entre la suma de todos los vasos elevados a la cuarta (Gorusch y Oberbauer, 2002). Los diámetros de los vasos fueron clasificados como pequeños ($< 80 \mu\text{m}$), medianos ($80\text{-}160 \mu\text{m}$) y grandes ($> 160 \mu\text{m}$) en función de su porcentaje de contribución al flujo total. Estas categorías se usaron para determinar STC y CHT asumiendo la pérdida de vasos grandes y de vasos medianos y grandes debido a la cavitación por *O. novo-ulmi*. Para evaluar el periodo de máximo riesgo de infección, se instaló una trampa de escolítidos a unos 300 m de las parcelas, según la metodología descrita por Solla y Gil (2003b). La trampa fue revisada semanalmente durante 2001.

3.3.3. Cambios químicos en brinzales de *Ulmus minor* en respuesta a la inoculación con *Ophiostoma novo-ulmi*

Se analizaron muestras de ramillos de dos savias procedentes de 70 brinzales de *U. minor* de cuatro años de edad, de susceptibilidad *a priori* desconocida. En este ensayo se pretendió evitar una alta mortandad y obtener un amplio rango de síntomas, por lo que el inóculo se ajustó a 10^4 esporas/ml, frente a la dosis de 10^6 normalmente usada en los ensayos de resistencia (Mitterpergher y Santini, 2000). Como controles, se inocularon 10 brinzales con agua destilada. Las muestras se tomaron 2 días antes y 40 días después de la inoculación, y fueron inmediatamente introducidas en nitrógeno líquido para su conservación. Cortes micrométricos de estas muestras (5 μ m) fueron analizados mediante técnicas histoquímicas consistentes en la aplicación de fluoroglucinol-HCl sobre secciones transversales de los ramillos. Estas secciones fueron observadas mediante un microscopio Olympus BX61 para detectar tejidos fuertemente lignificados (en rojo bajo luz de tungsteno), o suberizados (fluorescentes bajo luz ultravioleta) (Biggs, 1985).

Dado el carácter poligénico de la resistencia de los olmos a la grafiosis, se buscó una técnica complementaria al análisis histoquímico que pudiera reflejar, de forma global, el perfil metabólico de una muestra de tejido de xilema en un momento determinado. Interesaba utilizar una técnica que no requiriera la preparación de extractos específicos, con el fin de alterar lo menos posible la composición química de los tejidos. En función de estos requerimientos, se eligió la espectroscopía de infrarrojo de transformada de Fourier (FT-IR) como técnica analítica. Se trata de una técnica rápida y reproducible que, aunque no determina concentraciones de metabolitos específicos, proporciona espectros que reflejan el perfil metabólico de la muestra objeto de estudio (Griffiths y de Haseth, 1986). Se analizaron secciones transversales



Fig. 14. Microscopio acoplado a un espectrómetro FT-IR, para analizar químicamente secciones transversales de ramillos de *Ulmus minor*.

(5 μm) de las mismas muestras mediante un microscopio Continuum Nicolet, acoplado a un espectrómetro FT-IR Nexus 670 Nicolet, en modo transmisión (Fig. 14). En cada sección y para el análisis espectral dentro del anillo de crecimiento correspondiente al año de la inoculación (2003), se seleccionaron tres sectores (125 $\times$ 125 μm) al azar.

3.3.4. Cambios químicos en clones resistentes y susceptibles de *U. minor* tras la inoculación con *Ophiostoma novo-ulmi*

Se utilizaron tres clones resistentes y tres clones susceptibles de *U. minor* de 10 años de edad, seleccionados por el diferente grado de resistencia mostrado en un ensayo previo (Tabla 1 de Anexo 4). Se inocularon dos ramets por clon, uno con *O. novo-ulmi*, y otro con agua destilada como control. En los días 5, 15, 30, 60 y 120 tras la inoculación, se recogieron muestras de ramillos de 3 savias, que fueron inmediatamente introducidas en nitrógeno líquido para su conservación. Sobre dichas muestras, se extrajo el xilema del último anillo de crecimiento mediante una cuchilla, el cual fue pulverizado y analizado mediante un espectrómetro FT-IR Bruker IFS-55, en modo reflexión (Fig. 15).



Fig. 15. Espectrómetro FT-IR utilizado para analizar cambios químicos en tejidos de olmo.

3.3.5. Marcadores metabólicos de resistencia en olmos sanos

Se utilizaron cinco clones resistentes y cinco clones susceptibles de *U. minor*, así como cinco clones resistentes de *U. pumila*. Los clones fueron seleccionados por el diferente grado de resistencia mostrado en un ensayo previo (Tabla 1 de Anexo 5). No se practicaron inoculaciones en estos árboles. Los días 1 de mayo, 15 de mayo, 1 de junio, 1 de julio, y 1 de septiembre de 2004, se recogieron muestras de ramillos de tres savias, que fueron inmediatamente introducidas en nitrógeno líquido para su conservación. Sobre dichas muestras, se extrajo el xilema del último anillo de crecimiento mediante una cuchilla, el cual fue pulverizado y analizado mediante un espectrómetro FT-IR Bruker IFS-55, en modo reflexión.

3.3. Procesado de datos y análisis estadístico

Los valores de marchitamiento, diámetro de vasos, STC, y CHT fueron normalizados usando la transformación $(\arcsen(x/100)^{1/2})$. Estos parámetros, junto con el crecimiento radial del anillo xilemático, el número de vasos por grupo y el área de los grupos de vasos, fueron analizados mediante ANOVA, y sus medias comparadas mediante contrastes múltiples de igualdad. En el estudio de la influencia de la edad de la planta en la resistencia, se realizaron análisis de regresión entre valores de marchitamiento, diámetro de vasos, STC, CHT y vigor del árbol.

Cada número de onda de los espectros FT-IR fue considerado como una variable, cuyo valor estuvo determinado por la absorbancia del espectro en dicho número de onda. De esta forma, cada espectro estuvo representado por un total de 856 variables. La complejidad de estos espectros, determinada por el número de variables y la superposición de bandas espectrales, imposibilita el análisis visual. Por ello se utilizaron varias técnicas de estadística multivariante que detectan diferencias entre espectros (Kakuráková y Wilson, 2001). Con el objeto de reducir la dimensionalidad de los datos espectrales, y preservar la mayor parte de la varianza entre espectros, en el presente trabajo se utilizó la técnica de análisis de componentes principales (ACP) (Goodacre *et al.*, 2000). Las puntuaciones de las CP para cada muestra fueron representadas gráficamente, permitiendo

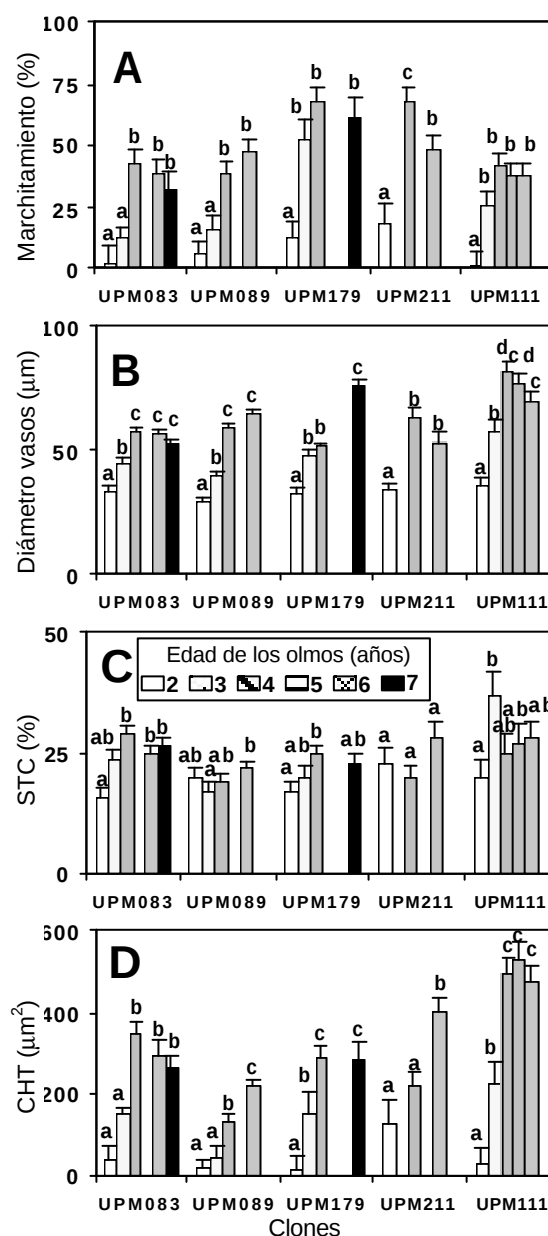
observar posibles agrupamientos entre muestras. Cuando con esta técnica no se detectaron agrupamientos, se aplicó un análisis de funciones discriminantes (AFD) sobre aquellas CP cuyos valores propios representaron más del 0,1% de la varianza total (Timmins *et al.*, 1998), con el conocimiento *a priori* de qué espectro correspondía a cada grupo de muestras. El AFD trata de minimizar la varianza dentro del grupo y de maximizar la varianza entre grupos (Goodacre *et al.*, 1998). Las puntuaciones de las FD fueron representadas gráficamente para observar posibles agrupaciones entre muestras. En el ACP y en el AFD, los coeficientes por los cuales las variables originales deben ser multiplicadas para obtener las CP o FD se denominan cargas. Con objeto de deducir qué partes de los espectros son determinantes para distinguir grupos de muestras en el ACP o en el AFD, las cargas de las CP o de las FD fueron representadas gráficamente. El valor numérico de una carga de una determinada variable en una CP o FD indica la relación de esa variable con la correspondiente CP o FD (Massart *et al.*, 1998). Por tanto, los gráficos de las cargas fueron utilizados para detectar aquellos números de onda (variables) que contribuyeron en mayor medida a la posición de las muestras, en el gráfico de dispersión de la correspondiente CP o FD. Las intensidades de algunos de los picos espectrales más discriminantes fueron comparadas entre grupos de muestras mediante ANOVA, previa normalización de los espectros (divididos por la desviación estándar y centrados).

Para realizar los ANOVAs, los análisis de regresión, y los contrastes de comparación de medias se utilizó el programa informático Statgraphics Plus 5.1. Para los análisis de estadística multivariante se utilizaron los programas S-PLUS 4.5 y el programa desarrollado por Barros y Rutledge (Barros, 1999).

4. RESULTADOS

4.1. Influencia de la edad de la planta en la resistencia y su relación con la anatomía del xilema

Los primeros síntomas de grafiosis se observaron a los 6 ó 7 días tras la inoculación en las plantas de cuatro a siete años, a los 11 días en las de tres años, y a los 15 días o más en las de dos años. Los síntomas se incrementaron rápidamente, y a partir del día 30 tras la inoculación se mantuvieron constantes. Tomando como referencia el marchitamiento en el día 60 tras la inoculación, las plantas de dos años mostraron menores síntomas que las plantas de cuatro, cinco, seis y siete años. Esta diferencia se mantuvo en los clones UPM083 y UPM089 durante el tercer año de edad (Fig. 16A). A partir de los cuatro años el marchitamiento se estabiliza, excepto en el clon UPM211, en el que los valores de marchitamiento decrecen en los individuos de seis años. Las plantas de dos años mostraron una distribución de vasos en poros difusos (Fig. 17A), en comparación con la distribución en poros en anillo de las plantas de mayor edad (Fig. 17B). Geles, tilosas, y otros materiales externos se observaron con frecuencia en el lumen de los vasos de la madera temprana (Fig. 17C).



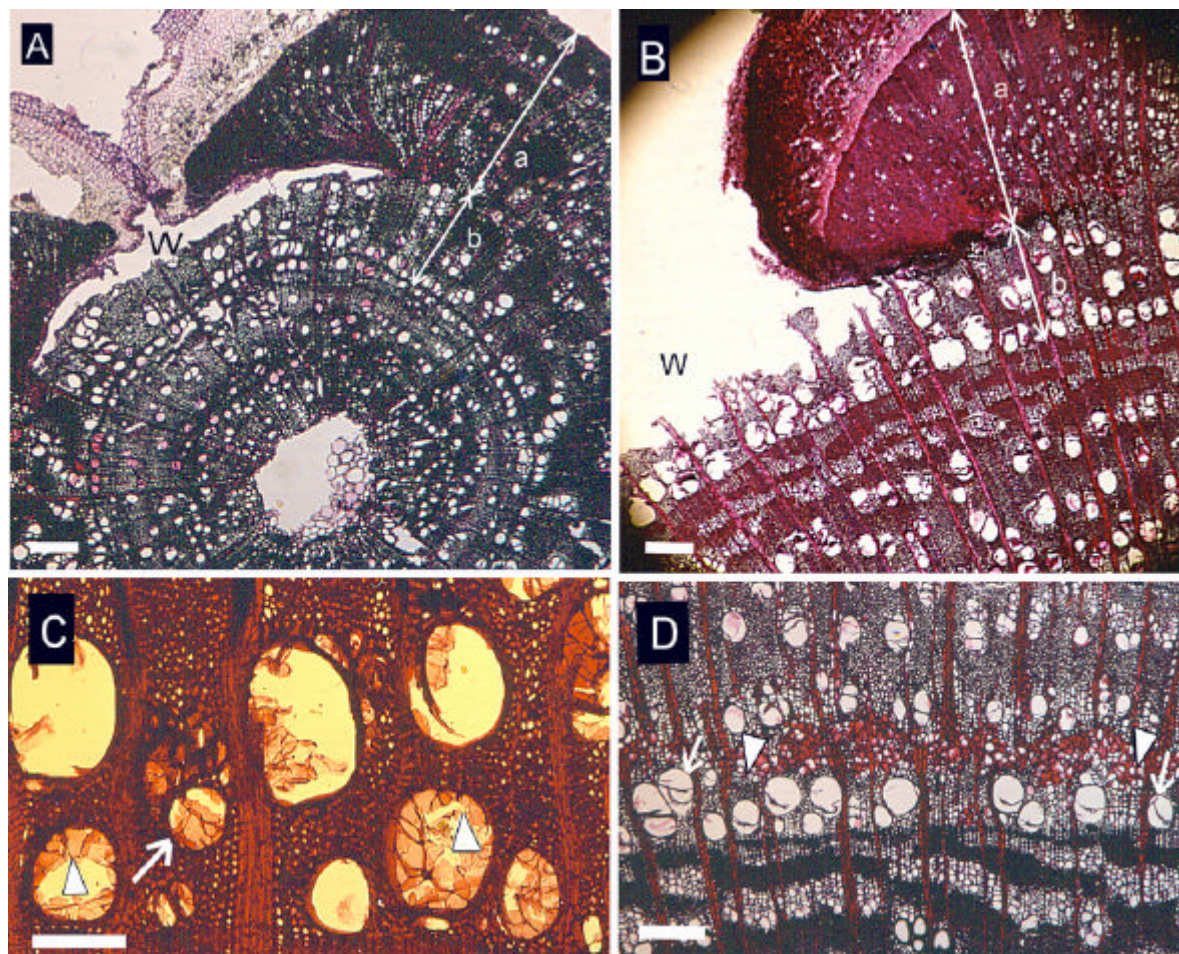


Fig. 17. Secciones transversales de los tallos de individuos de *Ulmus minor* (clon UPM211) de diferentes edades, inoculados con *Ophiostoma novo-ulmi* e inmediatamente heridos: **(A)** madera de poros difusos en un árbol de dos años de edad (barra = 200 μ m); **(B)** madera de poros en anillo en un árbol de 6 años de edad (barra = 200 μ m); **(C)** vasos en la madera temprana ocluidos por geles (triángulos) o tilosas y retículo alveolar (flecha) en un árbol de 4 años de edad (barra = 100 μ m); y **(D)** zona de barrera (entre triángulos) rodeando el xilema infectado, y vasos de la madera temprana conteniendo tilosas (flechas) en un árbol de 6 años de edad (barra = 200 μ m). Secciones teñidas con safranina. a, incremento de crecimiento después de la inoculación; b, incremento de crecimiento antes de la inoculación; W, herida.

