



**6º CONGRESO FORESTAL
ESPAÑOL**

6CFE01-231

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



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

¿Hablan Japonés los castaños gallegos? Introgresión genética en el castaño del país

CUENCA VALERA, B.¹, GONZÁLEZ GONZÁLEZ, M.V.², LÓPEZ RODRÍGUEZ M.², FERRADÁS RIAL, Y.² GONZÁLEZ SIMÓN, L.¹ y REY FRAILE, M.³

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

² Departamento de Fisiología Vegetal. Universidad de Santiago de Compostela. Campus Sur, 15782 Santiago de Compostela (Coruña), e-mail: mvictoria.gonzalez@usc.es; mariaangeles.lopez@usc.es

³ Departamento de Biología Vegetal y Ciencia del Suelo, Universidad de Vigo, Campus Universitario, 36310 Vigo (Pontevedra), e-mail: mreya@uvigo.es

Resumen

TRAGSA realizó en Galicia una selección de castaño por resistencia a tinta en el año 2003. La identificación genética de los individuos resistentes se realizó analizando 9 loci de microsatélites (SSR), para su clasificación como *Castanea sativa* o híbridos interespecíficos con *C. crenata* (castaño japonés). La existencia de estos híbridos se debe fundamentalmente a los programas de hibridación realizados en Galicia en la primera mitad del siglo XX. El análisis de alelos exclusivos de *C. sativa* o de especies asiáticas reveló que sólo dos genotipos de los 7 resistentes no presentaban ningún alelo exclusivo de especies asiáticas y de ellos únicamente uno presentaba alelos exclusivos de *C. sativa*. Los resultados del análisis de correspondencia factorial (FCA) mostraron que 4 de los individuos seleccionados y sus brinzales circundantes se agrupan con los híbridos artificiales, entre las accesiones de *C. crenata* y *C. sativa*. Otros dos se distribuyen próximos a híbridos artificiales mientras que sus brinzales lo hacen con las accesiones de *C. sativa*. Por último el único individuo con alelos exclusivos de *sativa* y sin presencia de alelos asiáticos aparece junto a dos de los híbridos artificiales, aunque mas próximo al grupo de *C. sativa* que ninguno de los otros individuos resistentes. Estos datos sugieren una gran variación genética entre las poblaciones de castaño de la RIU1, y un nivel de introgresión de genes foráneos en poblaciones silvestres de *C. sativa* en zonas costeras superior al esperado.

Palabras clave

Castanea sativa, *C. crenata*, híbridos, microsatélites, alelos foráneos, CNMB

1. Introducción

En el año 2003, la empresa pública TRAGSA realizó una selección en campo de *Castanea sativa* en base a caracteres de resistencia a la enfermedad de la tinta. Con este objetivo se muestrearon las zonas costeras de Galicia donde la enfermedad tiene incidencia desde la primera mitad del siglo XIX (zonas 1 y 2 de Bouhier, 1979), buscando árboles sanos que hubieran estado suficientemente expuestos a la enfermedad en el tiempo (diámetro mínimo 50 cm) y que cumplieran las mejores condiciones de forma y tamaño.

Estos genotipos fueron micropropagados en el laboratorio con el objeto de disponer de copias suficientes para evaluar su resistencia, y establecer parcelas de ensayo. Como resultados de estos ensayos, se seleccionaron 7 genotipos con elevada resistencia a

Phytophthora cinnamomi que han sido propuestos al Catálogo Nacional de Materiales de Base (CNMB) como portainjertos resistentes a la tinta.

La razón de esta selección de resistentes de entre los castaños del país, se debe a que precisamente a que presuponemos una mayor compatibilidad al injerto con las variedades tradicionales de fruto y una mejor adaptación a las condiciones edafoclimáticas de Galicia que los híbridos. Sin embargo, dada la elevada presencia de los híbridos artificiales en Galicia, a pesar de haber seleccionado los genotipos en parcelas donde según el Inventario Forestal Nacional (IFN), el castaño del país era primera o segunda especie, para mayor seguridad se ha caracterizado la base genética de los genotipos resistentes. Por este motivo en 2011 se puso a punto un método basado en marcadores moleculares tipo SSR (GONZÁLEZ ET AL., 2011).

