

## Selección de olmos resistentes a la grafiosis. II. Influencia de la repetición de las inoculaciones

A. SOLLA, L. GIL

En los distintos programas de mejora de *Ulmus* sp. frente a la grafiosis se seleccionan ejemplares resistentes utilizándose diferentes pautas de inoculación. En el presente trabajo se estudió la conveniencia de repetir las inoculaciones a lo largo de los años para la correcta selección de olmos resistentes. En 1993 y 1994 se infectaron, por separado, réplicas de cinco clones de olmos con dos cepas de *Ophiostoma novo-ulmi*. En 1997 se infectó toda la planta con una tercera cepa de *O. novo-ulmi*, de alta virulencia. Las mayores diferencias de susceptibilidad entre los clones se obtuvieron con la cepa de mayor virulencia al segundo año de inocular, momento que se considera más adecuado para la selección. Inoculaciones no consecutivas no son recomendables dado que no aportan información adicional, inhiben los crecimientos e inducen resistencia en la planta.

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, inoculación artificial, mejora genética, *Ophiostoma novo-ulmi*.

### INTRODUCCIÓN

Son varios los programas iniciados en Europa y Norteamérica para la mejora genética del olmo ante la grafiosis. En 1928 comenzó en Holanda un programa de mejora que habría de durar 60 años (WENT, 1954; HEYBROEK, 1993). En Norteamérica, la recolección de material indígena y la hibridación de olmos se puso en marcha a mediados del siglo XX. Así lo hicieron la Universidad de Wisconsin-Madison en Madison, Wisconsin (LESTER y SMALLEY, 1972), United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, en Delaware, Ohio (TOWNSEND, 2000), y United States National Arboretum, en Washington DC (SANTAMOUR, 1974). El Instituto Nacional de Investigação Agrária de

Portugal inició un programa, ahora extinto, de recolección e inoculación de olmos (MONIZ, 1979). En Florencia, Italia, el Consiglio Nazionale delle Ricerche promueve desde 1978 un programa de mejora en el que se hibridan numerosas especies de olmo con el objetivo de obtener individuos resistentes y adecuados para plantaciones en ciudad (MITTEMPERGER y LA PORTA, 1993).

En 1986, el antiguo Instituto para la Conservación de la Naturaleza inicia junto a la Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes de la Universidad Politécnica de Madrid un programa de mejora del olmo frente a la grafiosis. La mejora se centra en la especie *Ulmus minor* Miller, olmo más representativo y más afectado por la enfermedad en la Península. La alta suscep-

tibilidad de las olmedas de *U. minor* y la dificultad de encontrar individuos resistentes aconseja su hibridación con otra especie de resistencia mayor. El olmo siberiano (*U. pumila* L.), cuya presencia es centenaria en la Península, presenta la ventaja de ser resistente a la grafiosis, tener un rápido crecimiento juvenil, ser tolerante a la sequía y producir abundante semilla fértil (HEYBROEK, 1979; MITTEMPERGER y LA PORTA, 1991).

Los programas de mejora siguen una serie de ciclos consistentes en obtener, mediante cruzamientos controlados, generaciones de olmos que incorporen mayores niveles de resistencia. La selección se realiza tras inocular artificialmente esporas de los hongos de la grafiosis en plantas de más de dos savias. Cada programa selecciona la planta más resistente según unas pautas de inoculación distintas. En el programa italiano se selecciona tras una sola inoculación (MITTEMPERGER, com. pers.), en el holandés se hace tras inocular durante cuatro años consecutivos (WENT, 1954; HEYBROEK, com. pers.), y en el de Wisconsin tras inocular durante varios años no consecutivos (LESTER y SMALLEY, 1972). Una mejor selección se llevará a cabo si las diferencias de sintomatología entre unos clones y otros resulta más acusada. El presente trabajo pretende estudiar la conveniencia de repetir las inoculaciones, a fin de obtener mayores diferencias

de sintomatología y posibilitar una mejor selección.

## MATERIALES Y MÉTODOS

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 1). La planta se obtuvo en 1991 por estaquillado de raíz y fue instalada en una parcela en el Centro de Mejora Genética Forestal "Puerta de Hierro", Madrid, a un marco de 0,5 x 1,0 m.

