

Efecto de los filtrados de cultivos de *Ophiostoma novo-ulmi* Brasier sobre el crecimiento de callos de olmos con diferente susceptibilidad a la grafiosis

J. Diez ¹ *, L. Gil ²

¹ Unidad de Entomología y Patología Forestales, Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias. Universidad de Valladolid. Avenida de Madrid, 57, Palencia.

² Unidad de Anatomía, Fisiología y Genética Forestal, Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes. Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria. 28040, Madrid.

jdcasero@pvs.uva.es

RESUMEN

El largo tiempo de espera necesario para obtener resultados en los programas tradicionales de mejora de los olmos frente a la grafiosis justifica la búsqueda de nuevas técnicas de selección. En el presente trabajo se ha ensayado el efecto de los filtrados de cultivos de *Ophiostoma novo-ulmi* sobre los cultivos de tejidos de 20 genotipos de olmo, con la esperanza de obtener respuestas en su crecimiento relacionadas con su nivel de resistencia a la grafiosis.

El crecimiento de los callos de olmo fue en general inferior en presencia de los filtrados de cultivos de *O. novo-ulmi*. Sin embargo, las respuestas de los callos de olmo a los excretados del hongo fueron independientes de su nivel de resistencia a la grafiosis. La influencia de los componentes del medio de cultivo del hongo, presentes en los filtrados de cultivos control, sobre las células de olmo dificulta la utilización de esta técnica en la selección de olmos resistentes a esta enfermedad.

Palabras clave: grafiosis, *Ulmus sp.*, cultivo «in vitro», resistencia a grafiosis, selección de genotipos.

INTRODUCCIÓN

O. novo-ulmi (Brasier, 1991) es un ascomiceto, perteneciente al orden *Ophiostomatales*, agente causal de la grafiosis agresiva de los olmos, una enfermedad vascular que ha acabado con la mayor parte de los olmos en su zona de distribución. La oclusión de los vasos del xilema por parte del hongo no parece ser la única causa del marchitamiento, y de la muerte de ramas y del árbol, síntomas que generalmente caracterizan a la enferme-

* Autor para correspondencia

Recibido: 10-11-00

Aceptado para su publicación: 11-10-01

dad. Así, a partir de los cultivos de *O. novo-ulmi* se han aislado polisacáridos (Dimond *et al.*, 1947), metabolitos fenólicos (Claydon *et al.*, 1980) y un glicopéptido denominado peptidoramnomano (Strobel y Lanier, 1981; Scheffer y Elgersma, 1981), que poseen efectos fitotóxicos sobre los olmos. El mayor número de estudios se han centrado en una proteína tóxica, la ceratoulmina, que es excretada por el hongo al medio líquido y que está relacionada con la agresividad de los aislamientos fúngicos (Takay y Richards, 1978; Russo *et al.*, 1981; Scheffer *et al.*, 1987; Mezetti *et al.*, 1988; Templeton *et al.*, 1994; Richards, 1994; Sticklen y Bolyard, 1994).

Desde que la grafiosis se detectó en 1919, hasta la actualidad, se han desarrollado en diversos países, como Holanda, Italia, Estados Unidos y Canadá, programas de mejora genética, con el propósito de conseguir olmos resistentes. La mayoría de los esfuerzos han estado dirigidos a combinar las características ornamentales de las especies americanas y europeas con las de resistencia de las especies asiáticas, menos sensibles a la enfermedad. Híbridos de este tipo han sido desarrollados y cultivados en distintos países. En España el programa de mejora data de 1986 (Gil *et al.*, 1990).

En todos estos programas de mejora se necesitan tiempos prolongados y grandes extensiones de terreno y personal para el mantenimiento de las plantas. Las técnicas del cultivo «in vitro» podrían ser una valiosa herramienta en estos procesos de selección, ya que presentan una serie de ventajas como el requerimiento de menores espacios para el desarrollo de los ensayos, la posibilidad de realizar experimentos independientemente de la época del año y una mayor facilidad en la propagación del material vegetal para ensayo. Todas estas características pueden permitir, en principio, una mayor rapidez en la obtención de resultados que con los procesos tradicionales (Daub, 1986).

La existencia de toxinas en esta patología abre la posibilidad de realizar una selección de olmos resistentes a la grafiosis «in vitro». Así, Pijut *et al.*, (1990) observaron un crecimiento diferencial en los callos de tres genotipos de *Ulmus americana* L, relacionado con su resistencia a la grafiosis, al ser cultivados en presencia de distintas concentraciones (hasta el 50 % v/v) de los filtrados de cultivos *Ophiostoma novo-ulmi*, postulando su posible uso en los programas de mejora. Otros autores (Biondi *et al.*, 1991) también han comprobado el efecto inhibitor ejercido por los filtrados de *O. novo-ulmi* sobre células de *Ulmus minor*.

