

PROGRAMA DE MEJORA GENÉTICA DEL GÉNERO *ULMUS*

M. E. García-Nieto*, L. Gil*, Y. Menéndez*, & S. Iglesias**

*Unidad Docente de Fisiología, Anatomía y Genética Forestal. Departamento de Silvopascicultura. ETSI Montes. MADRID.

** Servicio de Material Genético. DGCONA. MADRID

RESUMEN

El Banco clonal de *Ulmus* existente en el CMGF Puerta de Hierro incluye 425 olmos que representan a 166 ortets españoles, 15 franceses y 7 holandeses. Este banco es una de las actividades realizadas dentro del programa de Mejora genética del Género *Ulmus*. En el presente trabajo se describen las principales actuaciones realizadas dentro de este programa.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de los olmos, causada por el hongo vascular *Ophiostoma ulmi* (Buism.) Nanf., fue reconocida por primera vez en España a comienzos de los años treinta por el patólogo forestal Benito Martínez, al detectar su presencia en los olmos de una población cercana a Madrid. El fue también quien acuñó el término "GRAFIOSIS" para denominarla y estableció las pautas del comportamiento epidemiológico (MARTÍNEZ, 1932).

Para disminuir sus efectos se pueden aplicar métodos de control curativos y preventivos, aunque ya desde 1945 el propio Martínez propuso como más eficaces y duraderos la selección de especies resistentes y el desarrollo de programas de mejora del hospedante. Estos últimos ya habían comenzado a ponerse en práctica en Holanda, llevando consigo la obtención de individuos resistentes a dicho patógeno.

En la década de los setenta sobrevino en Europa otra epidemia de mayor virulencia, ocasionada por un nuevo tipo de hongo, *Ophiostoma novo-ulmi* Brasier, más agresivo y mortal, invalidando casi por completo los programas de mejora que se llevaban a cabo con los olmos que habían resistido el ataque de la epidemia anterior.

Las poblaciones de olmo españolas sufren esta nueva fase epidémica entre 1978-1981 (CADAHIA, 1983). Es a partir de entonces cuando se comienza a detectar la mortandad de grandes olmedas del centro peninsular y la desaparición de infinidad de olmos centenarios que adornaban plazas, parques y jardines de numerosos pueblos y ciudades de las mesetas castellanas.

Ante los daños ocasionados, el desaparecido Instituto Nacional para la Conservación de la Naturaleza (ICONA) promovió en 1986 un proyecto para el control de la grafiosis mediante la mejora genética del olmo, que se desarrolla conjuntamente entre el Servicio de Material Genético de dicho Organismo y el Departamento de Silvopascicultura de la ETS de Ingenieros de Montes.

El objetivo primordial del proyecto es conservar la mayor variabilidad de olmos nativos y obtener individuos resistentes. Es importante tener en cuenta que la mejora debe estar circunscrita a un medio y país

determinado, para así evitar posibles fracasos que se producen al trasladar germoplasma de un lugar a otro.

Paralelamente a la conservación del recurso genético, la mejora frente a un carácter debe ir acompañada con el mantenimiento, o incluso mejora, de otros rasgos, que dependerán de la finalidad del material mejorado. Actualmente en nuestro país los olmos se demandan casi en exclusiva como ejemplares ornamentales; por tanto habrá que transmitir resistencia a individuos nativos de mayor valor estético.

Por otro lado, entre la población de olmos existente, tanto en masas como aislados, cabe esperar la presencia de ejemplares que conjuguen ambas características, de resistencia y ornamentales. Esta posibilidad no se descarta por las siguientes razones:

1. Fue un olmo de procedencia española el que originó uno de los primeros cultivares ("Christine Buisman") resistentes al hongo *Ophiostoma ulmi*.
2. El aniquilamiento de una olmeda por la grafiosis no se puede interpretar como la ausencia de ejemplares resistentes: la actuación simultánea del hongo y del vector transmisor (escolítidos) puede provocar la muerte de olmos resistentes, como consecuencia del ataque masivo de estos coleópteros.
3. La introducción en España del olmo siberiano (*U. pumila*) resistente a la grafiosis, es antigua, al menos desde finales del siglo XVIII, por lo que su presencia ha originado un enorme número de híbridos, por hibridación natural con las formas nativas, y cuya aclimatación está totalmente comprobada, al haberse difundido masivamente en plantaciones urbanas.
4. La variabilidad morfológica del olmo en España es muy superior a la que presentan otros países. Existen muchos híbridos naturales, de las distintas categorías intraespecíficas, que surgieron espontáneamente o como productos de la selección y cruzamiento que efectuaron los viveristas para su uso en jardinería.

5. La distribución aislada, y con reducido número de ejemplares, de las olmedas actuales dificulta la progresión de la enfermedad, permitiendo que exista variabilidad de unas a otras.

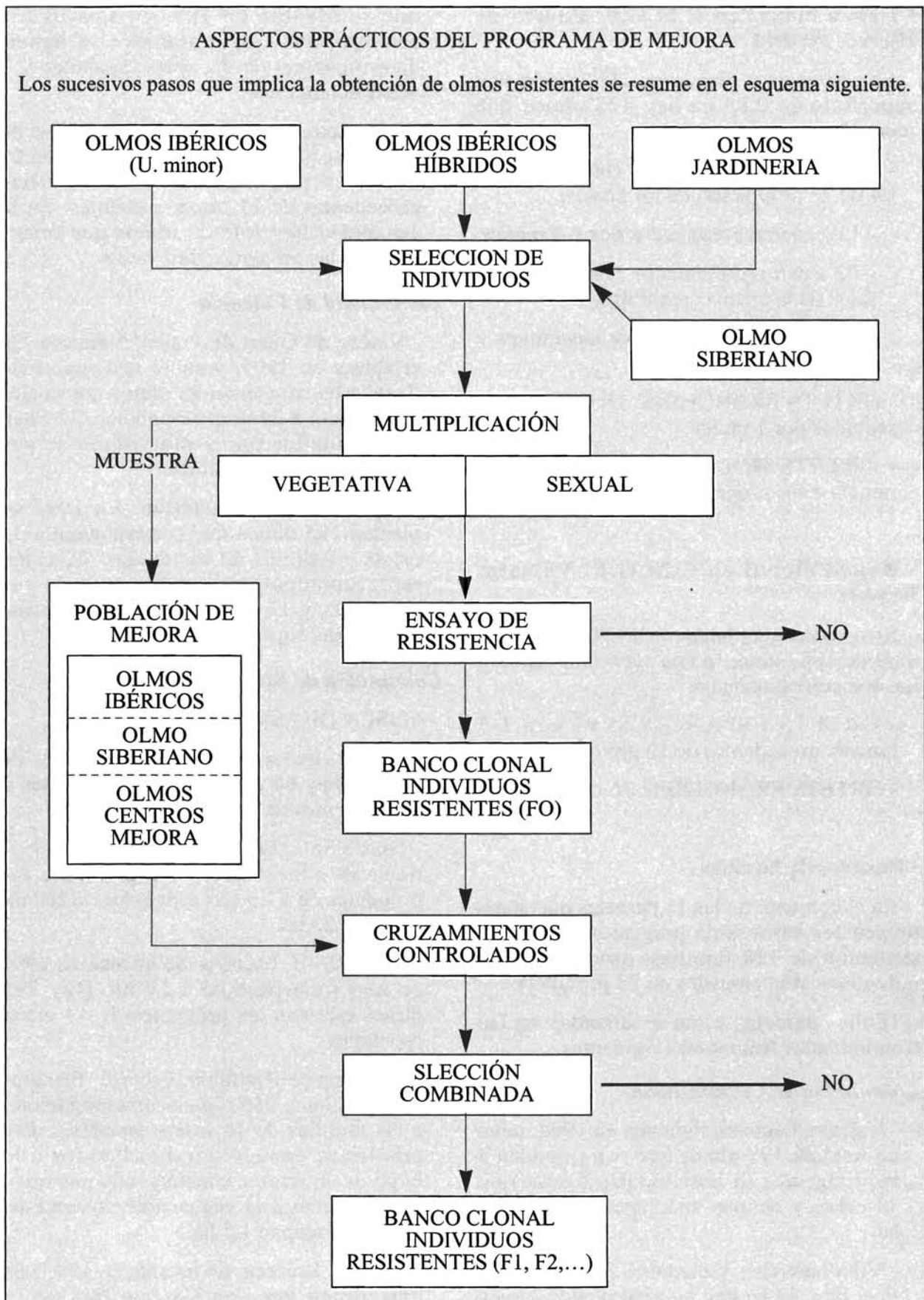
2. SELECCIÓN

La selección de individuos, y recogida de material para posteriormente multiplicarlo, se viene realizando de manera sistemática y continua desde 1990. La selección se centra en árboles nativos, que se encuentran en rodales con escasa afección y en masas donde no hubiera ejemplares enfermos. También se han seleccionado ejemplares aislados que destacaran por otros valores.

Asímismo se ha procedido a la selección de olmos en zonas urbanas, especialmente de la ciudad de Madrid, donde se encuentran infinidad de ejemplares con gran valor ornamental, de orígenes muy diversos. También en estos lugares se encuentran con frecuencia híbridos entre la especie siberiana, *U. pumila*, y la autóctona, *U. minor*, algunos de los cuales pueden presentar una acumulación de resistencia superior a la media, manteniendo los caracteres del progenitor autóctono.

