

Relación entre parámetros de intercambio gaseoso y los primeros síntomas de *Ulmus minor* Mill. a la grafiosis

A. Solla, M. Burón, L. Gil *

Unidad de Anatomía, Fisiología y Mejora Genética. E.T.S.I. de Montes
Universidad Politécnica de Madrid. Paseo de las Moreras s/n. 28040-Madrid
lgil@montes.upm.es

RESUMEN

Con el objetivo de encontrar olmos resistentes a la grafiosis se han tratado de encontrar parámetros anatómicos o fisiológicos, fácilmente medibles, relacionados con la resistencia. Dado que los factores que favorecen la difusión de la enfermedad en el árbol conducen a una mayor sintomatología, se plantea la hipótesis de que la conductancia estomática (g_s) y la conductividad hidráulica foliar específica (C_H) puedan tener relación con la susceptibilidad. Estos parámetros se determinaron en 75 ejemplares de la especie *U. minor*, con edades de 7, 6, 3 y 2 savias ($n \geq 15$). Los ejemplares fueron inoculados posteriormente con el hongo de la grafiosis. En plantas de 7, 6, y 3 savias se observó una relación positiva entre g_s a las 14:00 h y el marchitamiento manifestado a los 15 días ($r^2 > 0,40$; $P \leq 0,01$). La relación se hizo más débil con el marchitamiento manifestado a los 60 días, y en plantas de 3 savias dejó de ser significativa. Resultados similares se obtuvieron entre C_H y el marchitamiento a los 15 días en olmos de 6 y 7 savias. Se piensa que las relaciones observadas responden a que un mayor intercambio gaseoso favorece la colonización o difusión del patógeno en el árbol. La falta de relación entre g_s o C_H y la susceptibilidad, en planta de 2 savias, desaconseja la utilización de estos parámetros para la selección precoz de *U. minor* resistentes.

PALABRAS CLAVE: *Ulmus minor*
Ophiostoma novo-ulmi
Grafiosis
Transpiración
Conductancia estomática
Conductividad hidráulica foliar específica

INTRODUCCIÓN

Los programas tradicionales de mejora genética para la obtención de olmos resistentes a la grafiosis conllevan una serie de procesos de selección de planta cuyo esfuerzo, du-

* Autor para correspondencia
Recibido: 9-1-01
Aceptado para su publicación: 5-3-01

ración y espacio ocupado implican un elevado coste económico (Cheng *et al.*, 1997). Tal es el caso del programa español, iniciado en 1986 por la Dirección General para la Conservación de la Naturaleza en colaboración con la Universidad Politécnica de Madrid (Solla *et al.*, 2000). La selección de olmos resistentes requiere inocularlos antes con el hongo patógeno *Ophiostoma novo-ulmi* Brasier, causante de la enfermedad. Para precisar la validez de los resultados, las inoculaciones se han de practicar sobre un mínimo de seis réplicas, plantadas en parcelas homogéneas. Se necesita, además, que la planta tenga una determinada edad ya que el olmo posee resistencia juvenil. Los ejemplares de dos años no muestran síntomas al ser infectados con grafiosis, y al tercero sólo lo hacen si han mostrado un crecimiento vigoroso (Heybroek, 1957). Esperar tres años supone un retraso considerable en cada ciclo de mejora.

Ante estas dificultades y para evitar largos procesos, se han tratado de desarrollar técnicas de selección precoz. Los objetivos han sido, en planta joven, encontrar un parámetro anatómico o fisiológico, fácilmente medible, relacionado con la resistencia. Las relaciones halladas entre la resistencia de *Ulmus americana* L. y la concentración de azúcares o de ciertos compuestos nitrogenados en la savia (Zentmyer *et al.*, 1946; Singh y Smalley, 1969a) no han sido utilizadas como metodología de selección, dado que no se han podido corroborar posteriormente (Elgersma, 1967; Singh y Smalley, 1969b). Se ha señalado al diámetro de los vasos xilemáticos como posible parámetro de selección (Elgersma, 1970), e incluso se elaboró un índice para ello (Sinclair *et al.*, 1975). Este índice no es utilizado en ningún programa actual debido a la laboriosidad de su obtención y al daño considerable que se causa en planta de una y de dos savias. La relación hallada por Pijut *et al.* (1990a, b) entre la resistencia de *U. americana* L. y el crecimiento *in vitro* de sus callos en presencia de toxinas de *O. novo-ulmi*, motivó la puesta a punto de una técnica de selección precoz dentro del programa español de mejora genética del olmo. Los resultados obtenidos *in vitro* con *U. minor* Mill. no se correspondieron, sin embargo, con la susceptibilidad real de los árboles (Díez y Gil, 1998, 1999), por lo que se abandonó esta línea de trabajo.

Los factores que favorecen la multiplicación y la difusión del patógeno a través de los elementos vasculares conducen a una mayor sintomatología (Tchernoff, 1965; Sinclair *et al.*, 1975). Uno de estos factores es la conductividad hidráulica, la cual es mayor en individuos de alta susceptibilidad en las especies *U. americana* L. (Melching y Sinclair, 1975) y *U. x hollandica* Mill. (Elgersma, 1970). La conductividad hidráulica foliar específica (C_H) de una planta se puede estimar a partir de los parámetros fisiológicos transpiración (E), potencial hídrico al amanecer (Ψ_a) y potencial hídrico al mediodía (Ψ_m) (Ginter-Whitehouse *et al.*, 1983; Pallardy, 1989). De obtenerse buenas correlaciones entre C_H y la susceptibilidad en planta joven, el parámetro fisiológico C_H podría ser utilizado como herramienta de selección a edades tempranas.

