



7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

Gestión del monte: servicios ambientales y bioeconomía

26 - 30 junio 2017 | Plasencia  
Cáceres, Extremadura

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

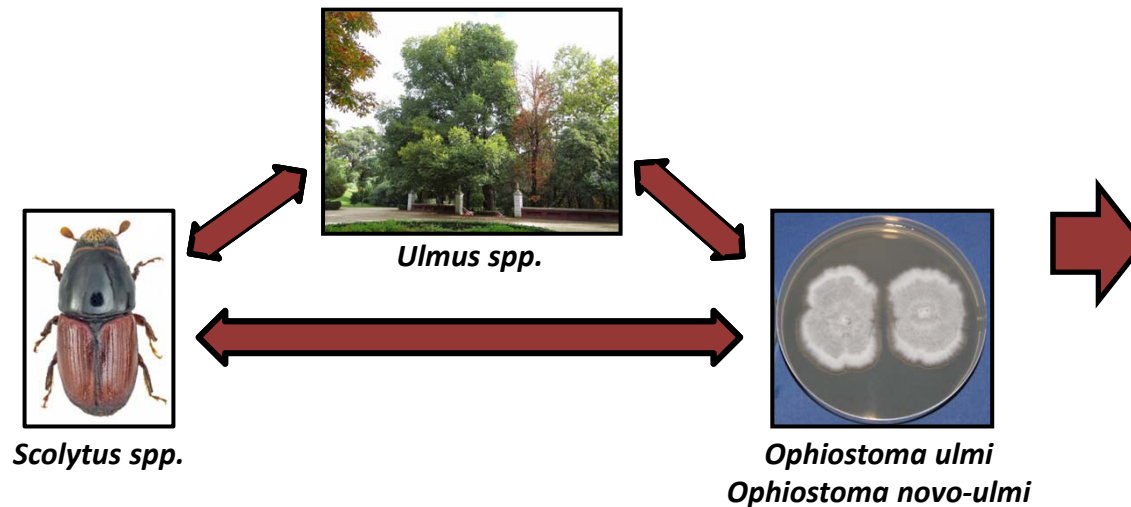
Juan Sobrino Plata

Sara María Ormeño, Begoña Coira, David Medel, Juan Antonio Martín,  
Carmen Collada, Luis Gil.

E.T.S.I. Montes, Forestal y del Medio Natural, Universidad Politécnica de Madrid

29-Junio-2017, Plasencia

## La enfermedad: **GRAFIOSIS** (o enfermedad holandesa del olmo)



En dos pandemias en el siglo XX la enfermedad ha provocado la muerte de **más del 90 %** de los olmos europeos

## La solución: Programa Español para la Conservación de los Olmos



### Objetivos:

1. Estudiar mecanismos de tolerancia en los olmos
2. Preservar la diversidad genética
3. Propagación de olmos tolerantes
4. Recuperar poblaciones de olmos

