



6º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

6CFE01-232

Montes: Servicios y desarrollo rural
10-14 junio 2013
Vitoria-Gasteiz



Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales
Vitoria-Gasteiz, 10-14 junio de 2013
ISBN: 978-84-937964-9-5
© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Nuevos Materiales Forestales de Reproducción de *Castanea sp.* de categoría cualificado

CUENCA VALERA, B.¹, LUQUERO RAMOS, L.² y OCAÑA BUENO, L.²

¹ Vivero de Ourense. TRAGSA. Crta. Maceda-Valdrey, km.2 32700 Maceda. Ourense. bcuenca@tragsa.es

² Departamento de Medio Natural. Subdirección de I + D + i. TRAGSA. C/ Cristóbal Bordiú nº 19-21 6º D. 28003 Madrid.

Resumen

TRAGSA realizó en la costa gallega en 2003 una selección de individuos de castaño del país aparentemente resistentes a la tinta. Se muestrearon áreas afectadas por la enfermedad, seleccionando árboles sanos de diámetro superior a 50 cm, con las mejores características de forma y calidad. Los genotipos seleccionados fueron establecidos en cultivo *in vitro* y las vitroplantas resultantes se testaron por resistencia a *Phytophthora cinnamomi*, se caracterizaron molecularmente para determinar su filiación genética, se criopreservaron y se establecieron en parcelas de ensayo para determinar: supervivencia a la implantación, sensibilidad al frío y/o sequía, precocidad de la brotación, forma del fuste, altura de la cruz, vigor, rectitud y dominancia apical. Los datos relacionados con la forma y pauta de crecimiento, se toman de manera provisional a los 3 años y definitiva a los 5 años. Con las características conocidas en este momento (resistencia a tinta, supervivencia a la implantación, precocidad y tasas de propagación vegetativa), se han registrado en el Catálogo Nacional de Materiales de Base (CNMB), como clones cualificados, 7 genotipos resistentes o altamente resistentes que se recomiendan para su uso como portainjertos tanto por su resistencia como por la mayor compatibilidad al injerto de variedades de fruto.

Palabras clave

Phytophthora cinnamomi, tinta, resistencia, castaño, clones, CNMB

1. Introducción

La incidencia de la tinta en España ha supuesto una alta regresión de la especie en las zonas litorales y la presencia cada vez más endémica y en un mayor número de zonas de la enfermedad (Galicia interior o en zonas elevadas). La precipitación anual y la duración del período de sequía son los principales parámetros que regulan la presencia de las diferentes especies de *Phytophthora* siendo *P. cinnamomi* y *P. cambivora* las más significativamente asociadas con el decaimiento de los árboles y la expresión de síntomas (VETTRAINO et al., 2001).

La amenaza de la enfermedad se conjugó con una apuesta fuerte de la Administración en la década del 2000 por la reforestación con frondosas nobles, lo que generó una fuerte demanda de planta de castaño. Sólo en Galicia, se estimaban necesarias 600.000 plantas para 2008. La medida más coherente pasa por el empleo de materiales seleccionados por su resistencia a la enfermedad. Los híbridos interespecíficos desarrollados y seleccionados por el CIF Lourizán (*C. sativa* x *C. crenata* ó *C. sativa* x *C. mollissima*) son tolerantes (MIRANDA-FONTAÍÑA et al., 2007) y se emplean como portainjertos en *soutos*, o por sus aptitudes para la producción de madera o fruto (RESOLUCIÓN de 25 de octubre de 2007 -BOE nº 272, 13-

11-2007). Estos materiales sin embargo, se recomiendan fundamentalmente para zonas litorales por su sensibilidad a las heladas tardías y a la sequía estival. Por otra parte, la conservación de los recursos genéticos propios hacía aconsejable la selección y mejora del castaño del país (*Castanea sativa*) para la obtención de clones o familias con características de tolerancia.

En este contexto la Unidad de Viveros Propios de TRAGSA, apoyada por la Subdirección de I + D + i de la empresa, comenzó en el año 2000 un programa de selección de individuos de *Castanea sativa* gallegos, resistentes a *Phytophthora*.

