



# 7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

**Gestión del monte: servicios  
ambientales y bioeconomía**

26 - 30 junio 2017 | Plasencia  
Cáceres, Extremadura

---

---

7CFE01-466

---

---

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales  
**Plasencia. Cáceres, Extremadura. 26-30 junio 2017**  
**ISBN 978-84-941695-2-6**

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

## Efectos del hongo endófito *Rhodotorula* sp. en la planta hospedante *Ulmus minor* Mill. y su relación con la resistencia a la grafiosis

SOBRINO-PLATA, J., ORMEÑO, S.M., COIRA, B., MEDEL, D., MARTÍN, J.A., COLLADA, C., GIL, L.

Grupo de Investigación en Genética, Fisiología e Historia Forestal, E.T.S.I. Montes, Forestal y del Medio Natural, Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria S/N. 28040 Madrid.

### Resumen

La grafiosis de los olmos, causada por el hongo patógeno *Ophiostoma novo-ulmi*, ha provocado la desaparición paulatina de esta especie, tanto dentro como fuera de España, en apenas unas décadas. Desde hace un tiempo se ha propuesto el uso de hongos endófitos como herramienta de biocontrol en la protección de distintas especies vegetales. Genotipos de olmos tolerantes y susceptibles a esta enfermedad fueron expuestos a un hongo endófito (*Rhodotorula* sp.) y a *O. novo-ulmi* con el fin de comprobar el potencial de esta estrategia. Se monitorizó la colonización de ambos hongos en estas plantas mediante la amplificación por PCR de sus regiones ITS. Además, se midió la acumulación de distintas sustancias relacionadas con el estrés biótico y fueron analizados cambios en la expresión de genes relacionados con respuestas de defensa. Se detectó una fuerte sobreexpresión del gen de la fenilalanina amonio-liasas (*PAL*) en la raíz de todos los genotipos con la inoculación de *Ophiostoma*, y de diferentes genes relacionados con patogénesis (*PR*) en la parte aérea de uno de los genotipos susceptibles. Por último, efectos beneficiosos en la asociación entre plantas de *U. minor* y *Rhodotorula* frente a *O. novo-ulmi* fueron observados en las distintas mediciones.

### Palabras clave

*Ophiostoma novo-ulmi*, *Ulmus minor*, endófitos, cultivo *in vitro*, defensa.

### 1. Introducción

La grafiosis del olmo, causada por el hongo exótico *Ophiostoma novo-ulmi* Brasier, ha eliminado la casi totalidad de los olmos adultos en Europa y Norte América. Posiblemente es la enfermedad forestal más devastadora del último siglo. La desaparición paulatina de *Ulmus minor* Mill. en nuestro país y en el resto de Europa ha provocado que en las últimas décadas se hayan estudiado los efectos de este patógeno en los olmos a distintos niveles de organización consiguiéndose avances como la catalogación de varios genotipos de *U. minor* tolerantes a la enfermedad (Martín et al. 2015). La existencia de estos genotipos proporciona una herramienta con la que estudiar la interacción entre el árbol y el patógeno con el objetivo de desentrañar los posibles mecanismos de defensa que los olmos tolerantes poseen para impedir la colonización del patógeno. Hasta la fecha se han realizado algunos estudios en este sentido (Solla & Gil 2002; Martín et al. 2010), pero hay todavía un gran sesgo en el conocimiento de las respuestas frente al patógeno a nivel molecular, hormonal y metabólico.

De manera general, las respuestas que se producen por ataque de un patógeno a la planta pueden ser separadas en dos tipos, i) una respuesta local que iniciará la activación de diversos genes y alteraciones en el metabolismo secundario y que dará lugar a señales importantes para la inducción de distintos mecanismos de defensa en la planta, lo que produce el segundo tipo de respuesta, ii) la respuesta sistémica. Normalmente esta última se da en una zona alejada de aquélla en la que se produjo el contacto con el patógeno, y es importante para la activación de distintos mecanismos que

protegen a la planta e impiden el avance tanto del propio patógeno como de los efectos adversos producidos por éste (Hammond-Kosack & Jones 2000).

En este aspecto hay que tener en cuenta diferentes procesos importantes a la hora de estudiar la interacción de nuestro patógeno (*O. novo-ulmi*) con las plantas de *Ulmus minor*. Por ejemplo, la inducción de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) cumple un papel central en la señalización de la respuesta frente al ataque de patógenos. Las ROS son producidas en las células que están en contacto con el patógeno y pueden actuar como moléculas señal de la respuesta de defensa ya que difunde entre las células. Estas ROS junto con el ácido salicílico (SA) y el óxido nítrico (NO) activan muchos de los mecanismos de defensa de la planta, incluyendo la muerte celular programada que se produce principalmente en las células de la zona de contacto con el patógeno (Klessig et al. 2000). El efecto inmediato del aumento de ROS supone un desajuste en el balance redox de la célula vegetal causado por la superación de la capacidad del sistema antioxidante de la célula que se traduce en un estrés oxidativo (Mittler 2002). Además del SA, fitohormonas como el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET) son consideradas como piezas clave en el establecimiento de la resistencia a enfermedades producidas por diversas interacciones con patógenos, concretamente tienen un papel muy importante en la señalización para la inducción de la respuesta sistémica de la planta (Glazebrook 2005). La composición y coordinación temporal de esta mezcla de hormonas determina si una planta se convierte en tolerante o susceptible frente a la invasión de un organismo y esta respuesta puede estar mediada por JA o SA dependiendo del carácter necrótrofo o biotrófo del patógeno respectivamente (Pieterse et al. 2012). El análisis de esta red hormonal, su regulación y su implicación en las respuestas de defensa está todavía por determinar en nuestro caso concreto de interacción *O. novo-ulmi* – *U. minor*.

