

LA GRAFIOSIS DEL OLMO EN ESPAÑA



INSTITUTO FORESTAL DE INVESTIGACIONES Y EXPERIENCIAS
LA MONCLOA, MADRID (8)

1936

Nº IX

NÚM. 15.

9472
R. J. J. J.

SECCION DE ESTUDIOS

P For 1.3.10



FILE 2

AÑO IX

NÚM. 15.

R. 67396

CONTIENE:

- I. — LA GRAFIOSIS DEL OLMO EN GENERAL**
- II. — LA EXISTENCIA DE LA CERATOSTOMELLA (GRAPHIUM)
ULMI (SCHWARZ) BUISMAN EN ESPAÑA, ESTÁ, AL FIN,
PLENAMENTE DEMOSTRADA**

LA GRAFIOSIS DEL OLMO EN GENERAL

La enfermedad del olmo causada por el *Graphium ulmi* Schw. es la más grave de todas sus enfermedades. Ataca principalmente al *Ulmus campestris* Smith, que es la especie de olmo dominante en nuestra Península. El *Ulmus montana* Smith, que es el otro olmo citado en España, es también víctima de ella, pero, en este caso, los daños no tienen importancia, por ser esta especie muy escasa y rara en nuestro país. Esta enfermedad es conocida con los nombres de *Jepenziekte*, en holandés; *Ulmensterben*, *hollandische Ulmenkrankheit*, en alemán; *dutch elm disease*, *die-back of elms*, *dying-off of elms*, en inglés; *moria degli olmi*, en italiano, y *maladie des Ormes*, en francés; en español, proponemos llamarla GRAFIOSIS DEL OLMO (*), mejor que *enfermedad holandesa de los olmos*, porque aun cuando se señaló por primera vez en Holanda, no se sabe todavía con certeza la patria del *Graphium ulmi* Schw. Es posible que este hongo sea oriundo de Asia. Algunos creen que de Norteamérica; sin embargo, esto no nos parece probable, pues a pesar de ser el olmo americano (*Ulmus americana* L.) muy propenso a esta enfermedad, según se ha comprobado por inoculaciones artificiales en Inglaterra, Norteamérica y Alemania, hasta ahora apenas se encontraron en Norteamérica olmos atacados de *Graphium ulmi*.

(*) Pudiera también llamarse *traqueografiosis*; sin embargo, en obsequio a la brevedad, preferimos denominarla *grafiosis*.

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA MUNDIAL

Esta enfermedad fué encontrada por primera vez en el Sur de Holanda, en septiembre de 1919, extendiéndose rápidamente por todo el país y pasando después a Bélgica, Francia y Oeste de Alemania. En el año 1926 Schimitschek comprobó su presencia en Austria. En la Gran Bretaña el primer caso fué señalado en 1927, y actualmente la enfermedad predomina en la parte Sur de la Isla. Está citada también en Suiza, con un clima frío, y en el centro de Italia, con un clima cálido. En 1930 la observaron en Norteamérica la holandesa Christine Buisman y el forestal norteamericano G. F. Gravatt (5). Ultimamente se confirmó la existencia de esta enfermedad en Checoslovaquia, Yugoslavia, Hungría, Bulgaria, Rumania y Portugal (3).

SINTOMATOLOGÍA

Caracteres externos. — Los caracteres externos, que son siempre secundarios, varían, según que se trate de la forma crónica o de la forma aguda.

En la *forma crónica*, que es la observada hasta ahora con más frecuencia, el follaje se va haciendo cada vez más ralo. Las hojas no llegan a alcanzar su tamaño normal. Se marchitan, amarillean y secan, cayendo prematuramente. A veces, se observa que, las puntas de las ramillas secas se encorvan hacia abajo, a modo de gancho.

En la *forma aguda* sucede lo siguiente: En algunos árboles, de aspecto vigoroso y follaje normal, se observa de repente un fuerte arrollamiento o marchitez de las hojas de una parte de la copa, o, más rara vez, de toda ella a un tiempo. Este fenómeno puede ser tan rápido que las hojas arrolladas o marchitas queden — durante bastante tiempo — en las ramas y ramillas, sin que tenga lugar la defoliación. Estas hojas, unas veces conservan su color

verde y otras se ponen pardas, contrastando, en este caso, con el color verde de las demás hojas del árbol.

Caracteres internos. — Los caracteres internos, que tienen un carácter primario, son muy fáciles de reconocer.

Si se descorteza el tronco, o una rama — y a veces hasta una raíz —, y se quita después cuidadosamente el liber, se ven a simple vista, en la superficie de la albura que ha quedado al descubierto, estrías longitudinales negruzcas hasta de un centímetro de largo, que siguen aproximadamente la dirección del eje longitudinal. Si el ataque es débil, estas estrías están separadas entre sí; pero si es fuerte, se unen, formando una red compacta dentro del último anillo anual.

En la sección longitudinal-axial aparecen también estas estrías oscuras, en dirección paralela al eje. Si la enfermedad está muy avanzada, se ven las estrías hasta en los anillos anuales más antiguos.

En la sección transversal se observa, a simple vista, en las últimas capas de la albura, una zona anular oscura, que no forma un anillo continuo, sino que está constituida por pequeños puntos negruzcos. La infección puede alcanzar en un año a varios anillos. Esto sucede probablemente a través de los rayos medulares que los unen, que, en algunos casos, aparecen también ennegrecidos. Tanto las estrías longitudinales, de que antes hablamos, como las coloraciones negruzcas de la sección transversal, se ponen más de manifiesto humedeciendo con agua las superficies observadas. Cuando el ataque es muy intenso, se ven a veces cavidades, hasta de varios milímetros de extensión, debidas a la destrucción de los vasos.

El corazón oscuro que suele verse en las ramas y en el tronco de algunos olmos, no tiene nada que ver con esta enfermedad, sino al contrario, es una característica normal de muchas especies de olmo.

ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA PATOLÓGICAS

Examinadas al microscopio las secciones transversales, se observa que los grandes vasos areolares, de la zona ennegrecida de la albura, están más o menos obstruidos por tyllos, nunca presentes en la madera sana. Estos vasos tienen sus paredes oscurecidas, debido a la oxidación de sus componentes y a la presencia de las llamadas gomas de madera. En algunos vasos se ven, además de los tyllos, unas masas esferiformes, que tienen todas las características de los esclerocios. Las estrías negruzcas, de que hicimos mención al tratar de los caracteres internos, representan las secciones longitudinales de los vasos llenos de tyllos. En las secciones transversales no se observa apenas micelio; en cambio, se le ve, con más frecuencia, en las secciones longitudinales de las ramas recién atacadas. En los estados avanzados de la enfermedad, el micelio desaparece por completo. (Véase figura 1.)

Cuando el ataque es muy intenso, todo el sistema leñoso está alterado, desde el cuello de la raíz hasta las últimas ramillas. Esto explica la muerte repentina de los árboles, porque la vida se mantiene, en tanto que algunos vasos funcionen y el agua pueda circular. Cuando todos los vasos están obstruidos, el agua cesa de repente de circular y las hojas se secan, sin ponerse amarillas.

