

VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DEL CASTAÑO COMO MÉTODO DE MEJORA GENÉTICA

ANTONIO BALLESTER y ANA M. VIEITEZ

*Instituto de investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC,
Apartado 122, 15780 Santiago de Compostela, España
e-mail: aballester@iiag.csic.es*

RESUMEN

Tanto el castaño europeo como el americano son susceptibles a las enfermedades causadas por hongos, las más devastadoras son la de la tinta (causada por *Phytophthora* spp.) y la del cáncer o chancro (causada por *Cryphonectria parasitica*). Mediante cruzamientos con los castaños asiáticos (resistentes a tinta y a chancro), se han desarrollado híbridos que han paliado el efecto negativo de las enfermedades. Sin embargo, estos híbridos o bien pierden las características típicas del castaño europeo y del castaño americano o bien se depura la información genética asiática mediante un proceso de retrocruzamientos, proceso para el que se necesitan alrededor de 20 años de esfuerzo. Las nuevas herramientas de la biotecnología (marcadores moleculares y transformación genética) posiblemente ayuden a reducir drásticamente el período de mejora. En concreto, mediante la producción de castaños transgénicos será posible, a corto plazo, disponer de árboles resistentes en un período de 2-4 años de trabajo. En esta revisión se pretende hacer un estudio comparativo de los sistemas convencionales de mejora genética del castaño y la aportación de la biotecnología en la consecución de castaños resistentes en un corto período de tiempo.

Palabras clave: castaño, marcadores moleculares, mejora genética, plantas transgénicas, transformación genética.

ABSTRACT

The population of both European and American chestnut drastically declined from the beginning of 20th century due to ink disease (caused by *Phytophthora* spp.) and blight disease (caused by *Cryphonectria parasitica*). Interspecific crosses with Asian chestnut species were carried out to obtain resistant hybrids, and a backcross breeding strategy was developed for American chestnut. However, this approach takes approximately two decades. The development of genomic tools (molecular markers and genetic transformation) will enhance traditional tree breeding technologies leading to more certain and timely recovery of chestnuts. Public acceptance of transgenic plants will probably be an obstacle, at least in Europe, to the application of new technologies in chestnut improvement programmes.

Key words: chestnut, genetic transformation, molecular markers, transgenic plants, tree breeding.

INTRODUCCIÓN

El género *Castanea* se divide taxonómicamente en 13 especies que se extienden en tres grandes áreas geográficas del hemisferio norte, siendo la distribución de las especies más importantes la siguiente: En Asia, el castaño está representado por dos especies donde *Castanea crenata* Sieb. and Zucc. crece en Japón y *C. mollissima* B.L. lo hace en China y Korea; en Europa, en donde *C. sativa* Mill. es la especie nativa; y en América del Norte, de donde es originario *C. dentata* Bork (Vieitez *et al.*, 1986). De modo puntual, algunas de estas especies y variedades seleccionadas se cultivan en ciertos países del hemisferio sur, como Chile y Australia, con la idea de promover la industria de la castaña.

Los castaños asiáticos se caracterizan por ser árboles de porte más bien bajo, castañas pequeñas y muestran un elevado nivel de resistencia o tolerancia a las enfermedades que atacan al castaño europeo y al americano. El castaño

européo es un árbol que alcanza los 20-25 metros, tiene una copa compacta, las castañas tienen un mayor tamaño que las producidas por otras especies y está presente en 25 países europeos cubriendo una superficie de aproximadamente 2 millones de hectáreas (Conedera *et al.*, 2004). El castaño americano es el de mayor porte dentro de la especie, destacando su tronco rectilíneo y estuvo presente (antes del retroceso debido a la enfermedad del cáncer) en la parte este de Estados Unidos, desde el sur de Canadá hasta el norte de los estados de Alabama y Georgia, siendo la especie forestal dominante en algunas áreas, como en los montes Apalaches (Anagnostakis, 1982).

Históricamente, las castañas fueron utilizadas como fuente de alimento en muchas poblaciones montañosas de Europa debido a su excelente valor nutricional y la madera se usó en la construcción de casas, muebles, la producción de taninos o, simplemente, como una fuente de energía renovable (Bellini, 2005). En Europa, la población de castaños se ha visto degradada desde principios del siglo pasado debido al efecto de las enfermedades, al despoblamiento de las áreas rurales como efecto del desarrollo industrial de las grandes áreas urbanas y al abandono de las prácticas de cultivo. Consecuencia de ello, ha sido la progresiva disminución en la producción de castañas en Europa, a partir de la mitad del siglo pasado, sobre todo en países como Francia, España y Portugal (Fig. 1), de acuerdo con los datos de Buonous (2002) y FAO (2002). En América, la irrupción de la enfermedad del cáncer, devastó la población de castaños hasta convertir esta especie dominante de su área en un matorral (Rutter *et al.*, 1990).