Tabla 1. Matriz de correlación y nivel de significación entre variables.

Variable	Diámetro de vasos ¹	STC ²	CHT ³	Vigor de las plantas ⁴
Marchitamiento ⁵	0,68*** ⁶	0,28	0,61**	0,60**
Diámetro de vasos		0,47*	0,88***	0,81***
STC			0,56**	0,39
CHT				0,77***

¹ Diámetro de los vasos de la madera temprana del tronco.

² Superficie transversal conductora.

³ Conductividad hidráulica teórica relativa.

⁴ Expresado como el crecimiento en el año antes de la inoculación.

⁵ Porcentaje de marchitamiento 60 días tras la inoculación con *Ophiostoma novo-ulmi*.

⁶ Los asteriscos indican significaciones a $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), y $P < 0,001$ (***).

La formación de barreras de compartimentación se observó en el exterior de los grandes vasos de la madera temprana, coincidiendo con el comienzo de la formación de xilema tras la inoculación (Fig. 17D). En el xilema formado antes de la inoculación, las plantas de dos años presentaron más del 95% de los vasos dentro de las menores clases diamétricas (20-39 y 40-59 μm) (Fig. 4 de Anexo 1). En plantas de cuatro a siete años, aproximadamente el 25% de los vasos se encontró por encima de las 59 μm de diámetro. Las plantas de dos años presentaron los menores diámetros medios de vasos, mientras que las plantas de más edad para cada clon presentaron los mayores diámetros, con la excepción del híbrido UPM111, que presentó el mayor diámetro medio de vasos a los cuatro años (Fig. 16B). Los valores de STC mostraron pocas diferencias significativas entre edades y clones (Fig. 16C). Por el contrario, los valores medios de CHT mostraron una alta correspondencia con los de diámetro medio de vasos (Fig. 16D); estas dos variables mostraron una correlación significativa con el marchitamiento a los 60 días y con el vigor de la planta (Tabla 1). Asimismo, se encontraron correlaciones significativas entre los porcentajes de marchitamiento y vigor de las plantas.

4.2. Variación estacional de la diferenciación del xilema y su relación con la resistencia

Tanto en *U. pumila* como en *U. minor*, la actividad cambial se detectó por primera vez el 15 de marzo. Los incrementos de crecimiento radial se extendieron desde el 16 de marzo hasta el 15 de octubre en *U. pumila*, y desde el 16 de marzo hasta el 15 de noviembre en *U. minor*. En ambas especies, el crecimiento radial fue máximo desde el 16 de mayo hasta el 15 de junio, coincidiendo con el máximo de escolítidos capturados (Figs. 2 y 3 de Anexo 2). Considerando valores mes a mes, el diámetro medio de los vasos el 15 de abril (vasos formados del 16 de marzo al 15 de abril) fue significativamente menor en *U. pumila*, aunque esta especie mostró un mayor diámetro medio de los vasos el 15 de junio, y el 15 de agosto (Fig. 18a). Considerando valores acumulados, el diámetro medio de los vasos fue menor para *U. pumila* desde el 16 de marzo hasta el 15 de mayo, pero menor para *U. minor* desde el 16 de mayo al 15 de diciembre (Fig. 18b). Los valores medios de STC no mostraron diferencias entre especies (Fig. 18c,d), pero los valores medios de CHT fueron mayores para *U. minor* el 15 de abril, el 15 de mayo y el 15 de junio, observándose

mayores conductancias en esta especie durante todo el periodo vegetativo (Fig. 18e,f). La figura 19 muestra los valores de STC y CHT asumiendo la pérdida de vasos grandes (diámetro $> 160 \mu\text{m}$) y medianos ($80 \mu\text{m} < x < 160 \mu\text{m}$) debido a una cavitación teórica y progresiva por *O. novo-ulmi*. Los valores de STC y CTH disminuyeron a medida que se fueron excluyendo vasos de los cálculos. Estas disminuciones fueron mayores en *U. minor*, debido a que los vasos grandes de esta especie contribuyen en mayor medida al flujo de savia que los vasos grandes de *U. pumila* (Fig. 20).

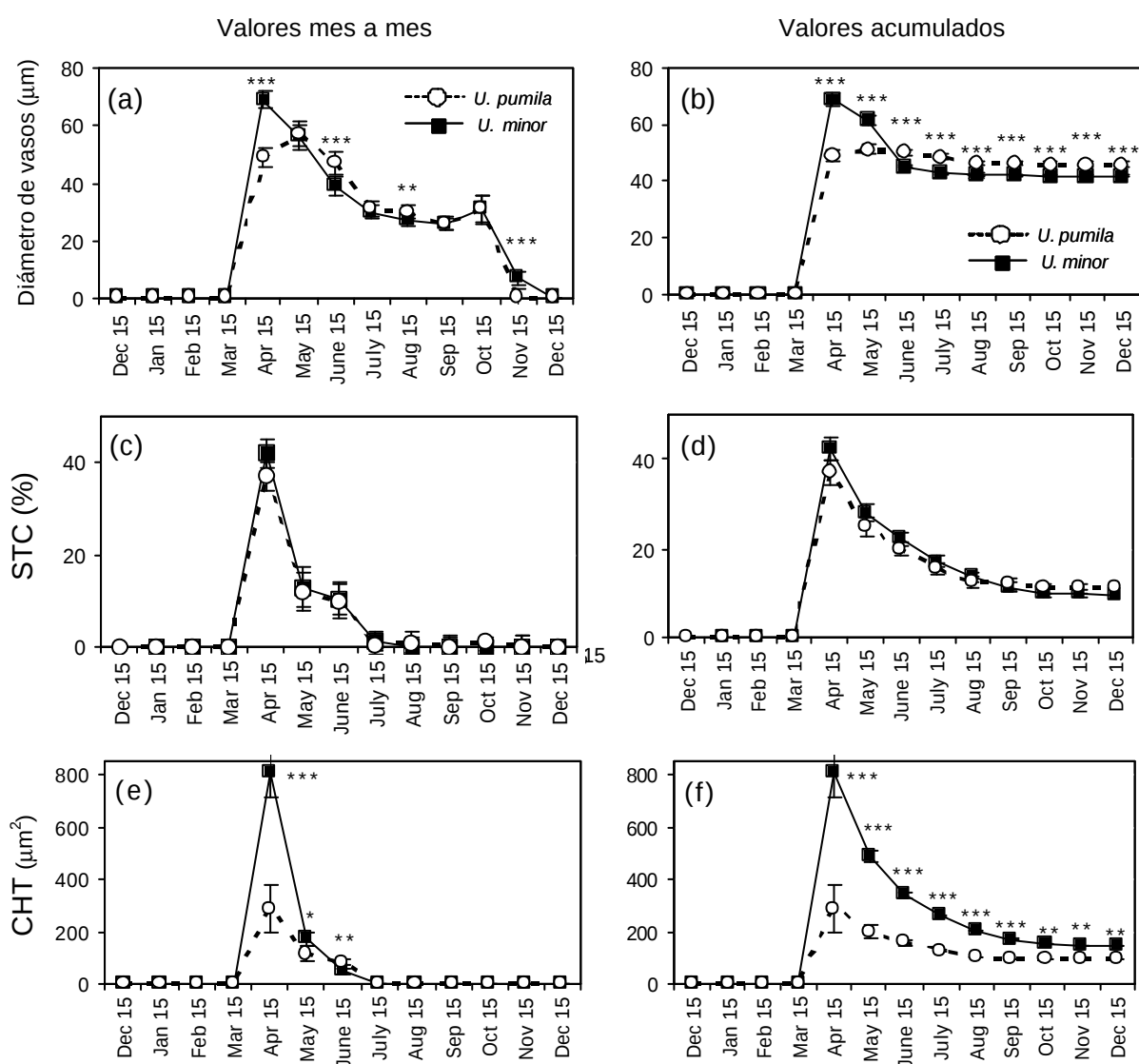


Fig. 18. Medidas tomadas en el xilema de ramas de cuatro años de edad de *Ulmus pumila* y *U. minor* desde el 15 de diciembre de 2000, hasta el 15 de diciembre de 2001: (a) diámetro de vasos; (b) valores acumulados de diámetro de vasos; (c) superficie transversal conductora; (d), valores acumulados; (e) conductividad hidráulica teórica relativa; (f) valores acumulados. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las dos especies para un momento dado del año a $P \leq 0,10$ (*), $P \leq 0,05$ (**), y $P \leq 0,01$ (***), y las barras representan errores estándar.

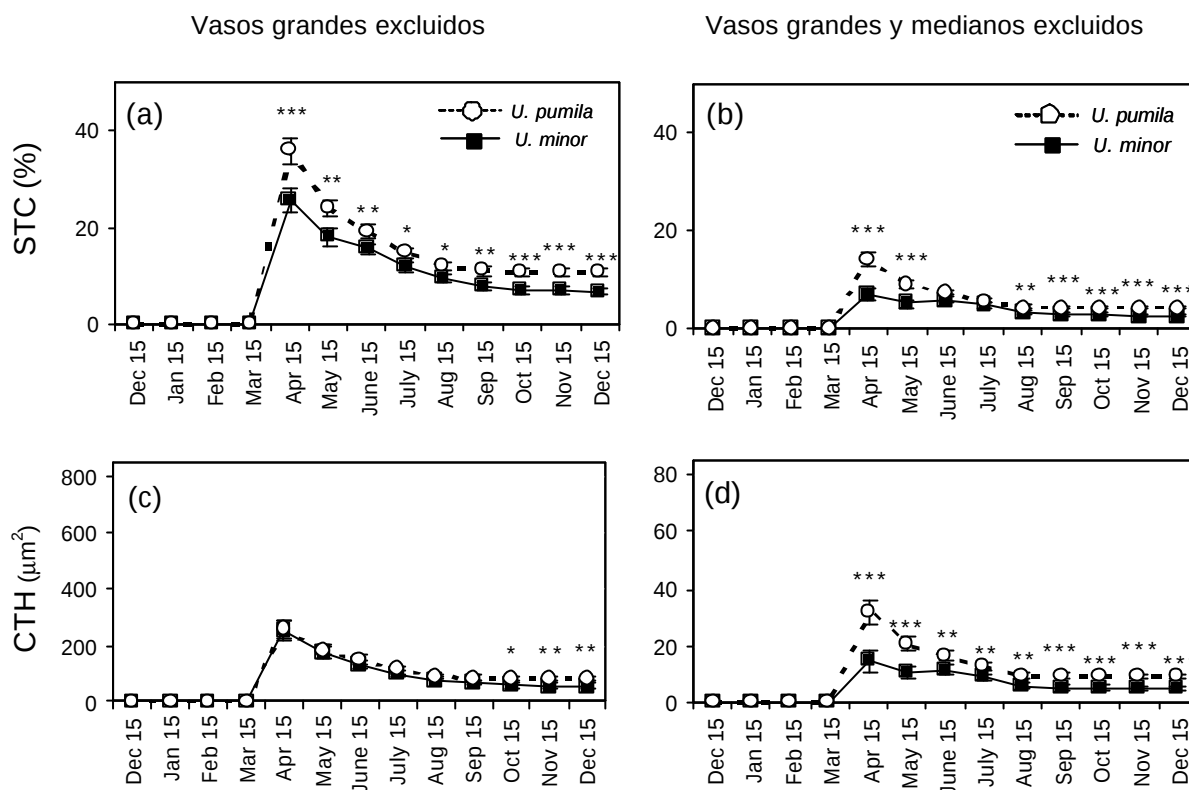


Fig. 19. Medidas tomadas en el xilema de ramas de cuatro años de edad de *Ulmus pumila* y *U. minor* desde el 15 de diciembre de 2000, hasta el 15 de diciembre de 2001 (valores acumulados): (a, b) sección transversal conductora; (c, d) conductancia hidráulica teórica relativa. Asumiendo cavitaciones causadas por *Ophiostoma novo-ulmi*, (a, c) vasos grandes (diámetro > 160 µm), y (b, d) medianos y grandes (diámetro > 80 µm) fueron excluidos de los cálculos. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las dos especies para un momento dado del año a $P \leq 0,10$ (*), $P \leq 0,05$ (**), y $P \leq 0,01$ (***), y las barras representan errores estándar.

La densidad media de vasos en el último anillo de crecimiento fue de $46,3 \pm 3,4$ vasos mm^{-2} (media $\pm$ error estándar) en *U. pumila*, y de $30,5 \pm 2,8$ para *U. minor*. A pesar de la menor densidad de vasos ($P \leq 0,05$), tanto el número de vasos por grupo, como el área transversal por grupo de vasos fueron significativamente mayores para *U. minor* (Tabla 2). Desde el 16 de mayo hasta el 15 de junio, coincidiendo con el máximo de capturas de escolítidos, el área transversal por grupo de vasos fue aproximadamente un 60% mayor para *U. minor*.

