

## Selección de olmos resistentes a la grafiosis. I. Influencia de la composición del inóculo infeccioso

A. SOLLA, L. GIL

Para seleccionar olmos resistentes a la grafiosis es preciso inocularlos, previamente, con un inóculo capaz de producir sintomatologías elevadas. Sobre olmos ibéricos se pretendió observar la conveniencia de utilizar inóculos infecciosos compuestos por esporas de *Ophiostoma ulmi*, de *O. novo-ulmi* o de la combinación de ambas especies. Se utilizaron 5 clones de olmos y 4 inóculos infecciosos. A los 60 días de inocular, los inóculos con mayor proporción de esporas de *O. ulmi* originaron los menores porcentajes de marchitamiento ( $P \leq 0,05$ ). La presencia de *O. ulmi* en el inóculo compuesto por *O. novo-ulmi* : *O. ulmi* (1:4) indujo resistencia en los árboles inoculados, luego se desaconseja el empleo de *O. ulmi* para obtener sintomatologías máximas.

A. SOLLA, L. GIL. Unidad de Anatomía, Fisiología y Mejora Genética. E.T.S.I. de Montes. Universidad Politécnica de Madrid. Paseo de las Moreras s/n. 28040-Madrid. Persona de contacto: Luis Gil (lgil@montes.upm.es).

**Palabras clave:** grafiosis, olmo, mejora genética, *Ophiostoma ulmi*, *Ophiostoma novo-ulmi*.

### INTRODUCCIÓN

Los hongos responsables de la grafiosis del olmo pertenecen a las especies denominadas *Ophiostoma ulmi* (Buisman) Nannf. [= *Ceratostomella ulmi*; = *Ceratocystis ulmi*] y *O. novo-ulmi* Brasier (BRASIER, 1991). Recientemente se ha descrito una tercera especie, denominada *O. himal-ulmi* sp. nov. (BRASIER y MEHROTRA, 1995). *O. novo-ulmi* se subdivide en dos biotipos, la raza norteamericana (NAN) y la raza euroasiática (EAN). Las dos primeras también se conocen como especie no agresiva y especie agresiva, respectivamente.

Las principales diferencias entre la especie no agresiva y la agresiva estriban en que la primera presenta un micelio más algodonoso pero un menor crecimiento y virulencia

que la segunda (Fig. 1 y 2) (GIBBS y BRASIER, 1973; SVALDI y ELGERSMA, 1982). También se diferencian en aspectos reproductivos (BRASIER, 1986b). En España, la especie no agresiva se detecta a comienzos de los años treinta en olmos de Chamartín de la Rosa, Madrid (MARTÍNEZ, 1932). La especie agresiva se aísla por primera vez en 1980, en su forma NAN, a partir de muestras procedentes de San Sebastián y de Aracena (MUÑOZ y RUPÉREZ, 1980). En la actualidad *O. novo-ulmi* se encuentra presente en toda la Península y Baleares (GARCÍA y ROMERO, 1996), y reemplaza a *O. ulmi* en las olmedas infectadas.

En los trabajos dedicados a la mejora del olmo frente a la grafiosis (HEYBROEK, 1993; SMALLEY y GURIES, 1993; TOWNSEND y SANTAMOUR, 1993; SOLLA *et al.*, 1999) se

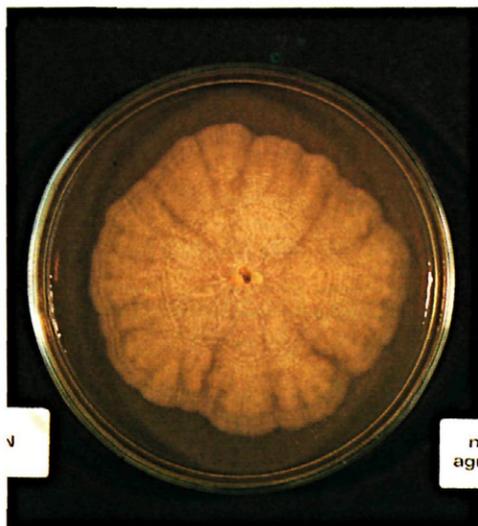


Fig. 1.—Cepa no agresiva de grafiosis (*Ophiostoma ulmi*) cultivada 10 días en MEA, a 20 °C. Se observan círculos concéntricos y el borde lobulado.

