



9CFE-1704

Actas del Noveno Congreso Forestal Español
Edita: **Sociedad Española de Ciencias Forestales. 2025.**
ISBN: 978-84-941695-7-1

Organiza





Material ancestral de reproducción de castaño como fuente del material genético del futuro

SOLA-LANDA, A. (1), CASADOMET, C. (2), SÁNCHEZ-OREJAS, C. (1), KOSALKOVA, K. (1), PÉREZ-REDONDO, R. (1), ARIAS, D. (2), ORTIZ, L. (2), QUIROGA, R. (2), MARTÍN MARTÍN, E. (3), CIORDIA, M. (4), LÓPEZ, A. (5), ABEL, J. (6), LINARES, P. (7), CUENCA, B. (8), BURGOS, L. (9), CAÑIBANO, C. (1), RUBIO-GUTIÉRREZ, R. (1)

(1) Área de Biotecnología. Fundación Cesefor (Centro de Servicios y Promoción Forestal y de su Industria de Castilla y León), Parque Científico de León. Avda. Real 1, 24006 León, España.

(2) Área de Recursos naturales y biodiversidad. Fundación Cesefor (Centro de Servicios y Promoción Forestal y de su Industria de Castilla y León), Parque Científico de León. Avda. Real 1, 24006 León, España.

(3) Asociación de productores de castaña de Villuercas. Avda. Virgen de Guadalupe 63, 10374 Navezuelas (Cáceres), España.

(4) Área de Cultivos Hortofrutícolas y Forestales. SERIDA (Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario). Ctra. AS-267, PK 19. 33300 Villaviciosa (Asturias), España

(5) Alibós Galicia S.L. Calle de Salvador Arotzarena 46, 27560, Monterroso (Lugo), España

(6) CTFC (Centre de Ciència i Tecnologia Forestal de Catalunya). Crta. de St. Llorenç de Morunys, km 2 (direc. Port del Comte) 25280 Solsona (Lleida). España

(7) Asociación Berciana de Agricultores. Calle la Iglesia 2, 24549 Carracedelo (León), España.

(8) Vivero de Maceda. Grupo Tragsa. Ctra. de Maceda a Baldrei, km 2, 32700 Maceda (Ourense), España.

(9) Castañas Valle del Genal S.C.A. Calle Loma de la Hiedra, 29450 Pujerra (Málaga), España.

Resumen

La actividad en torno al castaño (*Castanea sativa*) es de vital importancia como fuente de recursos económicos. Actualmente, existe una carencia significativa de patrones de castaño europeo, sustituidos en gran medida por clones híbridos, con el riesgo de introgresión genética en las poblaciones autóctonas. Dentro del Grupo Operativo YesWeCast (REGAGE23e00065232377) se pretende crear un catálogo minucioso de material vegetal procedente de castaños centenarios ubicados en las principales regiones productoras de España. Clonar estos árboles es importante para hacerse con el acervo genético de individuos que han sobrevivido a estreses bióticos y abióticos. Con el proyecto se pretende contribuir a conservar los recursos genéticos del material autóctono como patrón o variedad tradicional local de castaña europea, y suministrar materiales de calidad a los castañicultores, manteniendo la competitividad del sector en la producción y calidad de las castañas. Inicialmente, se ha realizado un inventario nacional de árboles singulares que se han caracterizado genotípicamente, analizando tanto la parte basal como la aérea para determinar la existencia de injerto. El análisis incluye



marcadores de resistencia a distintos tipos de estrés, lo que permite disponer de genotipos con distinto grado de resiliencia en el actual escenario de cambio climático.

Palabras clave

Castanea sativa, genotipos, árboles singulares, marcadores moleculares, resistencia.

1. Introducción

El castaño europeo (*Castanea sativa* Mill.) es un árbol caducifolio que ha supuesto a lo largo de los siglos un importante activo económico en las rentas del medio rural, debido a su uso tanto para la producción de fruto como de madera, sin olvidar la provisión de servicios ecosistémicos. Durante siglos, la castaña ha sido un sustento nutricional básico y la madera ha formado parte de la vida cotidiana de la población, vivienda, enseres y muebles. Hoy en día, la castaña se presenta como un producto cuyo aprovechamiento y comercialización en diferentes modalidades, tanto fresco como transformado, genera importantes rentas a las familias del medio rural. Además, la castaña es un producto altamente nutritivo, carente de gluten, y cuyos valores nutricionales hacen que cada vez esté siendo más reconocida por los mercados, la restauración y los consumidores.

La conservación del castaño no sólo proporciona recursos económicos, sino que también contribuye al mantenimiento del paisaje y su biodiversidad asociada, haciendo del castaño una especie característica y singular. Hay que tener en cuenta que el castaño está presente en gran parte de las regiones de España, con una superficie aproximada de 276.358 ha, localizándose las mayores extensiones en Asturias (con más de 120.000 ha), enfocada principalmente a la producción de madera, y Galicia (con 70.000 ha), donde se produce más del 50 % de la castaña nacional.