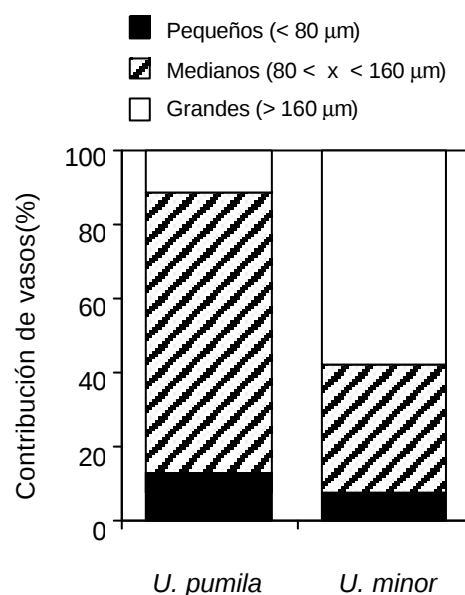


Fig. 20. Contribución de los vasos al flujo de savia basado en el diámetro de vasos en ramas de 4 años de edad de *Ulmus pumila* y *Ulmus minor*.

Tabla 2. Grupos de vasos observados en secciones transversales de ramas de 4 años de edad.

Periodo	<i>Ulmus pumila</i>			<i>Ulmus minor</i>		
	N	Número de vasos por grupo	Area por grupo (μm^2)	N	Número de vasos por grupo	Area por grupo (μm^2)
16 marzo-15 abril	31	2,29 ***	3433 **	19	3,00	9496
16 abril-15 mayo	11	2,27	5228	46	2,50	6110
16 mayo-15 junio	37	2,27	2295 **	296	2,53	3610
16 junio-15 julio	5	2,00	1228	55	2,42	1698
16 julio-15 agosto	17	2,27	973 **	7	2,14	1408
16 agosto-15 sept	1	2,00	761	6	2,16	964
16 sept-15 octubre	0	-	-	1	2,80	1819
Periodo vegetativo	102	2,21 **	1634 ***	430	2,53	3620

Los asteriscos indican diferencias significativas entre las dos especies dentro del mismo periodo a $P \leq 0,05$ (**), y $P \leq 0,01$ (***).

4.3. Cambios químicos en brinzales de *U. minor* en respuesta a la inoculación con *O. novo-ulmi*

En el estudio histoquímico, no se detectaron reacciones positivas de lignina o suberina en las muestras tomadas antes de la inoculación ni en las muestras control. En muestras tomadas después de la inoculación, se observaron reacciones positivas de lignina aproximadamente en el 35% de los árboles. Estas reacciones se apreciaron en las paredes celulares de vasos y células contiguas. En algunos vasos se observaron tilosas, y el protoplasto de algunas células de parénquima mostró una fuerte reacción al fluoroglucinol-HCl (Fig. 21A). Con este método, no se detectaron diferencias notables entre individuos resistentes y susceptibles. Bajo luz ultravioleta, el 75% de las secciones presentaron zonas fluorescentes (Fig 21B), indicativas de suberina, que frecuentemente aparecieron como bandas continuas de células de parénquima axial separando la zona de xilema infectada del cambium vascular. Estas bandas se encontraron aproximadamente en la misma proporción tanto en árboles resistentes como en árboles susceptibles, si bien su espesor radial estuvo comprendido entre 100 y 350 μm en los árboles resistentes, y entre 50 y 150 μm en los susceptibles. En los árboles resistentes, se observó un incremento radial de xilema en el exterior de la banda fluorescente, comprendido entre 300 y 1000 μm (Fig. 21C). Estos incrementos de madera tardía, incluyeron un elevado número de vasos. Por el contrario, en los árboles susceptibles dicho crecimiento radial del xilema estuvo comprendido entre 50 y 400 μm , y presentaba principalmente células de parénquima y fibras (Fig. 21D). Con frecuencia se detectaron tilosas en el lumen de los vasos, las cuales mostraron reacciones positivas de suberina.

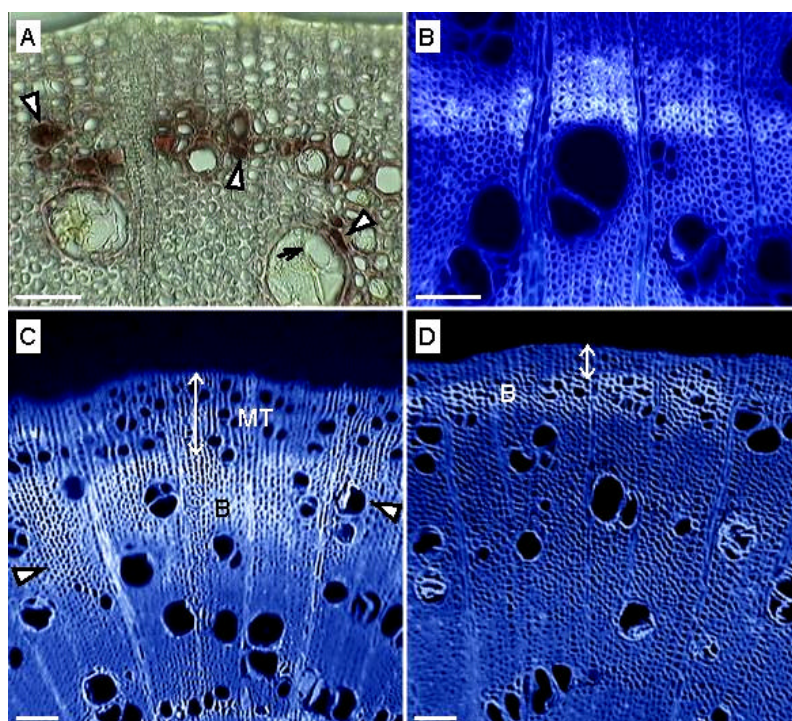


Fig. 21. Secciones transversales de ramillos de *Ulmus minor* mostrando diferentes respuestas a *Ophiostoma novo-ulmi*. Las secciones fueron teñidas con fluoroglucinol-HCl y observadas bajo luz de tungsteno (A) y luz UV (B-D). (A) Tinción de lignina en las paredes de células de parénquima contiguas a vasos infectados. El protoplasto de algunas células de parénquima mostró un contenido opaco teñido de oscuro (triángulos); se observaron tilosas en los vasos (flecha negra). (B) células suberizadas, que destacan por fluorescencia, formando una barrera alrededor de los vasos colonizados. (C, D) Muestras correspondientes a un individuo resistente (C) y otro susceptible. Se aprecia la formación de una banda de madera tardía (MT) relativamente gruesa, en el exterior de una amplia zona de células suberizadas (B entre triángulos) en el individuo más resistente (C), comparado con la escasa formación de madera tardía (flecha vertical) y de banda fluorescente (B) en el individuo susceptible (D). Barra = 100 µm.

Los espectros FT-IR resultaron complejos debido a la superposición de picos. Antes de la inoculación, los tres grupos de muestras (individuos resistentes, susceptibles, y control), mostraron valores similares de absorbancia. Después de la inoculación, el espectro medio de las muestras de los individuos resistentes mostró mayores valores de absorbancia que los espectros medios de los individuos susceptibles y control (Fig. 2 de Anexo 3). El uso del ACP no

permitió diferenciar entre grupos de muestras. Sin embargo, la clasificación de los espectros mediante el AFD permitió discriminar entre las muestras recogidas antes de la inoculación y las obtenidas después de la inoculación. En las primeras no se observó discriminación entre los grupos de muestras, mientras que después de la inoculación se observó una clara separación de los tres grupos (Fig. 22).

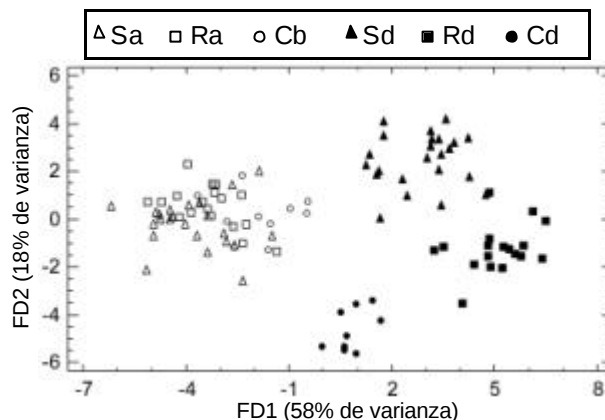


Fig. 22. Gráfico de dispersión de las puntuaciones del AFD de los espectros FT-IR procedentes de muestras de ramillos de *Ulmus minor*. Sa = árboles susceptibles antes de la inoculación; Ra = árboles resistentes antes de la inoculación; Ca = árboles control antes de la inoculación; Sd = árboles susceptibles después de la inoculación; Rd = árboles resistentes después de la inoculación; Cd = árboles control después de la inoculación.

4.4. Cambios químicos en clones resistentes y susceptibles de *Ulmus minor* tras la inoculación con *Ophiostoma novo-ulmi*

Los ramets inoculados con *O. novo-ulmi* mostraron un incremento progresivo de síntomas a lo largo del tiempo. El día 30 tras la inoculación se observaron diferencias entre árboles resistentes y susceptibles, ya que los últimos mostraron sus ramas inoculadas con un 100% de marchitamiento. Los días 60 y 120 tras la inoculación, los individuos susceptibles presentaron los mayores síntomas, que, en el caso de los ramets UPM068 y UPM171, excedieron el 90% de marchitamiento. Los individuos resistentes presentaron marchitamientos por debajo del 25% (Tabla 1 de Anexo 4).

Mediante el ACP se observó una clara separación entre los espectros FT-IR procedentes de árboles control y de árboles inoculados, desde el día 30 hasta el 120 tras la inoculación. Esta separación estuvo principalmente caracterizada por el eje CP1, el cual mostró un gradiente positivo de puntuaciones para árboles control y un gradiente negativo de puntuaciones para árboles inoculados (Fig. 23). En los gráficos de las cargas de CP1, se observó una gran similitud entre los picos correspondientes a los días 30, 60 y 120 tras la inoculación (Fig. 24). Considerando solamente árboles inoculados, el ACP correspondiente al día 15 tras la inoculación mostró una clara separación entre las muestras procedentes de individuos resistentes y de individuos

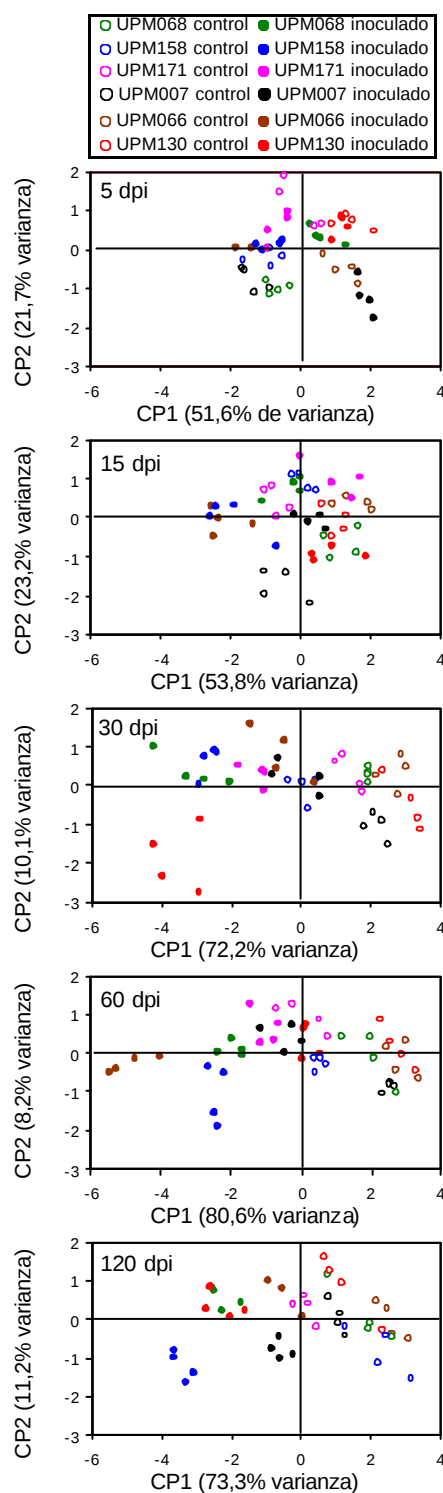


Fig. 23. Gráficos de dispersión de las puntuaciones del ACP de espectros procedentes de muestras de xilema recogidas en los días 5, 15, 30, 60 y 120 posteriores a la inoculación (dpi) en árboles de *Ulmus minor* control e inoculados.

susceptibles (Fig. 25A). En esta ocasión, la separación estuvo caracterizada por el eje CP2, el cual mostró un gradiente positivo de puntuaciones para árboles susceptibles y negativo para árboles resistentes. El gráfico de las cargas de CP2 se muestra en la figura 25B. Es de destacar el pico negativo prominente a 983 cm^{-1} .