En los últimos años el uso de SSRs (simple sequence repeats, microsatélites) en el castaño ha demostrado un gran potencial. Varios microsatélites han sido aislados y caracterizados en diferentes especies de castaño, permitiendo estudiar la diversidad y las relaciones genéticas en el género *Castanea* (Aldrich et al., 2003; Botta et al., 2006; Gobbin et al., 2007; Pereira-Lorenzo et al., 2010; Tanaka et al., 2005; Yamamoto et al., 2003). También han sido usados por nuestro grupo para establecer la identidad genética de algunos materiales resistentes seleccionados (GONZÁLEZ ET AL., 2011).

Las identificaciones iniciales con estos marcadores revelaron que prácticamente la totalidad de los árboles inicialmente seleccionados poseían alelos característicos de especies asiáticas. Por ello, en este trabajo decidimos analizar, además de nuevos genotipos resistentes, brinzales de semilla muestreados en torno a cada uno de los ejemplares adultos resistentes, y varios genotipos de híbridos artificiales, de la generación F1 y de la F2.

2. Objetivos

El objetivo último es determinar si los 7 genotipos propuestos al CNMB, son o no ejemplares de *C. sativa* puros, comprobando si poseen alelos exclusivos de especies asiáticas, y en que porcentaje, en comparación con los híbridos artificiales de la F1 o la F2 ya en catálogo.

Se determinará si los individuos resistentes, por el hecho de serlo, presentan mayor componente asiático que el resto de los individuos (brinzales colindantes) analizados en la misma localización, que no han sido seleccionados por resistencia.

Además, se intentará aclarar si el fenómeno de introgresión de alelos de especies asiáticas es algo general que afecta a *C. sativa* en toda la RIU1 (áreas costeras de Galicia).

3. Metodología

Material vegetal: en este estudio se analizaron un total de 38 genotipos de castaño distribuidos de la siguiente manera:

- 7 genotipos de castaño crecidos en áreas costeras de Galicia (RIU1) y previamente seleccionados en campo por la empresa TRAGSA por su posible resistencia a *Phytophthora cinnamomi* (C003, C004, C042, C053, P011, P042 y P043)

- Un total de 26 individuos, muestreados en las mismas parcelas que los 7 genotipos anteriores, distribuidos 3-4 individuos alrededor de cada uno de los genotipos resistentes seleccionados.
- 5 clones híbridos artificiales interspecíficos de *C. sativa* x *C. crenata*, tres de primera generación o F1 (CA-15, 90025 y 2671), y dos de segunda generación o F2 (HS y 111).

El material vegetal utilizado fueron hojas jóvenes de todos los individuos analizados. Las hojas jóvenes de los 26 individuos crecidos alrededor de los genotipos seleccionados se recogieron directamente en campo. Las hojas jóvenes de los 7 genotipos seleccionados por su resistencia, y de los híbridos interespecíficos se recogieron de plantas aclimatadas en los invernaderos de TRAGSA y obtenidas por micropropagación. Todas las hojas fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

Extracción de ADN y Amplificación de Microsatélites (Simple Sequence Repeat, SSR): la extracción de ADN se llevó a cabo a partir de 100 mg de hojas usando el DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se analizaron nueve loci de microsatélites previamente utilizados por nuestro grupo de investigación para caracterizar accesiones de *Castanea* seleccionadas por su resistencia a la tinta (González et al., 2011). Los loci analizados fueron: KT015a (Yamamoto et al., 2003); CsCAT1, CsCAT3, CsCAT6, CsCAT14 y CsCAT16 (MARINONI ET AL., 2003); EMCs14 (BUCK ET AL., 2003) y QpZag36 and QpZag110 (STEINKELLNER ET AL., 1997).

Las amplificaciones se realizaron en un volumen total de 20 µl de una mezcla conteniendo tampón de reacción (10 mM Tris-HCL pH 8.8, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 0.5 µM de cada cebador directo marcado con un fluorescente químico (NED, FAM, VIC ó PET) y un cebador inverso no marcado, 25 ng de ADN genómico (excepto KT015a, que se amplificó a partir de 10 ng) y 0.5 U de Taq ADN polimerasa (Bioline).