En muchos sistemas planta-patógeno se ha demostrado el efecto beneficioso de hongos endófitos, ya sea porque incrementan el crecimiento de la planta hospedadora o por un efecto directo sobre el patógeno (Fouda et al., 2015). Algunos hongos que se encuentran en los tejidos de los olmos podrían ser usados como agentes de biocontrol. Hasta la fecha tan sólo se ha probado con éxito el uso de un patógeno débil frente a *O. novo-ulmi* como el caso en el que la cepa WCS850 de *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold redujo la aparición de síntomas de la grafiosis en árboles adultos (Scheffer et al., 2008). De hecho, esta cepa se comercializa como producto de biocontrol llamado Dutch Trig® y es usado desde 1992 como producto preventivo, pero no protege a los árboles ya infectados (Postma & Goossen-van de Geijn, 2016). El uso de ciertos hongos endófitos encontrados en nuestro laboratorio en mayor proporción en tejidos de olmos tolerantes a la grafiosis, podría ser la base para una nueva estrategia de aumento de la resistencia a la grafiosis de genotipos susceptibles.

En este trabajo se utilizó un sistema novedoso para el estudio de la resistencia a la grafiosis, la micropropagación de clones de olmos mediante cultivo *in vitro*. Con este sistema se controlan tanto las condiciones de crecimiento como la esterilidad del medio, además de reducir el número de factores ambientales que hacen más complejo el estudio de las bases moleculares y metabólicas de la cualidad a estudiar. Gracias a este sistema de propagación de plantas se dispone de varias copias de cada uno de los diferentes genotipos, lo que prácticamente anula la variabilidad entre individuos del mismo genotipo. Además, esta homogeneidad clonal nos permite observar de manera más sencilla los factores que determinan la tolerancia/susceptibilidad a la enfermedad causada por *Ophiostoma novo-ulmi*.

## 2. Objetivos

El objetivo principal de este estudio es analizar la respuesta de defensa a nivel bioquímico y molecular de *Ulmus minor* frente a *Ophiostoma novo-ulmi*, utilizando para ello 4 genotipos de *Ulmus minor* con tolerancia contrastada al patógeno que han sido clonados y crecidos en completa esterilidad y condiciones controladas. Por otro lado, se quiere evaluar además el efecto de un hongo

endófito de olmos, que está asociado a árboles tolerantes, en la respuesta de defensa del olmo frente a *Ophiostoma*.

### 3. Metodología

#### 3.1 Material vegetal y fúngico y diseño experimental

Para el estudio se emplearon plántulas de *U. minor* crecidas *in vitro* en condiciones de completa esterilidad (Figura 1A). Se eligieron 4 genotipos: dos tolerantes a la enfermedad, según el Programa Español del Olmo, incluidos desde 2014 en el Catálogo Nacional de Materiales Base: M-DV 2.3 y V-AD 2; y otros dos genotipos testados y demostrado su susceptibilidad en estudios previos: M-DV 1 y VA-AP 38.

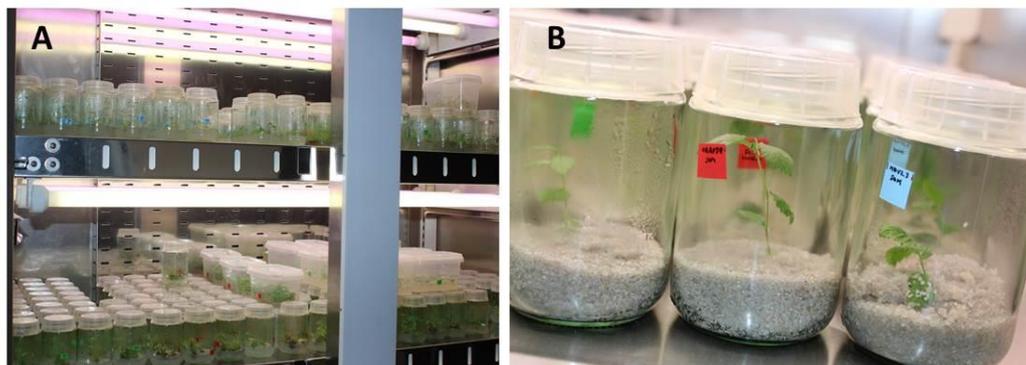


Figura 1. Imágenes de cultivo *in vitro* de plántulas de *Ulmus minor*. (A) Plántulas creciendo en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad en medio nutritivo con agar. (B) Plántulas trasplantadas a botes con arena estéril una vez inoculadas con los distintos tratamientos.

Estas plántulas fueron sometidas a los siguientes tratamientos: (1) **Control**, plántulas intactas a las que no se le sometió a ningún tipo de estrés mecánico o biótico; (2) **Control-herida**, plántulas que fueron inoculadas con agua destilada y estéril realizando un corte de la raíz (dejando una longitud de 3 cm) y manteniéndola sumergida en agua destilada y estéril durante 1 minuto; (3) Inoculada con *O. novo-ulmi*, plántulas inoculadas con una solución de  $10^6$  esporas  $\text{ml}^{-1}$  de una cepa virulenta de *O. novo-ulmi* denominada **SOM** (iniciales de la localización del olmo del que se aisló: SOMontes). La inoculación se realizó cortando la raíz dentro de la solución y manteniéndola sumergida durante 1 minuto; (4) Inoculada con un hongo endófito; se realizó de la misma manera que en el tratamiento anterior, pero con una solución de esporas de un hongo del género *Rhodotorula*, cuya cepa denominamos **P5**, y que fue aislado a partir de ramillos de un clon de *U. minor* tolerante a la grafiosis, situado en el Centro Nacional de Recursos Genéticos Forestales Puerta de Hierro (Madrid). Este género de endófitos fue encontrado en mayor proporción en olmos tolerantes frente a olmos susceptibles en un trabajo anterior no publicado; (5) Pre-inoculada con P5 una semana antes del inicio del ensayo y posteriormente inoculada con SOM (**P5+SOM**). Se emplearon 4 réplicas biológicas por tratamiento en todos los genotipos. Una vez inoculadas, las plántulas fueron traspasadas a recipientes que contenían arena estéril saturada con medio nutritivo Murashige & Skoog (MS; Figura 1B). Pasados 7 días, las plantas fueron recogidas y congeladas separando parte aérea y raíz.

