

APLICACION EXPERIMENTAL DE VERTICILLIUM DAHLIAE WCS850, EN EL CONTROL PREVENTIVO DE LA GRAFIOSIS DEL OLMO

P. GÁZQUEZ¹, J.M. SIERRA² & R. GONZÁLEZ RUIZ³

RESUMEN

Entre los estudios más relevantes que se han emprendido en los últimos años para el tratamiento de la grafiosis, los resultados más esperanzadores han sido obtenidos mediante la inducción de resistencia en los olmos frente a la enfermedad. Entre los diferentes microorganismos utilizados, la inoculación de los olmos con esporas del hongo *Verticillium dahliae* ha proporcionado los mejores resultados. Su eficacia, sin embargo, parece ser muy variable en función de varios factores, tales como la especie y variedad del olmo, tamaño, edad, tipo de suelo, condiciones climáticas, etc. En este trabajo se presenta el estudio preliminar llevado a cabo durante el año 1996, mediante la utilización de *Verticillium dahliae* WCS850 (Arcadis heidemij Realisatie), sobre olmos (*Ulmus minor* var. *minor*) de la provincia de Granada. Por otra parte, se describen los resultados de la serie de aplicaciones experimentales llevadas a cabo durante 1997 en diferentes provincias españolas (Granada, Jaén, Salamanca, Alicante). La información obtenida es de gran interés de cara a verificar la eficacia del prettreamiento con *V. dahliae* WCS850 en el éxito de la inducción de resistencia en los olmos, bajo diferentes condiciones ecológicas. Se discute la posibilidad de incorporar este elemento preventivo, en el control integrado de la grafiosis del olmo en España.

Palabras clave: *Verticillium dahliae*, *Ophiostoma novo-ulmi*, inducción de resistencia, grafiosis del olmo.

INTRODUCCION

La grafiosis del olmo ha provocado la desaparición de centenares de millones de olmos en Europa, Asia y Norte América (SVIRA, 1980; PAJARES & ARÉVALO, 1987; LANIER, 1990; GIL SÁNCHEZ, 1990; BRASIER, 1990, 1991; BRASIER & MEHROTRA, 1995). Entre los estudios más relevantes que se han emprendido en los últimos años para el tratamiento de esta enfermedad, destacan los dirigidos al originalmente denominado «control biológico de *Ophiostoma novo-ulmi*» (MYERS &

STROBEL, 1983; MURDOCH *et al.*, 1986; SCHEFFER & STROBEL, 1988; SCHEFFER, 1983, 1989, 1990; ROOSIEN 1993; SUTHERLAND *et al.*, 1995; SHI & BRASIER, 1986). Inicialmente, se observó que la utilización de bacterias antagonistas del hongo, tales como *Pseudomonas* spp., se presentaban claramente esperanzadoras al aplicarlas preventivamente (MURDOCH *et al.*, 1986; SCHEFFER, 1989; SHI & BRASIER, 1986), si bien el tratamiento curativo no resultaba eficaz. En estos estudios se observa que la eficacia del método era bastante variable, dependiendo del método de aplicación empleado, de la especie y variedad del olmo [máxima en *Ulmus americana*, *U. x hollandica*, y escasa o nula en *Ulmus carpinifolia* Gleditsch (= *Ulmus minor* Miller *sensu lato*), y *U. procera* Salisbury (= *U. minor* Miller var. *vulgaris* (Aiton))]. Una primera explicación a la eficacia observada en los ensayos, apuntaba a la existencia de metabolitos con actividad fungicida, o fungistática, los cuales sería liberados por la bacteria dentro del árbol. En este sentido, LAM *et al.*,

¹ Servicio de Conservación. Patronato de la Alhambra y Generalife. Consejería de Cultura de la Junta de Andalucía. Granada.

² Jefe de la Sección de Equilibrios Biológicos. Consejería del Medio Ambiente y Ordenación del Territorio. Dirección General del Medio Natural. Junta de Castilla y León.

³ Dpto. Biología Animal, Vegetal y Ecología. Universidad de Jaén.

(1987) observaron que una mutación de *P. syringa*, incapaz de producir antibióticos, se mostraba igualmente incapaz de suprimir los síntomas de la enfermedad, mientras que la variedad salvaje los suprimía claramente. Sin embargo, la existencia de olmos «no receptivos» sería difícil de entender, según este razonamiento (SCHEFFER, 1990), más aún cuando no se ha podido tener evidencia del establecimiento de una colonia de *Pseudomonas* en los olmos. Similares estudios fueron desarrollados con el micoparásito *Trichoderma viride* (BRASIER & WEBBER, 1987), los cuales sugieren que en ciertos casos es posible el control de la enfermedad con este hongo. Es de destacar que no se tiene la evidencia de una producción de antibióticos por parte de *Trichoderma*, por lo que se apunta que su efectividad estaría basada en la producción de celulasa, quitinasas y glucanasa (BRASIER & WEBBER, 1987). Paralelamente, se observa que una supresión efectiva de los síntomas de la grafiosis en olmos resistentes a la cepa no agresiva, puede conseguirse mediante la aplicación de un tratamiento preventivo con dicha cepa (HUBBES & JENG, 1981; SCHEFFER, 1990), o bien mediante la inoculación con una mezcla de cepas agresiva y no agresiva (SCHEFFER *et al.*, 1980; SCHEFFER, 1990). La virulencia de *O. ulmi* puede resultar afectada por una enfermedad, transmitida probablemente por un virus (factor de devirulencia, o factor *d*: BRASIER, 1983, 1984; WEBBER, 1987), por lo que la ausencia de síntomas en los olmos podría explicarse si el aislamiento de la cepa no agresiva, utilizada en estos experimentos, contuviese dicho factor, aunque esto no ha podido aún ser demostrado (SCHEFFER, 1990).