### Seven *Ulmus minor* clones tolerant to *Ophiostoma novo-ulmi* registered as forest reproductive material in Spain

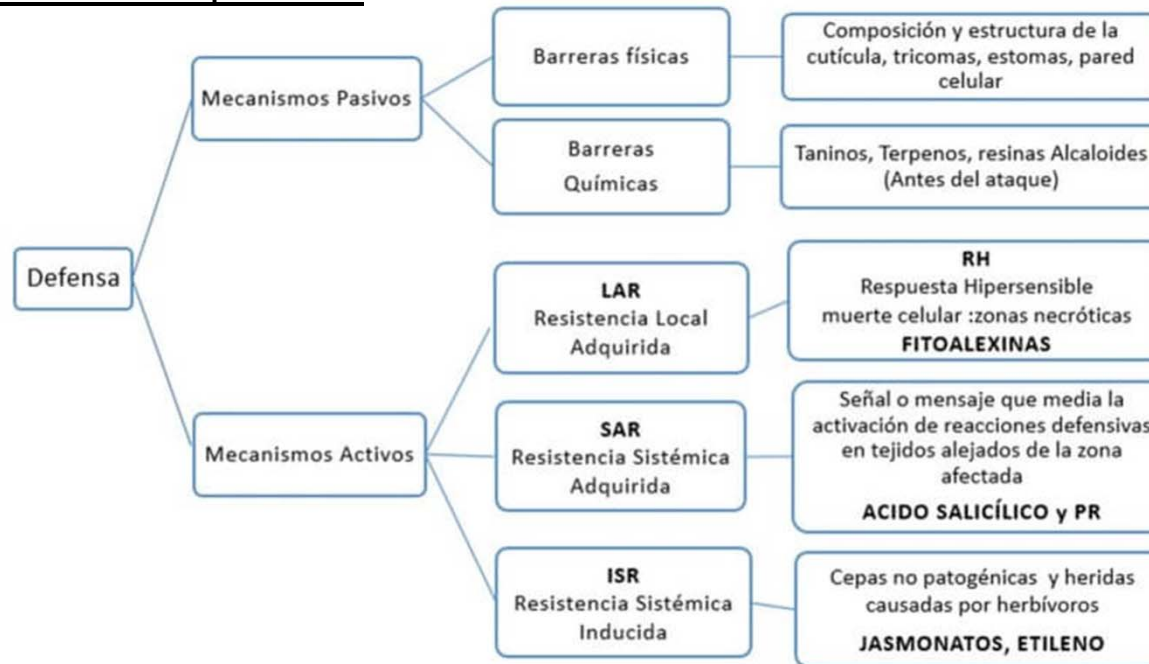
Juan Antonio Martín <sup>(1)</sup>, Alejandro Solla <sup>(2)</sup>, Martín Venturas <sup>(1)</sup>, Carmen Collada <sup>(1)</sup>, Jorge Domínguez <sup>(1)</sup>, Eva Miranda <sup>(1)</sup>, Pablo Fuentes <sup>(3)</sup>, Margarita Burón <sup>(1)</sup>, Salustiano Iglesias <sup>(4)</sup>, Luis Gil <sup>(1)</sup>

The Spanish elm programme began in 1986 in response to the devastating impact of Dutch elm disease on natural elm stands and urban trees. Its main objectives were to conserve remaining genetic resources and select and breed tolerant native elm genotypes. After 27 years of work conducting susceptibility trials on thousands of elm genotypes, the first seven tolerant *Ulmus minor* trees are now being registered by the Spanish Environmental Administration. This paper presents the results of the susceptibility tests on these clones and their distinctive genetic, morphological and phenological features. In all susceptibility trials the commercial "Sapporo Autumn Gold" clone, which is highly tolerant to *O. novo-ulmi*, was used as a control. The registered clones were named "Ademuz", "Dehesa de la Villa", "Majadahonda", "Toledo", "Dehesa de Amaniel", "Retiro" and "Fuente Umbría". The most tolerant clone was "Dehesa de Amaniel", as its wilting values were below 5% during the two consecutive inoculation trials performed in Madrid. "Fuente Umbría", tested over four consecutive years in Guadalajara and Palencia, was the Spanish clone with the most reliable tolerance level to *O. novo-ulmi*. The "Ademuz" and "Majadahonda" clones had the highest ornamental scores and are promising trees for use in urban environments and tree breeding for ornamental quality. These two genotypes showed a later bud burst phenology than the other *U. minor* clones, demonstrating suitability to areas with late frost events. The Spanish programme aims to substantially increase the range of tolerant native elms through new selections and crossings to gain a better understanding of the genetic basis of resistance.