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

En el estado actual de nuestros conocimientos no es posible determinar por un examen exterior, si un olmo está atacado, o no, de grafiosis. No bastan tampoco, para hacer un diagnóstico positivo, los caracteres externos unidos a los caracteres internos, puesto que hay otro hongo, que produce síntomas análogos. Solamente estudiando microscópicamente la anatomía patológica de los tejidos (véanse figuras 1 y 2) o haciendo cultivos (véanse figuras 3 y 4), se puede distinguir con certeza la *grafiosis* causada por el *Gra-*

Fig. 1

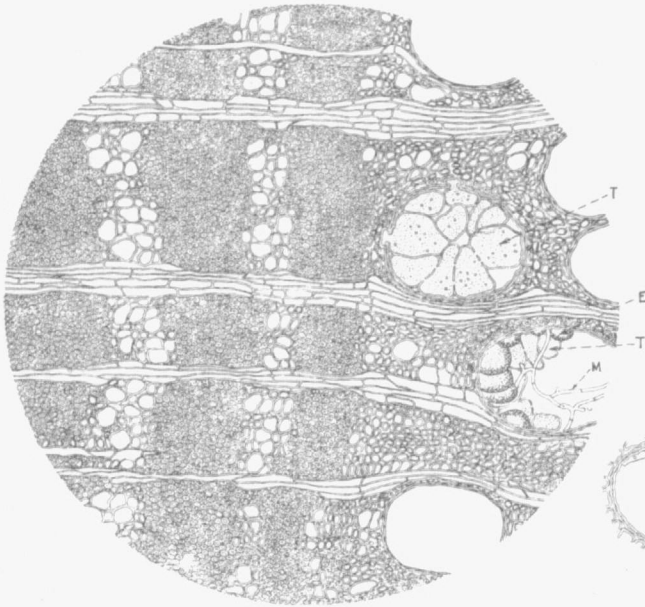


Fig. 1. — Sección transversal de una rama de *Ulmus campestris* Smith., atacada de *Graphium ulmi*.

T, Tyllos obstruyendo un vaso. E, Esclerocios, y M, Micelio del *Graphium ulmi* Schw.

Fig. 2



Fig. 2. — Un vaso con hifas de *Verticillium albo-atrum*. Rke. et Berth.

Fig. 3

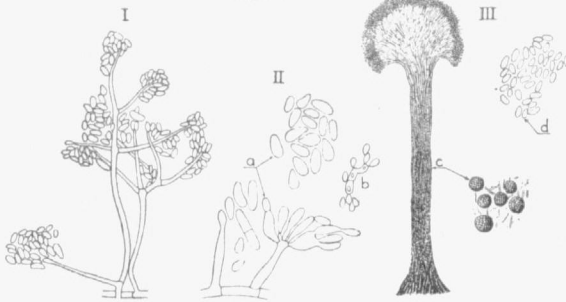


Fig. 3. — *Graphium ulmi* Schwarz.

I. Facies de *Cephalosporium*. Conidióforos y pseudocapitulos.

II. Facies de *Pionnotes*. a, Conidios y conidióforos. b, Germinación sacaromiciforme de un conidio.

III. Facies de *synnema*. c, Coremio y esclerocios. d, Conidios.

Fig. 4



Fig. 4. — *Verticillium albo-atrum* Rke et Berth.

phium ulmi Schw., de la *verticilliosis* producida por el *Verticillium albo-atrum* Rke. et Berth., que origina la muerte de gran número de árboles y arbustos.

Histológicamente, la *verticilliosis* se distingue de la *grafiosis* porque el *Verticillium albo-atrum* Rke. et Berth. produce menos tyllos y gomas que el *Graphium ulmi* Schw., y por esto la coloración negruzca de la albura es menos intensa en el primer caso. Las hifas encontradas en la madera atacada de *Graphium* son menos refringentes y más delgadas que las que se ven en la madera atacada por el *Verticillium*.

En la *verticilliosis*, la enfermedad empieza en las raíces y va hacia arriba; en cambio, en la *grafiosis*, nunca se observó que, la infección tuviese lugar a través de una raíz.

ETIOLOGÍA

Modernamente se admite, por todos los fitopatólogos, como causa de esta enfermedad, un hifal, del grupo de los estilbáceos, llamado *Graphium ulmi* Schw., descubierto en 1922 por la doctora holandesa Marie Beatrice Schwarz en Baarn (Holanda). Es de notar el hecho, que, de material de procedencia holandesa, inglesa y austríaca se ha aislado siempre el mismo *Graphium*, con una regularidad sorprendente. Además se ha logrado reproducir por inoculaciones artificiales en olmos sanos, todos los caracteres externos e internos de la enfermedad.

Las especies de *Graphium ulmi* Schwarz constan de dos grupos diferentes sexualmente (estirpes + y estirpes —). Cultivando ambos sexos simultáneamente sobre ramas de olmo esterilizadas, logró Buisman (2) obtener peritecas que pertenecen al género *Ceratostomella*.

La *Ceratostomella ulmi* Buisman se caracteriza así: Peritecas negras, esféricas, de 105-135 μ de diámetro, rara vez glabras, con más frecuencia provistas con pelos esparcidos. Los rostros, ligeramente curvados, terminan en una corona de cilios y miden 265-380 μ

de largo. Las ascas están incluidas en una masa mucosa, que se desintegra en el agua, lo cual impide tener idea exacta de su tamaño y determinar el número de esporidios, que tiene cada asca. Los esporidios miden $4,5-6 \times 1,5 \mu$ y son de forma arrañada.

El aislamiento del *Graphium ulmi* Schw. se hace del modo siguiente: Los trozos de madera, desinfectados exteriormente con sublimado o *Uspulun* ($C_6 Hg ClO_2 H_5$), son dislacerados o rajados, según su tamaño. De la superficie libre se arrancan astillas, que presenten las estrías oscuras características. Después de humedecidas en agua esterilizada, durante algunos minutos, se ponen, en cajas Petri o en tubos de cultivo, sobre el substrato.

En Baarn emplean ordinariamente, como substrato, agar-jugo de guindas, con un grado de acidez $pH = 4$.

En Alemania, Wollenweber (14) empleó agar-jugo de patata, adicionado de 1 por 100 de glucosa y acidulado con ácido láctico (para eliminar las bacterias), de modo que resulte un $pH = 4,8$. En Norteamérica usan agar-decocción de patata glucosada, y en Italia agar-infusión de zanahoria, acidulado con ácido málico.

A los pocos días se ve una eflorescencia mohosa, blanquecina, sobre los trozos de madera o irradiando alrededor de éstos. Esta eflorescencia está dispuesta, al principio, en zonas anulares concéntricas, pero, después que el hongo ha estado en cultivo durante algún tiempo, se desarrolla gran cantidad de micelio aéreo y las zonas se hacen poco claras. El micelio aéreo suele fructificar rápidamente, y en muchos substratos la fructificación es tan abundante, que queda completamente cubierto por una capa viscosa, blanquecina, de conidios.

Los conidios — al principio blancos y después pardos o amarillentos — están unas veces encadenados en los extremos de los conidioforos del micelio aéreo, formando falsos capítulos, lo que constituye la *facies de Cephalosporium*. (Véase figura 3-1.)

Otras veces, los conidios forman una capa mucosa sobre el micelio rastrero (*facies de Pionnotes*). Este Pionnotes puede multiplicarse mucho por germinación sacaromiciforme de los conidios

y cubrir, por lo tanto, una gran parte del substrato. (Véase figura 3-II.)

A veces se ennegrece la línea límite de los anillos concéntricos, y entonces, con la lupa, se ven puntitos pequeños, pedicelados, algo salientes, de color oscuro. Son los coremios (*facies de synnema*). Estos coremios se forman también sobre los trocitos de madera, empleados para hacer los aislamientos.

Los coremios, compuestos de *pedicelo* y *capítulo*, nacen sobre un estroma de hifas negruzcas, en donde suelen encontrarse esclerocios esféricos de 0,04-0,06 mm. de diámetro (formas de invernación). El *pedicelo* es de aspecto filiforme, cilíndrico o mazudo. Su color es negro, pero algo más claro por arriba. En la cúspide se transforma en un manojo de conidioforos — que se esparcen en todas direcciones — sobre los cuales se depositan los conidios, formando una especie de costra semiesférica, de color amarillo dorado (*capítulo*). Las dimensiones medias del *pedicelo* oscilan alrededor de $0,54 \times 0,03$ mm., y las del *capítulo* (alto $\times$ ancho) son de $0,16 \times 0,22$ milímetros.

