

CARVACROL Y ÁCIDO SALICÍLICO INCREMENTAN LA RESISTENCIA DE *ULMUS MINOR* FRENTE A *OPHIOSTOMA NOVO-ULMI*

Juan Antonio Martín García¹, Alejandro Solla Hach², Luis Gil Sánchez¹ y María Concepción García Vallejo³

¹ Anatomía, Fisiología y Genética Forestal. ETSI de Montes. Universidad Politécnica de Madrid. Paseo de las Moreras s/n. 28040-MADRID (España). Correo electrónico: luis.gil@upm.es

² Ingeniería Técnica Forestal. Universidad de Extremadura. Avenida Virgen del Puerto 2. 10600-PLASENCIA (Cáceres, España). Correo electrónico: asolla@unex.es

³ Productos Forestales. Centro de Investigación Forestal. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Carretera de la Coruña km 7,5. 28040-MADRID (España). Correo electrónico: garcival@inia.es

Resumen

Ophiostoma novo-ulmi es el principal hongo patógeno causante de la grafiosis del olmo. En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de ocho compuestos fenólicos simples sobre el crecimiento *in vitro* de *O. novo-ulmi*, y sobre la susceptibilidad *in vivo* de *Ulmus minor* a este patógeno. Los compuestos carvacrol, timol, y ácido salicílico mostraron mayor actividad antifúngica que el resto de los fenoles; dosis inferiores a 50 µg.ml⁻¹ redujeron en un 50% el crecimiento *in vitro* del hongo (dosis EC₅₀). Árboles regados dos meses con carvacrol y ácido salicílico (400 mg.l⁻¹; 1 l/semana/planta; n = 20) mostraron menores marchitamientos foliares, 120 días tras la inoculación con *O. novo-ulmi*, que árboles no tratados. Los resultados sugieren que la actividad antifúngica del carvacrol y del ácido salicílico mostrada *in vitro* se traduce en menores síntomas foliares si los árboles son tratados con estos compuestos, aunque otro tipo de factores de resistencia, inducidos por los tratamientos, podrían estar implicados.

Palabras clave: *Olmo*, *Grafiosis*, *Dutch elm disease*, *Control químico*

INTRODUCCIÓN

En el ámbito de la patología vegetal, los compuestos fenólicos han sido descritos como metabolitos secundarios implicados en los procesos defensivos de las plantas (NICHOLSON & HAMMERSCHMIDT, 1992). La acumulación de fenoles en tejidos vegetales se ha relacionado con importantes mecanismos de defensa de las plantas ante patógenos, tales como la vía fenilalanina amonioliasa (PAL), o la reacción hipersensible (SILVA et

al., 2002). En *Picea abies*, por ejemplo, se ha detectado la acumulación de compuestos fenólicos en zonas infectadas por el hongo *Gremmenella abietina*, observándose la síntesis por inducción sistémica de fenilpropanoides en zonas alejadas de la infección (CVIKROVÁ et al., 2006). En el pato-sistema *P. abies-Ophiostoma polonicum-Ips typographus* se ha destacado el papel que juegan los fenoles en la resistencia de los árboles hacia el hongo, por su implicación directa en la vía flavonoide (BRIGNOLAS et al., 1995).

La grafiosis del olmo es causada por los hongos *Ophiostoma ulmi* y *O. novo-ulmi*, los cuales se desarrollan en los vasos del xilema causando su cavitación y oclusión (GIL et al., 2003). Los hongos son transmitidos mediante coleópteros del género *Scolytus* o mediante contactos radiculares. Diversos trabajos han confirmado la implicación de los compuestos fenólicos en los mecanismos de defensa de los olmos ante la grafiosis (GAGNON, 1967; TIPPET & SHIGO, 1981; DUCHESNE et al., 1992). Se plantea la hipótesis de que la aplicación de fenoles en olmos susceptibles pueda incrementar su resistencia ante la grafiosis. Los objetivos del presente trabajo son: i) evaluar el efecto de ocho compuestos fenólicos simples (fenol y alquil-derivados) en el crecimiento *in vitro* de *O. ulmi* y *O. novo-ulmi*, y ii) evaluar si el riego con esos fenoles a plantas de *U. minor* incrementa su resistencia ante *O. novo-ulmi*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Evaluación *in vitro* de la actividad fungicida de los fenoles

