

EL PROGRAMA ESPAÑOL DEL OLMO: 25 AÑOS DE MEJORA E INVESTIGACIÓN FRENTE A LA GRAFIOSIS

Juan Antonio Martín García¹, Carmen Collada Collada², Martín Venturas¹, Jorge Domínguez Palacios¹, Eva Miranda García-Rovés¹, Jesús Díez Rodríguez¹, Salustiano Iglesias Sauce³ y Luis Gil Sánchez¹

¹ Departamento de Silvopascicultura. E.T.S. de Ingenieros de Montes–U.P.M. Ciudad Universitaria s/n. 28040-MADRID (España). Correo electrónico: luis.gil@upm.es

² Departamento de Biotecnología. E.T.S. de Ingenieros de Montes–U.P.M. Ciudad Universitaria s/n. 28040-MADRID (España).

³ Dirección General del Medio Natural y Política Forestal. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Desarrollo Rural. c/Gran Vía de San Francisco 4-6. 28005-MADRID (España).

Resumen

Tras la introducción de la grafiosis en España a mediados del siglo XX y como respuesta a su impacto devastador en las olmedas, se inició en 1986 el programa español de conservación y mejora de los olmos ibéricos. En sus comienzos, el programa se centró en incrementar la resistencia del olmo común (*Ulmus minor*) mediante su cruzamiento con olmos asiáticos resistentes a la enfermedad. Tras observarse que, si bien muy escasos, ciertos individuos autóctonos mostraban resistencia, el programa priorizó la mejora de olmos ibéricos con el fin de formar una base genética suficiente para devolver el olmo a las zonas riparias en las que antaño dominaba; aquellas más afectadas por la sequía estival. Diversos trabajos de investigación han complementado los trabajos de mejora. Se ha evidenciado el origen clonal e italiano del llamado olmo inglés (*U. procera*), ampliamente difundido por los romanos hace 2.000 años, y el carácter autóctono del negrillo (*U. laevis*). Se ha profundizado, entre otros, en el conocimiento de la diversidad genética del patógeno, la ecología del vector y los factores implicados en la resistencia a la enfermedad. Tras 25 años de mejora en los que se han evaluado varios miles de genotipos, los primeros olmos ibéricos resistentes están en proceso de catalogación por la administración, lo que permitirá su reintroducción en los bosques ibéricos.

Palabras clave: *Ulmus*, *Ophiostoma novo-ulmi*, *Scolytus*, *Diversidad*, *Resistencia*

INTRODUCCIÓN

Como resultado de la globalización en el transporte de material vegetal derivado de los olmos, los hongos *Ophiostoma ulmi* y *O. novo-ulmi*, ambos causantes de la enfermedad conocida como grafiosis del olmo, fueron introducidos en Europa y Norteamérica durante el siglo pasado. El origen de los patógenos no se ha podido

determinar con total seguridad, aunque el descubrimiento de un tercer patógeno de la grafiosis (*O. himal-ulmi*) en el Himalaya, en equilibrio con las poblaciones de olmos locales y sus insectos asociados, sugiere que esta región puede ser su origen (BRASIER & MEHROTRA, 1995).

Tras su introducción, los patógenos se expandieron rápidamente en varios frentes epidémicos. A principios del siglo XX, *O. ulmi* se difundió

desde el noroeste hacia el centro y sur de Europa, y hacia el este hasta las Islas Británicas y Norteamérica. Entorno a 1940, *O. novo-ulmi* subsp. *novo-ulmi* y *O. novo-ulmi* subsp. *americana* fueron probablemente introducidos en Europa y Norteamérica, respectivamente (BRASIER, 2000). Ambas subespecies reemplazaron rápidamente a *O. ulmi* dada su mejor adaptación a las condiciones del clima templado. La enfermedad 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. Él fue también quien acuñó el término "grafiosis" para denominarla y estableció las pautas del comportamiento epidemiológico (MARTÍNEZ, 1932).

Hoy en día, tras la masiva pérdida de olmos causada por la primera pandemia (estimada entre el 10 y el 40% de los olmos) y la consecuente selección natural de individuos resistentes, *O. ulmi* se considera un patógeno relativamente débil y se conoce como especie no agresiva de la grafiosis. *O. novo-ulmi*, causante de la segunda pandemia que provocó la práctica desaparición de los olmos adultos en numerosas localidades, se conoce como especie agresiva.

La gran virulencia y rapidez de expansión de la grafiosis, así como la efectividad de su transmisión mediante unos pequeños coleópteros de género *Scolytus*, la convierte en una enfermedad muy difícil de controlar con métodos químicos o biológicos. La selección y mejora de genotipos resistentes constituye la alternativa más viable

para la recuperación de los olmos (SOLLA et al., 2003; MITTEMPERGER & SANTINI, 2004). Sin embargo, la progresión de la mejora es lenta debido a los largos periodos de tiempo necesarios para multiplicar y evaluar la resistencia de un olmo (un mínimo de cinco años), y a los escasísimos olmos autóctonos resistentes (alrededor de un 0,02% de los que se evalúan).

La mejora del olmo tuvo su origen en Holanda hacia 1930, a la que se sumaron posteriormente diferentes programas americanos y europeos (MITTEMPERGER & SANTINI, 2004). El programa español del olmo se inició en 1986 promovido por el antiguo ICONA, hoy Dirección General para el Medio Natural y Política Forestal, junto con la Escuela de Ingenieros de Montes de la Universidad Politécnica de Madrid. Tras 25 años de actividad ininterrumpida, el programa sigue aún trabajando en la mejora y conservación de los olmos ibéricos con el fin último de recuperar el uso forestal y ornamental de la especie. Las líneas prioritarias del programa se presentan en la Tabla 1.

En 1997, el programa entró a formar parte de un proyecto a escala internacional que tuvo como objetivo mejorar la conservación, evaluación y uso de los recursos genéticos de los olmos europeos (proyecto RESGEN CT96-78, financiado por la Comisión Europea) (COLLIN et al., 2000). El proyecto europeo finalizó administrativamente en 2001 y aglutinó a diecisiete institutos en nueve estados de Europa occidental, reuniendo a un grupo diverso de científicos y forestales. Mediante este proyecto se elaboró

Periodo	Objetivo
1986-1989	Toma de contacto con los principales agentes implicados en el complejo grafiosis (olmo, vector y patógenos).
1990-	Conservar los recursos genéticos existentes de los olmos ibéricos.
1993-	Obtener olmos resistentes mediante ciclos de mejora genética utilizando olmos asiáticos como fuente de genes de resistencia.
1996-2001	Colaborar con 14 instituciones europeas a través de un proyecto coordinado para la conservación de los recursos genéticos de los olmos europeos.
1998-	Identificar la variabilidad genética, procedencia y ecología de los olmos ibéricos y obtener genotipos ibéricos resistentes.
2003-	Estudiar los caracteres implicados en la resistencia de los olmos ibéricos y su heredabilidad
2009-	Catalogar los olmos ibéricos resistentes como materiales de base para la producción de material forestal de reproducción certificado.

Tabla 1. Principales objetivos del programa español del olmo

una base de datos común, se estudió la diversidad genética de los olmos, se adoptaron protocolos de trabajo comunes y se creó una colección central europea encaminada a la conservación de los recursos genéticos de los olmos europeos.