Las dimensiones medias de los conidios del coremio son de $3,7 \times 1,7 \mu$. Las dimensiones de los conidios de la forma sacaromiciforme y los de la *facies Cephalosporium* oscilan entre $3-8 \times 1,5-4 \mu$. Todas estas clases de conidios son piriformes, rectos, rara vez algo encorvados, generalmente unicelulares y sólo por excepción bicelulares.

PATOGENIA Y EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD

Los resultados obtenidos por el profesor italiano Sibilía (9) sobre la actividad enzimática del *Graphium ulmi* Schw., permiten afirmar que este hongo no produce enzimas numerosas ni muy activas, por lo cual, para que la infección se produzca, es preciso que, su micelio se ponga en contacto con el cambium o con la albura. En efecto, la única enzima, que se ha puesto claramente en evidencia, es una *pectasa*; por consiguiente, el micelio sólo podrá penetrar a través

de células de pared delgada y formada exclusivamente de substancias pécticas, que son, como se sabe, disueltas por la *pectasa*.

En las condiciones naturales, se cree que el hongo invade los árboles a través de pequeñas heridas, producidas, por insectos o agentes mecánicos, en las yemas, ramas, troncos o raíces. Las grandes heridas, como las de poda, se infectan muy rara vez. La posibilidad de penetración a través de heridas naturales (cicatrices de flores y hojas) y aberturas naturales (estomas y lentejillas) no puede ser excluída. Se ha encontrado el hongo en los peciolo de las hojas; a pesar de esto, no se sabe, con certeza, la importancia que pueden tener las hojas, en la propagación de la enfermedad.

Como el hongo crece principalmente en la albura, protegida de ordinario por una capa de corteza sana, se supone que, la difusión exterior de esporas tiene que ser muy pequeña, mientras que el árbol o alguna parte de él no se haya secado. En condiciones muy favorables, las esporas pueden producirse también en los tocones, heridas de poda, etc.

La infección parece ser transmitida por el viento y por los insectos, siendo el primero el factor principal en la propagación de la enfermedad, que tiene cierta tendencia a aparecer, cuando se presenta en nuevas localidades, en los sitios más expuestos al viento. Muchos fitopatólogos, sin embargo, dan gran importancia a los insectos del género *Scolytus* (*Eccoptogaster*), que llevan el hongo en su cuerpo y son un vehículo de infección, al hacer sus galerías en las diferentes partes del árbol. El estudio de los partes meteorológicos holandeses demuestra que, la enfermedad del hongo se intensifica durante los períodos secos, o inmediatamente después de ellos, que es cuando los insectos tienen acceso a la albura.

Las infecciones naturales se presentan generalmente en la parte alta de la copa y se extienden hacia abajo a través del tronco; las ramas laterales no son atacadas hasta el tercer año después de la infección. Por esto, puede ocurrir que, ciertos árboles, que no tengan ninguna característica externa de esta enfermedad, actúen como centros de infección, durante dos veranos.

La evolución de la enfermedad varía con la especie, y, dentro de la especie, con el individuo. Una rama puede marchitarse en un año, y, en cambio, otras tardan varios años. El árbol puede morir al fin de la estación o resistir durante mucho tiempo. Las pequeñas plantitas pueden sucumbir a las pocas semanas después del ataque. Con tiempo caliente, la enfermedad progresa más rápidamente, que con tiempo frío. Las lluvias devuelven a los árboles pasajeramente su aspecto lozano.

TRATAMIENTO Y PROFILAXIS

Dada la localización del parásito, no es posible una lucha con los procedimientos ordinarios. Para aminorar los daños del *Graphium* se ha recurrido a la *selección de especies o variedades resistentes* y a la *terapéutica interna*.

La *selección de especies* ha dado ya brillantes resultados en la lucha contra otros parásitos. Sin embargo, en este caso se ha marchado muy lentamente, debido a la confusión que reina en la sistemática del olmo. (Se conocen 16 especies y 50 subespecies, incluyendo variedades y formas de jardín, siendo punto menos que imposible distinguir muchas de ellas entre sí.) Estas experiencias se hacen inoculando artificialmente todos los años muchos ejemplares de cada especie o variedad. Para la inoculación se emplean cultivos puros de *Graphium ulmi* Schw. Se hacen incisiones en forma de T (análogas a las del injerto de escudete), en la base del tronco y en las ramas principales y se introduce en ellas trozos de micelio o bien se pulverizan con una suspensión de esporas en agua esterilizada, después de lo cual se cubren con guata y se vendan. Es conveniente elegir árboles jóvenes y hacer las inoculaciones durante los meses de junio y julio. Según las últimas investigaciones de Buisman, profesor del *Phytopathologisch Laboratorium* de Baarn (Holanda), los únicos olmos inmunes a la enfermedad son: el *Ulmus pumila* L y el *U. pumila* var. *pinnato-ramosa* Henry. El *U. pumila* L (olmo siberiano) es una especie asiática, oriunda del Extremo

Oriente, que puede alcanzar 17 m. de altura y 4 m. de circunferencia. Abunda especialmente en la China septentrional y tiene tres variedades: Var. *pendula* Rehd. (*), Var. *pinnato-ramosa* Henry y Var. *arborea* Litvin. En Norteamérica se ha introducido en 1908 y se ha extendido tanto, que bien puede decirse que, si China se considera como la patria del *U. pumila*, Norteamérica es su segunda patria.

La *terapéutica interna* no ha dado resultados positivos. Según informes recientes, las inyecciones intraleñosas de Quinosol ($C_6 H_6 NOSO_3 K$), que venían ensayándose en el *Biolog. Reichsanstalt für Land-und Forstwirtschaft*, de Berlín-Dahlem, se han abandonado definitivamente.

Para evitar la difusión de la enfermedad hay que destruir los árboles secos o muy atacados. Esta destrucción, que es sólo conveniente en donde la enfermedad está en estado esporádico, se hace apeando los árboles y quemando todas sus partes, incluso las hojas, cortezas y demás restos del árbol, que hayan caído al suelo. Las raíces deben desarraigarse y quemarse, pero, como esto sería muy costoso, se dejan generalmente las más profundas, cubriéndolas después con una capa de tierra de un decímetro y medio o más de profundidad. También pueden dejarse los tocones, embadurnándolos entonces con una capa de alquitrán o *karbolineum* (producto comercial derivado del alquitrán de hulla).

Si por motivos económicos es necesario utilizar la madera de los troncos, entonces hay que descortezarles y apilarles en sitio seco. Las cortezas y todo el ramaje deben quemarse, y los tocones embadurnarse con alquitrán o *karbolineum*.

Cuando la enfermedad se presente en un vivero, deben arrancarse y quemarse las plantitas y en seguida desinfectar el suelo.

Las ramas enfermas de los árboles poco atacados hay que podarlas hasta llegar a la madera sana, cubriendo después las heridas

(*) Rehder, A.: *Manual of cultivated trees and shrubs*, pág. 190. New-York, año 1927.

con alquitrán o *karbolineum*. Todos los productos resultantes de la poda deben ser quemados, para impedir la formación de los órganos de propagación del hongo. Los instrumentos usados en esta operación deben esterilizarse con alcohol desnaturalizado u otro desinfectante adecuado.

Los árboles, en que se observen galerías producidas por escolitidos, hay que apearlos, descortezarlos y quemar allí mismo las cortezas.