El efecto de los fenoles se evaluó *in vitro* sobre tres cepas de hongos, P-98, P-114 y NA-PE, correspondientes a *O. ulmi*, *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* y *O. novo-ulmi* ssp. *americana*, respectivamente. Los 8 fenoles ensayados fueron fenol, *o*-cresol, *m*-cresol, *p*-cresol, 2,5-dimetilfenol, carvacrol, timol y ácido salicílico. Se utilizó un lector de absorbancia en microplaca, siguiendo la metodología descrita por RAPOSO et al. (1995). En los 96 pocillos de las microplacas se depositaron (i) una suspensión de esporas del hongo en medio líquido de cultivo de Tchernoff a una concentración de 10^4 esporas.ml⁻¹ (control), y (ii) una suspensión de esporas igual a la anterior pero conteniendo en disolución los diferentes fenoles a concentraciones de 0,2, 1, 10, 50, y 100 µg.ml⁻¹. Por cada cepa, compuesto y dosis se utilizaron 8 pocillos. La incubación se desarrolló durante 96 horas a 25°C, registrándose las densidades ópticas de los pocillos a intervalos de 24 horas. Las densidades ópticas obtenidas se relacionan directamente con el crecimiento del hongo. Todos los valores fueron corregidos por la densidad óptica en el tiempo cero.

Ensayos *in vivo* de la acción de los fenoles sobre el material vegetal

El material vegetal estuvo formado por 200 brinzales de *U. minor* procedentes de la olmeda de Rivas-Vaciamadrid, representando a 10 progenies, con 20 brinzales por progenie. Los brinzales eran de 3 savias y estaban plantados en macetas de 30 l. El efecto de los fenoles sobre la resistencia de la planta se evaluó mediante riego con 1 l de disolución de los diferentes fenoles. Si bien se ignora la concentración de fenol que puede ser absorbido por la planta, se seleccionó una concentración de 400 mg.l⁻¹ para los riegos, que se corresponde con el doble de la dosis más efectiva de las ensayadas en un estudio previo con fenol y cresoles (MARTÍN et al., 2008). Se regaron 20 brinzales por compuesto fenólico, 2 de cada progenie. Los riegos comenzaron el 15 de febrero y se repitieron semanalmente hasta el 24 de mayo. Como controles, 40 árboles adicionales se regaron con agua. El 29 de abril de 2006, los árboles tratados y 20 árboles control fueron inoculados con una suspensión de esporas de la cepa NA-PE (10^6 esporas.ml⁻¹). Los síntomas de grafiosis se evaluaron los días 30, 60 y 120 después de la inoculación, determinándose el porcentaje de marchitamiento foliar. La fenología foliar fue evaluada semanalmente durante los meses de febrero, marzo y abril de 2006 mediante la observación de unas 30 yemas foliares por árbol, lo que permitió determinar la fecha de rotura de yemas, según la metodología descrita por SANTINI et al. (2004). La altura de las plantas se midió al comienzo y final del periodo vegetativo.

Análisis estadísticos

Los valores de densidad óptica de los pocillos fueron analizados estadísticamente mediante ANOVAs multifactoriales, considerando dosis y cepa como factores, y las medias fueron comparadas entre los distintos tratamientos mediante tests LSD de Fisher ($P \leq 0,05$). Para cada compuesto y cepa se calculó la dosis que reduce la densidad óptica a la mitad, y se asumió este valor como EC₅₀ (RAPOSO et al., 1995). Para ello se realizaron regresiones lineales entre la reducción de la densidad óptica ocasionada por cada tratamiento, expresada en porcentaje, respecto al control a las 48 horas del inicio del ensayo, y el log₁₀

de las concentraciones de los fenoles. Los porcentajes de marchitamiento mostrados por las plantas fueron analizados mediante ANOVAs multifactoriales, considerando el tratamiento y la progenie como factores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se muestran los valores de EC₅₀ de los ocho compuestos fenólicos evaluados *in vitro* en las tres cepas estudiadas. Los tres compuestos más efectivos fueron carvacrol, timol y ácido salicílico. Los valores de EC₅₀ para el car-

vacrol variaron significativamente entre cepas, con un valor mayor para la cepa NA-PE. La evolución temporal de los valores de densidad óptica para estos tres compuestos se muestra en la figura 1. Se observó un progresivo aumento de densidad óptica con el tiempo, siendo dicho aumento menor a medida que la dosis se incrementó. Las dosis EC₅₀ obtenidas para los tres compuestos más efectivos son del mismo orden de magnitud que los obtenidos por NERI *et al.* (2007) al testar la eficacia de 9 extractos de plantas volátiles, incluyendo el carvacrol, ante *Monilinia laxa*, si bien son relativamente superiores a los obtenidos por RAPOSO *et al.* (1995) al testar dos fungicidas