En ensayos realizados sobre *U. minor* Mill. y sus híbridos con *U. pumila* L., Díez (1996) aportó indicios de una relación entre la regulación estomática de la planta y su resistencia a la grafiosis. En el presente trabajo se pretende observar, en ejemplares de *U. minor*, si existe alguna correlación entre la conductancia estomática (g_s) y la susceptibilidad a la grafiosis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para estudiar la posible relación entre C_H o g_s y la susceptibilidad de *U. minor* a la grafiosis se midieron los parámetros potencial hídrico, transpiración y conductancia estomática sobre el material seleccionado. Posteriormente se evaluó la susceptibilidad de la planta y por último se compararon los resultados.

Material vegetal

El criterio utilizado para seleccionar el material vegetal fue incluir olmos con gran variabilidad de C_H y g_s al mediodía. Dado que se pretende encontrar una relación entre C_H o g_s y la susceptibilidad, se espera que al seleccionar olmos con gran variabilidad en sus parámetros fisiológicos se obtengan respuestas variadas ante la grafiosis. Se hizo una medición previa de estos parámetros a un total de 163 olmos (*U. minor* Mill.) de polinización abierta, de diferentes edades. Dentro de cada edad se eligió aquel material más homogéneo en cuanto a altura.

Se seleccionaron 75 olmos correspondientes a ocho familias, con edades de siete, seis, tres y dos savias (Tabla 1). Se utilizaron familias de siete y seis savias debido a que Díez (1996) encontró, en árboles de la misma edad, relaciones entre la regulación estomática y la resistencia. Las familias utilizadas no fueron las mismas en cada edad debido a que no se dispuso de dicho material. Veinte árboles tenían siete savias y una altura próxima a los tres metros. Se utilizaron 15 brinzales de seis savias cuya altura estuvo comprendida entre dos y tres metros. Por último se seleccionaron brinzales de tres y dos savias, 20 por cada edad, cuyas alturas medias se indican en la Tabla 1.

Tabla 1
Especificaciones del material vegetal empleado para estudiar la relación entre parámetros fisiológicos y la susceptibilidad a la grafiosis en ejemplares de *U. minor*

Edad	Familia		Altura ^a (m)	Procedencia	Progenitor femenino	
	Identificación	N			Altitud (m)	Entorno
7	GR-AL 2	10	2,81 ± 0,31	La Alhambra, Granada	760	parque o jardín masa natural
	SE-SN 3	10	2,71 ± 0,28	San Nicolás, Sevilla	500	
6	GR-AL 2	5	2,52 ± 0,19	La Alhambra, Granada	760	parque o jardín masa natural masa natural
	SE-CT 3	5	2,49 ± 0,23	Constantina, Sevilla	600	
	SE-CT 2	5	2,46 ± 0,14	Constantina, Sevilla	600	
3	AB-FP 2	10	0,84 ± 0,16	Fábrica de Paños, Albacete	640	zona rural masa natural
	V-BC 1	10	0,86 ± 0,15	Bocairente, Valencia	-	
2	M-TC 6	10	0,33 ± 0,14	Tres Cruces, Madrid	640	parque o jardín zona rural
	ZA-VL 1	10	0,21 ± 0,12	Valorio, Zamora	600	

^a Valor medio y desviación estándar.

La planta de seis y de siete savias fue aviverada durante dos años, antes de su plantación, en una parcela de inoculación sita en el Centro de Mejora Genética Forestal Puerta de Hierro, Madrid. El marco de plantación fue 1 m entre filas y 0,5 m entre columnas. Los brinzales de tres savias se plantaron al año siguiente de su germinación en la parcela de aviveramiento del mismo Centro. Los brinzales de dos savias se dispusieron en macetas de 25 cm de diámetro, conteniendo tierra de textura franco arenosa enriquecida con turba (4:1 v/v).

Medición de los parámetros fisiológicos

Los parámetros fisiológicos medidos fueron el potencial hídrico (Ψ ; MPa), la transpiración (E ; $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y la conductancia estomática (g_s ; $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). El potencial hídrico se midió con una cámara de presión (PMS 1000, Instrument Co., Corvallis, Oregón USA) (Scholander *et al.*, 1965). Los valores de E y g_s se obtuvieron mediante un analizador de gases en el infrarrojo (IRGA) portátil, modelo ADC-LCA 4 (Analytical Development Co. Ltd., Hoddesdon, Herts., U.K.). El aparato contó con una cámara acoplada para introducir las hojas, modelo Parkinson ADC, con capacidad de medición foliar de $6,25 \text{ cm}^2$. Para el cálculo de los parámetros se utilizó un software interno con las fórmulas descritas por Von Caemmerer y Farquhar (1981).

En la planta de siete savias las mediciones se realizaron los días 6 y 7 de mayo de 1998 en una hoja apical por brinjal y día. Los valores medios de ambos días fueron los utilizados para relacionar con la susceptibilidad. El potencial hídrico se midió a las 7:00 h (Ψ_a), 14:00 h (Ψ_m) y 18:00 h (Ψ_l). E y g_s se registraron a las 11:00 h, 14:00 h y 18:00 h. En la planta de seis savias se midieron los mismos parámetros y a la misma hora que en la planta de siete savias, durante los días 22 y 23 de abril de 1997. Idénticas mediciones se hicieron para la planta de dos y tres savias, entre el 24 y el 30 de abril de 1998.