En Galicia, el castaño es uno de los árboles emblemáticos de la región, cultivado durante siglos desde su introducción, posiblemente a través de los romanos, en la que se producen, cosechan y se comercializan las castañas de sus 80 cultivares identificados (Pereira-Lorenzo *et al.*, 2006).

Tanto el castaño europeo como el americano han sufrido y sufren la acción de dos enfermedades devastadoras como son la tinta y el chancro y el estudio de las mismas así como la recuperación de los rodales de castaños productivos ha sido motivo de numerosos estudios. En el presente trabajo pretendemos hacer una revisión sobre las medidas que se han adoptado para inducir resistencia en *C. sativa* y *C. dentata* y la posibilidad de la aplicación de las nuevas herramientas de la biotecnología en la mejora del castaño.

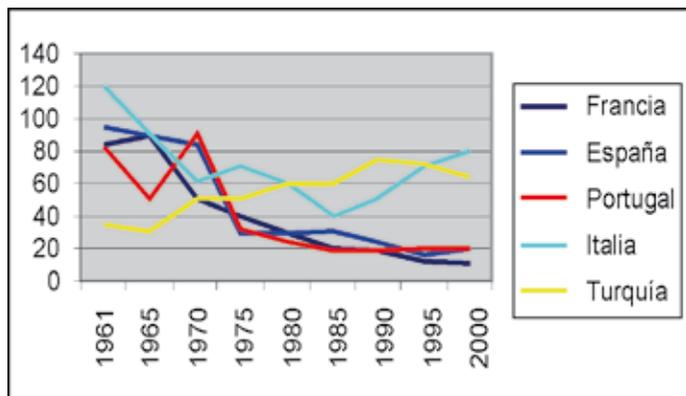


Figura 1. Producción de castañas en algunos países europeos desde 1961 a 2000 (en miles de toneladas/año).

Las enfermedades del castaño

Los castaños europeos y americanos son susceptibles a dos enfermedades causantes por hongos: la enfermedad de la tinta, causada por *Phytophthora cambivora* y *P. cinnamomi* y la enfermedad del chancro o cáncer, causada por *Cryphonectria parasitica*. La enfermedad de la tinta fue detectada inicialmente en España a mediados del siglo XIX (Vannini *et al.*, 2002; Fernández de Ana, 2002), y ha representado, probablemente, la patología más grave que ha afectado al castaño europeo. Los síntomas de la enfermedad son fácilmente reconocibles durante el crecimiento vegetativo del árbol, ya que las hojas de las partes más altas de la copa pierden su característico color verde fuerte por otro más pálido y amarillento. Estas hojas suelen permanecer en la copa durante el período invernal, cuando se cae el resto de las hojas. Al mismo tiempo, se puede notar una zona necrótica de color marrón oscuro a negro (tinta) en la unión del tallo con la raíz, cuando se descortezca el tallo. El hongo ataca el floema y el cambium de las raíces y el cuello de unión con el tronco, 10-20 cm por encima del suelo (Fig. 2A), destruyendo los tejidos y alterando, en consecuencia, el desarrollo del árbol. Es también una característica de la enfermedad la producción de un exudado negro en el suelo que está en contacto con la raíz.

Al contrario que en el caso de la enfermedad de la tinta, el hongo *Cryphonectria parasitica* causante de la enfermedad del chancro o cáncer, penetra en el castaño por la parte aérea (normalmente a través de heridas,

infectando el tejido cambial), tanto en el tronco como en las ramas laterales y, de forma especial, en las zonas de unión de la rama y el troco. Como una primera reacción, la parte de la corteza atacada adquiere un color pardo-rojizo y de forma irregular para, posteriormente, producirse una hinchazón (Fig. 2B) típica del cáncer que es capaz de matar el árbol cuando el ataque es muy virulento o bien matar las ramas y tallos cuando el ataque tiene lugar en estas zonas.

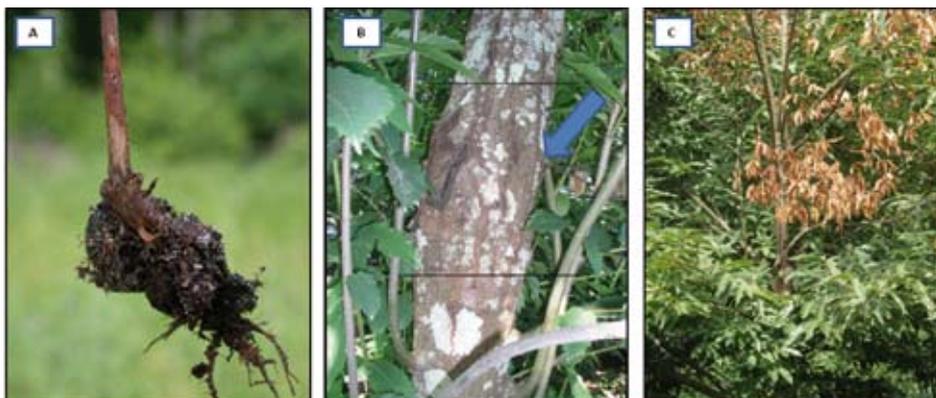


Figura 2. A. Planta de castaño mostrando la sintomatología de la enfermedad de la tinta (S.N. Jeffers, Clemson University, USA). B. Engrosamiento de la corteza del tronco de un castaño afectado por chancro. Se puede observar el desarrollo de nuevos brotes por debajo de la zona afectada, reacción típica de los castaños enfermos. C. Árbol de castaño afectado de chancro con una rama completamente seca; el resto del árbol permanece sano.