Para que se vea la importancia mundial de esta enfermedad, exponemos a continuación las disposiciones legales profilácticas, que están en vigor en las principales naciones:

Gran Bretaña. — Desde el año 1927 está prohibida en Inglaterra, Wales y Escocia la entrada de los olmos procedentes del Continente europeo.

Alemania. — El Estado libre de Sajonia dictó dos disposiciones en el año 1931, la primera, dando instrucciones para combatir el *Graphium ulmi*, y la segunda, unificando los métodos de lucha con los empleados en el Estado de Prusia.

La ciudad libre de Bremen publicó, en el año 1931, una orden haciendo un llamamiento a los propietarios de olmos, para que, en el plazo de una semana, notificasen a la Estación Fitopatológica de Bremen, si habían observado en sus olmos una marchitez repentina de las hojas o que se habían secado algunas ramas o árboles enteros u otros síntomas de la enfermedad, y enviasen en caso afirmativo a dicha Estación — con objeto de poder comprobar la existencia del *Graphium* — ramas de 0,5-2,5 centímetros de diámetro, cortadas en trozos de 1-2 decímetros de largo, recogidas de una parte del árbol recientemente seca. Al mismo tiempo se dan instrucciones para combatir la enfermedad y evitar su propagación, y se advierte que, las infracciones se castigan con multas, que pueden llegar hasta 150 marcos o catorce días de prisión.

Suecia. — Un Real decreto de 1931 prohíbe la importación de plantitas de la familia de las ulmáceas. Las plantitas, que hayan llegado al país, serán detenidas por las Aduanas y reexpedidas a

costa del propietario o destruídas, si no se hace ninguna reclamación de reexpedición, en el plazo de un mes después de la llegada.

Noruega. — La importación de plantitas de cualquier especie de olmo está prohibida desde el año 1930.

Estados Unidos de N. A. — Desde el 1.º de junio de 1929, la importación de semillas y plantitas de olmo sólo puede hacerse con permiso especial. Estos permisos fueron limitados a los estrictamente indispensables para atender a las necesidades de repoblación y para satisfacer fines experimentales, docentes o científicos; pero desde que esta enfermedad adquirió en Europa proporciones alarmantes, apenas se concedió ningún permiso.

II

LA EXISTENCIA DE LA CERATOSTOMELLA (GRAPHIUM) ULMI (SCHW.) BUISMAN EN ESPAÑA, ESTÁ AL FIN PLENAMENTE DEMOSTRADA.

En mi publicación (4) sobre la *Grafiosis del Olmo*, aparecida en julio de 1932, a raíz de haber intervenido en un caso de *traqueomicosis* del olmo, causada, según mi opinión, por el *Graphium ulmi*, decía lo siguiente: "Nosotros la hemos encontrado en unos olmos de Chamartín de la Rosa (Madrid) y creemos que, la enfermedad está muy extendida por toda España, sobre todo en su forma crónica". Por estar entonces en período de instalación la Sección de Cultivos de nuestro Laboratorio, tuvimos que prescindir del aislamiento y apoyar el diagnóstico exclusivamente en la sintomatología y en la anatomía patológica de la enfermedad. La marcha que seguimos fué la siguiente:

Primeramente hicimos una inspección ocular *in situ*, comprobando que había bastantes árboles completamente secos y muchos puntisecos, que presentaban la marchitez de las hojas, característica de la *grafiosis* (14).

Cortadas algunas ramas, vimos que, en las últimas capas de la albura, aparecían los clásicos puntos negros. Según Buisman (13), aparte del *Graphium ulmi*, hay otros dos organismos que producen esta coloración: el hifal *Verticillium albo-atrum* y la bacteria *Pseudomonas lignicola*, que no tiene carácter patógeno. Para dilucidar esta cuestión, descortezamos algunas ramas y quitamos el liber hasta poner la albura al descubierto, apareciendo entonces unas estrías longitudinales oscuras, que se interrumpían con frecuencia. Las estrías que produce el *Pseudomonas*, no tienen solución de continuidad y, aunque a veces se bifurcan, pueden seguirse

con relativa facilidad a lo largo de las ramas. La bacteria, por lo tanto, estaba excluida. La duda estaba entre el *Graphium* y el *Verticillium*. Para resolverla, recurrimos al microscopio y, al observar muchos tylos y no ver ningún micelio, nos decidimos por el *Graphium* (en el caso del *Verticillium* se producen pocos tylos y no es raro encontrar en los vasos hifas bastante gruesas).

En Enero de 1933, nos escribió la profesora Dr. Joh.^a Westerdijk, Directora del *Phytopathologisch Laboratorium* y del *Centraalbureau voor Schimmelcultures* Baarn (Holanda), rogándonos que le enviásemos cultivos del *Graphium ulmi* español, o, en su defecto, ramas de los olmos enfermos. Se le remitieron algunas, que llevaban en el Laboratorio más de seis meses, y, tal vez por esta causa, no pudo aislar de ellas el *Graphium*.

En el mes de Mayo del mismo año — a ruego también del Dr. Westerdijk — se enviaron nuevamente a Baarn ramas de olmo, pero, esta vez, no pudieron ser cortadas en la zona enferma, sino en sus proximidades, porque ya se había hecho el tratamiento profiláctico (apeo de todos los árboles secos y poda de todas las ramas enfermas, hasta llegar a la madera sana). Las ramas de este último envío no presentaban, en verdad, las estrías longitudinales características del *Graphium*. Más bien, parecía que, se trataba de coloraciones producidas por la bacteria *Pseudomonas lignicola*. En los cultivos, hechos en Baarn, sólo se desarrollaron hongos saprófitos y bacterias.

En la primavera de 1934 estuvieron en Madrid, con el exclusivo objeto de comprobar la existencia del *Graphium ulmi*, las profesoras Dr. Joh.^a Westerdijk y Dr. Christine Buisman, encargada por el Gobierno holandés del estudio de la enfermedad del olmo. Por mis ineludibles ocupaciones en aquellos días, me fué completamente imposible atenderlas. El Ingeniero Agrónomo Sr. Rodríguez Sardiña las acompañó a Chamartín de la Rosa, en donde estaban los olmos objeto de discusión, pero no pudieron encontrar ni un solo árbol, que presentase en sus ramas las estrías características del *Graphium ulmi*.

Por todas estas causas, apareció en la revista holandesa *Mededeelingen van het Phytopathologisch Laboratorium* "Willie Commelin Scholten" Baarn XIII, Noviembre 1934, un trabajo del Profesor Christine Buisman, titulado: "The area of distribution of the *Ceratostomella* (*Graphium*) elm disease", en el que, al hablar de la grafiosis del olmo en España, se dice que por no haberse confirmado el caso de Chamartín de la Rosa, citado en mi publicación, no debía figurar España en la lista de países, en donde estaba demostrada la presencia del *Graphium ulmi*.

En Septiembre de 1933, tuve que volver a intervenir, por deberes profesionales, en otra micosis del olmo. Se trataba de una olmeda formada por unos 5.000 árboles, conocida con el nombre de "Arboleda de la Virgen de las Viñas", propiedad del Ayuntamiento de Aranda de Duero, provincia de Burgos. Practicado un reconocimiento fitopatológico, se comprobó que, había unos 2.000 olmos completamente secos y cerca de 2.500 puntisecos y con bastantes ramas secas, que presentaban la marchitez característica del follaje — de que habla Wollenweber (14) — idéntica en absoluto a la que habíamos observado en los olmos de Chamartín de la Rosa. Después de no pocas tentativas infructuosas, logramos encontrar una pequeña zona, en donde el arbolado presentaba claramente los síntomas de una *hadromicosis*, producida, al parecer, por el *Graphium ulmi*.