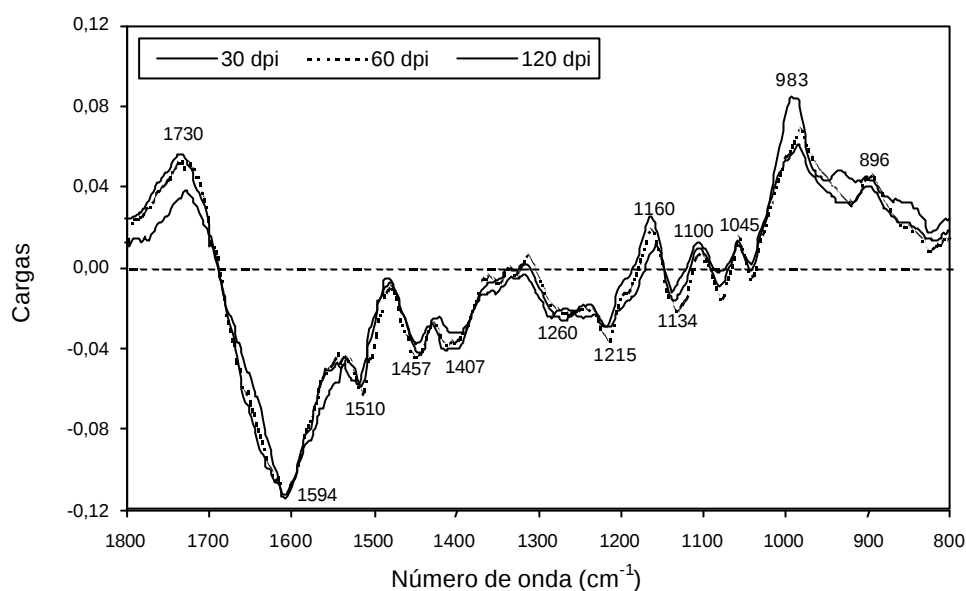


Fig. 24. Gráfico de las cargas de CP1, principal componente de distinción entre espectros FT-IR procedentes de muestras de xilema recogidas en los días 30, 60 y 120 posteriores a la inoculación (dpi) en árboles de *Ulmus minor* control e inoculados (ver Fig. 23)

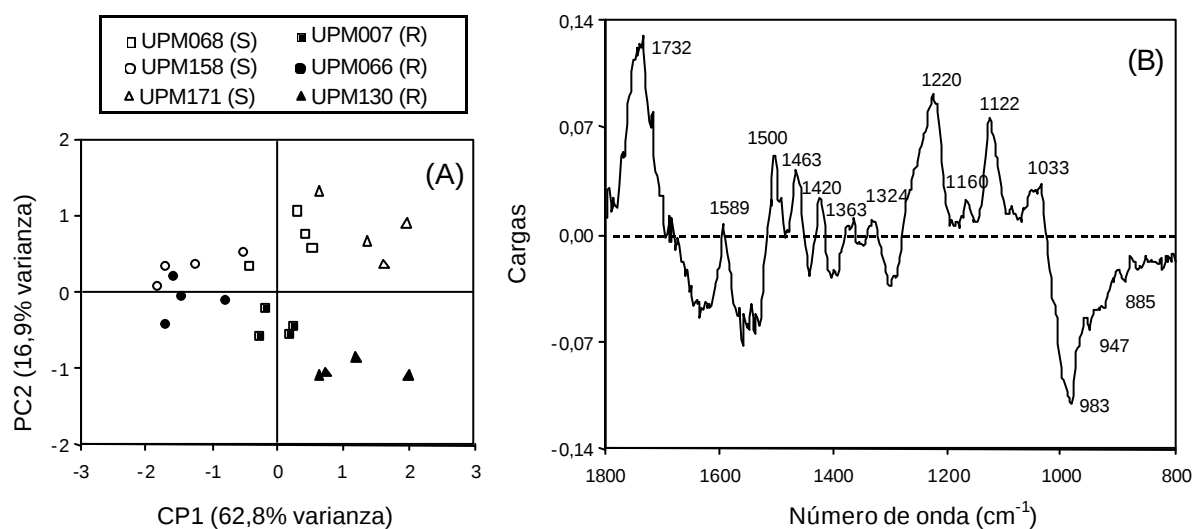


Fig. 25. ACP de los espectros de muestras de xilema recogidas 15 días tras la inoculación en individuos de *Ulmus minor* susceptibles (S) y resistentes (R). **(A)** gráfico de dispersión de puntuaciones CP1-CP2, **(B)** gráfico de las cargas de CP2.

4.5. Marcadores metabólicos de resistencia en olmos sanos

Mediante el ACP no se detectaron diferencias notables en árboles sin inocular entre los espectros FT-IR de los tres grupos (*U. pumila* resistentes, *U. minor* resistentes, y *U. minor* susceptibles), excepto en el día 1 de mayo, que se observó una separación de las muestras de *U. pumila* respecto a los grupos de *U. minor*. El AFD se aplicó entonces en tres de los cuatro ramets de *U. pumila* y en cuatro de los cinco ramets de *U. minor* resistentes y susceptibles. Para validar este análisis, el espectro FT-IR del ramet restante para cada grupo fue proyectado en el AFD, sin el conocimiento *a priori* de qué espectro pertenecía a cada grupo. Para cada grupo de árboles, los espectros proyectados aparecieron cerca de los usados para construir el modelo, sugiriendo que la reproducibilidad del modelo fue alta (Fig. 26). Se observó una clara discriminación entre los tres grupos de árboles en todos los días de muestreo, indicando diferencias metabólicas entre los tres grupos de muestras. La separación entre muestras de *U. pumila* y *U. minor* estuvo principalmente caracterizada por la FD1, la cual mostró un gradiente positivo de puntuaciones en *U. pumila* y negativo en *U. minor*. La separación entre muestras de *U. minor* resistentes y susceptibles estuvo caracterizada por la FD2, que mostró un gradiente positivo de puntuaciones en los individuos resistentes y negativo en los individuos susceptibles.

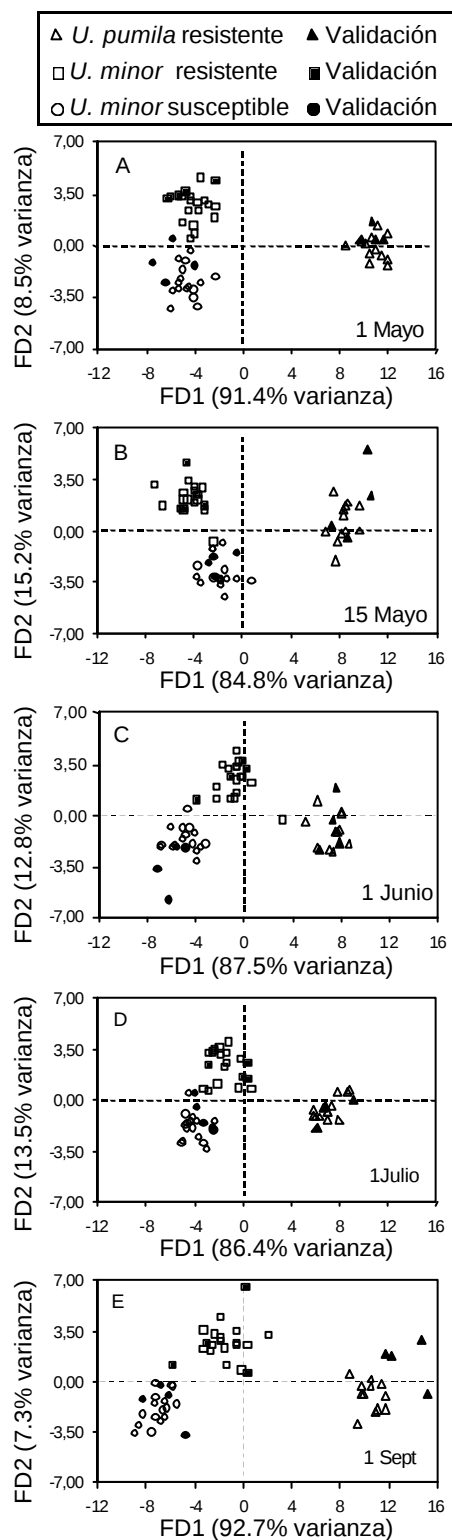


Fig. 26. Gráfico de dispersión de las puntuaciones del AFD de los espectros FT-IR procedentes de muestras de xilema recogidas el 1 de mayo (A), 15 de mayo (B), 1 de junio (C), y 1 de septiembre (E), en cuatro individuos resistentes de *Ulmus pumila*, cinco individuos resistentes de *U. minor*, y cinco individuos susceptibles de *U. minor*.

Con el objetivo de deducir qué partes de los espectros fueron determinantes para discriminar entre grupos de árboles, se estudiaron los gráficos de las cargas de la FD1 y la FD2 (Fig. 27). En estos gráficos, determinados picos aparecieron aproximadamente en el mismo número de onda (inverso de la longitud de onda) para todos los días de muestreo, razón por la cual fueron considerados como los picos discriminatorios más fiables. Estos números de onda se indican y asignan en las Tablas 3 y 4, correspondientes a la discriminación entre muestras de *U. pumila* y *U. minor* (FD1) y de *U. minor* resistentes y susceptibles (FD2), respectivamente.

El día 1 de mayo, el ANOVA sobre las intensidades de los picos espectrales discriminatorios mostró diferencias significativas ($P \leq 0,0001$) entre las dos especies en 10 de las 13 bandas analizadas (Tabla 3). Durante todo el ensayo, las bandas D, F y H, a 1483, 1310 y 1225 cm^{-1} , respectivamente, mostraron diferencias significativas ($P \leq 0,01$) entre especies. El día 1 de junio, se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0,1$) entre *U. minor* resistentes y *U. minor* susceptibles en 9 de las 11 bandas analizadas (Tabla 4). En esta fecha, las bandas que mejor diferenciaron los dos grupos ($P \leq 0,01$) fueron b, j, y k, a 1591, 989 y 930 cm^{-1} , respectivamente. A pesar de la dificultad de deducir el significado bioquímico de estas bandas discriminatorias, en las Tablas 3 y 4 se sugieren varias asignaciones, basadas en bibliografía previa.

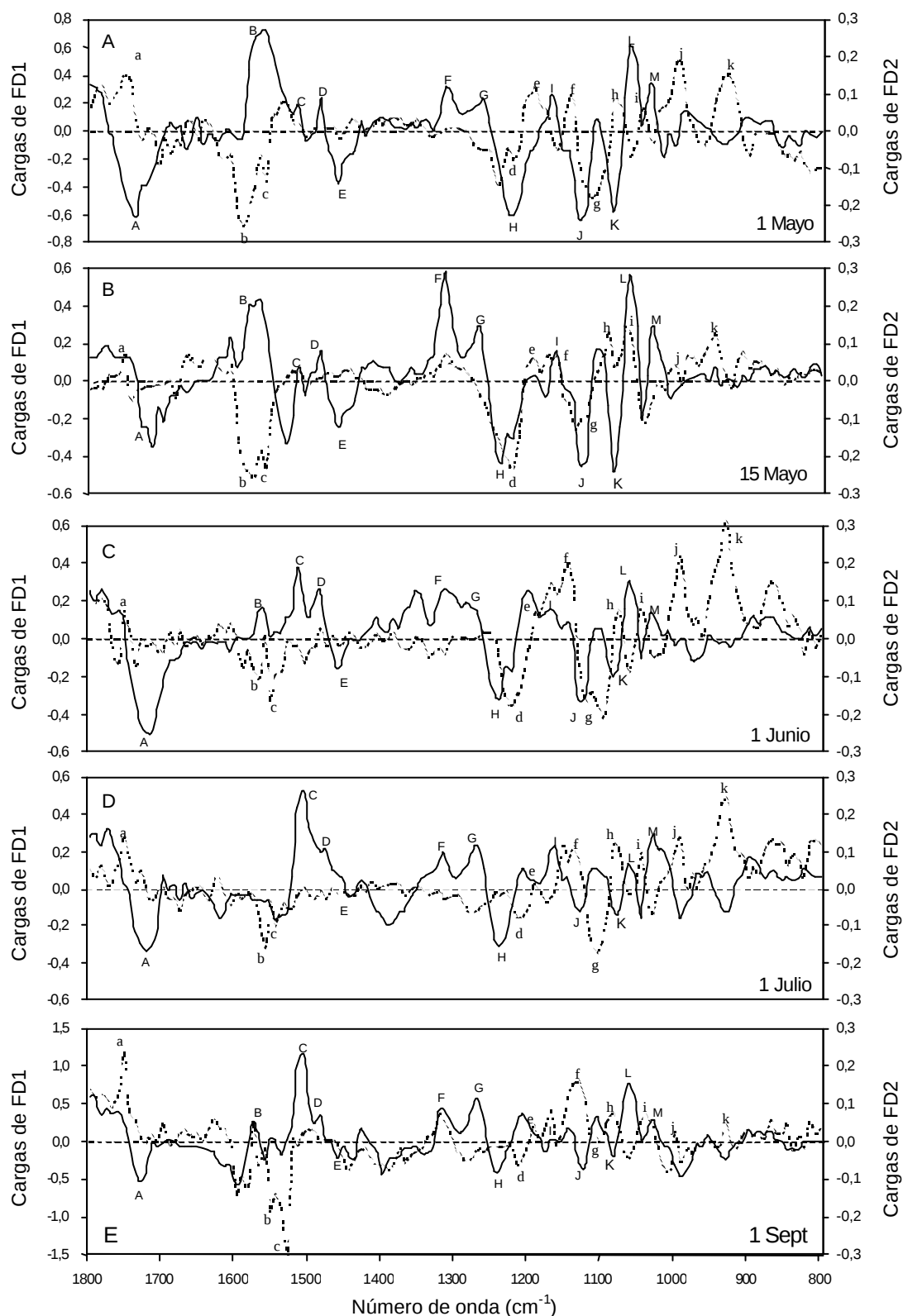


Fig. 27. Gráficos de las cargas de la FD1, principal factor de discriminación entre espectros de *Ulmus pumila* y *U. minor* (líneas continuas), y FD2, principal factor de discriminación entre espectros de individuos resistentes y susceptibles de *U. minor* (líneas discontinuas). Las muestras fueron recogidas el 1 de mayo (A), 15 de mayo (B), 1 de junio (C), 1 de julio (D), y 1 de septiembre (E). Las letras indican los picos de las cargas de la FD1 (letras mayúsculas), y de la FD2 (letras minúsculas) que aparecen aproximadamente en los mismos números de onda para todas las fechas de muestreo. Los números de onda y asignaciones de estos picos se especifican en las Tablas 3 y 4.

Tabla 3. Bandas espectrales discriminatorias entre tejidos de xilema de *Ulmus pumila* y *U. minor*, obtenidas a partir de las cargas de la FD1.

Banda ¹	Número de onda (cm ⁻¹)	Signo cargas de FD1	Nivel de significación ²					Asignación de bandas ³
			1 mayo	15 mayo	1 junio	1 julio	1 sept	
A	1722	-	***	**	***	...	*	C=O tensión en ésteres aromáticos
B	1560	+	***	**	...	...	**	Amida II: N-H deformación y C-N tensión
C	1510	+	...	...	**	*	***	Esqueleto aromático en lignina
D	1483	+	***	***	***	**	***	No determinado
E	1459	-	***	**	...	...	...	C-H deformación en grupos alquilo
F	1310	+	***	***	***	**	*	CH ₂ tensión en celulosa
G	1268	+	***	...	...	**	...	Vibraciones en anillo guayacil
H	1225	-	***	***	***	**	*	Amida III, C-O-H deformación y C-O tensión en compuestos fenólicos, y C-C-O tensión en éster
I	1160	+	...	...	**	***	...	C-O-C vibración en celulosa y C-O tensión en almidón
J	1120	-	***	***	*	...	...	C-O tensión en pectina, xiloglucano y celulosa
K	1078	-	***	***	**	**	...	C-O tensión en arabinogalactano y xiloglucano
L	1058	+	***	**	***	...	***	C-O-C y C-C deformación en celulosa
M	1027	+	*	...	*	***	*	C-O tensión en almidón

¹ En conexión con Figura 27.² Resultados de ANOVA unifactoriales de las absorbancias de los picos espectrales (valores normalizados), situados en los números de onda expuestos, considerando la especie como factor. Los asteriscos indican diferencias significativas a $P \leq 0,01$ (*), $P \leq 0,001$ (**), y $P \leq 0,0001$ (***).³ Referencias bibliográficas: Séné *et al.*, 1994; Chen y McClure, 2000; Kakurakova *et al.*, 2000; Yang y Yeng, 2002; Pavlovic y Brandao, 2003; Pandey y Pitman, 2003; Alonso-Simón *et al.*, 2004.**Tabla 4.** Bandas espectrales discriminatorias entre tejidos de xilema de *U. minor* resistentes y susceptibles, obtenidas a partir de las cargas de la FD2.

