



# 7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

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

26 - 30 junio 2017 | Plasencia  
Cáceres, Extremadura

---

---

7CFE01-048

---

---

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

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

## Aplicación de los microsatélites en la identificación de materiales de base de castaño

FERNÁNDEZ CRUZ, J.<sup>1</sup>, FERNÁNDEZ LÓPEZ, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación Forestal de Lourizán. Consellería do Medio Rural. Xunta de Galicia

### Resumen

Los materiales de base de castaño están formados por poblaciones, plantaciones y clones de los que se obtiene el material forestal de reproducción, tanto semillas como plantas, que se multiplican en viveros, para su comercialización. Los procedimientos de certificación garantizan el origen o identidad de los materiales de reproducción. Los marcadores genéticos son una herramienta importante en la verificación de la identidad clonal y del origen del material. Entre ellos destacan los microsatélites, que son secuencias cortas de nucleótidos (de 1 a 6 bases) repetidas en tándem un número elevado de veces. Estas repeticiones en el número de copias pueden llegar a ser diferentes entre individuos, permitiendo, en castaño, la identificación de variedades tradicionales de *Castanea sativa* e híbridos interespecíficos entre el castaño europeo (*C. sativa*) y las especies asiáticas (*Castanea crenata* y *Castanea mollissima*). Además, son útiles para verificar el origen geográfico de lotes de semillas o de plantas, determinar su diversidad y la presencia de contaminantes.

### Palabras clave

microsatélite, materiales de base, identificación molecular, origen geográfico, diversidad genética, castaño.

### 1. Introducción

El castaño es una especie de doble aptitud, muy demandada comercialmente por la calidad de su madera y fruto. Para la producción de madera, existen en la actualidad diversos materiales forestales de reproducción agrupados en rodales, huertos semilleros y clones híbridos resistentes a *Phytophthora cinnamomi* Rands. Por otro lado, existen también variedades tradicionales y portainjertos híbridos que son productores directos de castaña como el clon 90044.

Para la identificación y la verificación de la autenticidad del material de base y de variedades comerciales, los marcadores moleculares son una excelente herramienta, ya que permiten, tanto a los productores como a las administraciones competentes, un apropiado seguimiento en los procesos de producción, comercialización y utilización de algunos tipos de material forestal de reproducción (ALÍA et al., 2005).

Un marcador molecular es una secuencia de ADN conocida y localizada en un lugar específico del genoma y asociada con la herencia de un carácter o de un gen ligado (FAO, 2010). Un tipo de marcador molecular son los microsatélites (LITT Y LUTY, 1989), formados por secuencias cortas, de 1 a 6 bases nucleotídicas, repetidas en tándem un número alto de veces (SELKOE Y TOONEN 2006) y distribuidos de forma uniforme por todo el genoma. El tamaño de un locus varía entre 5-40 repeticiones, aunque también se pueden encontrar cadenas de mayor tamaño. Los microsatélites presentan herencia mendeliana simple y son marcadores codominantes, ya que se pueden diferenciar individuos homocigotos y heterocigotos, y son altamente polimórficos porque presentan un elevado número de alelos en un mismo locus, permitiendo la discriminación entre individuos.

Los microsatélites se pueden clasificar en tres tipos (WEBER, 1990):

- Puros o perfectos: presentan un solo motivo repetido  $n$  veces en serie. ej: (AC)<sub>9</sub>
- Puros interrumpidos: tienen un solo motivo repetido  $n$  veces, donde se intercalan nucleótidos entre las distintas repeticiones. ej: (CA)<sub>2</sub>AA(CA)<sub>12</sub>
- Compuestos: poseen dos o más motivos repetidos en serie. ej: (GT)<sub>2</sub>(TG)<sub>10</sub>

Si se tiene en cuenta el número de repeticiones, pueden clasificarse como dinucleótidos, trinucleótidos o tetranucleótidos si cada motivo de repetición presenta 2, 3 ó 4 nucleótidos respectivamente (GUICHOUX et al., 2011).

En este trabajo se muestra el empleo de los microsatélites para la identificación de variedades tradicionales, registradas en el registro de variedades comerciales e híbridos artificiales entre el castaño europeo (*Castanea sativa*) y las especies asiáticas (*Castanea crenata* y *Castanea mollissima*), que están aprobados como material forestal de reproducción cualificado o controlado. Otra aplicación de estos marcadores es su utilización para comprobar el origen geográfico de lotes de semillas o de plantas, determinar su diversidad y la presencia de contaminantes.

Los métodos moleculares comienzan con la extracción de ADN de hojas o yemas de castaño congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , utilizando el kit de extracción DNAeasy plant mini kit de Quiagen y la cuantificación del mismo mediante técnicas espectrofotométricas empleando el Biophotometer plus de Eppendorf. Para la caracterización molecular se emplean un total de 10 microsatélites: CsCAT3, CsCAT14, CsCAT16, CsCAT41 (MARINONI et al., 2003), EMCs2, EMCs14, EMCs15 (BUCK et al., 2003), QpZAG36, QpZAG110 (STEINKELLNER et al., 1997) y QrZAG96 (KAMPFER et al., 1998). Las reacciones de PCR se realizan en un volumen final de  $20\mu\text{L}$  que contiene  $1\times$  DreamTaq buffer (Fermentas UAB, Vilnius, Lituania),  $2.0\text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$  (Fermentas),  $200\text{ mM}$  de cada dNTP (Fermentas),  $0.2\ \mu\text{M}$  de primer forward marcado con D2, D3 o D4 (Sigma-Aldrich, Spain) dependiendo del microsatélite,  $0.2\ \mu\text{M}$  de primer reverse no marcado (Sigma-Aldrich),  $10\text{ ng}$  de ADN genómico,  $0.5\text{ U}$  de Taq polimerasa DreamTaq (Fermentas), y agua MilliQ. Las amplificaciones se hicieron en 2 termocicladores: I-Cycler (Bio-Rad, Foster City, California, EEUU) y Veriti (Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:  $95^{\circ}\text{C}$  durante 5 min, seguidos de 24-35 ciclos a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 45 s, la temperatura de la fase de hibridación fue diferente dependiendo del microsatélite (STEINKELLNER et al., 1997; KAMPFER et al., 1998; MARINONI et al., 2003; BUCK et al., 2003), durante 45 s, y 1.5 min a  $72^{\circ}\text{C}$ , y una extensión final a  $72^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. Se incluyeron controles positivos y negativos para verificar que las reacciones se realizaron correctamente. Los fragmentos amplificados se analizaron en el secuenciador CEQ8800 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Fullerton, California, EEUU). Los fragmentos se separaron siguiendo el método Frag-1 y se utilizó el CEQ DNA Size Standard Kit-400 (Beckman Coulter) como estándar.