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Techne. El locus KT015a se amplificó siguiendo el protocolo descrito por Yamamoto et al. (2003) usando una temperatura de hibridación de 50°C. Los loci CsCAT1, CsCAT3, CsCAT6, CsCAT14 y CsCAT16 se amplificaron según describen Marinoni et al. (2003). Los loci QpZag36 y QpZag110 usando las condiciones descritas por Marinoni et al. (2003) con algunas modificaciones (paso inicial a 94°C durante 4 min y 30 ciclos con 50°C como temperatura de hibridación). El locus EMCs14 se amplificó según el protocolo descrito por Buck et al. (2003). Los productos de PCR se separaron y detectaron usando un secuenciador automático ABI PRISM 3100 y el software GeneMapper (version 3.7, Applied Biosystems).

Análisis de los datos: para representar gráficamente la distribución de la variación genética en los individuos objeto de estudio se aplicó un análisis de correspondencia factorial (FCA) a los genotipos de SSR usando el software Genetix (BELKHIR ET AL., 1996). En este análisis se incluyeron además genotipos de SSRs correspondientes a accesiones de la especie asiática *C. crenata* y diversas accesiones de *C. sativa* de 3 regiones de procedencia (RP2, RP4, RP19) y de 12 clones de 7 cultivares tradicionales gallegos de fruta. Todos estos genotipos habían sido obtenidos por nuestro grupo en trabajos previos (GONZÁLEZ ET AL.,

2011) y fueron incluidos con el fin de enriquecer la base genética de este trabajo y mejorar la asignación molecular del material objeto del presente estudio.

4. Resultados y Discusión

El análisis de los datos obtenidos permitió determinar el genotipo correspondiente a cada uno de los individuos de la población objeto de estudio (7 plantas seleccionadas por su resistencia a *Phytophthora* y brinzales de semilla circundantes) para los nueve microsatélites empleados en este estudio. La comparación de los alelos asignados para cada microsatélite, con aquellos considerados como exclusivos en trabajos previos de nuestro grupo de investigación utilizando una base genética mas amplia y que incluía individuos de sativa y de especies asiáticas (GONZÁLEZ ET AL., 2011), permitió determinar la presencia de alelos exclusivos en los individuos objeto de estudio.

Se estableció el número de alelos exclusivos de *C. sativa* y de las especies asiáticas asignados a los 7 individuos seleccionados, a los brinzales de semilla colindantes y a los híbridos artificiales incluidos en el estudio (Tabla 1). Un primer análisis mostró marcadas diferencias entre las 7 parcelas muestreadas en la RIU1, con porcentajes medios de alelos asiáticos en los brinzales analizados en esas poblaciones en valores similares (33-59% de los alelos exclusivos) a los encontrados en algunos de los híbridos artificiales, entre ellos HS, el que fue el híbrido mas utilizado en España como patrón (PEREIRA-LORENZO ET AL., 2010). Únicamente los brinzales muestreados en la parcela de Paderne (circundantes al individuo C053) y muy especialmente en la de Sada (circundantes al C004) presentaron un componente asiático muy inferior (17 y 0% de alelos asiáticos, respectivamente) a los híbridos artificiales.

Asimismo, en los 7 individuos seleccionados los alelos exclusivos de asiáticas presentaron porcentajes muy variables del total de alelos exclusivos (Tabla 1). Los individuos P043, P042 y C004 mostraron altos porcentajes de alelos exclusivos de asiáticas (67-80%), propios de algunos de los híbridos artificiales (111-1; CA15; 90025). El individuo P011 también parecía contener un importante componente asiático, aunque en porcentaje más bajo que los anteriores. En el extremo opuesto se encontraron los individuos C003, con tan solo un 20% de alelos asiáticos, y el C053 sin alelos exclusivos ni de especies asiáticas ni de la europea, muy lejos por tanto de los porcentajes de alelos asiáticos encontrados en los híbridos artificiales. Mención especial merece el individuo C042 que presentó el total de sus alelos exclusivos correspondientes a *C. sativa*, lo que podría permitir clasificarlo como un individuo de esa especie y no un híbrido, y sin embargo es resistente a *Phytophthora*.