Se utilizaron las cepas denominadas SA-CF, M-SF y OR-AL de la especie *O. novo-ulmi*. La primera de ellas presenta un crecimiento *in vitro* sensiblemente inferior al crecimiento de las dos restantes (Cuadro 2). Los hongos fueron aislados en placas de Petri a partir de ramillos apicales de olmos infectados (Fig. 1 y 2). Como medio de aislamiento se utilizó agar extracto de malta [Oxoid] al 2%, con cicloheximida [Sigma®] (0,10 g l<sup>-1</sup>), y sulfato de estreptomycin [CEPA S.L.] (0,13 g l<sup>-1</sup>) (BRASIER, 1981). Desde su aislamiento, los hongos fueron mantenidos en nevera a 4 °C y repicados cada cuatro a seis meses. Durante el mes previo a las inoculaciones se repicaron semanalmente sobre placas con agar dextrosa de patata (Fig. 3), se cultivaron a 20 °C en oscuridad y se midieron los crecimientos.

Cuadro 1.—Especificaciones del material vegetal

Clon	Especie	Procedencia	Altitud (m)	Entorno	Altura ± e (cm)
M-CC 1	<i>U. minor</i>	Casa de Campo, Madrid	600	parque o jardín	93 ± 6
M-DV 1	<i>U. minor</i>	Dehesa de la Villa, Madrid	660	parque o jardín	116 ± 9
M-DV 2	<i>U. minor</i>	Dehesa de la Villa, Madrid	660	parque o jardín	97 ± 4
TO-PB 1	<i>U. minor</i>	Puebla de Montalbán, Toledo	500	masa natural	97 ± 8
M-PZ 3	<i>U. minor</i> x <i>U. pumila</i>	Pezuela de Torres, Madrid	760	parque o jardín	170 ± 8

Cuadro 2.—Especie, origen y tasa de crecimiento relativo (MEA, 20 °C) de los hongos utilizados

Aislamiento	Especie, raza	Origen	Autor, fecha	CR (mm/día)
M-SF	<i>O. novo-ulmi</i> , NAN	Puente de San Fernando, Madrid	ETSI Montes, 1992	5,8
SA-CF	<i>O. novo-ulmi</i> , NAN	Casafranca, Salamanca	ETSI Montes, 1993	4,5
OR-AL	<i>O. novo-ulmi</i> , NAN	Allariz, Orense	ETSI Montes, 1996	6,1



Fig. 1.—Ennegrecimiento interior de un ramillo de *Ulmus minor* infectado con *Ophiostoma novo-ulmi*.

Los hongos se inocularon en suspensiones conteniendo  $10^5$  conidios/ml, siguiendo la metodología descrita por SOLLA y GIL (2001). El 17 de mayo de 1993 se inocularon los hongos SA-CF y M-SF, separadamente sobre al menos cinco réplicas por cepa y clon. Las inoculaciones se repitieron en la misma fecha al año siguiente. En 1997, a los tres años de la última inoculación, toda la planta fue inoculada con la cepa OR-AL. La decisión de emplear OR-AL se debió a la gran virulencia que mostró sobre otros árboles inoculados previamente.

A finales de abril de 1994 y 1997 se midieron las alturas de las plantas. A los 60 días de cada inoculación en 1993, 1994 y



Fig. 2.—Aislamiento del hongo *Ophiostoma novo-ulmi* a partir de un ramillo de *Ulmus minor*. Se utilizaron placas de Petri conteniendo agar extracto de malta.



Fig. 3.—Repicado del hongo *Ophiostoma novo-ulmi* durante el mes previo a su inoculación. Se utilizaron placas de Petri conteniendo agar dextrosa de patata.

1997 se registraron los porcentajes de marchitamiento foliar en copa. Los porcentajes fueron normalizados mediante la transformación  $\arcsen(x/100)^{1/2}$ . Se realizaron ANOVAs multifactoriales para cada año considerándose como factores el clon y la cepa inoculada. Para comparar las diferen-

cias de susceptibilidad entre clones se observaron los radios de varianza de los ANOVAs realizados: a mayores F-ratio mayores diferencias. Para comparar las medias se llevaron a cabo tests LSD.

## RESULTADOS

Los primeros síntomas observados a los pocos días de inocular, en el año 1993, consistieron en la pérdida de turgencia de los ramillos apicales (Fig. 4). Esta pérdida de turgencia se hizo más o menos extensible a toda la copa tras una semana de inocular (Fig. 5), dependiendo del clon. A los 60 días de las inoculaciones, los denominados M-DV 1 y TO-PB 1 manifestaron un marchitamiento general (Fig. 6). En la figura 7 se indica este marchitamiento para los clones inoculados en 1993 y reinoculados en 1994 y en 1997. En el cuadro 3 se muestran los análisis de varianza correspondientes a cada año.