## 2. Identificación molecular de clones de variedades tradicionales e híbridos interespecíficos

Una variedad tradicional es una variedad seleccionada y propagada por injerto por los agricultores durante muchas generaciones (FERNÁNDEZ-LÓPEZ Y FERNÁNDEZ-CRUZ, 2015). Las variedades tradicionales se clasifican como principales o secundarias, dependiendo de su productividad y como local o extendida dependiendo de su área de difusión. La mayoría de las variedades gallegas, con una misma denominación, presentan una distribución localizada. Por ejemplo, la variedad “De Parede” se localiza fundamentalmente en la Sierra de Meira, la variedad “Branca” al sur de la Sierra do Eixo, la variedad “Loura” se encuentra en la Sierra de Faro.

Las variedades son cultivadas mediante injertos para la producción de castaña y madera. Antes del siglo XX, los portainjertos empleados, eran los descendientes de las propias variedades o de castaños bravos de la zona de cultivo. Sin embargo, con la introducción, a partir del siglo XVIII, de *Phytophthora cinnamomi* Rands, que produce la enfermedad de la tinta, se produjo una alta mortalidad en las poblaciones de castaño del norte de España. Además, el chancro, causado por

el patógeno *Cryphonectria parasítica* Murrill, también afectó a las poblaciones gallegas de castaño en las últimas décadas. Debido a la sensibilidad de *C. sativa* a estas dos enfermedades, se introdujeron en España, a principios del siglo XX, las especies de castaño japonés (*Castanea crenata* Blume) y castaño chino (*Castanea mollissima* Sieb. et Zucc.). Aunque estas dos especies son resistentes a los dos patógenos citados anteriormente, no producen madera ni castaña de buena calidad. Por esta razón, a mediados del siglo XX, comenzaron diversos programas de mejora genética que buscaban castaños europeos resistentes a estas enfermedades, mediante cruzamientos controlados entre *C. sativa* y las especies asiáticas *C. crenata* y *C. mollissima* (GALLASTEGUI, 1926; URQUIJO, 1956). En 1989, el Centro de Investigación Forestal de Lourizán comenzó un programa para la identificación, propagación clonal y selección de clones resistentes a *Phytophthora* spp. para la producción de madera (FERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 1992; FERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 1995; MIRANDA-FONTAÍÑA Y FERNÁNDEZ-LÓPEZ, 2001; MIRANDA-FONTAÍÑA et al., 2007; FERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2008). Fruto de este trabajo se consiguió que un total de 32 clones del núcleo de propagación del Centro de Investigación Forestal de Lourizán fueran aprobados como material de base cualificado o controlado para la producción de madera (BOE nº272, de 13 de noviembre de 2007). Estos clones son también utilizados en la actualidad como portainjertos de variedades tradicionales.

El Centro de Investigación Forestal de Lourizán cuenta en la actualidad con un total de 56 genotipos multilocus diferentes de variedades tradicionales (Figura 1a). Esta base de datos de genotipos permite detectar accesiones con el mismo genotipo multilocus, identificar sinonimias y homonimias e identificar el material sin etiqueta. Las variedades sinónimas presentan una denominación diferente con un mismo genotipo. Por ejemplo, se comprobó que la variedad “Negral” cultivada mayoritariamente al norte de la Sierra do Eixo es sinónima a la variedad “Riá” que cultivada en el noroeste de la sierra de San Mamede, a 70 kilómetros. Por otro lado, las variedades homónimas comparten el mismo nombre pero tienen distinto genotipo. Este es el caso de la variedad “De Parede”, que presenta varios genotipos diferentes.

Cada rama del dendrograma contiene el nombre de la variedad más frecuente entre todas las accesiones que forman ese grupo. Cuando existen dos o más grupos homónimos, que presentan diferentes grupos multilocus, se diferencian entre ellos añadiendo al final de cada variedad un número consecutivo (Ej. Monfortina 1 y Monfortina 2). Las distancias genéticas permiten también definir linajes genéticos (MLL), que son accesiones originarias de un mismo clon que presentan genotipos multilocus diferentes en un nucleótido debidos a una mutación. En el dendrograma se diferencian por las letras “a” y “b” (Amarelante 1a y Amarelante 1b).

El Centro de Investigación Forestal de Lourizán también ha realizado en los últimos años la identificación de gran parte de los castaños híbridos localizados en su núcleo de propagación (FERNÁNDEZ-CRUZ Y FERNÁNDEZ-LÓPEZ, 2012). En total se han detectado 36 genotipos diferentes (Figura 1b).

La información genética contenida en las bases de datos de variedades tradicionales de castaño y de híbridos interespecíficos permite confirmar la denominación que se la ha asignado a la planta. Una vez que se obtiene el genotipo de una accesión se compara con los genotipos de la base de datos. Si el genotipo de la accesión coincide con algún genotipo de la base de datos, la muestra queda identificada. Por otro lado, si no coincide, puede considerarse una variedad nueva si existe un número suficiente de individuos con el mismo genotipo.