Uno de los principales problemas actuales es la pérdida de los recursos genéticos autóctonos del castaño, ya que han sido sustituidos por otros de origen híbrido, que proporcionan ciertas ventajas respecto a algunas enfermedades (como la tinta, causada por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi*), y disponen de un vigor portainjerto conocido, al contrario que los materiales autóctonos actuales, muy desiguales, sin ningún tipo de selección, con problemas de adaptación y/o resistencias y escaso vigor como portainjerto de los cultivares tradicionales. Con el tiempo, esto puede suponer la pérdida de materiales genéticos ancestrales, adaptados durante siglos a diversas condiciones y afecciones.

Para conocer en profundidad este material genético ancestral, se caracterizaron 60 árboles centenarios distribuidos por las distintas regiones de España mediante el análisis de microsatélites, los mismos que ya han sido utilizados previamente para la caracterización de las distintas variedades presentes en la península ibérica (FERNÁNDEZ-LÓPEZ & FERNÁNDEZ-CRUZ, 2015; PEREIRA-LORENZO et al., 2017; FERNÁNDEZ-CRUZ et al., 2022). Además, el estudio se complementó con otros marcadores descritos más recientemente, asociados con la resistencia a sequía

(ALCAIDE et al., 2019, CASTELLANA et al., 2021), al calor (DORADO et al., 2022) y a *Phytophthora cinnamomi* (ALCAIDE et al., 2020), el agente causal de la tinta del castaño.

2. Objetivo

Identificar los recursos genéticos de árboles centenarios de *Castanea sativa*, cuya implantación es anterior a la de los híbridos logrados con las especies asiáticas. Estos castaños centenarios, por su longevidad, deben presentar caracteres de vigor y tolerancia a enfermedades que los hacen interesantes por ser un reservorio de variabilidad biológica y como portainjertos de interés.

3. Metodología

Material vegetal

Se recogieron muestras de 60 castaños singulares distribuidos por las principales regiones productoras de castaña (Figura 1). Con el fin de determinar si los árboles singulares estaban injertados, se recogieron muestras tanto de la parte basal como de la parte aérea, salvo en dos casos (uno en León y otro en Cáceres) en los que no se pudo recoger parte basal por falta de brotes. Las muestras se conservaron a -20 °C hasta el momento de su análisis.

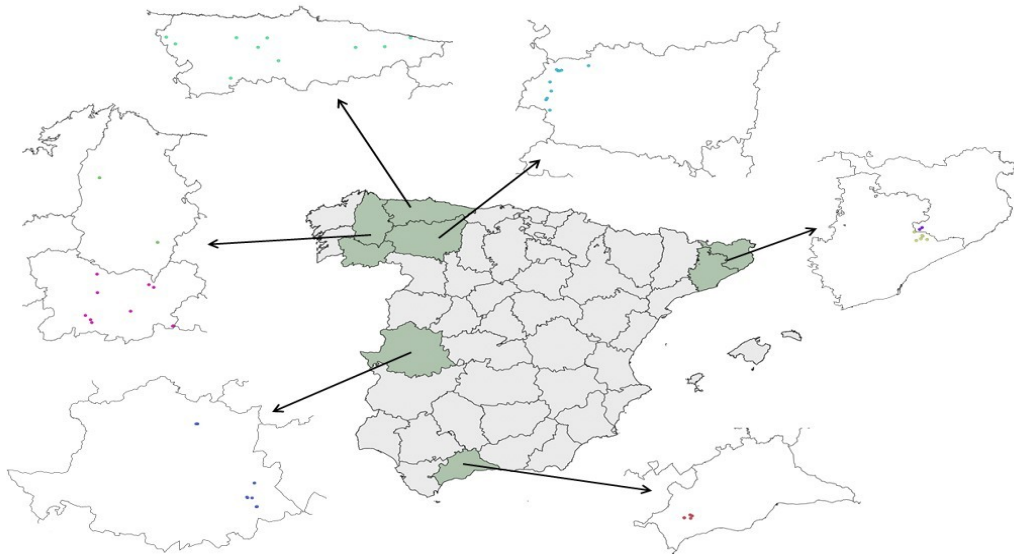


Figura 1. Mapa mostrando la localización de los 60 árboles singulares analizados en este estudio, según las Comunidades Autónomas donde se recogieron.

Análisis genético

El genotipado de las muestras se realizó mediante el análisis de repeticiones de secuencias simples (SSR, del inglés *simple sequence repeats*). Para la determinación de las variedades se seleccionaron 9 marcadores genómicos neutrales (gSSR, que no afectan a zonas codificantes): CsCAT3, CsCAT14, CsCAT16, CsCAT41b, (MARINONI et al., 2003), QpZAG36, QpZAG110 (STEINKELLNER et al., 1998), EMCs2,

EMCs14 y EMCs15 (BUCK et al., 2003). Además, se analizaron otros 3 marcadores de regiones codificantes (EST-SSR) relacionados con distintos tipos de estrés: VIT099, relacionado con el estrés por calor (DORADO et al., 2022), FIR059, relacionado con la resistencia a sequía (ALCAIDE et al., 2019) y CsPT_0005, relacionado con la tolerancia a la tinta del castaño (ALCAIDE et al., 2020).