2. Objetivos

Este trabajo pretende aportar nuevos MFR de castaño del país con características de resistencia a la enfermedad de la tinta que, a diferencia de los materiales disponibles en la actualidad de origen híbrido, se adapten mejor a las condiciones de Galicia Interior y tengan una mayor compatibilidad al injerto con las variedades tradicionales de fruto.

3. Metodología

Material vegetal: Entre los años 2002 y 2003 se seleccionaron árboles que cumplieran con los siguientes requisitos:

- I. Árboles de zonas marcadamente afectadas por *Phytophthora* (BOUHIER, 1979; MOLINA, 1984; FERNÁNDEZ DE ANA MAGÁN et al., 1998; VIEITEZ et al., 1999)
- II. Árboles que hubieran estado suficientemente expuestos a la enfermedad (diámetro mínimo 50 cm)
- III. Árboles que no estuvieran infectados en ese momento con la enfermedad
- IV. Árboles que cumplieran las mejores condiciones de forma y calidad

Para la localización de estos árboles se empleó la base de datos del Mapa Forestal de España, del III Inventario Forestal Nacional (IFN) así como GPS y cartografía 1: 5000 de la CPTOPV (Xunta de Galicia).

Micropropagación: de los árboles seleccionados se muestreó durante el invierno material ontogénicamente joven (brotes basales y epicórmicos) que se conservó a 4°C hasta la primavera, momento en que el material fue forzado a brotar en cámara controlada. A los 10-15 días se produjeron nuevos brotes que fueron cosechados y desinfectados superficialmente con una solución de hipoclorito sódico. Los segmentos internodales de 1-1,5 cm con 1 o 2 yemas se establecieron en cultivo *in vitro*, se transfirieron a medio fresco a los 15 días y posteriormente se subcultivaron cada 4 semanas. Tras algunos ensayos preliminares, la propagación se realizó en tres etapas: i. Multiplicación en medio GRESSHOFF & DOY (1972) adicionado con sacarosa 30 g/L, Bacto agar 7 g/L y bencil aminopurina (BAP) 0,1 mg/L durante 4 semanas bajo luz fotoperiódica (16 h 25°C luz, 8 h 20°C oscuridad), ii. Elongación en medio MURASHIGE & SKOOG (1962) adicionado con sacarosa 30 g/L, Bacto agar 7 g/L y BAP 0,1 mg/L, iii. Enraizamiento de los brotes elongados mediante inmersión basal en una solución de ácido indolbutírico (AIB) 1 g/L durante 1 min y transferencia a sustrato en bandeja forestal con protección contra la deshidratación en cámara controlada (16 h 25°C luz, 8 h 20°C oscuridad).

Las variables que se midieron fueron la Tasa de Multiplicación (TM: número de nuevos explantos obtenidos de cada explanto inicial al final del período de multiplicación); la Tasa de Elongación (TE: número de explantos enraizables de más de 4 cm obtenidos de cada explanto inicial al final del período de elongación); Tasa de Enraizamiento (TR: porcentaje de explantos enraizados de los inicialmente dispuestos a enraizar al cabo de los 2 meses) y Tasa de Supervivencia (TS: porcentaje de plantas supervivientes al cabo de los 3 meses del paso a suelo). Las variables se midieron en cada subcultivo y se ha considerado la media de 3 subcultivos entre mayo y agosto de 2008.

Evaluación de resistencia a Phytophthora cinnamomi: se evaluó mediante un test de inoculación al sustrato, irrigando plantas aclimatadas de una savia creciendo en macetas de 2 L, con una solución que contenía el micelio triturado de una cepa del hongo suministrada por la Estación de Fitopatología do Areeiro (EFA). Las macetas se mantuvieron en condiciones de encharcamiento durante todo el ensayo. Se inocularon 18 plantas de cada clon, agrupadas en 3 réplicas de 6 individuos y otras 6 plantas se mantuvieron sin inocular como control. En cada test se incluyeron plantas clonales de *C. sativa*, y de *C. crenata* y del clon HS como testigos susceptibles y resistentes respectivamente. Entre 2007 y 2011 se testaron 91 genotipos en 8 ensayos, a medida que se disponía de plantas aclimatadas de cada clon en número suficiente. Las variables evaluadas fueron: supervivencia, nivel de daño general (índice entre 0 -sin daño- y 4 -totalmente muerto-), necrosis en raíces (índice entre 0 y 5), y necrosis en el cuello de la raíz, porcentaje de circunferencia y longitud de la lesión (Vettraino et al., 2001; MIRANDA-FONTAÍÑA et al, 2007).