Consecuentemente a los estudios efectuados, el microorganismo utilizado para el control biológico del patógeno debe muy probablemente ejercer algún efecto en el hospedador, ya sean los metabolitos bacterianos (*Pseudomonas*), fúngicos (*Trichoderma*), o de la cepa no agresiva (*Ophiostoma ulmi*), los cuales deben muy probablemente desencadenar los mecanismos de defensa del hospedador, actuando como estimulantes (CRUTE *et al.*, 1985). El último efecto del tratamiento biológico del agente causante de la enfermedad debe ser por tanto el incremento de la resistencia del hospedador, o «resistencia inducida», lo que actualmente se baraja como la hipótesis más

plausible (SCHEFFER *et al.*, 1980; HUBBES & JENG, 1981).

Posteriormente, se demostró que un aislamiento del hongo *Verticillium dahliae* suprimía los síntomas de la enfermedad, incluso en olmos muy sensibles, e inmunes al tratamiento mediante *Pseudomonas* (*U. carpinifolia*), y su efecto protector igualaba e incluso mejoraba a los mejores resultados obtenidos con la bacteria (SCHEFFER, 1990). Este hongo es conocido como el agente causante de la «verticilosis», enfermedad que afecta a centenares de plantas, produciendo defoliación y marchitamiento gradual (AGRIOS, 1991), si bien, según SUTHERLAND *et al.* (1995), su patogenicidad para los olmos es baja o nula. Otros patógenos fúngicos fueron igualmente utilizados sin éxito (*Ceratocystis narcissi* y *V. albo-atrum*: SCHEFFER, 1990). El estímulo primario que inicia el mecanismo de resistencia está aún por dilucidar detalladamente, sin embargo se cree que los enzimas superóxido dismutasa y peroxidasa, implicados en la reducción catalítica del oxígeno, deben de jugar un papel importante, al eliminar radicales tales como los aniones superóxido, peróxido de hidrógeno e hidroxil, demasiado reactivos para ser tolerados por el hospedador. En favor de esta teoría, se observa que en los olmos más resistentes se desarrolla una mayor actividad de estos enzimas respecto de los más sensibles, lo que probablemente es reflejo de su mayor capacidad de defensa (CRUTE *et al.*, 1985; DEAN & KUC, 1987). La compartimentalización del área afectada por el patógeno, mediante la deposición de biopolímeros tales como lignina y calosa, capaces de aislar al patógeno, es una respuesta común en los olmos (SHIGO, 1984; BONSEN *et al.*, 1985), por lo que un evidente mecanismo de defensa dependería de los sistemas enzimáticos implicados (SCHEFFER, 1990). Otras posibles explicaciones a la resistencia inducida se fundamentan en la producción de gomas y tilosas por parte del olmo, que restringen el movimiento y distribución del patógeno (ELGERSMA 1973), o bien en la formación de embolias, que pueden ser debidas a los metabolitos producidos por el tratamiento, y que disminuyen la tensión superficial o incrementan el tamaño de los poros de las membranas (SUTHERLAND *et al.*, 1995).

Por otra parte, en los olmos se producen metabolitos tóxicos para *O. ulmi*, cuya actividad enzimá-

tica les permite degradar sus paredes celulares, pudiendo por tanto inhibir su crecimiento. HUBBES & JENG (1981) y JENG *et al.* (1983) han sugerido el importante papel de varias fitoalexinas (mansononas E y F) encontradas en ejemplares (*U. americana*) inoculados con aislamientos de las cepas no agresiva y agresiva sucesivamente.

Al igual que ocurre con la diferente susceptibilidad al patógeno, la eficacia del tratamiento preventivo con *V. dahliae* varía considerablemente en las diferentes especies y variedades (SCHEFFER, 1990; SUTHERLAND *et al.*, 1995). Según SCHEFFER (1990) y ROOSIEN (1995), este sistema es eficaz incluso en especies de olmos muy susceptibles tales como el olmo campestre (*U. carpinifolia*, sobre el que el tratamiento con *Pseudomonas* se había mostrado claramente ineficaz), aunque es inefectivo sobre *U. procera* (SUTHERLAND *et al.*, 1995). Para explicar la eficacia variable según distintas especies, estos autores proponen un mecanismo de acción basado en la capacidad de supervivencia del hongo inoculado y de su distribución dentro del xilema del árbol. En este sentido, se ha comprobado en las experiencias efectuadas con *O. piceae*, que la distancia respecto del punto de inoculación varía considerablemente (entre 30 cm y 1 m) según el clon del olmo utilizado. Según SUTHERLAND *et al.*, (1995), la mayor o menor efectividad depende de la variedad, o incluso dentro de una misma variedad, según el tamaño, edad, tipo de suelo, condiciones climáticas, etc. En este sentido, es necesario conocer y valorar la eficacia del control biológico del patógeno, mediante la inducción de resistencia, en las condiciones ecológicas particulares de la Península Ibérica, sobre ejemplares de la especie *Ulmus minor* Miller (*sensu latissimo*) (P. PRIETO FERNÁNDEZ, com. pers.), los cuales aunque generalmente escasos, son aún relativamente abundantes en ciertas zonas urbanas y rurales, principalmente del sur y este de la península, y son especialmente relevantes en espacios de interés histórico y cultural, tales como los del entorno forestal de la Alhambra y el Generalife de Granada (P. PRIETO FERNÁNDEZ, com. pers.).