El ADN de las hojas se extrajo con el kit comercial *DNeasy Plant Pro Kit* (QIAGEN) según las recomendaciones del fabricante, partiendo de 100 mg de hoja. Los cebadores *Forward* de cada locus se marcaron con distintos fluoróforos y las 12 parejas de cebadores se agruparon en 3 reacciones de multiplexación en función de los tamaños y la temperatura de anillamiento descrita para cada una de ellas (Tabla 1). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 12,5 µl conteniendo 5 ng de ADN y empleando el reactivo *Type-it Microsatellite PCR Kit* (QIAGEN), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Únicamente se modificó la temperatura de anillamiento en la reacción de multiplexación 1, que se realizó a 50 °C en vez de a los 57 °C recomendados. Los fragmentos de cada reacción múltiple se separaron empleando un equipo *3730xLR DNA Analyzer* (ThermoFisher Scientific) y el tamaño de los mismos se determinó a través de la aplicación *Microsatellite Analysis Software* (MSA), disponible en la nube (<https://apps.thermofisher.com/apps/spa/#/dashboard>).

Tabla 1. Información sobre los 12 loci genéticos analizados

Locus	Marcaje	Reacción	Temp.	Nº Alelos	Tamaño (pb)
CsCAT16	FAM	1	50 °C	6	126-148
QpZAG110	FAM	1	50 °C	8	208-223
CsCAT3	NED	1	50 °C	14	197-271
CsCAT41b	PET	1	50 °C	10	203-235
QpZAG36	VIC	1	50 °C	5	209-221
EMCs15	FAM	2	57 °C	4	82-91
EMCs14	FAM	2	57 °C	2	130-139
CsCAT14	PET	2	57 °C	5	136-164
EMCs2	VIC	2	57 °C	3	161-166
VIT099	FAM	3	57 °C	2	125-130
FIR059	FAM	3	57 °C	7	154-185
CsPT_0005	FAM	3	57 °C	1	265

4. **Resultados** Para el presente estudio se recogieron muestras en las principales regiones productoras de castañas, concretamente en Cataluña (6 árboles en la provincia de Barcelona y 2 en la de Girona), Galicia (10 en Ourense y 2 en Lugo), Castilla y León (10 en León), Asturias (10 árboles), Extremadura (10 en la provincia de Cáceres) y Andalucía (10 en Málaga). La relación de castaños y su ubicación se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Información relativa a los 60 castaños singulares analizados.

Castaño singular	Provincia	Localidad	Injertado	Variedad identificada
B-001	Barcelona	Cànoves i Samalús	No	
B-002	Barcelona	Sant Pere de Vilamajor	Sí	Martinenca
B-003	Barcelona	Fogars de Montclús	No	Martinenca
B-004	Barcelona	Fogars de Montclús	No	
B-005	Barcelona	El Brull	Sí	
B-006	Barcelona	Fogars de Montclús	No	
Gi-001	Girona	Viladrau	No	Martinenca
Gi-002	Girona	Viladrau	No	Martinenca
OU-020	Ourense	Manzaneda	No	Amarelante
OU-023	Ourense	Armariz	No	
OU-025	Ourense	A Lagoa (Porqueira)	Sí	Verea
OU-026	Ourense	Os Blancos	No	Verea
OU-110	Ourense	Pexeiros (Os Blancos)	Sí	Verea
OU-111	Ourense	Cerdedelo	No	
OU-113	Ourense	Santa Eufemia	No	
OU-114	Ourense	Cadavos	No	
OU-115	Ourense	Cadavos	No	
OU-116	Ourense	A Touza (Manzaneda)	Sí	
LU-018	Lugo	Baamonde	Sí	
LU-019	Lugo	Paderne (lugo)	No	
LE-001	León	Corullón	No	
LE-002	León	Corullón	No	
LE-003	León	Pobladura de Somoza	No	Parede
LE-004	León	Villar de Acero	No	
LE-005	León	Carucedo	No	
LE-006	León	Villasumil	No	
LE-007	León	Sorbeira	No	
LE-008	León	Pereda de Ancares	Sí	Parede
LE-009	León	Candín	No	
LE-010	León	Palacios del Sil	N.d.	
CC-001	Cáceres	Guadalupe	No	
CC-002	Cáceres	Guadalupe	No	
CC-003	Cáceres	Navezuelas	No	
CC-004	Cáceres	Navezuelas	Sí	Verata
CC-005	Cáceres	Navezuelas	Sí	Verata
CC-006	Cáceres	Castañar de Ibor	No	
CC-007	Cáceres	Castañar de Ibor	No	
CC-008	Cáceres	Casas del Castañar	No	
CC-009	Cáceres	Casas del Castañar	No	
CC-010	Cáceres	Casas del Castañar	N.d.	
AS-001	Asturias	Piloña	No	
AS-002	Asturias	Llanes	No	
AS-003	Asturias	Villatresmil (Tineo)	Sí	
AS-004	Asturias	Caranga de Arriba (Proaza)	No	
AS-005	Asturias	Picarín (Las Regueras)	Sí	Chamberga

