



9CFE-1541

Actas del Noveno Congreso Forestal Español
Edita: **Sociedad Española de Ciencias Forestales. 2025.**
ISBN: 978-84-941695-7-1



Clones de *Ulmus minor* resistentes a la grafiosis muestran diferentes mecanismos de defensa: implicaciones para la mejora

SOBRINO-PLATA, J. (1) (2), BARÓN-SOLA, A. (2), HERNÁNDEZ, L.E. (3), CAMISÓN, A. (2), RODRÍGUEZ-CALCERRADA, J. (2), MARTÍN, J.A. (2)

(1) Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas.

(2) Universidad Politécnica de Madrid. ETS de Ingeniería de Montes, Forestal y del Medio Natural.

(3) Universidad Autónoma de Madrid. Departamento de Biología/Centro de Investigación en Biodiversidad y Cambio Global.

Resumen

En la última década se han seleccionado varios clones de *Ulmus minor* resistentes a la grafiosis, pero se desconocen las causas de su resistencia. Por ello hemos investigado la respuesta a la grafiosis de plántulas de dos clones resistentes (R-VAD2 y R-MDV2.3) y de uno susceptible (S-MDV1) transcurridos 1, 3, 6 y 30 días desde la inoculación (ddi) de *Ophiostoma novo-ulmi*. A los 30 ddi el estrés oxidativo y el contenido de flavonoides aumentó únicamente en el clon susceptible. Por primera vez, identificamos la producción de tioles (glutatión) como una respuesta al patógeno, siendo más temprana en los clones resistentes. El clon susceptible y R-VAD2 acumularon ácido salicílico tras la inoculación, pero no R-MDV2.3. Este último clon fue el único que acumuló ácido benzoico tras la inoculación. Los clones resistentes mostraron vasos de menor longitud y diámetro que el susceptible. No obstante, R-MDV2.3 incrementó el diámetro y el área transversal ocupada por sus vasos en el xilema tras la inoculación. R-VAD2, a su vez, mostró una menor proporción de vasos ocluidos. Los resultados sugieren que no hay un único mecanismo de resistencia a la grafiosis, lo que puede favorecer la mejora de la especie mediante cruzamientos.

Palabras clave

Olmo, enfermedad vascular, *Ophiostoma*, tioles, xilema.

1. Introducción

Tras más de 100 años desde la introducción de la grafiosis en Europa y Norteamérica, la enfermedad sigue en una fase altamente virulenta y sin métodos de control eficaces (HESSENAUER et al. 2020). En la actualidad y ante la desaparición de los individuos de porte arbóreo, la enfermedad básicamente afecta a los rebrotes de cepa o de raíz que persisten en numerosas localidades, pero que pronto sucumben a la enfermedad en ciclos repetidos de infección y rebrote (MARTÍN et al. 2019a). A pesar de la difícil situación, el programa de mejora genética de *Ulmus minor* en España ha conseguido identificar una serie de genotipos de resistencia elevada a *Ophiostoma novo-ulmi* (ONU en adelante), agente causal de la enfermedad (MARTÍN et al. 2015). Gracias a esta selección, se está progresando en la obtención de nuevos genotipos resistentes mediante la realización de cruces controlados, habiéndose comprobado que la resistencia es un carácter heredable y, por tanto, susceptible de mejora (DOMÍNGUEZ et al. 2022).

Estudios previos han sugerido que la resistencia a ONU es poligénica y que se asocia a ciertos caracteres anatómicos, fisiológicos y bioquímicos (MARTÍN et al. 2019a). ONU es un patógeno vascular, y vasos del xilema de pequeño diámetro se han asociado a mayores niveles de resistencia (SOLLA et al. 2002, 2005), aunque esta relación no siempre se cumple (MARTÍN et al. 2021). En algunos casos, ante un aumento del déficit de vapor de agua en el aire, genotipos resistentes con vasos pequeños cierran antes los estomas que los genotipos susceptibles, manteniendo la hidratación del tallo y, a priori, la capacidad para defenderse y restringir el avance del hongo (PITA et al. 2018). Tras una infección por ONU, los genotipos resistentes de *U. minor* parecen controlar mejor el estrés oxidativo (SOBRINO-PLATA et al. 2022) y mantener mayores niveles de almidón en el xilema (MARTÍN et al. 2005) que los genotipos susceptibles. A pesar de estos avances, el conjunto de caracteres que hacen a un genotipo de *U. minor* altamente resistente a ONU no se conoce en profundidad. Asimismo, se desconoce el grado en el que los genotipos resistentes comparten los mismos mecanismos de resistencia. Determinar cuáles son los mecanismos de resistencia en genotipos seleccionados y su heredabilidad permitiría realizar una mejora más eficiente, seleccionando los cruces más adecuados para conseguir elevar la resistencia. Dado que la resistencia es un carácter plástico (DOMÍNGUEZ et al. 2024), conseguir identificar y combinar mecanismos de resistencia complementarios en un mismo genotipo permitiría obtener un material más resiliente ante variaciones ambientales.

2. Objetivos

En el presente trabajo planteamos la hipótesis de que los genotipos de *U. minor* resistentes a ONU comparten los mismos caracteres de resistencia. Para verificarlo, el objetivo de este trabajo ha sido investigar características anatómicas, fisiológicas, químicas y hormonales de tres genotipos de *U. minor* tras su inoculación con ONU. Dos de los genotipos estudiados son resistentes y el tercerorestantesusceptible a ONU. Por primera vez, se investiga el papel de biotioles no proteicos en la resistencia a ONU.

3. Metodología

3.1. Material vegetal

Plántulas de *Ulmus minor* procedentes de cultivo in vitro de tres genotipos diferentes, dos resistentes a la grafiosis, R-VAD2 y R-MDV2.3, y uno susceptible, S-MDV1, fueron cultivadas durante dos meses en una cámara climática, en alveolos con mezcla de sustrato:perlita (3:1). Pasado este tiempo, 40 plantas de cada genotipo fueron sometidas a dos tratamientos: la mitad de ellas se inocularon con 10 µl de una solución de esporas de ONU a una concentración de 107 esporas ml⁻¹, y la otra mitad con 10 µl de agua destilada y estéril como tratamiento control. Cinco plantas de cada tratamiento y de cada genotipo se muestrearon a los 1, 3, 6 y 30 días después de la inoculación (ddi). Tras medir el intercambio gaseoso en hojas de forma no destructiva, las plantas se cosecharon, y el material vegetal se almacenó a -80 °C hasta su uso (Figura 1).