A partir de las mediciones de E al mediodía, Ψ_a y Ψ_m , se estimó la conductividad hidráulica foliar específica (C_H) como la inversa de la resistencia (r) al flujo del agua en el continuo suelo-planta (Ginter-Whitehouse *et al.*, 1983; Pallardy, 1989):

$$C_H \cong \frac{1}{r} = \frac{E}{\Psi_{\text{suelo}} - \Psi_{\text{planta}}} \cong \frac{E}{\Psi_a - \Psi_m}$$

Todas las mediciones, excepto para la planta de dos savias, se hicieron al exterior en días despejados. Las plantas de dos savias se ubicaron en un invernadero, en el cual estuvieron aclimatadas durante un mes antes de hacer las mediciones. Las condiciones de temperatura y humedad relativa en el invernadero se mantuvieron en los intervalos de $25 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ y de $53 \pm 10 \%$. En el momento de medir, las macetas se colocaron bajo una lámpara de xenón que proporcionó una densidad de flujo fotosintético de $450 \text{ } \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Se eligieron siempre las hojas más expuestas.

Dos días antes del inicio de las mediciones las plantas fueron regadas abundantemente para que el suelo, o el sustrato de las macetas, estuvieran a capacidad de campo ($\text{HR} > 23 \%$). El contenido de la humedad del suelo se registró mediante un TDR (Trase System I, Soil Moisture Equipment Corp., USA). Se utilizaron sondas de 20 cm que fueron enterradas en las macetas o en cuatro puntos diametralmente opuestos a lo largo de las parcelas.

Evaluación de la susceptibilidad

Todos los olmos fueron inoculados tras las mediciones. La susceptibilidad de los árboles se pudo conocer tras inocularles artificialmente una cepa de la especie *Ophiostoma novo-ulmi*, raza NAN. El hongo fue aislado en 1996 en Allariz (Orense) sobre un ejemplar de *U. minor*. Presenta un crecimiento *in vitro* de 6,1 mm/día en medio de agar y malta (20 °C). Las inoculaciones se realizaron a los dos días de medir los parámetros. El procedimiento de inoculación se describe en Tchernoff (1965). La dosis empleada para inocular los olmos de siete y seis savias fue 0,10 ml de suspensión por árbol (10⁶ esporas/ml), a diferencia de 0,05 ml empleados en los olmos de tres y dos savias. Los cortes realizados en el tronco se cubrieron con parafilm para evitar una posible desecación o contaminación (Birkholz-Lambrecht *et al.*, 1977).

La susceptibilidad de los brinzales a la grafiosis se evaluó de dos maneras en función de la edad de la planta. En plantas de siete, seis y tres savias la susceptibilidad se evaluó a través de los porcentajes de marchitamiento foliar mostrados en la copa (Smalley y Guries, 1993). Dichos porcentajes se registraron a los 15, 30 y 60 días tras las inoculaciones. A partir de los 60 días el marchitamiento por grafiosis se mantiene constante hasta el final de la temporada. Los olmos se agruparon en tres clases de susceptibilidad según alcanzan, a los 60 días tras las inoculaciones, un porcentaje de marchitamiento comprendido entre 100 y 75 % (alta), 74 y 50 % (media), y 49 y 0 % (baja). El establecimiento de estas tres clases de susceptibilidad respondió a la intención de que en cada clase hubiera aproximadamente el mismo número de árboles, y de este modo, los análisis estadísticos fueran equilibrados.

En plantas de dos savias, al darse una ausencia de síntomas foliares debido a la resistencia juvenil descrita por Heybroek (1957), la susceptibilidad se estimó a partir de la coloración causada por el hongo en el interior de la planta. A los 30 días de la inoculación se midió la altura alcanzada por el hongo en la totalidad del anillo de crecimiento. Para medir dicha altura se siguió el procedimiento descrito por Green y Guries (1985), cortándose las plántulas en el punto de inoculación y seccionándose a intervalos de 1 cm. La susceptibilidad se ponderó mediante un índice de coloración (I_c), obtenido al dividir la altura alcanzada por el hongo entre la altura total de la planta. Los olmos se agruparon en tres clases de susceptibilidad según su índice estuviera comprendido entre 1,00 y 0,75 (alta); 0,74 y 0,50 (media) y 0,49 y 0,0 (baja).

Procesado de datos y análisis estadístico

Para relacionar los parámetros fisiológicos con la susceptibilidad de los olmos se siguieron dos procedimientos. El primero consistió en considerar las tres clases de susceptibilidad asignadas: alta, media y baja. Se hicieron ANOVAs unifactoriales tomando como variables los parámetros y como factor principal la clase de susceptibilidad. Para la comparación de medias se utilizaron tests LSD de Fisher ($P \leq 0,05$).

El segundo procedimiento consistió en establecer regresiones simples y polinómicas entre los valores de los parámetros y los porcentajes de marchitamiento o los índices de coloración. Los porcentajes y los índices se normalizaron mediante la transformación $\arcsen(x/100)^{1/2}$. En los análisis de regresión se calcularon los coeficientes de regresión (r^2), bien considerando a todo el conjunto de árboles, o bien para cada fami-

lia. La significación de los mismos se obtuvo a partir de ANOVAs. El programa informático utilizado para el análisis estadístico fue Statgraphics Plus v2.1 (Statistical Graphics Corp.TM).

RESULTADOS

Relación entre los parámetros fisiológicos y la susceptibilidad de olmos de siete savias

El marchitamiento observado a los 60 días de inocular fue muy variable, con valores entre 15 y 90 % ($\sigma_{n-1} = 22,6$). Al agrupar los árboles en clases de susceptibilidad se tuvieron seis individuos en la clase alta, siete en la clase media y siete en la clase baja. En la Figura 1a se muestran los valores medios de Ψ_a , Ψ_m , g_s al mediodía y C_H obtenidos en cada clase de susceptibilidad. El único valor medio diferente en las tres clases de susceptibilidad fue g_s a las 14:00 h. Los olmos de la clase susceptible tuvieron un valor medio de g_s mayor al de los olmos de la clase resistente.