AS-006	Asturias	Belmonte de Miranda	No	
AS-007	Asturias	Doriga (Salas)	No	
AS-008	Asturias	Corao (Cangas de Onís)	Sí	
AS-009	Asturias	Bres (Taramundi)	No	
AS-010	Asturias	Villanueva de Oscos	Sí	Parede
MA-001	Málaga	Pujerra	No	Pilonga
MA-002	Málaga	Pujerra	Sí	Pilonga
MA-003	Málaga	Pujerra	Sí	Pilonga
MA-004	Málaga	Faraján	No	Pilonga
MA-005	Málaga	Faraján	Sí	Pilonga
MA-006	Málaga	Faraján	Sí	Pilonga
MA-007	Málaga	Faraján	Sí	Pilonga
MA-008	Málaga	Faraján	Sí	Pilonga
MA-009	Málaga	Faraján	No	
MA-010	Málaga	Faraján	Sí	Pilonga

Análisis de marcadores gSSR

El análisis de los marcadores genómicos permitió detectar un total de 57 alelos distintos dentro de los 9 marcadores analizados, con una gran variabilidad entre muestras (Figura 2). El marcador más variable fue CsCAT3, con un total de 14 alelos distintos, seguido por CsCAT41b, con 10, mientras que los marcadores más conservados fueron EMCs14 y EMCs2, con únicamente 2 y 3 alelos, respectivamente (Tabla 1). Por regiones, la mayor variabilidad se detectó en Castilla y León, con 42 alelos, seguida por Galicia y Extremadura, con 40 cada una, Asturias y Andalucía, con 37, y finalmente Cataluña, con tan solo 25 alelos distintos. Hay que tener en cuenta que en este último caso el número de árboles analizados fue de 8, frente a los 12 de Galicia o los 10 de las otras 4 comunidades autónomas objeto de estudio.

Al comparar el genotipo de la parte basal con el de la copa, se observó que la mayoría de los árboles seleccionados, 40, eran bravos, mientras que tan solo 20 de los castaños centenarios estaban injertados (Tabla 2). El porcentaje de estos varió considerablemente entre regiones, desde el 10 % en León (un único árbol injertado de 10 analizados, aunque en uno de ellos no se pudo tomar muestra de la parte basal) hasta el 70 % en Málaga. Por otro lado, la mayoría de los árboles fueron de variedad desconocida, ya que tan solo se pudo correlacionar el genotipo de 23 de los árboles singulares con alguna de las variedades tradicionales.

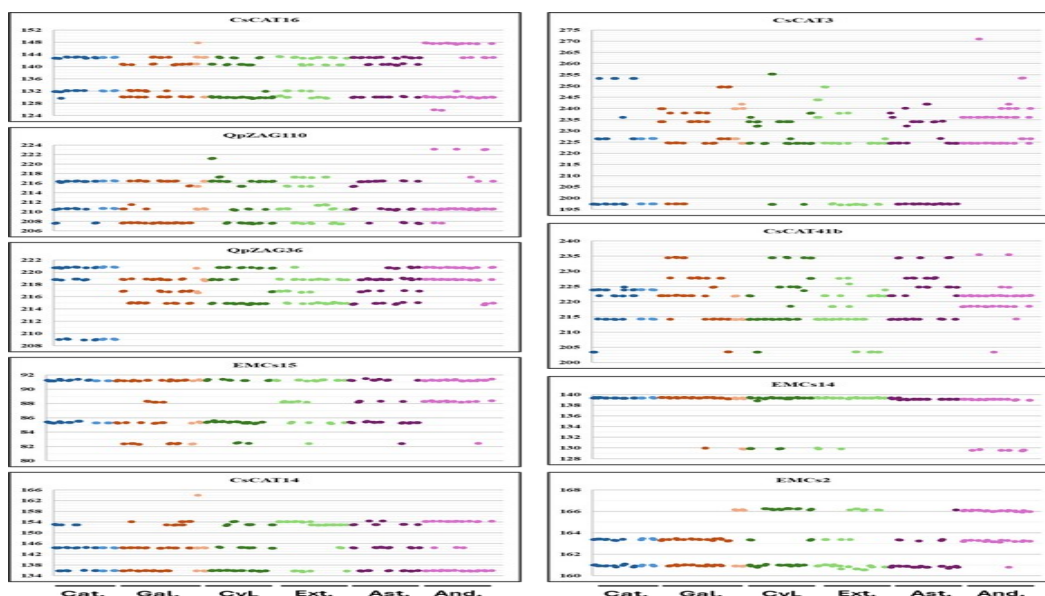


Figura 2. Alelos detectados para cada uno de los 9 marcadores gSSR analizados en las diferentes regiones de estudio. Cat., Cataluña (Barcelona en azul oscuro y Girona en azul claro); Gal., Galicia (Ourense en marrón oscuro y Lugo en marrón claro); CyL, Castilla y León (verde oscuro); Ext., Extremadura (verde claro); Ast., Asturias (morado oscuro); And., Andalucía (morado claro).