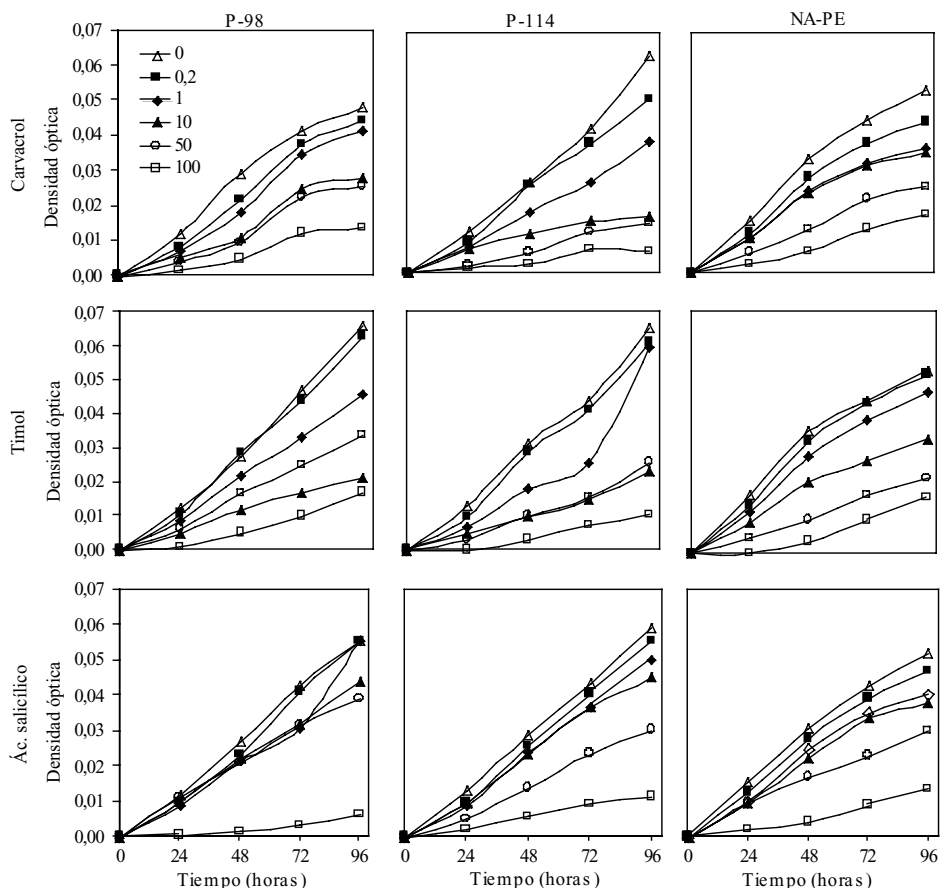


Figura 1. Crecimiento de las cepas P-98 (*O. ulmi*), P-114 (*O. novo-ulmi ssp. novo-ulmi*), y NA-PE (*O. novo-ulmi ssp. americana*) evaluado a partir de la densidad óptica de pocillos conteniendo medio líquido de Tchernoff en disolución con diferentes dosis de carvacrol, timol, y ácido salicílico (0, 0,2, 1, 10, 50, y 100 µg.ml⁻¹)

sintéticos ante *Botrytis cinerea*. En trabajos que emplean una metodología similar a la nuestra, si bien utilizando otros compuestos y hongos (RAPOSO et al., 1995; KUHAJEK et al., 2003), se han detectado interacciones significativas dosis-cepas dentro de un mismo taxón. Por tanto sería necesario ensayar más cepas dentro de cada uno de los tres taxones utilizados.