Los clones más resistentes de cada ensayo, considerando como tales los que presentaron un comportamiento semejante a *C. crenata*, 14 clones en total, se volvieron a testar juntos en 2011. En este caso la inoculación se hizo con una mezcla de 5 cepas diferentes, la proporcionada por la EFA y 4 suministradas por la Micoteca del Centro de Investigaciones Forestales de Lourizán. Se incluyó además el clon híbrido HS como control resistente. El efecto del genotipo sobre las variables medidas se evaluó mediante Análisis de Varianza (ANOVA1). La comparación entre medias se realizó mediante el test de la Mínima Diferencia Significativa (MDS) al 95% de probabilidad ($p = 0,05$). Los datos porcentuales fueron transformados mediante la raíz cuadrada del arcoseno para el análisis de varianza. Se seleccionaron como resistentes únicamente aquellos que no diferían significativamente de *C. crenata* en ninguna de las variables medidas.

Parcelas de ensayo: en otoño-invierno de 2008-2009 se establecieron las dos primeras parcelas de ensayo con los clones de la colección. Una en la región de procedencia Galicia Litoral (As Pontes, A Coruña) y otra en la región de Montañas y Mesetas Interiores de Galicia (Vilardevós, Ourense), con la intención de comprobar el comportamiento de los clones seleccionados en cada una de las RIUs gallegas y de esa manera disponer en el futuro de recomendaciones de uso en cada zona. En enero de 2011 se estableció una tercera finca de ensayo en Rodanillo, en el Bierzo, en una zona muy afectada por chancro, con la intención de tener datos del comportamiento de los clones frente a esta enfermedad. El establecimiento de estas parcelas es la condición previa a la propuesta de los clones al CNMB.

Las parcelas tienen un diseño de bloques completos al azar, con 3 repeticiones y 9 copias de cada genotipo por repetición. Las variables medidas anualmente son supervivencia, brotación y crecimiento en altura y diámetro de cuello de raíz. En las parcelas gallegas,

además, ya se han recogido algunos datos de forma y pauta de crecimiento de la tercera anualidad, información que se ha incorporado en las fichas de propuesta al CNMB.

4. Resultados y Discusión

El resultado de la fase de selección en campo, fueron 206 individuos seleccionados en un total de 18.808,84 ha muestreadas correspondientes a 513 teselas del Mapa Forestal con presencia de castaño en las zonas 1 y 2 de BOUHIER (1979) (CUENCA et al., 2009).

De los 206 árboles seleccionados, 199 se establecieron en cultivo *in vitro* y 137 se mantienen desde entonces estables en cultivo. Durante el proceso de establecimiento y cultivo, se optimizaron los protocolos de micropropagación publicados (BALLESTER et al., 1992; MIRANDA Y FERNÁNDEZ, 1992; SÁNCHEZ et al., 1997; BALLESTER et al., 2001), de modo que en la actualidad el cultivo se realiza en 3 etapas en medio semisólido (SS) o también en 3 fases en medio líquido mediante inmersión transitoria (TIS). Los resultados obtenidos en TIS se presentan en otro trabajo de este Congreso.

Tabla 1. Datos de micropropagación: Tasa de multiplicación (TM), elongación (TE), enraizamiento (TR) y supervivencia (TS) de los 7 clones resistentes propuestos al CNMB. Datos presentados: media \pm error estándar