El disponer de una amplia base genética disminuye la probabilidad de aparición de factores indeseables en las generaciones futuras y aumenta la probabilidad de acumular genes de resistencia, que permitirá combinarlos para lograr niveles superiores de la misma. La diversidad también disminuye la probabilidad de que mutaciones del patógeno, o posibles nuevas variantes del mismo, superen la resistencia adquirida por el hospedante.

Con los individuos seleccionados en nuestra geografía se fue estableciendo una Población de Mejora, que hoy está constituida por: dos Bancos Clonales, situados en los CMGF de Puerta de Hierro (Madrid) y Valsaín (Segovia), y 12 Ensayos de Familias, que se localizan: 7 en las islas Baleares, 3 en la Comunidad de Castilla-León y 2 en la Comunidad de Valencia.



• **Banco clonal en C.M.G.F. Puerta de Hierro, Madrid**

Se comienza a plantar en 1992, y en una superficie de 0,83 ha hay 425 olmos que representan a:

- ORTETS ESPAÑOLES: 166, procedentes de 23 provincias, de los cuales:
 - 122 están representados por 1-4 ramets
 - 42 están representados por 1-4 individuos de la misma semifratria
 - 2 están representados por sus ramets y sus progenies
- ORTETS FRANCESES: 15 todos representados por 1 ramet.
- ORTETS HOLANDESES: 7 con 2-4 ramets o sus progenies

• **Banco clonal en C.M.G.F. Valsaín, Segovia**

Se comienza a plantar en 1994 y posee un total de 185 olmos en una superficie de 0,46 ha, que corresponden a:

- ORTETS ESPAÑOLES: 91 con 1-3 ramets, procedentes de 19 provincias
- ORTETS FRANCESES: 16 con 1 ramet.

• **Ensayos de familias**

En el conjunto de las 11 parcelas que constituyen los ensayos de progenies hay representación de 118 familias, procedentes de individuos seleccionados en 25 provincias.

Dichas parcelas están localizadas en las Comunidades Autónomas siguientes:

Comunidad de Castilla-León

- Valsaín, Segovia. Plantada en 1994, tiene un total de 198 olmos que corresponden a las progenies (6 individuos/progenie) de 33 ortets y ocupan una superficie de 0,45 ha.
- Villamarciel-I, Valladolid. En una superficie de 1,72 ha hay un total de 445 olmos

que se plantan en 1994-5. Los olmos corresponden a las progenies (1-8 individuos/progenie) de 65 ortets españoles y 7 ortets holandeses.

