



7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

**Gestión del monte: servicios
ambientales y bioeconomía**

26 - 30 junio 2017 | Plasencia
Cáceres, Extremadura

7CFE01-003

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales
Plasencia. Cáceres, Extremadura. 26-30 junio 2017
ISBN 978-84-941695-2-6

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Las variedades tradicionales de castaño en Extremadura: identificación y caracterización

MARTÍN, M.A.^{1,2*}, DORADO, J.¹, PLATERO, M.¹, SOLLA, A.^{1,2} y MARTÍN, L.M.³

¹ Ingeniería Forestal y del Medio Natural, Universidad de Extremadura, Av. Virgen del Puerto 2, 10600 - Plasencia, Cáceres, España (angelamartin@unex.es).

² Institute of Dehesa Research (INDEHESA), Universidad de Extremadura, España.

³ Departamento de Genética, E.T.S.I.A.M., Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), Universidad de Córdoba, 14071 - Córdoba, España.

Resumen

En Extremadura, el castaño (*Castanea sativa* Mill.) se considera un cultivo agroambiental, ya que su mantenimiento genera diversos bienes (fruto, madera, miel, setas, valor medioambiental) que ayudan a sostener la población rural. Sin embargo, existen amenazas sobre el castaño, como el abandono de su cultivo por la pérdida de rentabilidad, la introducción de genotipos foráneos sin evaluación previa, o la sustitución y/o eliminación de las variedades tradicionales. El objetivo de este trabajo ha sido la caracterización de los recursos genéticos del castaño en Extremadura mediante la identificación y caracterización de las variedades autóctonas de la zona. Se han analizado 115 árboles correspondientes a 36 denominaciones varietales tradicionales empleando caracteres morfológicos cualitativos y marcadores microsatélites. La combinación de ambos tipos de marcadores ha permitido identificar 31 variedades, de las cuales 24 son autóctonas, cinco son híbridos interespecíficos de *C. sativa* x *C. crenata*, y dos pertenecen a otra región. Además, se han detectado cinco casos de homonimias y otros cinco de sinonimias. Por todo ello, en este trabajo se ha constatado que el sistema de manejo en estas zonas favorece un alto grado de diversidad genética y de distribución local, por lo que dichas zonas constituyen auténticas unidades de conservación genética en cultivo (on-farm conservation).

Palabras clave

Agrobiodiversidad, landraces, marcadores moleculares, recursos genéticos

1. Introducción

En la actualidad, tanto la agricultura como la gestión forestal se caracterizan por la puesta en valor de aspectos que van más allá de la eficacia en la producción, integrando todas las externalidades que se generan. Una de dichas externalidades es la contribución de los sistemas productivos al mantenimiento de la biodiversidad, y dentro de esta biodiversidad, a la diversidad genética de las especies manejadas por el hombre (HAMMER 2003).

Los agroecosistemas tradicionales se consideran los principales reservorios de la diversidad de las variedades locales ya que preservan tanto sus procesos evolutivos como el conocimiento de los agricultores asociado a la selección y manejo de dichas variedades (BRUSH & MENG 1998; THRUPP 2000; FOWLER & HODGKIN 2005). La cuenca Mediterránea alberga agroecosistemas tradicionales de gran importancia para la preservación de la biodiversidad de los cultivos, y el castaño es un ejemplo de dichos sistemas, cultivado desde la antigüedad para la producción de madera y fruto. En esta cuenca, el castañar es un elemento cultural de muchas comarcas, conformador de paisajes de gran valor, enriquecedor de la biodiversidad y atractivo para el turismo rural.

En Extremadura, los castañares ocupan una superficie de aproximadamente 6000 ha, y los más importantes se localizan en el norte (Valle del Jerte, Valle del Ambroz, y Sierra de Gata) y en el sureste (Sierra de las Villuercas) de la provincia de Cáceres. También existen extensiones de castañar de menor importancia en Valencia de Alcántara, la comarca de La Vera, la comarca de las Hurdes y

Cabeza la Vaca. De ellas, las principales zonas destinadas a la producción y comercialización de fruto son el Valle del Jerte y las Villuercas en donde se emplean variedades tradicionales injertadas sobre patrones procedentes de semilla (Figura 1). En las últimas décadas se está imponiendo la tendencia de introducir genotipos que puedan contrarrestar las principales amenazas que afectan a la especie, como el estrés hídrico o el ataque de patógenos. En este sentido, se está empleando material resistente a la tinta (*Phytophthora cinnamomi*), clones procedentes de la hibridación de *C. sativa* × *C. crenata*, algunos de ellos indicados como ‘tolerantes’ al estrés hídrico.