Todo esto ha llevado consigo a que se planteara el desarrollo de técnicas alternativas para evaluar el grado de resistencia a la grafiosis de olmos seleccionados (Diez, 1996), en particular de la metodología del cultivo «in vitro», como una forma de acelerar e incrementar los procesos de selección y testado. Para ello se obtuvieron suspensiones celulares de olmos pertenecientes a grupos con distinto grado de tolerancia a la grafiosis sobre los que se estudiaron las respuestas a las esporas de *Ophiostoma novo-ulmi* (Diez y Gil, 1998a) y a los productos excretados por este hongo al medio de cultivo (Diez y Gil, 1998b). En el presente trabajo se exponen los resultados obtenidos tras la aplicación de los filtrados de cultivos de *O. novo-ulmi* a otro tipo de material «in vitro», los callos de olmo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material fúngico

El aislamiento de *O. novo-ulmi* TO-VL1, utilizado en este trabajo, fue obtenido a partir de ramas de un árbol enfermo situado en Velilla (Toledo), y ha sido seleccionado por su

agresividad y alto Índice de Producción de Ceratoulmina (IPC). Los cultivos fueron mantenidos en medio de Extracto de Malta con Agar (MEA) y subcultivados cada 23 días.

Material vegetal

Para llevar a cabo el ensayo se eligieron 20 genotipos de olmo con distinto grado de resistencia a la grafiosis y pertenecientes a grupos taxonómicos distintos. Las características del material vegetal utilizado (genotipo, localización del ortet, tipo de propagación, localización del ramet, año de plantación del ramet y grado de susceptibilidad a *Ophiostoma novo-ulmi*, si es conocido) se señalan en la Tabla 1.

Crecimiento de *Ophiostoma novo-ulmi* para producción de toxina

El medio de Scala *et al.* (1993) fue el utilizado para el crecimiento en medio líquido de *O. novo-ulmi*. Los cultivos iniciales se consiguieron al inocular en frascos Erlenmeyer de 100 ml, que contenían 25 ml del medio de cultivo estéril, un trozo de medio agarizado de 3 mm de diámetro, obtenido a partir del borde de una colonia del hongo cultivada en una placa Petri durante 15 días. Los matraces se incubaron a 23 °C en la oscuridad durante una semana, en un agitador orbital a 125 r.p.m. A partir de estos cultivos iniciales se inocularon otros matraces (100 ml) con 25 ml del medio, con una concentración de 10⁵ esporas/ml, que fueron incubados en las mismas condiciones que los iniciales durante 10 días, con la intención de conseguir una producción óptima de toxinas. La producción de la toxina ceratoulmina en el cultivo fue cuantificada al final de este período, adaptando el método turbidométrico descrito por Takay y Richards (1978).

Obtención de los filtrados de cultivos fúngicos y de los filtrados de control

Los filtrados fúngicos se obtuvieron a partir de los cultivos líquidos de *O. novo-ulmi* (aislamiento TO-VL1), preparados según se describió anteriormente.

Los cultivos se centrifugaron a 7.500 r.p.m. (8.000 g) durante 20 minutos con la intención de precipitar la mayor parte posible del hongo. Una vez decantado el medio de cultivo, el pH se ajustó en un margen de 5.6 a 5.7 unidades y se pasó a través de filtros Millipore de 0.22 µm de tamaño de poro para eliminar el material fúngico existente aún en el medio.

Los filtrados de los cultivos control fueron obtenidos, según el procedimiento anteriormente descrito, a partir del medio de cultivo de Scala *et al.* (1993) sin inocular el hongo, mantenido en agitación durante 10 días.

Una vez obtenidos los filtrados, éstos fueron empleados en los diferentes ensayos.