En estos casos el resto del árbol mantiene un crecimiento normal mientras en las ramas afectadas se secan (Fig. 2C) (Vannini *et al.*, 2002). La mortalidad causada en el castaño europeo no es tan elevada como en el castaño americano, cuya población prácticamente ha desaparecido en lo que se considera uno de los mayores desastres forestales a nivel mundial. El castaño europeo es parcialmente tolerante al cáncer, en parte debido al fenómeno de la hipovirulencia, que es una atenuación de la virulencia del patógeno causada por un hipovirus (Grente, 1975, 1981). En Europa, los árboles han coexistido con la enfermedad durante décadas sin efectos desastrosos, aunque en países como España y Portugal, el daño ha sido continuo (Turchetti y Maresi, 2005).

Una información más exhaustiva de las características de estas dos enfermedades puede encontrarse en Vieitez *et al.* (1996).

Mejora genética del castaño

Desde que, a principios del siglo pasado, se hizo patente el efecto letal de las enfermedades antes señaladas con el consiguiente deterioro de las poblaciones de castaño tanto en Europa como en Estados Unidos, los investigadores trataron de poner freno al proceso mediante el control de la reproducción y dispersión de los agentes causantes de las dos enfermedades. Los resultados no fueron muy alentadores pero pronto se observó que los castaños asiáticos (*Castanea crenata* y *C. mollissima*) mostraban tolerancia o resistencia a *Phytophthora* y *Cryphonectria*. Se inició, entonces, una serie de estudios para conocer los mecanismos de resistencia y la posibilidad de transferir los genes de resistencia de los castaños asiáticos a los europeos y americanos. Se iniciaron entonces los programas de mejora genética vegetal utilizando las herramientas disponibles por aquel entonces. A día de hoy, la ciencia dispone de la biotecnología como una nueva herramienta que, al menos de forma teórica, puede complementar y/o mejorar la resistencia del castaño a las enfermedades.

En los párrafos siguientes comentaremos los logros alcanzados en ambos casos.

Mejora genética del castaño mediante técnicas convencionales

En Europa, el programa de mejora comenzó con la producción de híbridos resistentes a la tinta utilizando *C. sativa* como el progenitor femenino y *C. crenata* o *C. mollissima* como el masculino, habiéndose introducido plántulas de los castaños asiáticos entre 1917 y 1940 (Elorrieta, 1949). En Europa, este programa se inició en España por Gallastegui (1926) con el ánimo de combinar las mejores características de *C. sativa* y *C. crenata*, seguido por los trabajos de Urquijo (1944) en la producción de nuevos híbridos y sus descendientes, haciéndose ensayos de resistencia sobre 10.000 plantas de híbridos derivados de diferentes familias (Vieitez, 1961; Vieitez *et al.*, 1996). Posteriormente a estos estudios, otros países como Francia o Portugal siguieron programas de mejora similares.

En todos los programas europeos se utilizaron híbridos de primera generación o sus descendientes y se seleccionaron por su resistencia a

tinta. Desgraciadamente, no se depuró la información genética de los castaños asiáticos mediante retrocruzamientos con lo que, en muchos aspectos excepto la resistencia a la tinta, los híbridos son inferiores al castaño europeo: menor vigor, calidad de las castañas inferior, baja afinidad en los injertos con cultivares locales, sensibilidad a las heladas de primavera y a la sequía del verano y dificultades de adaptación a las condiciones climáticas de algunas áreas.

Programas similares se siguieron en Estados Unidos para obtener híbridos resistentes a chancro, pero estos programas se abandonaron a mitad de los años 1960 porque, aunque se identificaron híbridos con diferentes grados de susceptibilidad a la enfermedad, no obtuvieron ejemplares completamente resistentes que mostrasen el fenotipo de *C. dentata* (Jaynes, 1968). Sin embargo, en los años 1980 se retomaron con interés los programas de mejora del castaño americano al entender que podría ser un buen candidato de un programa de mejora mediante retrocruzamientos ya que florece relativamente rápido y el control de la resistencia se debe a un número limitado de genes (Rutter y Burnham 1982; Anagnostakis, 1992). A través de la American Chestnut Foundation se inició un programa de mejora utilizando el castaño chino como parental no recurrente siendo retrocruzados con diferentes parentales de castaño americano. El objetivo final es la obtención de castaños americanos (en el 99% de sus genes) pero resistentes a la enfermedad. Se ha comprobado que ejemplares de la tercera generación de retrocruzamientos tienen el fenotipo del castaño americano (Diskin *et al.* 2006) y actualmente se está evaluando una progenia denominada BC₃F₃ por su resistencia a chancro (Hebar, 2006; Maynard *et al.*, 2008).