Figura 1. Ejemplo de los castañares muestreados en Extremadura

Durante mucho tiempo, las variedades tradicionales de castaño se han clasificado de acuerdo a su origen geográfico, período de maduración o tipo de uso del fruto, lo que ha complicado su estudio (FINESCHI 1998), ya que la ausencia de referencias estándar ha generado confusión con el nombre de las variedades y se han detectado numerosos casos de homonimias y sinonimias (BOUNOUS 2002; GOBBIN et al. 2007). Los caracteres morfológicos constituyen el primer paso en la identificación varietal, y su empleo junto con los marcadores microsatélites (SSRs) ha mejorado la identificación de las variedades y ha puesto de manifiesto el gran acervo genético que contienen las mismas (GOULÃO et al. 2001; MARTÍN et al. 2009; MARINONI et al. 2013).

En las principales áreas de distribución de la especie en España, el germoplasma de castaño es rico en variedades tradicionales cultivadas. Diversos estudios han catalogado un elevado número de cultivares, principalmente del norte y sur de la Península, confirmando la alta diversidad genética que

implica el sistema productivo de la especie (MARTÍN et al. 2009; PEREIRA-LORENZO et al. 2010; QUINTANA et al. 2014). Estos estudios coinciden en que existe una diversidad genética autóctona, asociada a comarcas de alto valor medioambiental, con importantes connotaciones sociales y un patrimonio cultural desarrollado por las comunidades asociadas a su manejo.

Sin embargo, dicha biodiversidad y la de los ecosistemas que la componen están actualmente amenazados. Así, los procesos de sustitución varietal sin ningún tipo de control y limitación, y la introducción de variedades exóticas sin evaluación previa están llevando al castaño a una situación crítica en muchos lugares. Otra amenaza es el abandono del aprovechamiento, que junto a lo anterior, podrían poner en peligro el mantenimiento de los sistemas tradicionales y de los genotipos que han surgido de esta explotación tradicional (BOUNOUS 2002; MARTÍN et al. 2009; PEREIRA-LORENZO et al. 2010).

En Extremadura, el conocimiento sobre el panorama varietal de castaño es muy escaso, ya que hasta el momento no se ha realizado ningún estudio para identificar y caracterizar las variedades de la región. Sí existen trabajos previos, con enfoque nacional, que incluyen dentro del material evaluado algunas denominaciones varietales de Extremadura (RAMOS-CABRER et al. 2003; PEREIRA-LORENZO et al. 2010), y que cifran en cuatro las variedades de la región: *Temprana* y *Tardía* en la localidad de Cabeza la Vaca, e *Injerta* y *Verata* en la localidad de Guadalupe.

2. Objetivos

El objetivo de este trabajo es clarificar el panorama varietal del castaño en Extremadura con el fin de poder contribuir a la puesta en valor del cultivo y preservar los recursos genéticos de la especie. Los objetivos específicos son: i) identificar las variedades tradicionales de Extremadura mediante el empleo de caracteres morfológicos y marcadores moleculares; ii) detectar homonimias y sinonimias; y iii) evaluar la diversidad genética contenida en las variedades identificadas, así como sus posibles relaciones de parentesco.

3. Metodología

Se realizaron prospecciones en el área de distribución de la especie en Extremadura, haciendo mayor hincapié en las dos principales zonas productoras de castaña (Figura 2). Con la ayuda de los agricultores se recopiló una lista de denominaciones varietales y se muestrearon árboles representativos de cada una de ellas. El objetivo fue conseguir al menos un árbol de cada una de las citadas denominaciones e incrementar el número de individuos de forma proporcional a la importancia de la denominación varietal.

Se incluyeron total de 115 árboles correspondientes a 36 denominaciones varietales. Cada entrada se caracterizó en función de 11 caracteres morfológicos de fruto, hoja, inflorescencia y erizo de los propuestos por la UPOV (1989) y que han mostrado una alta variabilidad para la identificación varietal (Tabla 1) (MARTÍN et al. 2009).