	TM	TE	TR (%)	TS (%)
C003	0,76 \pm 0,03	0,49 \pm 0,03	80,94 \pm 5,58	74,50 \pm 12,00
C004	1,10 \pm 0,05	0,57 \pm 0,13	68,78 \pm 18,26	96,67 \pm 3,34
C042	1,19 \pm 0,09	0,67 \pm 2,50	94,16 \pm 2,50	74,84 \pm 17,11
C053	1,13 \pm 0,15	0,68 \pm 0,07	34,36 \pm 8,10	45,00 \pm 6,61
P011	1,07 \pm 0,10	0,81 \pm 0,08	98,33 \pm 1,02	78,33 \pm 6,81
P042	1,18 \pm 0,06	0,63 \pm 0,07	80,19 \pm 9,36	95,14 \pm 2,25
P043	0,56 \pm 0,05	0,34 \pm 0,05	39,58 \pm 11,90	20,00 \pm 12,65
Media	1,00 \pm 0,10	0,59 \pm 0,06	70,91 \pm 9,51	69,21 \pm 17,44

Las tasas de multiplicación y elongación (Tabla 1), son relativamente bajas. MIRANDA-FONTAÍÑA y FERNÁNDEZ-LÓPEZ (2001) multiplicando 35 clones híbridos, obtienen una tasa media de 3,94 en medio GD pero no proporciona datos de elongación ni enraizamiento. Sin embargo, estos 35 clones eran todos de origen juvenil mientras que en nuestro caso, los genotipos fueron establecidos a partir de árboles adultos, cuya propagación es previsiblemente más complicada que la de los genotipos juveniles.

Las tasas de enraizamiento y aclimatación (Tabla 1) sin embargo, son relativamente buenas, salvo para los clones C053 y P043, que son los más recalcitrantes al enraizamiento. Para estos dos clones, especialmente para P043 que además produce pocos brotes enraizables, es necesario plantear un sistema de multiplicación alternativo, que si no resulta más eficaz, sea al menos, más económico que el cultivo *in vitro* (estaquillado semiherbáceo o acodo).

Respecto a la evaluación de resistencia, los 8 ensayos previos han sido descritos previamente (CUENCA ET AL., 2010). En ellos, se encontró una elevada variabilidad con resultados diferentes para *C. crenata* y *C. sativa* en cada ensayo, probablemente debido a la influencia de la estación del año y por tanto el estado fisiológico de la planta en ese momento específico. Por ello, los clones que se comportaban tan bien o mejor que *C. crenata* se seleccionaron para ser evaluados de nuevo juntos en 2011 (Tabla 2) incluyendo el clon HS entre los controles, e introduciendo un mayor número de cepas de *Phytophthora cinnamomi* en la inoculación.

Tabla 2. Datos de las variables medidas en el test final de resistencia. S (supervivencia), ND (nivel de daño), NNR (nivel de necrosis de raíz), CCN (circunferencia de cuello necrosado) y LCN (longitud de cuello necrosado). Sombreados los valores que no difieren significativamente de *C. crenata* y/o HS

Clon	S (%)	ND	NNR	CCN (%)	LCN (cm)
C006	16,67 ± 9,62	3,22 ± 0,39	2,55 ± 0,22	85,28 ± 7,40	42,14 ± 5,46
P011	61,11 ± 5,56	1,78 ± 0,15	0,89 ± 0,20	41,39 ± 8,48	19,89 ± 6,92
P014	44,43 ± 24,24	2,72 ± 0,67	2,28 ± 0,82	53,33 ± 21,24	19,95 ± 7,6
P042	66,67 ± 25,46	1,95 ± 0,64	1,22 ± 0,66	32,22 ± 24,37	13,11 ± 9,47
C017	33,33 ± 9,62	2,89 ± 0,34	1,94 ± 0,31	61,11 ± 14,70	34,17 ± 8,58
C004	94,44 ± 5,56	0,89 ± 0,11	1,45 ± 0,15	5,56 ± 5,56	3,06 ± 3,06
P013	44,46 ± 22,23	2,41 ± 0,70	2,37 ± 0,19	41,67 ± 16,67	33,20 ± 14,93
C005	33,33 ± 19,25	2,95 ± 0,64	2,50 ± 0,50	50,00 ± 9,62	35,67 ± 10,77
C063	44,44 ± 5,56	2,56 ± 0,06	3,00 ± 0,33	63,89 ± 2,78	40,06 ± 12,78
C042	61,11 ± 30,93	2,00 ± 1,00	1,60 ± 0,95	48,61 ± 25,95	18,55 ± 15,92
P028	16,67 ± 9,62	3,28 ± 0,22	3,33 ± 0,19	85,00 ± 8,22	46,20 ± 5,51
P043	77,78 ± 22,22	1,67 ± 0,67	1,22 ± 1,06	22,22 ± 22,22	12,11 ± 12,11
C003	83,33 ± 16,67	1,83 ± 0,83	1,61 ± 0,94	40,83 ± 30,10	6,45 ± 5,78
C053	88,89 ± 5,56	0,51 ± 0,16	1,42 ± 0,13	10,00 ± 5,09	2,86 ± 1,68
HS	75,56 ± 12,37	1,60 ± 0,31	1,26 ± 0,52	26,11 ± 13,48	14,04 ± 7,44
CS	33,33 ± 0,00	2,78 ± 0,11	2,61 ± 0,20	70,00 ± 3,33	28,44 ± 0,45
CC	94,44 ± 5,56	0,89 ± 0,06	0,33 ± 0,19	5,56 ± 5,56	5,22 ± 5,22
p	0,0016**	0,0007***	0,0000***	0,0017**	0,0002***
LSD	36,7166	1,3443	1,5176	34,6491	24,5169