Banda ¹	Número de onda (cm ⁻¹)	Signo cargas de FD2	Nivel de significación ²					Asignación de bandas ³
			1 mayo	15 mayo	1 junio	1 julio	1 sept	
a	1745	+	...	**	...	...	***	C=O tensión de éster alquilo
b	1591	-	**	...	***	***	**	Esqueleto aromático en lignina
c	1560	-	...	...	**	**	...	Amida II: N-H deformación y C-N tensión
d	1220	-	**	**	**	*	...	Amida III, C-O-H deformación y C-O tensión en compuestos fenólicos, y C-C-O tensión en éster
e	1190	+	...	...	**	**	*	C-O-H deformación, C-O tensión de compuestos fenólicos y C-C-O tensión en éster
f	1143	+	...	...	*	**	...	C-O tensión en pectina
g	1122	-	**	**	*	...	...	Esqueleto aromático y C-O tensión
h	1082	+	...	...	...	...	...	C-O tensión en almidón
i	1043	+	...	...	...	...	**	C-O tensión en ramnogalacturonano
j	989	+	**	...	***	**	...	C-O tensión en ramnogalacturonano
k	930	+	**	...	***	***	...	C-O tensión en almidón y celulosa

¹ En conexión con Figura 27.² Resultados de ANOVA unifactoriales de las absorbancias de los picos espectrales (valores normalizados), situados en los números de onda expuestos, considerando el grupo de susceptibilidad como factor. Los asteriscos indican diferencias significativas a $P \leq 0,1$ (*), $P \leq 0,05$ (**), y $P \leq 0,01$ (***).³ Referencias bibliográficas: Séné *et al.*, 1994; Kakurakova *et al.*, 2000; Yang y Yeng, 2002; Pavlovic y Brandao, 2003; Pandey y Pitman, 2003.

5. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran una correlación significativa entre la edad de la planta y los niveles de marchitamiento foliar, lo cual confirma diferencias de resistencia entre individuos de diferentes edades en otras especies de olmo (Caroselli y Feldman, 1951; Smalley y Kais, 1966; Shutherland *et al.*, 1997). Destacan los bajos niveles de marchitamiento obtenidos en planta de dos años, que se mantienen en algunos clones durante el tercer año. A diferencia de estos resultados, otros autores han descrito síntomas típicos de grafiosis en brinzales jóvenes cultivados en invernadero (Smalley 1963; Tchernoff, 1965; Sinclair y Brener, 1974; Green *et al.*, 1985). Las comparaciones con trabajos previos deben ser interpretadas con cautela, ya que factores como la especie, las condiciones ambientales, el método de inoculación, la composición del inóculo, o la fecha de inoculación, pueden influir en la expresión de síntomas. Dado que los olmos viven más de 200 años, es difícil generalizar sobre la variación de la susceptibilidad con la edad. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo pueden ser útiles para realizar una selección de olmos resistentes más fiable. Con frecuencia, la selección de individuos resistentes ha implicado el uso de planta de dos y tres años (Wright, 1968; Green *et al.*, 1985). En *U. minor* y *U. minor* × *U. pumila*, los olmos alcanzaron síntomas de marchitamiento máximos a la edad de cuatro años, o coincidentes con los síntomas mostrados a edades superiores. Por tanto, se comprueba la idoneidad de esta edad como la óptima para realizar ensayos de selección de individuos resistentes.

Determinados factores anatómicos juegan un papel importante en la resistencia juvenil. La susceptibilidad baja de las plantas de dos años podría estar relacionada con el diámetro medio menor de vasos de estos ejemplares respecto a los de mayor edad. Se ha sugerido que cuanto menor sea el diámetro del vaso, el bloqueo de su lumen, mediante la producción de tilosas y geles, es más complicado (Elgersma 1970, Sinclair *et al.*, 1975). Ante una infección, individuos con vasos de menor diámetro son capaces de formar tilosas más rápidamente y en mayor número que individuos con vasos de mayor diámetro, dificultando la expansión del patógeno (Elgersma, 1973; Elgersma y Miller, 1977). Por tanto, individuos con vasos pequeños pueden ser más eficaces a la hora de compartimentar al patógeno.

A diferencia del diámetro medio de los vasos y de la CHT, la STC no parece tener relación con la resistencia. Este hecho pone de manifiesto la importancia de considerar la proporción de vasos, en función de su tamaño, dentro del anillo de crecimiento. Un individuo cuya madera temprana estuviera formada por un elevado número de vasos pequeños sería más resistente que un individuo cuya madera temprana estuviera formada por pocos vasos grandes. Sin embargo, su STC podría ser la misma. La alta proporción de vasos de grandes diámetros encontrada en individuos mayores de tres años, en comparación con individuos de menor edad, se tradujo en altos valores de CHT, que pudieron favorecer la difusión pasiva del patógeno.

Los resultados evidencian una clara relación entre el vigor de la planta y los síntomas de marchitamiento, confirmando trabajos previos (Heybroek, 1957; Tchernoff, 1965; Solla y Gil, 2002b). La utilización de un buen sustrato y la correcta fertilización incrementan los síntomas de grafiosis y alargan el periodo de susceptibilidad (Smalley, 1963; Solla y Gil 2003a). Por el contrario, factores que afecten al normal desarrollo de la planta generan resistencia. Estos factores pueden incluir trasplantes (Smalley, 1963; Townsend, 2000), la aplicación de productos químicos (Beckman, 1958; Brener y Beckman, 1968), o el estrés hídrico (Solla y Gil, 2002b). El contenido de agua del suelo determina la disponibilidad de agua para la planta, que a su vez influye en la expansión celular y en el tamaño de los vasos del xilema. Esto ocasiona que el estrés hídrico durante un periodo de tiempo determinado, principalmente a finales de invierno o a principios de primavera, genere resistencia frente a *O. novo-ulmi* (Solla y Gil, 2002b). En el presente trabajo se ha observado que, bajo las mismas condiciones ambientales, los individuos más vigorosos presentan mayores diámetros de los vasos. Esta relación podría explicar, al menos en parte, la mayor susceptibilidad mostrada por árboles vigorosos.

La hipótesis de que olmos con vasos grandes son más susceptibles a la grafiosis debe ser cuidadosamente interpretada. Los resultados obtenidos al comparar la formación del xilema en *U. minor* y *U. pumila* sugieren la necesidad de considerar los cambios estacionales en el tamaño de los vasos. Al comienzo del periodo vegetativo, *U. minor* forma vasos mayores que *U. pumila*, pero a partir del 15 de junio el diámetro medio de los vasos es mayor para el último (Fig.18b). Durante la formación de la madera temprana el riesgo de infección es máximo, ya que coincide con la época de mayor vuelo de escolítidos

(López *et al.*, 2000). En primavera, las condiciones ambientales para el desarrollo del hongo en las cámaras de pupación de los escolítidos son idóneas. Se ha comprobado que más del 50% de los escolítidos que emergen en primavera portan esporas del patógeno, mientras que en verano este porcentaje no llega al 10% (Faccoli y Battisti, 1997). El hecho de que en primavera *U. minor* presente vasos de mayor tamaño que *U. pumila* puede ser una expresión de mayor susceptibilidad en el primero respecto al último.

Los resultados muestran que ante la pérdida de vasos grandes, más vulnerables a la cavitación, *U. pumila* mantiene valores de STC y CHT mayores que *U. minor*. Estos parámetros determinan la cantidad de agua que un árbol puede suministrar a la copa, lo cual se verá reflejado en el marchitamiento foliar. Si se asume que las primeras cavitaciones por grafiosis se producen en los vasos de mayor tamaño (Tyree y Zimmermann, 2002), al igual que ocurre en situaciones de estrés hídrico o de heladas (Gorsuch y Oberbauer, 2002), tanto STC como CHT disminuyen en mayor medida en *U. minor* durante todo el periodo vegetativo. Por otra parte, y dado que la colonización lateral de *O. novo-ulmi* se realiza mediante la penetración directa del hongo de un vaso a otro, el mayor número de vasos por grupo y el mayor área por grupo en *U. minor* puede explicar su mayor grado de susceptibilidad.

En relación al análisis histoquímico realizado sobre secciones transversales de ramillos de olmos inoculados, el contenido opaco encontrado en células de parénquima y fibras alrededor de vasos infectados indica una respuesta del árbol a la infección, probablemente relacionada con la producción de compuestos fenólicos (Ouellette y Rioux, 1992). Las tilosas suberizadas presentes en los vasos, pudieron dificultar la difusión de esporas y favorecer la acumulación de compuestos fungitóxicos en los vasos infectados. Asimismo, estas tilosas pudieron desempeñar un papel importante en el mantenimiento de la funcionalidad del xilema, previniendo el acceso de aire y la extensión de las cavitaciones (Pearce, 1996). Las bandas de células suberizadas corresponden a la denominada barrera de tipo 4, descrita por Shigo y Marx (1977). Esta barrera es la más firme y duradera de las barreras de compartimentación. La componen células formadas por el cambium que constituyen barreras homogéneas en su estructura, en lugar de ser formadas a partir de tejidos ya diferenciados con diversos tipos de células, como ocurre en las barreras 1-3. Esta barrera protege los tejidos de xilema formados más recientemente y las células cambiales,

ambos de importancia vital para la supervivencia del olmo. En árboles susceptibles apenas se observó la formación de madera tardía tras la barrera de células suberizadas, a diferencia de árboles resistentes, confirmando trabajos previos con otras especies de olmo (Shigo y Tippet, 1981; Bonsen *et al.* 1985; Ouellette y Rioux, 1992).

El uso de espectroscopía FT-IR, en combinación con técnicas de análisis multivariante, ha permitido detectar cambios metabólicos en tejidos de xilema de *U. minor* inoculados con *O. novo-ulmi*. En la figura 23, la posición de los grupos de muestras (árboles inoculados y árboles control) respecto al eje CP1, junto con los picos observados en el gráfico de las cargas de λ CP1 (Fig. 24), sugiere que los árboles inoculados presentaron niveles más reducidos de almidón (983 cm^{-1}), celulosa (896 , 1045 y 1160 cm^{-1}), hemicelulosa (896 y 1045 cm^{-1}) y pectina (896 , 1045 y 1100 cm^{-1}), y niveles elevados de compuestos fenólicos (1215 , 1260 , 1510 y 1594 cm^{-1}) respecto a los árboles control (asignaciones de bandas especificadas en Tabla 2 de Anexo 4). La aplicación del método del yodo (I_2/KI) para la detección de almidón en los tejidos (Jensen, 1962) confirmó un menor contenido de almidón en árboles inoculados respecto a árboles control (Fig. 28). La reducción en los niveles de polisacáridos puede deberse a la degradación de estos compuestos por parte del hongo. Diversas enzimas de degradación de la pared celular, tales como poligalacturonasas, xilanasas, pectinasas o glucosidasas, han sido descritas como participantes en el proceso de colonización del hospedante por parte del hongo (Biehn y Dimond, 1971; Binz y Canevascini, 1996; Binz *et al.*, 1997). En un estudio con microscopía electrónica de barrido se observó que *O. ulmi* causa importantes erosiones en las paredes celulares de los vasos (Scheffer y Elgersma, 1982).

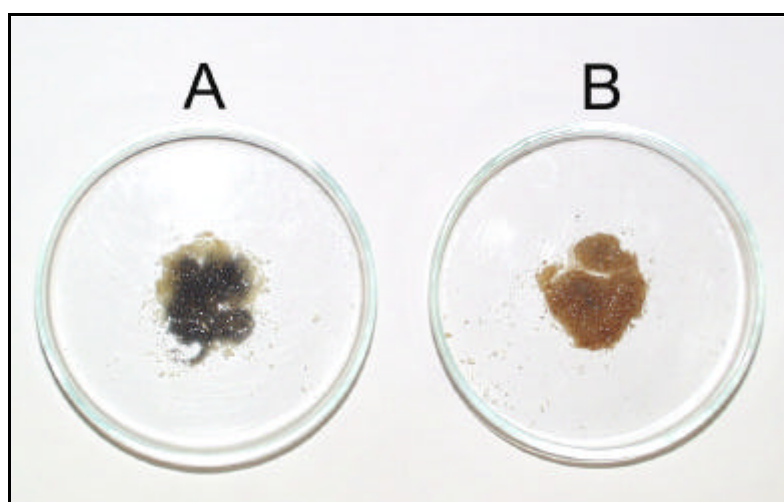


Fig. 28. Método del yodo (I_2/KI) para detectar almidón en tejidos de xilema de un árbol control (**A**) y de un árbol inoculado con *Ophiostoma novo-ulmi* (**B**). Se aprecia un mayor contenido de almidón en el árbol control (tejidos teñidos de azul oscuro). Las muestras proceden de ramillos de tres savias del clon UPM068, tomadas en el día 30 tras la inoculación.

La reducción en los niveles de almidón, a medida que progresó la infección, pudo estar relacionada con la degradación de células de parénquima por parte del hongo o con la energía probablemente requerida para la activación de los mecanismos de defensa del árbol (Shigo y Tippet, 1981). La activación de estos mecanismos de defensa pudo contribuir a los mayores niveles de lignina y otros compuestos fenólicos detectados en árboles inoculados respecto a árboles control. El pico negativo a 1457 cm^{-1} observado en el gráfico de las cargas de la CP1, sugiere la acumulación de compuestos alifáticos en los árboles inoculados. Con el objetivo de verificar esta hipótesis, la evolución temporal de la absorbancia a 1457 cm^{-1} , y a 2920 cm^{-1} (grupos C-H alquilo) fue estudiada. Desde el día 30 hasta el 120 tras la inoculación, ambas bandas se incrementaron en árboles inoculados respecto a árboles control (Fig. 29). La acumulación de compuestos alifáticos en árboles inoculados podría estar relacionada con la suberización del xilema, anteriormente observada mediante técnicas histoquímicas. La suberina es un polímero lipídico compuesto por cadenas largas de monómeros alifáticos asociados con cantidades significativas de compuestos fenólicos (Rocha *et al.*, 2001; Graça y Pereira, 2004).