Para los análisis moleculares se emplearon ocho marcadores microsatélites (*CsCAT1*, *CsCAT2*, *CsCAT3*, *CsCAT6*, *CsCAT14*, *CsCAT16*, *EMCs25*, *EMCs38*) desarrollados en *C. sativa* (MARINONI et al. 2003; BUCK et al. 2003). Estos marcadores pertenecen a distintos grupos de ligamiento (BARRENECHE et al. 2004) y fueron seleccionados por el alto grado de polimorfismo y poder de discriminación demostrado en estudios previos (MARTÍN et al. 2009; MARTÍN et al. 2010). La extracción de ADN se realizó en 20 mg de hoja liofilizada empleando el kit Qiagen DNeasy Plant mini. La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 20 μ l siguiendo el protocolo del kit Qiagen multiplex. Las muestras se analizaron con el secuenciador de ADN ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems).

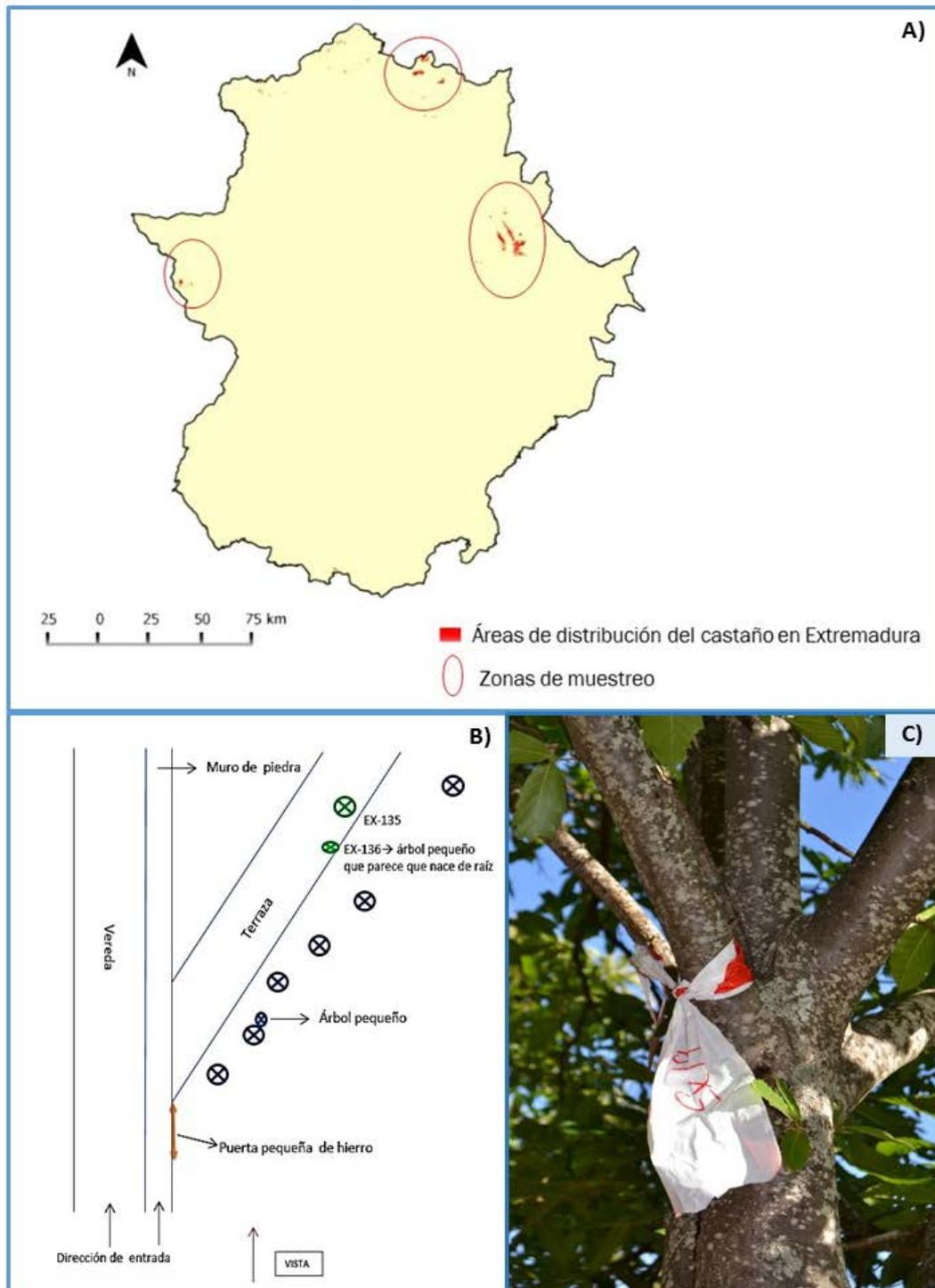


Figura 2. A) Distribución del castaño en Extremadura y zonas seleccionadas para el estudio; B) Esquema de campo empleado en la identificación varietal; C) Ejemplo del etiquetado de los árboles