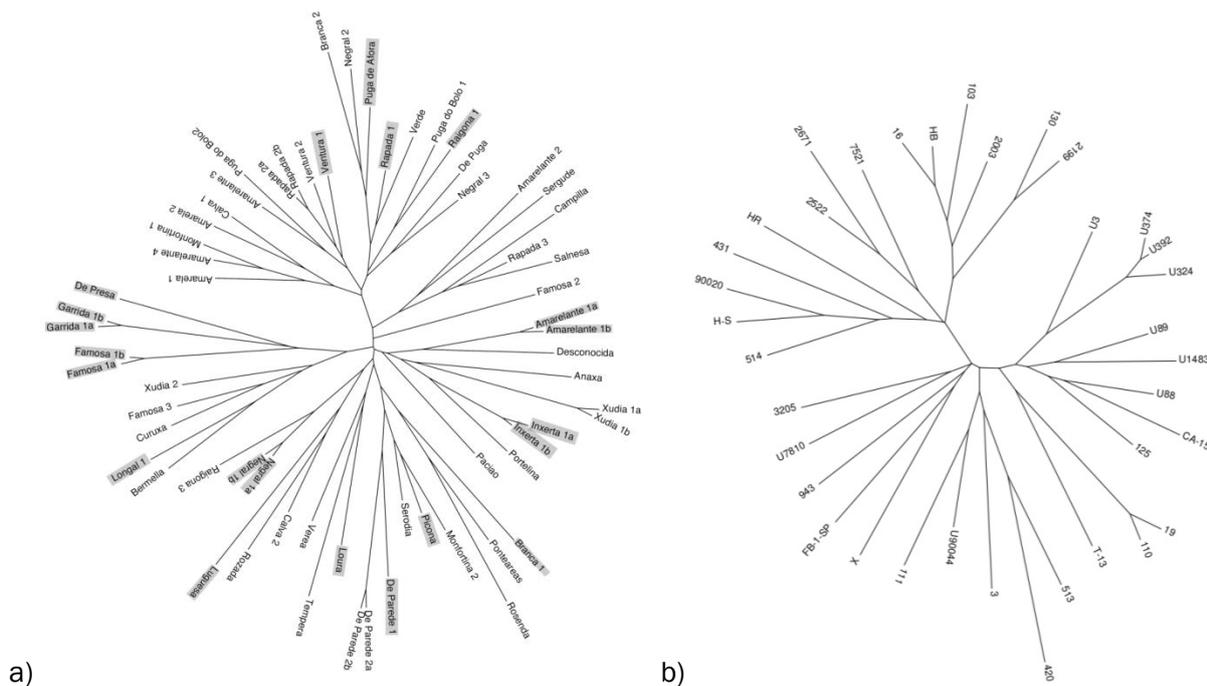


Figura 1. a) Dendrograma indicando la distancia genética en número diferente de alelos que existe entre las 64 variedades tradicionales de castaño. En gris se marcan las variedades que están registradas en el registro de variedades comerciales b) Dendrograma mostrando la distancia genética calculada como el número diferente de alelos entre los 36 híbridos interespecíficos localizados en el núcleo de propagación del Centro de Investigación Forestal de Lourizán

### 3. Identificación del origen del material vegetal: Clasificación del material vegetal en *C. sativa*, *C. crenata* y *C. mollissima* e híbridos interespecíficos e intraespecíficos

Los microsatélites no solo permiten la identificación del material sino que también son útiles para conocer cuál es el origen del mismo. El Centro de Investigación Forestal de Lourizán realizó un estudio sobre la estructura y la diversidad genética de las poblaciones de castaño para conocer el posible origen del material vegetal. Se analizaron un total de 29 poblaciones naturales o naturalizadas (Figura 1). La mayoría de las poblaciones están localizadas en Galicia, aunque también se recogieron muestras en el norte, centro y sur de España y en otros países europeos como Italia y Grecia. Para poder diferenciar a las especies asiáticas y detectar el germoplasma exógeno en las poblaciones naturales de castaño, se añadieron al estudio 41 muestras de castaño japonés (*C. crenata*) y 19 muestras de castaño chino (*C. mollissima*). Se utilizaron tanto caracteres morfológicos (Fernández-López 2011a; Fernández-Cruz y Fernández-López 2012) como microsatélites nucleares (FERNÁNDEZ-CRUZ Y FERNÁNDEZ-LÓPEZ, 2012; FERNÁNDEZ-CRUZ Y FERNÁNDEZ-LÓPEZ, 2016).

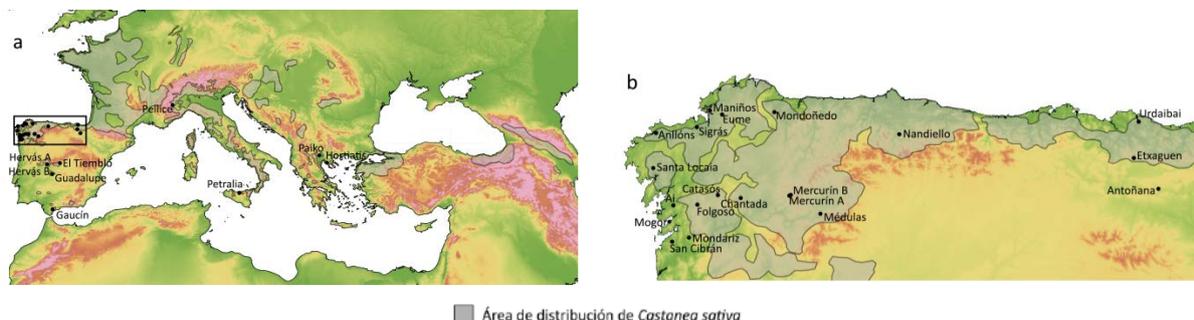


Figura 2. Localización geográfica de las poblaciones de castaño muestreadas. En gris se resalta el área de distribución de *C. sativa*