Los valores de Ψ_t ($-1,10 \pm 0,12$ MPa; media \pm ES) no difirieron significativamente de los de Ψ_m ($-1,21 \pm 0,17$ MPa) para las tres clases de susceptibilidad ($P > 0,10$). Los valores medios de g_s obtenidos a las 14:00 h (120 ± 25 mmol m⁻²s⁻¹) no difirieron significativamente de los medidos a las 11:00 h (111 ± 14 mmol m⁻²s⁻¹) y a las 18:00 h (115 ± 23 mmol m⁻²s⁻¹). No obstante, los valores medios de E obtenidos a las 14:00 h ($4,27 \pm 0,27$ mmol m⁻²s⁻¹) fueron mayores a los medidos a las 11:00 h ($3,67 \pm 0,31$ mmol m⁻²s⁻¹) y a las 18:00 h ($3,41 \pm 0,45$ mmol m⁻²s⁻¹) ($P \leq 0,01$).

Considerando el conjunto de todos los árboles, se hicieron análisis de regresión lineal y polinómica entre los parámetros fisiológicos y el marchitamiento manifestado a los 15, 30 y 60 días tras las inoculaciones. En la Tabla 2a se muestran los coeficientes de regresión y las significaciones de los modelos lineales. Estas significaciones no difirieron sustancialmente de las obtenidas en los modelos polinómicos. Las mayores significaciones se obtuvieron con el marchitamiento manifestado a los 15 días. Únicamente g_s a las 14:00 h se relacionó con la susceptibilidad manifestada a los 60 días. No hubo relación entre Ψ_a , Ψ_m y Ψ_t y los porcentajes de marchitamiento.

Considerando a las familias por separado, en la denominada GR-AL 2 se obtuvieron relaciones lineales positivas entre C_H o g_s a las 14:00 h, y el marchitamiento a los 15 días de inocular ($r^2 > 0,65$; $P \leq 0,01$) (Fig. 2). El marchitamiento a los 60 días no se relacionó con los valores de C_H ($r^2 = 0,08$; $P > 0,10$), aunque sí con g_s ($r^2 = 0,60$; $P \leq 0,10$). En la familia SE-SN 3, la única relación significativa se obtuvo entre g_s a las 14:00 h y el marchitamiento a los 15 días de inocular ($r^2 = 0,34$; $P \leq 0,10$).

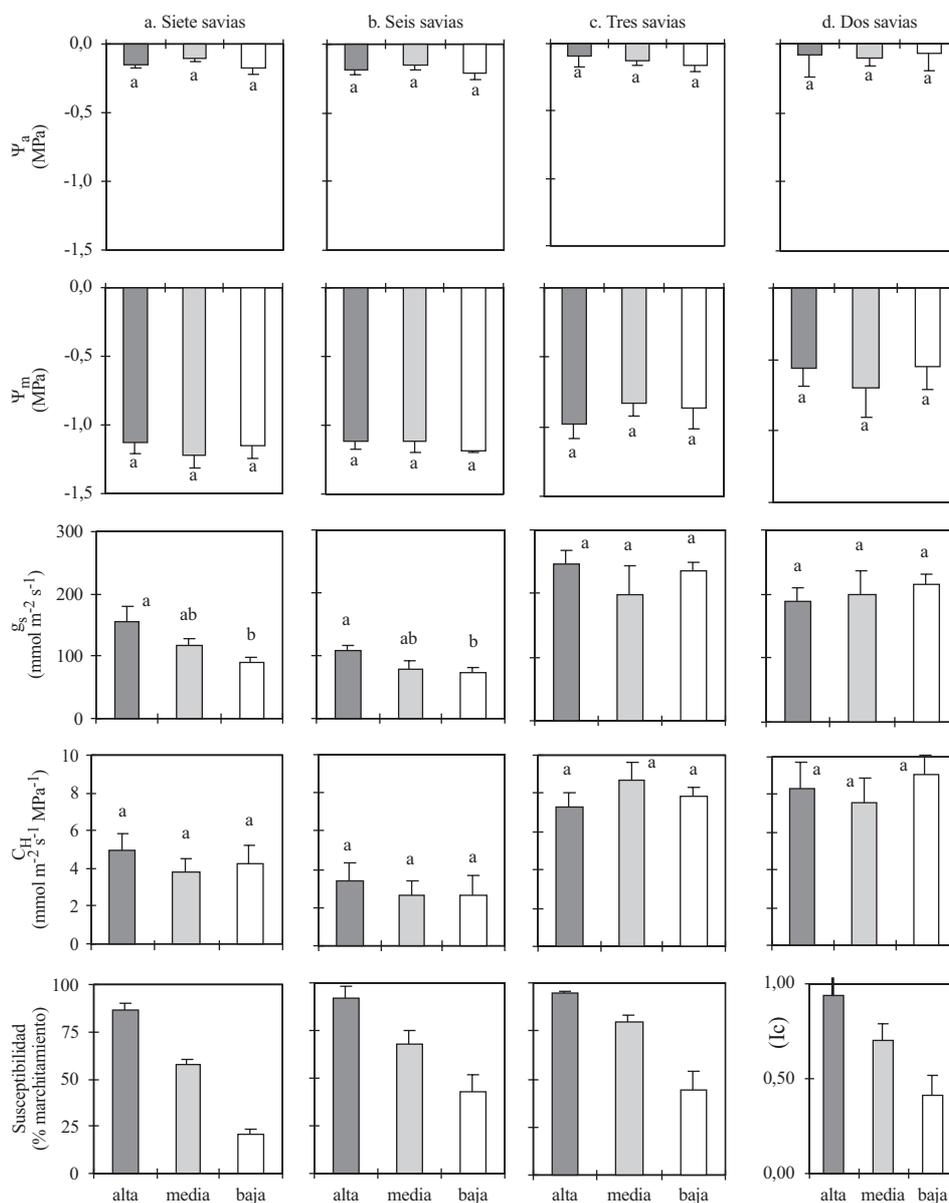


Fig. 1.—Potenciales hídricos al amanecer (Ψ_a) y al mediodía (Ψ_m), conductancias estomáticas al mediodía (g_s) y conductancias hidráulicas foliares específicas (C_H) de ejemplares de *U. minor* con susceptibilidades alta (■), media (□) y baja (■)