Desde el inicio del programa español, los trabajos de tipo técnico encaminados a la obtención de olmos resistentes han ido estrechamente ligados a otros de carácter científico, que han resultado en la publicación de siete tesis doctorales y más de una veintena de artículos JCR. A continuación se revisan algunos de los trabajos realizados más afines a la sanidad forestal. Éstos contemplan la transmisión de la grafiosis y la resistencia de los olmos, cuyo estudio ha estado apoyado por la bibliografía generada por otros grupos de investigación. Por su gran relevancia en el programa, se dedica también un apartado a la inclusión de las técnicas moleculares en el estudio de los olmos y la grafiosis, y las futuras líneas de investigación. Finalmente, se expone la metodología empleada en el programa de mejora y los avances en la obtención de genotipos resistentes.

LA TRANSMISIÓN DE LA GRAFIOSIS

En el marco del programa del olmo, el estudio de los escolítidos, también conocidos como barrenillos de los olmos, ha incrementado nuestro conocimiento sobre los factores implicados en la expansión de las epidemias de grafiosis. Aunque puede transmitirse a través de injertos radiculares, son los escolítidos, junto con la acción globalizadora del hombre, los verdaderos responsables de la transmisión de la enfermedad a gran escala (WEBBER, 2000; PAJARES et al., 2003). Los escolítidos siempre existieron viviendo sobre los olmos sin suponer un peligro para su supervivencia, formando parte de un sistema ecológico en equilibrio. La aparición del hongo trastocó este equilibrio al establecer una nueva combinación insecto-patógeno en la que ambos resultan beneficiados a expensas de su acción conjunta, que ha supuesto la pérdida de alrededor de un billón de olmos.

Se han descrito siete especies de escolítidos que colonizan el floema de los olmos en la península Ibérica, de las cuales tres han sido especialmente relevantes en la propagación de la

grafiosis: *Scolytus scolytus*, *S. multistriatus* y *S. kirschii* (PAJARES Y GIL, 1990). Los escolítidos invernan como larvas en las galerías del floema de un olmo decaído, enfermo o moribundo sobre el que se han desarrollado. En primavera, las larvas invernantes pupan y se transforman en adultos que salen al exterior. Si el debilitamiento del olmo se debe a que ha sido previamente infectado y colonizado por la grafiosis, los insectos adultos, al salir al exterior, portan en su cuerpo esporas del patógeno desarrolladas en las galerías de pupación (PAJARES et al., 2003). Tras su emergencia, los insectos buscan árboles apropiados para su reproducción. Durante esta búsqueda, un cierto número de individuos se detiene en las copas de los olmos sanos para alimentarse, realizando pequeñas mordeduras en el floema de las horcaduras de los ramillos. Las esporas transportadas por el insecto encuentran en las heridas de alimentación un microambiente adecuado para su germinación y crecimiento hacia el sistema vascular del árbol (PAJARES et al., 2003). A continuación, el hongo se expandirá por el xilema causando la embolia de los conductos (Figura 1).

Se ha evidenciado que los escolítidos muestran distintas preferencias de alimentación según las distintas especies de olmo presentes en España. En particular, *Ulmus laevis* y *U. glabra* son menos preferidos por los escolítidos que *U. minor* y *U. pumila* (PAJARES, 2004). Asimismo, existen diferencias de preferencia intraespecíficas en *U. minor*, lo que abre la posibilidad de que la mejora genética de la especie no sólo se centre en la resistencia hacia el patógeno, sino también hacia el vector.

Los escolítidos son capaces de percibir compuestos volátiles de los olmos, que actúan en sinergia con las feromonas emitidas por los insectos. Sin embargo, en ausencia de feromonas, la localización a gran distancia de olmos sanos es cuestionable (PAJARES, 2004). Parece probable que los escolítidos encuentren a sus hospedantes siendo guiados por una atracción general hacia la vegetación y las siluetas arbóreas. Tras la llegada a un árbol, la aceptación del hospedante estaría determinada por el olfato a corta distancia y por el gusto. La alta especificidad en la selección del hospedante puede explicarse por el efecto combinado de estimulantes de alimentación en el árbol junto con la ausencia de

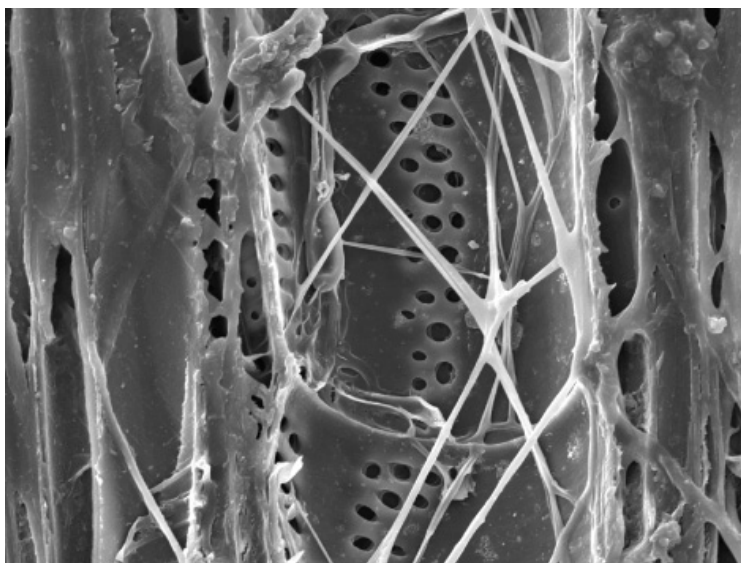


Figura 1. Fotografía realizada mediante un microscopio electrónico de barrido mostrando hifas del hongo patógeno de la grafiosis (*Ophiostoma novo-ulmi*) colonizando un elemento vascular de la madera temprana de un olmo. Durante el proceso de colonización del xilema el hongo causa la cavitación de los elementos conductores, ocasionando un déficit hídrico al árbol. Foto: Luis García Esteban

factores de disuasión de alimentación (ver NORRIS, 1977). Dado que los estimulantes de alimentación identificados hasta la fecha no son específicos de los olmos, la selección del hospedante está probablemente determinada por factores de disuasión. Algunos triterpenos y esteroides aislados en la corteza de *U. glabra* y *U. laevis* pueden ser responsables del efecto disuasorio hacia los escolítidos mostrado por estas especies de olmo (MARTÍN-BENITO et al., 2005).

LA RESISTENCIA DE LOS OLMOS

Paralelamente a la búsqueda y selección de olmos resistentes realizada en el programa, se han tratado de esclarecer qué factores están implicados en la supervivencia de ciertos olmos. En algunos casos, la resistencia puede deberse a que el árbol no atrae a los escolítidos debido a factores de disuasión antes comentados. En otros casos en los que se produce la transmisión pero el árbol no muestra síntomas de enfermedad, las causas de la resistencia son más complejas. Podemos hablar de resistencia genética cuando el patógeno no es capaz de suprimir o reprogramar los genes de resistencia del árbol, lo que lleva a su rápida activación impidiendo el establecimiento del patógeno en la planta (JONES

& DANGL, 2006). En otros casos, la resistencia es de tipo ambiental, ya que se ha comprobado que olmos que muestran resistencia a *O. novo-ulmi* en campo son altamente susceptibles al inocular artificialmente el patógeno en réplicas clonales de los mismos en parcelas experimentales (e.g., MARTÍN et al., 2010a).