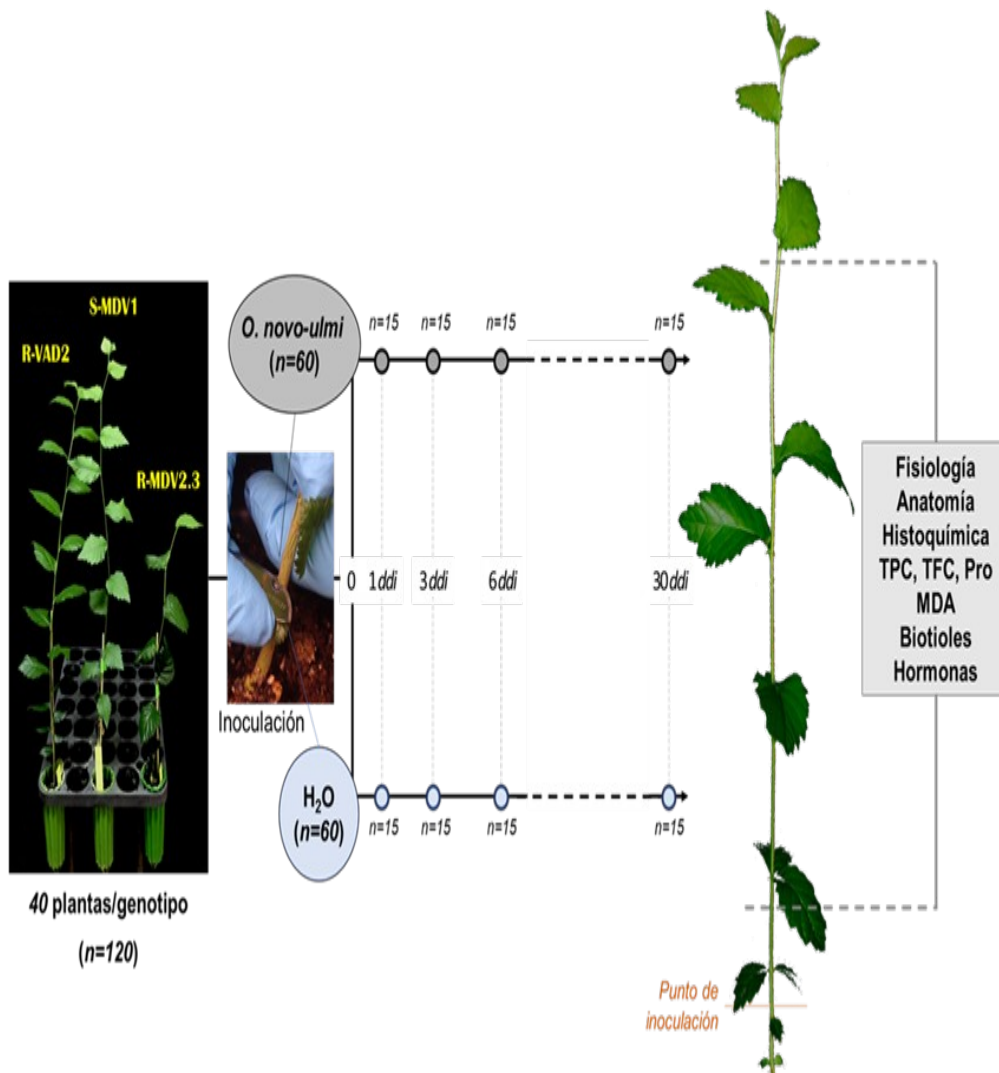


Figura 1. Diseño experimental y esquema de muestreo temporal de las plantas de *Ulmus minor* de los genotipos resistentes (R-VAD2 y R-MDV2.3) y susceptible (S-MDV1) y las posteriores mediciones realizadas. (TPC = contenido de fenoles totales, TFC = contenido de flavonoides totales, Pro = concentración de prolina libre, MDA = cuantificación de malondialdehído).

3.2. Parámetros fisiológicos

Como estimación del estado hídrico de la hoja, se midió el peso fresco y el peso seco de una hoja por planta en los días 1, 3 y 6 ddi para calcular el contenido hídrico relativo como: (peso fresco – peso seco) / peso seco. En los mismos días se midió la tasa de intercambio gaseoso en cuatro plantas por genotipo, escogiendo una hoja sana por planta. Las medidas se hicieron con un equipo portátil provisto de un analizador de gases por infrarrojo (IRGA; Li 6400 LI-COR Biosciences, USA), acoplado a una cámara de 2 cm² de superficie de muestreo. Las condiciones de medida se fijaron en 400 ppm de concentración de CO₂ y 25 °C en el aire de entrada, y 140 μmol fotones m⁻² s⁻¹ de luz fotosintéticamente activa, un nivel algo superior a la luz que tenían las plantas dentro de la cámara de cultivo. La



humedad relativa del aire osciló entre 43 y 58 % durante las medidas. Las variables que se analizaron fueron la tasa de fotosíntesis neta (P_n), la conductancia estomática al vapor de agua (g_s), y el cociente entre concentración intercelular y ambiental de CO_2 (C_i/C_a) como estimador indirecto de la eficiencia en el uso del agua.

3.3. Cuantificación de fenoles, flavonoides totales y prolina libre

A partir de 50 mg de tallo congelado y pulverizado se realizó una extracción con 2 ml de metanol al 95 % en frío, posteriormente se incubó a temperatura ambiente y oscuridad durante 48 horas. Este extracto en metanol fue usado para la cuantificación del contenido de fenoles y flavonoides totales, así como de la concentración de prolina libre. Se siguieron los métodos descritos por AINSWORTH & GILLESPIE (2007) para cuantificar fenoles, por BARREIRA et al. (2008) para flavonoides y por CARILLO & GIBBON (2011) para prolina, modificando volúmenes para poder realizar los ensayos en microplaca de 96 pocillos y hacer la medida de la absorbancia en un lector de microplacas a 765, 415 y 520 nm para fenoles, flavonoides y prolina, respectivamente. El contenido de fenoles, flavonoides totales y prolina en las muestras se calculó utilizando la ecuación de regresión obtenida de rectas patrón de concentraciones conocidas de ácido gálico (0,025 - 1 mM), quercetina (6,25 - 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y L-prolina (0,04 - 1 mM) respectivamente.

3.4. Cuantificación de malondialdehído (MDA)

Se evaluó el estrés oxidativo producido por el ataque del patógeno en las plantas de *U. minor* cosechadas a los 30 ddi mediante la cuantificación de malondialdehído (MDA). Para ello, se siguió el protocolo descrito por ORTEGA-VILLASANTE et al. (2005) donde se homogeneizaron 50 mg de tallo pulverizado y congelado en 1 ml de una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 15%, ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,37%, HCl 0,25 M, e hidroxitolueno butilado (BHT) al 0,01%. Se midió la absorbancia tras la reacción en espectrofotómetro a 535 y 600 nm y se calculó el valor de MDA producido mediante el coeficiente de extinción molar del cromóforo resultante de la reacción entre el MDA y el TBA: $1,56 \times 10^5 \text{ M cm}^{-1}$.

3.5. Cuantificación de biotioles no proteicos

La extracción de biotioles se realizó añadiendo 1 ml de HCl 0,25 N a 80-120 mg de tallo pulverizado y agitando en vortex durante 1 min. El homogeneizado fue centrifugado en frío en 2 etapas (4°C, 10000 x g, 15 min); una primera de separación de fases y otra de filtración (Corning™ Costar Spin-X™) del sobrenadante. La determinación de los biotioles se llevó a cabo mediante HPLC-UV-DAD en un equipo Agilent 1200 HPLC System siguiendo el procedimiento descrito por SOBRINO-PLATA et al. (2021). Los extractos (100 μL) fueron inyectados en una columna C18 Mediterranea SEA18 (5 μm , 250 x 4.6 mm; Teknokroma) y detectados por derivatización post-columna con reactivo Ellman (ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico); Thermo-Scientific). Los compuestos se identificaron por

comparación de los tiempos de retención de los estándares comerciales de cisteína (Cys), γ -glutamyl-Cys, y glutatión (GSH) (Sigma-Aldrich) y su cuantificación se realizó mediante adición de N-acetil cisteína (concentración final 250 μ M) como patrón interno durante la homogeneización de la muestra.

3.6. Extracción y cuantificación de hormonas

La extracción hormonal se realizó en las plantas cosechadas a los 1, 3 y 6 ddi, ya que se esperaba que los mayores cambios hormonales se produjeran en los primeros días tras la inoculación del patógeno. Sobre 50 mg de tallo pulverizado y congelado se añadió 1 ml de metanol al 10% que contenía una mezcla de estándares internos hormonales deuterados a concentración de 50 ng ml⁻¹: ácido salicílico-[2H6] (SA-d6), ácido jasmónico-[2H5] (JA-d5) y ácido abscísico-[2H6] (ABA-d6). La mezcla se agitó y se incubó durante 30 min a 4 °C y, posteriormente, se homogeneizó en un molino mezclador Precellys Evolution (Bertin Instruments). Las muestras se centrifugaron 30 min a 4 °C y a una velocidad de 13.000 x g. El pH del sobrenadante recogido se ajustó a 2,5 con ácido fórmico al 0,01% y se añadió un volumen de éter dietílico. Tras mezclar, se recogió la fase superior y sobre la fase acuosa inferior se volvió a añadir un volumen de éter dietílico y se volvió a mezclar y recoger la fase superior. Las dos fracciones orgánicas se unieron en un vial ámbar de 2 ml y se evaporaron con nitrógeno gaseoso hasta su completa deshidratación. Finalmente, las muestras se resuspendieron en 100 μ l de metanol al 10%. Cincuenta microlitros de cada extracto se separaron cromatográficamente en un sistema de cromatografía líquida de ultraalto rendimiento (UPLC) equipado con una columna analítica Ace Excel 3, C18-PFP (3 μ m, 150 x 3.0 mm) acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo EVOQ-ELITE (Bruker). Las condiciones cromatográficas y de espectrometría de masas fueron las utilizadas por PAN et al. (2010). Se cuantificaron las hormonas SA, ácido benzoico (BA), ABA, ácido 12-oxo-fitodienoico (12-OPDA), JA y jasmonoil-isoleucina (JA-Ile) utilizando curvas de calibración externas de cada estándar químico puro (10-100-500 ng ml⁻¹) y con los patrones internos citados previamente a concentración de 50 ng ml⁻¹.