El análisis de varianza mostró diferencias significativas para todas las variables medidas. MIRANDA-FONTAÍÑA et al. (2007) testaron 50 clones midiendo las mismas variables salvo el nivel de daño, y también encontraron diferencias significativas entre clones para todas ellas. Los valores de cada variable que cumplen con el criterio de resistencia establecido (no diferir de *C. crenata*) aparecen sombreados en la tabla. Siete de los catorce clones testados, no presentan diferencias significativas con *C. crenata* y/o HS para ninguna de las variables, y son por tanto los que consideraremos resistentes. Esto supone por tanto, 7,7% de los clones testados, mientras que MIRANDA-FONTAÍÑA ET AL. (2007) encontraron resistentes un tercio de los clones testados con criterios similares, si bien 46 de los 50 clones eran híbridos.

Para establecer un ranking (Tabla 3), consideramos el nivel de resistencia-susceptibilidad según el valor medio obtenido para la variable medida más discriminante, que fue el nivel de necrosis de la raíz siempre y cuando, además, el valor de la siguiente variable más discriminante, el porcentaje de circunferencia de necrosis de cuello, no difiriera significativamente del obtenido en el mismo test para *C. crenata*. De este modo el clon P011 se considera altamente resistente, los clones P042, P043, C003, C004, y C0053 resistentes y C042 parcialmente resistente, dado que difiere de *C. crenata* para la circunferencia de cuello necrosado. MIRANDA-FONTAÍÑA et al. (2007) señalan estas dos variables como las de mayor heredabilidad y por tanto las más adecuadas para realizar la selección. En nuestro caso, son efectivamente, las que más clones discriminan como significativamente diferentes.

Tabla 3. Ranking de resistencia de los nuevos materiales según los resultados de las variables más discriminante: NNR: nivel necrosis de raíz; CCN: circunferencia de cuello con necrosis; RR: altamente resistente (NNR 0-1); R: resistente (NNR 1-2); n.s: no significativo; *: significativo al 95% de probabilidad

NNR			CCN (%)		
Clon	Media	Nivel de resistencia	Clon	Media	Diferencia con CC y/o HS
C. crenata	0,33	RR	C. crenata	5,56	n.s.
P011	0,89	RR	C004	5,56	n.s.
P042	1,22	R	C053	10	n.s.
P043	1,22	R	P043	22,22	n.s.
HS	1,26	R	HS	26,11	n.s.
C053	1,42	R	P042	32,22	n.s.
C004	1,45	R	C003	40,83	n.s.
C042	1,60	R	P011	41,39	n.s.
C003	1,61	R	C042	48,61	*

Al estudiar los valores medios de las variables de adaptación (supervivencia, precocidad) y crecimiento (incremento en altura y diámetro) de cada una de las parcelas de ensayo establecidas (Tabla 4), vemos que la parcela de la RIU1 tiene mayores crecimientos que las de la RIU2, y mayor supervivencia a largo plazo, lo que refleja una mejor adaptación general al clima atlántico.

