

Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de nuevos aislados de *Ophiostoma novo-ulmi*

G. DÍAZ, D. GALLEGRO, A. GUTIÉRREZ, A. MUSALY, E. SORIANO, J. GALIÁN

Se han aislado cepas de *Ophiostoma* a partir de olmos que presentaban síntomas de grafiosis, procedentes de 12 localidades en Murcia, España. Estos aislados se han caracterizado e identificado de acuerdo a su dinámica de crecimiento en cultivo, a tests de fertilidad y mediante el uso de marcadores moleculares para el gen *cu* de la toxina ceratoulmina y el gen *coll* de la forma de la colonia. Todos los aislados se identificaron como *O. novo-ulmi* subsp. *americana*, aunque no se descarta que nuevos aislados tengan otra asignación específica. Se pone de manifiesto la necesidad de complementar los criterios clásicos fisiológicos con métodos moleculares, pues el comportamiento de algunos aislados en cultivo es confuso y puede sugerir la existencia de hibridación.

G. DÍAZ, A. MUSALY. Depto. Biología Aplicada. Botánica. Universidad Miguel Hernández. Avda. Universidad s/n, 03202, Elche, Alicante. E-mail: gdiaz@umh.es
D. GALLEGRO, E. SORIANO, J. GALIÁN. Depto. Zoología y Antropología Física. Universidad de Murcia. Campus Espinardo, 30100, Murcia.
A. GUTIÉRREZ. Servicio de Apoyo a la Investigación. Universidad de Murcia. Campus Espinardo, 30100, Murcia.

Palabras clave: Ceratoulmina, grafiosis, olmo, *Ulmus*.

INTRODUCCION

La enfermedad de la grafiosis del olmo está producida por dos especies de hongos, *Ophiostoma ulmi* (Buisman) Nannfeldt (= *Ceratostomella ulmi* (Schwartz) Buisman; = *Ceratocystis ulmi* (Buisman) C. Moreau) y *O. novo-ulmi* Brasier, conocidas en el pasado como cepa no agresiva y agresiva respectivamente.

Ambas especies se corresponden a las dos pandemias sufridas en el siglo pasado en los olmos del hemisferio norte. La primera pandemia fue causada por *O. ulmi*, que produjo grandes pérdidas en los olmos americanos, altamente susceptibles, y pérdidas algo menores en los olmos europeos. Esta pandemia declinó en Europa a partir de 1940 (BRASIER, 1990), entrando en fase postepidé-

mica, con tasas de infección y morbilidad mucho más reducidas. En la década de 1980 se desató una segunda pandemia, mucho más destructiva, con un nuevo agente patógeno, *O. novo-ulmi*. Esta especie, mucho más agresiva, ha causado la muerte y destrucción de muchas olmedas europeas que habían sobrevivido a la enfermedad producida por *O. ulmi*. De hecho, *O. novo-ulmi* habría desplazado a *O. ulmi*, considerándose esta última especie como prácticamente extinguida (BRASIER, 2000).

Estas dos especies se diferencian tanto por características morfológicas, como fisiológicas y genéticas (BRASIER, 1991; BRASIER Y MEHROTRA, 1995). Así, estas especies pueden diferenciarse por que *O. ulmi* presenta el margen de la colonia liso, con escasos anillos de crecimiento y sin micelio aéreo, fren-

te al margen lobulado-petaloides, la abundancia de anillos de crecimiento y el micelio aéreo en *O. novo-ulmi*. Destaca también la elevada capacidad de producción de ceratoulmina y el menor tamaño de ADN mitocondrial en *O. novo-ulmi*.

O. novo-ulmi no es una única entidad, sino que existe como dos subespecies: subsp. *novo-ulmi* y subsp. *americana* (BRASIER y KIRK, 2001), conocidas antes como raza Euroasiática (EAN) y Norteamericana (NAN) respectivamente (BRASIER, 1979), debido a los núcleos de donde se cree que son originarias. Estas dos subespecies difieren también en otras propiedades tales como la morfología de la colonia, la morfología de los peritecios y por características genéticas que implican una barrera de fertilidad parcial entre ellas (BRASIER *et al.*, 1981). La subsp. *novo-ulmi* exhibe una barrera reproductiva parcial frente a la subsp. *americana*, de modo que cuando actúa como receptora y la subsp. *americana* como donante, la producción de peritecios se reduce un 90% (SOLLA y GIL, 2003). Los aislamientos de la subsp. *americana* producen colonias más regulares y estriadas, mientras que la subsp. *novo-ulmi* son menos estriadas, irregulares y con un fuerte dimorfismo micelial. Además, la subsp. *novo-ulmi* tiene un crecimiento más lento y es menos virulenta (BRASIER y KIRK, 2001).

A pesar de las diferencias entre ambas especies, se están detectando en la actualidad una serie de fenómenos genéticos que resultan en una evolución del patógeno extremadamente rápida en el tiempo, que puede llevar a la aparición de nuevas formas, especies, y manifestaciones de la enfermedad (BRASIER y BUCK, 2001, BRASIER *et al.*, 2004). Entre estos fenómenos se incluyen procesos de transferencia interespecífica de genes desde *O. ulmi* a *O. novo-ulmi*, así como transferencia de virus deletéreos de ARN desde *O. ulmi* a *O. novo-ulmi* mediante fusión de hifas compatibles. Además pueden producirse hibridaciones entre las dos subespecies de *O. novo-ulmi* (KONRAD *et al.*, 2002; BRASIER, 2000) o incluso hibridaciones interespecíficas (SOLLA *et al.*, 2008). Estos procesos están produciendo

de una gran heterogeneidad genética entre las especies, lo que dificulta la caracterización de especies y/o subespecies.