# Respuestas de defensa en plantas: Interacción planta-patógeno

## Respuestas generales en plantas:



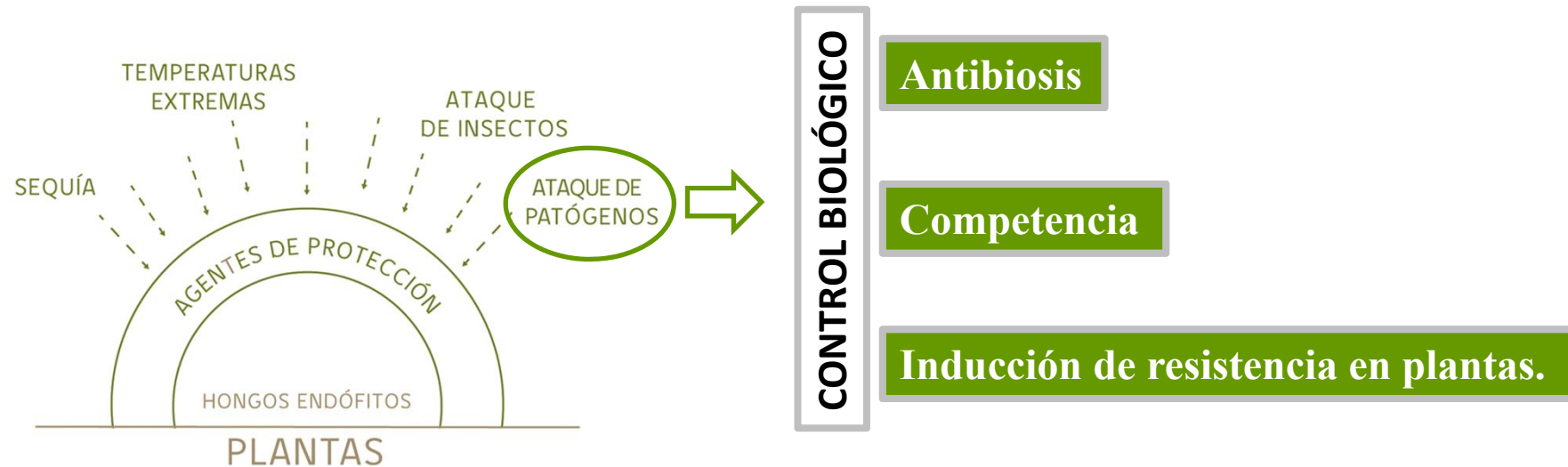
## Respuestas descritas en oimos:

Respuestas	Mecanismos	Literatura
Bloqueo de los vasos	Acumulación de compuestos fenólicos, tilosas, gels y callosa	Oulette and Rioux 1992; Beckman 1987; Li et al. 2015
Retraso de la invasión	Producción of Mansononas (fitoalexinas en oimos)	Hubbes 1981; Duchesne <i>et al.</i> 1985, 1986; Wu <i>et al.</i> 1989
Restricción de la expansión fúngica	Incremento de celulosa y hemicelulosa	Li et al. 2015
Producción de xilema nuevo	Producción de Suberina y lignina	Martin <i>et al.</i> 2005a, 2005b
Distribución energética	Reducción del contenido de almidón	Shigo and Tippett, 1981; Martin <i>et al.</i> 2008



## Papel activo de los endófitos: control biológico

Los endófitos son **bacterias y hongos** que colonizan los **tejidos internos** (raíz, hojas y tallos) de las plantas **sin causarles enfermedades** aparentes, además de **beneficiarlas** al reforzar su tolerancia a **condiciones adversas para su desarrollo**





## OBJETIVO:

Conocer la **RESPUESTA TEMPRANA** de defensa a nivel bioquímico y molecular de **4 genotipos de *Ulmus minor*** con tolerancia contrastada a ***Ophiostoma novo-ulmi***. Evaluar además el **EFFECTO BENEFICIOSO DE UN HONGO ENDÓFITO** de olmos, asociado a árboles tolerantes, en la respuesta de defensa del olmo frente a *O. novo-ulmi*.