3.7. Anatomía del xilema

El estudio anatómico se realizó sobre las muestras cosechadas el día 30. Sobre un segmento de tallo situado 2 cm por encima del punto de inoculación se realizaron cortes transversales micrométricos (20 μ m) mediante un criostato Leica CM1520. Los cortes fueron teñidos con floroglucinol-HCl y con lugol para observar la presencia de depósitos de suberina y de almidón en los tejidos, respectivamente. Los cortes fueron observados con un microscopio OLYMPUS BX51 y fotografiados. Cuatros sectores de 500 x 500 μ m fueron seleccionados aleatoriamente en el xilema de cada planta en los que se midieron: el diámetro de los vasos, el área ocupada por los vasos en el sector (%), la densidad de vasos (N/mm²), la proporción de vasos ocluidos por geles y tilosas (%), el área ocupada por reacciones al lugol (almidón) y el área ocupada por reacciones fluorescentes al floroglucinol-HCl (suberina). La longitud máxima de los vasos del xilema (Lmax) se midió en siete tallos principales de plantas sin tratar de cada genotipo, siguiendo la metodología de la inyección de aire descrita en TORRES-RUIZ et al. (2024). Las plantas habían sido bien regadas



previamente para minimizar la embolia de los vasos. El tallo se cortó bajo agua desde la base, que se introdujo en un tubo de goma acoplado a una bomba de aire a baja presión. Mientras se bombeaba aire por la base, el extremo apical del tallo sumergido en agua se fue cortando en intervalos de 1 a 2 cm aproximadamente, hasta que se vieron burbujas de aire emerger por el extremo apical. La longitud del tallo en ese momento se considera un estimador de L_{max} , asumiendo que el aire no atraviesa las punteaduras hidratadas que conectan los vasos.

3.8. Análisis estadísticos

Las variables estudiadas han sido analizadas mediante modelos lineales mixtos, considerando el tratamiento (ONU o control), el genotipo y su interacción como factores fijos y la planta como factor aleatorio. En aquellas variables con más de una fecha de medición se ha considerado el tiempo, el tratamiento y su interacción como factores fijos, analizándose cada genotipo por separado. Los análisis han sido realizados con los programas R versión 4.2.3 y Statistica 8. La significación de los factores fijos se evaluó mediante ANOVA tipo III, y las medias de los grupos se compararon usando el test HSD de Tukey. Se utilizó la corrección del p valor de Benjamini-Hochberg.

4. Resultados

4.1. Estado fisiológico de las plantas de *U. minor*

El contenido hídrico relativo foliar (CHR) no se vio afectado por la inoculación con ONU. Sí hubo una disminución significativa de CHR del día 1 al 6 (2,82 vs 2,33 g g⁻¹, respectivamente), más marcada en el genotipo S-MDV1 a un valor de significación $p < 0.1$. Las variables relacionadas con el intercambio gaseoso foliar tampoco mostraron un efecto de ONU. Los genotipos sí variaron significativamente. La tasa de fotosíntesis fue mayor en el genotipo R-MDV2.3 (6,47 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) que en los otros dos genotipos (6,00 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); la tasa de conductancia estomática fue también mayor en este genotipo (0,15 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) que en S-MDV1 y R-VAD2, que mostró el valor de g_s más bajo (0,09 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Por ello, C_i/C_a fue más bajo en R-VAD2 (0.70 vs 0.77 de media en los otros dos genotipos), lo que sugiere más eficiencia en el uso del agua de sus hojas (datos no mostrados).

4.2. Inducción del metabolismo antioxidante

A los 30 días tras la inoculación con ONU se produjo la acumulación de flavonoides y prolina, metabolitos relacionados con la actividad antioxidante de la célula, tan solo en el genotipo susceptible S-MDV1 (Figura 2 a-c y d-f). Sin embargo, la acumulación de biotioles no proteicos, principalmente GSH, se produjo en respuesta a la inoculación del patógeno en todos los genotipos, variando el tiempo en el cual se produjo una mayor producción de estos. Esta acumulación se observó de forma más temprana en los genotipos resistentes, 1 ddi y 3 ddi en R-VAD2 y R-MDV2.3 respectivamente, mientras que en S-MDV1 se acumularon en mayor medida a partir de los 6 ddi (Figura 2 g-i). Por otro lado, en ninguno de los tres

genotipos se produjeron cambios significativos en el contenido de fenoles totales.