Como en el resto de España, en Murcia se empezó a detectar la presencia de la enfermedad a partir de la década de los 80, con la muerte de muchos ejemplares y la destrucción de olmedas completas. Excepcionalmente en la zona del tramo medio del río Segura, las olmedas quedaron a salvo de la enfermedad. Actualmente, la enfermedad parece haber llegado a una situación relativamente estable, y se encuentra en una situación postepidémica.

Sin embargo, la información previa sobre las especies/subespecies de *Ophiostoma* que originan la grafiosis en Murcia es muy escasa. MUÑOZ (1985) hace referencia a la presencia de la cepa agresiva en la zona de Caravaca, y más recientemente SOLLA *et al.* (2006), citan por primera vez en España la presencia de *O. novo-ulmi* subsp. *novo-ulmi* en 16 muestras procedentes de La Coruña, Murcia, Navarra y Cáceres.

Por ello, es necesario disponer de un conocimiento más profundo de los agentes que causan la grafiosis que pueda explicar en parte las diferencias de la agresividad de la grafiosis en las olmedas de Murcia, y por tanto poder plantear un posible programa de recuperación del olmo en Murcia, especie catalogada como de Interés Especial en el Catálogo Regional de Flora Silvestre Protegida de la Región de Murcia (Decreto nº 50/2003).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar e identificar las especies y subespecies de *Ophiostoma* causantes de grafiosis en la Región de Murcia, siguiendo los criterios establecidos de dinámica de crecimiento en cultivo puro y por métodos moleculares, así como determinar, si lo hubiere, el grado de introgresión genética o hibridación entre especies y/o subespecies.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento de los hongos

Las muestras de ramas infectadas se recogieron de 12 olmedas afectadas por sín-

Cuadro 1. Fecha y localidad de procedencia de los aislados de *Ophiostoma* utilizados, causantes de grafiosis en Murcia, España

Cepa	Registro alternativo (molecular)	Fecha	Localidad	Coordenadas UTM
1	j1	20/10/03	Olmeda Maripinar. Cieza	636854-4233824
4	46	20/10/03	Bullas	620730-4213944
5	5a, 5c	21/10/03	Casa Paco. Calasparra	611558-4230316
10	10.6	21/10/03	La Curva. Calasparra	613860-4233275
19	19.6	23/10/03	Casa de Litanes. Jumilla	646244-4257405
32	32a	24/10/03	Rbla del Cañar. Cartagena	661049-4162894
43	-	16/12/03	El Cañar. Cartagena	661049-4162894
47	47.4	17/10/04	N301. Cieza	634366-4240238
62	62.2	17/10/04	La Torrecilla. Lorca	600663-4176493
68	-	22/11/04	Casa labor Ulea. Moratalla	604166-4228897
74	74.2	22/11/04	Campo San Juan. Moratalla	5809604226969
75	75.3	22/11/04	Casa Paco. Calasparra	611558-4230316

tomas de grafiosis con distintos grados (Cuadro 1), ubicadas en la provincia de Murcia y se trasladaron en condiciones óptimas al laboratorio.

Los aislamientos se realizaron a partir de fragmentos de ramillas de un grosor aproximado de 1 cm, esterilizados en hipoclorito sódico al 3% durante 10 minutos en agitación, lavados con agua destilada estéril y descortezados con ayuda de pinzas y bisturí, para limitar las contaminaciones. Posteriormente se cortaban fragmentos de unos 0,5-1 cm de espesor que se colocaban en placas Petri con medio de cultivo agar-malta (1,5 % agar, 2 % de malta).

Determinación de las temperaturas óptimas y límite de crecimiento

Se siguieron los criterios de BRASIER *et al.* (1981) establecidos para diferenciar las cepas agresiva y no agresiva, es decir las especies *O. novo-ulmi* y *O. ulmi*. Para ello, las colonias se incubaron en oscuridad a diferentes temperaturas (20°C: T^a óptima de *O. novo-ulmi*; 30°C: T^a óptima de *O. ulmi*; 32°C: T^a límite de *O. novo-ulmi*; 35°C: T^a límite de *O. ulmi*). El diámetro de la colonia se midió todos los días.

Las cepas utilizadas para este ensayo fueron los aislamientos con número: 1, 10, 19,

32 y 43 y una cepa autóctona de *O. novo-ulmi*, proporcionada por el Dr. J. Díaz-Casero, de la Universidad de Valladolid (denominada en adelante O-Va), que se utilizó como comparación. Se usaron 3 réplicas por tratamiento.

Descripción morfológica de las colonias

Se siguieron los criterios de BRASIER (1990) y BRASIER y MEHROTA (1995), basados en el color, la presencia o ausencia de zonas más pigmentadas, la existencia de anillos de crecimiento concéntrico, la presencia o ausencia de micelio aéreo, el tipo de margen que presenta la colonia y el aspecto que presenta (algodonoso, fibroso, estriado...). Asimismo se realizaron preparaciones microscópicas. Para ello se tomaron pequeñas porciones de micelio y se colocaron sobre una gota de agua o lactofucsina. Éstas se observaron en un microscopio Olympus CH20 para determinar las características del micelio y estructuras asociadas (sinemas, conidios...).