El análisis de microsatélites se completó con el análisis de correspondencia factorial (FCA) (Figura 1), realizado sobre genotipos multilocus con el fin de analizar gráficamente la distribución de la variación genética entre los individuos seleccionados, brinzales circundantes e híbridos artificiales en relación a individuos de *C. crenata* y *C. sativa* previamente analizados por nuestro grupo (GONZÁLEZ ET AL., 2011). El análisis FCA mostró un 99% de variación acumulada en los primeros tres ejes; el primero de los cuales ya explicó el 45% de la variación total. La distribución tridimensional mostró la existencia de dos grupos principales que se corresponden con las especies japonesa y europea; un tercer grupo se corresponde con los híbridos artificiales en posición intermedia entre ambas especies, junto con las plantas seleccionadas y los brinzales de semilla.

Tabla 1.- Número y distribución de alelos exclusivos obtenidos con los nueve loci de microsatélite ensayados en 7 individuos seleccionados por su resistencia a *Phytophthora cinnamomi* (0-C003, 0-C004, 0-C042, 0-C053, 0-P011, 0-P042 y 0-P043) y brinzales circundantes a cada uno de ellos (figuran con el código correspondiente a cada individuo resistente precedido de números correlativos). Los alelos exclusivos detectados en cinco híbridos artificiales aparecen también en la tabla (CA-15, 90025, 2671, HS y 111-1).

	C. sativa	C. crenata	C. mollissima	C. henryi	Todas las Asiáticas	% alelos exclus. C. sativa	% alelos exclus. asiáticos
HS	2			1		67	33
111-1	1				2	33	67
2671	2			1		67	34
CA-15	1	1			2	25	75
90025	1	1			2	25	75
0-C003	4	1				80	20
1-C003	1	1				50	50
2-C003	3	1				75	25
3-C003	3	1				75	25
Media brinzales						67	33
0-C004	1				2	33	67
1-C004	3					100	0
2-C004	2					100	0
3-C004	3					100	0
4-C004	2					100	0
Media brinzales						100	0
0-C042	3					100	0
1-C042	3				1	75	25
2-C042	1	1		1	3	17	83
3-C042	2		1		2	40	60
4-C042	1		1		1	33	67
Media brinzales						41	59
0-C053						0	0
1-C053	2					100	0
2-C053						-	-
3-C053	1		1			50	50
4-C053	1					100	0
Media brinzales						83	17
0-P011	2	1		1		50	50
1-P011	2			1		67	33
2-P011	3	1		1		60	40
3-P011	1	2			1	25	75
Media brinzales						51	49
0-P042	1	1			1	33	67
1-P042	2				1	67	33
2-P042	2				4	33	67
3-P042	5				1	83	17
4-P042	3		1	1		60	40
Media brinzales						61	39
0-P043	1	1		1	2	20	80
1-P043	4		1			80	20
2-P043	1		1			50	50
3-P043	2		2	1	1	33	67
4-P043	2				3	40	60
Media brinzales						51	49

Un análisis más detallado de este tercer grupo mostró diferencias en el componente asiático ó europeo tanto de los individuos seleccionados como de los brinzales de semilla. En ese sentido, los individuos P043, P042 y P011 y los correspondientes brinzales de sus poblaciones aparecieron muy alejados del grupo de *C. sativa* y próximos a dos de los híbridos artificiales. Ya se había apuntado en ellos un mayor componente asiático por los altos porcentajes de alelos exclusivos de especies asiáticas (Tabla 1), posiblemente relacionado con la mayor exposición a germoplasma híbrido en la provincia de Pontevedra.