De los datos anteriores puede concluirse que los híbridos utilizados en Europa contienen una gran carga genética de castaños asiáticos mientras que en Estados Unidos esa carga se ha ido depurando hasta reducirse al mínimo nivel. Se disponen ya de ejemplares que muestran el fenotipo del castaño americano y que puedan ser resistentes a chancro, pero el tiempo requerido para llegar a esta situación idónea ha sido de 20 años.

Bioteología y su aplicación en la mejora del castaño

El desarrollo de las herramientas biotecnológicas producido en los últimos 20 años ha permitido abordar objetivos impensables unas décadas antes. La

aplicación de las nuevas técnicas moleculares al conocimiento y mejora de las plantas está avanzando de forma notable y tiene su expresión más evidente en la utilización de marcadores moleculares y en la transformación genética. Estas tecnologías se están aplicando a la mejora del castaño.

Marcadores moleculares

La población de castaño en Europa es enormemente compleja debido, entre otros aspectos, a las diferentes épocas de su expansión, a la selección de variedades específicas, al retroceso causado por las enfermedades, a la dispersión de híbridos euro-asiáticos, etc. Muchos investigadores están estudiando la variabilidad genética de las poblaciones naturales y variedades cultivadas en Europa, aspectos que son de gran relevancia en el estudio y conservación de la biodiversidad y el estudio de caracteres adaptativos (Casasoli *et al.*, 2001; Marioni *et al.*, 2003). Aunque inicialmente se utilizaron isoenzimas como marcadores moleculares hoy día se emplean otros como RAPDs, AFLPs, ISSRs, SSRs, SNPs, ESTs, etc. Las herramientas genómicas para el castaño están actualmente en pleno desarrollo y existe una plataforma (www.fagaceae.org) en la que se actualizan las secuencias del genoma que se van identificando. La genómica del castaño ayudará a identificar muchos de los genes y sus localizaciones, suministrará información sobre el carácter complejo de la resistencia a enfermedades, se podrán clonar factores de resistencia específicos y se podrán acelerar los programas de mejora mediante retrocruzamientos (Wheeler y Sederoff, 2009). Por tanto, los programas de mejora clásica necesariamente deberían hacer uso de los resultados que se obtengan con los diferentes marcadores moleculares.

Transformación genética

Uno de los mayores avances en la mejora de especies vegetales se ha conseguido con la transformación genética mediante la inserción de genes específicos en el genoma de la planta objeto de mejora. Una premisa fundamental para tener éxito en la producción de plantas transgénicas es el disponer de un sistema de regeneración *in vitro* adecuado que permita la

obtención de plantas a partir de células, órganos o tejidos susceptibles de infección mediante *Agrobacterium tumefaciens* como agente portador del gen que pretende introducirse en la planta.

En los últimos 20 años, ha sido posible la regeneración in vitro del castaño a partir del cultivo de yemas axilares, lo que ha hecho posible la clonación de genotipos élite, no sólo a nivel de laboratorio sino también a nivel comercial (Vieitez *et al.*, 2007). Sin embargo, este sistema no es apropiado en transformación genética debido a la formación de quimeras, tal como se demostró con el primer intento de transformación genética del castaño (Seabra y Pais, 1998). Para paliar esta situación, se han desarrollado sistemas de regeneración mediante embriogénesis somática. En castaño europeo, los primeros resultados datan de 1990 (Vieitez *et al.*, 1990) habiendo utilizado embriones cigóticos inmaduros como fuente inicial de los cultivos. Posteriormente, se han establecido cultivos embriogénicos a partir de secciones de hojas (Corredoira *et al.*, 2003, 2008), lo que puede permitir la clonación y la transformación genética de material seleccionado. En castaño americano, sólo se ha obtenido embriogénesis somática a partir de embriones inmaduros (Merkle *et al.*, 1991; Xing *et al.*, 1999) pero las diferentes etapas del proceso no difieren mucho a las del castaño europeo. Al cabo de los años puede decirse que los sistemas embriogénicos en ambas especies están perfectamente definidos y consolidados, aunque es preciso mejorar las tasas de inducción a partir de material clonal así como las etapas de maduración, germinación y conversión en plantas (Corredoira *et al.*, 2006).