La resistencia de tipo ambiental se debe a múltiples factores y ha sido objeto de estudio en el programa. Factores climáticos como la sequía pueden tener cierta influencia en la expresión de síntomas al modificar la estructura de la madera, afectando así a la expansión del patógeno por el árbol (SOLLA Y GIL, 2002). Además, se ha demostrado que la aplicación en el suelo de determinados compuestos fenólicos incrementa la resistencia de los olmos al patógeno (MARTÍN et al., 2008; 2010a,b). Este proceso puede explicar la resistencia observada en la olmeda de Casa Eulogio (Figura 2), en Rivas-Vaciamadrid, donde en las últimas décadas se aplicaron productos desinfectantes para el ganado basados en estos fenoles (MARTÍN et al. 2010a). Otro de los factores en vías de investigación sería la flora de microorganismos que habitan el xilema, bien por antagonismo hacia el patógeno o por inducción de resistencia sistémica en el árbol. Trabajos previos demuestran que la resistencia a la grafiosis puede ser parcialmente inducida



Figura 2. Olmeda de Casa Eulogio en Rivas-Vaciamadrid (Madrid), ejemplo de resistencia ambiental ante la grafiosis. La aplicación durante décadas de productos desinfectantes para el ganado basados en compuestos fenólicos podría ser la causa de la ralentización de la expansión de la grafiosis en la olmeda. Foto: Juan Antonio Martín

mediante la inoculación artificial con organismos de baja patogenicidad (e.g., SOLLA & GIL, 2003; HUBBES, 2004). Estudios preliminares realizados en el programa sugieren la existencia de una alta diversidad fúngica en los olmos, la cual está condicionada por el grado de resistencia del árbol a la grafiosis, así como la presencia de hongos que muestran una fuerte actividad antagonista hacia *O. novo-ulmi*. El estudio de los microorganismos asociados a los olmos incrementará el conocimiento de los posibles factores ambientales implicados en la resistencia.

Los mecanismos de resistencia de los olmos ante la grafiosis están encaminados a restringir el establecimiento y dispersión del patógeno en el sistema vascular. Existen mecanismos de tipo constitutivo, presentes antes de que se produzca la infección, como son determinados caracteres anatómicos del xilema. Así, los olmos que al inicio de su periodo vegetativo forman vasos de gran diámetro suelen ser altamente susceptibles al patógeno (SOLLA Y GIL, 2002; SOLLA et al., 2005a; MARTÍN et al., 2009). Estos grandes vasos conducen un elevado flujo de savia que favorece la dispersión de los propágulos del hongo. Por otra parte, estos vasos son más susceptibles a la cavitación causada por la actividad de las sustancias emitidas por el patógeno. Ésto,

unido a que los grandes vasos (>160 μm) contribuyen a más de la mitad del flujo de savia total anual (SOLLA et al., 2005a) implica que, ante la cavitación y embolia de los grandes vasos de la madera temprana, el árbol ve muy comprometida su capacidad conductora. Asimismo, se ha evidenciado la implicación en la resistencia del tamaño de las punteaduras areoladas y de los radios medulares (MARTÍN et al., 2009). Se piensa que estas estructuras podrían estar también implicadas en la velocidad de dispersión del patógeno por el xilema.

Otros mecanismos son inducidos tras la infección e implican la acumulación de metabolitos de actividad antifúngica en las células parenquimáticas que circunscriben los tejidos infectados (DUCHESNE, 1993). Posteriormente, el cambium genera bandas tangenciales de células de parénquima de pared suberizada (Figura 3), con el fin de impedir la dispersión radial del hongo hacia el cambium (MARTÍN et al., 2005). Además, las células de parénquima que rodean a los vasos penetran a través de las punteaduras en el lumen del elemento conductor taponándolo (formación de tilosas) e impidiendo la dispersión axial del hongo. La eficacia de los mecanismos inducidos va a depender por una parte de su rapidez de activación, y por otra de la magnitud

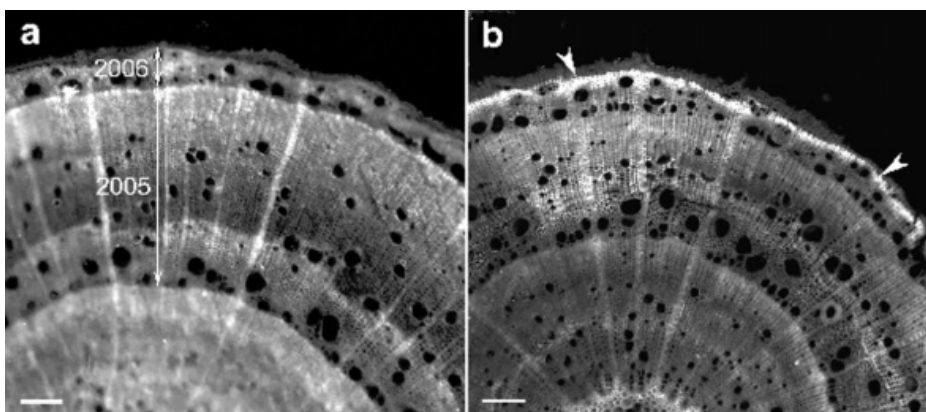


Figura 3. Fotografías realizadas mediante un microscopio óptico bajo luz ultravioleta, en el que se observan dos cortes histológicos transversales de dos olmos, en los que se aprecian los anillos de crecimiento de los años 2005 y 2006. La fotografía (a) corresponde a un olmo susceptible y la (b) a un olmo resistente tras ser inoculados con el patógeno de la grafiosis. Se aprecia como el olmo resistente, a diferencia del susceptible, forma una banda tangencial de células suberizadas (flechas) en respuesta a la infección. Fotos: Juan Antonio Martín

de la respuesta. Su activación puede producirse bien por una infección de grafiosis o bien por la acción de otro organismo (SOLLA *et al.*, 2003) y, en ocasiones, por la aplicación de una sustancia inductora de resistencia, como el ácido salicílico (MARTÍN *et al.*, 2010b), o incluso ligeramente tóxica para el árbol (MARTÍN *et al.*, 2010a).

Dado que los olmos muestran resistencia juvenil a la grafiosis, no se puede comprobar la resistencia de los genotipos hasta el cuarto año de edad (SOLLA *et al.*, 2005b), lo que hace que el proceso de selección y mejora de olmos resistentes se dilate en el tiempo. Por ello, se han tratado de desarrollar técnicas de selección precoz de olmos resistentes. Entre ellas se ha investigado el uso de cultivos *in vitro* de callos y de células de hojas de olmo sobre los que se aplicaron filtrados de cultivos del patógeno conteniendo las toxinas generadas por el mismo (DIEZ & GIL, 1998a). Mediante estos ensayos, no se ha observado una relación consistente entre la resistencia a la grafiosis y el crecimiento de los cultivos celulares sometidos a la acción de los filtrados fúngicos, debido a que la acción de los componentes del medio de cultivo del hongo ejercen una alta influencia en los cultivos celulares. Asimismo, se ha tratado de correlacionar la resistencia con la actividad de distintas enzimas relacionadas con la defensa, como la fenilalanina amonio liasa (PAL) (DIEZ & GIL, 1998b). Pese a que se constató la activación de la PAL tras la inoculación de los cultivos celulares con esporas de *O. novo-*

ulmi, no se observó relación con el grado de resistencia a la enfermedad. Estos resultados desaconsejaron el uso de técnicas de cultivo *in vitro* para la selección precoz de olmos resistentes, por lo que se siguen usando técnicas de selección *in vivo* con planta de cuatro savias.