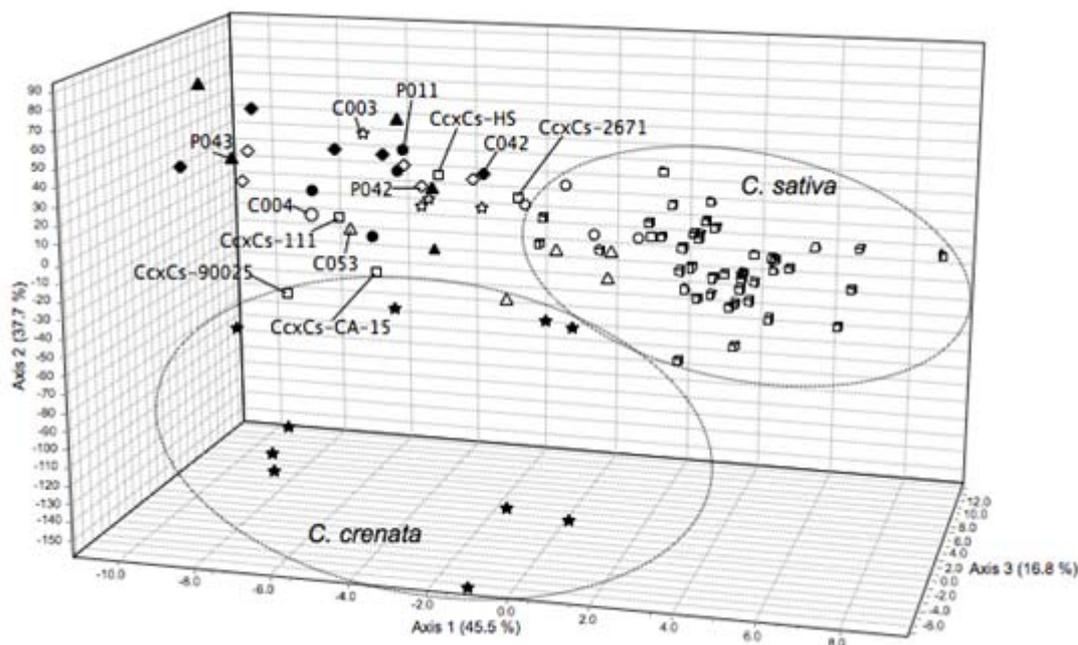


Figura 1.- Análisis de correspondencia factorial (FCA) basado en datos de microsatélites mostrando las accesiones correspondientes a *C. crenata* (estrellas negras), *C. sativa* (cubos blancos), híbridos artificiales (marcados con sus códigos), plantas seleccionadas como resistentes a *Phytophthora* y brinzales circundantes a cada planta resistente. Las plantas resistentes aparecen marcadas con su código, los brinzales de cada planta aparecen marcados con el mismo símbolo que la planta resistente (C003 asterisco blanco; C004 círculo blanco; C042 rombo negro; C053 triángulo blanco; P011 círculo negro; P042 rombo blanco; P043 triángulo negro).

El C004 es un individuo muy próximo a tres de los híbridos artificiales, como ya lo indicaban sus altos porcentajes de alelos exclusivos de especies asiáticas. Sin embargo se muestreó en una parcela en la que los brinzales tienen un fuerte componente de sativa, tanto que aparecen incluidos en ese grupo junto con los individuos de esa especie (Fig. 1). Esta población parece estar pues formada por brinzales de *C. sativa* sin componente alguno de especies asiáticas. Una situación similar se dió para el individuo C053, sin alelos exclusivos, y próximo según el análisis FCA a los híbridos, mientras que sus brinzales se agruparon, con una única excepción, con los individuos de sativa.

El individuo C042, para el cual el análisis de alelos exclusivos no reveló ningún componente asiático pero sí de sativa, apareció en el FCA próximo a dos de los híbridos artificiales, siendo de entre todos los individuos seleccionados el que parece tener un mayor componente de sativa y que el análisis FCA situó más próximo a este grupo. Este resultado concuerda con el hecho de que este genotipo sea, de entre los 7 seleccionados, el que presenta mayor afinidad al injerto con variedades de fruto de *C. sativa* (datos no mostrados).

El hecho de que los individuos resistentes seleccionados se agrupen con híbridos artificiales en el análisis FCA y la mayoría presenten además, un alto porcentaje de alelos exclusivos asiáticos parece apuntar a que la fuente de resistencia esté relacionada con la hibridación.

5. Conclusiones

1.- La valoración conjunta de la información aportada por el análisis de correspondencia factorial (FCA) y la presencia de alelos exclusivos muestra una gran variación genética entre las parcelas de castaño muestreadas en la RIU 1, en algunas de las cuales parece haber individuos con un importante componente de asiáticas que las hace similares a individuos catalogados como híbridos artificiales. En otras poblaciones, sin embargo, el carácter de sativa parece más predominante.