El tratamiento más efectivo en la reducción de síntomas respecto al tratamiento control fue el carvacrol (Tabla 2). El marchitamiento de los árboles tratados con carvacrol fue significativamente menor al mostrado por los árboles control en las tres fechas de evaluación de síntomas, incrementándose las diferencias con el tiempo. El segundo compuesto más efectivo fue el ácido salicílico, el cual redujo significativamente los síntomas respecto al control los días 60 ($P \leq 0,10$) y 120

($P \leq 0,05$) tras la inoculación. Los tratamientos *p*-cresol y timol redujeron síntomas en el día 30 ($P \leq 0,05$), y el fenol en el día 60 ($P \leq 0,10$). En ninguna de las tres fechas de evaluación de síntomas, el factor progenie resultó significativo ($P > 0,20$).

Los árboles tratados con 2,5-dimetilfenol, timol, carvacrol, y ácido salicílico mostraron una fenología foliar avanzada respecto a los árboles control (Tabla 2). El factor progenie sí tuvo en este caso un efecto significativo sobre la fenología foliar ($P < 0,01$). Tanto el factor tratamiento como el factor progenie resultaron significativos ($P < 0,05$) sobre el crecimiento apical de los árboles. Los olmos inoculados mostraron un crecimiento significativamente inferior a los no inoculados ($P < 0,01$), y no se observaron diferencias de crecimiento entre los grupos de árboles inoculados (Tabla 2).

Compuesto	P-98	P-114	NA-PE	Significación ^a
Fenol	>1.000	>1.000	>1.000	-
<i>o</i> -cresol	>1.000 b	576,3 ± 81,1 a	682,1 ± 105,0 a	<0,01
<i>m</i> -cresol	646,0 ± 74,8 b	219,7 ± 37,8 a	220,2 ± 65,1 a	<0,01
<i>p</i> -cresol	>1.000 b	319,7 ± 30,4 a	>1.000 b	<0,01
2,5-dimetilfenol	>1.000	>1.000	>1.000	-
Carvacrol	3,1 ± 0,7 a	4,6 ± 0,4 a	13,3 ± 2,8 b	<0,01
Timol	21,8 ± 10,8 a	3,9 ± 0,2 a	8,7 ± 1,4 a	0,17
Ácido salicílico	45,1 ± 17,2 a	29,5 ± 10,9 a	21,3 ± 2,1 a	0,39

Tabla 1. Valores de EC_{50} (media ± ES; $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) de los ocho compuestos fenólicos evaluados en las cepas P-98 (*O. ulmi*), P-114 (*O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi*) y NA-PE (*O. novo-ulmi* ssp. *americana*). Para cada compuesto, letras diferentes indican diferencias significativas entre cepas ($P \leq 0,05$). ^a Significación resultante de un análisis de varianza (ANOVA) unifactorial de los valores EC_{50} para cada compuesto, considerando la cepa como factor

Tratamiento	Marchitamiento (%)			Fecha rotura de yemas	Crecimiento apical (cm)
	Día 30	Día 60	Día 120		
Fenol	20,1 ± 4,9	20,9 ± 4,9 *	34,3 ± 6,2	5 abril	21,7 ± 4,2
<i>o</i> -cresol	22,3 ± 3,7	25,2 ± 5,2	32,9 ± 6,1	5 abril	19,9 ± 5,7
<i>m</i> -cresol	21,3 ± 4,8	26,9 ± 6,0	30,0 ± 5,8	5 abril	20,4 ± 7,2
<i>p</i> -cresol	14,1 ± 3,7 **	27,0 ± 4,9	38,5 ± 6,3	5 abril	22,7 ± 4,6
2,5-dimetilfenol	18,6 ± 3,9	31,7 ± 6,2	39,6 ± 7,4	22 marzo	22,8 ± 5,5
Carvacrol	14,3 ± 3,3 *	15,4 ± 5,2 **	17,8 ± 4,4 ***	29 marzo	19,0 ± 4,6
Timol	14,6 ± 2,5 **	23,9 ± 5,4	35,1 ± 7,0	22 marzo	20,9 ± 6,0
Ácido salicílico	17,6 ± 3,6	21,9 ± 4,8 *	25,9 ± 5,8 **	29 marzo	19,9 ± 4,5
Agua - inoculado	26,2 ± 4,6	34,9 ± 5,5	47,6 ± 7,4	5 abril	20,3 ± 5,2
Agua - no inoculado	0,0 ± 0,0 ***	0,0 ± 0,0 ***	0,0 ± 0,0 ***	5 abril	40,1 ± 7,4 ***