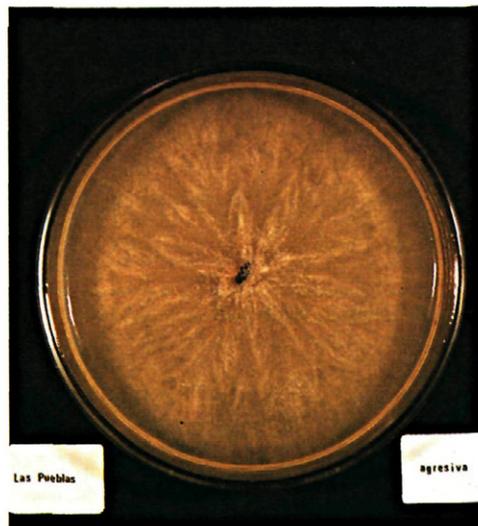


Fig. 2.—Cepa agresiva de grafiosis (*Ophiostoma novo-ulmi*), raza NAN, cultivada 8 días en MEA a 20 °C. Se observan líneas radiales, el borde no lobulado y un mayor crecimiento.

inoculan artificialmente las esporas de los hongos desde que se comprobó que este método de evaluación produce efectos similares a las infecciones provocadas por mordeduras de escoltídeos. La metodología de inoculación propuesta por TCHERNOFF (1965) se impuso por su idoneidad y es la comúnmente utilizada hoy en día. Consiste en inyectar durante la primavera, y en el anillo del año, una suspensión de esporas de *Ophiostoma ulmi* u *O. novo-ulmi* a concentraciones mayores de  $10^3$  conidios/ml. El marchitamiento foliar es el principal parámetro utilizado para estimar la resistencia de un individuo (HEYBROEK, 1993; SMALLY y GURIES, 1993), dada su alta correlación con otras sintomatologías. Ahora bien, este marchitamiento depende de la especie del hongo utilizado en el inóculo y de la virulencia del mismo (GIBBS y BRASIER, 1973).

Entre los diferentes programas de mejora y para la selección de olmos resistentes no existe consenso a la hora de utilizar una composición de inóculo determinada. En un ensayo realizado con *U. x hollandica* se observó la conveniencia

de inocular únicamente *O. novo-ulmi* para obtener sintomatologías máximas (SCHEFFER *et al.*, 1980). No obstante, son varios los programas de mejora que siguen utilizando suspensiones mixtas de conidios de *O. novo-ulmi* y *O. ulmi* (TOWNSEND y SANTAMOUR, 1993). Ello plantea la duda en el programa español de mejora de qué composición de inóculo utilizar. El objetivo del presente trabajo es comprobar la conveniencia de inocular suspensiones que contengan esporas de *O. ulmi*, de *O. novo-ulmi* o de la combinación de ambas especies.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon las cepas W9 y M-SF de las especies *Ophiostoma ulmi* y *O. novo-ulmi*, respectivamente. En el cuadro 1 se indica el origen y la fecha de aislamiento así como sus crecimientos *in vitro*. Los hongos fueron conservados a 4 °C en placas de Petri conteniendo agar extracto de malta (MEA) [Oxoid]. La semana antes de las inoculaciones se introdujeron tres pie-

zas de 2 x 2 mm de micelio, de cada hongo por separado, en frascos Erlenmeyer conteniendo medio líquido de Tchernoff (TCHERNOFF, 1965). La composición del medio fue 20 g de glucosa, 2 g de L-asparagina, 1,5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 20 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 10 mg de  $\text{FeCl}_3$ , 1 mg de vitamina  $\text{B}_1$  (tiamina), y 1 mg de vitamina  $\text{B}_6$  (piridoxina) en 1 l de agua destilada esterilizada. Los frascos se agitaron durante tres días, a 125 rpm, y a temperatura del laboratorio ( $25 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ ) (Fig. 3).