## ANÁLISIS REALIZADOS:

- **Presencia** de ambos hongos y su **distribución** a lo largo de las plántulas
- **Expresión** de diferentes **genes relacionados con la defensa**
- Acumulación de **metabolitos de defensa** en las plántulas:
  - Contenido de fenoles totales
  - Contenido de flavonoides totales
- Análisis del **estrés oxidativo**:
  - Medición de la acumulación de Prolina como indicador de estrés biótico

PCR  
qRT-PCR



**MATERIAL:**

**Propagación de olmos *in vitro***



- Fácil manejo
- Rápido crecimiento
- Condiciones controladas
- Esterilidad
- Alta tasa de propagación
- Sin necesidad de grandes extensiones





### MATERIAL:

#### → Plántulas de *Ulmus minor*

- 2 genotipos Tolerantes
  - M-DV 2.3
  - V-AD 2
- 2 genotipos Susceptibles
  - M-DV 1
  - VA-AP 38

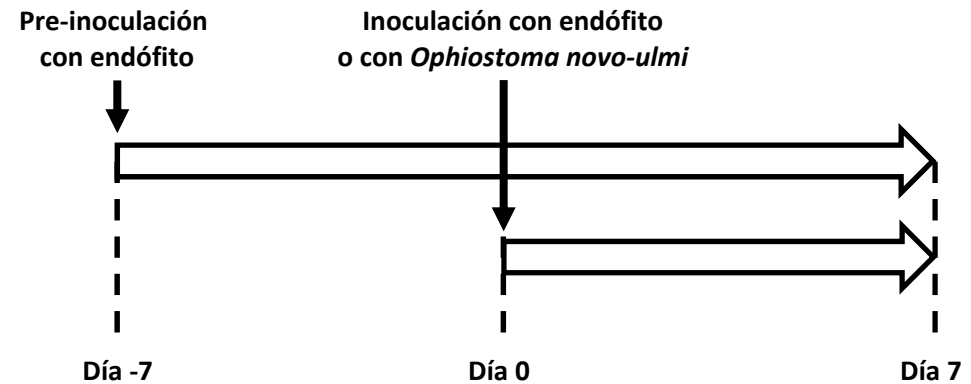
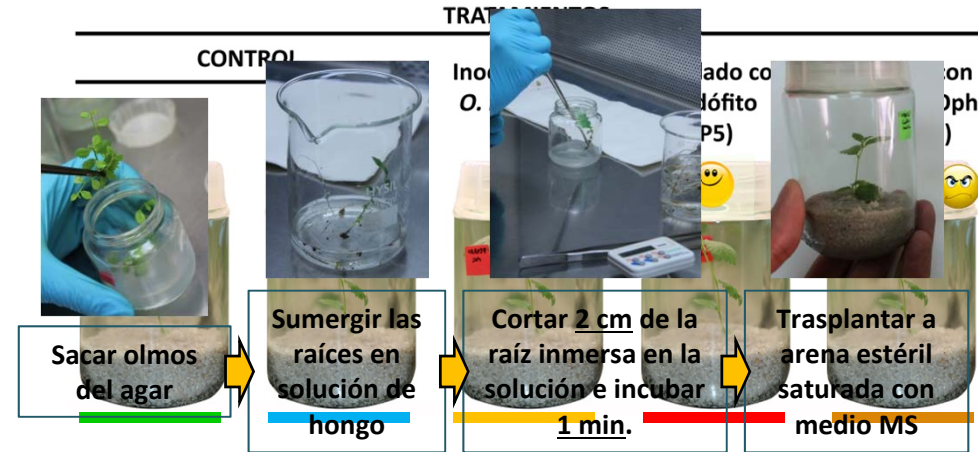
#### → *Ophiostoma novo-ulmi* (SOM)



#### → Hongo endófito: *Rhodotorula* spp. (P5)



### TRATAMIENTOS:





# RESULTADOS



➤ **Presencia** de ambos hongos y su **distribución** a lo largo de las plántulas