Como hemos dicho anteriormente, los primeros intentos de producir castaños transgénicos fueron infructuosos, porque la selección del material vegetal de partida no fue el correcto. El primer protocolo que permitió el establecimiento de líneas transgénicas de castaño, el establecimiento en invernadero de estas plantas y la comprobación de la estabilidad de los genes insertados fue publicado por Corredoira *et al.* (2004). Se utilizaron únicamente genes marcadores (*nptII* y *gus*) que permitieron la selección de los transgenes en medios con kanamicina y la identificación de los embriones transformados mediante la reacción GUS. El protocolo (resumido en la Fig. 3) necesita, al menos, de 12 semanas desde el inicio

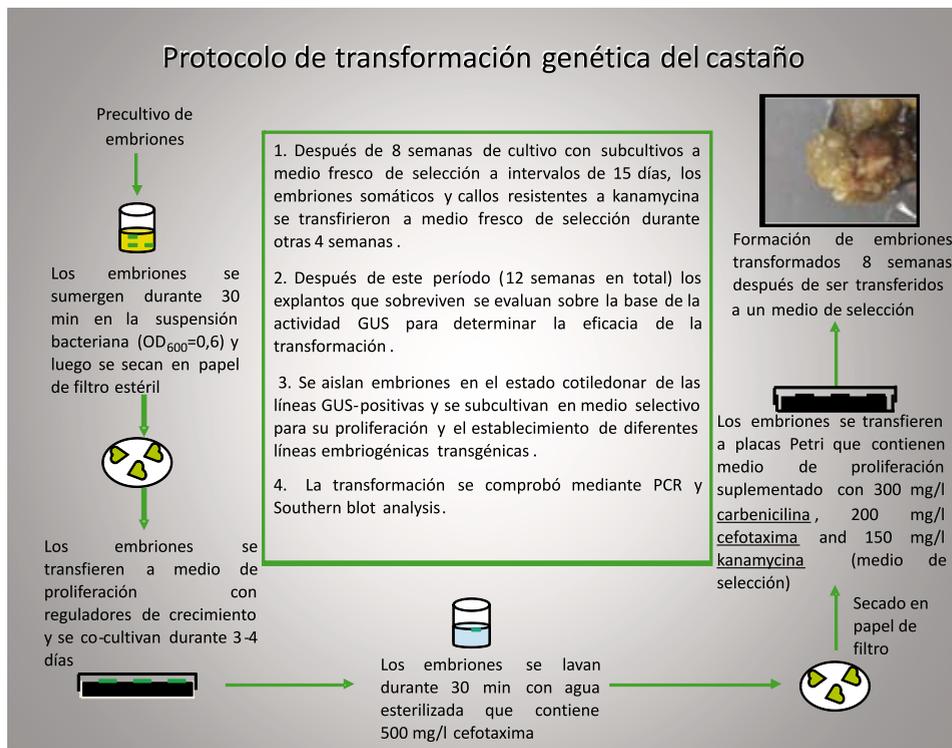


Figura 3. Protocolo seguido para la transformación genética del castaño a partir del cultivo de embriones somáticos. Son necesarias 12 semanas desde el inicio del proceso hasta que pueden realizarse los primeros ensayos GUS para determinar la eficacia del proceso (Adaptado de Corredoira *et al.*, 2004, 2007).

hasta la identificación de los embriones transgénicos mediante la reacción GUS. La eficacia de la transformación está supeditada a una serie de factores como son la combinación plásmido/cepa bacteriana, tiempo de co-cultivo, tipo y concentración de antibióticos, el genotipo, etc. Teniendo en cuenta todos estos factores, se han conseguido tasas de transformación del 25% en el castaño europeo (Corredoira *et al.*, 2007). Posteriormente al primer trabajo sobre la transformación genética estable del castaño europeo, Andrade *et al.* (2005) y Polin *et al.* (2006) publicaron el protocolo que siguieron en la transformación del castaño americano con genes marcadores utilizando un procedimiento muy similar al del castaño europeo, habiendo obtenido también notables tasas de transformación estable. Más recientemente, Andrade *et al.* (2009) han

obtenido 100 plantas transgénicas que han florecido tres años después de la regeneración.

Una vez definidos los protocolos de transformación con genes marcadores, el paso siguiente debe ser la inserción de genes que confieran al castaño algún tipo de característica diferente y el más interesante, a priori, es el carácter de resistencia a enfermedades. Mientras se dilucidan cuales pueden ser los genes específicos que controlan la resistencia a chancro y a tinta (Wheeler y Sederoff, 2009), es posible utilizar otras alternativas. El castaño americano ha sido transformado con un gen *oxalato oxidasa* tipo germina para tratar de aumentar la resistencia a chancro, y el plásmido contiene además un gen de selección y un gen marcador, en este caso, el gen de la fluorescencia verde. Las plantas transgénicas regeneradas están creciendo en parcelas para la evaluación de su tolerancia a chancro (Maynard *et al.*, 2008). En el castaño europeo, estamos intentando sobreexpresar una proteína tipo taumatina (*CsTLL1*) aislada de cotiledones maduros de castaño (García-Casado *et al.*, 2000) que tiene actividad antifúngica en ensayos in vitro. Esperamos encontrar algún tipo de tolerancia de las plantas transgénicas de castaño a la enfermedad del chancro.