Las distintas especies y variedades de olmos presentan una diferente susceptibilidad relativa a la grafiosis (GIL SÁNCHEZ *et al.*, 1990; DORION *et al.*, 1994), y en relación con ello, SCHEFFER (1983), y SUTHERLAND *et al.*, (1995) indican que

el éxito mediante la inducción de resistencia es también variable, en función de la especie, variedad, tamaño, edad, tipo de suelo, condiciones climáticas, etc. Esto implica que los resultados obtenidos sean relativamente erráticos, lo que supone según SUTHERLAND *et al.*, (1995), uno de los principales inconvenientes en su utilización. En adición a lo anterior, en nuestro país es relativamente escasa la información sobre los aspectos taxonómicos y ecológicos de las diferentes especies de olmos (GIL SÁNCHEZ *et al.*, 1990), razón que hace aún más necesaria la realización de posteriores ensayos sobre las distintas especies, variedades y en las diferentes condiciones ecológicas.

El objeto de la serie de aplicaciones en los ensayos que se describen a continuación ha sido, por tanto, verificar la posibilidad de inducir resistencia frente a la grafiosis en nuestros olmos (*Ulmus minor*, *sensu latissimo*), y observar la evolución de estos tras su tratamiento, en diferentes puntos geográficos, sujetos por tanto a diferentes condiciones ecológicas, con el fin de obtener un máximo de información sobre la potencial utilidad de este elemento en el control de la enfermedad. Esta serie de aplicaciones experimentales están basadas en los resultados de un ensayo preliminar, cuyos rasgos principales, para mayor información y comodidad del lector se describe en primer lugar.

MATERIAL Y METODOS

1. Ensayo preliminar

El estudio que constituye la base de la aplicación experimental de la inducción de resistencia fue realizado durante el verano de 1996, en la finca «Arenales de S. Pedro», situada a 20 km al norte de Granada capital, sobre olmos de la especie *Ulmus minor* Miller (= *Ulmus carpinifolia* Gle-ditsch; IPINZA CARMONA, 1990), de edades comprendidas entre 15 y 25 años, y de diámetros que oscilan entre 15 y 35 cm. Estos se encuentran formando una alineación en borde de carretera, siendo la distancia entre ellos de aproximadamente 1-1.5 m.

En la olmeda se establecieron 4 subgrupos de olmos, y en cada uno de ellos se seleccionaron 20 árboles. El tratamiento aplicado a cada uno de los 4 grupos fue el siguiente: Grupo A: Grupo con-

rol; Grupo B: *Ophiostoma novo-ulmi*; Grupo C: *Verticillium dahliae* (WCS850); Grupo D: *O. novo-ulmi* + *V. dahliae* (WCS850).

En los grupos C y D se aplicaron los tratamientos preventivos con el inductor de resistencia (11/junio/96), mediante la inoculación de una suspensión acuosa de esporas de un aislamiento del hongo *Verticillium dahliae* WCS 850, suministrado por Arcadis Heidemij Realisatie (Apeldoorn, Países Bajos). El método de aplicación del inductor, crucial en su efectividad, ha consistido en el escopleado con gubia, por ser más efectivo que la inyección a baja presión (SCHEFFER, 1990). El dispositivo utilizado para ello consiste en un inyector provisto de una hoja de gubia acanalada, con la que se efectúan incisiones en la corteza, de una profundidad variable, en función de su espesor, a una altura de aproximadamente 0.7 a 1 m sobre el suelo (SCHEFFER, 1990; ROOSIEN, 1995). En todos los olmos tratados con *V. dahliae*, las aplicaciones se han efectuado alrededor del tronco, por lo que el número de aplicaciones por unidad ha sido función de su diámetro, y la distancia entre cada dos de ellas, de 10 cm (Fotos 1 y 2). En cada incisión se aplicaron dos gotas del producto (100 microlitros), mediante deslizamiento de la suspensión a lo largo de la cuchilla, y su posterior incorporación por succión al interior del xilema (Foto 3).

Dos semanas después, el 25 de junio de 1997, los olmos de los grupos B y D fueron inoculados con una suspensión de esporas de un aislamiento de

O. novo ulmi (5×10^7 esporas/ml), enviado por el profesor L. Gil Sánchez (ETSI Montes, UPM).

El sistema descrito anteriormente ha sido también el empleado para la inoculación de *O. novo-ulmi*, sin embargo, a diferencia de los ensayos de SCHEFFER (1990), en los que la inoculación del hongo era efectuada en una de las ramas principales, y debido a la fecha relativamente tardía en la introducción del patógeno (aproximadamente dos meses después de la foliación), éste se aplicó directamente en los haces vasculares del xilema del tronco, con objeto de asegurar una mayor rapidez en el desarrollo de los síntomas de la enfermedad. En cada árbol se llevaron a cabo cuatro aplicaciones (una por orientación) de la suspensión de esporas, 10-15 cm por debajo del nivel de inoculación con *O. novo-ulmi*, suministrándose en cada una de ellas una gota de 50 microlitros, por lo que el volumen total suministrado por árbol infectado fue de 200 microlitros.

Desde la fecha de inoculación de los olmos, y hasta el inicio del amarilleamiento fisiológico del follaje, a partir de mediados de octubre de 1996, se realizaron una serie de inspecciones a intervalos mensuales (día 25 de cada mes) sobre los olmos de los cuatro grupos descritos. En cada una de ellas se anotaba el porcentaje de superficie foliar que presentaba los diferentes síntomas de la enfermedad (% de epinastia y % de hojas caídas o secas), así como la presencia de orificios de penetración de *Scolytus multistriatus* en el tronco y ramas del árbol, como dato indicativo del estado fisiológico de los árboles.



Fotos 1 y 2. Dispositivo utilizado para la inoculación de *V. dahliae* WCS850, y detalle del dosificador para la perfecta regulación del volumen administrado en cada incisión.



Foto 3. La suspensión de esporas se hace deslizar a lo largo del canal, existente en la hoja del inyector para, posteriormente, ser, incorporada por succión al xilema del olmo.



Foto 4. Ejemplar notable en Ciudad Rodrigo, inoculado con *V. dahliae* (17.V.97).



Foto 5. Tratamiento de olmo notable en Herguizuela de la Sierra.