Estudio de compatibilidad sexual

De acuerdo con IPINZA *et al.* (1990), si la cepa problema corresponde a *O. novo-ulmi*, se debe inocular una placa con un patrón conocido tipo A y otro tipo B de *O. novo-ulmi* y con el aislamiento desconocido. Si la

cepa problema corresponde a *O. ulmi*, habría que contar con dos placas, una con patrones de *O. novo-ulmi* y otra de *O. ulmi*. Si el desconocido es A, los peritecios se formarán entre el límite del patrón B y el desconocido, y en el límite del patrón A y el desconocido si este último es B.

Así pues, se inocularon placas conteniendo agar-malta con 3 cepas situadas de forma que quedaran equidistantes. El inóculo consistió en discos de 0,8 cm de diámetro de agar con micelio, procedente del margen de la colonia de cultivos incubados previamente durante 8-10 días. Los cultivos se incubaron durante una semana a 20°C en oscuridad y posteriormente durante dos semanas en luz difusa a la temperatura del laboratorio para favorecer la formación de peritecios.

Las cepas problema utilizadas en este ensayo fueron la 32 y la 1. Como patrones se utilizaron las cepas de *O. ulmi* A(H-173), B(PM-PL) y las de *O. novo-ulmi* A/NAN(H-172), A/EAN(YU-16), B/NAN(H-363) y B/EAN(H-219) procedentes del centro Nacional de Mejora Genética Forestal "Puerta de Hierro" y proporcionadas por la Dra. M. Burón Barrio. El ensayo se realizó por duplicado. El esquema se indica en el cuadro 2.

Análisis molecular

Los cultivos se repicaron y colocaron sobre placas de Petri que contenían agar-extracto de malta, con celofán, para facilitar la extracción del micelio, incubándose de 4 a 7 días en oscuridad a 20 °C. Las cepas utilizadas para estos ensayos fueron la 1, 4, 5, 10, 19, 32, 43 47, 62, 68, 74, 75.

La extracción del ADN se realizó homogeneizando fragmentos de micelio levantado del celofán, en un tubo Eppendorf estéril de 1,5 ml. Las muestras eran congeladas en hielo seco para facilitar la homogeneización. A los homogeneizados se les añadió 700 µl de tampón de extracción (1% bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), 0,7 M NaCl, 50 mM Tris pH 8,0, 10 µM EDTA, 1% 2-mercaptoetanol) durante 30 min. Posteriormente, se añadió un volumen igual de cloroformo-isoamilalcohol (24:1) y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min. En el siguiente paso se transfirieron 600 ml de sobrenadante a un nuevo tubo y se añadió un volumen igual de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos. Los tubos se centrifugaron otra vez durante 30 s a 13000 rpm, y el pellet se resuspendió en 300 µl de tampón TE (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). Se añadió 1 µl de ARNasa A y se incubó la muestra a 37 °C durante 30 min. Las muestras se re-extrajeron con cloroformo-isoamilalcohol (24:1). El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo 1,5 ml añadiéndose 700 µl de etanol 96 % (preenfriado a -20 °C). Las muestras se centrifugaron durante 30 s a 13000 rpm y el pellet se resuspendió en 50 µl de tampón TE.

Amplificación del gen *cu*

Se ha analizado un fragmento de 827 pb del gen de la toxina ceratoulmina, amplificándose en una reacción con un volumen de 25 µl, que contenía 2,5 µl de tampón sigma 10x (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.01% gelatina) con 1 µl adicional de 25 mM MgCl₂ para llevar la

Cuadro 2. Disposición de las cepas problema y cepas patrones conocidos en las placas de cultivo para el estudio de la compatibilidad sexual

Cepa problema	Patrones	
	A	B
32	<i>O. novo-ulmi</i> EAN	<i>O. novo-ulmi</i> EAN
32	<i>O. novo-ulmi</i> NAN	<i>O. novo-ulmi</i> NAN
1	<i>O. novo-ulmi</i> EAN	<i>O. novo-ulmi</i> EAN
1	<i>O. novo-ulmi</i> NAN	<i>O. novo-ulmi</i> NAN
1	<i>O. ulmi</i>	<i>O. ulmi</i>

concentración de $MgCl_2$ a 2,5 mM, 0,5 mM de dNTPs, 0,4 nM de cebadores *CU-F* (5'-gggcagcttaccagagtgaac -3') y *CU-R* (5'-gcgttatgatgtagcgggtggc- 3'), 0,4 μ l (= 2 unidades) de Taq DNA polimerasa, y 1 μ l de ADN purificado.

La PCR se llevó a cabo en un termociclador PTC-100. Los parámetros de la reacción fueron los siguientes: 95 °C durante 2 min seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 1 min, 68 °C durante 1 min y 1 min a 72 °C. La extensión final se realizó durante 4 min a 72 °C. El resultado se visualizó en geles de agarosa al 1 % teñidos con bromuro de etidio.

Los productos de PCR se secuenciaron directamente mediante el método *dideoxy chain terminator*, usando el kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* con *Ampli Taq DNA* polimerasa, en un secuenciador ABI PRISM Tm 377 DNA. Las diferencias en la secuencia de bases se utilizarán para discriminar entre las especies *O. ulmi* y *O. novo-ulmi*. Las secuencias se alinearon manualmente.