Las esporas desarrolladas en el medio (Fig. 4) fueron filtradas con papel de alto gramaje ( $73 \text{ g m}^{-2}$ ), centrifugadas e introducidas en agua destilada esterilizada. Se prepararon cuatro suspensiones con proporciones similares a las ensayadas por SCHEFFER *et al.* (1980): 1), *Ophiostoma ulmi* a  $10^5$  conidios/ml; 2), mezcla 4:1 de *O. ulmi* y *O. novo-ulmi* ( $10^5 : 0,25 \times 10^5$  conidios/ml); 3), mezcla 1:4 de *O. ulmi* y *O. novo-ulmi* ( $0,25 \times 10^5 : 10^5$  conidios/ml), y 4), *O. novo-ulmi* a  $10^5$  conidios/ml. Las concentraciones se ajustaron mediante una placa Thomas (Fig. 5).

Las inoculaciones en los árboles se realizaron el 24 de mayo de 1994 mediante una pipeta de Pasteur (Fig. 6). Se practicaron dos cortes transversales diametralmente opuestos en el tronco principal del árbol, con una navaja, hasta llegar al anillo xilemático del año anterior. Los cortes

se hicieron a una altura aproximada de 10 cm sobre el nivel del suelo. Sobre la hoja de la navaja se vertió 0,1 ml de la suspensión, la cual fue rápidamente absorbida por el árbol.

Se utilizaron cuatro clones de la especie *U. minor* y un quinto clon híbrido entre *U. minor* y *U. pumila*, designados respectivamente como M-CC 1, M-DV 1, M-DV 2, TO-PB 1 y M-PZ 3 (Cuadro 2). La planta se obtuvo en 1991 a partir de estaquillas de raíz y fue plantada en el Centro de Mejora Genética Forestal "Puerta de Hierro", Madrid, a un marco de 0,5 x 1,0 m. Se emplearon al menos cinco réplicas por genotipo y por composición de inóculo. En el momento de la inoculación los árboles tenían cuatro savias y alturas próximas a 1,5 m, a excepción del genotipo híbrido que rondaba los dos metros.

La planta fue observada a diario hasta el primer día en que mostró síntomas. La susceptibilidad de los árboles a la grafiosis se evaluó a través de los porcentajes de marchitamiento foliar mostrados en la copa (GIBBS y BRASIER, 1973). Dichos porcentajes se registraron a los 8, 15, 30 y 60 días tras las inoculaciones y fueron normalizados mediante la transformación arcsen  $(x/100)^{1/2}$ . Se realizó un ANOVA multifactorial considerándose como factores el clon y la composición de inóculo, y para comparar las medias se realizaron tests LSD ( $P \leq 0,05$ ).

Cuadro 1.—Especie, origen y tasa de crecimiento relativo (MEA, 20 °C) de los hongos utilizados

Aislamiento	Especie, raza	Origen	Autor, fecha	CR (mm/día)
W 9	<i>O. ulmi</i>	Holanda	FRS, U.K, 1987	2,8
M-SF	<i>O. novo-ulmi</i> , NAN	Puente de San Fernando, Madrid	ETSI Montes, 1992	5,8

Cuadro 2.—Material vegetal empleado para estudiar la influencia de la composición del inóculo infectivo en la manifestación de síntomas por grafiosis

Clon	Especie	Procedencia	Altitud (m)	Entorno	Altura $\pm e_x$ (cm)
M-CC 1	<i>U. minor</i>	Casa de Campo, Madrid	600	parque o jardín	123 $\pm$ 12
M-DV 1	<i>U. minor</i>	Dehesa de la Villa, Madrid	660	parque o jardín	162 $\pm$ 11
M-DV 2	<i>U. minor</i>	Dehesa de la Villa, Madrid	660	parque o jardín	142 $\pm$ 11
TO-PB 1	<i>U. minor</i>	Puebla de Montalbán, Toledo	500	masa natural	155 $\pm$ 9
M-PZ 3	<i>U. minor</i> x <i>U. pumila</i>	Pezuela de Torres, Madrid	760	parque o jardín	210 $\pm$ 15



Fig. 3.—Agitador rotatorio con frascos Erlenmeyer en los que se obtienen esporas de los hongos de la grafiosis.