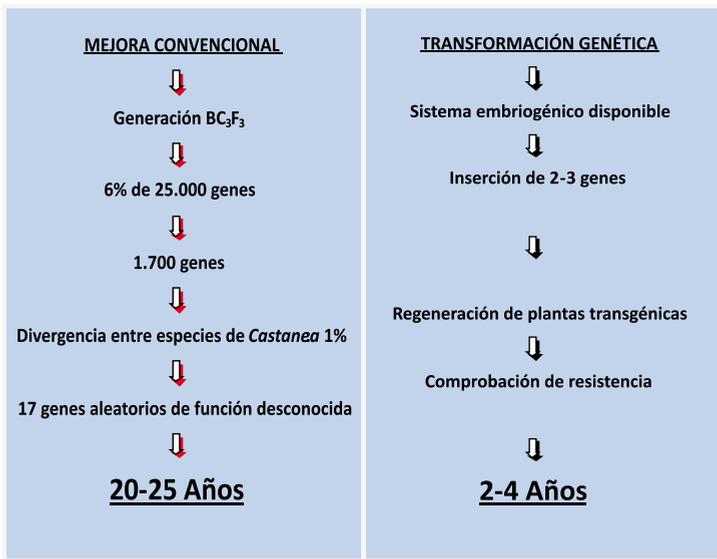
Mejora genética convencional y biotecnología: ventajas e inconvenientes

Como hemos dicho en párrafos anteriores, la herramienta más eficaz desde mediados del siglo XX para combatir las enfermedades del castaño ha sido la del desarrollo de híbridos del castaño europeo o americano con los castaños asiáticos. La estrategia europea consistió en la distribución y plantación de los híbridos de primera generación resistentes mientras que en USA este tipo de híbridos no tuvieron interés porque se perdía con ellos el fenotipo del *C. dentata* puro, más interesante, en todos los aspectos (desde el tipo de crecimiento a aspectos meramente ecológicos) que los híbridos correspondientes. La estrategia europea puede entenderse habida cuenta que el efecto devastador de las enfermedades sobre el castaño no fue tan dramático como en USA. El uso del programa de retrocruzamientos, basado en la precocidad de floración (de 3 a 5 años por generación) y el conocimiento de que posiblemente 2 ó 3 loci controlan la resistencia a chancro (Kubisiak *et al.*, 1997) ha sido muy positivo, pero tiene sus limitaciones (Maynard, *et al.*, 2008). El retrocruzamiento comienza con la hibridación de dos parentales, que transfiere una copia de cada genoma a la progenia híbrida. La eliminación de los genes del parental no recurrente depende de los procesos de dilución y

selección y, después de 3 retrocruzamientos (generación BC₃F₃) se predice que una población contendrá, aproximadamente el 7% del parental no recurrente. Si asumimos que el genoma de *Castanea* contiene 25.000 genes, la progenia de esta tercera generación tendrá 1.700 genes del carácter asiático. También puede estimarse que las diferentes especies de *Castanea* comparten muchos alelos idénticos y que la divergencia entre especies se puede estimar en el 1%. En consecuencia, se piensa que el método de retrocruzamientos puede introducir de forma aleatoria 17 genes del parental asiático y de función desconocida en un castaño con fenotipo del castaño americano, *C. dentata*. Para llevar a cabo todo este proceso es necesario un período de tiempo de 20-25 años (Tabla 1). Y este es el gran inconveniente de esta metodología. Se acepta hoy día que sólo con la ayuda de los marcadores moleculares (biotecnología) podrían acelerarse los nuevos programas de mejora del castaño que puedan ponerse en marcha en el futuro (Wheeler y Sederoff, 2009).

El desarrollo de los sistemas de regeneración del castaño in vitro mediante la inducción de embriogénesis somática ha necesitado de cerca de dos décadas de investigación, casi el mismo tiempo que obtener la generación BC₃F₃ de castaño. Sin embargo, ahora que los sistemas de transformación genética están disponibles, el tiempo requerido para introducir un número pequeño de genes de

Tabla 1. Modelo teórico del tiempo necesario para la producción de castaños resistentes a las enfermedades utilizando los programas de mejora genética convencional (mediante retrocruzamientos) o de transformación genética (plantas transgénicas).



función conocida en las líneas embriogénicas de castaño y regenerar y aclimatar las plantas transgénicas disponibles para llevar a cabo los ensayos de resistencia a chancro, podría estimarse entre 2 y 4 años (Tabla 1). Estas plantas transgénicas mantendrían, prácticamente al 100%, su carácter de castaño europeo o americano, la única e importante diferencia es que serían resistentes. Si se identificase un nuevo alelo relacionado con la resistencia a chancro, un programa de retrocruzamientos requeriría, al menos, otros 20 años de esfuerzo para obtener un castaño resistente, frente a los 2-4 años si usamos la vía de la producción de plantas transgénicas.