Por tratarse de un caso muy parecido al de Chamartín de la Rosa y por estar confirmada, desde el año 1933, la presencia del *Graphium ulmi* en Portugal, pusimos el mayor empeño en estudiar la sintomatología y en hacer el aislamiento del agente patógeno, para resolver, de una vez, el dudoso problema de la existencia del *Graphium ulmi* en España. A continuación exponemos el resultado de nuestras investigaciones.

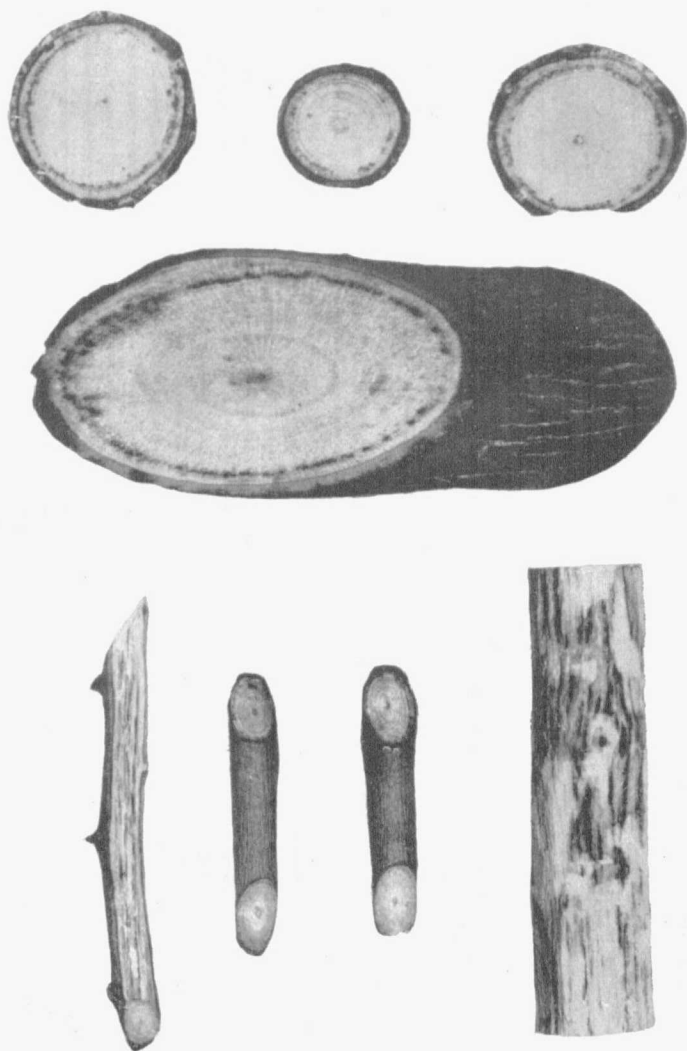
CARACTERES INTERNOS DE LA ENFERMEDAD

a) Macroscópicos. — En las secciones transversales (normales y oblicuas) de los troncos y ramas atacadas (haciendo el corte con un instrumento bien afilado) se observa a simple vista, en las últimas capas de la albura, una zona anular oscura, formada por puntos negruzcos. Éstos se ven, con mayor claridad, en las secciones oblicuas, sobre todo si se humedecen con agua. (Lám. I.)

Al descortezar un tronco o una rama y quitar el líber, aparecen en la superficie de la albura estrías longitudinales, con frecuentes soluciones de continuidad, que siguen la dirección del eje longitudinal. Estas estrías son de un color pardo oscuro y sus contornos no están bien definidos. (Lám. I.)

b) Microscópicos. — Si se examinan al microscopio las secciones transversales y longitudinales de las ramas enfermas, se observa que, en la zona ennegrecida de la albura, hay algunos vasos con tyllos en formación y otros cuyo *lumen* está completamente obstruidos por ellos (fig. 1, lám. II). Se ven también vasos, que están llenos de una sustancia de color amarillo-rojizo y de aspecto granuloso, semejante a las bacterias (fig. 2, lám. II). Y por último, hemos visto en algunos vasos — especialmente en las secciones longitudinales — las masas esferiformes de estructura plectenquímica (*esclerocios*), de que habla Wollenweber; mas no hemos logrado ver con claridad el micelio, ni en las secciones transversales, ni en las longitudinales.

Caracteres internos macroscópicos.



Secciones transversales y ramas descortezadas con la zona ennegrecida característica de la enfermedad.

Fot. Cruzado.

Caracteres internos microscópicos.

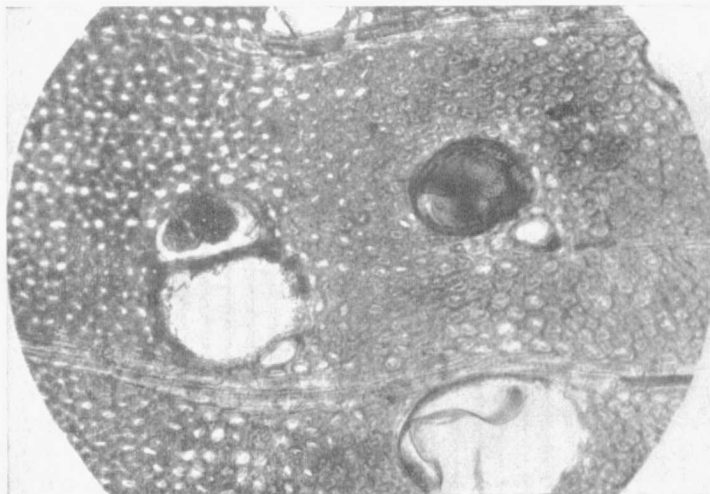


Fig. 1.— Sección transversal de una rama enferma, en la que hay dos vasos obstruídos por tylos.

Aumento 150 D.

Microfot. Cruzado.

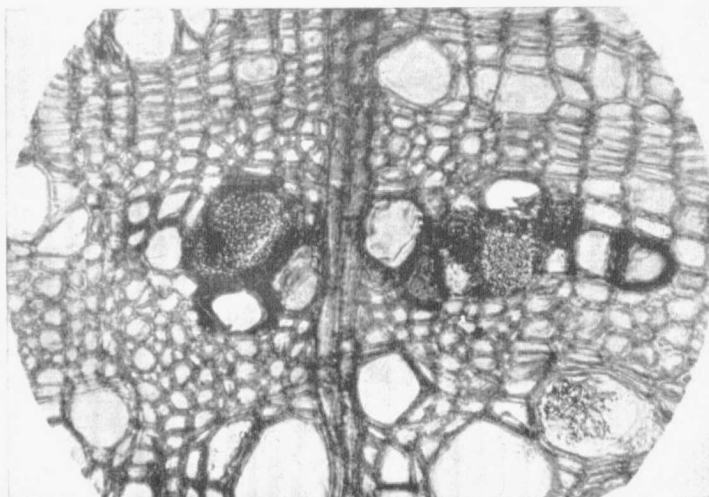


Fig. 2.— Sección transversal de una rama enferma, con varios vasos obstruídos por la substancia granulosa amarillo-rojiza.

Aumento 200 D.

Microfot. Cruzado.

AISLAMIENTO DEL AGENTE CASUAL Y CARACTERES DE LOS CULTIVOS (*)

La técnica empleada para el aislamiento, fué la siguiente:

Los trozos de las ramas enfermas, bien lavados y limpios, se desinfectan introduciéndoles, de cinco a diez minutos, en una solución de sublimado al 1 por 1.000, y después se lavan perfectamente con agua esterilizada. Hecho esto, se descortezan con un instrumento flameado y de la superficie libre se arrancan astillas, que presenten las estrías características. Estos trozos de madera son los que, después de humedecidos en agua esterilizada durante algunos minutos, se ponen, en las cajas Petri, sobre el substrato correspondiente.

