



UNIVERSIDAD DE CORDOBA

Programa de Doctorado: Ingeniería Agraria, Alimentaria, Forestal y del Desarrollo Rural Sostenible por la Universidad de Córdoba y la Universidad de Sevilla

TESIS DOCTORAL

“Diversidad genética y resistencia del castaño a factores bióticos y abióticos”

“Genetic diversity and resistance of chestnut to biotic and abiotic factors”

Doctorando:

María Isabel Cuestas Navarro

Directores:

Dra. María Ángela Martín Cuevas

Dr. Enrique Vargas Osuna

Abril 2019

TITULO: *DIVERSIDAD GENÉTICA Y RESISTENCIA DEL CASTAÑO A
FACTORES BIÓTICOS Y ABIÓTICOS*

AUTOR: *María Isabel Cuestas Navarro*

© Edita: UCOPress. 2019
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

[https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/
ucopress@uco.es](https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es)



TÍTULO DE TESIS

“Diversidad genética y resistencia del castaño a factores bióticos y abióticos”

DOCTORANDA: María Isabel Cuestas Navarro

INFORME REALIZADO DEL/DE LOS DIRECTORES DE TESIS

La presente Tesis Doctoral se ha desarrollado en el marco del proyecto AGL2013-48017-C2-1-R con el objetivo de determinar y analizar la diversidad genética del castaño en Andalucía frente a factores bióticos y abióticos. Para ello se han establecido tres objetivos específicos que se han desarrollado en los capítulos que componen la Tesis: i) la caracterización de la diversidad genética adaptativa relacionada con el estrés hídrico y la floración de poblaciones andaluzas de castaño; ii) la evaluación de la incidencia de especies carpófagas y la intensidad de los daños provocados en diferentes cultivares de las principales zonas productoras de fruto en Andalucía; iii) la evaluación de los primeros daños producidos por la avispa del castaño *Dryocosmus kuriphilus* y determinar si existe diversidad en los niveles de ataque de la misma en algunas de las variedades afectadas hasta el momento.

La Tesis se ha realizado en los plazos marcados, lo que ha permitido que hasta el momento se hayan publicado los siguientes trabajos:

Cuestas MI, Mattioni C, Martín LM, Osuna E V, Cherubini M, Martín MA (2017) Functional genetic diversity of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) populations from southern Spain. *Forest Systems* 26; 10.

Cuestas MI, Martín MA, Martín LM, Aldebis HK, Mena JD, Vargas Osuna E (2016) “Influencia de la variedad del castaño en la incidencia de insectos carpófagos en las principales zonas productoras de castañas en Andalucía”. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales* 43; 249-258.

Mena JD, Cuestas MI, Martín MA, Aldebis HK, Vargas-Osuna E (2015) *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera, Cynipidae) en poblaciones de castaños de la provincia de Málaga. Comunicación oral en el IX CONGRESO NACIONAL DE ENTOMOLOGÍA APLICADA. Valencia.

La Tesis cumple los requisitos de calidad necesarios para su exposición y defensa pública. Por todo ello, se autoriza la presentación de la Tesis Doctoral.

Córdoba, 4 de Abril del 2019

Firma de los directores

Fdo: Dra. M.A. Martín Cuevas

Fdo: Dr. E. Vargas Osuna

Este estudio ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad en el marco del Proyecto de Investigación del Plan Nacional de I+D+i AGL2013-48017-C2-1-R.

A los hombres y mujeres que trabajan en la agricultura

A Candela

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero expresar mi agradecimiento a los Departamentos de Genética y de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales de ETSIAM por permitirme utilizar sus instalaciones.

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de Tesis, Ángela Martín y Enrique Vargas, por su paciencia, dedicación y apoyo a la hora de realizar mi trabajo. Y por darme la oportunidad de realizar esta Tesis.

Deseo expresar mi agradecimiento a Luis Miguel Martín por introducirme en el mundo de los recursos fitogenéticos, por sus interesantes conversaciones y compartir sus conocimientos.

Agradecer al Profesor Juan Gil por estar siempre disponible para ayudar con la estadística. A Teresa Millán gracias por sus consejos y su tiempo.

Agradezco también a los agricultores que me hayan permitido acceder a sus fincas, recoger muestras y acompañarnos en nuestras salidas de campo.