Por tanto, la ventaja del sistema biotecnológico está en la rapidez de la consecución de los resultados buscados, sin embargo tiene el gran inconveniente del rechazo social hacia las plantas transgénicas, a pesar de que el sistema inserta sólo un pequeño número de genes de función conocida. Este rechazo es mucho más acentuado en Europa que en USA, por eso es de esperar que los castaños transgénicos resistentes a chancro crezcan antes en este último país.

Aunque la transformación genética necesite años para que sea aceptada, los estudios genómicos tendrán un gran impacto en la recuperación del castaño a través del uso de marcadores moleculares (biotecnología) que guiarán la mejora mediante retrocruzamientos (mejora clásica) y permitirán la selección temprana de las líneas recurrentes. Es posible también que los marcadores moleculares puedan reemplazar los ensayos de inoculación y comprobación de la resistencia en los programas de selección. Por tanto, no es imaginable el inicio de un nuevo programa de mejora del castaño sin el uso de la biotecnología como una herramienta esencial para su recuperación y utilización.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Xunta de Galicia (España) la financiación parcial de este trabajo a través de los proyectos PGIDT06PXIC40003PN y INCITE07PXI400004ES.

BIBLIOGRAFÍA

- Anagnostakis, S.L. (1982). Biological control of chestnut blight. *Science*, 215, 466–471.
- Anagnostakis, S.L. (1992). Chestnut breeding in the United States. Proceedings of the World Chestnut Industry Conference. Morgantown, WV, USA, July 8–10.
- Andrade, G.M., Nairn, C.J., Le, H.T., Merkle, S.A. (2005). Regeneration of transgenic American chestnut plants following co-cultivation of embryogenic tissues with *Agrobacterium tumefaciens*. IUFRO Tree Biotechnology 2005, November 6-11, 2005, Pretoria, South Africa. Abstract N° S7, p 10.
- Andrade, G.M., Nairn C.J., Le, H.T., Merkle, S.A. (2009). Sexually mature transgenic American chestnut trees via embryogenic suspension-based transformation. *Plant Cell Rep.*, 28, 1385-1397.
- Bellini, E. (2005). The chestnut and its resources: images and considerations. *Acta Hort.*, 693, 85–96.
- Bounous, G. (2002). Situazione mondiale. En: Il castagno. Coltura, ambiente ed utilizzazioni. Bounous G, (Ed.) Bologna, Italy: Edagricole. pp. 215-217.
- Casasoli, M., Mattioni, C., Cherubini, M., Villani, F. (2001). A genetic linkage map of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD, ISSR and isozyme markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 102, 1190–1199.
- Conedera, M., Manetti, M.C., Giudici, F., Amorini, E. (2004). Distribution and economic potential of the sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Europe. *Ecologia Mediterranea*, 30, 47–61.
- Corredoira, E., Ballester, A., Vieitez, A.M. (2003). Proliferation, maturation and germination of *Castanea sativa* Mill. somatic embryos originated from leaf explants. *Ann. Bot.*, 92, 1129-1136.
- Corredoira, E., Montenegro, D., San-José, M.C., Vieitez, A.M., Ballester, A. (2004). *Agrobacterium*-mediated transformation of European chestnut embryogenic cultures. *Plant Cell Rep.*, 23, 311-318.
- Corredoira, E., Ballester, A., Vieitez, A.M. (2006). Somatic embryogenesis in chestnut. En: *Somatic Embryogenesis*, Plant Cell Monogr. (2). Mujib S, Samaj J, (Eds). Heidelberg, Germany: Springer-Verlag. pp. 177-199.
- Corredoira, E., San-José, M.C., Vieitez, A.M., Ballester, A. (2007). Improving genetic transformation of European chestnut and cryopreservation of transgenic lines. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 91, 281-288.
- Corredoira, E., Valladares, S., Vieitez, A.M., Ballester, A. (2008). Improved germination of somatic embryos and plant recovery of European chestnut. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 44, 307-315.
- Diskin, M., Steiner, K.C. and Hebard, F.V. (2006). Recovery of American chestnut characteristics following hybridization and backcross breeding to restore blight-ravaged *Castanea dentata*. *Forest Ecol. Manag.*, 223, 439–447.
- Elorrieta, J. (1949). El castaño en España. IFIE, Madrid, 333 pp.
- FAO (2002). Inventory of chestnut research, germplasm and references. (www.fao.org).
- Fernández de Ana, F. J. (2002). Spagna. En: Il castagno. Coltura, ambiente ed utilizzazioni. Bounous, G. (Ed.). Edagricole, Bologna, pp. 265–273.