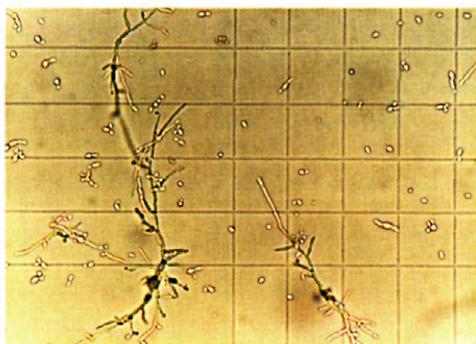


Fig. 5.—Conidios y micelio de una cepa de *O. novo-ulmi* sobre la malla de una placa Thomas (0,05 x 0,05 mm).

## RESULTADOS

La figura 7 muestra los porcentajes de marchitamiento manifestados a los 60 días por cada clon y composición de inóculo infectivo. Los clones M-PZ 3 y M-DV 2 fueron los más resistentes. El bajo marchitamiento causado por la mezcla 4:1 en M-CC 1 y los valores no aditivos en M-PZ 3 hicieron significativa la interacción clon x composición del inóculo ( $P \leq 0,01$ ) (Cuadro 3). En la parte derecha de la figura 7 se representan los valores medios para los cinco clones. El inóculo infectivo compuesto sólo por *Ophiostoma ulmi* originó menores marchitamientos que el inóculo compuesto sólo por *Ophiostoma novo-ulmi*. La inoculación con la mezcla de ambas especies dio lugar a sintomatologías intermedias, aunque no se hallaron diferencias significativas entre las inoculaciones re-



Fig. 4.—Frasco de Erlenmeyer conteniendo medio líquido de Tchernoff, a los tres días de agitación. En el líquido se observan, en suspensión, conidios y micelio de una cepa de grafiosis.



Fig. 6.—Inoculación artificial de conidios sobre el tronco principal de un ejemplar de *U. minor*.

alizadas con *O. novo-ulmi* y las realizadas con la mezcla *O. ulmi* : *O. novo-ulmi* en la proporción 1:4 ( $P > 0,10$ ).

Cuadro 3.-ANOVA multifactorial para la variable "marchitamiento a los 60 días" de cinco clones de olmos (n ≥ 5) inoculados con cuatro composiciones de inóculo: 1), *Ophiostoma ulmi*; 2), mezcla 4:1 de *O. ulmi* : *O. novo-ulmi*; 3), mezcla 1:4 de *O. ulmi* : *O. novo-ulmi* y 4), *O. novo-ulmi*

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F-ratio	Valor P
<b>FACTOR</b>					
A: Clon	6,4138	4	1,6034	26,98	0,0000
B: Composición de inóculo	5,1312	3	1,7104	28,78	0,0000
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	2,2218	12	0,1851	3,12	0,0010
ERROR	5,2304	88	0,0594		
<b>TOTAL (corregido)</b>	<b>19,4642</b>	<b>107</b>			

La evolución del marchitamiento foliar fue diferente según la composición del inóculo infectivo utilizado. Los primeros síntomas en respuesta a *O. novo-ulmi* y a sus mezclas se presentaron a los siete días después de inocular. El marchitamiento se mantuvo constante a partir de los 30 días. Sin embargo, los primeros síntomas foliares de los ejemplares infectados con *O. ulmi* no se apreciaron hasta el décimo día y se mantuvieron constantes a partir del día 15. En la figura 8 se muestra la evolución del marchitamiento foliar manifestado por el clon más susceptible. Al establecer regresiones sim-

ples entre los valores de los marchitamientos a los 8, 15, 30 y 60 días se obtienen coeficientes de regresión ( $r^2$ ) superiores a 0,5 ( $P \leq 0,01$ ).