Las muestras pertenecientes a las poblaciones de Mogor, Mondaríz, Anllóns, Mondoñedo y todos los individuos asiáticos fueron clasificados como *C. sativa*, *C. crenata*, *C. mollissima* o híbrido utilizando cuatro caracteres morfológicos (Figura 3):

1. Tricomas glandulares: son específicos de *C. crenata* y se observan en el envés de la hoja con un microscopio a 200-400 aumentos. Tienen un diámetro entre 40-80  $\mu\text{m}$  (FERNÁNDEZ-LÓPEZ, 2011b).
2. Forma de las ramas: son glabras en *C. sativa* y *C. crenata* y con microvellosidades en *C. mollissima*.
3. Color de las ramas: son oscuras en *C. sativa* y *C. crenata* y claras en *C. mollissima*.
4. Forma de las hojas: las hojas mucronadas son típicas de *C. crenata* mientras que las hojas dentadas son típicas de *C. sativa* y *C. mollissima*.



Figura 3. Caracteres morfológicos para la identificación de las especies *C. sativa*, *C. crenata* y *C. mollissima*. a) Tricoma glandular de *C. crenata* observado en el envés de la hoja con un microscopio óptico a 400 aumentos. b) Rama clara de *C. mollissima* (arriba) y ramas oscuras en *C. crenata* (centro) y *C. sativa* (abajo). c) Microvellosidades típicas de *C. mollissima*. d) Hojas dentadas comunes en *C. sativa* (izquierda) y *C. mollissima* (centro) y hojas mucronadas típicas de *C. crenata* (derecha)

Para diferenciar a las tres especies de castaño e intentar detectar los diferentes grupos genéticos dentro de *C. sativa*, se emplearon los microsatélites descritos anteriormente. Una vez que se obtuvieron los genotipos de todos los individuos se analizaron con STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000) para asignar los individuos de las tres especies a diferentes grupos genéticos y determinar la presencia de híbridos interespecíficos en las poblaciones de castaño europeo y conocer la estructura genética en *C. sativa*. Este programa informático tiene en cuenta los genotipos multilocus para determinar la estructura genética de un grupo de individuos y asignarlos a diferentes poblaciones. STRUCTURE asume que existe K poblaciones desconocidas. Para conocer cuál es el número de poblaciones más probable (K) se representaron en un gráfico los valores de logaritmo de probabilidad de K  $\ln P(K)$  para cada K poblaciones. También se calcularon y se representaron los valores de delta K ( $\Delta K$ ) que es el cambio de segundo orden del valor de  $\ln P(K)$  (EVANNO et al., 2005).

Los métodos usados para calcular el número más probable de poblaciones ancestrales indican que la mayor diferencia en los valores de  $\ln P(K)$  se produce entre  $K=1$  y  $K=2$  mientras que los valores más elevados de  $\Delta K$  ocurren en  $K=2$  y  $K=3$  (Figura 4a). También se detecta un aumento de los valores de  $\Delta K$  cuando  $K=5$  y  $K=10$  (Figura 4b).

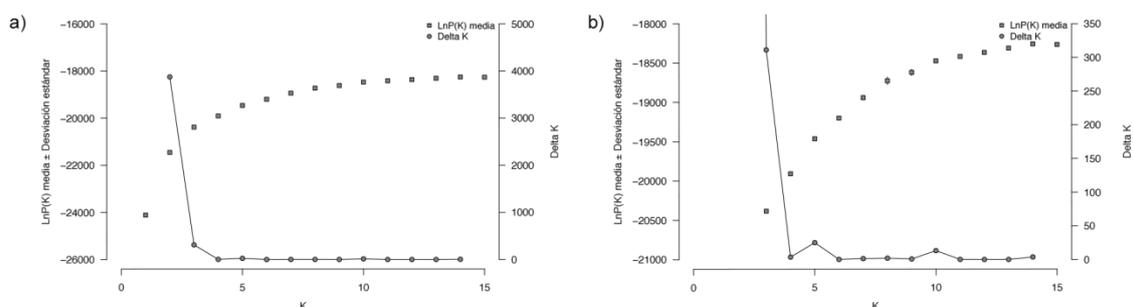


Figura 4. Cálculo del valor de K más probable en las poblaciones silvestres de castaño y en las plantaciones de especies asiáticas. a) Mostrando todos los puntos de cada valor de K. b) Reduciendo la escala de los valores de  $\ln P(K)$  y Delta K

En  $K=2$ , se separan las especies *C. sativa* de las especies asiáticas *C. crenata* y *C. mollissima* y se detectan híbridos interespecíficos en las poblaciones de castaño europeo (Figura 5). Se encontraron un total de 22 híbridos con un coeficiente de ancestría de especies asiáticas superior a 0.10. La mayoría de los híbridos se detectaron en las poblaciones del Noroeste de la Península Ibérica, en las poblaciones de Ai (9), Santa Locaia (3), Folgoso (2), Chantada (1), Mondariz (1), Mondoñedo (1) y en la población italiana de Petralia (2). La presencia de híbridos en la costa atlántica gallega se debe, como se comentó anteriormente, a la introducción de especies asiáticas a mediados del siglo XX y a la plantación de híbridos artificiales en el noroeste de España, en áreas de clima Atlántico.