Dada la época del año, en que hicimos el aislamiento, no pudimos preparar el agar-jugo de guindas, que es, por decirlo así, el substrato *standard* para esta clase de aislamientos, y en su lugar empleamos el agar-jugo de patata, según Appel (7) y el agar-extracto de malta de Leonian, modificado por Bonar (6). Estos medios los preparamos del modo siguiente:

Agar-jugo de patata, según Appel. — Primeramente, se empezó por obtener el jugo de patata, para lo cual se mondaron 5 kilogramos de patatas bien lavadas y limpias; después se rallaron bajo el agua y se prensaron. El jugo de prensa se dejó reposar durante veinticuatro horas, se decantó y, por último, se completó el volumen primitivo con agua destilada.

Para obtener el agar-jugo de patata, se cocieron juntos, durante una hora: 1.000 c. c. del jugo de patata, 10 gramos de glucosa y 30 gramos de agar. Después, ya no hay más que filtrar por algodón, repartir en tubos y esterilizar por ebullición discontinua.

(*) Justo es reconocer aquí que el éxito del aislamiento se debe, de un modo especial, a la escrupulosidad con que realizó todas las operaciones el Preparador del Laboratorio Sr. Carrero y Simón.

Agar-extracto de malta de Leonian, modificado por Bonar.

Solución A = 20 gramos de agar disuelto en 500 c. c. de agua destilada.

Solución B =	{	Fosfato monopotásico.	1,2 gramos.	
		Sulfato magnésico	0,6	»
		Maltosa	6,0	»
		Extracto de malta	6,0	»
		Agua destilada	500 c. c.	

En la solución B hemos prescindido de la peptona, como hacen algunos micólogos. El extracto de malta empleado por nosotros es el de la marca *Eumalt*, preparado por el Laboratorio del Dr. Andreu Lloberes, Esplugas (Barcelona).

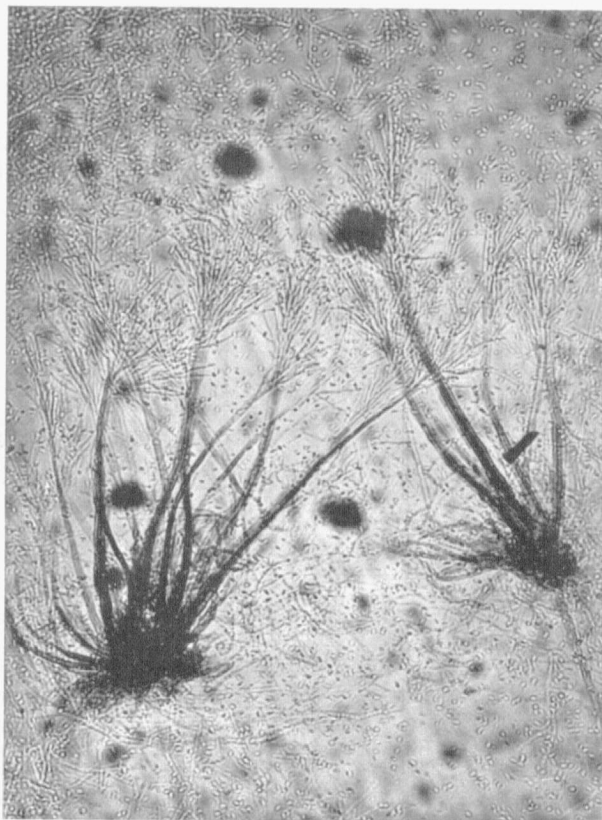
Las dos soluciones se mezclan, y la mezcla se filtra y se esteriliza en el autoclave, durante quince minutos, a $3/4$ atmósfera de presión.

Para hacer el aislamiento, se emplearon 10 placas Petri, que se numeraron del 1 al 10. En los números 1 al 5 se puso, como substrato, el agar-jugo de patata, y en los números 6 al 10, el agar-extracto de malta. En cada placa se introdujeron dos trozos de madera.

Cultivos originales en agar-jugo de patata, según Appel. — *Placa número 1.* — En uno de los trozos de madera apareció, a los tres días, una eflorescencia miceliar blanquecina, que cubría casi todo el trozo y empezaba a irradiar alrededor de él. Poco después, se fueron formando unos anillos concéntricos, de color amarillo oscuro, que nos hicieron presentir la presencia del *Graphium*. A los veinte días, empezó a ennegrecerse la línea límite de los últimos anillos formados. A los veinticinco días, se abrió la caja y, al observarla con el binocular, con aumento de 40 diámetros, vimos que en la zona ennegrecida (*estroma*) se habían formado numerosos grupos cespitosos de coremios (hemos visto algún grupo formado hasta por 12 coremios). Hecha una preparación y estudiada al microscopio, se comprobó que se trataba del *Graphium ulmi*. Los coremios formados son muy pequeños, tal vez porque el substrato, empleado por nos-

Cultivo en caja Petri sobre agar-jugo de patata.

(A los veinticinco días.)



Placa núm. 1. — Dos grupos cespitosos de coremios de *Graphium ulmi*.

Aumento 300 D.

Microfot. Urech.

Cultivo en caja Petri sobre agar-jugo de patata.

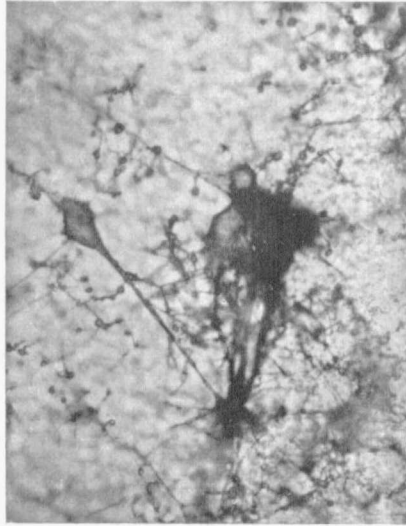


Fig. núm. 1.— Una zona de la placa núm. 1. Un grupo de coremios y varios conidióforos y pseudocapitulos de la facies *Cephalosporium*.

Aumento 150 D.

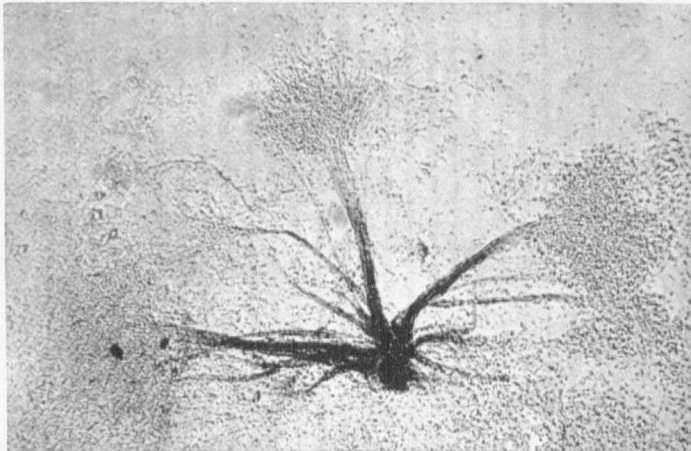


Fig. núm. 2. — Un grupo de coremios de la misma placa.

Aumento 200 D.

*icrofots. Cruzado.

otros, era poco ácido. Sus dimensiones son: *alto* (estipe + capítulo, sin contar la masa de conidios, que se deshace tan pronto como se ponen los coremios debajo de un cubre-objetos) $\times$ *grueso del estipe* = $200-230 \times 3-6 \mu$. Los conidios coremiales miden: $2-4 \times 1-2 \mu$ (la mayoría son de $3 \times 1 \mu$). (Véanse láminas III y IV.)

El *Graphium* (*Ceratostomella*) *ulmi* Schw. (Buisman) es especie nueva para la micoflora española.