En el caso de los árboles seleccionados en Cataluña, dos estaban injertados (ambos en Barcelona) y 6 fueron bravos. En cuanto a las variedades, 3 de los castaños resultaron ser bravos de la variedad Martinenca (Tabla 2) propagados vegetativamente (uno en Barcelona y los dos de Girona), además de que uno de los dos árboles injertados lo estaba con esta misma variedad. En cuanto a los marcadores propiamente dichos, destaca la presencia del alelo 209 en el marcador QpZAG36 (Figura 2), presente en 6 de los árboles (incluyendo los de la variedad Martinenca) y ausente en los del resto de las regiones.

De los 12 árboles muestreados en Galicia, se pudo comprobar que 4 estaban injertados (3 en Ourense y 1 en Lugo) y 8 eran bravos. De estos, uno se identificó como perteneciente a la variedad de Amarelante y otro a la variedad de Vereá (Tabla 2), ambos en la provincia de Ourense. Además, dos de los injertados de esta provincia lo estaban con esta misma variedad de Vereá. El alelo 164 del marcador CsCAT14 resultó ser único entre todos los árboles analizados, y estaba presente en el parte basal de uno de los árboles injertados de Lugo (Figura 2).

Como ya se ha comentado anteriormente, León fue la región con menos árboles injertados, con tan solo uno. Este, además, lo estaba con la variedad Parede, variedad a la que también pertenecía uno de los castaños bravos analizados (Tabla 2). Entre los alelos únicos detectados, se encuentran los alelos 255 del marcador CsCAT3 y el alelo 221 del marcador QpZAG110 (Figura 2), presentes en castaños bravos de variedad no asignada. Además, se encontró otro alelo raro, concretamente el 232 del marcador CsCAT3, presente únicamente en un árbol



singular de León y en el pie injertado de otro árbol singular de Asturias.

Al igual que ocurría con las muestras de León, en el caso de Cáceres tampoco se pudo encontrar muestras de la parte basal de uno de los árboles singulares. De los 9 castaños restantes, 2 de ellos estaban injertados, y en ambos casos se comprobó que la variedad seleccionada para ello fue Verata (Tabla 2). El resto de las variedades no se correspondía a ninguna de las descritas anteriormente. Entre los árboles analizados también se encontraron alelos únicos, como el alelo 226 del marcador CsCAT41b (Figura 2), encontrado precisamente en la parte basal de uno de los árboles injertados, así como el alelo 244 del marcador CsCAT3, encontrado en uno de los castaños bravos.

En el caso de Asturias, 4 de los árboles analizados estaban injertados con distintas variedades. Uno de ellos se identificó con la variedad Parede y otro con la variedad Chamberga (Tabla 2), mientras que el resto de los árboles no se correspondía con ninguna de las variedades conocidas, ni los otros dos injertados ni los 6 castaños bravos. El único alelo raro encontrado fue el ya comentado 232 del marcador CsCAT3, no detectándose ningún alelo único en esta región.

Finalmente, el caso de Andalucía fue el más llamativo de todos. De los 10 árboles analizados, 7 estaban injertados, y todos ellos con la misma variedad, denominada Pilonga2 en el estudio realizado por PEREIRA-LORENZO et al. (2017). Además, otros dos de los árboles bravos pertenecían a esta misma variedad (Tabla 2). A pesar de la uniformidad en las copas, los pies de los árboles mostraron una gran variabilidad, encontrando varios alelos únicos de esta región (Figura 2). Así, se encontró el alelo 126 del marcador CsCAT16, presente en dos árboles, el alelo 271 de CsCAT3, en un único árbol, y el alelo 235 en el marcador CsCAT41b, encontrado en dos de los castaños. Se da la circunstancia de que los tres alelos raros estaban presentes en uno de los árboles injertados. Finalmente, otro alelo único de los castaños de Málaga fue el alelo 223 del marcador QpZAG110, presente en dos de los árboles injertados y en el único castaño bravo que no era de la variedad Pilonga.

Análisis de marcadores EST-SSR

El marcador FIR059 fue el más variable de los 3 EST-SSR analizados, ya que se detectaron 7 alelos diferentes (Figura 3). La mayor variabilidad se observó en Galicia y Asturias, con 6 alelos distintos en cada Comunidad Autónoma, seguidos de Castilla y León y Extremadura, con 5 alelos. La menor variabilidad se corresponde con Andalucía y Cataluña, donde se detectaron 3 alelos en cada región.

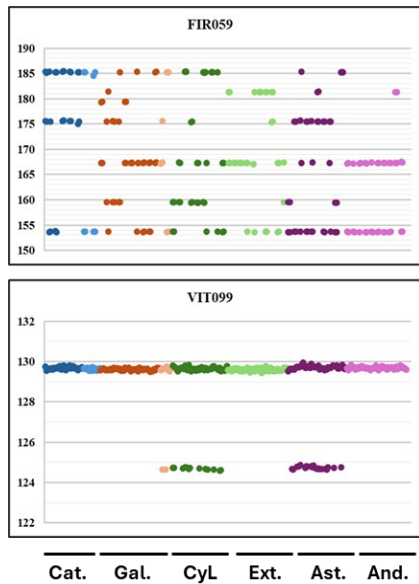


Figura 3. Alelos detectados en marcadores EST-SSR FIR059 y VIT099 analizados en las diferentes regiones de estudio. Cat., Cataluña (Barcelona en azul oscuro y Girona en azul claro); Gal., Galicia (Ourense en marrón oscuro y Lugo en marrón claro); CyL, Castilla y León (verde oscuro); Ext., Extremadura (verde claro); Ast., Asturias (morado oscuro); And., Andalucía (morado claro).

