

PONIENDO EN CLARO

Olmos resistentes a grafiosis

Rubén Moreno Gutiérrez¹, Mónica Mozo Ayuso² e Isabel Ruiz Movilla³

Facultad de C. C. Biológicas y Ambientales. Universidad de León. Alumnos de 5º de Biotecnología (curso 2009-2010).

¹(bctrmg00@estudiantes.unileon.es), ²(btcmma00@estudiantes.unileon.es),
³(bctirm00@estudiantes.unileon.es).

El olmo, antaño una de las especies arbóreas más abundantes, ha visto diezmada su población en el último siglo a causa de una enfermedad de origen fúngico conocida como grafiosis.

Con el fin de lograr detener y erradicar esta epidemia, se están llevando a cabo diversas medidas de control. Entre estas se incluyen diferentes estrategias de control químico y biológico que se emplean tanto frente al escarabajo responsable de la propagación de la infección como frente al hongo. Además, se están desarrollando varios proyectos para obtener olmos resistentes a través de la creación de árboles transgénicos y de programas de mejora, todo ello utilizando la biotecnología como herramienta para ayudar a identificar compuestos y mecanismos, así como genes, que confieran resistencia; y también para mejorar los sistemas de transformación, de regeneración y de propagación de olmos. Todas estas estrategias biotecnológicas deben combinarse con las medidas preventivas.

Palabras clave: árboles transgénicos, ceratoulmina, *Ophiostoma*, programas de mejora, pseudomicina.

El olmo

El olmo es un árbol caducifolio, perteneciente al género *Ulmus*, que se encuentra ampliamente distribuido por gran parte del planeta, sobre todo Asia Central, Europa y América del Norte. Además, al ser una especie muy utilizada por el hombre, fue rápidamente exportado a zonas del hemisferio Sur, como Australia o Sudamérica.

En nuestro país, las dos especies de olmo autóctonas son *Ulmus minor* (olmo común, distribuido prácticamente por todo el territorio) y *Ulmus glabra* (olmo de montaña, predominante en los Pirineos, la Cordillera Cantábrica y el Sistema Central).

Desde hace siglos, la madera de este árbol se ha utilizado para la fabricación de muebles, o incluso, dada su alta impermeabilidad, de barcos o tuberías. Además, su corteza, troceada y hervida, da como resultado una pasta

que se puede usar como suplemento para los pastos del ganado. Por último, también es muy apreciado con fines ornamentales (**Fig. 1**).

La grafiosis

La grafiosis es una enfermedad que afecta al olmo y que ha diezclado la población de estos árboles de forma drástica en el último siglo (1000 millones de olmos muertos a nivel mundial). Fue descubierta por Bea Schwarz en 1921 en Holanda (de ahí que, en inglés, esta enfermedad se conozca como Dutch Elm Disease). Desde entonces, se han producido dos grandes pandemias: la primera, que causó la muerte de entre el 10 y el 40% de los olmos, se dio entre 1920 y 1940, mientras que la segunda, más virulenta, empezó en 1970 y continúa en la actualidad.



Figura 1. Izquierda: Fotografía de un olmo común en Aras de los Olmos (Valencia). Derecha: El mismo olmo, tras sufrir la grafiosis.

El hongo causante de la enfermedad pertenece al género *Ophiostoma*, del cual existen dos especies relevantes. *O. ulmi* es la especie no virulenta, y es la responsable de la primera epidemia de grafiosis. La otra, *O. novo-ulmi*, es la especie agresiva, responsable de la segunda epidemia. La especie agresiva tiene mayor crecimiento y virulencia que la otra, gracias a su gran capacidad para producir toxinas como la ceratoulmina, péptido hidrofóbico de 75 aminoácidos y peso molecular de 7600 Da (Bowden et al., 1994), y que presenta naturaleza surfactante, es decir, reduce la tensión superficial de los líquidos (en este caso la savia), lo que aumenta el riesgo de cavitación y embolismo en los vasos del xilema (Díez et al., 2002). Esto provoca que la circulación de la savia sea intermitente, o incluso se detenga. Paralelamente, el hongo ataca a las células vegetales de su entorno; fruto de esta degradación, se forman subproductos de desecho, que se irán acumulando a su vez en el xilema, favoreciendo así el bloqueo de los vasos del xilema.