Cada barra representa la media de mediciones durante dos días en árboles de siete (a), seis (b), tres (c) y dos savias (d) ($n \geq 4$). Las líneas verticales son errores estándar y las letras distintas indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Tabla 2

Coefficientes de regresión entre los parámetros fisiológicos conductancia estomática (g_s) o conductividad hidráulica foliar específica (C_H) y el marchitamiento foliar a los 15, 30 y 60 días de inocular ejemplares de *U. minor* de siete (a), seis (b), tres (c), y dos savias (d)

		Parámetros fisiológicos			
		g_s			C_H
		11:00 h	14:00 h	18:00 h	–
a) Marchitamiento en olmos de siete savias (n = 20)	día 15	0,42 ***	0,41 ***	0,04	0,17 *
	día 30	0,25 **	0,23 **	0,02	0,07
	día 60	0,13	0,18 *	0,04	0,10
b) Marchitamiento en olmos de seis savias (n = 15)	día 15	0,22	0,50 ***	0,14	0,34 **
	día 30	0,02	0,50 ***	0,12	0,31 **
	día 60	0,11	0,42 ***	0,06	0,16
c) Marchitamiento en olmos de tres savias (n = 20)	día 15	0,02	0,40 ***	0,09	0,07
	día 30	0,12	0,23 **	0,09	0,01
	día 60	0,05	0,04	0,11	0,00
d) Marchitamiento en olmos de dos savias (n = 20)	día 15	0,07	0,00	0,04	0,04
	día 30	0,01	0,13	0,11	0,08
	día 60	0,15	0,06	0,09	0,04

Las significaciones se indican mediante: * $P \leq 0,10$; ** $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,01$.

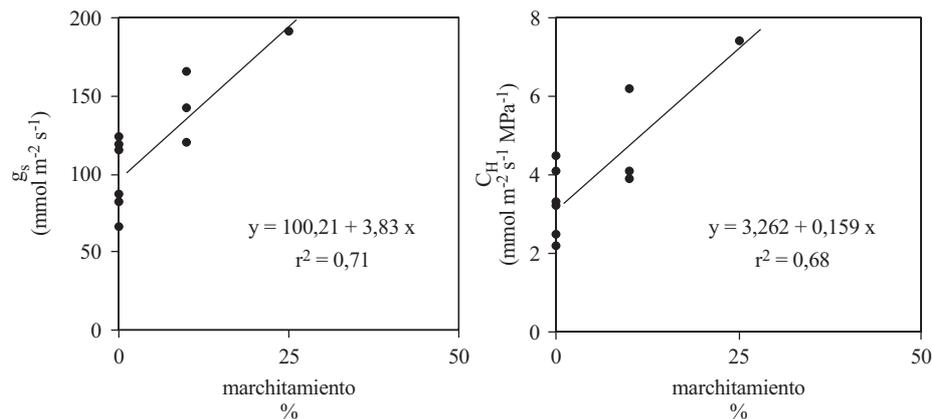


Fig. 2.—Conductancias estomáticas al mediodía (g_s), conductividades hidráulicas foliares específicas (C_H) y porcentajes de marchitamiento a los 15 días de inocular diez ejemplares *U. minor* de siete savias (familia GR-AL 2)

Relación entre los parámetros fisiológicos y la susceptibilidad de olmos de seis savias

El marchitamiento medio de los olmos de seis savias a los 60 días de inocular fue 64 % ($\sigma_{n-1} = 18,7$). Al agrupar los árboles en clases de susceptibilidad se tuvieron siete individuos en la clase alta, cuatro en la clase media y cuatro en la clase baja. En la Figura 1b se muestran los porcentajes de marchitamiento y Ψ_a , Ψ_m , g_s al mediodía y C_H de cada clase de susceptibilidad. Se observa que los olmos de la clase más susceptible tuvieron un valor medio de g_s al mediodía mayor a los de la clase más resistente ($P \leq 0,05$). Los máximos valores medios de E y g_s se alcanzaron a las 14:00 h ($P \leq 0,10$), siendo $2,90 \pm 0,23 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y $89 \pm 10 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ respectivamente.

Considerando el conjunto de todos los ejemplares, se obtuvieron altos coeficientes de regresión entre g_s a las 14:00 h y el marchitamiento de los olmos a los 15, 30 y 60 días de inocular (Tabla 2b). Los valores de C_H también se relacionaron positivamente con el marchitamiento a los 15 y 30 días.

Al realizar análisis de regresión lineales en la familia SE-CT 3 se obtuvieron relaciones positivas entre g_s a las 14:00 h y el marchitamiento de los brinzales a los 15, 30 y 60 días de inocular ($r^2 > 0,64$; $P \leq 0,10$). En la familia GR-AL 2 la relación sólo fue significativa entre g_s a las 14:00 h y el marchitamiento a los 15 días ($r^2 = 0,88$; $P \leq 0,05$), y entre C_H y el marchitamiento a los 15 días ($r^2 = 0,53$; $P \leq 0,10$). En SE-CT 2 no se observó relación alguna.