Los porcentajes de marchitamiento medio a los 60 días de inocular durante los años 1993, 1994 y 1997, fueron 36%, 24% y 15% respectivamente, difiriendo los tres valores



Fig. 4.—Pérdida de turgencia de un brote apical de un ejemplar de *U. minor*, a los cinco días de ser inoculado con *O. novo-ulmi*.



Fig. 5.—Pérdida de turgencia general de los brotes de un ejemplar de *U. minor*, a los siete días de ser inoculado con *O. novo-ulmi*.



Fig. 6.—Marchitamiento foliar de un ejemplar de *U. minor*, a los 60 días de ser inoculado con *O. novo-ulmi*.

Cuadro 3.—ANOVAs multifactoriales para la variable marchitamiento, considerándose como factores el clon y la cepa inoculada. El marchitamiento se registró a los 60 días de inocular en 1993, 1994 y 1997. Se utilizaron cinco clones ( $n \geq 5$ ) y dos cepas con distinto crecimiento *in vitro*. Las interacciones no significativas se han omitido.

	Fuente	suma de cuadrados	g. l.	c. m.	F-ratio	Valor P
a. 1993	FACTOR					
	A: Clon	3,1903	4	0,7975	9,59	0,0000
	B: Cepa	0,5132	1	0,5132	6,17	0,0153
	ERROR	5,9895	72	0,0831		
	<b>TOTAL</b>	<b>9,7307</b>	<b>77</b>			
b. 1994	FACTOR					
	A: Clon	11,11	4	2,7775	68,41	0,0000
	B: Cepa	1,2575	1	1,2575	30,97	0,0000
	INTERACCIONES					
	AB	1,01644	4	0,2541	6,26	0,0002
	ERROR	2,7609	68	0,0406		
	<b>TOTAL</b>	<b>15,7302</b>	<b>77</b>			
c. 1997	FACTOR					
	A: Clon	1,55218	4	0,38804	7,87	0,0001
	B: Cepa	0,28333	1	0,28333	5,75	0,0208
	ERROR	2,16832	44	0,04928		
	<b>TOTAL</b>	<b>4,00454</b>	<b>49</b>			

significativamente entre sí ( $P \leq 0,01$ ). En 1993 y 1994 se observó una menor virulencia de la cepa SA-CF (Fig. 7a y b). Los porcentajes de marchitamiento medio originados por la misma a los 60 días fueron siempre menores a los causados por M-SF ( $P \leq 0,05$ ). Las mayores diferencias de susceptibilidad entre los clones se obtuvieron en 1994. Mientras que los clones M-PZ 3 y M-DV 2 apenas mostraron síntomas, el clon TO-PB 1 tuvo un marchitamiento superior al 90%, y tres de sus seis réplicas fueron marras al final de la temporada.

Al repetir las inoculaciones en 1997 se originaron, en general, menores síntomas que en 1994. Destaca el hecho de que las réplicas de M-DV 2, M-CC 1 y M-DV 1 inoculadas previamente con la cepa SA-CF, menos virulenta, mostraran en 1997 más síntomas que las inoculadas previamente con M-SF, más virulenta (Fig. 7c).

Los crecimientos medios en altura de los clones entre el intervalo 1994 a 1997 se muestran en la figura 8. Los árboles tuvieron un crecimiento diferente según fueran inoculados con SA-CF o con M-SF. Los infectados con la cepa menos virulenta crecieron

con mayor rapidez que los infectados con la cepa de mayor virulencia ( $P \leq 0,05$ ). Se dejaron sin inocular réplicas de los clones M-PZ 3 y M-CC 1, para las cuales se obtuvieron crecimientos anuales de 0,93 m y 0,68 m, respectivamente.

## DISCUSIÓN

En el primer año de inoculaciones se obtienen mayores síntomas medios que en años posteriores, aunque no las mayores diferencias entre marchitamientos. Destaca que la cepa denominada SA-CF, de menor crecimiento *in vitro* que M-SF, ocasionara menor marchitamiento medio. La relación directa entre la virulencia de dos cepas de grafiosis y su crecimiento *in vitro* ha sido observada en otras ocasiones (HINDAL *et al.*, 1979; BRASIER, 1986). En 1993 también destaca que el marchitamiento originado por cada cepa se mantuviera proporcional entre los distintos clones. Esta observación se confirma por la falta de interacciones significativas cepa x clon (Cuadro 3a), y muestra la condición de resistencia horizontal de los ol-