Entre los síntomas de esta enfermedad, se encuentran el amarilleamiento de las hojas, debido a que sus células reciben un aporte limitado de sales minerales como resultado de la reducida circulación de la savia por el xilema, dándole al árbol un aspecto raído y débil; además, si se realiza un corte transversal a las ramas, se pueden observar ciertas manchas pardas, que corresponden a la presencia del hongo causante de la infección, obstruyendo los vasos conductores de la planta (**Fig. 2, Izquierda**); por otra parte, para causar la grafiosis, el hongo utiliza como vector a un escarabajo escolítido, cuya presencia, por lo tanto, constituye asimismo un indicador de la enfermedad.



Figura 2. Izquierda: anillo de color oscuro correspondiente a *Ophiostoma* obstruyendo el xilema de un olmo. Derecha: Galerías excavadas por *Scolytus multistriatus* en la parte interna de la corteza de un olmo.

La presencia de dichos escolítidos se identifica fácilmente al observar la parte interna de la corteza del árbol, ya que barrenan galerías y cavidades en la corteza (**Fig. 2, derecha**). La especie más importante de escolítido en relación a la grafiosis es *Scolytus multistriatus*. Estos escarabajos, a la hora de reproducirse, prefieren buscar olmos débiles (porque estén previamente infectados por grafiosis, o debido a sequías), en los que realizar la puesta de los huevos, concretamente en el espacio entre la corteza y la madera. Estos huevos eclosionan, y salen larvas que excavan sus respectivas galerías, perpendicularmente a la excavada por la madre. Pronto estas larvas se convierten en *Scolytus* en fase juvenil, los cuales, para alcanzar su madurez sexual, deben alimentarse de ramillas de olmos vigorosos, así que vuelan hacia ellos. Una vez que tienen los aparatos reproductores desarrollados, buscan de nuevo olmos debilitados para reproducirse en ellos.

Ophiostoma se aprovecha del ciclo de vida de *Scolytus*, ya que, si un olmo está infectado, las larvas que nacen y crecen en las galerías excavadas por la

madre en ese árbol saldrán recubiertas de sus esporas. Estas larvas, al alimentarse de ramillas de olmos vigorosos, permiten que las esporas del hongo que llevan consigo infecten a los árboles. Por otra parte, es frecuente que se produzca el contagio entre árboles cercanos mediante el contacto entre las raíces (Scheffer et al., 2008).

Factores que influyen en la eficacia de la infección

Una vez conocido el mecanismo de infección, es importante referirse a los factores que influyen en la eficacia de la misma, ya que será sobre ellos sobre los que haya que actuar. Entre estos factores se encuentran:

1. El diámetro de los vasos del xilema: olmos con diámetro grande son más susceptibles que olmos con menor diámetro, ya que posibilitan mayor difusión de la enfermedad.
2. La época del año en que se produce la infección: si la infección se produce en primavera, las esporas tienen tiempo para llegar a los vasos largos y principales del xilema, con lo que se extiende fácilmente a todo el árbol, (infección sistémica). Sin embargo, si se produce en verano, la infección se limita a los vasos externos, dando lugar a una infección más localizada, y además reversible.
3. La virulencia del patógeno: olmos infectados por *O. novo-ulmi* están prácticamente condenados a morir en ese año o al siguiente, mientras que en aquellos infectados por *O. ulmi* solo mueren unas pocas ramas, recuperando el follaje al año siguiente.
4. Otros factores importantes que determina la susceptibilidad del árbol son el genotipo, su edad, el vigor previo a la infección, y las condiciones del entorno.