La diversidad genética del conjunto de muestras analizadas para los 8 marcadores microsatélites se evaluó con el programa GenAlex v.6. (PEAKALL & SMOUSE 2005). La probabilidad de identidad (PI) y número de genotipos se calcularon con el programa IDENTITY 1.0 (WAGNER & SEFC 1999).

Para la identificación varietal y el análisis de la distancia genética entre variedades se empleó el programa NTSYS 2.1 (ROHLF 2008). El análisis de similaridad se realizó empleando el coeficiente de Jaccard en el caso de los caracteres morfológicos (JACCARD 1912), y el coeficiente de LYNCH (1990) para los marcadores microsatélites. Para estimar la significación del dendrograma se evaluó el coeficiente de correlación cofenético (SNEATH & SOKAL 1973).

4. Resultados

El análisis conjunto de los marcadores microsatélites y de los caracteres morfológicos ha dado como resultado la identificación de 31 variedades clonales, de las cuales 24 son autóctonas, cinco son híbridos interespecíficos y dos proceden de otra región.

Dentro de las 24 autóctonas, tres han coincidido con las más representativas de la región: *De Pablo* en el Valle del Jerte y *Verata e Injerta de Guadalupe* en la Comarca de las Villuercas (Figura 2). También se han identificado otras 12 variedades, desarrolladas en Extremadura aunque se cultivan de forma residual, que estuvieron representadas por un número bajo de individuos. Además se han identificado nueve variedades que no habían sido previamente descritas en la literatura (*Ciolo, Del País, Gorda de Navavillar de Ibor, Injerta Antigua de las Lanchuelas, Injerta Gorda, Injerta Roja, Injerta Temprana de Navavillar de Ibor, Militona y Roja Casareña*).

Se ha identificado un grupo de cinco variedades, compuesto por todas las entradas correspondientes a las denominaciones *Canadiense, Manolo, San Migueleña, Santos y Súper*, que ha resultado ser muy diferente al resto del material analizado. La relación de parentesco entre el citado grupo y el resto de entradas evaluadas mostró un nivel de similitud bajo ($I=0.25$).

Finalmente, los árboles correspondientes a las denominaciones *Malagueña y De Huelva* formaron dos grupos diferentes, no coincidentes con el resto de entradas y que dieron lugar a dos variedades.