- La Yutera, Palencia. En una superficie de 0,26 ha se plantaron en 1995 un total de 88 olmos correspondientes a las familias procedentes de 11 ortets españoles. En la actualidad hay sólo 22 olmos que representan a las progenies de 7 ortets.

Comunidad de Valencia

- Vivero de Quart de Poblet, Valencia. Se establece en 1995, y sobre una superficie de 0,24 ha se plantan 96 olmos, los cuales representan a 24 ortets españoles: 22 están representados por 4 individuos de sus progenies y 2 por 4 ramets.

- Mas de Ascle, Castellón. En 1995 se plantan 103 olmos que corresponden a 35 ortets españoles de los cuales: 22 están representados por 4 individuos de sus progenies y 13 por 1-3 ramets. En total supone una superficie de 0,31 ha.

Comunidad de Baleares

a) ISLA DE MALLORCA

- Manut, Escorca. Plantada en 1993, en 540 m² hay 60 olmos que corresponden a las progenies de 17 ortets españoles.

- Binifaldó-I, Escorca. Plantada en 1993, tiene 58 olmos, que corresponden a las progenies de 17 ortets españoles, distribuidos en 0,23 ha.

- Binifaldó-II, Escorca. Se levanta en 1995 en una superficie de 1,27 ha. Hay 291 olmos que son las progenies de 43 ortets españoles.

- Sa Coma de Binifaldó, Escorca. Plantada en 1995, tiene 356 olmos correspondientes a las familias de 18 ortets españoles. Los árboles se encuentran distribuidos a lo largo de un arroyo, constituyendo una repoblación junto a la vegetación existente de la zona y ocupan 1,5 ha.

- Mortitx, Escorca. Se levanta en 1995 con 350 olmos que son las familias de 18

ortets españoles, abarcando una superficie aproximada de 0,57 ha.

- Tossals Verds, Escorca. Se planta en 1995 con 243 olmos que corresponden a las familias de 18 ortets españoles. Supone una superficie aproximada de 0,35 ha.

b) ISLA DE MENORCA

- San Isidre, Mahón. Se establece en 1995 con 1086 olmos que corresponden a las progenies de 18 ortets españoles. En la actualidad quedan 998 ejemplares.

Asimismo, la Población de Mejora se ha incrementado con genotipos procedentes de otros Centros de Mejora. Se tiene representación de 23 clones resistentes a la grafiosis obtenidos en Wageningen (Holanda), de un ensayo de 11 procedencias de olmo siberiano recolectadas en China y 110 ortets seleccionados y propagados en el CEMAGREF, Francia.

Los 23 clones holandeses resistentes se incorporaron en 1989 y en este mismo año se distribuyen en tres Parcelas de Adaptabilidad, con 12 ramets por clon, situadas en: los Centros de Mejora Forestal de El Serranillo (Guadalajara) y La Almoraima (Cádiz), y en el Vivero Municipal de Migascalientes (Madrid).

Las 11 procedencias de *U. pumila* fueron recogidas en ocho provincias chinas y reúnen a 628 olmos obtenidos en 1988 y plantados en 1989 en una parcela localizada en La Almoraima.

Los 110 clones franceses llegaron en el verano de 1995 y en Febrero de 1996 se llevaron a plantaciones. Todos ellos están representados por una única réplica y se distribuyen: 16 en los Bancos Clonales y 94 en una parcela de 0,32ha en el término de Villamarciel, Vallodolid.

3. MULTIPLICACIÓN

Los individuos que se desean mejorar, así como posteriormente los genotipos obtenidos, son reproducidos para su empleo en las distintas fases del Programa. Desde su inicio

se han puesto a punto y perfeccionado los diversos métodos de propagación del material que se recolecta.