LA INCLUSIÓN DE LAS TÉCNICAS MOLECULARES EN EL PROGRAMA DEL OLMO

El empleo de marcadores moleculares en el estudio de los olmos

En los últimos años, el desarrollo de la biotecnología está creando nuevas expectativas para la mejora del olmo frente a la grafiosis. Así, en Estados Unidos se ha creado el primer olmo transgénico que incorpora un gen que codifica un péptido antimicrobiano sintético (NEWHOUSE *et al.*, 2007), el cual confiere al olmo cierto grado de resistencia. Además de la transformación genética, cuya introducción en la naturaleza puede originar la misma controversia que la mostrada con otras especies agronómicas, el avance de los marcadores moleculares está permitiendo salvar obstáculos y entender procesos antes inabordables.

Un objetivo principal del programa es conocer la diversidad existente en las poblaciones ibéricas de olmo, con el fin de entender qué recursos genéticos debemos conservar y cuáles debemos cruzar para generar un material resistente lo sufi-

cientemente diverso para permitir la reintroducción del olmo en el bosque con garantías de éxito reproductivo. El estudio de la diversidad de las especies se ha abordado tradicionalmente a través de caracteres morfológicos, cualitativos y cuantitativos. Ahora bien, estos caracteres suelen depender de la expresión de varios genes, de interacciones entre éstos y de las condiciones ambientales. Determinados marcadores moleculares se han desarrollado como técnicas que permiten el estudio de la diversidad genética independientemente del ambiente, por lo que se consideran marcadores neutros.

En el campo de la conservación y uso de los recursos genéticos encontramos un amplio abanico de estudios que utilizan los marcadores moleculares: medida de la diversidad genética y diferenciación de poblaciones naturales cultivadas o mejoradas, estimación del flujo génico y migración (e.g., RENDELL & ENNOS, 2002; GRIVET & PETIT, 2003), análisis de paternidad y parentesco (e.g., SELKOE & TOONEN, 2006), control de cruzamientos y predicción del comportamiento de híbridos (e.g., VALBUENA *et al.*, 2005; KITAHARA *et al.*, 2005), estudios de taxonomía, filogenia y recolonización postglacial (e.g., TAKEZAKI & NEI, 1996; MAGRI *et al.*, 2006), etc.

La taxonomía de las especies del género *Ulmus* en Europa ha sido tradicionalmente compleja (RICHENS, 1980) debido a la influencia de factores como las glaciaciones, el intenso uso que históricamente el hombre ha hecho de los olmos, los problemas de hibridación entre ellos y la influencia de la grafiosis sobre sus poblaciones. El desarrollo de marcadores moleculares de ADN, tales como PCR-RFLP de cloroplasto (DEMESURE *et al.*, 1995; DUMOLIN-LAPÈGUE *et al.*, 1997), microsatélites nucleares (WHITELEY *et al.*, 2003; COLLADA *et al.*, 2004; ZALAPA *et al.*, 2008) y AFLPs (GIL *et al.*, 2004) ha permitido evaluar dicha diversidad, uno de los objetivos del Programa europeo y del programa español del olmo.

La utilización de marcadores de ADN de cloroplasto (análisis de cinco regiones variables mediante PCR-RFLP) ha demostrado la existencia de dos linajes bien diferenciados genéticamente en la especie *U. minor*, consecuencia de la introducción y dispersión por el hombre de uno de ellos desde Italia (GIL *et al.*, 2004). Estos olmos de origen italiano fueron introducidos y

propagados por los agricultores romanos como soportes de las vides, y derivan de un único clon estéril recomendado por el agronomista Columela, el olmo Atinio. Su gran difusión se debe a que no sólo era un sostén adecuado para la vid, sino que era apreciado como pasto invernal para el ganado, es apto para muchos tipos de terreno, soporta bien la sequía estival, se reproduce con facilidad mediante estacas, y ofrece una madera de buenas propiedades. Este clon fue ampliamente difundido por el centro y noroeste de la Península así como en Inglaterra. En esta isla se convirtió en el olmo más abundante y reconocible, hasta el punto que los taxónomos ingleses llegaron a considerar este cultivar romano como una especie (*U. procera*).

El olmo Atinio posee un carácter funcionalmente masculino que tiene su origen no en las características florales de los pies, pues en todos los casos las flores son morfológicamente hermafroditas, sino en la presencia de un aborto generalizado de la semilla que hace que la sámara sea vana (LÓPEZ-ALMANSA *et al.*, 2004). En los olmos cosexuales, aunque un cierto número de semillas no completan su desarrollo, este aborto no es generalizado y, por tanto, la mayor parte de las sámaras están semilladas. Como consecuencia de todo ello, los pies funcionalmente masculinos pueden reproducirse exclusivamente a través del polen, frente a los pies cosexuales que se reproducen tanto a través del polen como de la producción de semilla.

El olmo presente de forma abundante (aunque en la actualidad residual debido a la grafiosis) en la España silíceo corresponde mayoritariamente al clon Atino (FUENTES, 2008), y es por tanto resultado del manejo humano. Este hecho contradice a los estudios paleobotánicos que acreditaban la existencia de polen de olmo en los yacimientos de la España occidental, salvo que este polen perteneciera a otra especie de olmo. En los últimos años, se han localizado bastantes ejemplares y pequeñas olmedas de *U. laevis*, especie comúnmente considerada como asilvestrada, en ubicaciones en las que su introducción se considera muy improbable. Se estableció entonces la hipótesis de que *U. laevis* pudiera ser autóctona y que explicara el abundante registro paleopolínico en la España silíceo. Estudios comparativos entre poblaciones europeas e ibéricas de

U. laevis mediante marcadores moleculares nucleares y de cloroplasto (WHITELEY, 2004; FUENTES, 2008; NIELSEN Y KJÆR, 2010) revelaron que existía mayor diversidad genética en el conjunto de los individuos ibéricos que en toda Europa occidental, lo que evidencia que estamos ante una especie autóctona. La Península había sido por tanto su refugio suroccidental durante las glaciaciones, desde donde tuvo lugar su recuperación en Europa. La consideración del *U. laevis* como especie autóctona abre nuevas posibilidades en la mejora de los olmos ibéricos ante la grafiosis. Especialmente interesante es la baja aceptación de esta especie de olmo por los escolítidos, lo que ha propiciado que sea la especie europea de olmo menos afectada por las pandemias (MACKENTHUN, 2004).

El empleo de microsatélites nucleares y AFLPs (GIL *et al.*, 2004, FUENTES, 2008) ha aportado información esencial para la correcta interpretación de los resultados filogeográficos obtenidos a partir de los marcadores de cloroplasto. En especial, han sido determinantes en la detección de genotipos clonales de olmo común propagados por el hombre (olmo Atinio). La homogeneidad genética resultante de las plantaciones masivas de un clon ha erosionado la diversidad natural de la especie y explica la rápida propagación de la grafiosis en la Península e Inglaterra.