Relación entre los parámetros fisiológicos y la susceptibilidad de olmos de tres savias

A los 60 días tras las inoculaciones, el marchitamiento medio de los olmos de tres savias fue 76.5 % ($\sigma_{n-1} = 12,8$). Once olmos se incluyeron en la clase de alta susceptibilidad, cinco en la clase media, y cuatro en la clase baja. Ninguno de los parámetros medidos resultó ser estadísticamente diferente para cada una de las tres clases de susceptibilidad (Fig. 1c). Los valores medios de E a las 14:00 h ($6,25 \pm 0,32 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) fueron mayores a los medidos a las 11:00 h ($5,01 \pm 0,25 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y a las 18:00 h ($4,88 \pm 0,21 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ($P \leq 0,05$).

Para los 20 olmos, los valores de g_s medidos a las 14:00 h se relacionaron positivamente con el marchitamiento foliar a los 15 y 30 días de inocular (Tabla 2c). A los 60 días de inocular no se obtuvo ninguna relación significativa, lineal o polinómica, entre los parámetros fisiológicos y el marchitamiento.

En la familia denominada AB-FP 2, ningún coeficiente de regresión resultó significativo. En la familia V-BC 1, los valores de g_s medidos a las 14:00 h mostraron una alta relación lineal con el marchitamiento foliar a los 15 días de inocular ($r^2 = 0,67$; $P \leq 0,01$). Entre C_H y el marchitamiento no se observó relación alguna.

Relación entre los parámetros fisiológicos y la susceptibilidad de olmos de dos savias

No se apreciaron síntomas externos de marchitamiento al mes de inocular la planta de dos savias. No obstante, se pudo observar con claridad el ennegrecimiento del anillo del año causado por el ascenso del hongo desde el punto de inoculación. La altura media de este ennegrecimiento fue 34,8 cm ($\sigma_{n-1} = 22,6$), y el índice de coloración (I_C) medio fue 0,73 % ($\sigma_{n-1} = 0,19$).

Al agrupar los árboles en tres clases de susceptibilidad según el valor de I_C , se obtuvieron siete olmos en la clase alta, nueve en la media y cuatro en la baja. Los valores medios de los parámetros fisiológicos fueron iguales en las tres clases de susceptibilidad (Fig. 1). Los modelos de regresión realizados entre I_C y los parámetros fisiológicos medidos no resultaron significativos (Tabla 2).

DISCUSIÓN

Lo más destacable de los resultados es la relación hallada entre la susceptibilidad a la grafiosis de olmos de seis y siete savias y los valores de los parámetros fisiológicos conductancia estomática (g_s) y conductividad hidráulica foliar específica (C_H). Los olmos con valores más altos de g_s a las 14:00 h y de C_H fueron los que manifestaron, tras ser inoculados, una mayor susceptibilidad inicial. Se puede aceptar que esta relación responde a que g_s y C_H influyen en la difusión del hongo y de sus toxinas en el árbol, siendo más rápida en árboles con los valores más altos.

La hipótesis de que un mayor intercambio gaseoso origina mayores síntomas de grafiosis es apoyada por distintos trabajos. Went (1938) y Tchernoff (1965), observaron que, tras inocular olmos artificialmente, los síntomas se manifestaban con mayor rapidez e intensidad si el ambiente era seco y cálido. Ambas circunstancias suelen incrementar la tasa de transpiración en las plantas (Lange *et al.*, 1971). Al inocular en días húmedos y fríos, algunos olmos no mostraron síntomas. Ante esto, ya Went (1938) había destacado la importancia del movimiento de la savia en la planta para el transporte del hongo. En otros trabajos se ha observado que ejemplares resistentes presentan hojas más pequeñas que ejemplares susceptibles, y se ha relacionado esta circunstancia con la difusión interna del patógeno (Lester y Smalley, 1972; Townsend y Schreiber, 1976). En general, cuanto mayor es la superficie foliar más intercambio gaseoso se produce (Kramer y Boyer, 1995). En el trabajo realizado por Díez (1996) se obtuvieron menores valores medios de g_s al mediodía para ejemplares de *U. minor* × *U. pumila* que para ejemplares de *U. minor*. La susceptibilidad de los híbridos a la grafiosis resultó también menor que la de los ejemplares de *U. minor*.

En la Tabla 2 se observa que los mayores coeficientes de regresión entre las variables marchitamiento y g_s se obtuvieron a las 14:00 h. Los coeficientes fueron menores o no significativos por la mañana y al atardecer. Se piensa que la relación ha sido mayor al mediodía porque en ese momento la transpiración es máxima, y se produce una mayor difusión del patógeno y de sus toxinas en la planta. Cuando las transpiraciones son elevadas, la difusión de fungicidas sistémicos inyectados en raíces de olmo se ve favorecida (Prasad, 1975).

Los mayores coeficientes se obtienen de relacionar g_s o C_H con los síntomas a los 15 días de inocular. A los 30 y 60 días los coeficientes son menores o no significativos. Una posible explicación se obtiene al dividir el proceso de la enfermedad de la grafiosis en dos etapas, una inicial y otra subsecuente. La etapa inicial se conoce como periodo de incubación y es el tiempo entre la infección y la expresión de síntomas, durante la cual tiene lugar la colonización o difusión del patógeno por el árbol (MacHardy, 1978). En esta etapa tiene lugar la formación de esporas que originan nuevo micelio. En la etapa subsecuente interviene la respuesta del hospedante al patógeno (Dixon *et al.*, 1994).