#### 3.2 Detección de la presencia de hongo

Para comprobar la presencia de los hongos inoculados en las plántulas de olmo se utilizó la región ITS2 (del inglés "Internal transcribed spacer") del ARN ribosómico. Se diseñaron cebadores para amplificar esta región tanto de SOM como de P5 y se comprobó por PCR que no había amplificaciones cruzadas utilizando ADN de ambos hongos (ver Tabla 1). Se realizaron dos tipos de ensayos, un seguimiento del avance del hongo en la planta recogiendo material vegetal a distintas

alturas (cada 1,5 cm) y comprobando la presencia de hongo por PCR, y un segundo ensayo en el que se cuantificó la cantidad de hongo incorporada en la planta por medio de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) en parte aérea y raíz por separado utilizando para ello la expresión del gen de referencia en olmo, *Ri18S\_RT* (ver en Tabla 2 la secuencia de los cebadores). En ambos casos se extrajo ADN del material vegetal utilizando el kit de extracción “Invisorb Spin Plant Mini kit” (Invitex).

Tabla 1. Cebadores usados para la detección de la presencia de *O. novo-ulmi* y *Rhodotorula* en las muestras de olmo.

	Cebadores	Región a amplificar
<i>ITS2Ophio</i>	CAGTACCGAACGCAAGTTCTCTCTC ATGCTTAAGTTCAGCGGGTAATCCT	Región ITS2 de <i>O. novo-ulmi</i> que se encuentra entre los ARNr 5.8S y 25S
<i>ITS2P5</i>	CAACGGATCTCTTGGCTCTC AACAGACATACTCTTCGGAATACC	Región ITS2 del endófito ( <i>Rhodotorula</i> ) que se encuentra entre los ARNr 5.8S y 25S

### 3.3 Análisis de expresión génica por qRT-PCR

A partir de 50-100 mg de material vegetal pulverizado se hizo una extracción de ARN usando el kit “Spectrum Plant total RNA Kit” (Sigma-Aldrich). El ARN fue posteriormente tratado con ADNasa (Thermo Scientific) y se sintetizó el ADNc mediante una reacción de transcripción inversa y posterior amplificación por PCR (RT-PCR) usando la enzima “RevertAid H minus Reverse Transcriptase” (Thermo Scientific). Por medio de qRT-PCR se midió la expresión de distintos genes relacionados con respuestas de defensa de las plantas frente a patógenos y con las rutas de fitohormonas como el ácido salicílico o el ácido jasmónico, importantes en la señalización de estas respuestas (ver Tabla 2 para descripción de cada gen analizado). La selección de estos genes se hizo en base a los resultados de un análisis transcriptómico mediante Microarrays de ARN realizado en el genotipo susceptible VA-AP 38 inoculado con *O. novo-ulmi* (Perdigüero et al., en revisión). Para los ensayos de qRT-PCR se utilizó como molde el ADNc sintetizado de cada una de las muestras, los cebadores para cada gen a analizar (Tabla 2) y SYBR Green Master Mix (Thermo Scientific) que contiene ADN polimerasa, el tampón de la polimerasa, los desoxinucleótidos trifosfato, y el fluoróforo SYBR Green. Las reacciones se llevaron a cabo en un sistema ViiA™ 7 Real-Time PCR (Thermo Scientific). El análisis de la expresión de los distintos genes se normalizó con la expresión del ARN Ribosómico 18 S como gen constitutivo y se relativizó con la expresión de éstos en las plántulas control.

### 3.4 Cuantificación del contenido de fenoles y flavonoides totales

El contenido de fenoles y flavonoides totales se midió en material vegetal pulverizado de parte aérea. A partir de 20 mg de material vegetal se realizó una extracción con 1 ml de Metanol al 95 % en frío, posteriormente se dejó a temperatura ambiente y oscuridad durante 48 horas. Este extracto en metanol fue usado para ambos ensayos. Se siguió el método descrito en Ainsworth & Gillespie (2007) para cuantificar fenoles y el descrito en Chang et al. (2011) para flavonoides, modificando volúmenes para poder realizar los ensayos en microplaca de 96 pocillos y hacer la medida de la Absorbancia en un Lector de microplacas Biotek ELx808 a 750 nm y 490 nm para fenoles y flavonoides respectivamente.

### 3.5 Determinación de la concentración de Prolina

La variación en la concentración de Prolina se ha utilizado como un índice de estrés oxidativo en una gran cantidad de trabajos de plantas sometidas a estrés tanto biótico como abiótico (Hayat et al., 2012). En nuestras muestras se cuantificó el nivel de este aminoácido siguiendo el protocolo para medición en microplaca descrito por Carillo & Gibbon en 2011. Se realizó una extracción de 20 mg de material vegetal pulverizado de parte aérea con 1 ml de Etanol al 40 %, seguidamente se guardó este extracto a 4 °C durante 72 horas. Pasado este tiempo se centrifugaron los extractos, se siguió el protocolo citado y se midió la Absorbancia a 520 nm en un Lector de microplacas Biotek ELx808.

Tabla 2. Genes incluidos en el análisis de expresión génica por qRT-PCR. Se muestra la secuencia de los cebadores utilizados y una breve descripción del gen.