Obtención y mantenimiento de callos

El material utilizado para la obtención de callos fueron hojas de olmo. Las hojas se esterilizaron y trocearon antes de situarse en placas de Petri conteniendo 25 ml del medio

Tabla 1
Ejemplares de olmo utilizados en los ensayos

<i>U. minor</i>	Localización Ortet	TP	Localización Ramet	AP	GS
M-PH1	Puerta de Hierro (Madrid)	ER	Vivero P. de Hierro (Madrid)	1991	S
M-PH2	Puerta de Hierro (Madrid)	Injerto	Vivero P. de Hierro (Madrid)	1991	S
M-SF1.	San Fernando (Madrid)	Injerto	Vivero P. de Hierro (Madrid)	1991	–
TO-PB1	Puebla (Toledo)	ER	Vivero P. de Hierro (Madrid)	1991	–
TO-PB3	Puebla (Toledo)	ER	Vivero P. de Hierro (Madrid)	1991	–
V-JR1	Jarafuel (Valencia)	ER	Vivero P. de Hierro (Madrid)	1990	–
ZA-VL1	Valorio (Zamora)	ER	Vivero P. de Hierro (Madrid)	1991	S
<i>U. minor x U. pumila</i>	Localización Ortet	TP	Localización Ramet	AP	GS
M-DV1	Dehesa de la Villa (Madrid)	ER	Vivero P. de Hierro (Madrid)	1991	I
M-DV3	Dehesa de la Villa (Madrid)	ER	Vivero P. de Hierro (Madrid)	1991	I
M-DV4	Dehesa de la Villa (Madrid)	ER	Vivero P. de Hierro (Madrid)	1990	I
M-DV5	Dehesa de la Villa (Madrid)	ER	Vivero P. de Hierro (Madrid)	1990	I
M-MT2	Martala (Madrid)	ER	Vivero P. de Hierro (Madrid)	1990	–
M-PZ3	Pezuela (Madrid)	ER	Vivero P. de Hierro (Madrid)	1991	I
M-TC2	Tres Cruces (Madrid)	ER	Vivero P. de Hierro (Madrid)	1990	S
VA-16	Vivero P. de Hierro (Madrid)*	–	–	–	R
Híbridos holandeses **	Localización Ortet	TP	Localización Ramet	AP	GS
454	Wageningen (Holanda)	Injerto	Vivero Serranillo (Guadalajara)	1989***	R
496	Wageningen (Holanda)	Injerto	Vivero Serranillo (Guadalajara)	1989***	R
568	Wageningen (Holanda)	Injerto	Vivero Serranillo (Guadalajara)	1989***	R
<i>U. pumila</i>	Localización Ortet	TP	Localización Ramet	AP	GS
M-ESC5	E.T.S.I. Montes (Madrid)	–	–	–	R
P-ESC1	E.T.S.I. Agrarias (Palencia)	–	–	–	R

TP: Tipo de propagación.

AP: Año de plantación.

ER: Estaquilla de raíz.

GS: Grado de susceptibilidad. (R: Resistente; S: Susceptible; I: Intermedio; –: Desconocido).

* Genotipo sembrado en el vivero central de Valladolid en 1986; inoculado en 1989, fue seleccionado y trasplantado al vivero de Puerta de Hierro en el año 1990.

** Genotipos: 454 (*U. carpiniifolia* x *U. glabra*) x (*U. wallichiana* x *U. glabra*).

496 (*U. carpiniifolia* x *U. carpiniifolia*) x (*U. wallichiana* x *U. glabra*).

568 (*U. carpiniifolia* x *U. glabra*) x (*U. wallichiana* x *U. glabra*).

*** Los injertos fueron realizados en Wageningen y plantados en España en la fecha indicada en la tabla.

MS estéril (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 200 mg/l de hidrolizado de caseína (HC), 30 g/l de sacarosa, 04 mg de la auxina 2,4-D y 8,8 mg de la citoquinina Benziladenina (BA) y 8 g/l de agar (pH = 5.6-5.7).

Todas las placas fueron debidamente selladas con Parafilm antes de colocarse en la cámara de cultivo a 24 ± 0,5 °C en oscuridad.

Una vez obtenidos los callos, éstos se subcultivaron cada 30 días, transfiriendo aproximadamente 2 gramos de tejido vegetal a placas Petri de 9 cm que contenían 25 ml de medio nuevo.

Crecimiento de los callos en presencia del filtrado fúngico

Los filtrados (tanto fúngicos como control) se mezclaron con el medio de cultivo utilizado para el mantenimiento de los callos (medio basal MS suplementado con 200 mg/l de HC, 30 g/l de sacarosa, 0,4 mg de Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético, 8,8 mg de 6-Bencilaminopurina y agar 8 g/l), de acuerdo con la metodología ensayada por Pijut *et al.* (1990) en *Ulmus americana*.