2. Aplicaciones experimentales

Durante el año 1997, una serie de aplicaciones experimentales con *Verticillium dahliae* WCS850 fueron llevadas a cabo, siguiendo la metodología antes descrita, en un número total de 222 olmos, localizados en las siguientes comunidades autónomas:

2.a. Comunidad de Andalucía

En la ciudad de Granada fueron objeto de tratamiento con *Verticillium dahliae* WCS850, un total de 156 olmos, de los más de 600 ejemplares existentes en las olmedas consideradas para la aplicación experimental del tratamiento (Tabla I). De ellos, la mayor parte (116 ejemplares) se localizan en los Bosques y Jardines de la Alhambra, donde los ejemplares seleccionados eran en su mayor parte olmos notables, con diámetros de hasta 1.4 m. En las Tablas II y III están representados, mediante número de identificación asignado a cada olmo (según la catalogación realizada durante el inventario efectuado en 1994 (GONZÁLEZ RUIZ, 1995; GONZÁLEZ RUIZ *et al.*, 1998), todos los olmos que fueron objeto del tratamiento, su localización (zona y subzona, o «cuartel»), así como el volumen de producto suministrado, en cm^3 .

Otros olmos de la provincia de Granada, objeto de este tratamiento se encuentran en el Sacromonte (Carmen de la Reja), aproximadamente a 250 m del Generalife. Los 40 ejemplares considerados (Tabla I), de los más de 150 ejemplares situados en las inmediaciones, presentaban diámetros entre 16 y 32 cm. En la provincia de Jaén, se trataron un total de 17 olmos durante la segunda quincena de mayo de 1997, en las localidades de Fuensanta de Martos, Cambil y Mogón. El número total de olmos en las olmedas y/o localidades seleccionadas en conjunto era superior a 150 (Tabla I).

2.b. Comunidad de Castilla-León

Los olmos objeto del tratamiento se encuentran en la provincia de Salamanca, concretamente en las localidades de Ciudad-Rodrigo (Foto 4), Monsagro y Herguizuela de la Sierra. Como se observa en la Tabla I, nueve olmos fueron inoculados preventivamente con *Verticillium dahliae* WCS850, el día 17 de junio de 1997 (Foto 5).

TABLA I
LOCALIZACION Y NUMERO DE OLMOS TRATADOS CON *V. DAHLIAE* WCS850, EN OLMOS DE ANDALUCIA, VALENCIA Y CASTILLA LEON, DURANTE 1997

Provincia	Localidad	Fecha tratamiento	Nº estimado Olmos no tratados	Nº Olmos tratados	Perímetro (m)
GRANADA	Alhambra Alamedas, Gómez	16-IV-97	303	66	1,50-3,60
	Alhambra Placetas de Carlos V	16-IV-97	55	32	0,75-4,30
	Alhambra Jardines del Partal	24-V-97		18	0,62-2,57
	Sacromonte Carmen de la Reja	20-V-97	>100	40	0,50-1,05
JAEÑ	Fuente de Martos Paseo Central	27-V-97	>50	10	1,20-2,90
	Mogón (prop. particular)	20-V-98	>80	6	1,10-1,30
	Cambil Plaza de la Iglesia	18-V-98	>20	1	>5
SALAMANCA	Ciudad Rodrigo Plaza	17-VI-98	7	7	1,30-2,50
	Herguñuela de la Sierra Plaza	17-VI-98	0	1	1,50
	Monsagro Plaza	17-VI-98	0	1	1,10
ALICANTE	Alcoy Olmedas periféricas	16-V-98	>1000	40	0,40-2,05

Los ejemplares inoculados son olmos notables, de diámetros de hasta 250 cm (Foto 4).

2.c. Comunidad de Valencia

En el término municipal de Alcoy (Alicante), 40 olmos fueron inoculados con *V. dahliae* WCS850, calculándose un número superior a 1.000 olmos en las diferentes olmedas objeto de estudio, en conjunto (Tabla I).

RESULTADOS

1. Ensayo preliminar

A excepción de uno de los ejemplares del grupo D (olmos inoculados con *V. dahliae* WCS850, y posteriormente con *O. novo-ulmi*) en el que se presentaron síntomas incipientes de la enfermedad, en ninguno de los restantes de dicho grupo se han observado anomalías en el seguimiento posterior. Por el contrario, en los olmos inocula-

dos únicamente con *Ophiostoma novo-ulmi* (grupo B), los síntomas de la enfermedad comienzan a manifestarse el día 10 de julio, es decir, 15 días después de la introducción del patógeno, y a partir de esta fecha, estos progresan con rapidez, de forma que en la primera de las observaciones efectuadas (25 de julio), el porcentaje de superficie foliar que presentaba síntomas evidentes era del 60%, incrementándose al 80% en la observación efectuada en el mes de agosto, y al 100% en la correspondiente al mes de septiembre. En cada una de estas tres observaciones se aprecia una gran diferencia entre la sintomatología de los olmos correspondientes a los distintos tratamientos, tanto en lo que respecta a los síntomas foliares, como indirectamente, en el ataque por parte de *S. multistriatus*, lo que se manifiesta por la existencia de orificios de penetración y de sistemas de galerías de este escolítico en los componentes del grupo B. Por el contrario, los olmos del grupo control (A) no han presentado sínto-

TABLA II

LOCALIZACION E IDENTIFICACION DE LOS OLMOS (*U. minor*) INOCULADOS CON *VERTICILLIUM DAHLIAE* WCS 850 EN LA ALHAMBRA (GRANADA) DURANTE 1997, Y VOLUMEN DE PRODUCTO ADMINISTRADO A CADA UNO DE ELLOS