A mis muletas en los tiempos difíciles: Francisco, Gabriela, Tere, Lathifa, Marcela, Marco y Alejandro.

A mis padres por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años.

A Pedro por ser uno de los promotores de este sueño.

Nota:

A fin de establecer una coherencia formal a lo largo del presente documento, se han editado los trabajos en lengua castellana y se ha uniformado todo el manuscrito en un único estilo y formato.

Resumen

El castaño (*Castanea sativa* Miller) es la única especie de su género autóctona de Europa. El carácter multipropósito de este árbol ha llevado desde su más temprano cultivo, hace miles de años, al desarrollo de diferentes técnicas de manejo de la especie dando lugar a estructuras genéticas muy diferentes a las esperadas en su estado natural. Así, podemos encontrar castañares de origen sexual o castañares de fruto formados por variedades tradicionales injertadas sobre portainjertos procedentes de semilla. El objetivo de esta Tesis ha sido estudiar la diversidad genética de los castañares en Andalucía frente a factores abióticos y bióticos. Para ello, se han establecido tres objetivos específicos que se han desarrollado en los tres capítulos que componen la Tesis. En el Capítulo I se ha estudiado la diversidad genética de ocho poblaciones de castaño de origen sexual en relación a la apertura de yemas y el estrés hídrico. Se encontró un alto grado de diversidad genética dentro y entre las poblaciones, aunque inferior a los resultados obtenidos en otros estudios con las mismas poblaciones utilizando marcadores microsatélites. Además, no se detectó señal de adaptación, posiblemente debido a la limitación del área estudiada. Sin embargo se encontraron dos poblaciones con alelos exclusivos que deberán ser tenidas en cuenta en futuros planes de conservación del castaño en Andalucía.

En el Capítulo II el objetivo fue el estudio de la diversidad genética de las variedades más representativas de las dos principales zonas productoras de castaña en Andalucía (Huelva y Málaga) frente al ataque de los dos carpófagos con más presencia en la región, *Cydia splendana* (Hübner) y *Curculio elephas* (Gyllenhal). Los resultados han mostrado la presencia mayoritaria de *C. splendana* en los frutos de las variedades analizadas y una respuesta diferencial de las mismas al ataque de este carpófago con una alta heredabilidad.

Finalmente, el Capítulo III se ha centrado en la evaluación de los primeros efectos producidos por la avispa del castaño (*Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu), un himenóptero de origen chino que se ha convertido en una plaga a nivel global del género *Castanea* y detectado por primera vez en Andalucía en el año 2014. Para ello, se han caracterizado agallas de las primeras variedades atacadas en diferentes fincas de la provincia de Málaga, según su forma, su localización en el brote y número de celdas/agalla. Los resultados obtenidos para el Índice de infestación (celdas/agalla) no han mostrado diferencias significativas entre variedades, aunque sí se observaron diferencias respecto al porcentaje de tipos de agalla que presenta cada variedad. Estas diferencias podrían ser indicadoras de diferentes grados de sensibilidad a la avispa del castaño.

En conclusión, estos resultados proporcionan datos de referencia útiles para futuros estudios más profundos sobre la genética del castaño en Andalucía que pueden contribuir a su conservación.

Palabras clave: castaño, diversidad genética, carpófagos, avispa castaño, susceptibilidad diferencial, variedades.

Abstract

Sweet chestnut (*Castanea sativa* Miller) is the only endemic species of *Castanea* genus in Europe. It is one of the most economically important multipurpose tree species of the Mediterranean region, cultivated for fruit and for timber and valued but for its contribution to the landscape and environment. This has resulted in different management techniques and genetic structures different from those expected in the nature. Thus, there are naturalized populations from sexual origin and orchards where traditional varieties (clonal origin) are grafted on rootstocks that come from seed. The general objective of this Thesis was to study the genetic diversity of chestnut in Andalusia in relation to abiotic and biotic factors. For this three specific objectives were conducted in three different chapters. In Chapter I, the genetic diversity of eight chestnut populations of sexual origin were assessed in relation to bud burst and water stress. A high degree of genetic diversity was found among and within populations, although lower than the results obtained in other studies with the same populations using neutral microsatellite markers. In addition, no adaptive signal was detected, possibly due to area studied limitation. However, two populations with exclusive alleles were found which should be taken into account in future chestnut conservation plans in Andalusia.