La expresión final de los síntomas depende de lo ocurrido en ambas etapas: habrá más marchitamiento cuanto más difusión tenga la enfermedad y cuanto menos capacidad de respuesta tenga el hospedante. Con *Fusarium oxysporum* var. *cubense* en banana, la susceptibilidad final depende mayoritariamente de la rapidez con que se difunde el hongo (Beckman *et al.*, 1962). Por el contrario, el marchitamiento producido por *F. oxysporum* var. *lycopersici* en tomate depende más de la capacidad de respuesta del hospedante.

En la grafiosis, el grado de difusión del patógeno en el árbol condiciona la efectividad de los mecanismos de defensa (Ouellette y Rioux, 1992), luego ambas etapas tienen gran importancia en la sintomatología final. Dado que el período de incubación de la grafiosis en el olmo dura entre 6 y 20 días (Pomerleau, 1970), los síntomas observados a los 15 días dependerán fundamentalmente del grado de difusión del patógeno.

La menor relación hallada entre g_s o C_H con la sintomatología a los 30 y 60 días responde a la incidencia de la segunda etapa. El hecho de que los coeficientes de regresión pierdan significación según avanza el tiempo desde la infección, apunta a que no exista relación entre g_s o C_H y los mecanismos de defensa que el olmo activa ante la grafiosis (oclusión de vasos, producción de fitoalexinas, etc.).

En los brinzales de dos y de tres savias no se encontró relación alguna entre los parámetros g_s o C_H y la susceptibilidad final a *O. novo-ulmi*. Buisman (1932), midiendo transpiraciones según el método propuesto por Livingston y Shreve (1916) no halló relación entre este parámetro y la susceptibilidad de varias especies de olmo a *O. ulmi*. El potencial hídrico tampoco se ha visto relacionado con la resistencia de los ejemplares de *U. minor*, confirmando a Melching y Sinclair (1975) en *U. americana*. Ante estos resultados no se sugiere medir estos parámetros fisiológicos para la selección precoz de *U. minor* frente a la grafiosis. Ya que la susceptibilidad en *U. minor* se mantiene constante a partir de las cuatro savias (datos sin publicar), resulta más conveniente para proceder a la selección inocularlos a esa edad.

AGRADECIMIENTOS

A Yolanda Menéndez y M.^a Eugenia García-Nieto por la colaboración técnica prestada y a Salustiano Iglesias y Manuel Tuero por su apoyo constante. Especialmente agradecidos a Ismael Aranda por la revisión del manuscrito. El trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Medio Ambiente a través de la DGCONA.

SUMMARY

Relationship between gas exchange parameters and first symptoms of *Ulmus minor* Mill. to Dutch elm disease

Research has been carried out into the identification of easily measured anatomical or physiological parameters that are related to resistance, with the aim of screening elms resistant to Dutch elm disease. Given that the factors which encourage diffusion of this disease in elms also lead to an increase in symptoms, it is hypothesised that stomatal conductance (g_s) and specific leaf hydraulic conductivity (C_H) could be related to susceptibility. These parameters were determined in 75 *U. minor* seedlings, aged 7, 6, 3 and 2 years old ($n \geq 15$), which were subsequently inoculated with the Dutch elm disease fungus. In plants of 7, 6, and 3 years a positive relationship was observed between g_s at 14 hours, and the amount of wilting shown after 15 days ($r^2 > 0.40$; $P \leq 0.01$). This relationship was shown weaker with the amount of wilting after 60 days in 7 and 6 year old plants, whilst in 3 year old plants it became nonsignificant. Similar results were obtained between C_H and the amount of wilting af-

ter 15 days in elms of 6 and 7 years. It is thought that the relationships observed occurred because a greater gas exchange favours the colonisation or diffusion of the pathogen within the tree. The fact that neither g_s nor C_H showed relationships with susceptibility in two year old plants makes it inadvisable to use these parameters for the early screening of resistant *U. minor* trees.