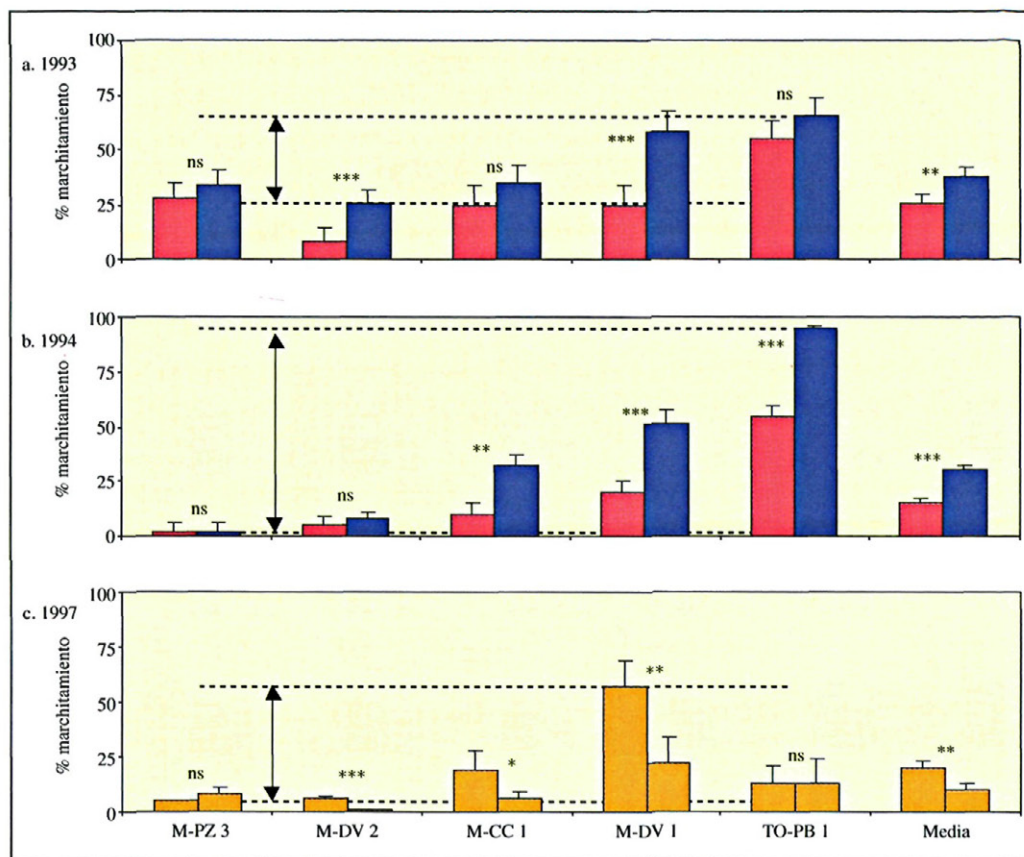


Fig. 7.—Porcentajes de marchitamiento medio manifestados por cinco clones tras ser inoculados en el año 1993, y reinoculados en 1994 y en 1997. Los valores corresponden al marchitamiento a los 60 días de las inoculaciones. En 1993 y 1994 se emplearon las cepas denominadas SA-CF (■) y M-SF (■) sobre al menos cinco réplicas por clon. En 1997 se inoculó toda la planta con la cepa OR-AL (■). Las barras verticales representan errores estándar y los símbolos son niveles de significación para los valores de cada clon (ns, no significativo; \*,  $P \leq 0,10$ ; \*\*,  $P \leq 0,05$ ; \*\*\*,  $P \leq 0,01$ ). Las flechas indican diferencias máximas de susceptibilidad entre los clones.