The aim of Chapter II was to study the genetic diversity of the most representative chestnut varieties in Andalusia to attack of the two most common carpophagous in the region, *Cydia splendana* (Hübner) and *Curculio elephas* (Gyllenhal). The results showed *C. splendana* as the main pest in the region as well as a differential response among varieties in relation to the attack of this carpophagous with a high heritability.

Finally, Chapter III has focused on the first effects produced by the chestnut wasp (*Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu), a hymenoptera of Chinese origin that has become a

global pest of genus *Castanea* and detected for the first time in Andalusia in 2014. For the study, galls of attacked varieties in different orchards from Malaga region were characterized, according to their shape, their location in shoots and number of cells/gall. The results obtained for the Infestation index (cells/gall) did not show significant differences among varieties; however differences in the percentage of gall types among varieties, which could be indicative of different degree of sensitivity to chestnut wasp, were observed.

In conclusion, these results provide useful reference data for more in-depth studies on chestnut genetic diversity in Andalusia that can contribute to its conservation.

Keywords: chestnut, genetic diversity, carpophagous, chestnut wasp, differential susceptibility, varieties.

INDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
1. Los sistemas agroforestales.....	3
2. Conservación de los Recursos Genéticos.....	4
3. Herramientas para el estudio de la diversidad de los Recursos Fitogenéticos	5
3.1. Marcadores microsatélites genómicos.....	5
3.2. Marcadores microsatélites génicos.....	6
4. El castaño en los Sistemas Agroforestales.....	7
4.1. Botánica, origen y distribución.....	7
4.2. Estructura genética derivada de sus formas de manejo.....	10
4.3. Aprovechamientos del castaño.....	11
4.4. Situación genética del castaño.....	13
4.5. Situación fitosanitaria del castaño.....	15
5. Los carpófagos del castaño.....	17
5.1. <i>Cydia splendana</i> (Hübner).....	17
5.2. <i>Curculeo elephas</i> (Gyllenhal).....	21
6. La avispa del castaño <i>Dryocosmus kuriphilus</i> (Yasumatsu).....	24
OBJETIVOS	31
CAPÍTULO I	35
Estudio de la diversidad genética funcional de las poblaciones de castaño (<i>Castanea sativa</i> Miller) en Andalucía	35
Introducción.....	39
Materiales y Métodos.....	42
Material vegetal.....	42

Extracción de ADN y análisis EST-SSR.....	43
Índices de diversidad genética dentro de las poblaciones.....	44
Análisis de la estructura de las poblaciones.....	44
Resultados y discusión.....	45
CAPÍTULO II.....	51
Respuesta diferencial al ataque de carpófagos entre variedades tradicionales	
de Andalucía.....	51
Introducción.....	55
Material y métodos.....	57
Material vegetal.....	57
Extracción de ADN y amplificación con marcadores SSR...	59
Incidencia de daños causada por carpófagos en los frutos	
de castaño.....	60
Análisis estadístico.....	61
Resultados.....	62
Incidencia de <i>Curculeo elephas</i>	63
Incidencia de <i>Cydia splendana</i>	64
Discusión.....	67
Conclusiones.....	69
CAPÍTULO III.....	71
Respuesta de variedades tradicionales del castaño en Andalucía al	
ataque de <i>Dryocosmus kuriphilus</i> (Yasumatsu).....	71
Introducción.....	75
Materiales y métodos.....	78
Material vegetal para la identificación varietal.....	78

La extracción de ADN y caracterización mediante microsatélites.....	79
Muestreo y análisis de las agallas.....	79
Análisis estadístico.....	82
Resultados.....	83
Índices de infestación de los tipos de agalla.....	83
Tipos de agalla presentes en cada variedad.....	83
Índice de infestación de las variedades.....	85
Discusión.....	86
Conclusiones.....	88
DISCUSIÓN GENERAL.....	91
CONCLUSIONES GENERALES.....	97
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO I

Tabla 1. Poblaciones muestreadas, localización geográfica y número de árboles en cada población (NA).....	43
Tabla 2. Descripción de la diversidad mostrada por los nueve marcadores en todas las poblaciones.....	45
Tabla 3. Diversidad genética dentro de las ocho poblaciones andaluzas y los coeficientes de diferenciación genética entre poblaciones.....	46
Tabla 4. Resultados AMOVA de las ocho poblaciones.....	47