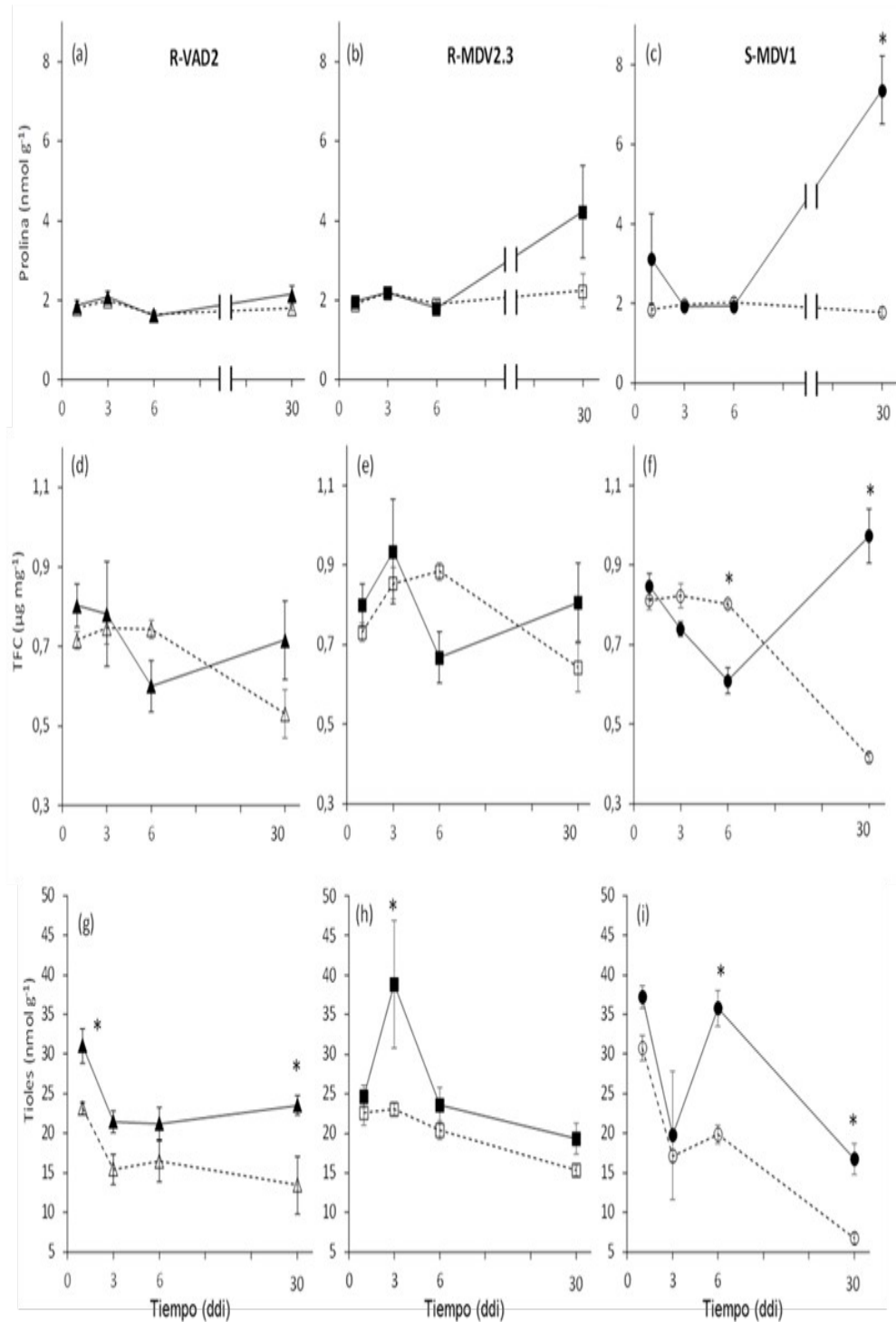


Figura 2. Cambios temporales tras la inoculación en los niveles de prolina (a-c), flavonoides totales (TFC) (d-f) y tioles (g-i) en plantas de genotipos de *Ulmus minor* resistentes (R-VAD2 y R-MDV2.3) y susceptibles (S-MDV1) a *O. novo-ulmi*. Se muestran plantas control (símbolos sin relleno y líneas discontinuas) e inoculadas con *O. novo-ulmi* (símbolos negros y líneas continuas). Asteriscos indican diferencias significativas entre medias para un mismo tiempo ($p < 0.05$, test de Tuckey) y barras

verticales el error estándar.

4.3. Nivel de peroxidación lipídica

Se evaluó el nivel de peroxidación lipídica (MDA) como indicador del estrés oxidativo inducido por la inoculación del patógeno y se observó un aumento de los niveles de éste en los tres genotipos del estudio a los 30 ddi. Sin embargo, este aumento de MDA en respuesta a la inoculación de ONU sólo fue significativo en el genotipo S-MDV1 con respecto al control ($p < 0.01$) (Figura 3).

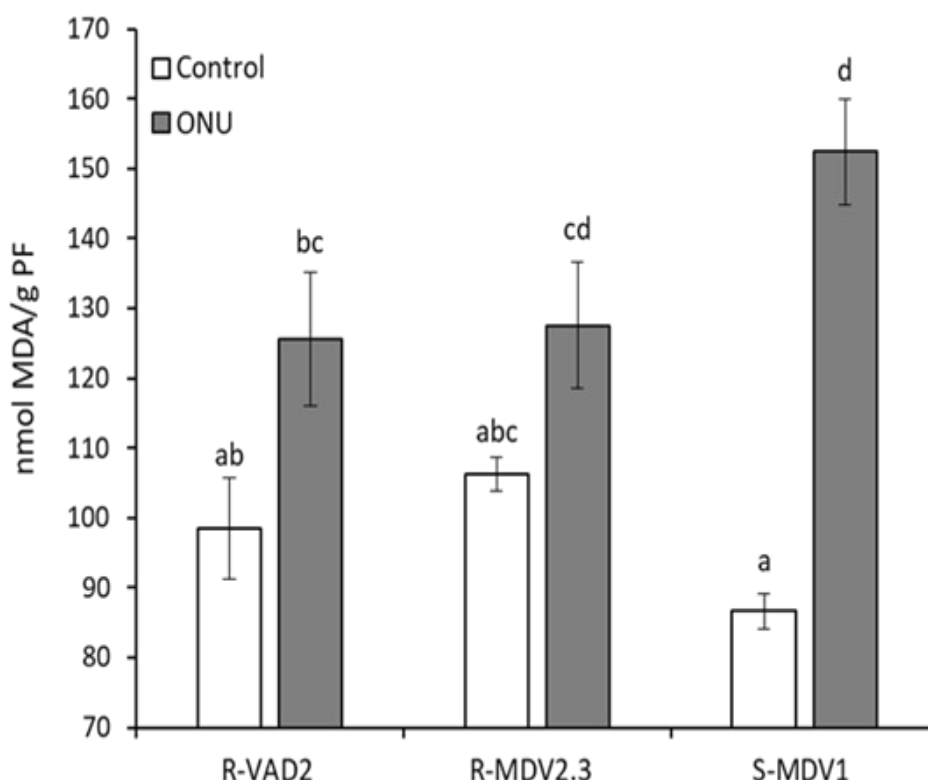


Figura 3. Peroxidación lipídica medida a través de la cuantificación del malondialdehído (MDA) producido en las plantas de los genotipos de *Ulmus minor* resistentes (R-VAD2 y R-MDV2.3) y susceptible (S-MDV1) inoculadas con *O. novo-ulmi* o sin inocular (control), a los 30 días de la inoculación. Las letras indican diferencias significativas entre los distintos tratamientos y genotipos ($P < 0,05$; test de Tukey) y barras verticales el error estándar.

4.4. Respuesta hormonal

Sólo se encontraron cambios a nivel hormonal entre los tratamientos control e inoculado en la acumulación de ácido salicílico (SA) en los genotipos R-VAD2 y S-MDV1 (Figura 4a-c). El SA se acumuló en respuesta al patógeno a partir de los 3 ddi en el genotipo susceptible y a partir de los 6 ddi en el resistente. Por otra parte se observó una acumulación de BA en R-MDV2.3 de forma puntual a los 3 ddi en respuesta a ONU (Figura 4e). No se observaron cambios significativos entre los

tratamientos en la acumulación de jasmonatos (JA, JA-Ile y OPDA) ni de ABA en ninguno de los genotipos del estudio.

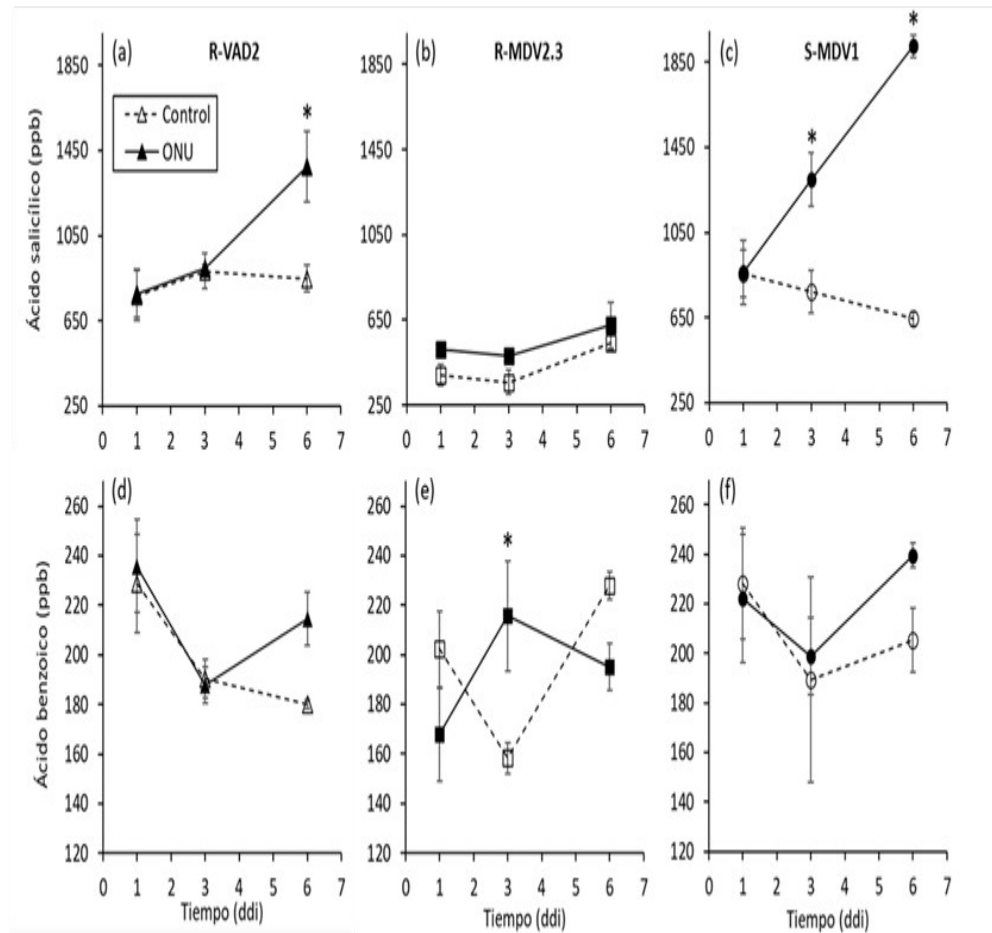


Figura 4. Cambios temporales en el contenido de ácido salicílico (a-c) y ácido benzoico (d-f) en los tres genotipos estudiados: (a) y (d) R-VAD2; (b) y (e) R-MDV2.3; y (c) y (f) S-MDV1, en plantas control (símbolos sin relleno y líneas discontinuas) e inoculadas con *O. novo-ulmi* (símbolos negros y líneas continuas). Asteriscos indican diferencias significativas entre medias para un mismo tiempo ($p < 0,05$; test de Tukey) y barras verticales el error estándar.