En el otro trozo de madera se formó, a los pocos días, una colonia de aspecto blanquecino-brillante y de forma redondeada, con los bordes lisos, que tenía un punto blanco central, rodeado por un anillo casi incoloro. Hecho un frotis sobre un porta-objetos, coloreado con eritrosina y examinado en el microscopio, resultó ser una colonia de *Coccáceas* (lám. V). Todas las bacterias de esta colonia son Gram negativo y no hay ninguna ácido-resistente.

De la masa granulosa de color amarillo-rojizo, que obstruye algunos vasos, como antes hemos dicho, es de donde aisló Brussoff (10) el *Micrococcus ulmi*, al que atribuye la causa de esta enfermedad, y como, por otra parte, está demostrado de un modo incontestable el papel patogénico del *Graphium ulmi*, hay algunos fitopatólogos — entre ellos el ruso Yachewsky (15) — que opinan que la enfermedad del olmo es debida a la acción combinada del *Graphium* y del *Micrococcus ulmi*. Nosotros creemos, sin embargo, que, después de los concienzudos trabajos de Stapp (14) y de Buisman (13), no hay por qué hablar del papel que desempeñan las bacterias en la etiología de esta enfermedad.

No hemos visto ningún *esclerocio* en el estroma (Schwarz (8) no dice nada de los esclerocios), pero hemos observado con frecuencia, en las hifas, masas esferiformes y piriformes, con una membrana bastante gruesa, que se colorean fuertemente con el *azul láctico* y miden $20-30 \times 20-28 \mu$. Suponemos que se trata de las *clamidosporas* de que habla Schwarz, aunque sin dar ningún detalle. (Wollenweber (l. c.) no observó clamidosporas en sus cultivos.)

Placa número 2. — Uno de los trozos de madera quedó estéril y el otro se cubrió de una capa viscosa, de color amarillento, que

parecía una colonia de bacterias. A los veinte días, se observaron unas protuberancias, que fueron tomando una forma cilindro-cónica y un aspecto parecido a las vedijas de lana. Examinada la capa viscosa al microscopio, se comprobó que estaba formada por numerosos conidios sacaromiciformes, entre los que se veía un micelio rastrero y no muy abundante. Las protuberancias cilindro-cónicas, de cerca de un centímetro de altura, estaban constituidas por una anastomosis de hifas, dispuestas paralelamente (de acuerdo con los resultados de Wollenweber, que hizo sus investigaciones en un medio de cultivo parecido al nuestro). Se trata, pues, de la facies de *Pionnotes*. Los conidios de esta facies miden: $4-6 \times 2-3 \mu$.

Las placas números 3 y 4 se infectaron con *Penicillium*.

La placa número 5 quedó estéril.

Cultivos originales sobre agar-extracto de malta de Leonian, modificado por Bonar. — Placa número 6. — Uno de los trozos de madera se infectó con *Penicillium* y en el otro se formaron, con toda claridad, los anillos concéntricos, característicos de la facies *Cephalosporium*, pero de un color blanco-amarillento, mucho más claro que el de los formados en la placa número 1. (Véase lám. V.) Los numerosos pseudocapítulos, formados por conidios aglomerados por una sustancia mucosa, presentaban el aspecto de gotitas brillantes y se veían hasta a simple vista. Los conidios de la facies *Cephalosporium* miden: $3-5 \times 1,5-2,5 \mu$. En esta placa no se observó ningún coremio.

Placa número 7. — En uno de los trozos de madera se formó la facies *Cephalosporium* y, al poco tiempo, aparecieron picnidios del género *Aposphaeria*, que ahogaron, casi por completo, el micelio del *Graphium*.

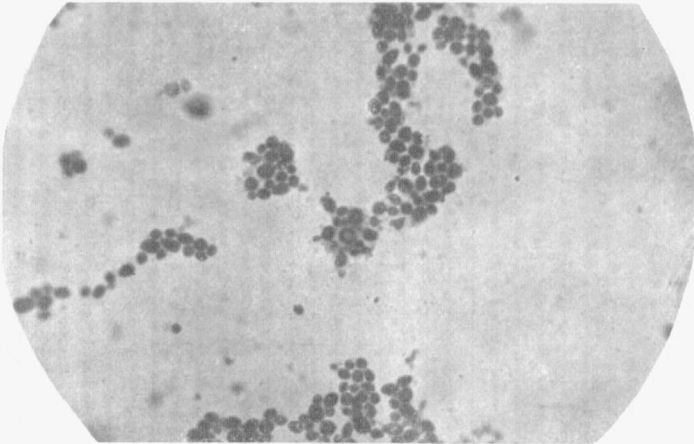
Las placas números 8 y 9 quedaron estériles.

La placa número 10 se infectó con *Penicillium*.

Subcultivos. — Siguiendo las investigaciones de Schwarz, se hizo un repicado de las facies *Cephalosporium* procedente de la placa número 6) sobre trozos de manzana esterilizada. La técnica empleada fué la siguiente: Se escoge una manzana, cuya piel esté in-

Cultivo en caja Petri sobre agar-jugo de patata.

(A los veinticinco días.)



Placa núm. 1.—Colonia de *Coccaceas* formada en uno de los trozos de madera.

Aumento 900 D.

Microfot. Cruzado.

Cultivo en caja Petri sobre agar-extracto de malta.

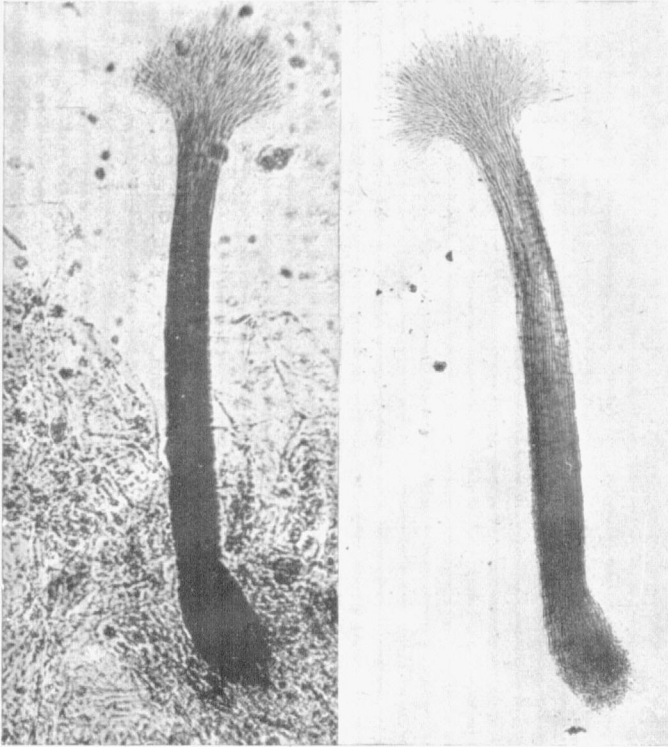


Placa núm. 6.—Anillos concéntricos de la facies *Cephalosporium*.

Fot. Cruzado.

Subcultivo sobre trozos de manzana.

(Repicado de la *placa* núm. 6.)



Coremios obtenidos a los diez días.

Aumento 200 D.