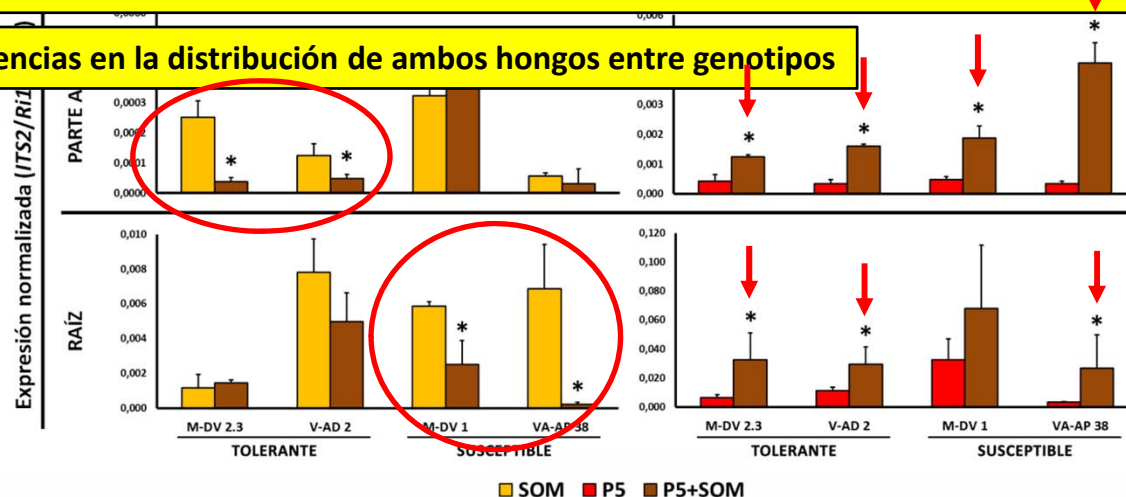
		SUSCEPTIBLE				TOLERANTE				
		VA-AP 38		M-DV 1		M-DV 2.3		V-AD 2		
Órgano	Fragmento	Trat. 3	Trat. 5	Trat. 3	Trat. 5	Trat. 3	Trat. 5	Trat. 3	Trat. 5	
O. novo-ulmi	Tallo	6	- - -	- - -	-	-	- - -	- - -	- - -	- - -
		5	- - -	- - -	-	-	- - -	- - -	- - -	- - -
		4	-	-	-	-	-	-	-	-
	Raíz	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	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

Distribución de ambos hongos a lo largo de la planta mediante la amplificación de la región ITS por PCR

Colonización completa de las raíces por P5 y *Ophiostoma*. La distribución en parte aérea depende de la longitud de la planta

No se encuentran diferencias en la distribución de ambos hongos entre genotipos

Presencia de ambos hongos en raíz y parte aérea mediante la cuantificación de la región ITS por qPCR