En el análisis realizado en este estudio se detectaron dos alelos del marcador VIT099, siendo el más abundante el 130 (Figura 3), mientras que el alelo 125 fue detectado únicamente en individuos de Lugo, León y Asturias, todos próximos geográficamente, y en todos los casos se detectaron en heterocigosis junto al alelo 130. Finalmente, el marcador CsPT_0005 no aportó información, al encontrarse un único alelo entre todos los árboles analizados.

5. Discusión

El castaño ha sido un importante sustento económico en muchas regiones rurales de España, por lo que siempre se han buscado soluciones para paliar los problemas generados por las plagas y enfermedades que le afectan. La especie europea, *C. sativa*, es sensible a numerosas especies patógenas, principalmente al oomiceto *P. cinnamomi*, el agente causal de la tinta del castaño, que causa la podredumbre de las raíces y que puede provocar la muerte del árbol en poco tiempo. Por tal motivo, durante la primera mitad del siglo XX se llevaron a cabo en España extensos planes de reforestación con plantas de las especies asiáticas *Castanea crenata* y *Castanea mollissima*, especies naturalmente más resistentes a la tinta. Sin embargo, estas especies no se adaptaron bien a las condiciones climáticas del país y presentaban peores características en desarrollo y calidad de la castaña, por lo que se iniciaron programas de hibridación para combinar las propiedades forestales y las agronómicas del castaño europeo, junto con la resistencia a la enfermedad de la tinta presente en los castaños asiáticos. Al tener una polinización



mediada por el viento, la convivencia de las 3 especies en un mismo entorno ha favorecido la hibridación de las mismas y la introgresión de material genético de las especies asiáticas en el castaño europeo. Recientemente, se han publicado los resultados de un estudio realizado en la localidad gallega de Bergondo, en la que se ha determinado que tan solo el 28,6 % de los árboles juveniles podían clasificarse como *C. sativa* puros, frente al 70,6 % de los ejemplares adultos (ALCAIDE et al., 2022), lo que puede ser indicativo de la situación en otras regiones donde se han plantado especies alóctonas.

Con el fin de caracterizar árboles libres de introgresión génica, se procedió al genotipado de árboles centenarios, nacidos con anterioridad a la introducción de las especies asiáticas. El análisis genético de distintos marcadores neutrales mostró una gran variabilidad entre individuos, detectándose algunos alelos que fueron únicos en castaños específicos y otros que estaban compartidos únicamente por individuos de una misma región, lo que podría estar vinculado de alguna manera con una mayor adaptación al medio en el que viven. Todos estos marcadores únicos o raros se detectaron en castaños cuya variedad no se ha descrito previamente, o que al menos no está disponible en las distintas bases de datos analizadas, por lo que sus características no están definidas. Este hecho se ve reflejado en el número total de alelos detectados, lo que se correlaciona con los diferentes estudios realizados por otros grupos de investigación. Así, en un estudio focalizado únicamente en Galicia, se detectaron un total de 48 alelos para los mismos 9 marcadores (FERNÁNDEZ-LÓPEZ & FERNÁNDEZ-CRUZ, 2015), un número inferior a los 57 encontrados en este trabajo, a pesar de analizar un total de 123 accesos frente a los 60 aquí analizados. Los mismos autores, en un estudio más amplio que incluía otras regiones del noroeste peninsular, detectaron 54 alelos distintos, habiendo analizado 447 accesos (FERNÁNDEZ-CRUZ et al., 2022). Cuando se incluyen otras regiones de Europa el número de alelos distintos se ve claramente incrementado, llegando a 76 alelos para 271 accesos (PEREIRA-LORENZO et al., 2017) y a 84 alelos distintos cuando se analizaron 962 accesos (PEREIRA-LORENZO et al., 2020).

Con el fin de determinar la presencia de variedades conocidas entre las muestras analizadas, los genotipos obtenidos se compararon con los publicados en distintos trabajos (FERNÁNDEZ-LÓPEZ & FERNÁNDEZ-CRUZ, 2015; PEREIRA-LORENZO et al., 2017; FERNÁNDEZ-CRUZ et al., 2022). De esta forma se pudo asignar 9 de los árboles a la variedad Pilonga, 3 a Parede, 3 a Vereja, 2 a Verata, 1 a Amarelante y 1 a Chamberga. La mayoría de estas variedades (Pilonga, Parede, Verata, Amarelante y Chamberga) son muy conocidas, y tradicionalmente se han incluido en los distintos estudios llevados a cabo sobre variedades del castaño en España (ver por ejemplo PEREIRA-LORENZO et al., 2001; RAMOS-CABRER & PEREIRA-LORENZO, 2005). Además, 3 de ellas se encuentran registradas en la Oficina Española de Variedades Vegetales (OEVV) y sus características están accesibles online a través de la página del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (<https://servicio.mapa.gob.es/germenwai/>). Concretamente, se trata de las variedades Amarelante (número de registro 20160129), Parede (20160131) y Chamberga (20170068). Las dos primeras fueron registradas por el Centro de Investigación Forestal de Lourizán, y la tercera por el Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA).