Se prepararon cinco tratamientos; uno de ellos sin ningún tipo de filtrado (dosis D0), mientras que, de los cuatro restantes, dos tenían los filtrados del hongo y los otros dos el medio de cultivo del hongo sin inocular, ambos en dos dosis distintas 10 % (D10) y 50 % (D50) del volumen final preparado. Las mezclas se realizaron esterilizando por un lado el medio de cultivo de los callos y añadiéndole a éste, una vez que la temperatura descendió por debajo de 37 °C, los filtrados líquidos mantenidos a esa misma temperatura en un baño termostático. Después de realizada la mezcla, ésta se distribuyó rápidamente en placas Petri de 60 mm de diámetro (10 ml/placa) con ayuda de una bomba peristáltica marca Autoclude modelo PC.

Una vez solidificado el medio se colocaron en cada placa 0,5 g de callo de cada uno de los veinte genotipos de olmo utilizados, a razón de 10 placas por genotipo y tratamiento. Al cabo de 40 días de crecimiento a 24 °C en oscuridad se anotó el incremento en peso experimentado por cada uno de los callos. Los datos representan la media de dos experimentos independientes.

Análisis estadístico

Cuando se estimó necesario y con la intención de comprobar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos control e inoculado de la misma concentración se realizó un análisis de la varianza con la ayuda del programa estadístico Statgraphics Plus for Windows 4.0.

RESULTADOS

La concentración de ceratoulmina excretada por el aislamiento de *Ophiostoma novo-ulmi* TO-VL1 al medio de cultivo fue alta (560 IPC).

El peso medio de los callos en los tratamientos con los filtrados fúngicos en las dos dosis ensayadas (D10 y D50) fue menor al de los tratamientos con los filtrados control de su misma concentración (Fig. 1). Sin embargo, los componentes del medio de SCALA (sales minerales, sacarosa etc.) presentes en los dos tipos de filtrados (control y fúngicos) también afectaron al crecimiento de los callos de olmo, como prueba el menor crecimen-

to experimentado en los tratamientos con los filtrados control a la concentración D50 con respecto al tratamiento control sin filtrados (D0). Por ello, se estimó oportuno comparar en todos los ensayos los resultados de los tratamientos con los filtrados fúngicos con los obtenidos en los filtrados control a la misma dosis. De esta forma se eliminó el efecto de los nutrientes del medio de cultivo del hongo sobre los callos, lo que permite conocer realmente el efecto de los excretados del hongo.

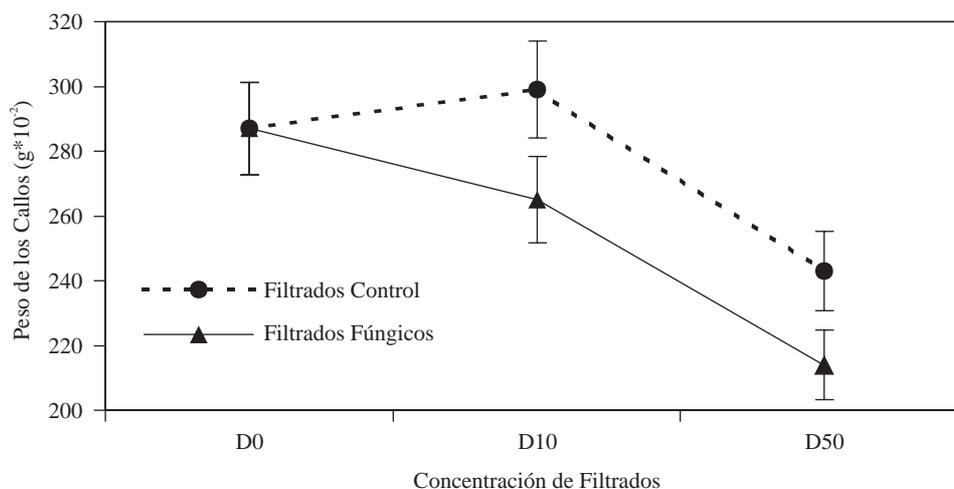


Fig. 1.—Efecto de los filtrados de cultivos de *Ophiostoma novo-ulmi* al 10 y 50 % sobre el crecimiento medio de los callos de los clones de olmo (media \pm error estándar, en $g \times 10^{-2}$).

El mayor descenso en los tratamientos fúngicos D50 lo experimentaron los genotipos M-TC2, M-ESC5, P-ESC1, ZA-VL1, V-JR1, M-PH2, VA-16, 454 y 568 (Fig. 2). Los filtrados fúngicos ocasionaron un incremento significativo en el peso de algunos genotipos, como M-DV3 o M-PZ3. Sin embargo, esta respuesta de los callos a los filtrados no ha estado relacionada con el nivel de resistencia de los clones. Así, mientras que en M-ESC5, P-ESC1, 568, 454, y VA-16, todos genotipos resistentes, el crecimiento de los callos fue un 40 % inferior en presencia de los filtrados fúngicos a la dosis D50, los filtrados fúngicos apenas afectaron a genotipos susceptibles como M-PH1 (*U. minor*), donde la reducción experimentada por los tratamientos fúngicos con respecto a sus controles D50 no fue significativa.