Amplificación del gen *colI*

Se amplificó un fragmento de 417 pb del gen forma de la colonia. Se utilizaron los cebadores *colI-F* (5'-gcagttgtgacatgtatg-3'); *colI-R* (5'-tgcttgacgtatgctcg-3'). Las condiciones de PCR fueron las mismas que las utilizadas para el gen *cu*, pero con una temperatura de anillamiento de 58 °C en lugar de 68 °C. Posteriormente se han determinado la secuencia de bases del fragmento para encontrar diferencias entre subespecies. Las secuencias se alinearon manualmente.

Consulta de bases de datos de secuencias genéticas

Se accedió a la base de datos GenBank, disponible en la dirección WEB: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>. Se descargaron las secuencias que se indican en el Cuadro 3.

Con las secuencias obtenidas se calculó el mejor árbol filogenético mediante métodos bayesianos, mediante la generación de 500000 árboles y su posterior selección, utilizando el software MrBayes 3.1.2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización morfológica y fisiológica

El crecimiento del micelio de las cepas de *Ophiostoma* fue variable tanto en aspecto como en velocidad, dependiendo de la temperatura de incubación y de la cepa, aunque en general fue más rápido que los indicados por BRASIER *et al.*, (1981) para otras cepas de este hongo.

En las figuras 1 y 2 se muestran los resultados de crecimiento del micelio obtenidos a diferentes temperaturas. En el cuadro 4 se describe brevemente el aspecto de los cultivos obtenidos a diferentes temperaturas.

La cepa 1 no corresponde a ningún patrón claro. Según la temperatura límite, correspondería a *O. novo-ulmi* al no crecer a 32 °C. En cambio, según la temperatura óptima de crecimiento, podría asignarse tanto a *O. novo-ulmi* (temperatura óptima 20-22 °C) como a *O. ulmi* (temperatura óptima 28-30 °C). Las características morfológicas del micelio (cuadro 4) indican que pueda tratarse de *O. novo-ulmi*. Es interesante destacar que la zona de

Cuadro 3. Número de secuencias descargadas de GenBank¹ por especie, subespecie y marcador molecular estudiado. ¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>

		Cu	ColI
<i>O. novo-ulmi</i>	EAN	2	1
	NAN	1	1
<i>O. ulmi</i>		3	1
<i>O. novo-ulmi mutante</i>		1	0
Híbrido <i>O. novo-ulmi</i> x <i>O. ulmi</i>		2	0
<i>O. himal-ulmi</i>		2	0