Gen	Cebadores	Descripción del gen
<i>Ri18S_RT</i>	GCGAAAGCATTTGCCAAGG ATTCCTGGTCGGCATCGTTTA	ADN ribosómico 18S. Empleado como gen constitutivo en el análisis.
<i>CYP71</i>	TTTCTTTCCACAACGCTTC TTTGCTGCAGGAAGTGCAC	Codifica para un Citocromo p450, además de la actividad monooxigenasa asociada a esta familia de proteínas, esta proteína está involucrada en la síntesis de fitoalexinas y su expresión está directamente asociada a PR1 y WRKY33.
<i>DP22</i>	GGAACACTACTTGAGACTAA AGAATGAGGTTGAGAAGAG	Proteínas generales en respuestas de defensa. Relacionadas con el ensamblaje de la lignina y los lignanos, polifenoles con propiedades antioxidantes y biocidas.
<i>DRP</i>	AAGACATTGGCAAGTTAT CTCCTCATCATATCAC	Proteína receptora relacionada con la señalización por ácido salicílico (SA) en la respuesta inmune adquirida disparada por efectores de patógenos específicos.
<i>EDS1</i>	GGATTATTCTCGGGCTGTGA TGCATTTTCCAACAACCAA	Junto con PAD4 es la reguladora de la biosíntesis de SA en la respuesta inmune innata disparada por PAMPs (pathogen-associated molecular patterns).
<i>GLP1.14</i>	GGAGTTGTTGTGGCTATT ATAATCAATCCATCATTCTCAAT	Proteínas involucradas en respuestas generales de defensa en las plantas, su expresión suele aumentar después de la infección con patógenos, insectos o en tratamientos de SA, etileno o peróxido de hidrógeno.
<i>PAL</i>	GGTGAGGATATAGAGAAGGT AACAGAGCCATTCCAATC	Primera enzima de las rutas de los fenilpropanoides y flavonoides que dan lugar a numerosos compuestos fenólicos implicados en defensa, lignificación y señalización de diferentes estreses. Es principio de una de las dos rutas de síntesis de SA.
<i>PR1</i>	GAATGGCCATCTTTGAGACG TCCAGTTTTGGACCCCTTCAG	Proteína que se induce rápidamente en presencia de patógenos, se cree tiene actividad antifúngica pero se desconoce su función. Es usada como marcador de la Resistencia sistémica adquirida (SAR).
<i>PR2</i>	ACTCATAGTTGACATCTT GGCTCTTATATTGTTCTG	Endo b 1,3-glucanasas. Degrada b 1,3-glucanos de la pared de hongos y bacterias. En combinación con quitinasas producen la hidrólisis de pared celular de hongos.
<i>PR4</i>	AGCCTTGATTATAGCCATT ACGGTGAGAATTGTTGAT	Endoquitinasas tipos I y II. Degradan las quitinas de la pared celular de hongos. Concretamente ataca el enlace entre los carbonos 1 y 4 de dos N-acetilglucosaminas consecutivas.
<i>PR14</i>	CTTTAATGGCGGTGTTGTCC TGCCCTCCGAAAACCCATAG	Transfieren fosfolípidos entre dos membranas. Forman un poro en la membrana del patógeno que permite la pérdida intracelular de iones y lleva a la muerte del organismo.
<i>PR15</i>	CAGTGTATTTCAGGTTT TTATTGCCAACATTTCATT	Oxalato oxidasas. Involucradas en la germinación de la semilla pero aparecen fuertemente asociadas a la resistencia de las plantas frente a patógenos.
<i>WRKY33</i>	TCAGTGGCGTTTTTCAGCATA CCACCAACCACAACCTCACTG	Factor de transcripción relacionado con la producción de fitoalexinas. Implicado en la regulación de la respuesta de defensa mediada por salicílico.
<i>WRKY40</i>	TTTCTTCAACGGGAACCTTGG CCGTTGAAATCTTGGCCTTA	Factor de transcripción relacionado directamente con la respuesta inmune innata disparada por PAMPs mediante la regulación de la expresión de EDS1.
<i>WRKY70</i>	TCAGACGACATCACTT CGCAGCAGAATCAGAATA	Importante en el "cross-talk" entre las rutas de señalización de salicílico y jasmónico. En concreto una alta expresión promueve la respuesta mediada por salicílico inhibiendo la mediada por jasmónico.

### 3.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico de todas las pruebas se realizó con el programa IBM SPSS Statistics 23 para Windows. En todos los ensayos se aplicó un ANOVA usando el test de Tuckey con nivel de confianza del 95 y 99 %.

## 4. Resultados

### 4.1 Localización del endófito y del patógeno en las plántulas de olmo

El seguimiento de ambos hongos mediante amplificación de las regiones ITS2 demostró una variabilidad en la distribución de éstos a lo largo de la planta independiente del genotipo. Ambos hongos colonizaron las raíces completamente en el tiempo que duró el ensayo (Tabla 3), sin embargo, la distribución en el tallo fue desigual y dependiente del tamaño de la planta. En los casos de plantas

con menor tamaño (tallos de 3,5-4 cm) se vio una colonización completa tanto por *O. novo-ulmi* como por el endófito, mientras que en aquellas plantas de más de 4 cm se encontró una mayor variabilidad. En el total de plantas analizadas, *Ophiostoma* colonizó completamente la planta en el 45 % de los casos mientras que P5 se encontró completamente distribuido en el 33 % de las plantas inoculadas con este hongo (Tabla 3). Además, no se encontraron diferencias aparentes entre las inoculaciones con un solo hongo (tratamientos 3 y 4) y la inoculación conjunta de ambos hongos (tratamiento 5).

Tabla 3. Presencia de *O. novo-ulmi* y el endófito del género *Rhodotorula* representados por casillas de color naranja y rosa respectivamente en 3 réplicas de los tratamientos 3, 4 y 5 (SOM, P5 y P5+SOM), las casillas en blanco representan ausencia de hongo y las casillas con guion representan ausencia de fragmento por ser plantas de menor tamaño. Los fragmentos fueron recogidos cada 1,5 cm y nombrados de 1 a 6 donde 1 y 2 corresponden a raíz y del 3 al 6 a tallo.

		VA-AP 38			M-DV 1		M-DV 2.3		V-AD 2	
Órgano	Fragmento	Trat. 3	Trat. 5	Trat. 3	Trat. 5	Trat. 3	Trat. 5	Trat. 3	Trat. 5	
<i>O. novo-ulmi</i>	Tallo	6	- - -	- - -	-	-	- - -	- - -	- - -	- - -
		5	- - -	-	-	-	- - -	- - -	-	-
		4	-	-	-	-	-	-	-	-
	Raíz	3	-	-	-	-	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-	-	-
		1	-	-	-	-	-	-	-	-
		Trat. 4	Trat. 5	Trat. 4	Trat. 5	Trat. 4	Trat. 5	Trat. 4	Trat. 5	
<i>Rhodotorula</i>	Tallo	6	- - -	- - -	-	-	- - -	- - -	- - -	- - -
		5	-	-	-	-	-	-	-	-
		4	-	-	-	-	-	-	-	-
	Raíz	3	-	-	-	-	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-	-	-
		1	-	-	-	-	-	-	-	-

Por otro lado, la cuantificación de ambos hongos utilizando la técnica de qRT-PCR mostró mayor acumulación de SOM y P5 en las raíces comparado con la parte aérea (Figura 2). En relación al patógeno vemos que el genotipo M-DV 2.3 fue el que menos acumuló en raíz mientras que fue el genotipo donde se observó mayor translocación a la parte aérea junto con M-DV 1. La preinoculación con el endófito redujo la acumulación posterior del patógeno en parte aérea en los genotipos tolerantes y en raíz en el caso de los susceptibles (Figura 2). En cuanto a P5, se observó una acumulación muy similar en todos los genotipos tanto en parte aérea como en raíz, salvo en el caso de M-DV 1 que tuvo la mayor presencia de este hongo en raíz.