Micr. fot. Cruzado.

tacta, se la lava con cuidado y se la sumerge, durante un par de horas, en una solución de sublimado al 2 por 1.000, con objeto de desinfectar su superficie. Después se seca con papel secante esterilizado y se parte en varios trozos con un instrumento flameado, teniéndola siempre envuelta en papel esterilizado, para evitar el contacto con las manos. Estos trozos se introducen en cajas Petri esterilizadas, en las que se ha puesto previamente una capa de agar en estado líquido, con el fin de inmovilizar los trozos y al mismo tiempo mantener un cierto grado de humedad. La siembra se hace por medio de la aguja de platino, con punta de espátula. A los diez días, se veían — hasta sin abrir las cajas — numerosos coremios, la mayoría gregarios y pocos cespitosos. Estos coremios son mucho mayores que los formados en el agar-jugo de patata. Tienen de *alto* (estipe + capítulo, sin la masa de conidios) hasta 500 μ y de *grueso del estipe*: 30-40 μ . Los conidios coremiales miden: $3-3,5 \times 1-1,5 \mu$. (Lámina VI.)

Y, para terminar, hemos de decir que, por apremios de tiempo — debido al especial interés que tenemos en dar esta nota, lo antes posible, a la publicidad — no hemos podido hacer un trabajo tan completo como quisiéramos. En lo sucesivo, lo iremos completando, determinando los caracteres culturales de las distintas estirpes del *Graphium ulmi* español en otros medios de cultivo (especialmente en ramas de olmo y en agar-jugo de guindas) e investigando la influencia que ejercen la reacción del medio (pH) y las condiciones de temperatura y humedad. Además, una vez determinada el área de difusión del *Graphium ulmi* en España y conocidas las características de sus distintas estirpes, habrá que comprobar, si el *Ulmus pumila* L. y su variedad *pinnato-ramosa* Henry resisten a la acción del *Graphium ulmi* español, en cuyo caso habrá que ir pensando en ensayar su aclimatación — como se está haciendo ahora en Italia con brillante éxito — para ver hasta qué punto es posible y conveniente que estos olmos lleguen a sustituir paulatinamente a nuestro *Ulmus campestris*.

ZUSAMMENFASSUNG.

In Jahre 1932 tauchte bei einigen Ulmen (*U. campestris* S.) in Chamartín de la Rosa, Madrid (Spanien) eine Tracheomykosis auf, die wegen ihrer äusseren, inneren und histopathologischen Eigentümlichkeiten als *Graphiosis* angesprochen werden konnte, jedoch gelang es nicht aus dem Holze der erkrankten Bäume *Graphium* auszuscheiden, obwohl Zweige zum *Centraalbureau voor Schimmelcultures* Baarn (Holland) gesandt wurden.

In 1935 wiederholte sich der Fall bei einigen Ulmen (*U. campestris* S.) in Aranda de Duero, Burgos (Spanien) unter ganz denselben Erscheinungen. Aus den Zweigen dieser Bäume konnte jetzt *Graphium ulmi* gewonnen werden. Die Koremien bildeten sich bei dem Original-Kulturen auf Kartoffelsaftagar und auf Apfelstücken bei den Unterkulturen (*).

Ceratostomella (*Graphium*) *ulmi* (Schwarz) Buisman ist eine neue Art für die spanische Mykoflora.

Spanien muss auf die Liste der Länder (Holland, Belgien, Frankreich, Deutschland, England, Österreich, Tschechoslowakei, Schweiz, Italien, Rumanien, Bulgarien, Portugal, Ungarn, Jugoslawien, und Vereinigte Staaten von Nordamerika) gesetzt werden, in denen das Vorkommen des *Graphium ulmi* bisher festgestellt worden ist.

RÉSUMÉ.

Dans l'année 1932, il se produisit sur quelques ormes (*Ulmus campestris* S.) de Chamartín de la Rosa, Madrid (Espagne), une *hadromycosis*, qui fut diagnostiquée comme *graphiosis* à cause de ses caractères externes, internes et histopathologiques mais on ne put isoler le *Graphium* des arbres malades, bien qu'on envoyât quelques branches au *Centralbureau voor Schimmelcultures* de Baarn (Hollande).

En 1935, un autre cas se produisit sur quelques ormes (*Ulmus campestris* S.) d'Aranda de Duero (province de Burgos). On arriva enfin à isoler le *Graphium ulmi* des branches de ces arbres. Les *coremies* se sont formées dans les cultures originales sur agar-jus de pommes de terre d'Appel et dans les sous-cultures sur des morceaux de pomme (*).

Le *Graphium* (*Ceratostomella*) *ulmi* Schw. (Buisman) est un espèce nouvelle pour la mycoflore espagnole.

L'Espagne doit figurer sur la liste des pays (Hollande, Belgique, France, Allemagne, Angleterre, Autriche, Tchécoslovaquie, Suisse, Italie, Roumanie, Bulgarie, Portugal, Hongrie, Yougoslavie et Amérique du Nord) où on a confirmé, jusqu'à présent, l'existence du *Graphium ulmi*.

(*) Estando en prensa este trabajo recibimos carta de la Profesora Dr. JOH^a WESTERDIJK de BAARN — que une a sus muchos méritos el de escribir correctamente el español —, de la que transcribimos literalmente el siguiente párrafo: «Habiendo recibido y examinado las ramitas de olmo con *hadromycosis*, estamos enteramente de acuerdo con Usted, en que estos árboles están atacados por el *Graphium ulmi*. El cultivo, que nos mandó, también demuestra típicamente el *Graphium ulmi*».

BIBLIOGRAFÍA

1. BRUSSOFF: Véase SORAUER, P. (10).
2. BUISMAN, C. B.: «Ceratostomella ulmi de geslachtelijke vorm van Graphium ulmi Schwarz».
1932. *Tidjschrift over Plantenziekten*. XXXVIII, p.p. 1-8. Wageningen.
3. ——— «The area of distribution of the Ceratostomella (Graphium) elm disease».
1934. *Meded. Phytopat. Labor. W. C. Sch.*, XIII, p.p. 35-46. Baarn.
4. MARTÍNEZ, J. B.: «La grafiosis del olmo».
1932. *Montes e Industrias*. XIX, p.p. 499-503. Madrid.
5. MAY, C. and GRAVATT, G. F.: «The dutch elm disease».
1931. *U. S. Dept. of Agric. Circ.* 170. Wáshington D. C.
6. RAWLINS, T. E.: «Preparation of culture media».
1933. *Phytotathological and botanical methods*, p.p. 77-79. New-York.
7. RODRÍGUEZ SARDIÑA, J.: «Dos nuevas enfermedades de las habas».
1931. *Estación Central de Fitopatología Agrícola*, p.p. 6-7. Madrid.
8. SCHWARZ, M. B.: «Die Zweigdürre und die Gefässkrankheit der Ulme».
1922. *Meded. Phytopat. Labor. W. T. Sch.*, p.p. 10-19. Baarn.
9. SIBILIA, C.: «Una nuova malattia degli olmi segnalata in Italia».
1931. *L'Alpe*, p.p. 414-417. Firenze.
10. SORAUER, P.: *Handbuch der Pflanzenkrankheiten*.
1928. Band II. *Die pflanzlichen Parasiten*. 1 Teil, p.p. 78-79. Berlín.
11. ——— *Handbuch der Pflanzenkrankheiten*.
1932. Band III. *Die pflanzlichen Parasiten*, 2 Teil, p.p. 718-726. Berlín.
12. VANIN, S. I.: *Kurs liesnoi fitopatologii*.
1931. Chast I, p.p. 132. Moskvá i Leningrad.
13. WESTERDIJK, J. en BUISMAN, C.: *De Iepenziekte*.
1929. *Ned. Heide-Maatschappij*, p.p. 66-74.
14. WOLLENWEBER, H. W. und STAPP, C.: «Untersuchungen über die als Ulmensterben bekannte Baumkrankheit».
1929. *Arb. aus der Biol. Reichsanst. für Land- und Forst-Wirtschaft*. XVI, p.p. 283-324.
15. YACHEVSKY, A. A.: Véase VANIN, S. I. (12).





1113201
DR-9472

94

TIPOGRA
ALAMED