2.- Los individuos seleccionados por su resistencia a *Phytophthora* parecen ser híbridos con componente genético de sativa en diferentes grados. Los individuos C004, P011, P042 y P043 parecen tener un fuerte componente asiático, menor en los individuos C003 y C053. El individuo C042 presenta el menor componente asiático, muy próximo a los individuos de *C. sativa* y sin ningún alelo exclusivo de especies asiáticas.

3.- Aunque el hecho de que los individuos resistentes seleccionados se agrupen con híbridos artificiales en el análisis FCA y presenten además en general un alto porcentaje de alelos exclusivos asiáticos parece apuntar a que la fuente de resistencia está relacionada con la hibridación, los datos obtenidos no permiten asegurarlo puesto que la hibridación es frecuente también en los genotipos no resistentes.

4.- Este trabajo ha revelado la presencia de alelos asiáticos en individuos muestreados en poblaciones de la RIU1. El porcentaje de alelos asiáticos en los loci estudiados es en algunos de los individuos analizados muy inferior al detectado en los híbridos artificiales, por lo que para la propuesta al CNMB sería conveniente disponer de una nueva acepción para el género *Castanea*, que podría denominarse *híbridos espontáneos de C. sativa* Mill. A la vista de la información obtenida en este trabajo podría plantearse la necesidad de una revisión de la filiación genética de las masas consideradas por el IFN en la RIU1 como de *C. sativa* puro, con el empleo de las nuevas herramientas moleculares disponibles.

6. Agradecimientos

Este trabajo ha sido parcialmente financiado a través del programa INCITE de la Consellería de Economía e Industria de la Xunta de Galicia (expediente 09MRU016E).

Nuestro agradecimiento a Luis Rodríguez Núñez, técnico de TRAGSA, por la selección y muestreo del material en campo.

7. Bibliografía

ALDRICH, P.R.; JAGTAP, M.; MICHLER, C.H.; ROMERO-SEVERSON, J.; 2003. Amplification of North American red oak microsatellite markers in European white oaks and Chinese chestnut. *Silvae Genetica* 52:3-4.

BELKHIR, K.; BORSA, P.; CHIKLI, L.; RAUFASTE, N.; BONHOMME, F.; 1996. GENETIX 4.04, Logiciel sous Windows™ pour la Génétique des Populations. Laboratoire Génome, Université Montpellier, Montpellier, France.

BOTTA, R.; GUARALDO, P.; MELLANO, M.G.; AKKAK, A.; BOUNOUS, G.; 2006. DNA typing and quality evaluation of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cultivars. *Ad. Hort. Sci.* 20:96-100.

BOUHIER, A.; 1979. La Galice, Essai Géographique d'Analyse et d'Interpretation d'un Vieux Complex Agraire. Volume II. Imprimerie Younnaise, La Roche-sur-Yon, France.

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.

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.

GONZALEZ, M.V.; CUENCA, B.; LOPEZ, M.; PRADO, M.J.; REY, M.; 2011. Molecular characterization of chestnut plants selected for putative resistance to *Phytophthora cinnamomi* using SSR markers. *Scientia Horticulturae* 130:459-467.

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.

PEREIRA-LORENZO, S.; COSTA, R.M.L.; RAMOS-CABRER, A.M.; RIBEIRO, C.A.M.; DA SILVA, M.F.S.; MANZANO, G.; BARRENECHE, T.; 2010. Variation in grafted European chestnut and hybrids by microsatellites reveals two main origins in the Iberian Peninsula. *Tree Genet. Genomes* 6:701-715.

STEINKELLNER, H.; FLUCH, S.; TURETSCHKE, E.; LEXER, C.; STREFF, 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.

TANAKA, T.; YAMAMOTO, T.; SUZUKI, M.; 2005. Genetic diversity of *Castanea crenata* in Northern Japan assessed by SSR markers. *Breed. Sci.* 55:271-277.

YAMAMOTO, T.; TANAKA, T.; KOTOBUKI, K.; MATSUTA, N.; SUZUKI, M.; HAYASHI, T.; 2003. Characterization of simple sequence repeats in Japanese chestnut. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 78:197-220.