Los microsatélites nucleares se han utilizado en la caracterización genética de los parentales de los cruces controlados de *U. minor* realizados en el programa y en el análisis de la progenie, lo que permite detectar posibles contaminaciones de material no procedente de los cruces. La validación del material clonal resistente a la grafiosis también se realiza mediante la caracterización genética de dicho material con microsatélites nucleares.

En la actualidad se cuenta con una librería diseñada para identificar el mayor número de unigenes, a partir de los parentales utilizados en dos cruces controlados entre clones resistentes y susceptibles. Con esta librería se pretenden generar mapas genéticos de alta densidad para *U. minor* mediante el análisis de las progenies de referencia diseñadas para optimizar la segregación de caracteres relacionados con la resistencia a la grafiosis. Se analizarán también otros caracteres de interés que muestren segregación. La obtención de los mapas genéticos necesitará la

identificación de SNPs (variaciones de nucleótidos en las secuencias) mediante secuenciación masiva de cDNAs, que se expresan en condiciones normales en la planta (expresión constitutiva), o que son inducidos por diferentes tipos de estrés tanto abiótico como biótico. Además, necesitará la identificación de regiones del genoma que controlan la respuesta a la grafiosis mediante la búsqueda de asociaciones entre genotipos y fenotipos en la progenie segregante. Para la consecución de este objetivo se contempla la caracterización fenotípica de la respuesta a la infección por el hongo *O. novo-ulmi* en un estudio clonal de la progenie de referencia.

El empleo de marcadores moleculares en el estudio del patógeno

Los avances en las técnicas moleculares también han ayudado a conocer la diversidad genética de los agentes causales de la enfermedad en la península Ibérica y Baleares. El empleo de RAPD, a pesar de sus limitaciones, junto con ensayos de fertilidad, permitieron confirmar la presencia de las dos subespecies de la especie agresiva (*O. novo-ulmi*), junto con la especie menos agresiva (*O. ulmi*) en España (SOLLA *et al.*, 2008).

Para el estudio de las poblaciones del agente causal de la grafiosis por el programa del olmo, se han desarrollado recientemente marcadores moleculares que evitan los problemas del RAPD, como su escasa repetitividad. Esto ha permitido mejorar los análisis genéticos de sus poblaciones, con el objetivo de conocer las fuerzas que dirigen su evolución. Se han desarrollado dos tipos marcadores: microsatélites, considerados como marcadores neutros y SNP para genes funcionales y, por tanto, susceptibles de verse sometidos a procesos de selección, ya que podrían permitir la adaptación de los patógenos a nuevos ambientes o condiciones del ambiente. Con los microsatélites se está analizando la estructuración geográfica de diversidad genética de sus poblaciones y el flujo genético entre poblaciones.

Los genes funcionales para los que se han desarrollado marcadores moleculares corresponden en su mayoría a genes homólogos, a genes implicados en la enfermedad en otros hongos patógenos, o que modulan su agresividad. Con estos marcadores se pretenden descifrar los mecanismos que favorecen la evolución de las

poblaciones actuales de estos hongos y eventualmente pudieran llevar a la aparición de nuevas variantes más agresivas. Entre los mecanismos objeto de estudio está la hibridación introgresiva entre las diversas especies y subespecies en la aparición de nuevas cepas agresivas. Para ello, se estudian las diferencias alélicas en dichos genes entre diversas poblaciones, y los niveles de introgresión de los genes de una especie en otra.

EL PROCESO DE SELECCIÓN, MEJORA Y CATALOGACIÓN DE OLMOS RESISTENTES

Metodología empleada

La secuencia de tareas del proceso de selección y mejora de olmos resistentes se esquematiza en la Figura 4. El primer paso consiste en la prospección de olmos en campo o entornos urbanos que hayan sobrevivido a las epidemias de grafiosis. Especialmente interesantes son aquellos ejemplares cuyo porte y avanzada edad les hagan candidatos a ser resistentes, dado que es probable que en algún momento de su vida hayan estado en contacto con la enfermedad.

Estos ejemplares se someten a un análisis genético preliminar para evitar incluir en el programa de selección y mejora a individuos derivados del clon Atino, altamente susceptible a *O. novo-ulmi* (GIL et al., 2004). Posteriormente se procede a la propagación de estos olmos preseleccionados, bien mediante recogida de semilla o mediante técnicas de reproducción vegetativa que permiten obtener réplicas clonales del ortet.

Tradicionalmente se vienen empleando técnicas de propagación vegetativa mediante estaquillado aéreo o de raíz (BURÓN et al., 2003). Sin embargo, estas técnicas ofrecen un bajo porcentaje de éxito, ya que tan solo un 16% de las estaquillas iniciales llegan a generar una nueva planta. La puesta a punto de técnicas de micropropagación in vitro de los olmos (DÍEZ Y GIL, 2004; BIROSCÍKOVÁ et al., 2004) ofrece mayores tasas de éxito, con un porcentaje de enraizamiento superior al 60% y unos porcentajes de eficacia (% de explantos convertidos en planta) de entre el 40 y el 90% según el genotipo, lo que representa un considerable avance frente a las técnicas de macropropagación. Por ello, las técnicas de propagación tradicional se están sustituyendo por las de micropropagación, que además ofrecen meno-

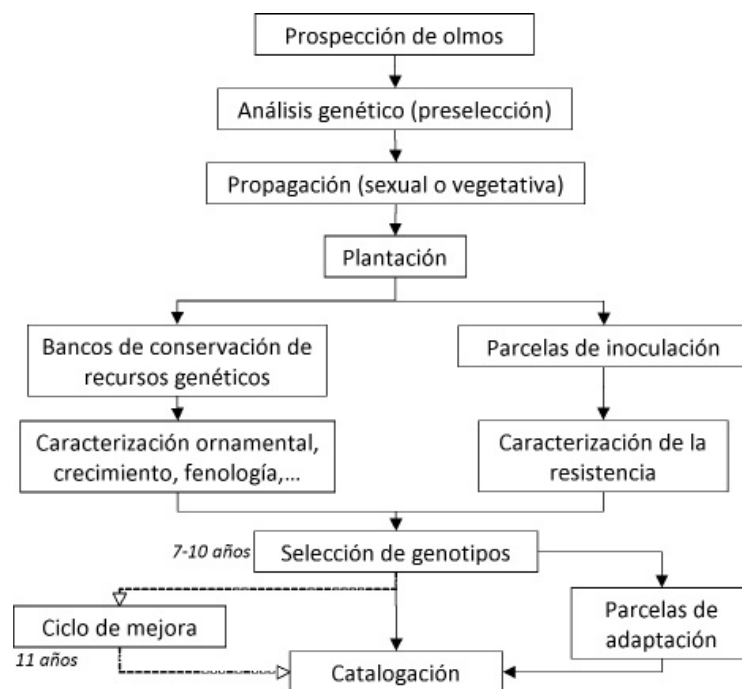


Figura 4. Secuencia de tareas realizadas en el programa para la obtención de olmos ibéricos resistentes a la grafiosis. Se indica el tiempo aproximado en lograr la primera selección de genotipos (7-10 años) y en completar un ciclo de mejora (11 años)

res requisitos de material de partida, independencia del condicionante estacional y un mejor control sobre el estado de madurez de la planta.