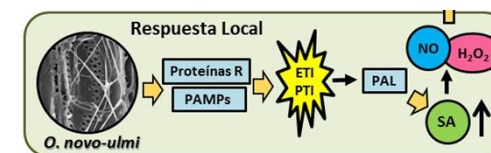
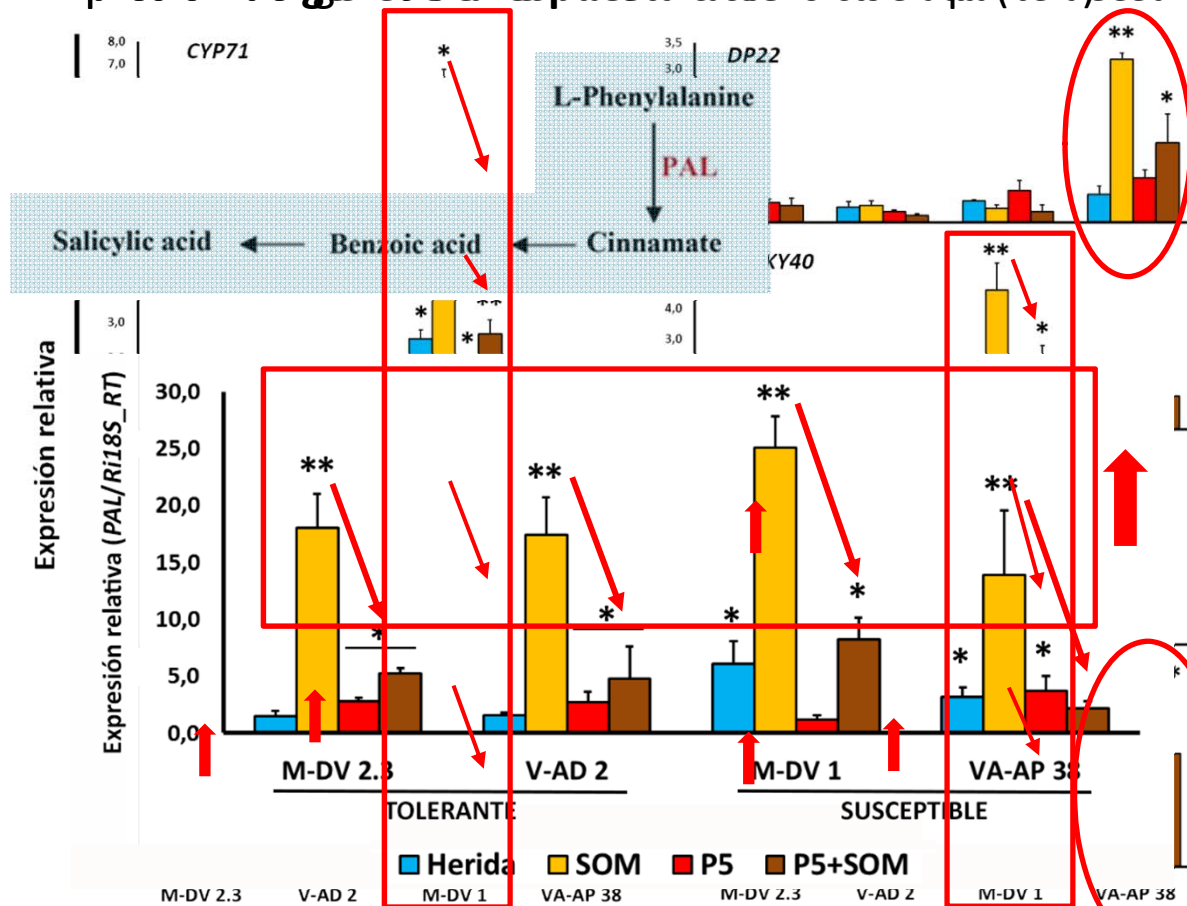


La pre-inoculación con P5 reduce la acumulación de *Ophiostoma*

Aumento de población del endófito P5 dentro de las plántulas de olmo

➤ **Expresión de genes** involucrados en la defensa de las plantas frente a patógenos usando información previa de un trabajo con microarrays publicado en el laboratorio (**Perdiguero et al. 2015**).

- Expresión de los genes de la respuesta sistémica en la parte aérea (PAL) en raíz:



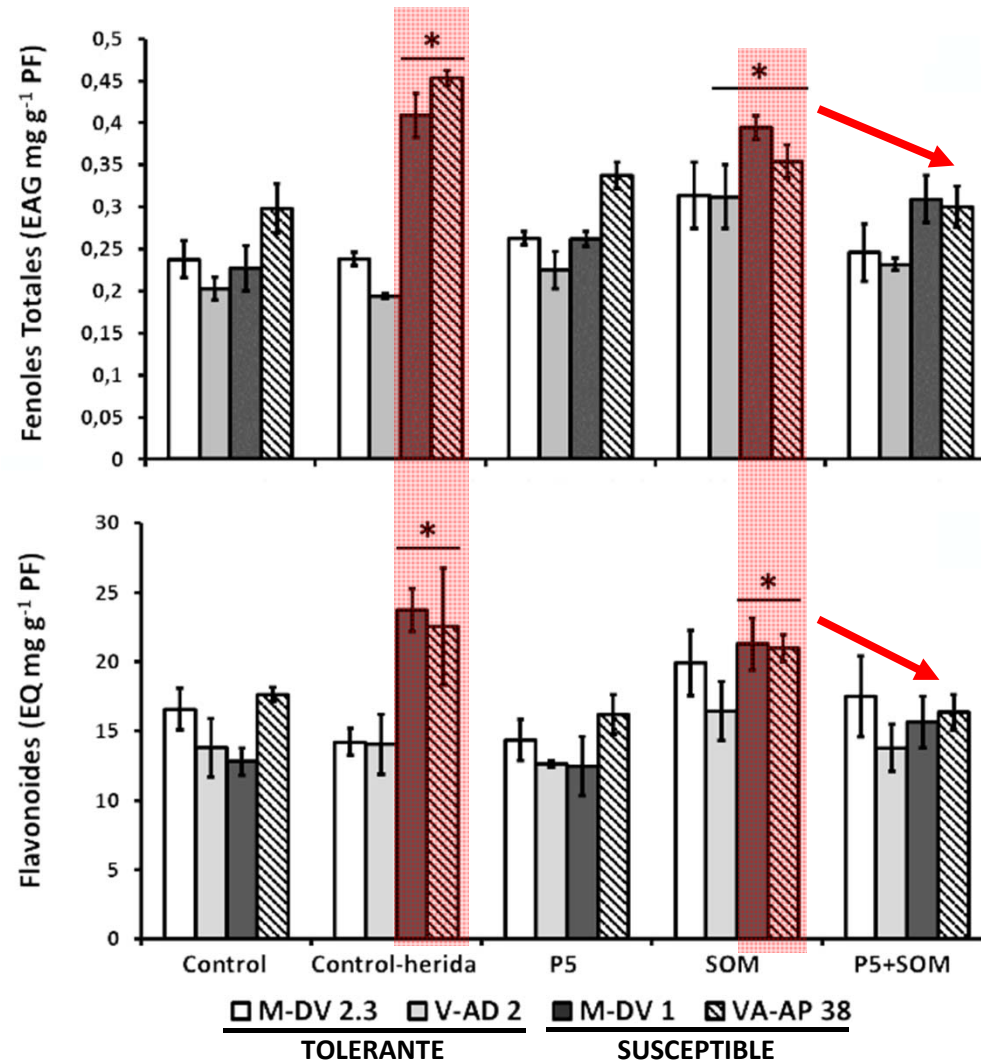
Fuerte respuesta local con la inoculación de *Ophiostoma* (SOM) en todos los genotipos

Clara respuesta sistémica en parte aérea de M-DV 1 con la entrada de SOM que se ve reducida con la pre-inoculación de P5

Inducción de la expresión de diferentes PRs en los genotipos tolerantes frente a SOM