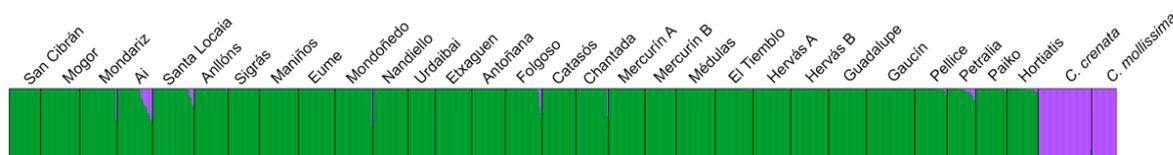


Figura 5. Introgresión de germoplasma asiático en las poblaciones naturales o naturalizadas de *C. sativa*. Cada una de las barras del gráfico indica un único individuo. El color verde representa a la especie de castaño europeo (*C. sativa*) y el color morado a las especies asiáticas, *C. crenata* y *C. mollissima*.

Cuando se asumen tres poblaciones (Figura 6), las especies asiáticas siguen formando un único grupo, mientras que las poblaciones de castaño europeas se dividen en dos. Por una parte, se diferencia el grupo genético norte de la Península Ibérica que se distribuye por toda la costa gallega y la cornisa cantábrica. Por otra parte, se distingue el grupo genético mediterráneo que incluye a las poblaciones griegas, italianas y españolas del sur y centro, llegando hasta Mercurín, situado en las montañas del interior de Galicia. También se detectan varias poblaciones híbridas entre estos grupos genéticos, como Folgoso, Catasós y Las Médulas. Es importante destacar que la población gallega de San Cibrán y la población griega de Hortiatís se encuentran en los dos extremos del área del estudio y presentan los coeficientes de ancestría más elevados para los grupos genéticos norte de la Península Ibérica y mediterráneo, respectivamente.

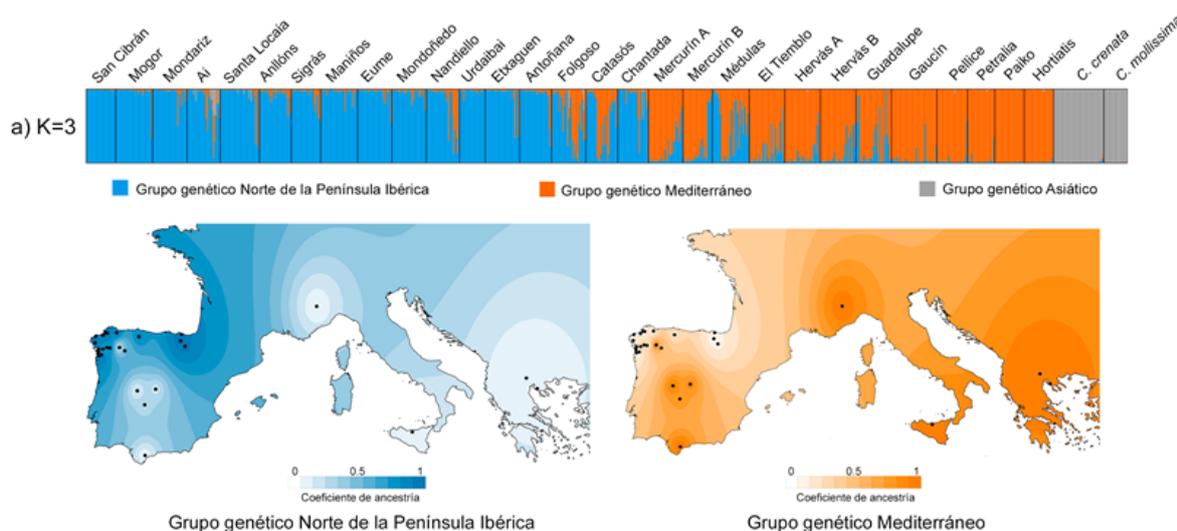


Figura 6. Gráfico de barras con los resultados de STRUCTURE y extensión de cada grupo genético detectado mediante interpolación IDW (distancia inversa ponderada) cuando  $K=3$

Cuando se asumen cinco poblaciones ancestrales (Figura 7), el grupo genético asiático sigue englobando las especies *C. crenata* y *C. mollissima*. A este respecto hay que subrayar que, aunque se aumente el valor de  $K$ , no se diferencian las dos especies de castaño asiático. Una

posible explicación de esta situación es que en este trabajo hay únicamente 19 genotipos de la especie china. Este tamaño reducido de la muestra de *C. mollissima* hace que los individuos chinos no se diferencien en STRUCTURE utilizando un modelo con mezcla y frecuencias correlacionadas.

En K=5 (Figura 7), las poblaciones de *C. sativa* clasificadas anteriormente como grupo genético norte de la Península Ibérica se subdividen en dos grupos: el grupo genético atlántico, que se extiende mayoritariamente por toda la costa atlántica gallega, desde San Cibrán hasta Santa Locaia, y el grupo genético cantábrico, distribuido por el norte de la Península Ibérica, desde la población gallega de Anllóns hasta las poblaciones vascas de Urdaibai, Etxaguen y Antoñana. Por otra parte, las poblaciones del grupo genético mediterráneo también se dividen en dos grupos: el grupo genético mediterráneo occidental, que incluye a las poblaciones españolas de Mercurín, El Tiembo, Hervás, Guadalupe, Gaucín y la italiana de Pellice y el grupo genético mediterráneo oriental, que está presente mayoritariamente en las poblaciones griegas de Paiko y Hortiatis. Es importante remarcar que este último grupo genético se extiende también por Sicilia, donde se detecta de forma muy marcada, por el norte de Italia en menor intensidad y, de forma diseminada, por las poblaciones españolas de Gaucín, Guadalupe y Las Médulas. Nuevamente, existen varias poblaciones que quedan clasificadas como híbridas si se asumen cinco poblaciones ancestrales. Las poblaciones de Folgoso, Catasós y Chantada situadas en el centro de Galicia son mezcla de los grupos genéticos atlántico, cantábrico y mediterráneo occidental. Las Médulas localizadas en El Bierzo presentan mezcla de los cuatro grupos genéticos detectados en *C. sativa*. En las poblaciones del centro de España, la población de Guadalupe es una mezcla de los grupos genéticos atlántico, mediterráneo occidental y mediterráneo oriental. Por otra parte, las poblaciones de Gaucín, Pellice y Petralia son híbridas entre los grupos mediterráneo occidental y oriental.