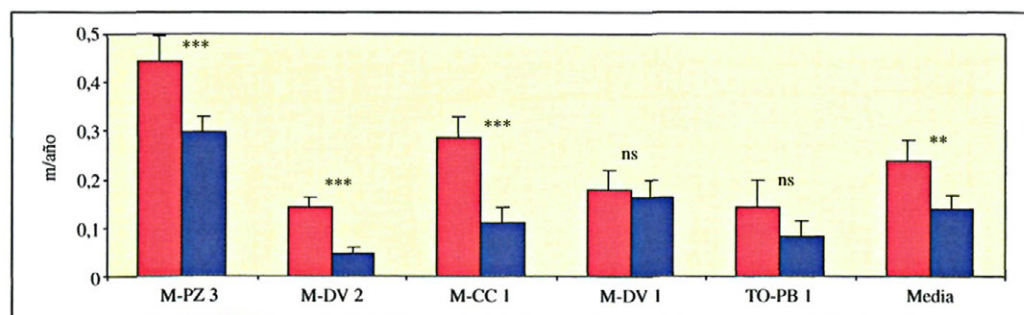


Fig. 8.—Crecimientos medios en altura de cinco clones durante el período de 1994 a 1997 ( $n \geq 5$ ). Los clones fueron inoculados en 1993 y reinoculados en 1994 con las cepas denominadas SA-CF (■) y M-SF (■). Las barras verticales representan errores estándar y los símbolos son niveles de significación para los valores de cada clon (ns, no significativo; \*,  $P \leq 0,10$ ; \*\*,  $P \leq 0,05$ ; \*\*\*,  $P \leq 0,01$ ).

mos ante la grafiosis, apuntada en otros trabajos (HEYBROEK, 1969; TOWNSEND y SCHREIBER, 1976). La proporcionalidad de los síntomas ante distintas cepas posibilita la utilización de una única cepa para evaluar resistencias en olmos.

En el año 1994 las respuestas se hacen más extremas, y así lo muestran los mayores F-ratios obtenidos durante este año para el factor clon (Cuadro 3b). Los ejemplares que más se marchitaron en 1993 incrementaron su sintomatología tras una segunda inoculación en 1994, y sin embargo los menos marchitos no manifestaron prácticamente síntomas en 1994. Ello parece indicar que el olmo alcanza, ante una segunda inoculación, menores niveles de marchitamiento si durante la primera inoculación no se llega a un determinado umbral de daño.

Los marchitamientos observados en 1997 no se corresponden con una falta de virulencia de la cepa utilizada. La denominada OR-AL es una de las cepas con mayor crecimiento *in vitro* aislada dentro del programa de mejora español. Árboles plantados en la misma parcela e inoculados con esta cepa el mismo día mostraron una alta susceptibilidad. Se acepta que los bajos marchitamientos de 1997 se deben a que las inoculaciones de 1993 y 1994 han inducido resistencia en el huésped. Resultados similares se han obtenido ante inoculaciones no consecutivas con ejemplares de *U. americana* (LESTER y SMALLEY, 1972). La resistencia en el olmo frente a la grafiosis ha sido inducida en ocasiones mediante la inoculación previa de cepas no agresivas (SCHEFFER, 1990). Otra forma de lograr que disminuyan los síntomas por grafiosis es tratar al olmo con productos químicos que atenúen su crecimiento (BRENER y BECKMAN, 1968). La inoculación previa con *O. novo-ulmi* podría producir el mismo efecto pues es conocido que las inoculaciones de grafiosis ralentizan el crecimiento de la planta (ROBERTS, 1972). En réplicas sin inocular de los clones utilizados se han obtenido, entre 1994 y 1997, crecimientos en altura superiores a 0,8 m/año. En la figura 8 se muestran los crecimientos de los

clones inoculados, los cuales son sensiblemente menores a dicha cifra. La cepa denominada M-SF mermó considerablemente más el crecimiento de las plantas que la cepa SA-CF. Precisamente la cepa M-SF fue la que mayor resistencia indujo en tres de los cinco clones inoculados posteriormente con OR-AL (Fig. 7c).

La alta variabilidad de síntomas manifestados por los cinco clones utilizados ofrece una esperanza para la obtención de ejemplares resistentes de *U. minor* mediante ciclos de mejora. Los altos niveles de resistencia observados en los clones M-PZ 3 y M-DV 2, posibilitan su incorporación en futuras campañas de cruzamiento. Se concluye que la inoculación de olmos durante dos primaveras consecutivas, mediante una cepa de alta virulencia, permite evaluar satisfactoriamente su nivel de re-



Fig. 9.—Ramas secas de un ejemplar de *U. minor*, inoculado artificialmente con *O. novo-ulmi* durante dos años consecutivos. Una tercera inoculación originaría un marchitamiento difícil de evaluar.

sistencia. Inoculaciones no consecutivas no son recomendables dado que no aportan información adicional, inhiben los crecimientos e inducen resistencia en la planta. En aquellos árboles en los que el porcentaje de marchitamiento ha sido elevado durante el primer y el segundo año, la totalidad de la copa se encontrará prácticamente seca al tercero (Fig. 9), y el marchitamiento será difícil de evaluar.