Globalmente, esta falta de relación puede observarse por grupos de resistencia (Fig. 3). Así, los mayores descensos en el crecimiento con respecto a los tratamientos con filtrados control la experimentaron los genotipos susceptibles y los resistentes (–29 y –23 %, respectivamente). En los genotipos intermedios se produjo un incremento de peso (+11 %) al ser cultivados en presencia de los cultivos fúngicos, mientras que en los desconocidos el ligero descenso (13 %) no fue significativo.

Por grupos taxonómicos, el crecimiento de los callos en los tratamientos conteniendo los filtrados de cultivos de *O. novo-ulmi* fue inferior al experimentado por sus respectivos

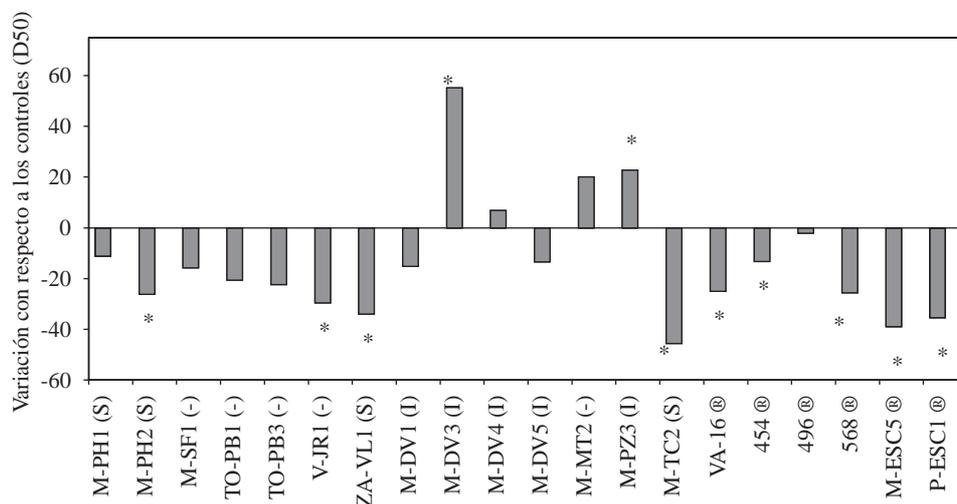


Fig. 2.—Variación en el crecimiento (en %) experimentada por los callos de los clones de olmo ensayados en los tratamientos con los filtrados fúngicos en la dosis D50, con respecto a los filtrados control de la misma concentración. Los asteriscos indican diferencias significativas entre filtrados control y fúngicos (Anova al 95 %).

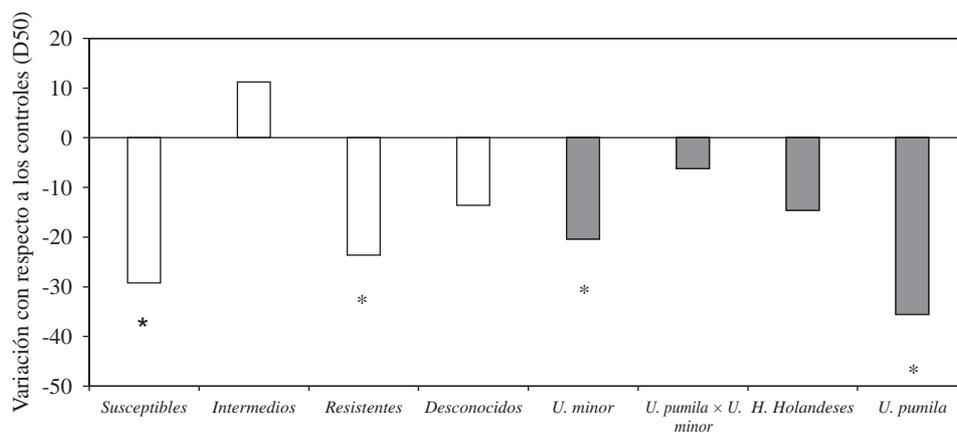


Fig. 3.—Variación en el crecimiento (en %) experimentada en los grupos de olmos utilizados en el estudio en los tratamientos con los filtrados fúngicos a la dosis D50, con respecto a los filtrados control de la misma concentración. Los asteriscos indican diferencias significativas entre filtrados control y fúngicos (Anova al 95 %).

filtrados control en todos los grupos, de una forma significativa en las especies *U. minor* y *U. pumila* (20 y 36 %, respectivamente).