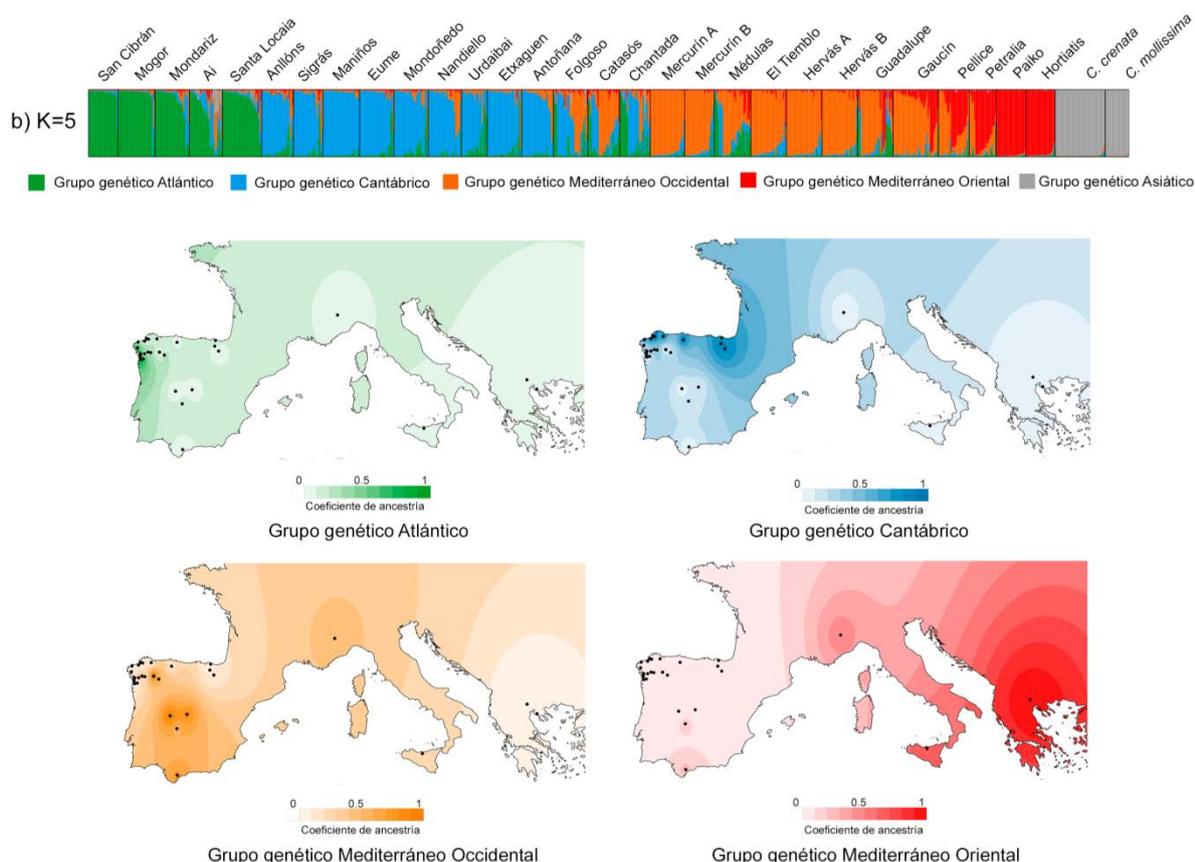


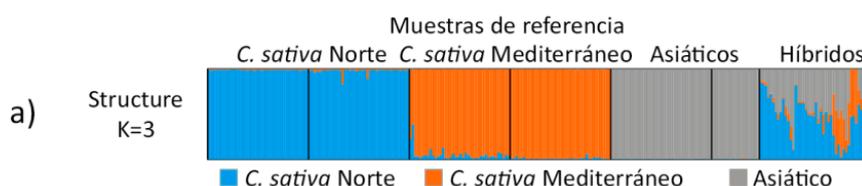
Figura 7. Gráfico de barras con los resultados de STRUCTURE y extensión de cada grupo genético detectado mediante interpolación IDW (distancia inversa ponderada) cuando K=5

En resumen, los resultados expuestos en este trabajo indican que es posible separar a la especie de castaño europeo de las especies asiáticas *C. crenata* y *C. mollissima* y que dentro de *C. sativa* existen cuatro grupos genéticos diferentes. Una aplicación práctica de esta metodología es que se pueden genotipar y clasificar individuos de origen desconocido para conocer su origen geográfico.

Al igual que se realizó con las poblaciones naturales o naturalizadas, también se puede caracterizar genéticamente el material de base del que se obtiene el material forestal de reproducción para conocer su origen, su diversidad genética y conocer si presenta material exógeno. El Centro de Investigación Forestal de Lourizán utilizó esta metodología para conocer el origen y la composición genética de los híbridos interespecíficos localizados en el núcleo de propagación del centro. Se clasificaron empleando muestras de referencia, que son un conjunto de individuos que en el análisis con STRUCTURE presentaron una proporción de ancestría superior al 0.90 en un grupo genético determinado. En un primer análisis, se estudió el porcentaje de *C. sativa* norte, *C. sativa* mediterráneo y asiático que presenta cada híbrido. Para ello se realizó un análisis en STRUCTURE asumiendo que existen tres poblaciones ancestrales. Las muestras de referencia de los grupos genéticos *C. sativa* norte, *C. sativa* mediterráneo y asiático presentan una proporción de ancestría elevada que permite la clasificación de los híbridos en seis grupos: tres puros (*C. sativa* norte, *C. sativa* mediterráneo y asiático) y tres híbridos (CsNxCsM, CsNxA, CsMxA) (Figura 8a). Esta primera clasificación permite definir cuál es el componente mayoritario de *C. sativa* dentro de cada híbrido. Posteriormente, se realizó el mismo análisis pero, en este caso, se asumieron seis poblaciones ancestrales (Figura 8b). Las muestras de referencia de *C. sativa* norte se subdividen en *C. sativa* atlántico y *C. sativa* cantábrico. Por otra parte, las muestras de referencia mediterráneas se diferencian en mediterráneas occidentales y orientales. Por último, dentro del grupo asiático se diferencian las especies *C. crenata* y *C. mollissima*. En este caso los híbridos del núcleo de propagación quedan clasificados en ocho grupos:

1. Híbridos entre *C. sativa* atlántico y *C. crenata*
2. Híbridos entre *C. sativa* cantábrico y *C. crenata*
3. Híbridos entre *C. sativa* mediterráneo occidental y *C. crenata*
4. Híbridos entre *C. sativa* cantábrico y *C. sativa* mediterráneo occidental
5. Híbridos entre *C. sativa* atlántico y *C. mollissima*
6. Híbridos entre *C. sativa* atlántico y *C. sativa* cantábrico
7. Híbridos entre *C. sativa* mediterráneo oriental y *C. crenata*
8. Híbridos entre *C. sativa* mediterráneo occidental y *C. sativa* mediterráneo oriental

Una vez conocidos los parentales de cada uno de los híbridos, se analizaron con NEWHYBRIDS (ANDERSON, 2008) para conocer cuál es su clase genealógica: parental, híbrido F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, o retrocruzamiento. Los híbridos del núcleo de propagación son, mayoritariamente, híbridos F<sub>1</sub> entre las dos especies parentales, aunque también se encuentran individuos F<sub>2</sub> y retrocruzamientos. Es importante destacar que no todas las plantas instaladas en el núcleo de propagación son híbridos, ya que también se han detectado individuos del grupo genético mediterráneo occidental y atlántico.



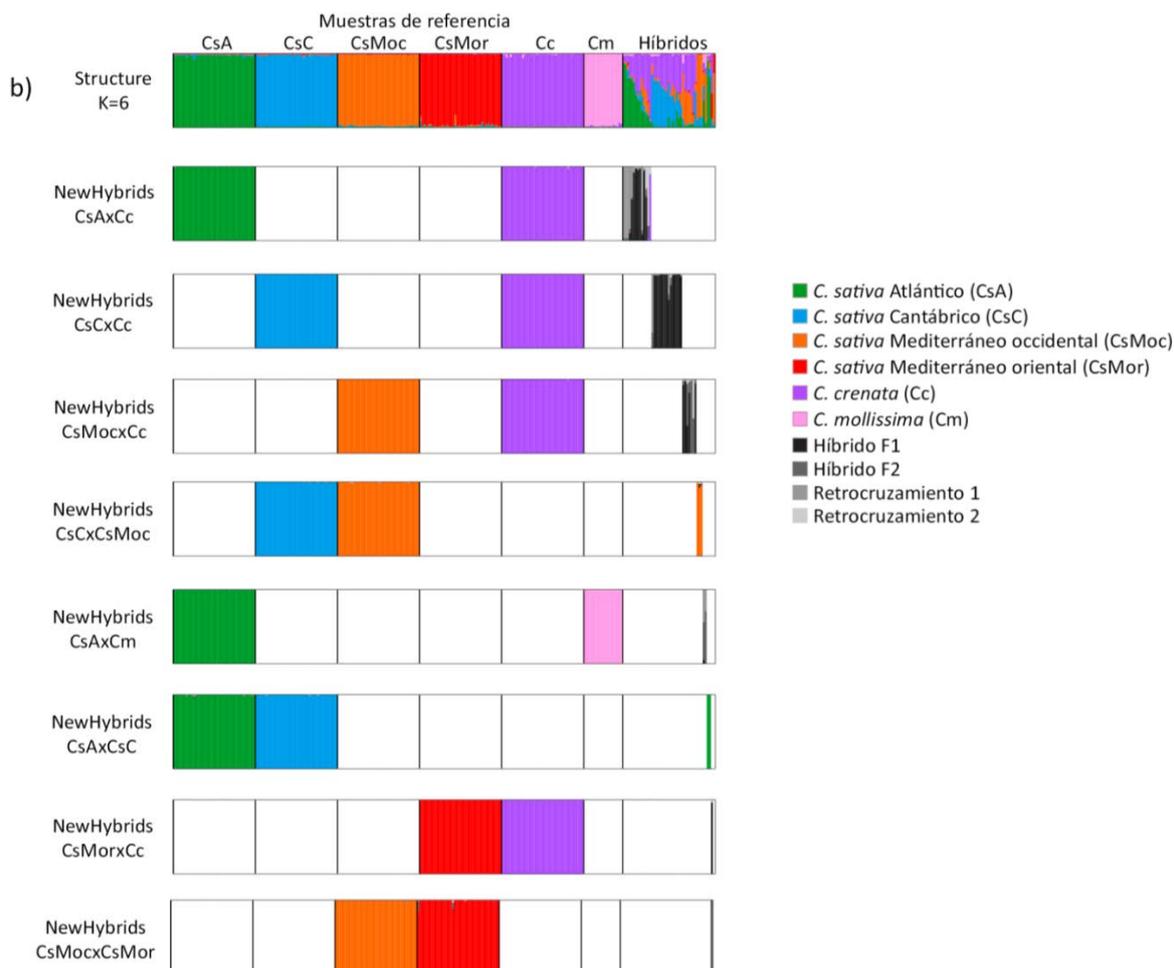


Figura 8. Determinación de las especies parentales de los híbridos de Veiga do Cocho y su asignación a diferentes clases genealógicas ( $F_1$ ,  $F_2$  y retrocruzamientos). a) Clasificación de los híbridos en los grupos genéticos norte, mediterráneo y asiático. b) Clasificación de los híbridos en los cuatro grupos genéticos detectados en *C. sativa* y en las especies asiáticas *C. crenata* y *C. mollissima*. Tras conocer que dos grupos genéticos o especies parentales participan en cada híbrido, se asignan a una clase genealógica determinada.