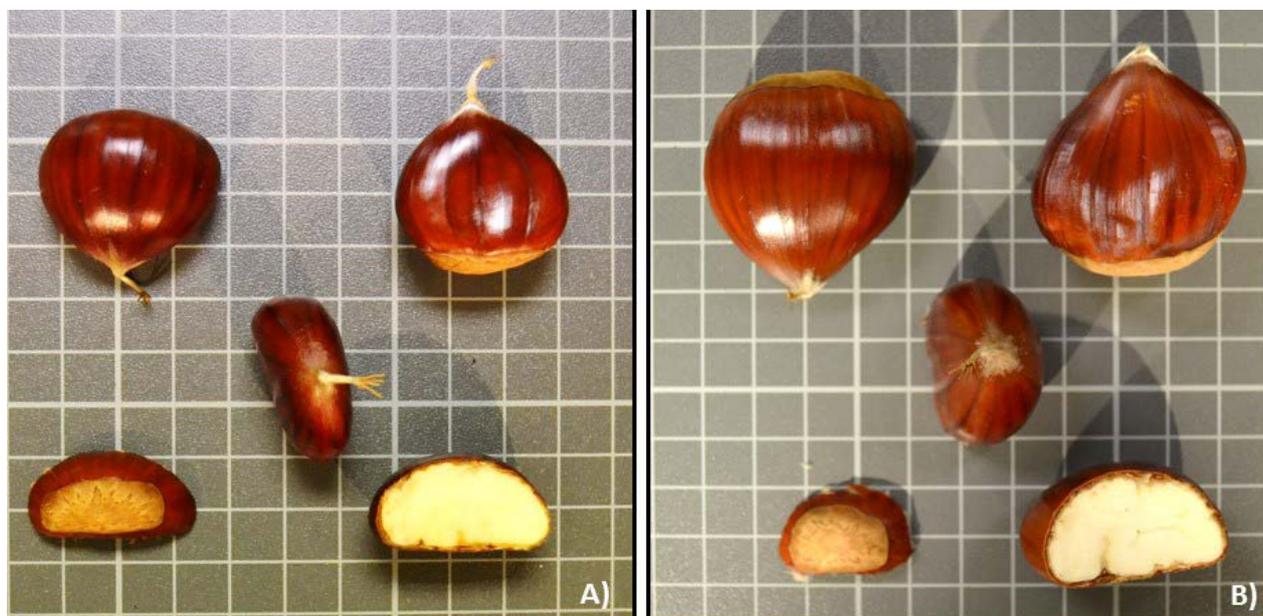


Figura 2. Ejemplo de características morfológicas de fruto de las variedades estudiadas. A) Variedad De Pablo (Valle del Jerte), B) Variedad Verata (Villuercas)

En relación a la caracterización morfológica, los 11 caracteres estudiados resultaron polimórficos y permitieron adscribir todas las entradas a las 29 clases evaluadas (Tabla 1). Así, para la forma del fruto, la clase más frecuente ha sido la globosa, mientras que la forma elipsoide únicamente se ha detectado en cinco árboles pertenecientes a las denominaciones varietales *Calvotera*, *Súper*, *San Migueleña* y *Roja Casareña* (Tabla 1). Para el color, el fruto dominante fue marrón claro, y las coloraciones oscuras fueron muy escasas, representadas sólo en aproximadamente el 10% de los árboles (Tabla 1).

Tabla 1. Caracteres morfológicos evaluados y número de árboles correspondiente a cada clase

Carácter	Clase	Nº árboles
Forma del fruto	Ovoide/ Globosa/ Elipsoide	31/ 79/ 5
Color del fruto	Marrón-rojizo/ Marrón claro/ Marrón oscuro/ Marrón-negro	48/ 55/ 10/ 2
Brillo del fruto	Sin brillo/ Con brillo	12/ 103
Presencia de estrías en el fruto	Sin estrías/ Con estrías	44/ 71
Tipo de estrías	Sin estrías/ Patentes/ Difusas	44/ 65/ 6
Pilosidad del fruto	Nula/ Media/ Alta	24/ 70/ 21
Contraste hilum-pericarpio	Claro/ Difuso	112/ 3
Púa del erizo	Erecta/ Corona	109/ 6
Tipo de hoja	Dentada/ Mucronada	106/ 9
Inflorescencia masculina	Longistaminada/ Mesostaminada/ Braquistaminada/ Astaminada	18/ 22/ 13/ 62
Fecha de maduración	Temprana/ Tardía	48/ 67

En cuanto al tipo de inflorescencia masculina, los amentos astaminados (aquéllos que no producen polen) han estado presentes en más de la mitad de las denominaciones varietales, mientras que los longistaminados (amentos con estambres en forma de plumero que producen una gran cantidad de polen) han sido poco frecuentes, apareciendo sólo en aproximadamente en el 15% de las entradas evaluadas (Tabla 1).

Para los demás caracteres (brillo, pilosidad, presencia y tipo de estrías, contraste hilum-pericarpio, fecha de maduración, tipo de erizo y tipo de hoja) se detectó una clase dominante representada por más de la mitad de los individuos estudiados (Tabla 1).

El total de alelos para el conjunto de los ocho SSRs evaluados fue 72, variando entre cuatro y 14 alelos por locus para *EMCs25* y *CsCAT3*, respectivamente (Tabla 2). El número de genotipos identificados por locus fue alto, excepto para el marcador *EMCs25* que mostró un bajo nivel de discriminación (Tabla 2). En cuanto a la distribución de las frecuencias de alelos, 13 fueron alelos comunes (frecuencia >20%), 22 alelos tuvieron una frecuencia intermedia (5-20%), 14 alelos fueron raros (frecuencia <5%), y 23 alelos fueron exclusivos, que estuvieron localizados en siete de los ocho marcadores y permitieron identificar 14 de las 31 variedades del estudio.