Zona	Subzona	N.º olmo	V. dahliae (cc)	Zona	Subzona	N.º olmo	V. dahliae (cc)
P L A C E T A S D E C A R L O S V	18	1	3.20	C	18	31	0.66
	18	2	2.30	A	18	32	0.66
	18	3	1.90	R	18	33	0.66
	18	4	3.20	L	18	34	0.69
	18	5	0.85	O	18	35	0.62
	18	6	0.83	S	18	36	0.92
	18	7	0.92	V	18	37	0.73
	18	8	0.64	J A R D I N E S P A R T E L	19	1	1.95
	18	9	1.23		19	2	2.07
	18	10	1.80		19	3	1.47
	18	12	4.30		19	4	1.40
	18	13	1.12		19	5	1.50
	18	14	0.93		19	6	1.47
	18	15	1.70		19	7	2.12
	18	16	1.57		19	8	1.20
	18	17	1.44		19	9	0.45
	18	19	1.15		19	10	0.84
	18	20	1.35		19	11	1.03
	18	21	1.20		19	12	0.63
	18	22	1.40		19	13	0.98
	18	23	2.90	19	14	2.05	
	18	26	3.45	19	15	2.42	
	18	28	1.63	19	16	1.42	
	18	29	1.68	19	22	1.47	
	18	30	1.20	19	26	1.20	

mas de la enfermedad ni de ningún otro tipo de anomalía foliar. Esto, por una parte nos permite eliminar la posibilidad de que los síntomas observados en ellos hubieran sido debidos a infecciones provocadas espontáneamente por los escolítidos generados en la zona. Nuestros resultados, a la vista de la evolución de los olmos de los grupos C y D., están en consonancia con las observaciones efectuadas previamente en los Paí-

ses Bajos (ROOSIEN, 1995), por lo que el uso de *V. dahliae* no ha supuesto por el momento un peligro para el medio ambiente, para la salud pública, para el propio hospedador, o para las plantas adyacentes. En este aspecto, SUTHERLAND *et al.* (1995) señala que a pesar de su baja o nula patogenicidad para los olmos, la amplia gama de hospedadores susceptibles a *V. dahliae* podría representar el principal obstáculo a la hora de su apli-

TABLA III

LOCALIZACION E IDENTIFICACION DE LOS OLMOS (*U. minor*) INOCULADOS CON *Verticillium dahliae* WCS 850 EN LA ALHAMBRA (GRANADA) DURANTE 1997, Y VOLUMEN DE PRODUCTO ADMINISTRADO A CADA UNO DE ELLOS

Zona	Subzona (Cuartel)	N.º olmo	V. dahliae (cc)	Zona	Subzona (Cuartel)	N.º olmo	V. dahliae (cc)
	2	1	1.67		10	38	1.76
	2	2	1.69		10	43	1.86
	2	3	1.83		10	44	1.65
	2	4	0.63		10	45	1.58
L	2	12	0.57	L	10	46	1.95
A	2	14	0.52	A	10	47	2.05
S	2	16	0.69	S	10	48	0.80
	2	17	1.05		10	49	1.60
	2	21	1.80		10	50	1.90
	2	22	1.89		10	51	2.03
A	2	23	2.57	A	10	52	1.87
L	2	24	2.03	L	10	53	2.00
A	2	25	1.99	A	10	57	2.30
M	2	26	2.48	M	10	58	1.60
E	3	1	2.57	E	10	61	1.62
D	3	2	2.70	D	10	62	1.68
A	3	3	1.28	A	10	63	1.64
S	3	4	1.91	S	10	64	1.57
	3	12	1.90		10	67	1.78
	3	13	1.63		11	1	2.93
	3	14	1.68		11	2	2.34
	3	15	2.10		11	6	2.19
	3	16	1.53		11	7	3.84
	3	17	1.47		11	10	3.11
	3	18	2.78		11	11	1.02
	10	1	3.65		11	13	3.02
	10	2	2.47		11	14	2.28
	10	3	2.75		11	16	3.03
	10	17	1.20		11	17	1.99
	10	18	2.83		11	18	1.87
	10	19	0.75		11	19	2.83
	10	27	1.33		11	20	2.35
	10	28	1.76		11	21	1.70

cación en grandes extensiones, si bien estos autores indican como una buena alternativa la posibilidad de atenuar artificialmente la patogenicidad del hongo. En contraste con lo observado por SUTHERLAND *et al.* (1995), hasta la fecha, la respuesta al pretratamiento con *V. dahliae* (grupo D) ha sido generalmente satisfactoria y relativamente homogénea al proporcionar una protección óptima en el 95% de ellos. Esto supone que el porcentaje medio de enfermedad sea inferior al 10% observado por SCHEFFER (1990), aunque algo superior a los valores indicados por ROOSIEN (1995), entre 1992 y 1995, en el que oscilaron entre el 0.9% y el 1.4% sobre más de 30.000 olmos. En el caso de *U. carpinifolia*, SCHEFFER (1990) observa que la eficacia es relativamente variable, presentándose síntomas de la enfermedad hasta en un 30 por 100 de los olmos inoculados con *O. novo-ulmi*, en el peor de los casos.

El porcentaje medio de superficie foliar afectada, observado en este ensayo (del 1.3%), es más optimista que el 8-15% de defoliación media observada por SUTHERLAND *et al.*, (1995) sobre *U. x hollandica* var. *Commelin*, en el Reino Unido sobre *U. carpinifolia* (clon CaO6) en Italia. En beneficio de su eficacia, es importante resaltar, por otra parte, que en los mencionados estudios, la inoculación de *O. novo-ulmi* se efectuó en ramas altas de la copa del árbol, de diámetro inferior a 10 cm, en contraste con este estudio, en el que la inoculación se efectuó directamente en el tronco (ver

Material y Métodos). En este caso, el más rápido acceso del hongo a los haces vasculares del xilema de mayor diámetro proporciona mayor rapidez en el avance del patógeno, lo que disminuye considerablemente las posibilidades de resistencia del olmo frente a la infección, condiciones que hacen aún más evidente la eficacia de la resistencia inducida.