### DISCUSIÓN

La composición del inóculo infectivo determina la intensidad de los síntomas manifestados en el olmo. Inoculaciones con una cepa de la especie agresiva provocan mayores marchitamientos que inoculaciones con una cepa de la especie no agre-

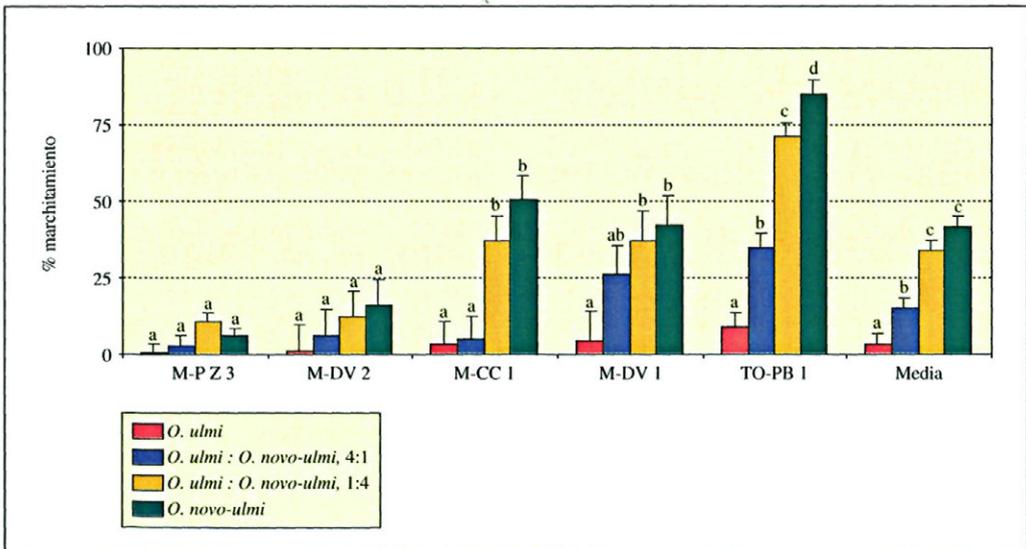


Fig. 7.-Porcentajes de marchitamiento medio manifestados por cinco clones de tres savias, el 24 de julio de 1994, a los 60 días de su inoculación (n ≥ 5). A la derecha se dan los valores medios. Se utilizaron inóculos infectivos compuestos por una cepa de *O. ulmi*, otra de *O. novo-ulmi*, y sus mezclas en las proporciones 4:1 y 1:4. Las barras verticales representan errores estándar y letras distintas indican diferencias significativas para cada clon ( $P \leq 0,05$ ).