CAPÍTULO II

Tabla 1. Variedades locales estudiadas en Huelva y Málaga, municipios donde se localizan las fincas y número de árboles (NA) muestreados por finca y variedad durante los años 2015 y 2016.....	58
Tabla 2. Descripción de los ocho marcadores SSR utilizados en la identificación de las variedades.....	59
Tabla 3. Tasa de infestación (Ti) de los árboles afectados por <i>Curculio elephas</i> en Huelva y Málaga.....	64
Tabla 4. Resultados del ANOVA factorial para la determinación de los efectos de Año, Variedad y la interacción Año x Variedad en las dos zonas por separado..	65
Tabla 5. Resultados del ANOVA jerarquizado para determinar el efecto de la Zona como factor principal y la Variedad como factor anidado a Zona (Variedad (Zona)) en cada año por separado.....	66
Tabla 6. Resultados del ANOVA de una vía para el efecto del factor Variedad en cada zona y año. Heredabilidad genotípica (H).....	67

CAPÍTULO III

Tabla 1. Valores medios del contenido de cada tipo de agalla, número máximo de celdas presentes en cada agalla y el porcentaje de cada tipo respecto al total de agallas analizadas.....	84
Tabla 2. Índice de infestación (celdas/agalla) de las variedades, número de árboles muestreados y número de agallas analizadas.....	85
Tabla 3. Resultados del ANOVA de una vía para la determinación de las diferencias entre el Índice de infestación de las variedades.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

- Figura 1. Erizo maduro con tres frutos de castaña en su interior. Alrededor se pueden observar los amentos masculinos caídos del árbol..... 8
- Figura 2. Árbol dedicado a la producción de fruto. Las flechas señalan las variedades clonadas injertadas sobre el mismo portainjertos..... 11
- Figura 3. Individuo adulto de *Cydia splendana* y su larva..... 18
- Figura 4. *Curculio elephas* adulto y su larva..... 22
- Figura 5. Hembra de *Dryocosmus kuriphilus* ovipositando en una yema de castaño y agallas formadas por el árbol donde se desarrollan las larvas de la avispa..... 25

CAPÍTULO I

- Figura 1. Estructura de las ocho poblaciones de castaño de Andalucía calculada a partir del programa STRUCTURE basado en métodos bayesianos y visualizados con el programa DISTRUCT. Cada individuo se muestra en una barra vertical y cada color representa la proporción del clúster al que pertenece..... 48

CAPÍTULO II

- Figura 1. Árbol marcado para posteriores muestreos. Los datos de cada árbol son registrados en un croquis con su localización en coordenadas geográficas. Los frutos de cada árbol son analizados de forma separada en el laboratorio.. 60
- Figura 2. Fruto de castaño con larva de *Cydia splendana* y orificio de salida. Restos de excrementos con forma granular procedentes de una larva de *Cydia splendana*..... 61
- Figura 3. Valores medios (\pm SE) de la Tasa de infestación de *Cydia splendana* en diferentes variedades en las zonas de Huelva y Málaga durante los tres años del

trabajo. Las barras coronadas con la misma letra en cada zona indican que no difieren significativamente entre sí de acuerdo con la prueba de comparación de LSD ($p \leq 0.05$)..... 65

CAPÍTULO III

Figura 1. Tipos de agalla según la clasificación de Mena et al. (2015). B1: agalla basal simple, B2: agalla basal polimórfica, H: agalla de hoja, P: agalla de peciolo..... 81

Figura 2. Porcentaje de cada tipo de agalla en cada una de las variedades. B1 agalla basal simple, B2 agalla basal polimórfica, H agalla de hoja, P agalla de peciolo y/o estipula. Los asteriscos sobre cada barra indican diferencias significativas de cada tipo de agalla respecto a la variedad *Pilonga*. Nivel de significación de la prueba de homogeneidad de chi-cuadrado. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ 85

INTRODUCCIÓN

1. Los sistemas agroforestales.

Existen varias definiciones de sistema agroforestal (SAF), pero en general se trata de formas de producción sostenibles en las que el componente principal es una especie leñosa perenne. Estos sistemas se caracterizan porque, además de productos agrícolas y/o forestales, presentan servicios al entorno. Es posible clasificar los principales servicios de los SAF al ecosistema en tres categorías (Smith et al. 2013): i) servicios de aprovisionamiento como: frutos, leña, productos maderables y productos no maderables (setas y miel, plantas aromáticas, taninos y resinas); ii) servicios de regulación como: secuestro de carbono, disminución de la erosión y mantenimiento de la biodiversidad; iii) servicios socio-culturales relacionados tanto con los estilos de vida como con los conocimientos tradicionales sobre las técnicas empleadas.