Gestión de la grafiosis

Existen diferentes medidas de control encaminadas a lograr la detención y erradicación de la epidemia, y a conseguir restaurar las menguadas poblaciones de olmos. Se utilizan diferentes estrategias de actuación tanto frente al escolítido como frente al hongo. También se están desarrollando varias estrategias para obtener olmos resistentes a través de la creación de olmos transgénicos y de los programas de mejora.

Actuación frente al escolítido

Como los principales vectores de la enfermedad son los escolítidos, el objetivo principal en este caso es conseguir una reducción del tamaño de las poblaciones. Para ello se utilizan tres estrategias fundamentalmente: la destrucción de los árboles afectados, el control químico y el control biológico.

La destrucción de los árboles afectados ha de realizarse inmediatamente para limitar la pérdida al menor número de ejemplares posible. Para ello se quema la madera extraída, y se eliminan o tratan los tocones con productos que maten a la raíz.

En cuanto al control químico se han empleado numerosos insecticidas tanto de contacto como sistémicos, pero la mayoría, pese a ser eficaces, entrañan problemas de contaminación ambiental y se requiere una aplicación repetida cada cierto tiempo. La toxina Bt, de *Bacillus thuringiensis* afecta a las larvas del escolítido, y es segura desde el punto de vista medioambiental. Otro tipo de control químico es mediante la utilización de disuasorios de la alimentación. Se ha visto que el compuesto más eficaz es la juglona, extraída de *Carya ovata* y *Juglans regia* (**Fig. 3**) (Pajares et al., 2004). También otros compuestos pertenecientes a distintos grupos químicos logran reducir la alimentación, como flavonoides, (floreтина, kaempferol y quercetina) cumarinas (aesculetina y fraxetina) y alcaloides (gramina y magnolina).



Figura 3. Ensayo de doble elección en el que se observa una mayor alimentación del escolítido en el disco foliar no impregnado con juglona (derecha) (Pajares et al., 2004).

Como control biológico se utiliza el hongo *Phomopsis oblonga*, que aparece de manera natural en el floema de olmos moribundos, del cual se han aislado metabolitos disuasorios de la alimentación (phomosolidas A y B). Además los escolítidos tienen diversos enemigos naturales, siendo los más significativos la hormiga *Entedon leucogramma* y los pájaros carpinteros.

Lucha contra el hongo

En cuanto a la actuación frente al hongo existen, al igual que en el caso anterior, diferentes controles químicos o biológicos.

El primer tipo de estrategia de control químico es el uso de fungicidas sistémicos. Los más utilizados son los del grupo del bencimidazol y los derivados del imidazol. Este es un tratamiento preventivo que solo se suele aplicar a olmos de gran valor. Por otro lado diversos trabajos han confirmado la

implicación de compuestos fenólicos, como el carvacrol y el ácido salicílico, en los mecanismos de defensa del olmo ante la grafiosis, observándose un incremento de la resistencia tras su aplicación (Martín et al., 2008).

En cuanto al control biológico se han empleado diferentes bacterias, pero el género *Pseudomonas* es el más relevante. Algunas especies sintetizan sustancias antimicóticas como la pseudomicina, y además poseen gran afección por el hierro existente en la savia, necesario para la subsistencia del hongo. La más utilizada es una cepa de *P. syringae* modificada genéticamente cuyo transposón Tn903 se emplea para realizar mutagénesis y obtener nuevos mutantes productores de antimicóticos (Lam et al., 1987).

Un hongo utilizado con éxito es *Verticillium albo-atrum* cepa WCS850, que es una cepa no patogénica para el olmo. La inyección de una suspensión de esporas de este hongo en *U. americana*, consigue aumentar la resistencia frente a la infección por *O. novo-ulmi* (Scheffler et al., 2008). Además de este hongo, también se utilizan extractos de esporas o aislados de glicoproteínas de una cepa de *O. ulmi* no agresiva, con el objetivo de inducir los mecanismos de defensa del olmo. Concretamente algunos estudios han demostrado que se produce la acumulación de unas fitoalexinas sesquiterpénicas denominadas mansosonas en *U. americana*, después de la inoculación con esta cepa. La mansosona E es la más activa frente al hongo, según demuestran ensayos realizados *in vitro*.