## 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. II. Influencia de la repetición de las inoculaciones. Bol. San. Veg. Plagas. Vol. 27 (3): 363-371

In the various breeding programs aimed at confronting Dutch elm disease, resistant elms are selected using different inoculation schedules. In the present work elm re-inoculation was studied in terms of its suitability for improving the selection of resistant elms. In 1993 and 1994, replicates of five elm clones were infected separately with two strains of *Ophiostoma novo-ulmi*. In 1997 all of the plants were infected with a third and highly virulent strain. The greatest differences in susceptibility between clones were obtained with the most virulent strain during the second inoculation year, which is considered to be the most appropriate year for selection. Non-consecutive inoculations are inadvisable as they provide no additional information, inhibit growth and induce resistance.

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

## REFERENCIAS

- BRASIER, C. M. 1981. Laboratory investigation of *Ceratocystis ulmi*. En: pp. 76-79, Compendium of Elm Diseases. Stipes, R. J.; Campana, R. J. eds. Am. Phy. Society: St. Paul, Minnesota.
- BRASIER, C. M. 1986. Comparison of pathogenicity and cultural characteristics in the EAN and NAN aggressive subgroups of *Ophiostoma ulmi*. Trans. Br. mycol. Soc. 87: 1-13.
- BRENER, W. D. y BECKMAN, C. H. 1968. A mechanism of enhanced resistance to *Ceratocystis ulmi* in American elms treated with sodium trichloro-phenylacetate. Phytopathology. 58: 555-561.
- HEYBROEK, H. M. 1969. Host plant resistances in the elms. Proceedings North Central Branch - Entomol. Soc. Am. 24:69-74.
- HEYBROEK, H. M. 1979. Mini-monograph of elms in agroforestry. FAO Technical consultation on fast-growing broadleaved trees, FO: FGB 79-8/7 pp. 423-441.
- HEYBROEK, H. M. 1993. The Dutch Elm Breeding Program. En: pp. 16-25, Dutch elm disease research. Cellular and molecular approaches. Sticklen, M.; Sheppard, J. eds. Springer-Verlag, New York.
- HINDAL, D. F., HARNER, E. J. y MACDONALD, W. L. 1979. Further studies on the relationship of cultural characteristics and pathogenicity in *Ceratocystis ulmi*. Phytopathology. 69: 108-111.
- LESTER, D. T. y SMALLEY, E. B. 1972. Improvement of elms through interspecific hybridization with Asian species. En: pp. 1-10, Proceedings IUFRO-SABRAO Symposium For. Tree Breed. Gov. Exp. Stn. Japan.
- MITTEMPERGHER, L. y LA PORTA, N. 1991. Hybridization studies in the Eurasian species of elm (*Ulmus pumila*). Silvae Genetica 40: 237-243.
- MITTEMPERGHER, L. y LA PORTA, N. 1993. *Ophiostoma ulmi*/Olmo. En: pp. 412-432, Miglioramento genetico delle piante per resistenza a patogeni e parassiti. Edagricole, Bologna.
- MONIZ, M. F. 1979. Las enfermedades del olmo. Bol. Serv. Plagas. 5: 79-84.
- ROBERTS, B. R. 1972. Net photosynthesis, growth, and transpiration in American elm seedlings as influenced by Dutch elm disease and plant-water stress. Phytopathology. 62: 457-459.



- SANTAMOUR, F. S. JR. 1974. Resistance of new elm hybrids to Dutch elm disease. *Plant Dis. Repr.* 58: 727-731.
- SCHEFFER, R. J. 1990. Mechanisms involved in biological control of Dutch elm disease. *J. Phytopathol.* 130: 265-276.
- SOLLA, A. y GIL, L. 2001. Selección de olmos resistentes a la grafiosis. I. Influencia de la composición del inóculo infectivo. *Bol. San. Veg. Plagas.* Vol. 27 (3): 355-362.
- TOWNSEND, A. M. 2000. USDA genetic research on elms. En: pp. 271-278, *The Elms: Breeding, Conservation and Disease Management*. Dunn, C. P. ed. Kluwer Academic Publishers.
- TOWNSEND, A. M.; SCHREIBER, L. R. 1976. Resistance of hybrid elm progenies to *Ceratocystis ulmi*. *Phytopathology.* 66: 1107-1110.
- WENT, J. C. 1954. The Dutch Elm Disease. Summary of fifteen years hybridisation and selection work (1937-1952) *Tijdschr. Plziekte.* 60: 109-127.

(Recepción: 11 de julio de 2001)

(Aceptación: 26 de julio de 2001)