4.5. Anatomía del xilema

De los parámetros anatómicos estudiados en los cortes transversales, el área ocupada por los vasos en el xilema mostró diferencias entre genotipos ($p < 0.001$) y una interacción marginalmente significativa entre el genotipo y el tratamiento ($p = 0.07$). En las plantas control, el genotipo R-VAD2 presentó un mayor porcentaje de área ocupada por vasos en el xilema que los otros dos genotipos. Sin embargo, tras la inoculación de ONU el genotipo R-MDV2.3 incrementó el área ocupada por los vasos hasta alcanzar un valor similar al de R-VAD2 (Figura 5a). El diámetro de vasos mostró un efecto significativo del genotipo ($p < 0.001$), pero no del tratamiento ni de la interacción entre ambos ($p > 0.13$). El genotipo susceptible S-MDV1 mostró el mayor diámetro medio de vasos, significativamente mayor al del

R-MDV2.3. En las plantas inoculadas estas diferencias entre genotipos se minimizaron ya que el S-MDV1 tendió a reducir su diámetro de vasos mientras que el R-MDV2.3 tendió a aumentarlo (Figura 5b). Los valores de almidón y suberina mostraron diferencias entre tratamientos ($p < 0.001$) y una interacción significativa genotipo x tratamiento ($p < 0.05$). La inoculación con ONU indujo una bajada de los niveles de almidón en los tejidos (Figura 5c) y una acumulación de suberina (Figura 5d), siendo el genotipo R-MDV2.3 el que presentó mayores valores de almidón y menores de suberina. En relación a los vasos ocluidos, el genotipo R-VAD2 mostró un menor porcentaje de vasos ocluidos tras la inoculación con ONU que los otros dos genotipos ($p < 0.05$; datos no mostrados).

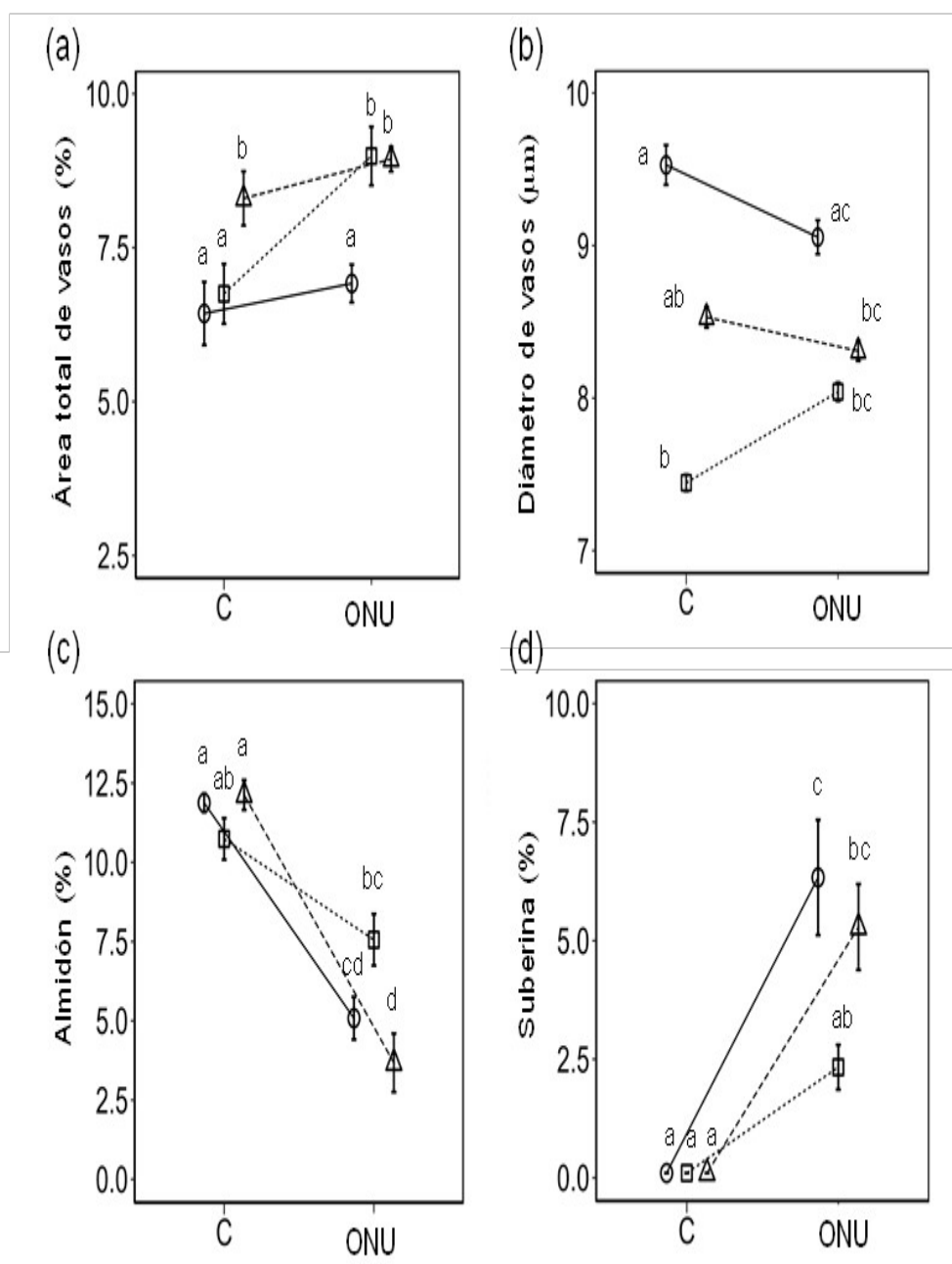


Figura 5. Características anatómicas del xilema en tres genotipos de *U. minor*: R-VAD2 (triángulos); R-MDV2.3 (cuadrados); y S-MDV1 (círculos), en plantas control (C) e inoculadas con *O. novo-ulmi* (ONU) 30 días después de la inoculación. (a) Área

transversal ocupada los vasos; (b) Diámetro medio de los vasos; (c) Área transversal ocupada por almidón; (d) Área transversal ocupada por suberina. Letras diferentes indican diferencias significativas entre medias ($p < 0.05$; test de Tuckey) y barras verticales el error estándar.

El diámetro medio de los vasos mostró una relación inversa y significativa con la densidad de vasos, independientemente del tratamiento ($p < 0.0001$, $r = -0.72$; Figura 6). En esta relación, se observó que el genotipo susceptible S-MDV1 presentó las menores densidades y los mayores diámetros de vasos, al contrario que los resistentes. También se observó una correlación significativa e inversa entre el contenido de almidón y de suberina en los tejidos ($p < 0.001$; $r = -0.68$; datos no mostrados). La longitud máxima de los vasos fue mayor en S-MDV1 que en los genotipos resistentes (Figura 7).