Tabla 2. Porcentajes de marchitamiento foliar, fecha de rotura de yemas y crecimiento apical (media ± ES) de *Ulmus minor* sometidos a riego de ocho compuestos fenólicos. Los valores de marchitamiento corresponden a los 30, 60 y 120 días tras la inoculación con *O. novo-ulmi*. En cada columna, los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control inoculado a $P \leq 0,10$ (*), $P \leq 0,05$ (**), y $P \leq 0,01$ (***)

Diversos productos químicos han sido investigados para combatir la grafiosis. Los de mayor difusión han sido los benzimidazoles, por ser sistémicos y activos a bajas concentraciones (STENNES, 2000), aunque no siempre efectivos. Se han descrito otro tipo de productos químicos, reguladores del crecimiento, que reducen la susceptibilidad de *U. americana* a *O. ulmi* (SMALLEY, 1962; BRENER & BECKMAN, 1967). Estos productos alteran la fenología de formación de la madera e inducen la formación de tilosas, factores que pueden condicionar la susceptibilidad del árbol. Es difícil determinar el mecanismo implicado en el incremento de resistencia observado en plantas tratadas con carvacrol y ácido salicílico, si bien se plantean tres hipótesis no excluyentes: (i) los compuestos, tras su absorción por el sistema radicular de la planta, ejercieron un efecto fungitóxico o fungiestático sobre *O. novo-ulmi*, (ii) los tratamientos alteraron la fenología de las plantas induciendo indirectamente resistencia, y (iii) los tratamientos activaron los mecanismos de defensa de los árboles.

La efectividad mostrada *in vitro* por el carvacrol y el ácido salicílico respalda la primera hipótesis. En la actualidad se estudia si fenoles aplicados mediante riego a olmos son absorbidos por la planta y la concentración en la que están presentes en los tejidos xilemáticos de los ramillos. Cambios en la fenología causados por los tratamientos pudieron también influir en la susceptibilidad de las plantas. Un adelanto en la formación de la madera tardía proporcionaría al árbol una mayor proporción de vasos de menor diámetro en el momento de la inoculación, lo que supondría una menor dispersión pasiva del hongo y una mayor seguridad hídrica por parte del árbol ante cavitaciones por grafiosis. Para constatar esta hipótesis se realizaron heridas en la base del tronco de cada árbol los días 1 de mayo, 1 junio y 1 de agosto de 2006, con el fin de marcar el incremento del anillo de crecimiento en cada una de las fechas señaladas. El estudio histológico de estos tallos, todavía en progreso, determinará las características del xilema para cada fecha y tratamiento. Por último, se considera la posible inducción de mecanismos de defensa del árbol por los tratamientos. Este proceso ha sido descrito en otras especies vegetales tratadas con ácido salicílico (MAUCH-

MANI & MÉTRAUX, 1998; SPLETZER & ENYEDI, 1999). Recientemente se ha constatado que *U. minor* tratado con fenol y *o*-cresol origina una acumulación de suberina en el xilema de los ramillos, como resultado del estrés generado en la planta (MARTÍN *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos generan nuevas expectativas para combatir la grafiosis del olmo, si bien la aplicación en suelo de determinados compuestos, tales como el fenol o los cresoles, se vería comprometida por su toxicidad ambiental. No obstante, fenoles de origen natural, como el carvacrol, el timol o el ácido salicílico presentan una toxicidad considerablemente menor. En la actualidad se están realizando inyecciones de fenoles en tronco como medida más compatible con el medio ambiente, y se está estudiando el efecto de estos fenoles sobre la floración y producción de semilla del árbol.

Agradecimientos

Agradecemos la ayuda prestada por Margarita Burón y Miguel Ángel García (UPM), así como el asesoramiento de la Dra. Rosa Raposo (CIFOR-INIA). El trabajo ha sido financiado por el proyecto INIA RTA05-151, y por el programa de conservación y mejora de los olmos ibéricos (convenio de colaboración DGB-UPM).