2. Aplicaciones experimentales

2.a. Comunidad de Andalucía

El seguimiento del estado fitosanitario, durante el verano de 1997, de los 116 olmos inoculados con *V. dahliae* en los Bosques y Jardines de la Alhambra, indica la total ausencia de infecciones en copa, a excepción del olmo nº 3 del cuartel 10 de «las Alamedas» (Tabla III). Es importante tener en cuenta que en el año 1997, el inicio de los vuelos de la generación invernante de *S. multistriatus* se detectó a principios de abril (GONZÁLEZ RUIZ *et al.*, en este volumen), es decir, aproximadamente 2 semanas antes de la fecha en la que olmos fueran inoculados con *V. dahliae*. Estas circunstancias impiden, por tanto, afirmar la falta de eficacia de la resistencia inducida en el olmo afectado por dicha infección aérea. La existencia de esta infección en el olmo nº 3, implica una tasa de infección del 0.86%, lo que supone aproximadamente una cifra ligeramente inferior a la mita de la observada en los olmos no tratados, en la que fue del 1.95% (7 infecciones en 358 olmos). Es importante destacar que, especialmente en 1997, la tasa de infección en los olmos de «las Alamedas» y del recinto de la Alhambra fue excepcionalmente baja, a diferencia de la observada en los ejemplares del Generalife y Bosque de S. Pedro (788 y 214 olmos, en los que se observaron 13 y 19 infecciones aéreas, respectivamente) debido principalmente a su mayor proximidad a los focos de infección/infestación que comienzan a proliferar en las zonas urbanas situadas en sus proximidades, (GONZÁLEZ RUIZ *et al.*, en este volumen). Esto explica que las condiciones no fueran especialmente propicias para evaluar la eficacia de la inducción de resistencia.

En lo que respecta a los 40 ejemplares de *Ulmus minor* (var. *minor*) inoculados con *V. dahliae*, en el

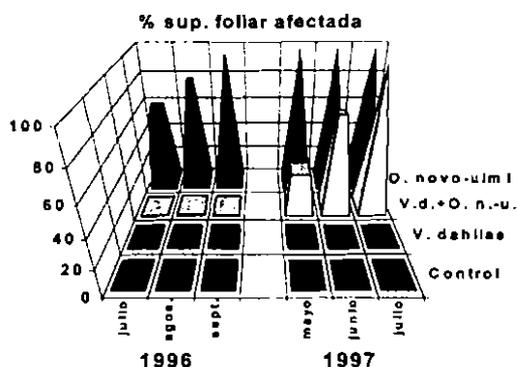


Fig. 1. Evolución de los síntomas foliares (epinastia + hojas secas o defoliación) en los olmos de los grupos A, B, C y D (n = 20 por grupo). El pretratamiento con *V. dahliae* (grupos C y D) fue efectuado el 11 de junio, y la posterior inoculación de *O. novo-ulmi* (Grupos B y D), el 25 de junio del 96. Las inspecciones se realizaron a intervalos mensuales (día 25º).

barrio granadino del Sacromonte («Carmen de la Reja»), en ninguno de ellos se han observado infecciones a lo largo del seguimiento efectuado durante el verano siguiente al tratamiento, así como ningún tipo de anomalía foliar. En contraste con esto, en los ejemplares que permanecieron exentos del pretratamiento, y que constituyen una mayor proporción (Tabla I), se observaron frecuentes infecciones aéreas, que afectaron aproximadamente a un tercio del total (35 olmos), producidas de forma natural por la abundante población de escolítidos generados en esta zona y sus inmediaciones. Debido a la rápida progresión de estas infecciones, gran parte de estos ejemplares fueron apeados durante el verano de 1997. En este caso, la efectividad de la inducción de resistencia es especialmente evidente, a la vista de las tasas de infección en los olmos tratados y no tratados, del 0% y superior al 30%, respectivamente.

Análogamente, en los ejemplares correspondientes a las diferentes localidades consideradas en la provincia de Jaén (Cambil, Fuensanta de Martos y Mogón), la eficacia del pretratamiento se ha evaluado a la vista de las tasas de infección en los olmos tratados y no tratados. En el primer caso, no se han observado síntomas foliares de la enfermedad, en los 17 olmos inoculados, en contraste con las frecuentes infecciones detectadas en los ejemplares situados en las inmediaciones, en cuyo caso las tasas de infección oscilaron entre 10% y el 25%.

2.b. Comunidad de Castilla-León

Como resultado a las observaciones efectuadas durante el verano de 1997, en ninguno de los nueve olmos inoculados con *V. dahliae* se han observado síntomas de la enfermedad. Análogamente, se pudo verificar el perfecto estado de estos olmos, no observándose defoliaciones, ni decoloraciones del follaje.

2.c. Comunidad de Valencia

Las observaciones sobre la evolución del estado fitosanitario de los olmos, llevadas a cabo por personal de la Gerencia de Medio Ambiente del Exmo. Ayto. de Alcoy, no revelaron la aparición de síntomas de la enfermedad en los 40 ejemplares situados en las tres olmedas periurbanas, inoculados con *V. dahliae* WCS850. Análogamente a lo observado

en las provincias de Granada y Jaén, la incidencia de la enfermedad fue muy importante en gran parte de los ejemplares de estas olmedas, así como en la mayor parte de las olmedas urbanas y periurbanas. En ningún caso se observaron síntomas de patogenicidad por parte del hongo inoculado, así como de cualquier otro tipo de anomalía, en los ejemplares objeto de este tratamiento.