El promedio de heterocigosidad observada (H_o) fue 0.638, variando entre 0.209 (*EMCs25*) y 0.826 (*CsCAT1*). La heterocigosidad promedio esperada (H_e) fue 0.640, con el valor más bajo para el locus *EMCs25* y el más alto para *CsCAT3* (Tabla 2). El coeficiente de consanguinidad (F_{IS}) mostró valores cercanos a 0, y únicamente en *EMCs25*, locus de menor polimorfismo, fue significativamente distinto a cero (Tabla 2).

Tabla 2. Diversidad genética encontrada en los 115 individuos para los ocho marcadores SSRs analizados

Locus	Nº Alelos	Nº Genotipos	H_o	H_e	F_{IS}
<i>CsCAT1</i>	8	10	0.617	0.563	-0.102
<i>CsCAT2</i>	13	13	0.652	0.637	-0.028
<i>CsCAT3</i>	14	19	0.826	0.864	0.040
<i>CsCAT6</i>	10	13	0.513	0.530	0.028
<i>CsCAT14</i>	8	11	0.748	0.649	-0.158
<i>CsCAT16</i>	6	11	0.739	0.707	-0.050
<i>EMCs25</i>	4	4	0.209	0.413	0.492*
<i>EMCs38</i>	9	16	0.800	0.758	-0.060

H_o , heterocigosidad observada; H_e , heterocigosidad esperada; F_{IS} , coeficiente de consanguinidad; * Diferencias significativas $P < 0.05$

Finalmente, se han detectado cinco casos de sinonimias (variedades con diferentes nombres que son iguales) y otros cinco de homonimias (variedades con el mismo nombre que son distintas). Los casos de sinonimias correspondieron a denominaciones que presentaron características morfológicas de fruto muy similares a las variedades más importantes de la región (*De Pablo* y *Verata*). Los casos de homonimias estuvieron asociados con el término “injerta”, empleado por los agricultores para designar árboles que están injertados.

5. Discusión

Los resultados de este trabajo han puesto de manifiesto una elevada variabilidad genética en los castañares de fruto en Extremadura. El uso combinado de los marcadores morfológicos y microsatélites ha permitido identificar 31 variedades clonales, 24 de ellas autóctonas.

El resultado más importante derivado de la caracterización morfológica ha sido el alto porcentaje de variedades con amentos masculinos astaminados. En España, la mayor parte de las variedades poseen amentos de tipo mesostaminados y longistaminados, patrón que se repite en las comunidades autónomas de Asturias, Galicia, y Castilla y León (PEREIRA-LORENZO et al. 2006). Únicamente en Extremadura, dichos autores han descrito un alto grado de denominaciones varietales astaminadas, confirmando nuestros resultados. Además, resultados similares a la situación descrita en Extremadura se han encontrado en la provincia de Huelva, donde dos de las variedades más importantes (*Helechal* y *Comisaria*) son astaminadas (MARTÍN et al. 2009). Esto implica la necesidad de introducir individuos con amentos longistaminados que sirvan de polinizadores. En el caso de la comarca Villuercas, los árboles denominados “reboldanos” (sin injertar) juegan un papel importante en este respecto, ya que en su mayoría presentan amentos que producen gran cantidad de polen, y según la información proporcionada por los agricultores se encuentran situados estratégicamente para este fin, en la linde de las fincas.

En cuanto a la diversidad genética detectada, nuestros resultados fueron similares a los descritos en otras zonas de España. En Andalucía, un estudio realizado con 100 individuos y 7 SSRs identificó 8.7 alelos por locus y 23 alelos exclusivos (MARTÍN et al. 2009); en el Bierzo, a partir de 169 árboles estudiados con 7 SSRs, se han descrito un total de 8.4 alelos por locus (QUINTANA et al. 2014). Por el contrario, estudios en Galicia con un tamaño de muestra similar a los descritos han mostrado valores inferiores (FERNÁNDEZ-LÓPEZ & FERNÁNDEZ-CRUZ 2015).

El perfil genético de las variedades *Canadiense*, *Manolo*, *San Migueleña*, *Santos*, y *Súper*, que resultó muy diferente al resto del material analizado, se comparó con el perfil de otros genotipos identificados en la Península Ibérica (MARTÍN et al. 2009; PEREIRA-LORENZO et al. 2010; QUINTANA et al., 2014), no encontrándose en ningún caso equivalencias. Sin embargo, se detectaron alelos específicos de *C. crenata*. La explicación más plausible es que estas denominaciones sean híbridos interespecíficos *C. sativa* × *C. crenata*, de los que España tiene una de las colecciones más amplia y diversa, y que son utilizados para plantaciones forestales y frutales, bien como productores directos, o bien como patrones de las variedades del país (PEREIRA-LORENZO et al. 2010).