Los individuos propagados y plantados en envases se someten a un periodo de aclimatación de dos savias en umbráculo. Posteriormente, son plantados en parcelas de conservación de recursos genéticos, o bien en parcelas experimentales donde se evalúa su resistencia a la grafiosis. En ambos tipos de parcelas, la fenología y crecimiento de los árboles son caracterizados, ya que son factores relacionados con la resistencia (ver SANTINI et al., 2004). Además, en estas parcelas se realizan estudios de tipo científico con el fin de evaluar la influencia de factores anatómicos, fisiológicos, genéticos, químicos o biológicos en la resistencia a la enfermedad.

Para evaluar la resistencia de los olmos propagados es necesario inducir la enfermedad. Los árboles han de tener más de tres savias y un tamaño superior a un metro para que los síntomas de marchitamiento inducidos sean equivalentes en porcentaje de copa afectada a los del árbol adulto (SOLLA et al., 2005b). El inóculo se prepara mediante cepas de grafiosis aisladas en laboratorio a partir de ramillos infectados. Las cepas aisladas se caracterizan y se seleccionan aquellas que presenten un mayor crecimiento en placa Petri, ya que el crecimiento *in vitro* se correlaciona con la virulencia del patógeno (SOLLA et al., 2008). A partir de la cepa seleccionada, se prepara una suspensión de esporas en agua destilada, y se ajusta a una concentración de 10^6 esporas por ml.

La inoculación se realiza a mediados de primavera, cuando el árbol acaba de formar los grandes vasos de la madera temprana, lo que permite una máxima difusión de esporas por los vasos del xilema. Posteriormente, se evalúa su marchitamiento foliar mediante el porcentaje de hojas secas respecto al total de la copa transcurridos 30; 60 y 120 días tras la inoculación. Ésta se realiza mediante una incisión en la base del tronco realizada con una hoja de navaja afilada en la cual se depositan 0,1 ml de la suspensión de esporas, que es absorbida por el flujo de savia.

Los genotipos que muestran marchitamientos bajos (0-30%) tras dos años consecutivos de inoculaciones se consideran resistentes a la grafiosis y pueden ser catalogados por la Administración como material forestal de repro-

ducción cualificado. La catalogación permite la propagación y uso de estos clones para fines forestales. Para ser catalogados como resistentes, los clones deben cumplir los siguientes requisitos: (i) El clon objeto de catalogación debe de estar plantado en una parcela controlada junto con un clon de referencia resistente y un clon de referencia susceptible; (ii) El número de réplicas del clon en la parcela debe ser como mínimo de seis; (iii) El marchitamiento foliar medio mostrado por el clon debe ser igual o inferior al 30% de la copa durante dos años de inoculación consecutivos, siempre y cuando el clon de referencia susceptible muestre síntomas mayores del 70% de marchitamiento; (iv) los ensayos de resistencia deben realizarse en planta mayor de tres savias; y (v) deben describirse sus características morfológicas, fenológicas, reproductivas, y genéticas. La categoría de material cualificado tiene un carácter provisional, siendo necesario el paso a la categoría de material controlado para que adquiera un carácter permanente (ALÍA et al., 2005). Para ello, los clones deben cumplir los mismos requisitos especificados para material cualificado y, además, cumplir dichos requisitos en ensayos realizados bajo un segundo ambiente.

Los genotipos resistentes son además sometidos a un ciclo de mejora genética, donde se hibridan entre ellos mediante cruces controlados con el fin de incrementar su resistencia. Los brinzales obtenidos de los cruces se plantan en parcelas experimentales donde se les inocula artificialmente la grafiosis al cuarto y quinto año de edad. Aquellos brinzales más resistentes se propagan vegetativamente para comprobar de nuevo su resistencia en un número de réplicas clonales mayor o igual a seis, con el fin de dar validez estadística a la resistencia del clon. Estas últimas inoculaciones se realizan de nuevo al cuarto y quinto año de edad, con lo que para completar el ciclo se necesita un mínimo de 10 años. Una vez se seleccionen los genotipos más resistentes, éstos se vuelven a cruzar comenzando un nuevo ciclo de mejora.

Olmos resistentes obtenidos

En la actualidad, siete clones de *U. minor* (Dehesa de la Villa, Ademuz, Majadahonda, Dehesa de Amaniél, Retiro, Toledo y Fuente Umbría) están en proceso de catalogación como material forestal de reproducción cualificado. Estos siete

clones podrían pasar a la categoría de material controlado en un plazo de cinco años, tras ser ensayada su resistencia bajo un segundo ambiente. Además, se han seleccionado por su elevada resistencia 20 brinzales de *U. minor* procedentes de cruces controlados de primera generación entre cinco parentales de resistencia media-alta. Tras su propagación clonal e inoculación cuando cumplan cuatro savias, se espera que el número de genotipos de *U. minor* resistentes que pasen a ser catalogados se incremente considerablemente.

El programa ha obtenido además genotipos fruto de la hibridación entre diferentes especies de olmos, incluyendo olmos de origen asiático. Éstos constituyen la principal fuente de genes de resistencia en los programas de mejora (SMALLEY & GURIES, 2000), existiendo una amplia tradición en el uso de *U. pumila*, *U. davidiana* var. *japonica* y *U. wallichiana* en la mejora del olmo. En el programa español, estos olmos asiáticos se han cruzado con individuos autóctonos con el fin de conseguir una mejor adaptación a las condiciones ambientales de la Península y conservar, al menos en parte, las cualidades ornamentales de nuestros olmos. Seis de estos olmos híbridos han sido ya ensayados como réplicas clonales ($N \geq 6$) y bajo dos ambientes, con lo que cumplirían los requisitos necesarios para ser catalogados como material controlado. No obstante, estos híbridos no pueden ser catalogados para su uso con fines forestales, pues no están incluidos en la normativa que regula las especies que pueden ser comercializadas con este fin, dado su carácter parcialmente exótico. Sin embargo, pueden ser utilizadas en jardinería de ambientes urbanos dadas sus buenas cualidades ornamentales y buen crecimiento. Para su comercialización, el programa pretende registrar estos olmos como variedades ornamentales resistentes a la grafiosis.

CONCLUSIONES

La grafiosis es una enfermedad compleja, que implica interacciones dinámicas entre varios agentes. El éxito en la expansión a gran escala de las dos pandemias de grafiosis por el hemisferio norte muestra la gran virulencia de la grafiosis y su alta tolerancia a variaciones ambientales, aspectos que la convierten en una enfermedad muy difícil de

controlar. Los programas de mejora genética constituyen la mejor y quizás única alternativa para recuperar las poblaciones de olmo.

Tras 25 años de investigación y mejora, el programa español del olmo ha sentado las bases para ofrecer un futuro esperanzador a la especie, al obtener no sólo individuos resistentes mediante su cruzamiento con especies asiáticas, sino también individuos autóctonos con un elevado grado de resistencia. Se espera que en los próximos años el número de genotipos ibéricos resistentes se incremente considerablemente. Su catalogación por la Administración permitirá devolver al olmo a un lugar relevante en los bosques de ribera mediterráneos. Su singularidad frente a otras especies riparias radica en su buena tolerancia a la sequía estival, lo que le permite ocupar una posición más alejada del cauce que sauces, chopos o alisos. Esta capacidad le otorga también adecuación como árbol ornamental en áreas sometidas a periodos de sequía, lo que ha propiciado que sea una especie muy difundida y arraigada a la cultura española.