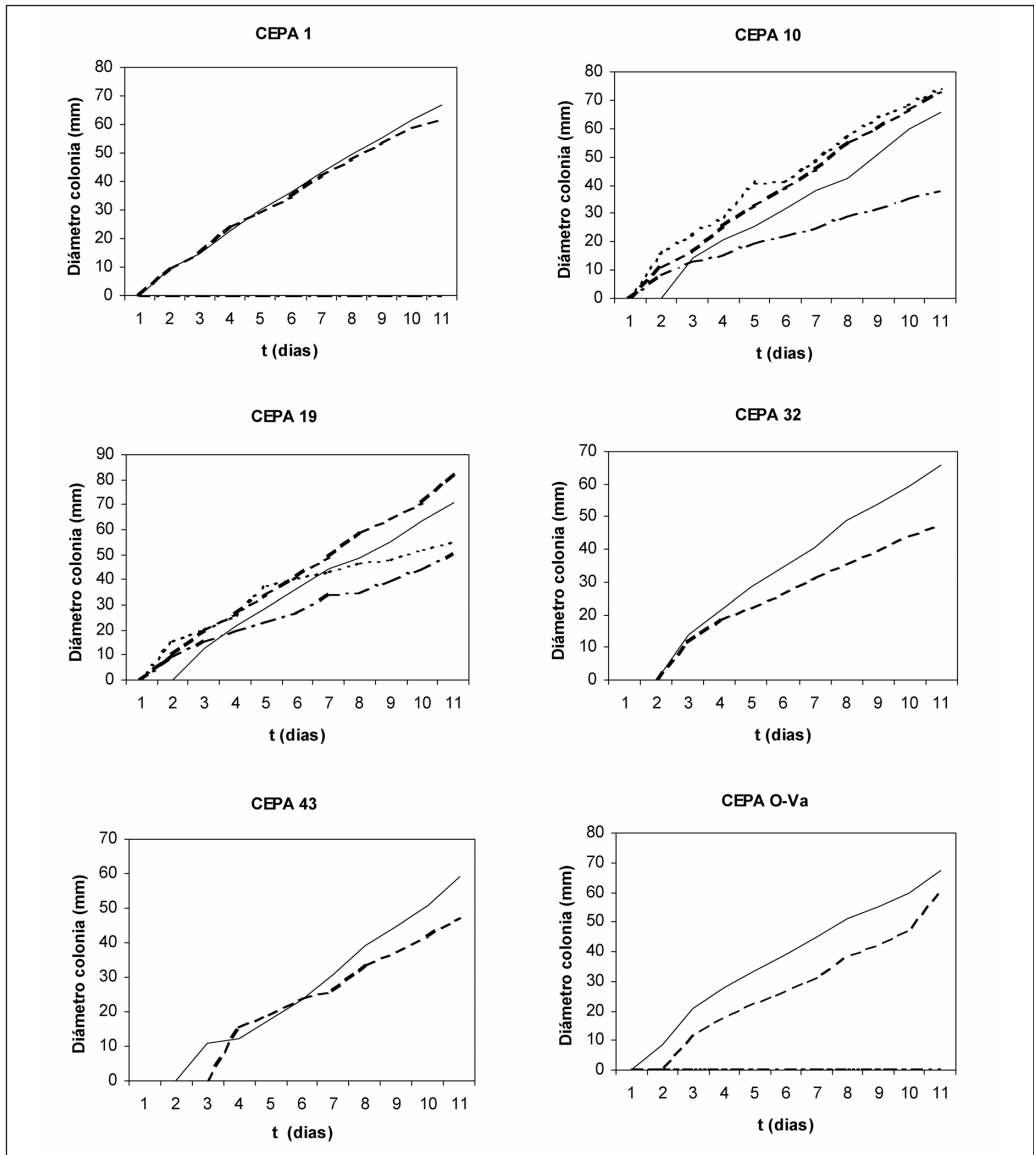


Figura 1. Representación gráfica del diámetro de la colonia (mm) de cepas de *Ophiostoma* aislados de olmos con grafiosis en Murcia y una cepa autóctona (O-Va) incubados a diferentes temperaturas a lo largo del tiempo (— 20°C; - - - 30°C; - · - · 32°C; 35°C).

procedencia de esta cepa se trata de olmedas monumentales en la comarca de Cieza (Vega Media del Segura), en las que se aísla el patógeno, pero que nunca han sufrido la enfermedad de la grafiosis.

Las cepas 10 y 19 en principio podrían considerarse *O. ulmi* por el crecimiento óptimo a 30 °C. Sin embargo, el hecho de que siga creciendo a 35 °C, que debiera ser su temperatura límite, pone en duda esta ad-

Cuadro 4. Características morfológicas de las colonias de los aislados de *Ophiostoma* crecidos a 20°C y 30°C.

Cepa	Tª	Características morfológicas
1	20°C	Color blanco-crema, margen regular, numerosos anillos de crecimiento concéntrico y micelio aéreo escaso.
	30°C	Color grisáceo, margen ligeramente lobulado, anillos de crecimiento, micelio ligeramente aéreo y presencia de sinemas.
10	20°C	Color crema oscuro, margen regular, sin anillos de crecimiento, aspecto céreo con algunas aglomeraciones de micelio.
	30°C	(igual que a 20°C).
19	20°C	Color crema claro, margen regular, sin anillos de crecimiento y zonas de aglomeración de micelio.
	30°C	El mismo aspecto, pero mayor presencia de zonas algodonosas.
32	20°C	Color blanco crema, presencia de anillos de crecimiento concéntrico, periferia con micelio incluido en el medio y centro con micelio aéreo. Margen lobulado y presencia de sinemas.
	30°C	El mismo aspecto, pero el margen es lobulado.
43	20°C	Color blanco-crema, presencia de anillos de crecimiento concéntrico, periferia con micelio incluido en el medio y centro con micelio aéreo. Margen lobulado y presencia de sinemas.
	30°C	El mismo aspecto, pero todo el micelio incluido en el medio.
O-Va	20°C	Color blanco-crema, presencia de anillos de crecimiento, margen ligeramente lobulado y micelio prácticamente incluido en el medio.
	30°C	(igual que a 20°C).

cripción. Esto puede ser debido al hecho, bastante frecuente en estos hongos, de que en cultivo crezcan asociados virus o bacterias que serían los responsables del crecimiento a altas temperaturas (SINGLETON *et al.* 1987). Esta teoría puede quedar confirmada por el aspecto de la colonia que, con el paso del tiempo, fue adoptando un aspecto en cuanto a color y textura diferente al resto. Por tanto, según el comportamiento en cultivo, podrían adscribirse tanto a *O. ulmi* como a *O. novo-ulmi*.

Las cepas 32 y 43 y la cepa O-Va muestran un comportamiento similar, que coincide claramente con el de *O. novo-ulmi* ya que presentan el óptimo de crecimiento a 20 °C y no crecen a 32 °C. Por otro lado, las características morfológica de estas cepas (cuadro 4) corresponden con las que BRASIER *et al.* (1981) y BRASIER (1991) describen para dicho hongo. Por tanto, se puede afirmar que estos aislados corresponden a *O. novo-ulmi*. El ensayo con la cepa de referencia nos sirvió de testigo para evaluar la validez del método utilizado. Las observaciones realizadas en los muestreos de campo confirman

este resultado, pues se constata un rápido avance de la enfermedad, con la muerte de la mayoría de los pies del olmo, sobreviviendo sólo algún rebrote aislado.

En todos los casos, al microscopio, las hifas aparecen hialinas, septadas y con una pared de 1,5-7 µm de ancho. Se observa también agregación de las hifas formando cordones. Se observaron también conidios unicelulares, hialinos, simples y piriformes, de 4-6 x 2-3 µm procedentes de conidióforos tipo *Sporothrix* y que aparecieron al cabo de 1-3 días de iniciado el cultivo. Asimismo se pudo constatar, en la mayoría de los aislados, la formación de sinemas de tipo *Pesotum* (= *Graphium*), de 1-3 mm de longitud, formado por hifas negras densamente aglutinadas y una estructura globosa en la parte superior de más de 200 µm de diámetro, donde se sitúan las células conidiógenas que dan lugar a los conidios. Estos se formaron en el margen de la colonia cuando alcanzaban su máximo crecimiento, después de 2-5 semanas.