La multiplicación se ha llevado a cabo mediante:

A.- técnicas de propagación vegetativa por medio de estaquillas e injertos, que permiten transmitir toda la información genética y por tanto todas las características que motivan su selección

B.- reproducción sexual a través de las semillas, para generar variabilidad y disponer de individuos con nuevas combinaciones. Estos últimos se consiguen a través de cruces controlados entre parentales escogidos, según criterios de resistencia a la enfermedad o/y del valor estético, o de conservación de recursos.

A) Programación vegetativa

La propagación asexual se requiere para:

- conseguir el mayor número posible de ejemplares pertenecientes a un genotipo dado, de forma que se establezcan los bancos clonales y las parcelas en las que se realizan las pruebas de patogenicidad,

- conseguir a gran escala los clones que se obtengan como producto final en el Programa de Mejora.

Los métodos ensayados han sido el estaquillado, tanto de muletillas de raíz como de esquejes, y el injerto, de yema a "ojo dormido".

Estaquillado

El estaquillado es un método de fácil ejecución con el que se obtienen rápidos resultados. No obstante, exige dejar raíces al descubierto, lo que presenta dificultades en zonas ajardinadas, y en ocasiones no permite una identificación correcta del material que se extrae con el genotipo seleccionado. Por otro lado, los resultados son muy dispares entre los distintos genotipos probados.

La propagación por muletillas de raíz se realiza a finales del invierno, desde los últi-

mos días del mes de enero hasta finales de febrero, antes de que se inicie el brote de los árboles. Desde 1990 hasta 1996, se han multiplicado por este método 135 individuos y sólo se han conseguido copias de 105, aunque con porcentajes de enraizamiento muy distintos que han dependido principalmente de la edad de los individuos. El 80% de los olmos escogidos eran adultos, con lo que el porcentaje medio de éxito ha sido de aproximadamente un 25%. Este bajo porcentaje ha dificultado la obtención de un número adecuado de copias por individuo, y por tanto no se tiene representación de todos los genotipos seleccionados en las parcelas de inoculación. Sin embargo, el reestaquillado de los ramets situados en el banco clonal, con edades comprendidas entre 3-4 años, arroja un porcentaje medio de éxito de un 75%.

En cuanto al estaquillado de esquejes, éste tiene lugar en dos épocas del año:

- en el mes de enero, sobre una cama caliente y a temperatura ambiente
- en los meses de junio-julio en invernadero, donde se procuró mantener una temperatura ambiente no superior a los 30 °C y una humedad de aproximadamente el 80% mediante un sistema de niebla.

Los esquejes se recogen de las partes medias-bajas de las copas de los árboles y se preparan a partir de los brotes de uno-dos años lignificados, cuando se estaquilla en la primera fecha, y de brotes del año con la base lignificada, cuando se procede en verano.

Esta metodología se comienza a aplicar a partir de 1994, en el caso del enraizamiento de esquejes en verano, y en 1996, para esquejes en invierno.

En total se han multiplicado por estacas aéreas 54 individuos, de los cuales 16 tanto en verano como en invierno y 38 sólo en verano. El éxito de enraizamiento es considerablemente mayor que con muletilas de raíz, siendo el porcentaje medio en torno al 50%, en verano, y al 60%, en invierno.

Injerto

El injerto es un método muy difundido para la propagación de los olmos, puesto que conlleva mejores resultados aunque entraña técnicas de ejecución más laboriosas. Sin embargo, solo se ha utilizado cuando los individuos seleccionados no se han reproducido con facilidad por medio del estaquillado.

El injerto tiene no obstante ciertas ventajas, como mantener el estado de desarrollo del individuo que se propaga, para así obtener más tempranamente su madurez sexual. Asimismo, se pueden elegir los patrones más adaptados a las condiciones edáficas donde van a ser plantados.

Sin embargo, con el injerto se producen en muchas ocasiones variabilidad entre los ramets de un mismo clon, y puede ocurrir un efecto del patrón sobre el material injertado (TCHERNOFF, 1963). Además se pueden presentar fenómenos de incompatibilidad a largo plazo, que surgen de la interacción de genotipos de distintas especies (HEYBROEK, 1979) o, incluso, de una misma especie (MITTEMPERGER, 1991).