DISCUSIÓN

Los excretados de *Ophiostoma novo-ulmi* redujeron el crecimiento de los callos de olmo independientemente del grado de resistencia de la planta adulta de donde se obtuvieron. Así, los cultivos celulares de los clones de la especie *U. pumila* se vieron muy afectados por la adición de los filtrados del hongo al medio de cultivo, mientras que algunos de los de individuos susceptibles no redujeron su crecimiento de forma significativa en estas mismas condiciones. Estos resultados incumplen el requisito previo necesario para poder seleccionar genotipos resistentes a escala celular: que la expresión de la resistencia, caracterizada en la planta intacta, se manifieste también en las células cultivadas «in vitro».

El efecto de los filtrados de *Ophiostoma novo-ulmi* sobre el crecimiento de los tejidos de los ejemplares de *Ulmus minor* más sensibles (ZA-VL1 o M-PH2) fue algo inferior al encontrado en callos de *U. americana* (Pijut *et al.*, 1990; Lineberger *et al.*, 1990; Domir *et al.*, 1993), donde su adición a la dosis del 50 % al medio de cultivo redujo su crecimiento en un 50 % con respecto a los tratamientos con los filtrados control.

La interferencia de los componentes del medio de cultivo tanto del hongo (medio de Scala) como de los callos (medio MS hormonado) pueden ser una de las causas que hayan originado estos resultados. Las sales minerales, vitaminas, sacarosa y reguladores del crecimiento incluidos en el medio de cultivo pueden enmascarar la acción de los compuestos excretados por el hongo, como ya describieran Roy y Newman (1989) en *U. americana*.

Otra posible causa de esta falta de relación entre la afección por los filtrados y la resistencia pudiera ser que la acción de las toxinas de *Ophiostoma novo-ulmi* se produzca únicamente en la planta intacta. Así, la ceratoulmina posee naturaleza hidrofóbica y es además una sustancia surfactante (Russo *et al.*, 1981). Una reducción en la tensión superficial de la savia aumenta el riesgo de cavitación y embolismo en los vasos del xilema, y provoca la ruptura de la columna de agua y la desecación de los tejidos vegetales dependientes (Cruiziat y Tyree, 1991). Van Alfen y Turner (1975) ya especularon con un posible taponamiento de las punteaduras del xilema y la posterior cavitación de los vasos como el posible modo de acción de la toxina peptidoramnomanano, aislada a partir de los cultivos líquidos de *Ophiostoma novo-ulmi*. La resistencia a la grafiosis, en este caso, estaría relacionada con mecanismos que no implican tolerancia hacia toxinas «in vitro», como son las características anatómicas y fisiológicas diferenciales entre individuos susceptibles y resistentes, ya señaladas en los primeros estudios sobre la enfermedad (Buisman, 1932; Went, 1954; Heybroek, 1957) y comprobados en recientes estudios (Solla, 2000).

La respuesta de los callos de olmo a los filtrados también pudiera ser debida a una escasa influencia de las toxinas en el desarrollo de la enfermedad de la grafiosis. Así, el efecto de los filtrados de cultivos de *Ophiostoma novo-ulmi* sobre los tejidos indiferenciados de olmo ha sido mucho menor al encontrado en otros sistemas hospedante-patógeno, como el sistema patológico *Cucumis melo-Fusarium oxysporum* ssp *melonis* (Megnegneau y Branchard, 1991), donde la reducción del crecimiento de los callos fue del 75 %, en relación con los cultivos control, en un medio conteniendo tan sólo un 4 % de los fil-

trados del patógeno, inhibiéndose por completo al 8 %. Parece ser que el efecto de las toxinas descritas en el desarrollo de la grafiosis no está todavía suficientemente aclarado, máxime cuando algunos trabajos (Tegli *et al.*, 1993) le confieren un papel estimulador del crecimiento de los tejidos de olmo. Esto podría explicar el aumento significativo de peso experimentado por los genotipos híbridos ibéricos M-DV3 y M-PZ3 en presencia de los filtrados del *Ophiostoma novo-ulmi*.