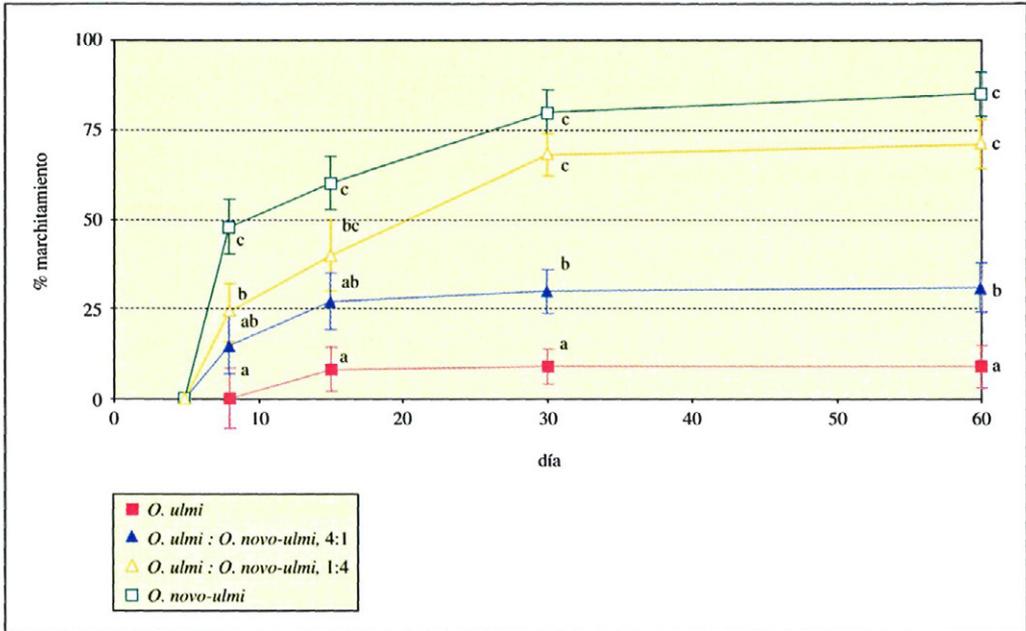


Fig. 8.—Evolución de síntomas manifestados por el clon TO-PB 1 tras la inoculación de réplicas ( $n \geq 5$ ) con una cepa de *O. ulmi*, otra de *O. novo-ulmi*, y sus mezclas en las proporciones 4:1 y 1:4. Las barras verticales representan errores estándar y letras distintas indican diferencias significativas entre los valores para cada día ( $P \leq 0,05$ ).

siva (GIBBS y BRASIER, 1973). En los resultados correspondientes a la figura 7 se obtiene lo mismo al considerar los marchitamientos medios de cinco genotipos ibéricos. La evolución del marchitamiento foliar observada coincide con la descrita anteriormente para *U. minor* y *U. x hollandica* (HOLMES *et al.*, 1972; BRASIER, 1986a). Los síntomas originados por las cepas no agresivas tardan más en manifestarse y se mantienen constantes a los pocos días de aparecer. La menor producción de toxinas y de enzimas de degradación por parte de la especie no agresiva (TAKAY, 1980; SVALDI y ELGERSMA, 1982) ralentiza tal vez la aparición de síntomas y permite a la planta controlar el daño con mayor facilidad. En otras enfermedades, la mayor o menor producción de compuestos de alto peso molecular, tales como toxinas, ha sido relacionada con la virulencia de las cepas (HUSAIN y KELMAN, 1958; SUTTON y WILLIAMS, 1968).

Las inoculaciones con la mezcla de especies originaron sintomatologías intermedias, similares a las obtenidas por SCHEFFER *et al.* (1980) en *U. x hollandica*. En la figura 7 se observa que los síntomas medios provocados por la mezcla de cepas de *O. ulmi* : *O. novo-ulmi* en la relación 4:1 difieren de los provocados por las inoculaciones con *O. novo-ulmi*. Es posible que la presencia de *O. ulmi* haya interactuado con *O. novo-ulmi* induciendo resistencia en las plantas. Se concluye que inocular una mezcla de las especies agresiva y no agresiva de la grafiosis no permite observar sintomatologías máximas en ejemplares ibéricos de olmos. Para este último propósito se recomienda utilizar una única cepa agresiva, de alta virulencia. Al evaluar la resistencia de la planta bastará con registrar los porcentajes de marchitamiento a los dos meses. Evaluar el marchitamiento después de 60 días no resulta fácil pues a partir de este momento comienzan a secarse los ramillos y a caerse las hojas, y los síntomas se pueden superponer con los causados por el estrés hídrico estival.

## AGRADECIMIENTOS

A Yolanda Menéndez y a M<sup>a</sup> Eugenia Gracia-Nieto por la colaboración técnica. A Salustiano Iglesias y a Manuel Tuero por su

continuo apoyo. Se agradece a Julio Díez la revisión del manuscrito. El trabajo se ha desarrollado en el marco de un convenio suscrito entre la DGCONA (Ministerio de Medio Ambiente) y la ETSI de Montes (UPM).

## ABSTRACT

SOLLA, A.; GIL, L. 2001. Selección de olmos resistentes. I. Influencia de la composición del inóculo infectivo. Bol. San. Veg. Plagas. Vol. 27 (3): 355-362

In order to select trees that are resistant to Dutch elm disease, it is necessary to inoculate them previously with an inoculum capable of producing strong symptoms. Iberian elms were studied to assess the suitability of using infective inoculums with spores of *Ophiostoma ulmi*, of *O. novo-ulmi* and spores of both species. Five elm clones and four infective inoculums were used. Sixty days after inoculation, the lowest wilting percentage was produced by those inoculums containing the most *O. ulmi* spores ( $P \leq 0,05$ ). Resistance was induced in the inoculated trees, due to the presence of *O. ulmi* in the *O. novo-ulmi* : *O. ulmi* (1:4) inoculum, meaning it is therefore inadvisable to use *O. ulmi* to maximise symptoms.