Del mismo modo, el perfil genético de las denominaciones *De Huelva* y *Malagueña* se comparó con la base de datos publicada de las variedades tradicionales de Andalucía. Se comprobó que la denominación *De Huelva* correspondió a la variedad *Temprana*, una variedad muy apreciada por su maduración precoz, y la denominación *Malagueña* correspondió a la variedad *Pilonga*, la más importante de la provincia de Málaga (MARTÍN et al. 2009). Estos resultados confirman el gran flujo de material que existe por parte de los agricultores, los cuales transportan púas de aquellas variedades tradicionales más productivas (FINESCHI 1998; BOUNOUS 2002).

Además, se han detectado cinco sinonimias y otras cinco homonimias en el material evaluado. Estos casos se han registrado ya en estudios previos con variedades tradicionales de castaño en Europa (GOBBIN et al. 2007; MARTÍN et al. 2009; FERNÁNDEZ-LÓPEZ & FERNÁNDEZ-CRUZ 2015). El caso más llamativo, fue el descrito para los cultivares de tipo “Marrón” (castaña de excelente calidad) en Italia, en el que un estudio ha llegado a identificar hasta seis sinonimias (MARTÍN et al. 2010).

6. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo han puesto de manifiesto que los castañares extremeños albergan numerosas variedades tradicionales fruto de los procesos selectivos efectuados por los agricultores, por lo que son un importante reservorio de diversidad.

Se constata que estos recursos genéticos se están viendo amenazados por diferentes circunstancias, entre las que destaca la sustitución de variedades autóctonas por híbridos mejor adaptados a las exigencias del mercado, sin evaluación previa. Se sugiere establecer medidas para la salvaguarda de dichas variedades tradicionales, como la tipificación de la castaña, establecer colecciones de germoplasma que aseguren una conservación *ex situ* representativa, y el fomento de acciones que permitan el mantenimiento de los agroecosistemas en los que se encuentra el castaño.

7. Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad en el marco de los Proyectos de Investigación del Plan Nacional de I+D+i AGL2013-48017-C2-1-R y AGL2014-53822-C2-1-R. M.A. Martín fue contratada con financiación de la Secretaría General de Ciencia, Tecnología e Innovación de la Consejería de Economía e Infraestructuras de la Junta de Extremadura. Los autores agradecen la ayuda a los propietarios de los castañares que han contribuido prestando sus fincas para la prospección y toma de muestras, y en especial a Efrén Martín, por aportar una información imprescindible para el desarrollo de este trabajo.

8. Bibliografía

BARRENECHE, T.; CASASSOLI, M.; ROUSSEL, G.; AKKAK, A.; MEDDOUR, H.; PLOMION, C.; VILLANI, F.; KREMER, A. 2004. Comparative mapping between *Quercus* and *Castanea* using simple sequences repeats (SSRs). *Theor Appl Genet* 108, 558-566.

BOUNOUS, G. 2002. Il castagno. Coltura, ambiente ed utilizzazioni in Italia e nel mondo. Edagricole.

BRUSH, S.B.; MENG, E. 1998. Farmer's valuation and conservation of crop genetic resources. *Genet Resour Crop Evol* 45:139–150.

BUCK, E.J.; RUSSELL, K.; HADONOU, M.; JAMES, C.J.; BLAKESLEY, D. 2003. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in European chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Mol Ecol Notes* 3, 239-241.

THRUPP, L.A. 1998. Cultivating diversity: agrobiodiversity and food security. World Resources Institute, Washington, DC.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; FERNÁNDEZ-CRUZ, J. 2016. Genetic structure of wild sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) populations in northwest of Spain and their differences with other European stands. *Conserv Genet* 17, 1-19.

FINESCHI, S. 1988. Genetics of chestnut (*Castanea sativa* Mill.). II. Uniformity of isozyme phenotypes in grafted orchards. *Silvae Genet* 37, 82-83.

FOWLER, C.; HODGKIN, T. 2005. Plant genetic resources for food and agriculture: assessing global availability. *Ann Rev Env Resour* 29, 10.1–10.37.