En general, se observa que los resultados de la serie de aplicaciones experimentales están en consonancia con los observados en el ensayo preliminar. Si bien, por una parte es importante tener en cuenta que en estos casos no se pueden efectuar valoraciones absolutas respecto del nivel de éxito en la inducción de resistencia, debido a que en ningún caso estos fueron inoculados posteriormente con *O. novo-ulmi*, sin embargo, son muy evidentes los datos que, indirectamente, denotan la eficacia del pretratamiento. Por otra parte, no es menos importante destacar que al igual de lo observado en el ensayo preliminar, en la reacción de los ejemplares tratados no se han observado, en ninguno de ellos, síntomas foliares que reflejen una posible patogenicidad en los árboles por parte de la cepa utilizada para la inducción de resistencia.

Por último, y como conclusión principal, destacamos que de confirmarse los resultados obtenidos hasta la fecha, y estableciendo una comparación con otras medidas preventivas de control (aplicación de insecticidas, inyección de fungicidas, o de *Pseudomonas*), la inducción de resistencia en los olmos mediante *V. dahliae* WCS850 ejerce un escaso o nulo impacto ambiental, y supone un importante incremento en la eficacia y el rendimiento en la lucha contra la grafiosis del olmo, por lo que sería una prometedora herramienta para la mejora del control integrado de la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

A los profesores Dr. J. A. Pajares Alonso (Escuela de Ingenierías Agrarias de Palencia) y Dr. L. Gil Sánchez (ETS, UPM), por su inestimable asesoramiento y colaboración en la realización de este trabajo.

A todos los miembros del Patronato de la Alhambra que han participado en la ejecución del programa de control integrado de la grafiosis del olmo, especialmente al Excmo. Sr. D. Mateo Revilla Uceda, y a D. Jorge Calancha de Passos, por el gran interés en la investigación e incorporación al programa, de esta nueva alternativa de lucha.

A D.E. van Doorp, D.P. Den Biensen, y D. T. Roosien (Arcadis Heidemij Realisatie), por la ayuda recibida en el suministro del material biológico, así como en el diseño y ejecución del experimento preliminar, así como a los Sres. Moreno Villalonga, propietarios de la finca «Arenales de S. Pedro», por su valiosa contribu-

ción a la realización de este estudio. Igualmente, nuestro agradecimiento al Excmo. Sr. D. Alvar Seguí i Llopis, Concejal de Medio Ambiente del Ayuntamiento de Alcoi, y al personal de la Gerencia de Medio Ambiente, especialmente a D. Josep Nebot i Cerdà, por sus esfuerzos en la lucha contra la enfermedad del olmo, y su gran interés y activa colaboración en la realización de este trabajo.

R.G.R. agradece al Excmo. Sr. Director de la O.T.R.I. de la Universidad de Jaén, D. M. Parras Rosa, e igualmente, al Dpto. de Biología Animal, Vegetal y Ecología, y en particular a los profesores Dr. I. Ruiz Martínez y Dr. J. Pérez Jiménez.

SUMMARY

Among the more relevant studies conducted during the last years on the management of the Dutch elm disease (DED), hopeful results have been obtained by means of induction of tree resistance against the disease. Among the different microorganism used, the elm inoculation with *Verticillium dahliae* spores, has proved the better results. Its effectiveness, however, seems to be quite variable, depending on different factors such as elm species, variety, age, size, soil and weather conditions, etc. In this paper, a preliminary study carried out during 1996, by using the *Verticillium dahliae* WCS850 strain (Arcadis Heidemij Realisatie, Netherlands), on elms (*Ulmus minor*, var. *minor*) of the Granada province of Spain, is present. Moreover, a series of experimental applications on elms (*Ulmus minor sensu latissimo*) located in different provinces of Spain (Granada, Jaén, Salamanca, Alicante) have also been carried out during 1997. The results obtained, also present in this paper, are of great importance in order to verify the effectiveness of elm induction of resistance under different ecological conditions. The possibility of incorporate the pretreatment with *V. dahliae* WCS850 as a preventive element, on the integrate management of the DED in Spain, is discussed.

Key Words: *Verticillium dahliae*, *Ophistoma novo-ulmi*, induction of resistance, Dutch elm disease.

BIBLIOGRAFIA

- AGRIOS G. 1991: *Fitopatología*. Editorial Limusa. México, 756 pp. Versión traducida al castellano por M. Guzmán Ortíz.
- BONSEN K.J.M., SCHEFFER, R.J. & ELGERSMA D.M. 1985: «Barrier zone formation as a resistance mechanism of elms to Dutch elm disease». *IAWA Bull.* (n.s.) 6, 71-77.
- BRASIER C.M. 1983: «A cytoplasmatically transmitted disease of *Ceratocystis ulmi*». *Nature* (London), 305, 220-223.
- BRASIER C.M. 1984: «Inter-mycelial recognition systems in *Ceratocystis ulmi*, their physiological properties and ecological importance. In: JENNINGS, D.H. RAYNER, A.D.M. (eds). *The Ecology & Physiology of the fungal mycelium*, pp. 451-497. Cambridge University Press.
- BRASIER C. M. 1990: «China and the origins of dutch elm disease: an appraisal». *Plant Pathology* 39, 5-16.