Destaca la diferencia encontrada en el ACP entre individuos inoculados resistentes e individuos inoculados susceptibles, 15 días después de la inoculación (Fig. 25). El pico prominente a 983 cm^{-1} , detectado en el gráfico de las cargas de la CP2, sugiere una mayor proporción de almidón en árboles resistentes. Esto podría estar relacionado con una mayor degradación de almidón directamente por la acción del hongo, o con una menor disponibilidad energética para la activación de mecanismos de defensa, en árboles susceptibles. La escasez de reservas de almidón en células de parénquima en árboles sometidos a estrés ha sido asociada con un aumento de susceptibilidad a patógenos, tales como *Armillaria* spp. (Wargo, 1972). En los olmos, la disponibilidad de reservas energéticas, principalmente determinada por la cantidad de almidón presente en los tejidos, se ha propuesto como posible explicación de la mayor formación de zonas de barrera en el tronco y ramas gruesas, en comparación con ramillos anuales y ramas pequeñas (Shigo y Tippet, 1981; Bonsen *et al.*, 1985), y puede ser un factor determinante para sobrevivir a infecciones en años sucesivos (Shigo *et al.*, 1986).

En los ciclos de mejora, la selección de olmos resistentes implica inocular miles de árboles todos los años con esporas del patógeno (Solla *et al.*, 2005). Como consecuencia de la

resistencia juvenil, los olmos no pueden ser inoculados a edades tempranas, ocasionando que los ciclos sean largos y costosos. Diversos estudios han tratado de buscar marcadores de resistencia anatómicos, fisiológicos o químicos para su posible uso como técnicas alternativas de selección de individuos resistentes. En este sentido se ha estudiado la producción de fitoalexinas (Overeem y Elgersma, 1970; Duchesne *et al.*, 1985), la magnitud del oscurecimiento del cambium tras una inoculación (Smalley *et al.*, 1982), la actividad de la enzima fenilalanina amonio-liasa en cultivos de células de olmo (Díez y Gil, 1998), la conductancia estomática y la conductividad foliar específica (Solla *et al.*,

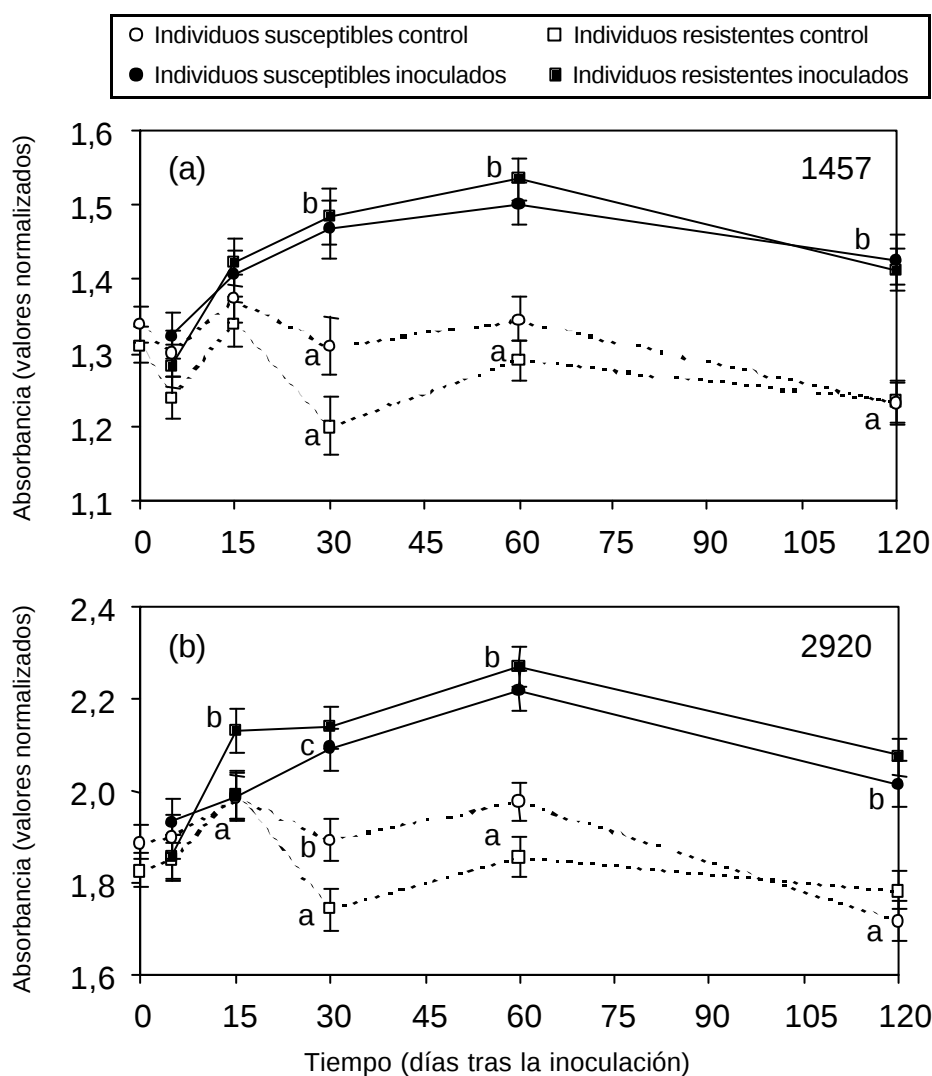


Fig. 29. Evolución temporal de las absorbancias medias de los espectros (valores normalizados) a 1457 cm^{-1} (a), y 2920 cm^{-1} (b), procedentes de muestras de xilema tomadas en individuos resistentes y susceptibles de *Ulmus minor*. Letras diferentes indican diferencias entre grupos de árboles ($P < 0,05$) y las barras indican los límites de confianza al 95%.

2001), o la proporción de vasos grandes en la madera temprana (Solla y Gil, 2002a). Sin embargo, el uso de estas técnicas suele presentar dificultades a la hora de obtener resultados concluyentes, bien por ser demasiado laboriosas para ser aplicadas en los ciclos de mejora, o bien porque la carencia de clones resistentes en los ensayos impide obtener relaciones claras entre el parámetro de estudio y la resistencia.

La importancia de la disponibilidad de clones resistentes en los ensayos ha sido evidenciada en el presente trabajo. Al utilizar material no caracterizado (brinzales procedentes de semillas de polinización abierta), no se detectaron diferencias entre los diferentes grupos de susceptibilidad en muestras de olmos tomadas antes de la inoculación (Fig. 22). Estas diferencias se mostraron significativas al utilizar clones de resistencia contrastada (Fig. 26). En el primer caso, los grupos de resistencia se crearon a partir de los marchitamientos mostrados tras inocular los brinzales con una baja concentración de esporas y, por tanto, el nivel de resistencia de estos brinzales no es comparable al de los clones utilizados en el segundo caso. El hecho de que en el ensayo con brinzales fuera posible discriminar entre grupos de resistencia después de la inoculación, sugiere cambios metabólicos diferentes según el nivel de resistencia de la planta.

Los resultados obtenidos muestran el potencial de la espectroscopia FT-IR para identificar marcadores de resistencia. Estos marcadores podrían ser aplicados para la selección precoz de árboles resistentes, si bien sería necesario validar el modelo con un mayor número de réplicas. Los marcadores de resistencia en olmos sanos serían de especial utilidad, ya que evitarían la destrucción de miles de olmos al año debido a las inoculaciones. Considerando las diferencias químicas encontradas en árboles sanos entre *U. pumila* y *U. minor* (Fig. 26, Tabla 3), la posición de los grupos de muestras respecto al eje FD1 sugiere que los tejidos de xilema de *U. pumila* presentaron niveles elevados de lignina y almidón, y niveles reducidos de ésteres y hemicelulosas, respecto a los tejidos de *U. minor*. En el gráfico de las cargas de FD1 (Fig. 27), el hecho de que tres picos positivos sean característicos de vibraciones de celulosa (1310, 1160, y 1058 cm^{-1} , bandas F, I, y L, respectivamente) indica que las muestras de *U. pumila* presentaron mayores niveles de celulosa respecto a las muestras de *U. minor*. En relación al ANOVA de los picos espectrales más discriminatorios, destaca que el mayor número de diferencias entre las dos especies ($P =$

0,0001) se observara el 1 de mayo, época de mayor susceptibilidad de los olmos a la grafiosis.

El origen de los hongos de la grafiosis es desconocido, aunque China ha sido considerada tradicionalmente como el centro de origen (Horsfall y Cowling, 1978). Esta hipótesis se basa principalmente en dos líneas de evidencia. En primer lugar, el nivel relativamente alto de resistencia a la enfermedad de especies chinas, tales como *U. pumila* y *U. parvifolia* Jacq. (Heybroek, 1981), sugiere una coevolución entre patógeno y hospedante en la región. En segundo lugar, la alta diversidad de olmos en China (Heybroek, 1981) indica que esta región es el centro genético de *Ulmus*, y, en consecuencia, de muchas de sus enfermedades. No obstante, en las prospecciones realizadas allí en 1986 no se logró aislar ninguna cepa de grafiosis (Brasier, 1990). Tampoco se encontró ninguna especie del género *Ophiostoma* asociada a los coleópteros perforadores de los olmos inspeccionados (Brasier y Kirk, 1993). Estos hechos, unidos a la susceptibilidad de algunos olmos chinos, tales como *U. japonica* Sarg, *U. bergmaniana* Schneid., y *U. laciniata* (Trautv.) Mayr (Heybroek, 1981), cuestionan el posible origen chino de la grafiosis. Smalley *et al.* (1993) sugirieron que la resistencia de los olmos asiáticos puede ser resultado de su coevolución como hospedantes de los escolítidos, ya que Eurasia constituye el centro genético de las 47 especies paleárticas del género *Scolytus*. Entre estas especies, 24 tienen al olmo como hospedante principal y, de ellas, 8 lo tienen como exclusivo (Michalski, 1973). De esta manera, la resistencia pudo haberse desarrollado como resultado de mecanismos de defensa inducidos ante esporas de cualquier microorganismo depositadas en las cámaras de pupación o en las heridas de alimentación de los escolítidos. Es relevante la gran vinculación del género *Scolytus* a los olmos, que sólo en la Península Ibérica está representado por las especies *S. scolytus* (F.), *S. multistriatus* (Marsh.), *S. kirschii* Skal., *S. laevis* Chap., y *S. pygmaeus* (F.). Otro posible origen de la resistencia de *U. pumila* sería el desarrollo de caracteres anatómicos o fisiológicos como consecuencia de adaptaciones ambientales (Brasier, 1990). *U. pumila*, nativo de la estepa y de los desiertos del Gobi y de Tarim, puede tolerar tanto condiciones de sequía como duras heladas (Heybroek, 1979). Probablemente, las variaciones estacionales en la formación de los vasos observadas en el presente trabajo estén relacionadas con una mayor seguridad de conducción ante situaciones de estrés, lo que a su vez contribuye al mayor grado de resistencia de esta especie. De igual modo, la distinta composición química entre *U. pumila* y *U. minor* pudo haberse originado a partir

de adaptaciones ecológicas diferentes, las cuales indirectamente podrían contribuir al diferente grado de resistencia de estas dos especies a la grafiosis. Individuos de *Quercus ilex* L. cultivados en ambiente seco o bajo estrés hídrico presentan mayores niveles de almidón en sus ramillos en relación a individuos de la misma especie cultivados en ambientes más favorables (Bussoti *et al.*, 2002). De la misma manera, la disponibilidad de altas reservas de carbohidratos, principalmente azúcares solubles y almidón, se ha propuesto como posible explicación de la tolerancia de *Picea rubens* Sarg. a diversos tipos de estrés ambiental (Amundson *et al.*, 1993). El mayor contenido de almidón en *U. pumila* respecto a *U. minor* podría estar también relacionado con adaptaciones a situaciones de estrés que, como se explicó anteriormente, podrían influir en su mayor grado de resistencia a la grafiosis. La interpretación del contenido de celulosa y lignina en términos de adaptaciones ecológicas y de resistencia a la enfermedad es más complejo. En las plantas, la lignina, es la forma más abundante de carbono aromático, que protege a los polisacáridos de la madera de ataques enzimáticos (Griffin, 1994). De hecho, la lignina es uno de los compuestos que más frecuentemente han sido detectados en las zonas de barrera de los olmos, formadas ante el avance de la enfermedad. Es probable que mayores niveles de lignina en las paredes celulares pudieran conferir al xilema una mayor resistencia a la degradación y, en consecuencia, a la expansión del patógeno. Estas interpretaciones requerirán de trabajos más específicos.

En relación con las diferencias entre los dos grupos de susceptibilidad de *U. minor* (Figs. 26 y 27, Tabla 4), la posición de los grupos respecto del eje FD2 sugiere que las muestras de árboles resistentes presentaron niveles elevados de almidón, celulosa y pectina, y niveles reducidos de lignina, respecto a muestras de árboles susceptibles. De nuevo, el contenido de almidón y celulosa está relacionado con la resistencia del árbol. Las vibraciones atribuibles a pectina (1745 , 1143 , 1043 y 989 cm^{-1}) también contribuyeron a la discriminación entre grupos de susceptibilidad. Las variaciones en la composición de pectina han sido asociadas con la resistencia del trigo a *Puccinia graminis* Pers. (Vorwerk *et al.*, 2004). Las enzimas de degradación de la pectina parecen jugar un papel importante en la colonización de las plantas por parte de patógenos, incluyendo *O. novo-ulmi* (Ouellette *et al.*, 2004). Los oligosacáridos producidos como resultado de la degradación de la pectina se han propuesto como responsables de la obstrucción del flujo de savia en árboles infectados por grafiosis (Svaldi y Elgersma, 1982). Cabe la posibilidad de que

estos productos de degradación pudieran actuar como moléculas de señal para la activación de los mecanismos de defensa, como ha sido sugerido en otros patosistemas (Ridley *et al.*, 2001; Shibuya y Minami, 2001).