En el ensayo de compatibilidad sexual o test de fertilidad, respecto a la cepa 32, se

reconocieron peritecios entre la muestra problema y el patrón A, por lo que se puede afirmar que esta cepa corresponde a *O. novo-ulmi* subsp. *americana* de tipo B, o aislamiento donante (+). Asimismo, se observaron peritecios entre los patrones A y B de la subsp. *americana*. En cuanto a la cepa 1, no se reconocieron peritecios en ninguna de las placas. Este hecho apoya la teoría de que este aislado presenta una peculiar dinámica de crecimiento en cultivo, por lo que no se puede confirmar de qué especie/subespecie se trata únicamente por criterios morfo-fisiológicos.

Identificación molecular

Se trabajó con un total de 28 secuencias del fragmento *cu* estudiado, que incluían 11 secuencias descargadas de GenBank (Cuadro

3) y 16 secuencias de muestras murcianas, así como la cepa alóctona O-Va. Los resultados se ilustran en forma de árbol en la Figura 3. Se presenta el árbol consenso obtenido a partir de la generación de 500000 árboles y su posterior selección por métodos bayesianos. Se observa una clara estructura filogenética en la que todas las muestras murcianas, así como la muestra O-Va se incluyen en el clado que comprende a la especie *O. novo-ulmi*. La especie *O. ulmi* así como los híbridos *O. novo-ulmi* x *O. ulmi* quedan agrupados en un clado independiente.

Se observa también una organización dentro del clado que comprende a *O. novo-ulmi*, de forma que las tres secuencias correspondientes a la subsp. *novo-ulmi* (EAN) quedan comprendidas en un subclado. El resto de las secuencias, que incluye tanto a las murcianas

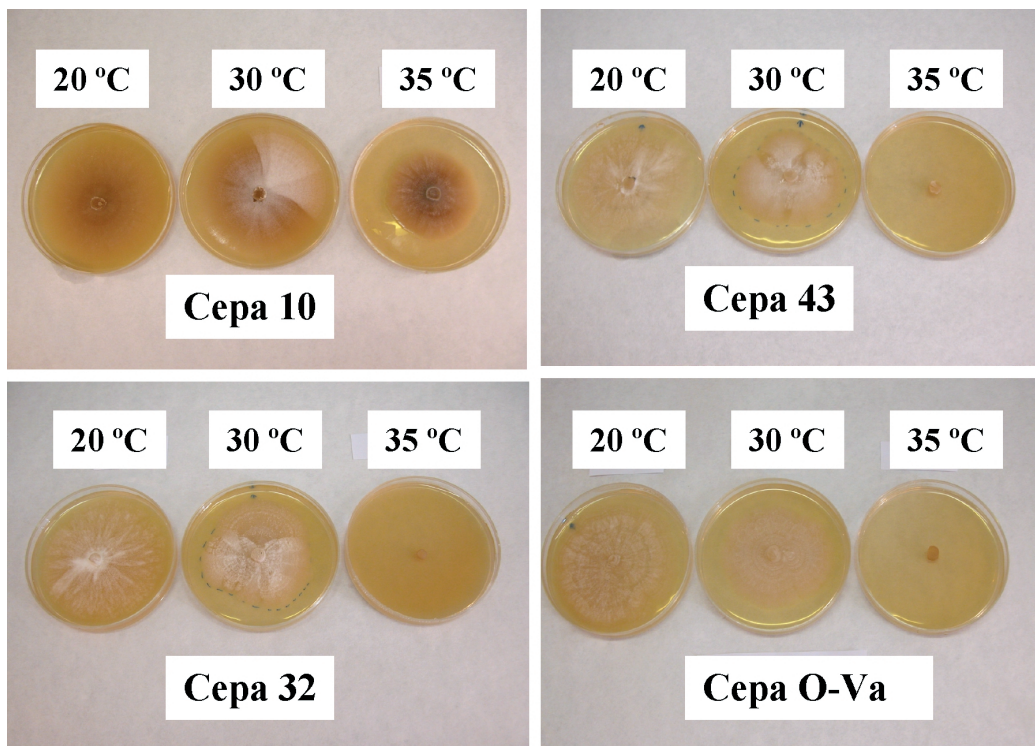


Figura 2. Crecimiento de cepas de *Ophiostoma* aislados de olmos con grafiosis en Murcia y una cepa alóctona (O-Va) incubadas a diferentes temperaturas.

como a la cepa alóctona quedan agrupadas en un grupo con alta homoplasia que incluye también la secuencia correspondiente a la subsp. *americana* (NAN).

Por lo tanto no se ha detectado la presencia de *O. ulmi* en las cepas aisladas de Murcia, en la que sólo estaría presente *O. novo-ulmi*. Tampoco se han detectado casos de hibridación o introgresión entre *O. ulmi* y *O. novo-ulmi*. Esto implica que todas las muestras analizadas carecen de material genético

para la toxina ceratoulmina procedente de *O. novo-ulmi*.

Aunque el gen de la ceratoulmina se ha utilizado para discriminar *O. ulmi* de *O. novo-ulmi* y sus híbridos (KONRAD *et al.*, 2002) también parece poder resolver las subespecies de *O. novo-ulmi*. Según los resultados obtenidos, todas las muestras más el control pertenecerían a la subespecie *americana*. Estos resultados se confirman con el análisis del gen *coll*.