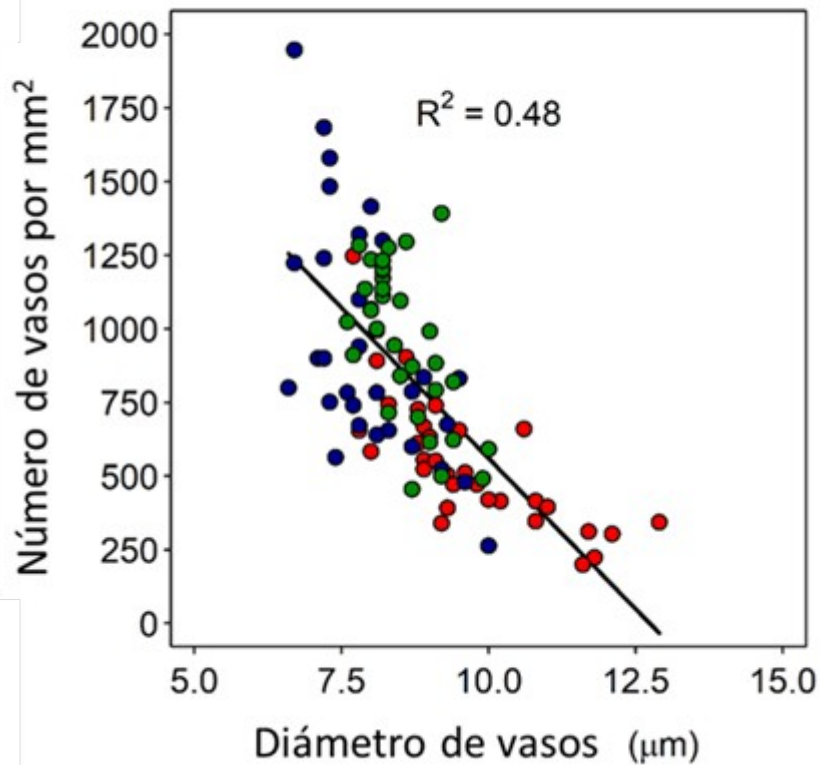


Figura 6. Relación entre la densidad de vasos (Nº por mm²) y el diámetro de vasos. Azul: R-MDV2.3, verde: R-VAD2; rojo: S-MDV1. Se muestra el valor del coeficiente de determinación R^2 de la regresión lineal.

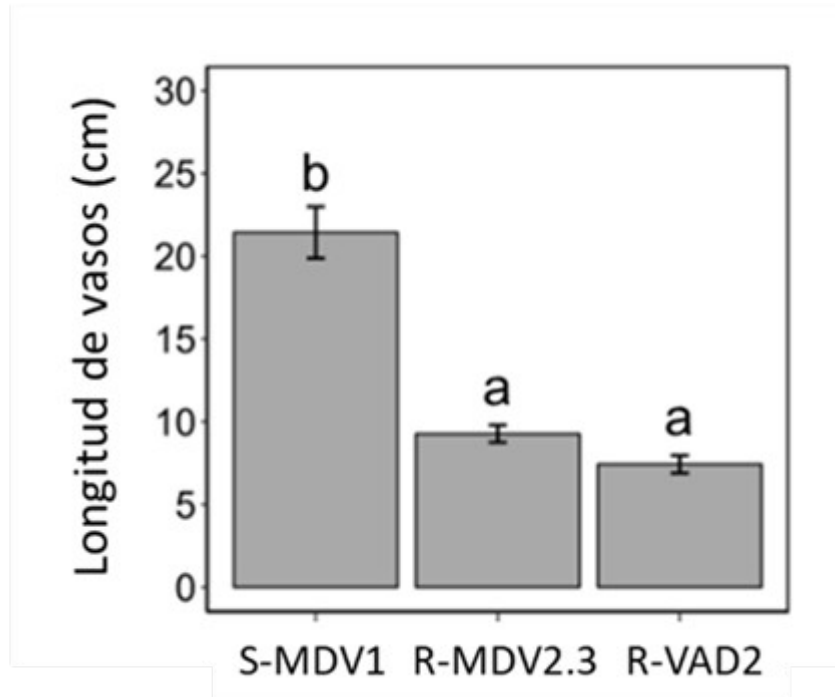


Figura 7. Longitud máxima de vasos del xilema en los tres genotipos estudiados Las letras indican diferencias significativas entre los distintos genotipos ($p < 0,05$; test de Tukey) y barras verticales el error estándar.

5. Discusión

Los resultados muestran un efecto claro de la inoculación con ONU en las características químicas y anatómicas de las plantas. Así, ONU elevó el estrés oxidativo, indujo la acumulación de ácido salicílico, prolina y biotioles, disminuyó el contenido de almidón, incrementó el de suberina, y desencadenó la oclusión de vasos. El análisis conjunto de estas variables sugiere que los genotipos resistentes evitaron el estrés oxidativo más que el susceptible, pese a que este último respondió a la inoculación con un aumento temprano de los niveles de ácido salicílico. El tamaño y distribución de los vasos en el xilema y la rapidez induciendo la defensa química parecen ser factores clave del estrés generado por ONU.

La inoculación del patógeno tendió a incrementar el nivel de peroxidación lipídica en los tres genotipos, indicando que la infección induce estrés oxidativo en los tejidos del tallo. Sin embargo, la mayor susceptibilidad a la grafiosis del genotipo S-MDV1 queda evidenciada por ser este el único en el que dicho incremento fue significativo. Este hecho fue acompañado de una acumulación significativa de prolina, flavonoides y biotioles en este genotipo a los 30 días de la entrada del patógeno, lo cual indica una respuesta del sistema antioxidante en este tiempo para reducir el daño oxidativo producido. En trabajos previos con plántulas de este genotipo ya se observó un comportamiento similar (MARTÍN et al., 2019b; SOBRINO-PLATA et al., 2022), lo cual confirma que, en plantas jóvenes de los genotipos susceptibles, pese a no producirse un marchitamiento por la invasión del patógeno como ocurre en árboles adultos (LI et al., 2016), sí se observa un daño



oxidativo en sus tejidos que no es contrarrestado de forma eficiente por el sistema antioxidante.

El análisis de biotioles no proteicos permitió determinar, por primera vez, la presencia de estos compuestos (Cys y GSH) en la especie *U. minor* en relación con la grafiosis. Dentro de este tipo de compuestos, el GSH representó entre el 60 y el 90% de los biotioles encontrados en las muestras analizadas. El GSH se considera el principal metabolito antioxidante en la célula, participando en múltiples procesos fisiológicos como la señalización, la muerte celular o la inducción de mecanismos de defensa (NOCTOR et al., 2011). A pesar de que las vías principales de síntesis de GSH están muy conservadas y son comunes en distintos tipos de organismos, las plantas han desarrollado diferentes mecanismos reguladores en la formación de biotioles y una gran diversificación de productos relacionados (GALANT et al., 2011). En este estudio, cada clon tuvo una respuesta temporal diferente en la acumulación de biotioles, lo que podría indicar la existencia de mecanismos de regulación de síntesis diferentes entre genotipos. La acumulación temprana de GSH y otros biotioles en los genotipos resistentes podría estar relacionada con una activación del sistema antioxidante rápida y eficiente que limitaría el daño oxidativo producido por la invasión del patógeno, su impacto en la transpiración y asimilación de CO₂ que, en definitiva, apuntaría a una contribución significativa de estos compuestos al aumento de la resistencia frente a ONU. En un trabajo previo donde se analizaron en los mismos genotipos los enzimas antioxidantes glutatión reductasa y ascorbato peroxidasa, se observó una activación rápida de estos en el primer día tras la inoculación de ONU en el genotipo resistente R-MDV2.3 mientras que en el genotipo susceptible se observó a los 7 ddi (MARTÍNEZ-ARIAS et al., 2021). La activación del sistema antioxidante conlleva la reducción de especies reactivas de oxígeno (EROs) que se producen en situaciones de estrés, además de la generación de moléculas defensivas y de barrera de naturaleza fenólica que impiden o limitan la dispersión del patógeno (SHALABY y HORWITZ, 2015). Sin embargo, en el presente trabajo no se observaron diferencias en la acumulación de compuestos fenólicos totales en respuesta a la entrada del patógeno, tan sólo flavonoides en el genotipo S-MDV1, al contrario de lo observado en trabajos previos (SOBRINO-PLATA et al., 2022; MARTÍNEZ-ARIAS et al., 2021).