Igualmente se encuentra registrada, aunque todavía no es accesible online (a fecha 14 de abril de 2025), la variedad Martinenca, cuyo registro fue llevado a cabo por la Diputació de Barcelona. Dicha variedad ha sido caracterizada recientemente a partir de un amplio estudio llevado a cabo en el Parque Natural del Montseny, con el fin de recuperar las variedades tradicionales de Cataluña (ABEL et al., 2024). Aunque su genotipo no ha sido publicado, entre las muestras analizadas se encuentra el árbol codificado como B-003, uno de los representantes utilizados a su vez para la caracterización de esta variedad. En base a los datos obtenidos en el presente trabajo se pudieron asignar a esta misma variedad 3 árboles más, haciendo un total de 4.

La última parte del estudio se centró en la búsqueda de marcadores que relacionados con la resistencia a distintos tipos de estreses bióticos y abióticos mediante el estudio de diferentes EST-SSR, con el fin de identificar individuos que podrían ser más resistentes a la sequía, característica muy importante en el actual contexto de calentamiento global y cambio climático.

El marcador FIR059 está asociado con una ARN helicasa dependiente de ATP que regula distintas vías inducidas por estrés y es importante en la respuesta celular a la deshidratación y la salinidad (VASHISHT & TUTEJA, 2006). En *C. sativa* se han identificado 3 alelos privados en individuos susceptibles a la sequía (alelos 143, 160 y 179) y otros 2 alelos privados en individuos tolerantes a la misma (152 y 176) (ALCAIDE et al., 2019). Más recientemente, se ha visto que el alelo 176 está asociado con la temperatura media del trimestre más húmedo, mientras que el alelo 160 lo está con la temperatura media anual, la temperatura mínima anual y la estacionalidad de las precipitaciones (CASTELLANA et al., 2021). De los 5 alelos privados, se detectaron 3 de ellos en los castaños singulares analizados. El más abundante fue el alelo 176, relacionado con la tolerancia a la sequía y presente en 18 de los árboles analizados, principalmente localizados en Asturias y Barcelona, pero también presentes en algunos ejemplares del resto de las regiones, salvo en Andalucía (Figura 3). Los alelos 160 y 179, relacionados con la sensibilidad a la sequía, fueron encontrados en 11 y 2 árboles, respectivamente, siendo más abundantes en León y Ourense (única provincia donde se detectó el alelo 179), estando ausentes en Cataluña y Andalucía. Todos los alelos fueron encontrados en condiciones de heterocigosis, dándose el caso de individuos con un alelo de resistencia (176) y otro de susceptibilidad (160), concretamente los pertenecientes a las variedades Vereja en Ourense y otro sin determinar en León.

El locus VIT099 tiene una posible función de proteína 78 con un dominio NAC, implicada en la regulación de la biosíntesis de flavonoides y proteasomas 20S y 26S en respuesta al estrés oxidativo (MORISHITA et al., 2009) y se ha relacionado con la tolerancia al calor (DORADO et al., 2022). Aunque no se han asignado alelos en función de una mayor o menor tolerancia, el hecho de que el alelo 130 se encuentre en homocigosis en las regiones más cálidas de las analizadas (Extremadura, Andalucía y Cataluña), hace pensar que esté más relacionado con dicha tolerancia, mientras que no ocurriría lo mismo con el alelo 125, detectado



únicamente en las regiones del noroeste de la península, con temperaturas medias anuales más bajas.

El último marcador analizado fue CsPT_0005, posiblemente relacionado con la expresión del factor transcripcional TF ABR1, sensible al etileno y relacionado con la patogénesis, del que se han descrito dos alelos privados (171 y 260) relacionados con una mayor tolerancia a *P. cinnamomi* y ningún alelo con una mayor sensibilidad (ALCAIDE et al., 2020). En nuestro caso, todos los castaños singulares presentaron un único alelo (265), por lo que no se puede relacionar ninguno de ellos con una mayor tolerancia al patógeno.

6. Conclusiones

El actual estudio ha permitido hacer una selección inicial de material genético de *C. sativa* libre de todo tipo de introgresión génica con germoplasma de otras especies del género *Castanea*.

La propagación de este material permitirá obtener clones de estos castaños centenarios para establecer una red de parcelas y abordar estudios de interacción genotipo x ambiente para evaluar si posibles variaciones ambientales tienen distinto efecto sobre los diferentes genotipos definidos o, a la inversa; así como para conocer el comportamiento de estos materiales frente a distintos tipos de estrés bióticos.