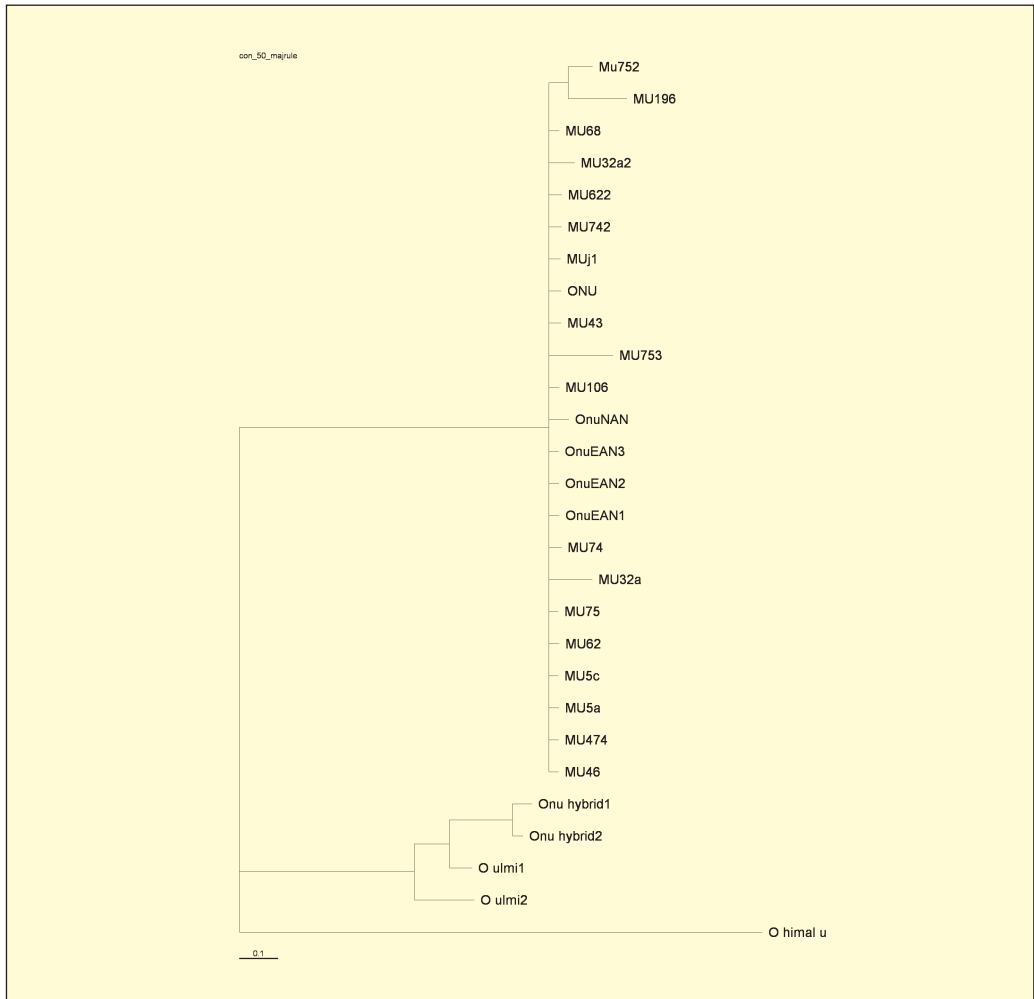


Figura 3. Arbol consenso por *majority rule* de los resultados del análisis bayesiano para el fragmento de *cu* estudiado. Onu: *O. novo-ulmi*; NAN: subsp. *americana*; EAN: subsp. *novo ulmi*.

Respecto a los resultados del fragmento génico *col1*, se han analizado 12 secuencias, tres de las cuales se corresponden a secuencias descargadas desde la base de datos GenBank, correspondientes a *O. novo-ulmi* subsp. *americana* (NAN) y *O. novo-ulmi* subsp. *novo-ulmi* (EAN), así como una secuencia procedente de un aislamiento de *O. ulmi*. Las 9 secuencias restantes fueron aislamientos murcianos. El árbol consenso obtenido tras la generación de 500000 árboles era altamente homoplásico, ya que todas las muestras quedaron incluidas en el mismo clado que incluye la subsp. *americana* (NAN). Esta alta homoplasia se explica porque todas las secuencias son idénticas, la variabilidad entre ellas es nula.

Un resultado sorprendente es la inclusión de *O. ulmi* en el mismo clado que las muestras murcianas, con el mismo nivel de homoplasia (las secuencias son idénticas). Este gen *col1* ha sido propuesto como útil para resolver entre subespecies de *O. novo-ulmi* y no para resolver las especies (KONRAD *et al.*, 2002). Por ello caben dos explicaciones ante este hecho: i) que la secuencia del *col1* de *O. ulmi* sea idéntica a la de *O. novo-ulmi* subsp. *americana*, o bien ii) que se trate de un híbrido entre ambas especies.

Los resultados de este trabajo coinciden con trabajos anteriores que ponen de manifiesto la sustitución de *O. ulmi* por *O. novo-ulmi* en Europa (BRASIER, 2000; BRASIER *et al.*, 2004). También en España, la preponde-

rancia de *O. novo-ulmi* subsp. *americana* parece estar clara según datos recientes (SOLLA *et al.*, 2008) que entre 106 aislados de *Ophiostoma* reconocen 6 de *O. ulmi*, 16 de *O. novo-ulmi* subsp. *novo-ulmi* frente a 78 de *O. novo-ulmi* subsp. *americana*.

Es destacable la confirmación de la presencia del patógeno *O. novo-ulmi* subsp. *americana* en las olmedas de olmos monumentales en la comarca de Cieza (Vega Media del Segura). Estas olmedas nunca han registrado un brote epidémico de mortandad por grafiosis, aunque sí algunos síntomas muy dispersos en ramas que no han progresado. Este fenómeno de resistencia debe ser estudiado.