- BRASIER C. M. 1991: «*Ophiostoma novo-ulmi* sp. causative agente of the current Dutch elm disease pandemics». *Mycopathologia* 115, 151-161.
- BRASIER C. M. & WEBBER J. F. 1987: «Recent avances in Dutch elm disease research: host, pathogen and vector» In: THATCH, D. (ed.), *Advances in Practical Arboriculture*. Forestry Commission Bulletin, 65 pp. 166-179. Her Majesty's Stationary Office, London.
- 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 (2): 205-215.
- CRUTE Y. R. DE WIT P. J. & WADE M. 1985: «Mechanism by which genetically controlled resistance and virulence influence host colonization by fungal and bacterial parasites». In: FRASER, R.S.S. (ed.) *Mechanism of resistance to plant diseases*, pp. 197-309. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk publishers, Dordrecht.
- DEAN R.A & KUC J. A. 1987: «Inmunization against disease: the plant fights back. In: PEGG, G.E. & AYRES, P.G. (eds.), *Fungal infection of plants*, pp. 383-410. Cambridge University Press, Cambridge.
- DORION N., BIGOT C., & NEWMAN P. 1994: «Evaluation of dutch elm disease susceptibility and pathogenicity of *Ophiostoma ulmi* using micropropagate elm shoots». *Eur. J. for Path.* 24, 112-122.
- ELGERSMA D.M. 1973: «Tylose formation in elms after inoculation with *Ceratocystis ulmi*, a possible reistance mechanism». *Neth. J. Plant. Patol.* 79. 218-220.
- GIL SÁNCHEZ L. 1990: *Los olmos y la grafiosis en España*. ICONA, Colección Técnica, Madrid, 300 pp.
- GIL SÁNCHEZ L., GARCÍA-NIETO RIVERO M.E. & SALVADOR NEMOZ, M.L. 1990: «La mejora genética de los olmos españoles». En: GIL, L. (ed.), *Los olmos y la grafiosis en España*, pp. 275-298. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación –ICONA–.
- GONZÁLEZ RUIZ R. 1995: «Control integrado de la grafiosis del olmo en la Alhambra. *Cuadernos de la Alhambra*, vol. 31-3229, 207-224.
- GONZÁLEZ RUIZ R., GAZQUEZ ALCOPA P & PAJARES ALONSO J. A. 1998: «Consideraciones sobre la situación actual y evolución de la grafiosis del olmo, *Ophiostoma novo-ulmi*, en la Alhambra y el Generalife (Granada, 1997)». *Ecología* nº 12: 307-318.
- HUBBES M. & JENG R. S. 1981: «Aggressiveness of *Ceratocystis ulmi* strains and induction of resistance in *Ulmus americana*». *Eur. J. Forest. Pathol.* 11. 257-264.
- IPINZA CARMONA R. 1990: «Algunos aspectos relevantes sobre la taxonomía de los olmos ibéricos». En: GIL, L. (ed.), *Los olmos y la grafiosis en España*, pp. 275-298. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación –ICONA–.
- JENG R. S., ALFENAS A. C., HUBBES M. & DUMAS M. 1983: «Presence and accumulation of fungitoxic substance against *Ceratocystis ulmi* in *Ulmus americana*; possible relation to induced resistance». *Eur J. Forest Pathol.*, 13, 239-224.
- LANIER G. N. 1990: «Consideraciones sobre los problemas en el control municipal de la grafiosis». En: GIL, L. (ed.), *Los olmos y la grafiosis en España*, pp. 215-241. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación –ICONA–.
- LAM B. S., STROBEL G. A., HARRISON L. A. & LAM S. T. 1987: «Transposon mutagenesis and traggig of fluorescent, *Pseudomonas*: antimycotic production is necessary for control of Dutch elm disease». *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 84, 6447-6451.
- MURDOCH C. M., CAMPANA R. J. & HOCH J. 1986: «Development of Dutch elm disease inhibited by fluorescent pseudomonads. *Biol. Cult. Test*, 1, 71.

- MYERS D. F. & STROBEL G. A. 1983: «*Pseudomonas syringae* as a microbial antagonist of *Ceratocystis ulmi* in the apoplast of American elms». *Trans. Brit. mycol. Soc.* 80, 389-394.
- PAJARES, J. A. & Arevalo M. J. 1987: «Protección de los olmos contra insectos vectores de la grafiosis». *Boletín de Sanidad Vegetal y Plagas* 13: 311-325.
- ROOSIEN T. 1993: *Three years of succesful control of Dutch elm disease by means of biologically induced resistance*. Informe Técnico, 4 pp.
- SCHEFFER R. J. 1983: «Biological control of Dutch elm disease by *Pseudomonas* species». *Annals Appl. Biol.*, 103, 21-30.
- SCHEFFER R. J. 1989: «*Pseudomonas* for biological control of Dutch elm disease III. Field trials at various locations in the Netherlands». *Neth., J. Plant Pathol.*, 95, 305-318.
- SCHEFFER R J. 1990: «Mechanisms involved in biological control of Dutch elm disease». *J. Phytopathol.*, 130, 265-276.
- SCHEFFER R. J., HEIBROECK H. M. & ELGERSMA D. M. 1980: «Symptom expression in elms after inoculation with combinations of an aggressive and a non-aggressive strain of *Ophiostoma ulmi*». *Neth. J. Plant Pathol.*, 86, 315-317.
- SCHEFFER R. J. & STROBEL G. A. 1988: «Dutch elm disease, a model tree disease for biolocial control». In: MUKERJI, K. G., & K. L. GARG (eds.), *Biocontrol of Plant Dis.*, pp. 103-119. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.
- SHI J. L. & BRASIER C. M. 1986: «Experiments on the control of Dutch elm disease by injection of *Pseudomonas* species». *Eur. J. Forest. Pathol.*, 86, 315-317.
- SHIGO A. L. 1984: «Compartmentalization: a conceptual framework for understanding how trees grow and defend themselves». *Ann. Rev. Phytopathol.*, 22, 189-214.
- SUTHERLAND M. L., MITTEMPERGHER L & BRASIER C.M. 1995: «Control of Dutch elm disease by induced host resistance». *Eur. J. For. Pathol.*, 25, 307-318.
- SVIRA P. 1980: *Dutch elm disease in California*. Leaflet 21189, Division of agricultural sciences. University of California, 7 pp.
- WEBBER J. F. 1987: «Influence of the d²-factor on survival and infection by the Dutch elm disease pathogen *Ophiostoma ulmi*». *Plant Pathol.*, 36, 535-538.