Una vez realizados los estudios *in planta*, el material finalmente seleccionado podrá ser utilizado por los castañicultores como nuevo material de calidad, manteniendo la competitividad del sector en la producción y calidad de las castañas, evitando el uso de materiales híbridos alóctonos, que son la fuente de dicha introgresión.

7. Agradecimientos

El Grupo Operativo YesWeCast para la conservación y recuperación del genoma ancestral del castaño para la producción de fruto mejorando su resiliencia frente al cambio climático y amenazas fitosanitarias.

Comisión Europea: https://agriculture.ec.europa.eu/common-agricultural-policy/rural-development_es

El grupo operativo GO YesWeCast ha recibido para su proyecto de innovación una subvención de 599.791,52 €. El importe del proyecto es financiado al 80% con fondos procedentes del Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural (FEADER) y 20 % por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, tal como se establece en el Real Decreto 366/2023, de 17 de mayo.



El organismo responsable del contenido es el GO YesWeCast.

La Dirección General de Desarrollo Rural, Innovación y Formación Agroalimentaria (DGDRIFA) es la autoridad de gestión encargada de la aplicación de la ayuda del FEADER y nacional correspondiente.

«Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural: Europa invierte en las zonas rurales»

8. Bibliografía

ABEL, J.; ARGEMÍ, J.; SÁNCHEZ, R.; ALETÀ, N.; Genetic heritage of sweet chestnut genotypes in Montseny Natural Park, Catalonia. *Acta Horti* 1400, 147-158.

ALCAIDE, F.; SOLLA, A.; MATTIONI, C.; CASTELLANA, S.; MARTÍN, M.A.; 2019. Adaptive diversity and drought tolerance in *Castanea sativa* assessed through EST-SSR genic markers. *Forestry* 92, 287–296.

ALCAIDE, F.; SOLLA, A.; CHERUBINI, M.; MATTIONI, C.; CUENCA, B.; CAMISÓN, A.; MARTÍN, M.A.; 2020. Adaptive evolution of chestnut forests to the impact of ink disease in Spain. *J Syst Evol* 58, 504-516.

ALCAIDE, F.; SOLLA, A.; CUENCA, B.; MARTÍN, M.A.; 2022. Molecular evidence of introgression of Asian germplasm into a natural *Castanea sativa* forest in Spain. *Forestry*, 95, 95-104.

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

CASTELLANA, S.; MARTÍN, M.A.; SOLLA, A.; ALCAIDE, F.; VILLANI, F.; CHERUBINI, M.; NEALE, D.; MATTIONI, C.; 2021. Signatures of local adaptation to climate in natural populations of sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) from southern Europe. *Annals of Forest Science*, 78, 27.

DORADO, F.J.; SOLLA, A.; ALCAIDE, F.; MARTÍN, M.A.; 2022. Assessing heat stress tolerance in *Castanea sativa*. *Forestry* 95, 667-677.

FERNÁNDEZ-CRUZ, J.; MÍGUEZ-SOTO, B.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; 2022. Origin of traditional sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) varieties from the Northwest of the Iberian Peninsula. *Tree Genet Genomes* 18, 34.

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.



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.

MORISHITA, T.; KOJIMA, Y.; MARUTA, T.; NISHIZAWA-YOKOI, A.; YABUTA, Y.; SHIGEOKA, S.; 2009. *Arabidopsis* NAC transcription factor, ANAC078, regulates flavonoid biosynthesis under high-light. *Plant Cell Physiol.* 50, 2210-2222.

PEREIRA-LORENZO, S.; RAMOS-CABRER, A.M.; DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.B.; ASCASÍBAR-ERRASTI, J.; SAU, F.; CIORDIA-ARA, M.; 2001. Spanish Chestnut Cultivars. *HortSci* 36, 344-347.

PEREIRA-LORENZO, S.; RAMOS-CABRER, A.M.; BARRENECHE, T.; MATTIONI, C.; VILLANI, F.; DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.B.; MARTÍN, L.M.; MARTÍN, A.; 2017. Database of European chestnut cultivars and definition of a core collection using simple sequence repeats. *Tree Genet Genomes* 13, 114.

RAMOS-CABRER, A.M.; PEREIRA-LORENZO, S.; 2005. Genetic relationship between *Castanea sativa* Mill. trees from north-western to south Spain based on morphological traits and isoenzymes. *Genet Resour Crop Evol* 52, 879-890.

SAU, F.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; VARELA ARIAS, I.; PEREIRA-LORENZO, S.; 2000. Comportamiento de patrones híbridos de castaño resistentes a la tinta en zonas de Castaña en Galicia. *Invest Agr: Sist Recur For* 9, 89-102.

STEINKELLNER, H.; FLUCH, S.; TURETSCHKE, E.; LEXER, C.; STREIFF, R.; KREMER, A.; BURG, K.; GLÖSSL, J.; 1997. Identification and characterization of (GA/CT)(n)-microsatellite loci from *Quercus petraea*. *Plant Mol Biol* 33, 1093-1096.

VASHISHT, A.A.; TUTEJA, N.; 2006. Stress responsive DEAD-box helicases: a new pathway to engineer plant stress tolerance. *J Photochem Photobiol B*, 84, 150-160.