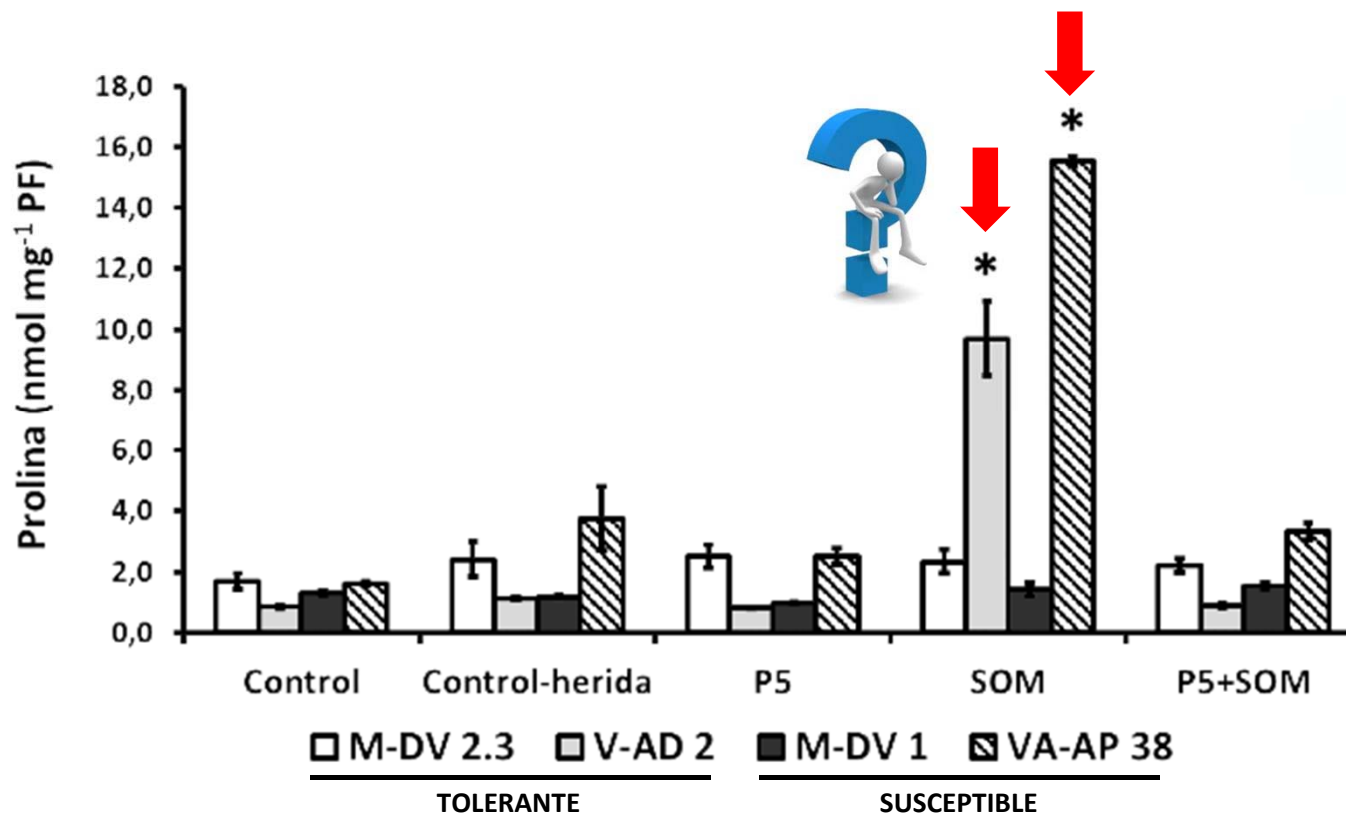


➤ Acumulación de metabolitos de defensa en las plántulas:



Acumulación de Fenoles y Flavonoides en respuesta a herida y a inoculación con patógeno en genotipos susceptibles

➤ Análisis del estrés oxidativo: acumulación de Prolina




Estrés oxidativo inducido por *Ophiostoma* observado sólo en un genotipo susceptible y en un tolerante

# CONCLUSIONES


## Tolerantes Vs Susceptibles

1. No se encontraron **diferencias en la distribución** de los hongos en las plántulas.
2. En inoculación de *O. novo-ulmi* **misma respuesta en Raíz** a nivel genético.
3. Posible **respuesta sistémica más rápida en Parte Aérea** en genotipos tolerantes.
4. Mayor **acumulación de metabolitos de defensa** en susceptibles en respuesta a herida y a la entrada del patógeno

## M-DV 1 Vs VA-AP 38

1. Clara **respuesta sistémica en M-DV 1** con la inoculación de *O. novo-ulmi*.
2. No sobreexpresión génica en Parte Aérea de **VA-AP 38** 
  - Diferente ruta** de defensa
  - Causa de **mayor estrés**

## Efecto beneficioso de P5

1. La pre-inoculación de P5 
  - en **tolerantes reduce la translocación** del patógeno a Parte Aérea
  - en **susceptibles reduce la presencia** del patógeno en Raíz
2. La inoculación previa del endófito **reduce la sobreexpresión génica** producida por *O. novo-ulmi* y la **acumulación de Fenoles y Flavonoides** en olmos susceptibles en respuesta al patógeno.

**MUCHAS GRACIAS POR SU ATENCIÓN**



CAMPUS  
DE EXCELENCIA  
INTERNACIONAL



**7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL**

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



26 - 30 junio 2017 | **Plasencia**  
Cáceres, Extremadura



[www.congresoforestal.es](http://www.congresoforestal.es)