La técnica de injerto utilizada prioritariamente ha sido la de yema a "ojo dormido". Este tipo de injerto se ha realizado en verano, durante la segunda quincena del mes de Julio. Para su realización se requiere que los árboles a injertar desarrollen brotes del año con un grosor similar al de los patrones, que debe ser aproximado a 0,5-1 cm. La falta de adecuación entre los tamaños de la yema y el patrón ha sido causa del fracaso de muchos injertos.

Se han injertado 94 individuos, con un porcentaje medio de éxito del 50%.

B) Reproducción sexual

La reproducción conlleva tanto la siembra de sámaras obtenidas en los árboles seleccionados, originadas por polinización abierta, o en los cruces controlados que se realizan entre ellos.

Con las sámaras se procede a la determinación del porcentaje de vanas y posteriormente al de su germinación. El primero arroja

valores muy elevados, entre un 80-100%, para los frutos de individuos pertenecientes a la especie *U. minor*, siendo menor, en torno al 40-50%, para los originados en ejemplares correspondientes a *U. pumila* y los híbridos entre ambas.

En cuanto a la germinación de sámaras embrionadas, realizada en laboratorio, independientemente de la especie, presentan muy buenos porcentajes, que oscilan entre un 90-100%.

Se han recogido sámaras obtenidas por polinización abierta de 220 individuos, pero sólo se han podido obtener descendencias de 118, puesto que en 102 fueron vanas en su totalidad.

Los cruces controlados se realizan entre ejemplares del Banco Clonal, clones holandeses resistentes y ejemplares de *U. pumila* seleccionados en jardines de la ciudad de Madrid.

Los olmos poseen flores hermafroditas, pero no se procede a la emasculación de los estambres en las flores de los árboles madres. Aunque en general la mayoría de los olmos presentan una autoesterilidad de moderada a elevada, las plantas obtenidas de autocruces son proporcionalmente más débiles y la mayoría mueren cuando alcanzan el desarrollo de las primeras hojas.

Sin embargo, el hermafroditismo implica que hay que recoger el polen con anterioridad a la dehiscencia de las yemas florales de los progenitores femeninos. El polen se obtiene de varas florales recogidas de los árboles que van a actuar como padres, las cuales se cortan diez días antes de que se produzca la apertura de las yemas. Estas ramas se mantienen en agua en recipientes aislados, colocados en una habitación con una temperatura constante de 25 °C.

Una vez que se produce la total anthesis de las anteras, el polen que se recoge, se filtra y se conserva a 4 °C en el interior de un desecador, hasta que están abiertas las yemas florales de las madres.

Las hibridaciones artificiales se iniciaron en 1992. En este primer año se realizaron en

el interior de un recinto cerrado en el que se mantenía una temperatura en torno a los 20 °C. De los parentales femeninos se cortaban varas con yemas florales que se conservaban en agua y se aislaban entre sí colocándolas en habitáculos separados. Las flores fueron polinizadas con pinceles impregnados de polen. El número de sámaras conseguidas fue muy reducido además de obtenerse sólo en 2 de los 16 cruces efectuados. El rápido agotamiento de las varas junto a la dificultad de mantener la temperatura constante del recinto, motivaron que las hibridaciones se llevaran a cabo, a partir del año 1993, sobre árboles en el campo.

Para aislar las flores de los árboles que actúan como genitores femeninos se utilizan bolsas de tela. El polen se introdujo con una jeringuilla modificada, cambiando el émbolo por una perilla de aire.

Se han realizado un total de 72 cruces en el campo; sin embargo se han obtenido sámaras sólo en 50 de ellos. En cuanto a las descendencias, se consiguieron sólo en 32 de ellos, puesto que en el resto las sámaras producidas fueron vanas en un 100%.

4. PRUEBAS DE RESISTENCIA

Las réplicas y las familias obtenidas en la multiplicación de los genotipos seleccionados se disponen en plantaciones para probar su resistencia, mediante la inoculación artificial del hongo.