Tabla 4. Valores medios de las variables de adaptación y crecimiento de las parcelas de ensayo

Nombre parcela	Provincia	RIU	Genotipos + Controles	Implantación		2012*			
				Fecha	Superv. (%)	Superv. (%)	Brotación	Δh (cm)	$\Delta \Phi$ (mm)
Monte Seixo	La Coruña	RIU1	40 + 4	ene-09	80,2	55,3	---	33,2	13,5
Vilardevós	Ourense	RIU2	20 + 2	dic-08	69,1	36,7	---	12,7	4,8
Rodanillo	León	RIU2	83 + 4	ene-11	85,2	85,2	precoz	22,6	0,2

* Datos del año 3 para las parcelas de M. Seixo y Vilardevós y del año 1 para Rodanillo.

Centrándonos en los resultados obtenidos en la parcela de Rodanillo, única que contiene todos los clones propuestos al CNMB (Tabla 5), vemos que 5 de los 7 clones son precoces en brotación (entre el 25 de marzo y 15 de abril) y los clones P042 y P043 muy precoces (antes del 25 de marzo).

Tabla 5. Datos de supervivencia, crecimiento y brotación de los clones propuestos al CNMB respecto a los controles en la parcela de Rodanillo (León). El análisis de los datos se realizó para el conjunto de los 87 genotipos de la parcela.

CLON	Superv1	$\Delta h1$	$\Delta \Phi1$	Brotación
C003	93,3	71,9	2,6	Precoz
C004	92,6	40,2	1,9	Precoz
C042	100	15	0,2	Precoz
C053	92,1	20,4	0	Precoz
P011	92,6	10,2	0	Precoz
P042	100	23,2	0,7	Muy Precoz
P043	100	7,9	7,3	Muy Precoz
CS	92,6	19,4	-2,8	Precoz
CC	92,6	3,5	-1,5	Muy Precoz
p	0,0111*	0,0000***	0,0019*	
MDS	26,17	29,91	5,03	

Todos los clones presentan una supervivencia a la implantación superior al 90% y tienen unos crecimientos que no difieren significativamente de *C. sativa* excepto el clon C003, que el primer año presenta un crecimiento en altura y grosor significativamente muy superiores, y el clon P043, cuyo diámetro crece significativamente más de *C. sativa* y el resto de los clones seleccionados. FERNÁNDEZ-LÓPEZ et al. (2008) emplean estas variables, entre otras para seleccionar clones híbridos de castaño por su producción de madera, señalando una mayor heredabilidad de las variables brotación y altura.

5. Conclusiones

El programa de selección y mejora desarrollado por TRAGSA, ha permitido catalogar 7 nuevos clones de castaño con categoría cualificada. Estos materiales presentan un alto nivel de tolerancia a la tinta, y son capaces de ser reproducidos vegetativamente por micropropagación, por lo que se proponen inicialmente para su uso como portainjertos.

La información proporcionada por los ensayos permitirá en el futuro elevar la categoría de estos materiales, establecer nuevas recomendaciones de uso así como continuar con el programa de selección, por otras características (producción de madera, de fruto, resistencia a chancro...). Los materiales ya han sido incluidos en el *Rexistro Galego de Materiais de Base para a Producción de Materiais Forestais de Reprodución* (Resolución do DOG nº 178, del 18 de setembro de 2012) y en el CNMB (Resolución del 18 de febrero de 2013, BOE nº 55 del 5 de marzo de 2013).

6. Agradecimientos

El programa contó inicialmente con financiación del Ministerio de Ciencia y Tecnología a través del programa PROFIT y posteriormente con financiación de la Xunta de Galicia (Proyectos PGIDIT07MRU003E y PGIDIT09MRU016E) ambos del Plan INCITE.

Nuestro agradecimiento a la Xunta de Galicia y a las CMMC de Vilardevós y Rodanillo por la cesión de las parcelas. A la EFA y al CIF Lourizán por suministrarnos las cepas de *Phytophthora cinnamomi*. A Luis Rodríguez por la selección y muestreo en campo.

7. Bibliografía

BALLESTER, A.; SÁNCHEZ, M.C.; VIEITEZ, A.M.; 1992. New strategies for *in vitro* propagation of chestnut. *Proceedings of the World Chestnut Industry Conference*, Morgantown, USA, 32-40.