En Europa, la presencia de estos sistemas gestionados de forma tradicional ha tenido gran importancia. Sin embargo, debido al desarrollo tecnológico en la agricultura durante el siglo XX, estos sistemas han visto drásticamente reducida su extensión e importancia. Así, muchos de estos sistemas desaparecieron y su situación se limita a las zonas con peores condiciones de producción (regiones montañosas, áridas o suelos pobres). Un ejemplo es la región mediterránea donde se mantiene el cultivo de forma tradicional de algunas especies leñosas.

En los últimos años en Europa, los SAF son considerados como "áreas de enfoque ecológico" de la Política Agrícola Común (Comisión Europea 2013a) y en los programas de desarrollo rural (Comisión Europea 2013b). Recientemente, se ha llevado a cabo un proyecto de investigación para caracterizar y calcular la superficie total que abarcan los SAF en Europa. Los resultados han estimado que estos sistemas ocupan un total del 8.8% de la superficie agrícola utilizada, equivalente al 3.6% del área territorial europea (den Herder et al. 2017).

2. Conservación de los Recursos Genéticos.

Como consecuencia de su composición y gestión, los SAF contienen un alto grado de diversidad genética en las especies que los componen. Gran parte de esa biodiversidad reside en las poblaciones y/o variedades locales o tradicionales desarrolladas por los agricultores en un proceso continuo, en el que han intervenido las presiones de selección impuestas por el medio ambiente y el ser humano (Harlan 1992) y se han convertido en parte integrante de los paisajes y culturas rurales (Brush y Meng 1998; Zimmerer 2010; Bellon et al. 2015).

La diversidad genética de las especies constituye los recursos genéticos con los que estas especies evolucionan y pueden ser mejoradas, por lo que su conservación es fundamental. Existen dos estrategias básicas en cuanto a la conservación de recursos genéticos: la conservación *in situ* (dinámica) y la conservación *ex situ* (estática). Por “conservación *in situ*” se entiende la conservación de los ecosistemas y hábitats naturales, así como el mantenimiento y recuperación de poblaciones viables de especies en su entorno natural y, en el caso de las especies domesticadas y cultivadas, en el ambiente donde se han desarrollado sus propiedades distintivas (CBD 1992). Por “conservación *ex situ*” se entiende la conservación de los recursos fitogenéticos fuera de su hábitat natural. Ambas formas de conservación son complementarias. Si bien en la agricultura actual, la principal forma de conservación de los recursos fitogenéticos son los bancos de germoplasma (Cubero 2003), en algunos casos como en la Estrategia Española para la Conservación y el Uso Sostenible de los Recursos Genéticos Forestales, se señala que la conservación debe ser principalmente *in situ*, considerando la conservación *ex situ* como complementaria (MIMAM 2006).

3. Herramientas para el estudio de la diversidad de los Recursos Fitogenéticos.

Para llevar a cabo cualquier estrategia de conservación, el primer paso desde un punto de vista genético, es determinar la variación existente. El reciente desarrollo de la biología molecular y de las herramientas estadísticas ha permitido identificar y analizar esta variación (Aranguren-Méndez et al. 2005). Existen diferentes técnicas para el estudio de la variación genética, entre los que destacan los marcadores genómicos y marcadores génicos.

3.1. Marcadores microsatélites genómicos.

Los microsatélites (SSR por su acrónimo en inglés *simple sequence repeat*) son segmentos cortos de ADN de 1 a 6 pares de bases (pb) que se repiten en tándem (Powell et al. 1996). Estas secuencias se encuentran distribuidas uniformemente por todo el genoma (Gupta y Varshney 2000). La densidad de microsatélites en el genoma vegetal es aproximadamente de un SSR cada 64.4kb en monocotiledóneas y uno cada 21.2kb para el caso de dicotiledóneas (Varshney et al. 2005). La variación en el número de repeticiones de estas secuencias produce una serie de polimorfismos o “alelos” diferentes en tamaño.