**Key words:** Dutch elm disease, elm, breeding, *Ophiostoma ulmi*, *Ophiostoma novo-ulmi*.

## REFERENCIAS

- BRASIER, C. M. 1986a. Comparison of pathogenicity and cultural characteristics in the EAN and NAN aggressive subgroups of *Ophiostoma ulmi*. Trans. Br. mycol. Soc. 87: 1-13.
- BRASIER, C. M. 1986b. The population biology of Dutch elm disease. Adv. in Plant Pathology. 5: 53-118.
- BRASIER, C. M. 1991. *Ophiostoma novo-ulmi* sp. nov., causative agent for current Dutch elm disease pandemics. Mycopathologia. 15: 151-161.
- BRASIER, C. M. y 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.
- GARCÍA, R. M. y ROMERO, C. J. 1996. Detección de la grafiosis agresiva en la isla de Ibiza (Baleares). Bol. San. Veg. Plagas. 22: 798-801.
- GIBBS, J. N. y BRASIER, C. M. 1973. Correlation between cultural characters and pathogenicity of *Ceratocystis ulmi* from Britain, Europe and America. Nature. 241: 381-383.
- HEYBROEK, H. M. 1993. The Dutch Elm Breeding Program. En: pp. 16-25, Dutch elm disease research. Cellular and molecular approaches. Sticklen, M. B.; Sherald, J. L. eds. Springer-Verlag, New York.
- HOLMES, F. W., HEYBROEK, H. y GIBBS, J. 1972. Aggressiveness in *Ceratocystis ulmi*. Phytopathology. 62: 939-940 (Nota).
- HUSAIN, A. y KELMAN, A. 1958. Relation of slime production to mechanism of wilting and pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology. 48: 155-165.
- MARTÍNEZ, J. 1932. La grafiosis del olmo. Montes e Industrias. 19: 499-503.
- MUÑOZ, C. y RUPÉREZ, A. 1980. La desaparición de los olmos. Bol. Serv. Plagas. 6: 105-106.
- SCHEFFER, R. J., HEYBROEK, H. M. y ELGERSMA, D. M. 1980. Symptom expression in elms after inoculation with combination of an aggressive and non-aggressive strain of *Ophiostoma ulmi*. Neth. J. Pl. Pathol. 86: 315-317.
- SMALLEY, E. B. y GURIES, R. P. 1993. Breeding elms for resistance to Dutch elm disease. Annu. Rev. Phytopathol. 31: 325-352.
- SOLLA, A., MENÉNDEZ, Y., BURÓN, M., IGLESIAS, S. y GIL, L. 1999. Programa español para la conservación y mejora de *Ulmus minor* Miller. Montes. 56: 5-12.
- SUTTON, J. C. y WILLIAMS, P. H. 1968. Xylem plugging and black rot lesion development in cabbage. Phytopathology. 58: 1069 (Abstract).
- SVALDI, R. y ELGERSMA, D. M. 1982. Further studies on the activity of cell wall degrading enzymes of aggressive and non-aggressive isolates of *Ophiostoma ulmi*. Eur. J. For. Pathol. 12: 29-36.
- TAKAI, S. 1980. Relationship of the production of the toxin cerato-ulmin to sennemata formation, pathogenicity, micelial habit and growth of *Ceratocystis ulmi* isolates. Can. J. Bot. 58: 658-662.

TCHERNOFF, V. 1965. Methods for screening and for the rapid selection of elms for resistance to Dutch elm disease. *Acta Bot. Neerl.* 14: 409-452.

TOWNSEND, A. M. y SANTAMOUR, F. S. JR. 1993. Progress in the development of disease-resistant elms. En: pp. 46-50, Dutch elm disease research: Cellular

and molecular approaches. Sticklen, M. B.; Sherald, J. L. eds. Springer-Verlag, New York.

(Recepción: 11 de julio de 2001)

(Aceptación: 26 de julio de 2001)