El avance de las técnicas moleculares está permitiendo salvar obstáculos y comprender aspectos biológicos que en el futuro harán que la mejora del olmo frente a la grafiosis sea más eficaz y precisa. El conocimiento de la diversidad de los olmos, los genes implicados en la resistencia y en la virulencia del patógeno permitirá, entre otros, la selección precoz de olmos resistentes, el establecimiento de los cruces más apropiados para incrementar la resistencia frente al patógeno e incluso el desarrollo de métodos biotecnológicos de control de la enfermedad que neutralicen la virulencia del hongo.

Los avances presentados en este trabajo han implicado la participación y colaboración de muchas personas e instituciones durante los 25 años de vida del programa, a nivel nacional e internacional. El enfoque multidisciplinar de los estudios ha permitido obtener un conocimiento profundo y global del complejo grafiosis, sin el cual, cualquier intento de recuperación del olmo sería probablemente inútil.

Agradecimientos

A todas las personas que durante los 25 años de vida del programa español del olmo han par-

ticipado en los trabajos técnicos y científicos. A la Dirección General del Desarrollo Rural y Política Forestal por su apoyo financiero.

BIBLIOGRAFÍA

- ALÍA, R.; ALBA, N.; AGÚNDEZ, D. E IGLESIAS, S. (COORDS.); 2005. *Manual para la Comercialización y Producción de Semillas y Plantas Forestales. Materiales de base y de reproducción*. Serie Forestal. DGB. Madrid.
- BIROSCÍKOVÁ, M.; SPISÁKOVÁ, K.; LIPTÁK, S.; PICHLER, V. & DURKOVIC, J.; 2004. Micropropagation of mature wych elm (*Ulmus glabra* Huds.). *Plant Cell. Rep.* 22: 640-644.
- BRASIER, C.M.; 2000. Intercontinental spread and continuing evolution of the Dutch elm disease pathogens. In: C.P. Dunn (ed.), *The Elms: Breeding, Conservation and Disease Management*: 61-72. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- BRASIER, C.M. & MEHROTRA, M.D.; 1995. *Ophiostoma himal-ulmi* sp. nov., a new species of Dutch elm disease fungus endemic to the Himalayas. *Mycol. Res.* 99: 205-215.
- BURÓN, M.; DÍEZ, J.J. Y GIL, L.; 2003. Propagación vegetativa de los olmos. En: L. Gil, A. Solla y S. Iglesias (eds.), *Los Olmos Ibéricos: Conservación y Mejora Frente a la Grafiosis*: 185-212. Organismo Autónomo Parques Nacionales. Madrid.
- COLLADA, C.; FUENTES-UTRILLA, P.; GIL, L. & CERVERA, M.T.; 2004. Characterization of microsatellite loci in *Ulmus minor* Miller and cross-amplification in *U. glabra* Hudson and *U. laevis* Pall. *Molecular Ecology Notes* 4(4): 731-732.
- COLLIN, E.; BILGER, I.; ERIKSSON, G. & TUROK, J.; 2000. The conservation of elm genetic resources in Europe. In: C.P. Dunn (ed.), *The Elms: Breeding, Conservation and Disease Management*: 281-293. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- DEMASURE, B.; SODZI, N. & PETIT, R.J.; 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology* 4: 129-131.
- DÍEZ, J.J. & GIL, J.; 1998a. Effects of *Ophiostoma ulmi* and *Ophiostoma novo-ulmi* culture filtrates on elm cultures from genotypes with different susceptibility to Dutch elm disease. *Eur. J. For. Path.* 28: 399-407.
- DÍEZ, J.J. & GIL, J.; 1998b. Variability in phenylalanine ammonia-lyase activity in elm among cell cultures of elm clones inoculated with *Ophiostoma novo-ulmi* spores. *Plant Pathol.* 47: 687-692.
- DÍEZ, J.J. & GIL, L.; 2004. Micropropagation of *Ulmus minor* and *U. minor* x *U. pumila* from 4-year-old ramets. *Inv. Agraria; Sist. Rec. For.* 13: 249-254.
- DUCHESNE, L.C.; 1993. Mechanisms of resistance: can they help save susceptible elms? In: M.B. Sticklen and J.L. Serald (eds.), *Dutch Elm Disease Research. Cellular and Molecular Approaches*: 239-254. Springer-Verlag. New York.
- DUMOLIN-LAPÈGUE, S.; PEMONGE, M.H. & PETIT, R.J.; 1997. An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Molecular Ecology* 6: 393-397.
- FUENTES, P.; 2008. *Estudio de la variabilidad genética del género Ulmus L. en España mediante marcadores moleculares*. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid.
- GIL, L.; FUENTES-UTRILLA, P.; SOTO, A.; CERVERA, M.T. & COLLADA, C.; 2004. English elm is a 2000-year-old Roman clone. *Nature* 431 (7012): 1053-1053.
- GRIVET, D. & PETIT, R.J.; 2003. Chloroplast DNA phylogeography of the hornbeam in Europe: Evidence for a bottleneck at the outset of postglacial colonization. *Conservation Genetics* 4: 47-56.
- HUBBES, M.; 2004. Induced resistance for the control of Dutch elm disease. *Inv. Agraria; Sist. Rec. For.* 13: 185-196.
- JONES, J.D.G. & DANGL, J.L.; 2006. The plant immune system. *Nature* 444(7117): 323-329.
- KITAHARA, K., MATSUMOTO, S.; YAMAMOTO, T.; SOEJIMA, J.; KIMURA, T.; KOMATSU H. & ABE, K.; 2005. Molecular characterization of apple cultivars in Japan by S-RNase analysis and SSR markers. *J. Japan. Soc. Horticult. Sci.* 130: 885-892.