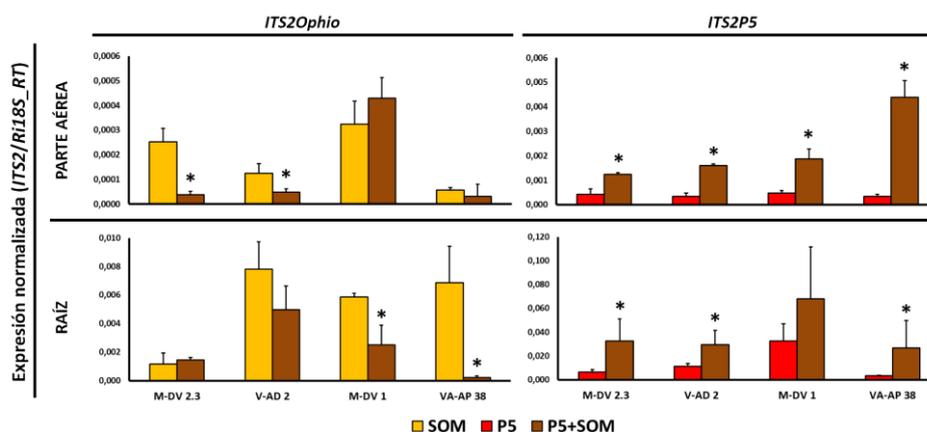


Figura 2. Expresión de ITS2 de *Ophiostoma novo-ulmi* (ITS2Ophio) y del endófito P5 (ITS2P5) normalizada con el gen constitutivo de olmo Ri18S\_RT para cuantificar la presencia de estos hongos en raíz y parte aérea de las plántulas inoculadas con *Ophiostoma* (SOM), el endófito (P5) y preinoculadas con P5 e inoculadas con SOM (P5+SOM). Las barras verticales indican el error estándar y los asteriscos diferencias significativas de expresión entre la inoculación de un único hongo y la inoculación con ambos hongos con un nivel de confianza del 95 %.

En las plantas del tratamiento de doble inoculación la presencia de P5 aumenta en todos los casos lo que supone un incremento de la población de este hongo en el interior de las plantas durante la semana adicional de este tratamiento (Figura 2).

#### 4.3 Expresión de genes relacionados con la defensa frente a patógenos

De los 14 genes seleccionados sólo algunos mostraron diferencias en la expresión entre los distintos tratamientos y entre genotipos (Figuras 3 y 4). En raíz, sólo el gen de la *fenilalanina amonio liasa* (*PAL*) mostró cambios significativos en su expresión con los distintos tratamientos. La inoculación de SOM produjo en todos los genotipos una sobreexpresión de entre 15 y 25 veces mayor que la de las plantas control, independientemente de su condición de tolerante o susceptible. Por su parte, P5 provocó una reacción significativa en la expresión de este gen en la raíz de los genotipos resistentes y del susceptible VA-AP 38, aunque ésta fue del orden de cuatro veces menor que la provocada por *O. novo-ulmi*. Cuando las plantas fueron preinoculadas con P5 y posteriormente se inoculó con el patógeno se pudo ver que la sobreexpresión de *PAL*, si bien ocurre, está muy reducida llegando a estar sólo 5 o 10 veces por encima del valor del control (Figura 3). En el caso de la parte aérea sólo se vio un incremento de la expresión de *PAL* en el genotipo M-DV 1 con el tratamiento P5+SOM (Figura 3).

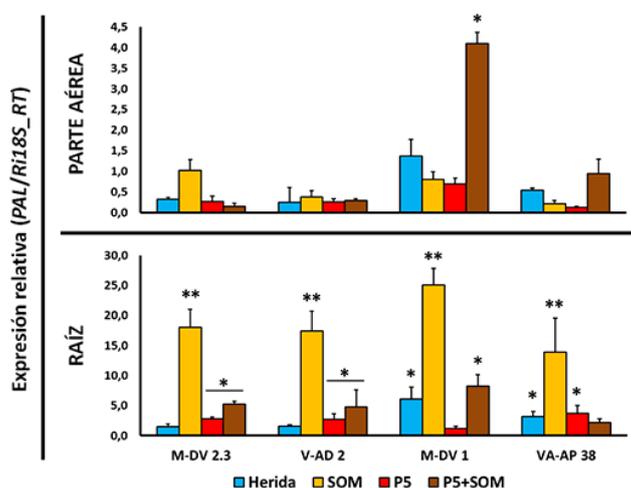


Figura 3. Expresión relativa del gen de la fenilalanina amonio liasa (*PAL*) normalizada con el gen constitutivo de olmo Ri18S\_RT en parte aérea y raíz de los distintos genotipos utilizados y en los distintos tratamientos: Inoculación con agua (*Herida*), inoculación con *O. novo-ulmi* (*SOM*), inoculación con el endófito (*P5*) y doble inoculación endófito-*O. novo-ulmi* (*P5+SOM*). Las barras verticales indican el error estándar y los asteriscos diferencias significativas de expresión entre los distintos tratamientos y el tratamiento control de cada genotipo con un nivel de confianza del 95 % (\*) o del 99 % (\*\*).