Por último, existe un tipo de entidades parecidas a micovirus, que son los factores d. Existen treinta tipos diferentes, son RNA bicatenarios, antagonistas de *O. ulmi*. Uno de estos factores, el factor d², se ha asociado con una reducción de la virulencia de *O. ulmi*. El mecanismo de acción todavía no se conoce bien, pero se ha correlacionado con una reducción de los niveles de citocromo aa₃, una importante enzima de la cadena respiratoria. Se transmite a otros hongos por fusión hifal o reproducción sexual (Brasier, 1986).

Olmos transgénicos

La primera aproximación para obtener un olmo transgénico de interés frente a la grafiosis fue la transformación de *U. procera* con el plásmido RiA4b (Gartland et al., 2001). El plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes* produce, entre otros efectos, modificaciones en el xilema. Por tanto, como el tamaño del xilema es una de las características que pueden conferir resistencia al olmo, se estudian las modificaciones internas que se podrían conseguir en las plantas regeneradas a través de la utilización de este plásmido.

Sin embargo, fue el trabajo desarrollado por Newhouse et al., en el 2007, el primer intento de transformar *U. americana* con genes de resistencia exógenos con actividad específica frente a *O. novo-ulmi*. Obtuvieron olmos transgénicos transformados con *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA105 con

la construcción génica pSE39, que codifica para el péptido antimicrobiano ESf39 (**Fig. 4**).

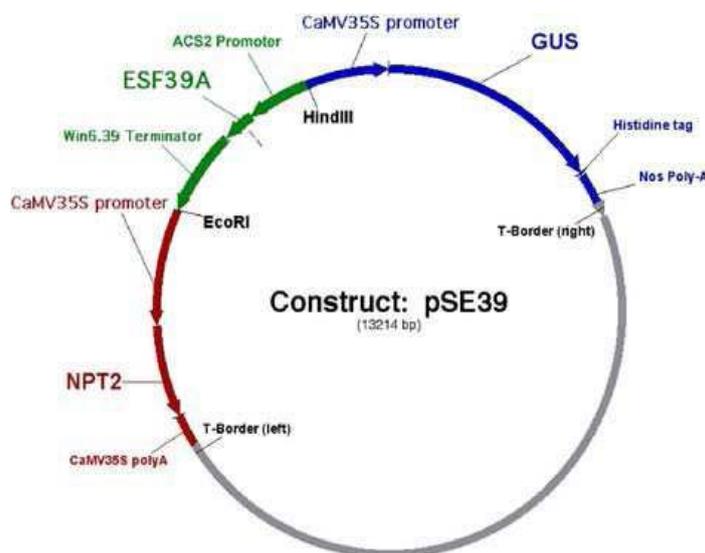


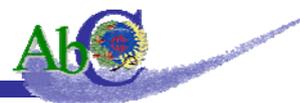
Figura 4. Construcción génica pSE39 (Newhouse et al., 2007). Consta del gen del péptido antimicrobiano ESF39 dirigido por el promotor ACS2 procedente del castaño americano, para que se exprese en el tejido vascular, de un gen de selección NPT2 y un gen testigo GUS (estos dos últimos dirigidos por el promotor del virus del mosaico del tabaco, CaMV35S).

Para evaluar la resistencia de los olmos transgénicos se realizó una inyección de conidios de *O. novo-ulmi*. Se midieron varios parámetros indicativos de la resistencia al hongo y de la capacidad de dispersión de éste en el olmo. Se consiguió obtener una línea transgénica que mostraba una resistencia significativa. Pese a estos resultados prometedores es necesario realizar más estudios en campo y en olmos adultos, una vez pasada la resistencia juvenil, para evaluar entonces la eficacia del compuesto.