- Gallastegui, C. (1926). Técnica de la hibridación artificial del castaño. Bol. Real Soc. Cien. Natur., 26, 88-94.
- García-Casado, G., Collada, C., Allona, I., Soto, A., Casado, R., Rodríguez-Cerezo, E., Gomez, L. and Aragoncillo, C. (2000). Characterization of an apoplastic basic thaumatinlike protein from recalcitrant chestnut seeds. *Physiol. Plant.*, 110, 172–180.
- Grente, J. (1975). La lutte biologique contre le chancre du châtaignier par “hypovirulence contagieuse”. *Annal. Phytopathol.*, 7, 216–218.
- Grente, J. (1981). Les variants hypovirulents del *Endothia parasitica* et la lutte biologique contre le châtaignier. Ph.D. Thesis, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France, 195 pp.
- Hebard, F.V. (2006). Meadowview Notes 2005–2006. J. American Chestnut Foundation, 20, 18–25.
- Jaynes, R.A. (1968). Progress with chestnut. *Horticulture*, 46, 16–17.
- Kubisiak, T.L., Hebard, F.V., Nelson, C.D., Zhang, J., Bernatzky, R., Huang, H., Anagnostakis, S.L. and Doudrick, R.L. (1997). Molecular mapping of resistance to blight in an interspecific cross in the genus *Castanea*. *Phytopathology*, 87, 751-759.
- Marioni, D., Akkac, A., Bounous, G., Edwards, K.J., Botta, R. (2003). Development and characterization of microsatellite markers in *Castanea sativa* Mill. *Mol. Breeding*, 11, 127–136.
- Maynard, C.A., Powell, W.A., Polin-McGuigan, L.D., Vieitez, A.M., Ballester, A., Corredoira, E., Merkle, S.A., Andrade, G.M. (2008). Chestnut. En: *Compendium of Transgenic Crop Plants: Transgenic Forest Tree Species*. Kole C, Hall TC, (Eds.). Blackwell Publishing. pp. 169-192.
- Merkle, S.A., Bailey, R.L., Pauley, B.A., Neu, K.A., Kim, M.K., Rugh, C.L., Montello, P.M. (1997). Somatic embryogenesis from tissues of mature sweetgum trees. *Can. J. For. Res.*, 27, 959-964.
- Pereira-Lorenzo, S., Diaz-Hernandez, M. B., Ramos-Cabrera, A. M. (2006). Use of highly discriminating morphological characters and isozymes in the study of Spanish chestnut cultivars. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.*, 131, 770-779.
- Polin, L.D., Liang, H., Rothrock, R.E., Nishii, M., Diehl, D.L., Newhouse, A.E., Mairn, C.J., Powell, W.A., Maynard, C.A. (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation of American chestnut (*Castanea dentata* (Marsh) Borkh.) somatic embryos. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 84, 69-79.
- Rutter, P.A., Burnham, C.R. (1982). The Minnesota chestnut program-new promise for breeding a blight resistant American chestnut. *Ann. Rep. Northern Nut Growers Assoc.*, 73, 81–90.
- Rutter, P.A., Miller, G., Payne, J.A. (1990). Chestnuts (*Castanea*). *Acta Hortic.*, 290, 761–788.
- Seabra, R.C., Pais, M.S. (1998). Genetic transformation of European chestnut. *Plant Cell Rep.*, 17, 177–182.
- Turchetti, T., Maresi, G. (2005). Phytosanitary criteria for the protection of chestnut orchards and stands against chestnut blight and ink disease. *Acta Hortic.*, 693, 521–528.
- Urquijo, P. (1944). Aspectos de la obtención de híbridos resistentes a la enfermedad del castaño. *Bol. Pat. Veg. Entomol. Agric.*, 13, 447-462.
- Vannini, A., Vettraino, A.M., Anselmo, N. (2002). Patología. Il Castagno. *Coltura, Ambiente ed Utilizzazioni*. Bounous, G. (Ed.) Edagricole, Bologna, pp. 103–111.

- Vieitez, A.M., Vieitez, M.L., Vieitez, E. (1986). Chestnut (*Castanea* spp). En: Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 1. Bajaj, Y.P.S. (Ed). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 393-414.
- Vieitez, A.M., Sánchez, C., García-Nimo, M.L., Ballester, A. (2007). Protocol for micropropagation of *Castanea sativa*. En: Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Jain SM, Häggman H, (Eds.). Heidelberg, Germany: Springer, 299-312.
- Vieitez, E. (1961). Obtención de castaños resistentes. Centro Forestal de Lourizán, Pontevedra, 29 pp.
- Vieitez, E., Vieitez, M.L., Vieitez, F.J. (1996). El castaño. Edilesa, León, Spain.
- Vieitez, F.J., San-José, M.C., Ballester, A., Vieitez, A.M. (1990). Somatic embryogenesis in cultured immature zygotic embryos in chestnut. J Plant Physiol., 136, 253-256.
- Wheeler, N., Sederoff, R. (2009). Role of genomics in the potential restoration of the American chestnut. Tree Genetics and Genomes, 5, 181-187.
- Xing, Z., Powell, W.A. and Maynard, C.A. (1999). Development and germination of American chestnut somatic embryos. Plant Cell Tissue Organ Cult., 57, 47-55.