Del resto de genes seleccionados, algunos no dieron diferencias significativas en raíz y otros sólo se pudieron analizar en la parte aérea por falta de material en raíz. Las diferencias de expresión más remarcables se observaron en dos genes relacionados con la patogénesis (*PRs*), *PR2* y *PR14* (Figura 4). En el caso de *PR2*, se produjo una sobreexpresión de unas 20 veces por encima del valor control en el genotipo M-DV 2.3 con todos los tratamientos, y en el genotipo M-DV 1 la expresión de este gen se vio incrementada unas 60 veces únicamente cuando las plantas fueron inoculadas con *Ophiostoma*. En los otros dos genotipos *PR2* no cambió su expresión en ningún caso. Por otro lado, se indujo la expresión de *PR14* en todos los genotipos con la inoculación del patógeno, viéndose reducida con el tratamiento de doble inoculación en todos los casos excepto en el genotipo susceptible VA-AP 38 en el que incrementó la expresión con respecto a la inoculación sólo con SOM (Figura 4). La inoculación de *Ophiostoma* en el genotipo susceptible M-DV 1 produjo la sobreexpresión no sólo de estos dos genes que se han mencionado sino también de otros, aunque con menor diferencia de expresión frente al control. Se pudo ver una respuesta de sobreexpresión con el

patógeno de otras dos PRs (*PR1* y *PR4*), de dos factores de transcripción *WRKY33* y *WRKY40* y del gen que codifica para un citocromo p450 (*CYP71*), sin embargo, la doble inoculación endófito-*Ophiostoma* no produjo una expresión tan elevada en todos estos genes en este genotipo (Figura 4). Por último, cabe destacar que, en el otro genotipo susceptible, VA-AP 38, de entre estos genes, sólo se observó incremento significativo en *PR14*. Sin embargo, se indujo significativamente la expresión del gen *DP22* en la inoculación con *O. novo-ulmi* únicamente en este genotipo. Este gen codifica para una proteína de respuesta de resistencia a la enfermedad. El tratamiento de doble inoculación P5+SOM también provocó una expresión significativa de este gen respecto al control, aunque ésta fue sólo la mitad respecto a la inoculación simple con SOM (Figura 4).

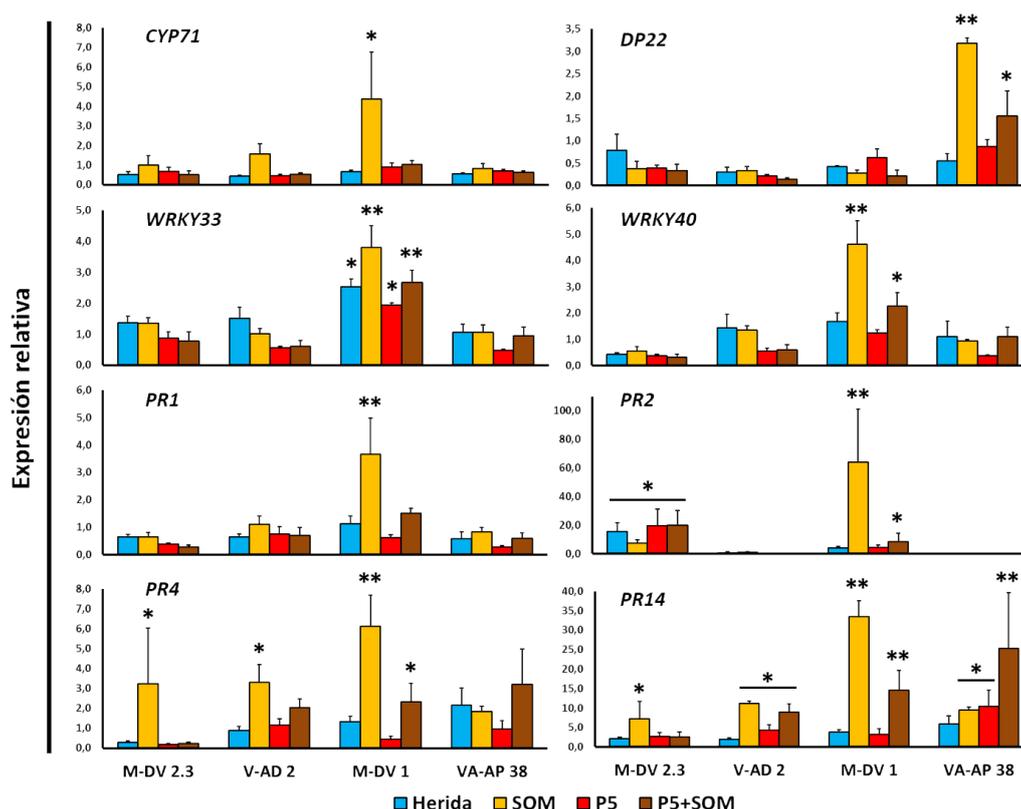


Figura 4. Expresión relativa de distintos genes normalizados con el gen constitutivo de olmo Ri18S\_RT en la parte aérea de los distintos genotipos utilizados y en los distintos tratamientos: Inoculación con agua (Herida), inoculación con *O. novo-ulmi* (SOM), inoculación con el endófito (P5) y doble inoculación endófito-*O. novo-ulmi* (P5+SOM). Las barras verticales indican el error estándar y los asteriscos diferencias significativas de expresión entre los distintos tratamientos y el tratamiento control de cada genotipo con un nivel de confianza del 95% (\*) o del 99% (\*\*).

#### 4.4 Contenido de fenoles y flavonoides totales y cuantificación de Prolina en parte aérea

La determinación del contenido de flavonoides y fenoles totales mostró una respuesta muy similar en los genotipos susceptibles cuando fueron inoculados con los distintos tratamientos (Figuras 5A y 5B). Sorprendentemente M-DV 1 y VA-AP 38 acumularon de manera significativa ambos compuestos en respuesta a la herida. Por otro lado, la inoculación con el patógeno produjo un incremento de la producción tanto de fenoles como de flavonoides en los genotipos susceptibles y en el genotipo tolerante V-AD 2 sólo en el caso de fenoles. Tanto en el contenido de fenoles como en el de flavonoides se produjo una disminución de su acumulación en el tratamiento de doble inoculación comparada con la inoculación sólo con el patógeno llegando a los valores de las plantas control. Tampoco el endófito por sí solo provocó una respuesta de mayor acumulación de estos compuestos en ninguno de los genotipos (Figura 5A y 5B).

La concentración de Prolina en las plántulas de olmo incrementó únicamente en dos de los genotipos al ser inoculados con *Ophiostoma*, en el tolerante V-AD 2 y en el susceptible VA-AP 38. Los otros dos genotipos no sufrieron variaciones significativas en la concentración de Prolina con ninguno de los tratamientos (Figura 5C).