Los SSR presentan una serie de características que los hacen ventajosos frente a otros tipos de marcadores moleculares. Estas características se resumen básicamente en: su elevado grado de polimorfismo, su herencia mendeliana simple, codominancia (pueden diferenciarse los individuos homocigotos de los heterocigotos) y su alta reproducibilidad (Varshney et al. 2005). Debido a estas peculiaridades, están siendo utilizados para una serie de aplicaciones como: pruebas de paternidad o identificación de individuos, mapas genéticos, estudios de genética poblacional o filogenia. Si bien

estos marcadores representan las secuencias más variables del genoma, la mayoría se encuentran en regiones que no codifican (Araguren 2005).

Estos marcadores se utilizan en los Capítulos II y III de esta Tesis para la identificación de árboles, contrastando sus perfiles genéticos con los de las variedades ya definidas (Martín et al. 2009).

3.2. Marcadores microsatélites génicos.

Los marcadores de secuencia expresada o EST-SSR (acrónimo del inglés *expressed sequence tags simple sequence repeats*) son fragmentos de secuencias génicas expresadas del genoma. Los marcadores EST-SSR presentan ciertas ventajas respecto a los SSR genómicos. La primera es que se obtienen a partir de una secuencia de ARNm, que posteriormente se transcribe a ADNc mediante una transcriptasa inversa. Esto conlleva que las secuencias con las que trabajamos están libres de intrones y que se trata de material expresado y por tanto potencialmente codificante de proteína (Li et al. 2004). Por esta razón son denominados también marcadores funcionales o génicos. Otra de las ventajas es la alta transferibilidad entre especies cercanas, lo que resulta una ventaja para las especies en las que no se dispone de información (Varshney et al. 2005). La rápida obtención mediante las extensas bases de datos públicas de EST-SSR y las herramientas bioinformáticas de libre acceso han permitido, además, avances en la investigación de especies de menor importancia.

Estos marcadores se emplean en el Capítulo I de la presente Tesis.

4. El castaño en los Sistemas Agroforestales.

4.1. Botánica, origen y distribución.

El castaño europeo (*Castanea sativa* Miller) pertenece al género *Castanea* de la familia *Fagaceae*, ampliamente distribuido en los bosques caducifolios del hemisferio norte. Su origen parece ser que fue Asia oriental y que desde allí se expandió hacia el oeste. Así, un estudio molecular apoya la teoría de grupo monofilético con *C. crenata* como especie basal (Lang et al. 2007). Se estimó que se produjo una diversificación inicial en el este de Asia a principios del Eoceno (54 m.a.) aislando el castaño japonés del resto de linajes. Seguidamente, hubo una divergencia entre las especies de los diferentes continentes; separándose las especies de China por un lado y Europa-América del Norte por otro, durante el Eoceno medio (43 m.a.). Finalmente, la separación entre las especies de Norte América y Europa tiene lugar a finales del Eoceno (39 m.a.). Ya en el Mioceno, se producen las diversificaciones dentro de las especies chinas (10 m.a.) y norteamericanas (24 m.a.).

El castaño es un árbol de gran porte y copa esférica, que puede alcanzar los 25 m. Sus hojas son simples, oblanceoladas y con márgenes dentadocrenados, glabras por el haz y un poco pubescentes a lo largo de los nervios del envés. Se trata de un árbol caducifolio cuyas hojas nacen generalmente en Mayo y caen a principios de Noviembre (Berrocal et al. 1998).

Es una especie monoica y autoincompatible. Presenta dos tipos de inflorescencia: amentos unisexuales que se desarrollan en la base de la rama floral y amentos bisexuales que se encuentran en el ápice de dicha rama (Botta et al. 1995). Las flores masculinas se presentan en amentos de hasta 20 cm de longitud con periantio trímero doble, y con 8-10 estambres exertos. Mientras que las femeninas, que se desarrollan en

la base de la misma rama donde aparece el amento masculino, pueden aparecer solitarias o en grupos de tres (Botta et al. 1995). La flor femenina pueden presentarse con un número de estilos de 7 a 9 y un ovario formado por 6 a 8 carpelos rodeado por un involucre de numerosas brácteas ligeramente espinosas (Valdés et al. 1987).