KEY WORDS: *Ulmus minor*
Ophiostoma novo-ulmi
 Dutch elm disease
 Transpiration
 Estomatic conductance
 Specific leaf hydraulic conductivity.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BECKMAN C. H., HALMOS S., MACE M. E., 1962. The interaction of host, pathogen and soil temperature in relation to susceptibility to *Fusarium* wilt of bananas. *Phytopathology*, 52, 134-140.
- BIRKHOLZ-LAMBRECHT A. F., LESTER D. T., SMALLEY E. B., 1977. Temperature, host genotype, and fungus genotype in early testing for Dutch elm disease resistance. *Plant Dis. Repr.* 61, 238-242.
- BUISMAN C. J., 1932. Verslag van de phytopathologische onderzoekingen over de iepenziekte, verricht in het Phytopathologisch Laboratorium «Willie Commelin Scholten» te Baarn, Gedunde 1931. *Tijdschr. Plziekt.* 38, 17-36.
- CHENG Z. M., SHI N. Q., HERMAN D. E., CAPPS T. K., 1997. Building in resistance to Dutch elm disease. *Journal of Forestry*, March, pp. 24-27.
- DÍEZ J. 1996. Desarrollo y evaluación de técnicas de selección «in vitro» de olmos resistentes a la grafiosis Tesis Doctoral. E.T.S.I. de Montes. Universidad Politécnica de Madrid. 155 pp.
- DÍEZ J., GIL L., 1998. Variability in phenylalanine ammonia-lyase activity among cell cultures of elm clones inoculated with *Ophiostoma novo-ulmi* spores. *Pl. Path.* 47, 687-692.
- DÍEZ J., GIL L., 1999. Effects of *Ophiostoma ulmi* and *Ophiostoma novo-ulmi* culture filtrates on elm culture from genotypes with different susceptibility to Dutch Elm Disease. *Eur. J. For. Path.* 28, 399-407.
- DIXON R. A., HARRISON M. J., LAMB C. J., 1994. Early events in the activation of plant defense responses. *Ann. Rev. Phytopathol.* 32, 479-501.
- ELGERSMA D. M., 1967. Factors determining resistance of elms to *Ceratocystis ulmi*. *Phytopathology*, 57, 641-642.
- ELGERSMA D. M., 1970. Length and diameter of xylem vessels as a factors in resistance of elms to *Ceratocystis ulmi*. *Neth. J. Pl. Path.* 76, 179-182.
- GINTER-WHITEHOUSE D. L., HINCKLEY T. M., PALLARDY S. G., 1983. Spatial and temporal aspects of water relations of three tree species with different vascular anatomy. *Forest Sci.* 29, 317-329.
- GREEN C. E., GURIES R. P., 1985. Early screening of elms for resistance to *Ceratocystis ulmi*. *Plant Dis.* 69, 60-63.
- HEYBROEK H. M., 1957. Elm breeding in the Netherlands. *Silvae Genetica*, 6, 112-117
- KRAMER P., BOYER J., 1995. Water relations of Plants and Soils. Academic Press, 485 pp.
- LANGE O. L., LÖSCH R., SCHULZE E.-D., KAPPEN L., 1971. Responses of stomata to changes in humidity. *Planta*, 100, 76-86.
- LESTER D. T., SMALLEY E. B., 1972. Variation in ornamental traits and disease resistance among crosses of *Ulmus pumila*, *U. rubra*, and putative natural hybrids. *Silvae Genetica*, 21, 193-197.
- LIVINGSTON B. E., SHREVE E. B., 1916. Improvenets in the Method for determining the Transpiring Power of Plant Surfaces by Hygrometric Paper. *The Plant World*. 19, 287.
- MACHARDY, W. E., 1978. Mechanisms of resistance. En: Dutch elm disease: perspective after 60 years. Sinclair W. A. y Campana R. J., ed. *Search. Agr.*, Ithaca, N.Y., vol. 8, n.º 5, pp. 25-27.
- 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.
- OUELLETTE G. B., RIOUX D., 1992. Anatomical and physiological aspects of resistance to Dutch Elm Disease. En: Defense mechanism of woody plants against fungi. Blanchette A. y Biggs R., ed. Springer-Verlag, pp. 257-301.
- PALLARDY, S. G., 1989. Hydraulic architecture and conductivity: an overview. En: Structural and functional responses to environmental stresses: water shortage. Kreeb K. H., Richter H. y Hinckley T. M., ed. SPB Academic Publishing. pp. 3-21

- PIJUT P. M., DOMIR S., LINEBERGER D., SCHREIBER L., 1990a. Use of culture filtrates of *Ceratocystis ulmi* as a bioassay to screen for disease tolerant *Ulmus americana*. *Plant Science*, 70, 191-196.
- PIJUT P. M., LINEBERGER D., DOMIR S., ICHIDA J. M., KRAUSE C. R., 1990b. Ultrastructure of cells of *Ulmus americana* cultured in vitro and exposed to the culture filtrate of *Ceratocystis ulmi*. *Phytopathology*, 80, 764-767.
- POMERLEAU R., 1970. Pathological anatomy of the Dutch elm disease. Distribution and development of *Ceratocystis ulmi* in elm tissues. *Can. J. Bot.* 48, 2043-2057.
- PRASAD R., 1975. Protection of elm trees against the Dutch elm disease (*Ceratocystis ulmi* Buisson/Moreau) in the urban environments: Some factors affecting uptake and translocation of the systemic fungicide, Benomyl, by roots. II FAO/IUFRO World, Technical Consultation on Forest Diseases and Insects. New Delhi, India. April 7-12, 12 pp.
- SCHOLANDER P. F., HAMMEL H. T., BRADSTREET E. D., HEMMINGS E. A., 1965. Sap pressures in vascular plants. Negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science*, 148, 339-346.
- 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., 1969a. Nitrogenous and carbohydrate compounds in the xylem sap of *Ulmaceae* species varying in resistance to Dutch elm disease. *Can. J. Bot.* 47, 335-339.
- SINGH D., SMALLEY E. B., 1969b. Nitrogenous compounds in the xylem sap of American elms with Dutch elm disease. *Can. J. Bot.* 47, 1061-1065.
- SMALLEY E. B., GURIES R. P., 1993. Breeding elms for resistance to Dutch elm disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* 31, 325-352.
- SOLLA A., BURÓN M., IGLESIAS S., GIL L., 2000. Spanish program for the conservation and breeding of elms against DED. In: *The Elms: Breeding, Conservation and Disease Management*. Dunn, C. P., ed. Kluwer Academic Publishers, pp. 295-303.
- TCHERNOFF V., 1965. Methods for screening and for the rapid selection of elms for resistance to Dutch elm disease. *Acta Bot. Neerl.* 14, 409-452.
- TOWNSEND A. M., SCHREIBER L. R., 1976. Resistance of hybrid elm progenies to *Ceratocystis ulmi*. *Phytopathology*, 66, 1107-1110.
- VON CAEMMERER S., FARQUHAR G. C., 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta*, 153, 376-387.
- WENT J. C., 1938. Compilation of the investigations on the susceptibility of different elms to *Ceratostomella ulmi* Buisson in the Netherlands. *Phytopathol. Z.* 11, 181-201.
- ZENTMYER G. A., HORSFALL J.G., WALLACE P. P., 1946. Dutch elm disease and its chemotherapy. *Conn. Agr. Exp. Stn. Bull.* 498, 70 pp.