El presente trabajo evidencia la implicación de una serie de factores anatómicos y químicos en la resistencia de *U. minor* a *O. novo-ulmi*. Estos factores probablemente sean más eficaces en la restricción de la enfermedad si actúan de forma complementaria. Factores anatómicos, tales como el diámetro de los vasos o el tamaño de los grupos de vasos, constituyen una primera línea de defensa. Tras la infección, la activación de mecanismos de defensa inducidos, formando barreras anatómicas o químicas ante el avance de la enfermedad, constituyen una segunda línea de defensa. A su vez, las reservas energéticas del árbol, determinadas por la cantidad de almidón en sus tejidos, o la composición química de las paredes celulares, parecen influir en la capacidad del árbol para sobrevivir a la infección. Factores de tipo ambiental, no contemplados en el presente trabajo, también pueden condicionar la resistencia. Con temperaturas del aire por encima de 17° C bajo una exposición solar moderada (de 5 a 7 horas) se han observado síntomas severos, mientras que con una exposición solar alta (> 7,5 horas de insolación) a cualquier temperatura, o con una exposición baja (< 4,5 horas de insolación) y temperaturas más frías (< 15,5° C) se han observado síntomas menores (Sutherland *et al.*, 1997). La supervivencia de algunas olmedas, dentro de áreas totalmente devastadas por la enfermedad, puede estar relacionada con factores de tipo ambiental. Tal es el caso de la olmeda ibérica de *U. minor*, probablemente mejor conservada, y ubicada en Rivas-Vaciamadrid, Madrid. Una caracterización genética de sus pies reveló que la mayoría son un único clon susceptible (*U. minor* var. *vulgaris*), ampliamente distribuido en otras localidades de España y del Reino Unido (Gil *et al.*, 2004). En esta olmeda se ha confirmado la presencia de *O. ulmi* y *O. novo-ulmi* (Solla *et al.*, 2006), pero la progresión de la enfermedad es anormalmente lenta. La presencia de *O. ulmi* en la olmeda probablemente ralentiza la tasa de mortalidad e induce resistencia a los olmos que son luego infectados por *O. novo-ulmi* (Hubbes y Jeng, 1981). Por otra parte, el intenso uso ganadero de esta olmeda desde, al menos, el siglo XVIII (Martín y Gil, 2003) ha llevado a la utilización continuada de productos químicos desinfectantes que posiblemente afecten al crecimiento y metabolismo de los olmos, pudiendo generar resistencia. Recientemente se

ha iniciado una nueva línea de investigación con el objeto de evaluar el posible efecto protector de este tipo de productos ante la grafiosis.

La espectroscopia FT-IR, unida al análisis multivariante, ha resultado de gran utilidad para la distinción entre grupos de árboles de acuerdo su nivel de resistencia, si bien no es capaz de cuantificar los componentes del xilema. En futuras investigaciones sería deseable la aplicación de otras técnicas de análisis químico, tales como la espectrometría de masa o la resonancia magnética nuclear, para complementar y reforzar los resultados aquí obtenidos. Un mejor conocimiento de los factores implicados en la resistencia de los olmos a la grafiosis permitiría profundizar en trabajos que impliquen, por ejemplo, el desarrollo de técnicas de selección precoz de individuos resistentes, el desarrollo de nuevos métodos de control mediante la manipulación de los mecanismos de resistencia, o la identificación de genes de resistencia.

6. CONCLUSIONES

- La susceptibilidad de *Ulmus minor* a la grafiosis es máxima a la edad de cuatro años. Plantas de dos y, en ocasiones tres años, muestran resistencia juvenil. A partir de los cuatro años la susceptibilidad se estabiliza o decrece, si bien la edad máxima estudiada fue de siete años. En consecuencia, se comprueba que la edad de cuatro años es la idónea para evaluar la susceptibilidad en los trabajos de selección de individuos resistentes.
- Existe una relación directa y significativa entre la variación de la susceptibilidad con la edad, la variación del diámetro medio de los vasos y la conductancia hidráulica teórica, de la madera temprana.
- *U. minor* forma vasos de mayores diámetros que *U. pumila* al comienzo del periodo vegetativo, coincidiendo con el máximo vuelo de escolítidos, pero a partir del 15 de junio los diámetros de los vasos son mayores en *U. pumila*. En la mayor parte del año, el número de vasos por grupo, el área transversal por grupo de vasos, y la conductancia hidráulica teórica es mayor en *U. minor* que en *U. pumila*. Estos factores pueden contribuir al diferente grado de susceptibilidad de estas dos especies a *Ophiostoma novo-ulmi*.
- El uso de espectroscopía de infrarrojo de transformada de Fourier (FT-IR), junto con técnicas de análisis multivariante, es capaz de discriminar perfiles metabólicos de olmos de acuerdo a su susceptibilidad a *O. novo-ulmi*. El uso de esta u otras técnicas de análisis metabólico pueden ser de utilidad en la identificación de marcadores de resistencia y en el desarrollo de técnicas de selección precoz de individuos resistentes.
- A partir del día 30 días tras la inoculación de *U. minor* con *O. novo-ulmi* se encontraron diferencias químicas entre tejidos de xilema sanos e infectados. Los resultados sugieren que los tejidos infectados presentan niveles reducidos de polisacáridos (almidón, celulosa, hemicelulosa y pectina) y niveles

elevados de compuestos fenólicos, respecto a los tejidos de xilema no infectados.

- A los 15 días tras la inoculación con *O. novo-ulmi*, es posible distinguir químicamente tejidos de xilema infectados de clones de *U. minor* resistentes y susceptibles. Los resultados sugieren que los clones resistentes presentan mayores niveles de almidón que los clones susceptibles.
- Considerando tejidos sanos de xilema, se encontraron diferencias químicas entre *U. pumila* y *U. minor*, así como entre individuos resistentes y susceptibles de *U. minor*. Los resultados sugieren que *U. pumila* contiene niveles elevados de almidón, celulosa y lignina, en relación con *U. minor*, mientras que individuos resistentes de *U. minor* presentan niveles elevados de almidón, celulosa y pectina, en relación a individuos susceptibles de la misma especie.

CONCLUSIONS

- *Ulmus minor* shows its maximum susceptibility level at 4 years of age. Two and, in some cases, 3 year-old plants show juvenile resistance. Starting from 4 years of age, susceptibility stabilizes or falls, although the oldest plants were 7 years old. Consequently, the optimal age for screening *U. minor* resistance is 4 year-old plants.
- A direct and significant relationship between the changes in susceptibility with age, the changes in mean vessel diameter, and the theoretical hydraulic conductance in the earlywood was observed.
- At the beginning of the season, coinciding with a peak of captured beetles, *U. minor* forms larger vessels than *U. pumila* but up to June 15, vessels were larger for *U. pumila*. The number of vessels per group, the transversal area per vessel group, and the mean theoretical hydraulic conductances were significantly higher for *U. minor* on most dates. These factors could contribute to the different susceptibility degree of these two species to *Ophiostoma novo-ulmi*.
- The use of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy, coupled with multivariate data analysis techniques, is able to discriminate metabolic profiles of elms according to their susceptibility level to *O. novo-ulmi*. The use of this or other metabolomic techniques can be useful for the identification of resistance markers and for the development of early screening techniques of resistant elms.
- Starting from the day 30 after inoculation with *O. novo-ulmi*, chemical differences between healthy and infected xylem tissues of *U. minor* were found. The results suggest that infected tissues contain reduced levels of polysaccharides (starch, cellulose, hemicellulose, and pectin) and enhanced levels of phenolic compounds, with respect to healthy xylem tissues.

- On day 15 after inoculation with *O. novo-ulmi*, it is possible to distinguish the chemical composition of infected elm xylem tissues from resistant and susceptible *U. minor* clones. The results suggest that resistant clones present higher starch levels than susceptible clones
- Considering healthy xylem tissues, chemical differences between *U. pumila* and *U. minor* were found, as well as between resistant and susceptible *U. minor* trees. The results suggest that *U. pumila* contains enhanced levels of starch, cellulose, and lignin, with respect to *U. minor*, while resistant *U. minor* trees contain enhanced levels of starch, cellulose and pectin, with respect to susceptible individuals of the same species.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso-Simón A., Encina A.E., García-Angulo P., Álvarez J.M., Acebes J.L., 2004. FT-IR spectroscopy monitoring of cell wall modifications during the habituation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) callus cultures to dichlobenil. *Plant Sci.* **167**:1273-1281.
- Amundson R.G., Kohut R.J., Laurence J.A., Fellows S., Colavito L.J., 1993. Moderate water stress alters carbohydrate content and cold tolerance of red spruce foliage. *Environ. Exp. Bot.* **33**: 383-390.
- Barros A.S., 1999. Contribution à la sélection et la comparaison de variables caractéristiques. Ph. D. Thesis, Institut National Agronomique Paris-Grignon, Ch. 1.
- Beckman C.H., 1958. Growth inhibition as a mechanism in Dutch elm disease therapy. *Phytopathology.* **48**: 172-176.
- Biehn W.L., Dimond A.E., 1971. Effect of pectin source and sugars on polygalacturonase production by *Ceratocystis ulmi*. *Phytopathology* **61**: 745-746.
- Biggs A.R., 1985. Suberized boundary zones and the chronology of wound response in tree bark. *Phytopathology* **75**: 1191-1195.
- Binz T., Canevascini G., 1996. Xylanases from the Dutch elm disease pathogens *Ophiostoma ulmi* and *Ophiostoma novo-ulmi*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **49**: 159-175.
- Binz T., Gremaud C., Canevascini G., 1997. Production and purification of an extracellular beta-galactosidase from the Dutch elm disease fungus *Ophiostoma novo-ulmi*. *Can. J. Microbiol.* **43**: 1011-1016.
- Bonsen K.J.M., Scheffer R.J., Elgersma D.M., 1985. Barrier zone formation as a resistance mechanism of elms to Dutch elm disease. *IAWA J.* **6**: 71-77.
- Brasier C.M., 1990. China and the origins of Dutch elm disease: an appraisal. *Plant Pathol.* **39**: 5-16.
- Brasier C.M., 2000. Intercontinental spread and continuing evolution of the Dutch elm disease pathogens. En: *The Elms: Breeding, Conservation and Disease Management* (ed. Dunn C.P.), Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 61-72.
- Brasier C.M., Kirk S.A., 1993. Sibling species within *Ophiostoma piceae*. *Micol. Res.* **97**: 811-816.

- 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.
- Burón M., Díez J., Gil L., 2003. Propagación vegetativa de los olmos. En: Los Olmos Ibéricos. Conservación y Mejora Frente a la Grafiosis, (ed. Gil, L., Solla, A. e Iglesias, S), Parques Nacionales, Madrid, pp. 185-212.
- Bussotti F., Bettini D., Grossoni P., Mansuino S., Nibbi R., Soda C., Tani C., 2002. Structural and functional traits of *Quercus ilex* in response to water availability. *Environ. Exp. Bot.* **47**:11-23.
- Caroselli N.E., Feldman A.W., 1951. Dutch elm disease in young elm seedlings. *Phytopathology* **41**:46-51.
- Cogolludo-Agustín M.A., Agúndez D., Gil L., 2000. Identification of native and hybrid elms in Spain using isozyme gene markers. *Heredity* **85**:157-166.
- Chen M., McClure J.W., 2000. Altered lignin composition in phenylalanine ammonia-lyase-inhibited radish seedlings: implications for seed-derived sinapoyl esters as lignin precursors. *Phytochemistry* **53**:365-370.
- Collin E., Eriksson G., Turok J., 2003. La conservación de los recursos genéticos del olmo en Europa. En: Los Olmos Ibéricos. Conservación y Mejora Frente a la Grafiosis, (ed. Gil, L., Solla, A. e Iglesias, S), Parques Nacionales, Madrid, pp. 379-392.
- Díez J.J., Gil L., 1998. Variability in phenylalanine ammonia-lyase activity in elm among cell cultures of elm clones inoculated with *Ophiostoma novo-ulmi* spores. *Plant Pathol.* **47**:687-692.
- Doskotch, R.W., Keely S.L., Schreiber L.R., 1975. Isolation and identification of an antifungal agent from seeds of American elms. *Phytopathology* **65**:634-635.
- Duchesne L.C., Hubbes M., Jeng R.S., 1985. Accumulation of phytoalexins in *Ulmus americana* in response to infection by a non aggressive and aggressive strain of *Ophiostoma ulmi*. *Can. J. Bot.* **63**:678-680.
- Duchesne L.C., Jeng R.S., Hubbes M., Sticklen M.B. 1990. Accumulation of mansonones E and F in seedlings of *Ulmus americana* in response to inoculation with *Ophiostoma ulmi*. *Trees* **4**:187-190.
- Elgersma D.M., 1970. Length and diameter of xylem vessels as a factors in resistance of elms to *Ceratocystis ulmi*. *Neth. J. Plant Path.* **76**:179-182.

- Elgersma D. M., 1973. Tylosis formation in elms after inoculation with *Ceratocystis ulmi*, a possible resistance mechanism. *Neth. J. Plant Pathol.* **79**:218-220.
- Elgersma D.M., Miller H.J., 1977. Tylosis formation in elms after inoculation with an aggressive or a non aggressive strain of *Ophiostoma ulmi* or with a non-pathogen in elms. *Neth. J. Plant Pathol.* **83**:241-243.
- Faccoli M., Battisti A., 1997. Observations on the transmission of *Ophiostoma ulmi* by the smaller elm bark beetles (*Scolytus* spp.). En: *Interacting Cultural Tactics into the Management of Bark Beetle Reforestation Pests* (eds. Gregorie J.C., Liebhold A.M., Stephen F.M., Day K.R., Salom S.M.), USDA Forest Service General Technical Report NE-236, 172-176.
- García-Nieto M.E., Génova M., Morla C., Rossignoli A., 2003. Los olmos en el paisaje vegetal de la Península Ibérica. En: *Los Olmos Ibéricos. Conservación y Mejora Frente a la Grafiosis*, (ed. Gil, L., Solla, A. e Iglesias, S), Parques Nacionales, Madrid, pp. 129-149.
- Gil L., López R.A., García-Nieto M.E., 2003. Historia de los olmos en la Península Ibérica. En: *Los Olmos Ibéricos. Conservación y Mejora Frente a la Grafiosis*, (ed. Gil, L., Solla, A. e Iglesias, S), Parques Nacionales, Madrid, pp. 69-114.
- Gil L., Fuentes-Utrilla P., Soto A., Cervera M.T., Collada C., 2004. English elm (*Ulmus procera*) is a 2,000-year-old Roman clone. *Nature* **431**, 1035.
- Giordano R., Salleo S., Wanderlingh F., 1978. Flow in xylem vessels and Poiseuille's law. *Can. J. Bot.* **56**:333-338.
- Goodacre R., Shann B., Gilbert R.J., Timmins E.M., McGovern A.C., Alsberg B.K., Kell D.B., Logan N.A., 2000. Detection of the dipicolinic acid biomarker in *Bacillus* spores using Curie-point pyrolysis mass spectrometry and Fourier transform-infrared spectroscopy. *Anal. Chem.* **72**:119-127.
- Goodacre R., Shann B., Timmins E.M., Burton R., Kanderbhai N., Woodward A.M., Kell D.B., Rooney P.J., 1998. Rapid identification of urinary tract infection bacteria using hyperspectral whole-organism fingerprinting and artificial neural networks. *Microbiology* **144**:1157-1170.
- Gorsuch D., Oberbauer S.F., 2002. Effects of mid-season frost and elevated growing season temperature on stomatal conductance and specific xylem conductivity of the arctic shrub, *Salix pulchra*. *Tree Physiol.* **22**:1027-1034.