Programas de mejora

Existe una serie de pasos básicos que se llevan a cabo habitualmente en los programas de mejora de resistencia a patógenos:

1. Conocimiento de la biología del patógeno, variación, virulencia y epidemiología.
2. Identificación de las fuentes de resistencia.
3. Conocimiento de la genética de la resistencia.
4. Desarrollo de métodos de inoculación rápida.
5. Escalas de identificación de la enfermedad que sean fácilmente aplicables.
6. Desarrollos de esquemas de selección.



7. Evaluación de las nuevas líneas resistentes.

Siguiendo estos pasos, desde que la grafiosis se detectó en 1921, se han ido desarrollando en diversos países programas de mejora genética, con el objetivo de conseguir olmos resistentes.

La estrategia general de estos programas es la inoculación del hongo en el tronco del olmo; tras 60 días se seleccionan los olmos que no presentan síntomas. Los olmos resistentes se cruzan entre sí para conseguir en unos pocos genotipos el mayor grado de caracteres de resistencia a la grafiosis, que den como resultado olmos resistentes. Basándose en los estudios realizados, se determina que aproximadamente solo un 2% de los árboles evaluados presentan resistencia; por tanto, se requiere desarrollar técnicas que permitan una selección precoz, como las técnicas de cultivo *in vitro*.

Técnicas de cultivo *in vitro* para ensayos de resistencia

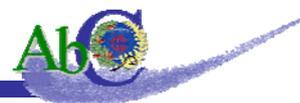
La utilización de técnicas de cultivo *in vitro* en los programas de mejora supone varias ventajas con respecto a los métodos clásicos:

1. Detección precoz de la resistencia, por lo que se podrían detectar en etapas tempranas los olmos resistentes.
2. Las necesidades de espacio son menores, lo que permite realizar la selección sin utilizar grandes extensiones de terreno.
3. Posibilidad de realizar los experimentos en cualquier época del año.
4. Mayor facilidad en la propagación del material, ya que es más sencillo propagar material juvenil que material adulto.

El futuro de los programas de selección de olmos resistentes a esta patología está ligado al desarrollo de los métodos de selección molecular, que han demostrado ser más eficientes en otras especies, como el eucalipto, pero que todavía no se han probado en olmos.

Propagación *in vitro*

Una vez llevada a cabo la selección, el siguiente aspecto importante es la propagación de los olmos resistentes. Se han desarrollado programas de micropropagación para varias especies de olmos como *U. campestris*, *U. americana*, *U. laevis*, *U. pumila*, *U. minor*, e incluso programas para híbridos. Algunas de las estrategias que se emplean son la embriogénesis somática a partir de sámaras inmaduras y a partir de hojas, la micropropagación a partir de segmentos nodales y, por último, también se han desarrollado protocolos eficientes para el aislamiento y cultivo de protoplastos a partir de hojas y callos.



Programa de mejora español

El objetivo de este programa es la selección de olmos resistentes a grafiosis mediante la inoculación del hongo en árboles de más de 4 años para comprobar su resistencia y cruzar los ejemplares que se muestren más resistentes.

La mejora se centra en *U. minor*, olmo más representativo y más afectado por la enfermedad en la península. Esta especie es muy susceptible a la enfermedad, por lo que se aconseja su hibridación con otra especie de resistencia mayor como *U. pumila*, que además de ser resistente a la grafiosis, tiene otras ventajas, como un rápido crecimiento juvenil, tolerancia a la sequía y una abundante producción de semilla fértil.

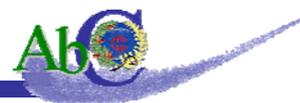
Dentro del programa de mejora español se han llevado a cabo numerosos estudios sobre la influencia de varios factores en la resistencia, como la frecuencia y la composición de las inoculaciones (Solla et al., 2001), la humedad del suelo, la edad de la planta y las dimensiones de los vasos del xilema (Elgersma et al., 1970). Gran parte de estos trabajos se han realizado estudiando una olmeda en Rivas-Vaciamadrid, que contiene unos 300 ejemplares de *U. minor* de unos 70 años de vida que han sobrevivido a la grafiosis en un área totalmente devastada por la enfermedad.