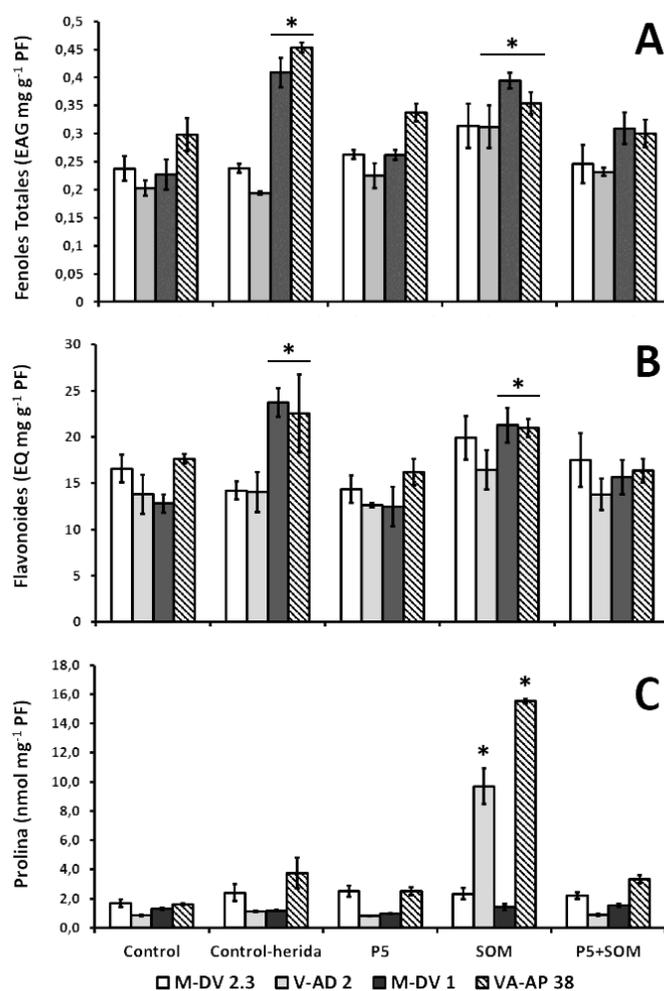


Figura 5. Cuantificación de la concentración de Fenoles (A), Flavonoides (B) y Prolina (C) en la parte aérea de los distintos genotipos utilizados y en los distintos tratamientos: Inoculación con agua (Herida), inoculación con *O. novo-ulmi* (SOM), inoculación con el endófito (P5) y doble inoculación endófito-*O. novo-ulmi* (P5+SOM). Las barras verticales indican el error estándar y los asteriscos diferencias significativas entre los distintos tratamientos y el tratamiento control de cada genotipo con un nivel de confianza del 95 % (\*).

## 5. Discusión

La detección de la presencia de los hongos SOM y P5 mediante la amplificación de la secuencia ITS2 de cada hongo reveló que no hay ninguna característica anatómica aparente que diferencie a los genotipos tolerantes de los susceptibles en cuanto a la entrada o translocación desde la raíz a la parte aérea de los hongos. La cuantificación de los hongos por medio de qRT-PCR donde se normalizaba la expresión de *ITS2P5* e *ITS2Ophi* frente al gen constitutivo de olmo reveló que se produjo una mayor colonización del endófito en las plántulas inoculadas con este hongo en comparación con la que se dio en las inoculadas con *Ophiostoma*. Sin embargo, la presencia tanto de SOM como de P5 en la parte aérea fue muchísimo menor a la encontrada en raíz, indicando que el movimiento de ambos hongos, aunque se produce, no llega a ser completo en la semana que duró el ensayo. Si se observa la cantidad de endófito en el tratamiento de doble inoculación se puede ver que

durante la semana adicional que tuvieron estas plantas, el endófito P5 incrementó su población tanto en la raíz como en la parte aérea, llegando a ser más del doble en comparación con la inoculación simple con P5. Esta doble inoculación produjo un efecto sobre la colonización de *Ophiostoma* si se compara este tratamiento con el de la inoculación simple de SOM. En este caso se puede ver que la presencia previa de endófito produjo en la mayoría de los casos un impedimento para el establecimiento del patógeno viéndose una menor acumulación de éste en las plántulas sometidas al tratamiento 5 (P5+SOM).

Los datos de la expresión de los genes relacionados con la defensa de las plantas no desvelaron una asociación con la susceptibilidad o tolerancia al patógeno, aunque sí que se observaron, en el genotipo M-DV 1, distintos genes sobreexpresados que tienen relación con la ruta de defensa mediada por ácido salicílico, lo que hace suponer que en este genotipo esta ruta es importante en el reconocimiento y respuesta frente al ataque del patógeno. Tanto los factores de transcripción *WRKY33* y *WRKY40* como el gen *CYP71* y los que codifican para las distintas PRs se sobreexpresaron en este genotipo cuando las plántulas fueron inoculadas con SOM. Todos estos genes están relacionados con la conocida respuesta sistémica adquirida (Vlot et al., 2009), indicando que este genotipo está teniendo en la parte aérea una respuesta de defensa frente a la entrada del patógeno por la raíz, mientras que en el resto de los genotipos no se produce de forma tan clara. Observando la cantidad de *Ophiostoma* en el genotipo M-DV 1 es muy probable que la razón de que encontremos una mayor expresión de estos genes se deba a una mayor presencia de patógeno en estas plantas en comparación con el resto de genotipos. Dado que estos genes son importantes en el reconocimiento y respuesta frente a patógenos, existe además la posibilidad de que haya una variación entre genotipos debida, no sólo a la cantidad de masa fúngica presente, sino también al momento en el que fue analizada su expresión. La comparación con el otro genotipo susceptible, VA-AP 38, hace pensar también en distintos mecanismos de respuesta que impliquen otras rutas génicas no analizadas en el ensayo, dado que en éste se produce una sobreexpresión de un gen de respuesta distinto como es *DP22*.

De manera general se muestra la importancia de las proteínas PR y el papel de la enzima PAL que no sólo es precursora del ácido salicílico sino también de diferentes compuestos fenólicos relacionados con la defensa frente a patógenos o el desarrollo de las plantas (Van Loon et al., 2006). La sobreexpresión de *PAL* en raíz nos apunta que hay una fuerte respuesta local de las plántulas de olmo a la entrada del patógeno y que esta es independiente del carácter de tolerancia o susceptibilidad que se presupone en estos genotipos. Esta respuesta se ve muy mermada en las plántulas que han sido previamente inoculadas con el endófito P5 lo que nos desvela el efecto beneficioso de la presencia de éste previa a la entrada del patógeno, ya sea por ocupación de nicho o por un efecto de lo que se conoce como “priming” (Conrath et al., 2006). Este mismo efecto se observa en la acumulación de los fenoles y flavonoides en la parte aérea donde la acumulación de estos compuestos relacionados con la defensa se dispara en respuesta a la inoculación simple de SOM pero no en aquellas plántulas con la doble inoculación.