- LÓPEZ-ALMANSA, J.C.; YEUNG, E.C. & GIL, L.; 2004. Abortive seed development in *Ulmus minor* (Ulmaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 145: 455-467.
- MACKENTHUN, J.F.; 2004. The role of *Ulmus laevis* in German floodplain landscapes. *Inv. Agraria; Sist. Rec. For.* 13: 55-63.
- MAGRI, D.; VENDRAMIN, G.G.; COMPS, B.; DUPANLOUP, I.; GEBUREK, T.; GOMORY, D.; LATA, OWA, M.; LITT, T.; PAULE, L.; ROURE, J.M.; TANTAU, I.; VAN DER KNAAP, W.O.; PETIT, R.J. & DE BEAULIEU, J.L.; 2006. A new scenario for the Quaternary history of European beech populations: palaeobotanical evidence and genetic consequences. *New Phytologist* 171: 199-221.
- MARTÍN, J.A.; SOLLA, A.; WOODWARD, S. & GIL, L.; 2005. FT-IR spectroscopy as a new method for evaluating host resistance in the Dutch elm disease complex. *Tree Physiol.* 25: 1331-1338.
- MARTÍN, J.A.; SOLLA, A.; DOMINGUES, M.R.; COIMBRA, M.A. & GIL, L.; 2008. Exogenous phenol increase resistance of *Ulmus minor* to Dutch elm disease through formation of suberin-like compounds on xylem tissues. *Environ. Exp. Bot.* 64: 97-104.
- MARTÍN, J.A.; SOLLA, A.; ESTEBAN, L.G.; DE PALACIOS, P. & GIL, L.; 2009. Bordered pit and ray morphology involvement in elm resistance to Dutch elm disease. *Can. J. For. Res.* 39: 420-429.
- MARTÍN, J.A.; SOLLA, A.; GIL, L. & GARCÍA-VALLEJO, M.C.; 2010a. Phenological and histochemical changes of *Ulmus minor* due to root absorption of phenol: Implications for resistance to DED. *Environ. Exp. Bot.* 69: 175-182.
- MARTÍN, J.A.; SOLLA, A.; WITZELL, J.; GIL, L. & GARCÍA-VALLEJO, M.C.; 2010b. Antifungal effect and reduction of *Ulmus minor* symptoms to *Ophiostoma novo-ulmi* by carvacrol and salicylic acid. *Eur. J. Plant Pathol.* 127:21-32.
- MARTÍN-BENITO, D.; GARCÍA-VALLEJO, M.C.; PAJARES, J.A. & LÓPEZ, D.; 2005. Triterpenes in elms in Spain. *Can. J. For. Res.* 35: 199-205.
- MARTÍNEZ, B.; 1932. La grafiosis del olmo. *Montes e Industrias* 19: 499-503.
- MITTEMPERGER, L. & SANTINI, A.; 2004. The history of elm breeding. *Inv. Agraria; Sist. Rec. For.* 13: 161-177.
- NEWHOUSE, A.E.; SCHRODT, F.; LIANG, H.; MAYNARD, C.A. & POWELL, W.A.; 2007. Transgenic American elm shows reduced Dutch elm disease symptoms and normal mycorrhizal colonization. *Plant Cell Rep.* 26: 977-987.
- NIELSEN, L.R. & KJÆR, E.D.; 2010. Fine-scale gene flow and genetic structure in a relic *Ulmus laevis* population at its northern range. *Tree Genetics & Genomes* 6(5): 643-649.
- NORRIS, D.M. 1977. Role of repellents and deterrents in feeding of *Scolytus multistriatus*. In: P.A. Hedin (ed.), *Host Plant Resistance to Insects*: 215-230. ACS Symposium Ser. 62, American Chemical Society.
- PAJARES, J.A. 2004. Elm breeding for resistance against bark beetles. *Inv. Agraria; Sist. Rec. For.* 13: 207-215.
- PAJARES, J.A. Y GIL, L.; 1990. Los escolítidos del olmo, vectores de la grafiosis. En: L. Gil (ed.), *Los Olmos y la Grafiosis en España*: 165 - 211. ICONA. Madrid.
- PAJARES, J.A.; GIL, L. Y GONZÁLEZ, R.; 2003. Los escolítidos del olmo, transmisores de la grafiosis. En: L. Gil, A. Solla & S. Iglesias (eds.), *Los Olmos Ibéricos: Conservación y Mejora Frente a la Grafiosis*: 261-282. Organismo Autónomo Parques Nacionales. Madrid.
- RENDELL, S. & ENNOS, R.A.; 2002. Chloroplast DNA diversity in *Calluna vulgaris* (heather) populations in Europe. *Molecular Ecology* 11: 69-78.
- RICHENS, R.H.; 1980. On fine distinctions in *Ulmus L.* *Taxon* 29: 305-312.
- SANTINI, A.; GHELARDINI, L.; FALUSI, M.; BOHNENS, J.; BURON, M.; COLLIN, E.; SOLLA, A. & VANDEN BROECK, A.; 2004. Vegetative bud-burst variability of European elms. *Inv. Agraria; Sist. Recur. For.* 13: 37-45.
- SELKOE, K.A. & TOONEN, R.J.; 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615-629.
- SMALLEY, E.B. & GURIES, R.P.; 2000. Asian elms: sources of disease and insect resistance. In: C.P. Dunn (ed.), *The Elms: Breeding*,

- Conservation and Disease Management*: 215-230. Kluwer. Dordrecht.
- SOLLA, A. & GIL, L.; 2002. Influence of water stress on Dutch elm disease symptoms in *Ulmus minor*. *Can. J. Bot.* 80: 810-817.
- SOLLA, A. & GIL, L.; 2003. Evaluating *Verticillium dahliae* for biological control of *Ophiostoma novo-ulmi* in *Ulmus minor*. *Plant Pathol.* 52: 579-585.
- SOLLA, A.; BURÓN, M.; LÓPEZ-ALMANSA, J.C.; LÓPEZ, D.; MARTÍN, J.A.; IGLESIAS, S. Y GIL, L.; 2003. La conservación y mejora genética de los olmos en España. *En*: L. Gil, A. Solla & S. Iglesias (eds.), *Los Olmos Ibéricos: Conservación y Mejora Frente a la Grafiosis*: 411-432. Organismo Autónomo Parques Nacionales. Madrid.
- SOLLA, A.; MARTÍN, J.A.; CORRAL, P. & GIL, L.; 2005a. Seasonal changes in wood formation of *Ulmus pumila* and *U. minor* and its relation with Dutch elm disease. *New Phytologist* 166: 1025-1034.
- SOLLA, A.; MARTÍN, J.A.; OUELLETTE, G. & GIL, L.; 2005b. Influence of plant age on symptom development in *Ulmus minor* following inoculation by *Ophiostoma novo-ulmi*. *Plant Disease* 89: 1035-1040.
- SOLLA, A.; DACASA, M.C.; NASMITH, C.; HUBBES, M. & GIL, L.; 2008. Analysis of Spanish populations of *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi* using phenotypic characteristics and RAPD markers. *Plant Pathology* 57: 33-44.
- TAKEZAKI, N. & NEI, M.; 1996. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* 144: 389-399.
- VALBUENA, M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.C.; SORK, V.L.; COLLADA, C.; SOTO, A.; GOICOECHEA, P.G. & GIL, L.; 2005. Gene flow and hybridisation in a mixed oak forest (*Quercus pyrenaica* Willd. and *Quercus petraea* (Matts.) Liebl. in central Spain. *Heredity* 95: 457-65.
- WEBBER, J.F. 2000. Insect vector behavior and the evolution of Dutch elm disease. *In*: C.P. Dunn (ed.), *The Elms: Breeding, Conservation and Disease Management*: 47-60. Kluwer. Dordrecht.
- WHITELEY, R.; 2004. *Quantitative and molecular genetic variation in Ulmus laevis* Pall. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences
- WHITELEY, R.E.; BLACK-SAMUELSSON, S. & CLAPHAM, D.; 2003. Development of microsatellite markers for the European white elm (*Ulmus laevis* Pall.) and cross-species amplification within the genus *Ulmus*. *Molecular Ecology Notes* 3: 598-600.
- ZALAPA, J.E.; BRUNET, J. & GURIES, R.P.; 2008. Isolation and characterization of microsatellite markers for red elm (*Ulmus rubra* Muhl.) and cross-species amplification with Siberian elm (*Ulmus pumila* L.). *Molecular Ecology Resources* 8: 109-112.