Conclusiones

La biotecnología es una herramienta muy útil para conseguir olmos resistentes a la grafiosis, ya que puede ayudar en diversas etapas, como la identificación de compuestos, mecanismos o incluso genes que confieran resistencia, o el desarrollo de sistemas de transformación de olmos modificados genéticamente. Así pues, se hace necesaria la creación de programas de investigación a través de los cuales avanzar hacia un control definitivo de la enfermedad, antes de que ésta nos deje con el poema de Machado como único recuerdo de la existencia del olmo.

Bibliografía

- Bowden, C.G., Hintz, W.E., Jeng, R., Hubbes, M., Horgen, P.A. 1994. Isolation and characterization of the cerato-ulmin toxin gene of the Dutch elm disease pathogen, *Ophiostoma ulmi*. *Curr. Genet.*, 25:323-329.
- Brasier, C.M. 1986. The d-factor in *Ceratocystis ulmi*: its biological characteristics and implications for Dutch elm disease. En "Fungal virology" (ed. K.W. Buck), pp. 177-208. CRC Press: Boca Ratón, Florida.
- Díez, J., Gil, L. 2002. Efecto de los filtrados de cultivos de *Ophiostoma novo-ulmi* Brasier sobre el crecimiento de callos de olmos con diferente susceptibilidad a la grafiosis. *Invest. Agr.: Sist. Recur. For.* 11:67-76.



- Domínguez, S. 2006. Los últimos olmos ibéricos. La lucha de una especie arbórea contra una terrible enfermedad. Exposiciones divulgativas. Obra Social Caja Madrid.
- Elgersma, D.M. 1970. Length and diameter of xylem vessels as factors in resistance of elms to *Ceratocystis ulmi*. Neth. J. Plant. Pathol. 76:179-182.
- Gartland, J.S., Brasier, C.M., Fenning, T.M., Birch R., Gartland, K.M.A. 2001. Ri plasmid mediated transformation and regeneration of *Ulmus procera* (English Elm). Plant Growth Reg. 33:123-129.
- Gilbert, B.M., Baker, J.E., Norris, D.M. 1967. Juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) from *Carya ovata*, a deterrent to feeding by *Scolytus multistriatus*. J. Insect Physiol. 13:1453-1459.
- Lam, B.S., Strobel, G.A., Harrison, L.A., Lam, S.T. 1987. Transposon mutagenesis and tagging of fluorescent *Pseudomonas*: antimycotic production is necessary for control of Dutch elm disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6447-6451.
- Martín García, J.A. 2006. Factores anatómicos y químicos del xilema de *Ulmus minor* Mill. relacionados con la resistencia a *Ophiostoma novo ulmi* Brasier. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid.
- Martín García, J.A., Solla, A., Gil Sánchez, L. y García Vallejo, M.C. 2008. Carvacrol y ácido salicílico incrementan la resistencia de *Ulmus minor* frente a *Ophiostoma novo-ulmi*. Cuad. Soc. Esp. Cienc. For. 26: 103-108
- Pajares, J.A. 2004. Elm breeding for resistance against bark beetles. Invest. Agrar.: Sist. Recur. For. 13:207-215.
- Solla, A., Gil, L. 2001. Selección de olmos resistentes a la grafiosis. I. Influencia de la composición del inóculo infectivo. Bol. San. Veg. Plagas. 27:355-362.
- Scheffer, R.J., Voeten, J.G.W.F., Guries, R.P. 2008. Biological control of Dutch Elm Disease. Plant Dis. 92:192-200.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAA18912.1?report=fasta&logS=seqview> (marzo 2011)
- <http://www.forestbiotech.org> (marzo 2011)
- <http://www.elmpost.org> (marzo 2011)
- <http://www.dutchelmdisease.org> (marzo 2011)