En conclusión, los 12 aislados del hongo causante de la grafiosis del olmo aislados en Murcia se identifican como *O. novo-ulmi* subsp. *americana*, aunque no se descarta que nuevos aislados tengan otra asignación específica. Se pone de manifiesto la necesidad de complementar los criterios clásicos de tasa de crecimiento y morfología de la colonia, con métodos moleculares, pues el comportamiento de algunos aislados en cultivo es confuso y puede sugerir la existencia de hibridación. La variabilidad en la manifestación de la grafiosis, según nuestros resultados, no podría explicarse según la variabilidad molecular sino que habría que explicarla desde otros factores que intervienen en la transmisión e infección, como árbol hospedador, insectos vectores y factores ambientales implicados.

ABSTRACT

DÍAZ, G., D. GALLEGO, A. GUTIÉRREZ, A. MUSALY, E. SORIANO, J. GALIÁN. 2009. Morphological, physiological and molecular characterization of new *Ophiostoma novo-ulmi* isolates from Murcia, Spain. *Bol. San. Veg. Plagas*, **35**: 469-479.

Isolates of *Ophiostoma* were obtained from elms with dutch elm disease (DED) symptoms from 12 locations from the province of Murcia, Spain. The isolates were characterized and identified according to their growth rates and morphology colony in culture, fertility tests and by the use of molecular markers for ceratoulmine and colony type genes. The isolates were identified as *O. novo-ulmi* subsp. *americana*, although new isolates may be assigned to other species/subspecies. The use of morphological, physiological and molecular methods to species identification is suggested due to the confuse response of some isolated in vitro and the possibility of hybridation.

Key words: Ceratoulmine, dutch elm disease, elm, *Ulmus*.

REFERENCIAS

- BRASIER, C.M. 1979. Dual origin of recent Dutch elm disease outbreaks in Europe. *Nature*, **281**: 78-79.
- BRASIER, C.M. 1990. China and the origin of Dutch elm disease: an appraisal. *Plant Pathology*, **39**: 5-16.
- BRASIER C.M. 1991. *Ophiostoma novo-ulmi* sp. nov., causative agent of current Dutch elm disease pandemics. *Mycopathologia*, **115**: 151-161.
- BRASIER C.M. 2000. The rise of the Hybrid fungi. *Nature* **405**: 134-135.
- BRASIER C.M., KIRK S.A. 2001. Designation of the EAN and NAN races of *Ophiostoma novo-ulmi* as subspecies. *Mycol. Res.*, **105**: 547-554.
- BRASIER, C.M., BUCK, K.W. 2001. Rapid evolutionary changes in a globally invading fungal pathogen (Dutch elm disease). *Biological Invasions*, **3**: 223-233.
- BRASIER, C.M., MEHROTRA, M.D. 1995. *Ophiostoma himal-ulmi* sp.nov. a new species of Dutch elm disease fungus endemic to the Himalayas. *Mycol. Res.*, **99**: 205-215.
- BRASIER, C.M., LEA J., RAWLINGS, M.K. 1981. The aggressive and non-aggressive strains of *Ceratocystis ulmi* have different temperature optima for growth. *The British Mycological Society*, **76**: 213-218.
- BRASIER, C.M., BUCK, K., PAOLETTI, M., CRAWFORD, L., KIRK, S. 2004. Molecular analysis of evolutionary changes in populations of *Ophiostoma novo-ulmi*. *Invest. Agr.: Sist. y Rec. For.*, **13**: 99-103.
- IPINZA, R., MARTÍNEZ DE AZAGRA, A., SALVADOR M^a.L., CALONGE, F. 1990. Consideraciones micológicas y epidemiológicas de *Ceratocystis ulmi*. En: *Los olmos y la grafiosis en España*. (Luis Gil, ed.) ICONA, Colección técnica. Madrid, pp: 121-164.
- KONRAD, H., KIRISITS, T., RIEGLER, M., HALMSCHLAGER, E., STAUFFER, C. 2002. Genetic evidence for natural hybridization between the Dutch elm disease pathogens *Ophiostoma novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* and *O. novo-ulmi* ssp. *americana*. *Plant Pathol.*, **51**: 78-84.
- MUÑOZ, C. 1985. La grafiosis del olmo en España, nuevos aislamientos de la cepa agresiva. *Boletín de la Estación Central de Ecología*, **14** (22):65-76.
- SINGLETON, L., MIHAIL, J., RUSH, C. 1987. Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. The American Phytopathological Society. Pp:56-57.
- SOLLA, A., GIL, L. 2003. La grafiosis: hongos implicados, ciclo biológico, epidemiología y patogénesis. En: *Los olmos ibéricos: conservación y mejora frente a la grafiosis*. (Gil L., Solla A. e Iglesias S. eds). Editorial Parques Nacionales., pp: 237-259.
- SOLLA, A., NASMITH, C., DACASA, M.C., FUENTES-UTRILLA, P., HUBBES, M., GIL, L. 2006. First report of *Ophiostoma novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* on elms in the Iberian Peninsula. *Plant Pathol.*, **55**: 582.
- SOLLA, A., DACASA, M.C., NASMITH, C., HUBBES, M., GIL, L. 2008. Análisis of Spanish populations of *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi* using physiological characteristics and RADP markers. *Plant Pathol.*, **57**: 33-44.

(Recepción: 2 marzo 2009)

(Aceptación: 3 julio 2009)