El cultivo de los tejidos indiferenciados de olmo en presencia de los filtrados de *Ophiostoma novo-ulmi* no es una técnica apropiada para conocer el nivel de resistencia de los olmos frente a la grafiosis. El futuro de los programas de selección de olmos resistentes a esta patología está ligado, sin lugar a dudas, al desarrollo de los métodos de selección molecular, que tan eficaces se están mostrando en otros proyectos de mejora (Cervera *et al.*, 1995; Paz *et al.*, 2000).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha llevado a cabo mediante un convenio entre la Dirección General de Conservación de la Naturaleza (DGCONA) y la Universidad Politécnica de Madrid. Agradecemos al Instituto DORSCHKAMP de Wageningen (Holanda) el suministro de los clones 454, 496 y 568.

SUMMARY

Influence of *Ophiostoma novo-ulmi* culture filtrates on callus of elms with different susceptibility to Dutch Elm Disease

The long time needed to achieve results in traditional elm breeding programs against Dutch Elm Disease (DED) justifies the search for new selection techniques. In this paper, effects of *Ophiostoma novo-ulmi* culture filtrates on 20 elm genotypes were assayed, in an attempt to find out whether growth responses were related to their DED resistance level. Callus growth was lower with *O. novo-ulmi* culture filtrates. However, this response was independent of DED resistance. The influence of fungal media components, present in the control culture filtrates, on the callus hinders the use of these techniques in DED resistance selection.

Key words: dutch elm disease, plant breeding, *Ulmus* sp., plant tissue culture, DED resistance.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIONDI S., MIRZA J., MITTEMPERGER L., BAGNI N., 1991. Selection of elm cell culture variants resistant to *Ophiostoma ulmi* culture filtrate. *J. Plant Physiol.* 3: 631-634.
- BRASIER C.M., 1991. *Ophiostoma novo-ulmi* sp. nov. causative agent of current Dutch Elm Disease pandemics. *Mycopathologia* 115:151-161
- BUISMAN C.J., 1932. Verslag van de phytopathologische onderzoeken over de iepenziekte, verricht in het Phytopathologisch Laboratorium «Willie Commelin Scholten» te Baarn, Gedunde 1931. *Tijdschr. Plziekt.* 38:17-36.
- CERVERA M., GUSMAO J., STEENACKER M., STORME V., VANDEN BROECK A., VAN MONTAGU M., BOERJAN W., 1995. Identification of AFLP-Markers tightly linked to the locus conferring resistance to *Melampsora larici-populina* in *Populus*. Plant Genome IV Conference. San Diego, CA, enero 1995. Publicado en Internet, disponible en <http://www.intl-pag.org/pag/4/abstracts/w2.html>
- CLAYDON N., ELGERSMA D.M., GROVE J.F., 1980. The phytotoxicity of some phenolic products of *Ophiostoma ulmi* to *Ulmus* sp. *Neth. J. Pl. Path.* 86:229-237.
- CRUIZIAT P., TYREE M., 1991. La subida de la savia en los árboles. *Mundo Científico* 10 (103): 630-638.
- DAUB M., 1986. Tissue culture and the selection of resistance to pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24: 159-186.