A nivel hormonal, la respuesta de defensa frente a ONU en *U. minor* parece estar mediada por la hormona ácido salicílico (SA) ya que sólo se vieron cambios significativos en esta hormona y en su precursora, el ácido benzoico (BA), mientras que no se observaron cambios en la concentración de ninguno de los jasmonatos analizados (OPDA, JA y JA-Ile) ni en el ácido abscísico (ABA). Debido a la naturaleza hemibiotrófica del patógeno, era esperable que los cambios en los niveles hormonales se vieran en SA y BA (PIETERSE et al., 2012), además de que en trabajos previos donde se analizó la expresión de genes relacionados con la defensa de *U. minor* frente a ONU se demostró una activación de las rutas tanto de síntesis de SA como de inducción de la defensa mediada por esta hormona (PERDIGUERO et al., 2018; MARTÍNEZ-ARIAS et al., 2021; SOBRINO-PLATA et al., 2022). No obstante, también se ha reportado la acumulación de JA en árboles de *U. americana* a las 96 horas tras la inoculación de ONU y la activación de la defensa mediada por esta hormona (SHERIF et al., 2016). Sin embargo, hasta el momento, no se ha visto relevancia de esta hormona en la respuesta defensiva de *U. minor*.



frente a ONU. Por otra parte, en el presente trabajo se observaron diferencias en el tiempo en la acumulación de SA entre el genotipo resistente R-VAD2 y el susceptible S-MDV1, siendo en este último donde se acumuló de forma más temprana (3 ddi) y en el que se alcanzaron niveles mayores de esta hormona. Siendo el genotipo S-MDV1 el que presentó un mayor estrés oxidativo a causa de la invasión del patógeno, no parece que la acumulación temprana de SA conlleve en este genotipo una respuesta defensiva tan eficiente como la de los genotipos resistentes. Esto estaría indicando que la eficacia en la respuesta al patógeno no sólo depende de la activación mediada por esta hormona sino que, posiblemente, hay otros factores más relevantes de tipo anatómico o fisiológico que podrían estar implicados. En un trabajo previo donde se analizó la expresión génica de árboles del clon Atinio, también susceptible a la grafiosis, inoculados con ONU (PERDIGUERO et al., 2018), se observó una descompensación entre la inducción de genes relacionados con la defensa y genes relacionados con el crecimiento y la fisiología, lo cual unido a las características anatómicas de este clon podría ser la causa de una respuesta defensiva fuerte pero ineficaz frente al patógeno.

Cabe destacar que la inducción de btióles o SA en la primera semana tras la inoculación con ONU se produce sin que se manifieste un efecto del hongo en la hidratación de las hojas o en sus tasas de intercambio gaseoso. Esto indica que la inducción de la defensa química no estuvo causada por el estrés hídrico que provoca el patógeno al bloquear los vasos, sino a la propia presencia del patógeno. Este hecho es importante cuando lo que se pretende es comprender respuestas precoces de resistencia al hongo, y no comparar el grado de resistencia entre genotipos.

Las características anatómicas del xilema confirman que el genotipo susceptible posee unas características que podrían favorecer la dispersión del patógeno y la cavitación y embolia de los vasos. Los resultados sugieren que el tamaño y distribución de vasos son factores asociados a la resistencia, apoyando estudios previos (SOLLA et al. 2005; MARTÍN et al. 2021). Así, los genotipos resistentes mostraron vasos de menor diámetro pero más frecuentes (N/mm²) que el susceptible. No obstante, la respuesta anatómica a la inoculación con ONU fue distinta en los dos genotipos resistentes; mientras que R-VAD2 no vio alterada su estructura de vasos, R-MDV2.3 formó vasos de mayor diámetro incrementando el área transversal ocupada por los mismos en la madera, posiblemente para contrarrestar la pérdida funcional de vasos por la infección. En líneas generales se podría concluir que los genotipos resistentes formaron un xilema con más vasos, pero de menor diámetro y longitud que el susceptible. Si tenemos en cuenta que los vasos más vulnerables a la cavitación y los que facilitan en mayor grado la dispersión del patógeno son los vasos de mayor diámetro y longitud, es muy probable que el genotipo susceptible vea más rápidamente afectados sus tejidos xilemáticos (SOLLA et al., 2002). La oclusión de vasos mediante tilosas es un mecanismo para evitar la expansión vertical del patógeno, pero que en trabajos previos no se ha visto relacionado con una mayor resistencia a ONU (McNABB et al. 1970). Posiblemente, la eficacia de este mecanismo depende de la estructura de la madera. En nuestro trabajo observamos que el genotipo con los vasos más pequeños (R-MDV2.3) ocluye un porcentaje de vasos similar al susceptible, pero sensiblemente superior al R-VAD2. Esto sugiere que pese a que la oclusión de vasos



sea una respuesta general a ONU, posiblemente solo sea ventajosa ante vasos pequeños, más fáciles de ocluir, pero no ante vasos grandes, donde puede ser incluso perjudicial para el árbol (PERDIGUERO et al. 2018). En cuanto a los niveles de almidón y suberina, se observó una brusca disminución en los niveles de almidón y un significativo aumento de la acumulación de suberina en respuesta a la inoculación. Sin embargo, no se observó una relación clara con la resistencia, si bien los resultados indicaron que una mayor inversión en suberina, como sistema de compartimentación del patógeno, se relacionó con una menor cantidad de almidón. Posiblemente este hecho fue consecuencia de los requerimientos energéticos necesarios para la formación de barreras de suberina.

6. Conclusiones

Los genotipos resistentes poseen unas características anatómicas (vasos de menor diámetro y más cortos) que presumiblemente dificultan la dispersión del patógeno, permitiendo que las respuestas inducidas frente a ONU sean más eficaces. No obstante, los genotipos resistentes han mostrado una acumulación más temprana de biotioles, lo que sugiere que a nivel bioquímico también existen factores de reconocimiento del patógeno e inducción de resistencia más eficaces en estos genotipos.

A pesar de que los dos genotipos resistentes comparten características comunes en su anatomía y respuesta al patógeno, también mostraron diferencias en ciertos caracteres. Por ejemplo, el genotipo R-MDV2.3, con vasos de menor diámetro que R-VAD2, respondió a ONU ocluyendo vasos e incrementando el área de vasos en el xilema, respuestas que no se observaron o fueron más tenues en R-VAD2. Sin embargo, la acumulación de biotioles fue más temprana en R-VAD2, que también mostró una acumulación significativa de SA, a diferencia de R-MDV2.3. Éste último fue el único que acumuló la hormona BA tras la inoculación. Estas diferencias indican que el cruzamiento de genotipos resistentes a ONU puede dar como resultado genotipos con mecanismos de resistencia únicos y distintos a los de sus progenitores debido a la segregación de los genes de resistencia. La combinación de distintos caracteres asociados a la resistencia podría dar lugar a genotipos de resistencia más elevada y, posiblemente, de mayor resiliencia en la respuesta a ONU ante distintos ambientes, lo que facilitaría su uso en distintas localidades. Convendría estudiar hasta qué punto caracteres como la producción de biotioles o el tamaño y longitud de los vasos son heredables y susceptibles de mejora.

7. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por la Dirección General de Biodiversidad, Bosques y Desertificación, del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico y por el proyecto AGL-2015-66952-R (MINECO/FEDER).

8. Bibliografía

AINSWORTH, E.A.; GILLESPIE, K.M.; 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* 2 875 – 877. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>



BARREIRA, J.C.; FERREIRA, I.C.; OLIVEIRA, M.B.P.; PEREIRA, J.A.; 2008. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food Chem.* 107(3) 1106 – 1113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.030>

CARILLO, P.; GIBBON, Y.; 2011. PROTOCOL: extraction and determination of proline. *PrometheusWiki* 2011 1 – 5. <https://fr.scribd.com/document/249087860/PROTOCOL-Extraction-and-Determination-of-Proline>

DOMÍNGUEZ, J.; MACAYA-SANZ, D.; GIL, L.; MARTÍN J.A.; 2022. Excelling the progenitors: breeding for resistance to Dutch elm disease from moderately resistant and susceptible native stock. *For Ecol Manage* 511: 120113. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2022.120113>.