Por último, con respecto a la concentración de Prolina, en nuestro caso sorprendió observar un incremento en su concentración sólo en dos genotipos cuando se inocularon con *Ophiostoma*, uno tolerante, V-AD2, y otro susceptible, VA-AP 38. Este hecho parece indicar que, al menos en parte aérea, la respuesta entre genotipos es variable e independiente de su grado de tolerancia. Este resultado, como lo visto anteriormente con el análisis de expresión génica, nos lleva a pensar en rutas de señalización y respuesta frente al ataque de un patógeno distintas en cada genotipo y que la tolerancia a la grafiosis es un rasgo multifactorial, como ya se suponía. Por otro lado, se vuelve a ver un efecto de reducción del estrés producido por el patógeno en estos genotipos, V-AD 2 y VA-AP 38, cuando las plantas fueron previamente inoculadas con el endófito.

## 6. Conclusiones

A partir de este trabajo se han podido observar ciertos factores relacionados con los genotipos susceptibles como la acumulación de Fenoles y Flavonoides en respuesta al ataque del patógeno, o el incremento de la expresión de genes relacionados con la defensa mediada por salicílico claramente

en uno de los genotipos susceptibles, M-DV 1. También se ha podido confirmar el efecto beneficioso de un hongo endófito en la interacción olmo-*Ophiostoma* donde en la mayoría de los casos, tanto en genotipos tolerantes como susceptibles, la preinoculación del endófito P5 produjo una respuesta menos agresiva o ausente del patógeno. Estos datos aportan información sobre el camino a seguir para lograr comprender las diferencias entre los genotipos y desarrollar un sistema mejorado de la selección de genotipos tolerantes a la grafiosis, además de confirmar la posibilidad del uso de endófitos como agentes de biocontrol de la grafiosis.

## 7. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad con el proyecto AGL2015-66925-R y por la Escuela de Montes, Forestal y del Medio Natural de la Universidad Politécnica de Madrid mediante una beca del programa “Emilio González Esparcia” que permitió que parte de este trabajo se desarrollase en el Grupo de Interacciones Planta-Microorganismo de la Universidad de Utrecht.

## 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.

CARILLO, P., GIBBON, Y.; 2011. PROTOCOL: extraction and determination of proline.

CHANG, C. L., LIN, C. S., LAI, G. H.; 2011. Phytochemical characteristics, free radical scavenging activities, and neuroprotection of five medicinal plant extracts. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, Article ID 984295, 1 - 8.

CONRATH, U., BECKERS, G. J., FLORS, V., GARCÍA-AGUSTÍN, P., JAKAB, G., MAUCH, F., NEWMAN, M. A., PIETERSE, C. M. J., POINSSOT, B., POZO, M. J., PUGIN, A., SCHAFFRATH, U., TON, J., WENDEHENNE, D., ZIMMERLI, I., MAUCH-MANI, B.; 2006. Priming: getting ready for battle. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 19, 1062 - 1071.

FOUDA, A. H., HASSAN, S. E. D., EID, A. M., EWAIS, E. E. D.; 2015. Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica* (Bioss.). *Ann. Agrar. Sci.*, 601, 95 - 104.

GLAZEBROOK, J.; 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43, 205 - 227.

HAMMOND-KOSACK, K., JONES, R. L.; 2000. Responses to plant pathogens. En: BUCHANAN, B. B., GRUISSEM, W., JONES, R. L.; *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, 1, 1102 - 1156. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists.

HAYAT, S., HAYAT, Q., ALYEMENI, M. N., WANI, A. S., PICHTEL, J., AHMAD, A.; 2012. Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signal. Behav.*, 7, 1456 - 1466.

KLESSIG, D. F., DURNER, J., NOAD, R., NAVARRE, D. A., WENDEHENNE, D., KUMAR, D., ZHOU, J. M., SHAH, J., ZHANG, S., KACHROO, P., TRIFA, Y., PONTIER, D., LAM, E., SILVA, H.; 2000. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *PNAS*, 97, 8849 - 8855.

MARTÍN, J. A., SOLLA, A., GIL, L., GARCÍA-VALLEJO, M. C.; 2010. Phenological and histochemical changes of *Ulmus minor* due to root absorption of phenol: Implications for resistance to DED. *Environ. Exp. Bot.*, 69, 175 - 182.

- MARTÍN, J. A., SOLLA, A., VENTURAS, M., COLLADA, C., DOMÍNGUEZ, J., MIRANDA, E., FUENTES, P., BURÓN, M., IGLESIAS, S., GIL, L.; 2015. Seven *Ulmus minor* clones tolerant to *Ophiostoma novo-ulmi* registered as forest reproductive material in Spain. *iForest*, 8, 172 – 180.
- MITTLER, R.; 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.*, 7, 405 – 410.
- PERDIGUERO, P., SOBRINO-PLATA, J., VENTURAS, M., MARTÍN, J. A., GIL, L., COLLADA, C. Gene expression tradeoffs between defense and growth in English elm induced by *Ophiostoma novo-ulmi*. *Plant Cell Environ.* (en revisión).
- PIETERSE, C. M., VAN DER DOES, D., ZAMIOUDIS, C., LEON-REYES, A., VAN WEES, S. C.; 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 28, 489 – 521.
- POSTMA, J., GOOSSEN-VAN DE GEIJN, H.; 2016. Twenty-four years of Dutch Trig® application to control Dutch Elm Disease. *BioControl* 61, 305 – 312.
- SCHEFFER, R. J., VOETEN, J. G. W. F., GURIES, R. P.; 2008. Biological control of Dutch elm disease. *Plant Dis.* 92, 192 – 200.
- 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.
- VAN LOON, L. C., REP, M., PIETERSE, C. M. J.; 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44, 135 – 162.
- VLOT, A. C., DEMPSEY, D. M. A., KLESSIG, D. F.; 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 47, 177 – 206.