- DIEZ J., 1996. Desarrollo y Evaluación de Técnicas de Selección «in vitro» de Olmos Resistentes a la Grafiosis. Tesis Doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes (E.T.S.I.M.). Universidad Politécnica de Madrid.
- DIEZ J.J., GIL L.A., 1998a. Variability in phenylalanine ammonia-lyase activity in elm among cell cultures of elm clones inoculated with *Ophiostoma novo-ulmi* spores. *Plant Pathology* 47, 687-692.
- DIEZ J.J., GIL L.A., 1998b. Effects of *Ophiostoma ulmi* and *Ophiostoma novo-ulmi* culture filtrates on elm cultures from genotypes with different susceptibility to Dutch Elm Disease. *European Journal of Forest Pathology* 28: 399-407.
- DIMOND A.E., 1947. Symptoms of Dutch Elm Disease reproduced by toxins of *Graphium ulmi* in culture. *Phytopathology* 37:7.
- DOMIR S.C., SCHREIBER L.R., PIJUT P.M., 1993. Development of model systems to screen elms resistant to Dutch elm disease. En: *Dutch Elm Disease research: cellular and molecular approaches*. Springer-Verlag, New York. Editado por: Sticklen.
- GIL L.A., GARCÍA-NIETO M.E., SALVADOR NEMOZ M.ªL., 1990. La mejora genética de los olmos españoles. En: *Los olmos y la grafiosis en España*. ICONA, MADRID. 275-298.
- HEYBROEK H.M., 1957. Elm breeding in the Netherlands. *Silvae Genetica* 6:112-117.
- LINEBERGER R.D., STICKLEN M.B., PIJUT P.M., KROGGEL M.A., FINK C.V.M., DOMIR S.C., 1990. Use of protoplast, cell, and shoot tip culture in an elm germplasm improvement program. *Acta Horticulturae* 280:247-253.
- MEGNEGNEAU B., BRANCHARD M., 1991. Effects of fungal culture filtrates on tissue from susceptible and resistant genotypes of muskmelon to *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis. *Plant Science* 79: 105-110.
- MEZZETTI B., MITTEMPERGHER L. y ROSATI P., 1988. *Ophiostoma ulmi* metabolites and elm cell membrane permeability. Possible use in early tests of resistance. *Eur.J.For. Path.* 18: 77-84.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- PAZ M., KLOS K., MAREK L., CREGAN P., SHOEMAKER R., 2000. Molecular markers useful for detecting resistance to brown stem rot in soybean. *Plant and Animal Genome VIII Conference*. San Diego, CA, enero 9-12, 2000. Publicado en Internet, disponible en <http://www.intl-pag.org/pag/abstracts/pag8262.html>
- PIJUT P.M., DOMIR S., LINEBERGER D., SCHREIBER L., 1990. Use of culture filtrates of *Ceratocystis ulmi* as a bioassay to screen for disease tolerant *Ulmus americana*. *Plant Science* 70:191-196
- RICHARDS W.C., 1994. Cerato-ulmin: a wilt toxin of Dutch Elm Disease. Information Report O-X-432. National Resources Canada. Canadian Forest Service. Ontario. Canada.
- ROY G., NEWMAN P., 1989. Effect of an *Ophiostoma ulmi* filtrate on *U. americana* callus formation. *Can. J. Plant Pathol.* 11: 198.
- RUSSO P., BLUM F., IPSEM J., ABUL-HAJJ J., MILLER W., 1981. The solubility and surface activity of the *Ceratocystis ulmi* toxin cerato-ulmin. *Physiological Plant Pathology* 19:113-126.
- SCALA A., TEGLI S., COMPARINI C., MITTEMPERGUER L., SCALA F., DEL SORBO G., 1993. Influence of fungal inoculum on cerato-ulmin production, purification of cerato-ulmin and detection in elm sucker cuttings. *Petria*, 4: 57-67
- SCHEFFER R.J., ELGERSMA D.M., 1981. Detection of a phytotoxic glycopeptide produced by *Ophiostoma ulmi* in elm by enzyme-linked immunospecific assay (ELISA). *Physiol. Plant. Pathol.* 18:27-32.
- SCHEFFER R.J., LIEM J.I. y ELGERSMA D.M., 1987. Production in vitro of phytotoxic compounds by non-aggressive and aggressive isolates of *Ophiostoma ulmi*, the Dutch Elm Disease Pathogen. *30:321-335*.
- SOLLA A., 2000. Mejora genética de *Ulmus minor* Miller: Selección de ejemplares resistentes a la grafiosis. Tesis Doctoral. ETSIM. Universidad Politécnica de Madrid.
- STICKLEN M.B., BOLYARD M.G., 1994. Refinement of physiological roles for cerato-ulmin by analogy with other hydrophobins. *Trends Microbiol.* 2(6):213-215.
- STROBEL G.N., LANIER G., 1981. Dutch Elm Disease. *Scientific. Am.* 245:40-50.
- TAKAY S., RICHARDS C., 1978. Cerato-ulmin, a wilting toxin of *Ceratocystis ulmi*: Isolation and some properties of the cerato-ulmin from the culture of *C. ulmi*. *Phytopath. Z.* 91:129-146.
- TEGLI S., COMPARINI C., GIANNETTI C., SCALA A., 1993. Effect of cerato-ulmin on surviving on in vitro elm callus and cells. Resúmenes del 32 Congreso Sociale de la Societa Italiana di Fisiologia Vegetale. 5-9 de octubre de 1992. En: *Giornale Botanico Italiano* 127:190-191.
- TEMPLETON M., RIKKERINK A., BEEVER R., 1994. Small, cysteine-rich proteins and recognition in fungal-plant interactions. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 7(3): 320-325.
- VAN ALFEN N., TURNER N., 1975. Influence of a *Ceratocystis ulmi* toxin on water relations of elm (*Ulmus americana*). *Plant Physiol.* 55:312-316.
- WENT J.C., 1954. The Dutch Elm Disease. *Tijdschr. Plziekte* 60:109-127.