DOMÍNGUEZ, J.; MACAYA-SANZ, D.; RAMÍREZ-VALIENTE, J.A.; MARTÍN, J.A.; 2024. Genotype-by-environment interaction in Dutch elm disease resistance. *Agricultural and Forest Meteorology* 359: 110294 <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2024.110294>

GALANT A, PREUSS ML, CAMERON JC, JEZ JM. Plant glutathione biosynthesis: diversity in biochemical regulation and reaction products. *Front Plant Sci.* 2011 Sep 5;2:45. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00045>

HESSENAUER, P.; FIJARCZYK, A.; MARTIN, H. et al.; 2020. Hybridization and introgression drive genome evolution of Dutch elm disease pathogens. *Nat Ecol Evol* 4: 626 – 638. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-1133-6>

LI, M.; LÓPEZ, R.; VENTURAS, M.; MARTÍN, J.A.; DOMÍNGUEZ, J.; GORDALIZA, G.G.; GIL, L.; RODRÍGUEZ-CALCERRADA, J.; 2016. Physiological and biochemical differences among *Ulmus minor* genotypes showing a gradient of resistance to Dutch elm disease. *For. Pathol.* 46 215 – 228. <https://doi.org/10.1111/efp.12247>

MARTÍN, J.A.; SOLLA, A.; COIMBRA, M.A.; GIL, L.; 2005. Metabolic distinction of *Ulmus minor* xylem tissues after inoculation with *Ophiostoma novo-ulmi*. *Phytochemistry* 66: 2458 – 2467. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.08.004>

MARTÍN, J.; SOLLA, A.; VENTURAS, M.; et al.; 2015. Seven *Ulmus minor* clones tolerant to *Ophiostoma novo-ulmi* registered as forest reproductive material in Spain. *iForest* 8: 172 – 180. <https://doi.org/10.3832/ifor1224-008>

MARTÍN, J.A.; SOBRINO-PLATA, J.; RODRÍGUEZ-CALCERRADA, J.; et al.; 2019a. Breeding and scientific advances in the fight against Dutch elm disease: will they allow the use of elms in forest restoration? *New For* 50: 183 – 215. <https://doi.org/10.1007/s11056-018-9640-x>



MARTÍN, J.A.; SOBRINO-PLATA, J.; COIRA, B.; MEDEL, D.; COLLADA, C.; GIL, L.; 2019b. Growth resilience and oxidative burst control as tolerance factors to *Ophiostoma novo-ulmi* in *Ulmus minor*. *Tree Physiol.* 39 1512 – 1524. DOI:10.1093/treephys/tpz067

MARTÍN, J.A.; SOLLA, A.; OSZAKO, T.; GIL, L.; 2021. Characterizing offspring of Dutch elm disease-resistant trees (*Ulmus minor* Mill.). *For Int J For Res* 94(3): 374 – 385. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpaa040>

MARTÍNEZ-ARIAS, C.; SOBRINO-PLATA, J.; GIL, L.; RODRÍGUEZ-CALCERRADA, J.; MARTÍN, J.A.; 2021. Priming of plant defenses against *Ophiostoma novo-ulmi* by Elm (*Ulmus minor* Mill.) fungal endophytes. *J. Fungi* 7(9) 687 1 – 21. <https://doi.org/10.3390/jof7090687>

MCNABB, H.S.; HEYBROEK, H.M.; MACDONALD, W.L.; 1970. Anatomical factors in resistance to Dutch elm disease. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 76: 196–205. <https://doi.org/10.1007/BF01974331>

NOCTOR, G.; QUEVAL, G.; MHAMDI, A.; CHAOUCH, S.; FOYER, C.H.; 2011. Glutathione. *The Arabidopsis Book*. 9 1 – 32. <https://doi.org/10.1199/tab.0142>

ORTEGA-VILLASANTE, C.; RELLÁN-ÁLVAREZ, R.; DEL CAMPO, F.F.; CARPENA-RUIZ, R.O.; HERNÁNDEZ, L.E.; 2005. Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*. *J. Exp. Bot.* 56 (418) 2239 – 2251. DOI: 10.1093/jxb/eri223

PAN, X.; WELTI, R.; WANG, X.; 2010. Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Nat. protoc.* 5 (6) 986 – 992. DOI: 10.1038/nprot.2010.37

PERDIGUERO, P.; SOBRINO-PLATA, J.; VENTURAS, M.; MARTÍN, J.A.; GIL, L.; COLLADA, C.; 2018. Gene expression trade-offs between defence and growth in English elm induced by *Ophiostoma novo-ulmi*. *Plant. Cell Environ.* 41 198–214. DOI: 10.1111/pce.13085

PIETERSE, C.M.J.; VAN DER DOES, D.; ZAMIOUDIS, C.; LEON-REYES, A.; VAN WEES, S.C.M.; 2012. Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28 489 – 521. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154055

PITA, P.; RODRÍGUEZ-CALCERRADA, J.; MEDEL, D.; GIL, L.; 2018. Further insights into the components of resistance to *Ophiostoma novo-ulmi* in *Ulmus minor*: hydraulic conductance, stomatal sensitivity and bark dehydration. *Tree Physiol* 38: 252 – 262. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpx123>



SHALABY, S.; HORWITZ, B.A.; 2015. Plant phenolic compounds and oxidative stress: integrated signals in fungal–plant interactions. *Curr. Genet.* 61 347 – 357. <https://doi.org/10.1007/s00294-014-0458-6>

SHERIF, S.M.; SHUKLA, M.R.; MURCH, S.J.; BERNIER, L.; SAXENA, P.K.; 2016. Simultaneous induction of jasmonic acid and disease-responsive genes signifies tolerance of American elm to Dutch elm disease. *Sci. Rep.* 6 21934 1 – 15. <https://doi.org/10.1038/srep21934>

SOBRINO-PLATA, J.; BARÓN-SOLA, Á.; ORTEGA-VILLASANTE, C.; ORTEGA-CAMPAYO, V.; GONZÁLEZ-BERROCAL, C.; CONESA-QUINTANA, C.; CARRASCO-GIL, S.; MUÑOZ-PINILLA, M.; ABADÍA, J.; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, A.; HERNÁNDEZ, L.E.; 2021. Sulphur and biothiol metabolism determine toxicity responses and fate of mercury in *Arabidopsis*. *Environ. Exp. Bot.* 182 104302 1 – 14. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104302>

SOBRINO-PLATA, J.; MARTÍNEZ-ARIAS, C.; ORMEÑO-MONCALVILLO, S.; FERNÁNDEZ, I.; COLLADA, C.; GIL, L.; PIETERSE, C.M.J.; MARTÍN, J.A.; 2022. No priming, just fighting—endophytic yeast attenuates the defense response and the stress induced by Dutch elm disease in *Ulmus minor* Mill. *Tree physiol.* 42(10) 2086 – 2099. DOI: 10.1093/treephys/tpac062

SOLLA, A.; GIL, L.; 2002. Xylem vessel diameter as a factor in resistance of *Ulmus minor* to *Ophiostoma novo-ulmi*. *For Pathol* 32: 123 – 134. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0329.2002.00274.x>

SOLLA, A.; MARTIN, J.A.; CORRAL, P.; GIL, L.; 2005. Seasonal changes in wood formation of *Ulmus pumila* and *U. minor* and its relation with Dutch elm disease. *New Phytologist* 166(3): 1025 – 1034. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2005.01384.X>

TORRES-RUIZ, J.M.; HUBER, A.E.; BAUERLE, T.; 2024. Determination of maximum xylem vessel length by air-injection. *Prometheus Protocols in ecological & environmental science*. <https://prometheusprotocols.net/structure/morphology/stem-morphology/determination-of-maximum-xylem-vessel-length-by-air-injection/> Último acceso el 18-12-2024