BALLESTER, A.; BOURRIAN, L.; CORREDORIA, E.; GONÇALVES, J.C.; CÔNG-LINH, L.; MIRANDA-FONTAÍÑA, M.E.; SAN JOSÉ, M.C.; SAUER, U.; VIEITEZ, A.M.; WILHELM, E.; 2001. Improving chestnut micropropagation through axillary shoot development and somatic embryogenesis. *For. Snow. Landsc. Res.* 76, 3: 460-467.

BOUHIER, A. ; 1979. La Galice, essai géographique d'analyse et d'interprétation d'un vieux complexe agricole. *Imp. Younnaise. la Roche sur You*: 626-636.

CUENCA, B.; FERNÁNDEZ, M.R.; OCAÑA, L.; SALINERO, C.; PINTOS, C.; MANSILLA, J.P.; RIAL, C.; 2009. Selection of *Castanea sativa* Mill. for resistance to *Phytophthora cinnamomi*: testing of selected clones. *Acta Hort.*, 844: 395-403.

CUENCA, B.; OCAÑA, L.; SALINERO, C.; PINTOS, C.; MANSILLA, J.P.; RIAL, C.; 2010. Selection of *Castanea sativa* Mill. for resistance to *Phytophthora cinnamomi*: micropropagation and testing of selected clones. *Acta Hort.* 866: 111-119.

GRESHOFF, P.M.; DOY, C.H.; 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum*. *Planta*, 107: 167-170.

FERNÁNDEZ DE ANA MAGÁN, F. J.; VERDE, M. C.; RODRÍGUEZ A.; 1998. O souto, un ecosistema en perigo. Servicio de Estudos e Publicacións Consellería de Agricultura, Gandería e Política Agroalimentaria. Ed. Xunta de Galicia. Santiago de Compostela.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; MIRANDA-FONTAÍÑA, M.E.; FURONES, P.; 2008. Caracteres de selección en campo de clones de castaño híbrido (*Castanea crenata* x *Castanea sativa*) para la producción de madera. *Cuad. Soc. Esp. Cienc. For.* 24: 39-43.

MIRANDA, M.E.; FERNÁNDEZ, J.; 1992. The micropropagation of chestnut tree: *in vivo* establishment and post-propagation growth. *Proceedings of Mass Production Technology for Genetically Improved Fast Growing Forest Tree Species*. AFOCEL-IUFRO Symposium. 14-18 September. Bordeaux, Francia. p. 421-426.

MIRANDA-FONTAINA, M.E. & FERNANDEZ-LOPEZ, J.; 2001. Genotypic and environmental variation of *Castanea crenata* x *C. sativa* clones in aptitude to micropropagation. *Silvae Genet.* 50(3/4): 153-162.

MIRANDA-FONTAÍÑA, E.; FERNANDEZ-LOPEZ, J.; VETTRAINO, A.M.; VANNINI, A.; 2007. Resistance of *Castanea* clones to *Phytophthora cinnamomi* : testing and genetic control. *Silvae Genetica*, 56: 11-21.

MOLINA, F.; 1984. Cuarenta años de investigación sobre el Castaño en el Departamento Forestal de Lourizán. En: *Congreso Internacional sobre Castaño, Lourizán (Galicia, España)*: 21-23. *Lourizán (Pontevedra)*.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.; 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

SÁNCHEZ, M.C.; SAN-JOSÉ, M.C.; FERRO, E.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A.M.; 1997. Improving micropropagation conditions for adult-phase shoots of chestnut. *J. Hort.Sci.* 72:433-443.

VETTRAINO, A.M.; NATILI, N.; ANSEMI, N.; VANNINI, A.; 2001. Recovery and pathogenicity of *Phytophthora* species associated with a resurgence of ink disease in *Castanea sativa* in Italy. *Plant Pathology*, 50: 90-96.

VIEITEZ, E.; VIEITEZ M. L. ; VIEITEZ, F.; 1999. O Castiñeiro: *Biología e Patoloxía*. Ed. Consello da Cultura Galega. Santiago de Compostela.