BIBLIOGRAFÍA

- BRENER, W.D. & BECKMAN, C.H.; 1967. A mechanism of enhanced resistance to *Ceratocystis ulmi* in American elms treated with sodium trichlorophenylacetate. *Phytopathology* 58: 555-561.
- BIGNOLAS, F.; LACROIX, B.; LIEUTIER, F.; SAUVARD, D.; DROUET, A.; CLAUDOT, A.C.; YART, A.; BERRYMAN, A.A. & CHRISTIANSEN, E.; 1995. Induced responses in phenolic metabolism in two Norway spruce clones after wounding and inoculations with *Ophiostoma polonicum*, a bark beetle-associated fungus. *Plant Physiol.* 109: 821-827.
- CVIKROVÁ, M.; MALÁ, J.; HRUBCOVÁ, M. & EDER, J.; 2006. Soluble and cell wall-bound phenolics and lignin in *Ascolyx abietina*

- infected Norway spruces. *Plant Sci.* 170: 563-570.
- DUCHESNE, L.C., HUBBES, M. & JENG, R.S.; 1992. Biochemistry and molecular biology of defense reactions in the xylem of angiosperm trees. In: R.A. Blanchette & A.R. Biggs (eds.), *Defense Mechanisms of Woody Plants Against Fungi*: 133-146. Springer-Verlag, Berlin.
- GAGNON, C.; 1967. Polyphenols and discolorations in the Elm disease investigated by histochemical techniques. *Can. J. Bot.* 45: 2119-2124.
- GIL, L.; SOLLA, A. E IGLESIAS, S. (EDS.); 2003. *Los Olmos Ibéricos, Conservación y Mejora frente a la Grafiosis*. Organismo Autónomo Parques Nacionales.
- KUHAJEK, J.M.; JEFFERS, S.N.; SLATTERY, M. & WEDGE, D.E.; 2003. A rapid microbioassay for discovery of novel fungicides for *Phytophthora* spp. *Phytopathology* 93: 46-53.
- MARTÍN, J.A.; SOLLA, A.; DOMINGUES, M.R.; COIMBRA, M.A. Y GIL, L.; 2008. Exogenous phenol increase resistance of *Ulmus minor* to Dutch elm disease through formation of suberin-like compounds on xylem tissues. *Env. Exp. Bot.* (En prensa)
- MAUCH-MANI, B. & MÉTRAUX, J.; 1998. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Ann. Bot.* 82: 535-540.
- NERI, F.; MARI, M.; BRIGATI, S. & BERTOLINI, P.; 2007. Fungicidal activity of plant volatile compounds for controlling *Monilinia laxa* in stone fruit. *Plant Dis.* 91: 30-35.
- NICHOLSON, R. & HAMMERSCHMIDT, R.; 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Rev. Phytopathol.* 30: 369-389.
- RAPOSO, R.; COLGAN, R.; DELCAN, J. & MELGAREJO, P.; 1995. Application of an automated method to determine fungicide resistance in *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.* 79: 294-296.
- SANTINI, A.; GHELARDINI, L.; FALUSI, M.; BOHNENS, J.; BURON, M. COLLIN, E.; SOLLA, A. & VANDEN BROECK, A.; 2004. Vegetative bud-burst variability of European elms. *Inv. Agr.; Sist. Rec. For.* 13: 47-54.
- SILVA, M.C.; NICOLE, M.; GUERRA-GUIMARAES, L. & RODRIGUES, C.J.; 2002. Hypersensitive cell death and post-haustoria defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 60: 169-183.
- SMALLEY, E.B.; 1962. Prevention of Dutch elm disease by treatments with 2,3,6-trichlorophenyl acetic acid. *Phytopathology* 52: 1090-1091.
- SPLETZER, M.E. & ENYEDI, A.; 1999. Salicylic acid induces resistance to *Alternaria solani* in hydroponically grown tomato. *Phytopathology* 89: 722-727.
- STENNES, M.A.; 2000. Dutch elm disease chemotherapy with Arbotect 20-S and Alamo. In: C.P. Dunn (ed.), *The Elms: Breeding, Conservation and Disease Management*: 173-188. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- TIPPET, J.T. & SHIGO, A.L.; 1981. Barrier zone formation: a mechanism of tree defense against vascular pathogens. *IAWA J.* 2: 163-168.