GOBBIN, D.; HOHL, L.; CONZA, L.; JERMINI, M.; GESSLER, C.; CONEDERA, M. 2007. Microsatellite-based characterization of the *Castanea sativa* cultivar heritage of southern Switzerland. *Genome* 50, 1089-1103.

GOULÃO, L.; VALDIVIESSO, T.; SANTANA, C.; OLIVEIRA, C. 2001. Comparison between phenetic characterisation using RAPD and ISSR markers and phenotypic data of cultivated chestnut (*Castanea sativa* Miller). *Genet Resour Crop Evol* 48: 329-338.

HAMMER, K. 2003. A paradigm shift in the discipline of plant genetic resources. *Genet Resour Crop Evol* 50, 3-10.

JACCARD, P. 1912. The distribution of the flora in the alpine zone. *New Phytol* 11, 37-50.

LYNCH, M. 1990. The similarity index and DNA fingerprint. *Mol Biol Evol* 7, 478-484.

MARINONI, D.; AKKAK, A.; BOUNOUS, G.; EDWARDS, K.J.; BOTTA, R. 2003. Development and characterization of microsatellite markers in *Castanea sativa* (Mill.). *Mol Breed* 11, 127-136.

MARINONI, D.; AKKAK, A.; BELTRAMO, C.; GUARALDO, P.; BOCCACCI, P.; BOUNOUS, G.; FERRARA, A.M.; EBONE, A.; VIOTTO, E.; BOTTA, R. 2013. Genetic and morphological characterization of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) germplasm in Piedmont (north-western Italy). *Tree Genet Genom* 9, 1017-1030.

- MARTIN, M.A.; ALVAREZ, J.B.; MATTIONI, C.; CHERUBINI, M.; VILLANI, F.; MARTIN, L.M. 2009. Identification and characterisation of traditional chestnut varieties of southern Spain using morphological and simple sequence repeat (SSRs) markers. *Ann Appl Biol* 154, 389–398.
- MARTIN, M.A.; MATTIONI, C.; CHERUBINI, M.; TAURCHINI, D.; VILLANI, F. 2010. Genetic characterisation of traditional chestnut varieties in Italy using microsatellites (SSRs) markers. *Ann Appl Biol* 157, 37-44.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. 2005. GenAIEx 6: genetic analysis in excell. Population genetic software for teaching and research. Australian National University, Canberra. In: <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAIEx>.
- PEREIRA-LORENZO, S.; DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.B.; RAMOS-CABRER, A.M. 2006. Use of highly discriminating morphological characters and isozymes in the study of Spanish chestnut cultivars. *Am Soc Hort Sc* 131, 770-779.
- PEREIRA-LORENZO, S.; COSTA, R.; RAMOS-CABRER, A.; RIBEIRO, C.; DA SILVA, M.; MANZANO, G.; BARRENECHE, T. 2010. Variation in grafted European chestnut and hybrids microsatellite reveals two main origins in the Iberian Peninsula. *Tree Genet Genom* 5, 701-715.
- QUINTANA, J.; Contreras, A.; Merino, I.; Vinuesa, A.; Orozco, G.; Ovalle, F.; Gomez, L. 2014. Genetic characterization of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) orchards and traditional nut varieties in El Bierzo, a glacial refuge and major cultivation site in northwestern Spain. *Tree Genet Genom* 11, 826.
- RAMOS-CABRER, A.M.; PEREIRA-TABOADA, A.; PEREIRA-LORENZO, S. 2003. Características morfológicas e isoenzimáticas de los principales cultivares de castaño *Castanea sativa* Mill. de El Bierzo (Castilla y León) y Guadalupe (Extremadura). *Monografías INIA: Agrícola*, 14, 1-103.
- ROHLF, F.J. 2000. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software: Setauket, NY.
- SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. 1973. Numerical Taxonomy. San Francisco, CA, USA: Freeman.
- UPOV. 1989. Guidelines for the conduct of test for distinctness, homogeneity and stability (Chestnut, *Castanea sativa* Mill.). TG/124/3, 23 pp.
- WAGNER, H.W.; SEFC, K.M. 1999. IDENTITY. Version 1.0 (Computer program). Centre of Applied Genetics, University of Agricultural Sciences, Vienna. Available from <http://www.boku.ac.at/zag/forsch/identity.htm>.