#### 4. BIBLIOGRAFÍA

- ALÍA R, ALBA N, AGÚNDEZ D, IGLESIAS S (coord. . (2005) Manual para la comercialización y producción de semillas y plantas forestales. Materiales de base y de reproducción. Madrid
- ANDERSON EC (2008) Bayesian inference of species hybrids using multilocus dominant genetic markers. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 363:2841–2850.
- BOE nº272, de 13 de noviembre de 2007. Resolución de 25 de octubre de 2007, de la Dirección General de Agricultura, por la que se publica la ampliación del Catálogo Nacional de materiales de base de diversas especies forestales para la producción de los materiales forestales de reproducción de las categorías identificada, cualificada y controlada.
- BUCK EJ, HADONOU M, JAMES CJ, et al (2003) Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in European chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Mol Ecol Notes* 3:239–241.
- EVANNO G, REGNAUT S, GOUDET J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Mol Ecol* 14:2611–2620.
- FAO (2010) The state of the world´s animal genetic resources for food and agriculture. Rome

- FERNÁNDEZ-CRUZ J, FERNÁNDEZ-LÓPEZ J (2012) Morphological, molecular and statistical tools to identify *Castanea* species and their hybrids. *Conserv Genet* 13:1589–1600.
- FERNÁNDEZ-CRUZ J, FERNÁNDEZ-LÓPEZ 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* 1–19. doi: 10.1007/s10592-016-0835-4
- FERNÁNDEZ-LÓPEZ J (2011a) Identification of the genealogy of interspecific hybrids between *Castanea sativa*, *Castanea crenata* and *Castanea mollissima*. *For Syst* 20:65–80.
- FERNÁNDEZ-LÓPEZ J (2011b) Identification of the genealogy of interspecific hybrids between *Castanea sativa*, *Castanea crenata* and *Castanea mollissima*. *For Syst* 20:65–80.
- FERNÁNDEZ-LÓPEZ J, FERNÁNDEZ-CRUZ J (2015) Identification of traditional Galician sweet chestnut varieties using ethnographic and nuclear microsatellite data. *Tree Genet Genomes* 11:111. doi: 10.1007/s11295-015-0934-2
- FERNÁNDEZ-LÓPEZ J, MIRANDA-FONTAÍÑA ME, FURONES-PÉREZ P (2008) Caracteres de selección en campo de clones de castaño híbrido (*Castanea crenata* x *Castanea sativa*) para la producción de madera. *Cuad la Soc Española Ciencias For* 24:39–43.
- FERNÁNDEZ-LÓPEZ J, MIRANDA-FONTAÍÑA ME, PEREIRA-LORENZO S (1995) Esquema de producción de materiales clonales forestales y frutales de castaño híbrido (*Castanea crenata* X *Castanea sativa*). *ITEA* 91:149–156.
- FERNÁNDEZ-LÓPEZ J, PEREIRA-LORENZO S, MIRANDA-FONTAÍÑA ME (1992) Fog and substrate conditions for chestnut propagation by leafy cuttings. In: *Mass Production Technology for Genetically improved fast growing forest tree species*. AFOCEL/IUFRO I. pp 379–383
- GALLASTEGUI C (1926) Técnica de la hibridación artificial del castaño. *Boletín la Real Soc Española Hist Nat Tomo XXVI*:88–94.
- GUICHOUX E, LAGACHE L, WAGNER S, et al (2011) Current trends in microsatellite genotyping. *Mol Ecol Resour* 11:591–611.
- KAMPFER S, LEXER C, GLÖSSL J, STEINKELLNER H (1998) Characterization of (GA)(n) microsatellite loci from *Quercus robur*. *Hereditas* 129:183–186.
- LITT M, LUTY JA (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 44:397–401.
- MARINONI D, AKKAK A, BOUNOUS G, EDWARDS KJ (2003) Development and characterization of microsatellite markers in *Castanea sativa* ( Mill .). 127–136.
- MIRANDA-FONTAÍÑA ME, FERNÁNDEZ-LÓPEZ J (2001) Genotypic and Environmental Variation of *Castanea crenata* x *C. sativa* and *Castanea sativa* Clones in Aptitude to Micropropagation. *Silvae Genet* 50:153–162.
- MIRANDA-FONTAÍÑA ME, FERNÁNDEZ-LÓPEZ J, VETTRAINO AM, VANNINI A (2007) Resistance of *Castanea* clones to *Phytophthora Cinnamomi*: Testing and genetic control. *Silvae Genet* 56:11–21.
- PRITCHARD JK, STEPHENS M, DONNELLY P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959.
- SELKOE KA, TOONEN RJ (2006) Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol Lett* 9:615–629.
- STEINKELLNER H, FLUCH S, TURETSCHKE E, et al (1997) Identification and characterization of (GA/CT)(n)-microsatellite loci from *Quercus petraea*. *Plant Mol Biol* 33:1093–1096.
- URQUIJO P (1956) La regeneración del castaño. *Bol Pat Veg y Entomol Agrícola XXII*:217–232.
- WEBER JL (1990) Informativeness of human (dC-dA)n. (dG-dT)n polymorphisms. *Genomics* 7:524–530.