El poder introducir el agente patógeno en los árboles permite evaluar el grado de resistencia que poseen los individuos seleccionados y de los que se vayan obteniendo a través del Programa.

La enfermedad, al estar provocada por un hongo vascular, se desarrolla en el interior de los vasos del xilema del árbol, y a favor del flujo de savia se difunde por todo el interior.

Para testar el material se han establecido hasta la fecha 6 parcelas de inoculación: 4 en el CMGF de Puerta de Hierro (Madrid) y 2 en el CMGF de El Serranillo (Guadalajara).

En ellas hay 2.839 olmos que corresponden a 127 ortets, 52 de los cuales están representados por ramets y 75 por familias.

Las inoculaciones se llevan a cabo introduciendo el hongo en su fase de levadura, en una concentración mínima de 10^3 esporas por mililitro. Ello se consigue cultivando pequeñas porciones de micelio, obtenidos primero en agar-malta, en un medio nutritivo líquido, que se mantiene a 25 °C y en agitación durante tres días.

El mecanismo de infección es mediante la inyección con jeringuilla de unas gotas de este medio, aproximadamente 0,25-0,30 ml, en cortes efectuados en la base de los troncos de los árboles, asegurándose de que se penetra hasta el cambium.

Para provocar el mayor grado de respuesta a la infección por el patógeno, las inoculaciones se realizan con una mezcla de distintos micelios, y a ser posible de los dos tipos del hongo, que presenten distintas tasas de crecimiento.

Entre los años 1993, 1994 y 1996 se han testado 33 clones y 9 genotipos a través de sus descendientes, con resultados preliminares esperanzadores: nueve clones y las progenies de tres individuos han demostrado presentar una baja susceptibilidad.

La fiabilidad de estas pruebas de resistencia requiere, no obstante, que los ejemplares posean una edad avanzada, ya que los olmos en sus primeros años presentan unos vasos conductores de pequeño diámetro, por lo que no son afectados por la enfermedad o lo son en escaso grado. Es necesario que los individuos hasta ahora testados alcancen mayor tamaño y desarrollo, puesto que han sido inoculados cuando poseían una edad comprendida entre los 3-5 años.

Asímismo, se requiere que los ejemplares se vuelvan a testar en diversos años, para,

por un lado evitar el efecto escape, y, por otro evaluar la resistencia adquirida y establecer los niveles de resistencia que se desea alcanzar.

Por último comentar, que la caracterización hídrica de 20 genotipos del Banco Clonal por la medición de ciertos parámetros, como potencial hídrico, transpiración foliar y conductancia estomática, ha abierto una nueva línea de trabajo, conducente a seleccionar individuos resistentes. Se ha encontrado una cierta relación entre la resistencia a la sequía y a la enfermedad, lo cual posibilitaría evaluar la resistencia de los árboles a través de estos parámetros hídricos. Aunque la inoculación directa del hongo en los ejemplares no se podría en ningún caso obviar, la respuesta a estos parámetros puede permitir que el número de genotipos a testar se reduzca considerablemente.

BIBLIOGRAFÍA

- CADAHIA, D.; 1983. "Nuevos problemas fitosanitarios". *Boletín del Servicio de Plagas* 9:275-285.
- HEYBROEK, H.; 1979. "Mini-Monograph on elms in agroforestry". *Technical Consultation on Fast-Growing Plantation Broadleaved Trees for Mediterranean and Temperate Zones*, FAO, Junio 1979. 18pp.
- MARTÍNEZ, B.; 1932. "La grafiosis del olmo". *Montes e Industrias*, 19: 499-503.
- MITTEMPERGER, L.; 1991. "Aspects of elm propagation by soft and hard cuttings". *Suelo y Planta* 2(1): 129-137.
- TCHERNOFF, V., 1963. "Vegetative propagation of elms by means of shoots cut from callused roots". *Acta Botanica Neerlandica* 12: 40-50.