- Graça J.A.R., Pereira H.M.N., 2004. Suberinas e cutinas: Biopoliésteres das plantas. En: Química de Polímeros (eds. Seixas de Melo J.S., Moreno M.J., Burrows H.D., Gil M.H.), Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal, pp. 619-639.
- Green C.E., Guries, R.P., Smalley E.B., 1985. Early screening of elms for resistance to *Ceratocystis ulmi*. Plant Dis. **69**:60-63.
- Griffin D.H., 1994. Fungal Physiology. Wiley-Liss, Inc, New York
- Heybroek H.M., 1957. Elm breeding in the Netherlands. Silvae Genetica **6**:112-117.
- Heybroek H.M., 1979. Mini-monograph of elms in Agroforestry. En: Technical Consultation on Fast-Growing Broadleaved Trees for Mediterranean and Temperate Zones. FAO, FO: FGB-79-8/7, 423-441.
- Heybroek H.M., 1981. Elm cultivation. En: Compendium of Elm Diseases (eds. Stipes R.J., Campana R.J.), American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, pp. 3-5.
- Heybroek H.M., 1993. Why bother about the Elm? En: Dutch elm disease research (ed. M. B. Sticklen y J.L. Sherald), Springer-Verlag, Nueva York pp. 1-8.
- Horsfall J.G., Cowling E.B., 1978. Some epidemics man has known. En: Plant Disease, an Advanced Treatise (eds. Horsfall, J.G., Cowling E. B.), Academic Press, NY y London, pp. 17-32.
- Hubbes M., 2004. Induced resistance for the control of Dutch elm disease. Invest. Agrar.: Sist. Recur. For. **13**: 185-196.
- Hubbes M., Jeng R.S., 1981. Aggressiveness of *Ceratocystis ulmi* strains and induction of resistance in *Ulmus americana*. European Journal of Forest Pathology **11**: 257-264.
- Jensen W.A., 1962. Botanical histochemistry. WH Freeman and Co, San Francisco, 408 p.
- Kacuráková M., Wilson R.H., 2001. Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. Carbohydr. Polym. **44**:291-303.
- Kacurakova M., Capek P., Sasinkova V., Wellner N., Ebringerova A., 2000. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. Carbohydr. Polym. **43**:195-203.
- López J.C., Solla A., Menéndez Y., Iglesias S., Gil L., 2000. Escolítidos vectores de la grafiosis en Puerta de Hierro (Madrid) y Valsaín (Segovia) durante el período de 1996-1999. Ecologia **14**:211-217.
- Martín J.A., Gil L., 2003. Historical evolution of Rivas-Vaciamadrid elm stand. Comunicación en panel. Second International Elm Conference. Valsaín, Segovia, 20-23 Mayo 2003. Resumen en actas, p. 22.

- Massart D.L., Vandeginste B.G.M., Deming S.N., Michotte Y., Kauffman L., 1998. Chemometrics: A Textbook. Elsevier, New York.
- 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.
- 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.
- Michalski J., 1973. Revision of the palearctic species of the genus *Scolytus* Geoffroy (Coleoptera, Scolytidae). *Panstwowe Wydawnictwo Naukowe*, 214 pp.
- Mittempergher L., la Porta N., 1993. *Ophiostoma ulmi*/Olmo. En: Miglioramento Genetico delle Piante per Resistenza a Patogeni e Parassiti (eds. Crinò P., Sonnino A, Saccardo F., Buiatti M., Porta-Puglia A., Surico G.), Edagricole, Bologna, Italy, pp. 412-432
- Mittempergher L., Santini A., 2000. La mejora de los olmos en Europa. En: Los Olmos Ibéricos. Conservación y Mejora Frente a la Grafiosis, (eds. Gil L., Solla A., Iglesias S.), Organismo Autónomo Parques Nacionales, Madrid, pp. 393-410.
- Neely D., 1968. Twig inoculations on American elm with *Ceratocystis ulmi*. *Phytopathology* **58**:1566-1570.
- Ouellette G.B., Rioux D., 1992. Anatomical and physiological aspects of resistance to Dutch Elm Disease. En: Defense Mechanisms of Woody Plants Against Fungi, (ed. Blanchette A., Biggs R.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 257-301.
- Ouellette G.B., Baayen R.P., Chamberland H., Simard M., Rioux D., Charest P.M., 2004. Cytochemical labeling for fungal and host components in plant tissues inoculated with fungal wilt pathogens. *Microsc. Microanal.* **10**:449-461.
- Overeem J.C., Elgersma D.M., 1970. Accumulation of mansonenes E and F in *Ulmus hollandica* infected with *Ceratocystis ulmi*. *Phytochemistry* **9**:1949-1952.
- Pajares J.A., Gil L., González R., 2003. Los escolítidos del olmo, transmisores de la grafiosis. En: Los Olmos Ibéricos. Conservación y Mejora Frente a la Grafiosis, (ed. Gil, L., Solla, A. e Iglesias, S), Parques Nacionales, Madrid, pp. 261-282.
- Pandey K.K., Pitman A.J., 2003. FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **52**:151-160.
- Pavlovic S., Brandao P.R.G., 2003. Adsorption of starch, amylose, amylopectin and glucose monomer and their effect on the ?otation of hematite and quartz. *Miner. Eng.* **16**:1117-1122.

- Peace T.R., 1960. The status and development of Dutch elm disease in Britain. Forestry Commission Bulletin 33.
- Pearce R.B., 1996. Antimicrobial defences in the wood of living trees. *New Phytol.* **132**: 203-233.
- Ridley B.L., O'Neill M.A., Mohnen D., 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57**:929-967.
- Rocha S.M., Goodfellow B.J., Delgadillo I., Neto C.P., Gil A.M., 2001. Enzymatic isolation and structural characterisation of polymeric suberin of cork from *Quercus suber* L. *Int. J. Biol. Macromol.* **28**:107-119.
- Russo P., Blum F., Ipsem J., Abul-Hajj J., Miller W., 1981. The solubility and surface activity of the *Ceratocystis ulmi* toxin cerato-ulmin. *Physiol. Plant Pathol.* **19**:113-126.
- Scheffer R.J., Elgersma D.M., 1982. A scanning electron microscopical study of cell wall degradation in elm wood by aggressive and non-aggressive isolates of *Ophiostoma ulmi*. *Eur. J. For. Pathol.* **12**:25-28.
- Schreiber L.R., 1970. Viability of *Ceratocystis ulmi* in young seedlings of American elms and de effects of extracts from their tissues on conidial germination. *Phytopathology* **60**:31-35.
- Séné C.F.B., McCann M.C., Wilson R.H., Grinter R., 1994. Fourier-transform raman and Fourier-transform infrared spectroscopy. An investigation of five higher plant cell walls and their components. *Plant Physiol.* **106**:1623-1631.
- Shibuya N., Minami E., 2001. Oligosaccharide signalling for defense responses in plant. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **59**: 223-233.
- Shigo A., Marx H.G., 1977. Compartmentalization of decay in trees. *Agr. Inf. Bull. US Dept. Agr. For. Serv.* 405: 73 p.
- Shigo A., Tippet J.T., 1981. Compartmentalization of American elm tissues infected by *Ceratocystis ulmi*. *Plant Dis.* **65**:715-718.
- Shigo A.L., Gregory G.F., Campana R.J., Dudzik K.R., Zimel D.M., 1986. Patterns of starch reserves in healthy and diseased American elms. *Can. J. For. Res.* **16**:204-210.
- Shutherland M.L., Pearson S., Brasier C.M., 1997. The influence of temperature and light on defoliation levels of elm by Dutch el disease. *Phytopathology* **87**:576-581.
- Sinclair W.A., Brener, W.D., 1974. Dutch elm disease in clones from white elms resistant and susceptible to *Ceratocystis ulmi*. *Phytopathology* **64**:675-679.

- Sinclair W.A., Zahand J.P., Melching J.B., 1975. Anatomical markers for resistance of *Ulmus americana* to *Ceratocystis ulmi*. *Phytopathology* **65**:349-352.
- Singh D., Smalley E.B., 1969. Nitrogenous and carbohydrate compounds in the xylem sap of *Ulmaceae* species varying in resistance to Dutch elm disease. *Can. J. Bot.* **47**:335-339.
- Smalley, E.B. 1963. Seasonal fluctuations in susceptibility of young elm seedlings to Dutch elm disease. *Phytopathology*. **53**:846-853.
- Smalley E.B., Kais A.G., 1966. Seasonal variations in the resistance of various elm species to Dutch elm disease. En: *Proc. Breeding Pest-Resistant Trees.* (eds. Gerhold H.D., Schreiner E.J., McDermott R.E., Winieski J.A.), Pergamon Press, Oxford, UK, pp. 279-287.
- Smalley E.B., Ehlke N.S., Clark E.F., Mai S.H., 1982. Cambial reactions in *Ulmus* following inoculation with *Ceratocystis ulmi*. *Phytopathology* **72**:981.
- Smalley E.B., Raffa K.F., Proctoer R.H., Klepzig K.D., 1993. Tree responses to infection by species of *Ophiostoma* and *Ceratocystis*. En *Ceratocystis and Ophiostoma: Taxonomy, Ecology and Pathogenicity* (eds. Wingfield M.J., Seifert K.A., Webber J.F.), The American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota, pp. 207-217.
- Solla A., Gil L., 2002a. Xylem vessel diameter as a factor in resistance of *Ulmus minor* to *Ophiostoma novo-ulmi*. *For. Pathol.* **32**:123-134.
- Solla A., Gil L., 2002b. Influence of water stress on Dutch elm disease symptoms in *Ulmus minor*. *Can. J. Bot.* **80**:810-817.
- Solla A., Gil L., 2003a. La grafiosis: hongos implicados, ciclo biológico, epidemiología y patogénesis. En: *Los Olmos Ibéricos. Conservación y Mejora Frente a la Grafiosis*, (ed. Gil, L., Solla, A. e Iglesias, S), Parques Nacionales, Madrid, pp. 237-259.
- Solla A., Gil L., 2003b. Evaluating *Verticillium dahliae* for biological control of *Ophiostoma novo-ulmi* in *Ulmus minor*. *Plant Pathology* **52**:579-585.
- Solla A., Burón M., Iglesias S., Gil L., 2000. Spanish program for the conservation and breeding of elms against DED. En: *The Elms. Breeding, Conservation and Disease Management*, (ed. Dunn C. P.), Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 295-303.
- Solla A., Burón M., Gil L., 2001. Relación entre parámetros de intercambio gaseoso y los primeros síntomas de *U. minor* Mill. a la grafiosis. *Invest Agrar: Sist Recur For* **10**: 151-163.

- Solla A., Bohnens J., Collin E., Diamandis S., Franke A., Gil L., Burón M., Santini A., Mittempergher L., Pinon J., Vanden Broeck A., 2005. Screening European elms for resistance to *Ophiostoma novo-ulmi*. For. Sci. **51**:134-141.
- Solla A., Nasmith C., Dacasa M.C., Fuentes-Utrilla P., Hubbes M., Gil L., 2006 Genetic analysis of the Spanish population of *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi* using RAPD markers: Evidence for the presence of intraspecific and interspecific hybrids. Enviado a Plant Pathol.
- 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.
- Svaldi R., Elgersma D.M., 1982. Further studies on the activity of cell wall degrading enzymes of aggressive and non-aggressive isolates of *Ophiostoma ulmi*. Eur. J. For. Path. **12**:29-36.
- Tainter F.H., 2001. Anatomy and physiology of vascular tissues of woody plants. En: Shade Tree Wilt Diseases. (ed. Ash C. L.), APS Press. St. Paul, Minnesota, pp. 1-14.
- Takai S., Richards W.C., 1978. Cerato-ulmin, a wilting toxin of *Ceratocystis ulmi*: Isolation and some properties of the cerato-ulmin from the culture of *C. ulmi*. Phytopath. Z. **91**:129-146.
- Tchernoff V., 1965. Methods for screening and for the rapid selection of elms for resistance to Dutch elm disease. Acta Botanica Neerlandica **14**:409-452.
- Timmins E.M., Howell S.A., Alsberg B.K., Noble W.C., Goodacre R., 1998. Rapid differentiation of closely related *Candida* species and strains by pyrolysis-mass spectrometry and Fourier transform-infrared spectroscopy. J. Clin. Microbiol. **36**:367-74.
- Towsend, A.M., 2000. USDA genetic research on elms. En: The Elms: Breeding, Conservation and Disease Management, (ed. Dunn, C.P.), Kluwer Academic Publishers **5**: 271-278.
- Tyree M.T., Zimmermann M.H., 2002. Xylem Structure and the Ascent of Sap. Berlin, Germany: Springer-Verlag.
- Vorwerk S., Somerville S., Somerville C., 2004. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. Trends Plant Sci. **9**:203-209.
- Wargo P.M., 1972. Defoliation-induced chemical changes in sugar maple roots stimulate growth of *Armillaria mellea*. Phytopathology **62**:1278-1283.

- Wright J.W., 1968. A first step in breeding resistant elms. En: Proc. Sixth Central States Forest Tree Improvement Conference, (ed. Funk D.T.), U.S. Forest Service, Carbondale, Illinois, pp. 28-25
- Yang J., Yen H.E., 2002. Early salt stress effects on the changes in chemical composition in leaves of ice plant and arabidopsis. A Fourier Transform infrared spectroscopy study. *Plant Physiol.* **130**:1032-1042.
- Zimmerman M.H., 1983. Xylem structure and the ascent of sap. Springer Verlag, New York. 144 pp.