El fruto es de tipo aquenio, pardo brillante con cicatriz basal grisácea, convexa o planoconvexa, y pericarpo aterciopelado en la parte interna. La cúpula, también llamada erizo, se abre por 4 valvas y está cubierta de largas espinas ramificadas y algo pelosas (Valdés et al. 1987) (Figura 1). Suelen darse un número de tres frutos por erizo. La polinización es cruzada y se produce por el viento y de forma entomófila.



Figura 1. Erizo maduro con tres frutos de castaña en su interior. Alrededor se pueden observar los amentos masculinos caídos del árbol.

Las primeras teorías sobre el origen y distribución de *C. sativa* apuntaban a que el Este de Turquía podría ser el centro de origen de esta especie (Villani et al. 1991). Parece ser que hubo una primera expansión desde allí hasta el oeste de Turquía, resultado de la difusión natural de la especie. Más tarde, desde el oeste de Turquía ocurrió una expansión hacia Grecia más rápida, fruto de la domesticación por parte del hombre (Villani et al. 1994).

Más adelante, estudios palinológicos confirmaron la existencia de diferentes refugios glaciares, donde algunas poblaciones de castaño lograron mantenerse durante las últimas glaciaciones. Sus resultados sugieren la existencia de una serie de refugios situados en el noreste de Turquía, Cáucaso, los Alpes, norte de la Península Ibérica y el sur de Italia (Krebs et al. 2004). Estos resultados coinciden con los hallados, posteriormente, mediante el uso de marcadores moleculares. Mattioni et al. (2013, 2017) encontraron una fuerte estructura geográfica en las poblaciones europeas indicando que provienen de diferentes fuentes genéticas, atribuibles a los diferentes refugios glaciares. No obstante, estas técnicas han mostrado también una influencia humana en la estructura genética de tales poblaciones, como la semejanza entre los materiales italianos y españoles.

Si bien la expansión del cultivo del castaño para obtención de alimento es atribuible al Imperio Romano, su uso en aquella época parecía responder más a las necesidades de madera. La gran expansión de esta especie para la obtención de fruto se produjo durante la Edad Media, sobre todo en zonas montañosas, donde pasó a ser una fuente esencial de alimento ante las dificultades del cultivo de cereales (Conedera et al. 2004).

Su actual rango de distribución oscila entre los 36° - 51°N, siendo las poblaciones del sur de España las más meridionales y las de países como Inglaterra y Bélgica las más septentrionales. Su rango longitudinal abarca desde el Mar Caspio por el Este hasta el Atlántico por el Oeste. En Europa, el castaño cubre un área de más de 2.5 millones de hectáreas. La mayor parte de la superficie (89 %) está concentrada en sólo unos pocos países (Francia, Italia, España, Portugal y Suiza) (Conedera 2016).

4.2. Estructura genética derivada de sus formas de manejo.

Fruto de los diferentes aprovechamientos de la especie durante siglos, el castaño presenta una estructura genética compleja alejada de la que correspondería a una población natural.

Así, según su estructura genética podemos encontrar:

a) Castañares de naturaleza sexual:

Se trata de poblaciones de castaño procedentes de semilla (brinzales), en las que cada árbol tiene su propio genotipo y que pueden tener diversos usos.

b) Tallares:

Son castañares destinados a la producción de madera. En este caso, los pies centrales proceden de semilla aunque se regeneran mediante brotes de cepa (chirpiales), por lo que la formación resultante de cada cepa tiene un único genotipo.

c) Castañares destinados a la producción de fruto:

Son poblaciones de árboles que proceden de semilla sobre los que se injertan variedades clonales. La estructura genética de las poblaciones de patrones es distinta a la de los injertos. Así, mientras en la parte aérea lo esperable es una mezcla de clones, en los patrones lo esperable es que cada árbol tenga su propio genotipo (Figura 2).



Figura 2. Árbol dedicado a la producción de fruto. Las flechas señalan las variedades clonadas injertadas sobre el mismo portainjertos.

4.3. Aprovechamientos del castaño.

Los principales aprovechamientos del castaño son la producción de madera y fruto.

a) Producción de madera.

Para la producción de madera, la capacidad de rebrote del castaño posibilita su tratamiento bajo dos métodos de beneficio: en Monte Alto, donde los pies que conforman la masa proceden de plántulas de semilla (brinzales) y en Monte Bajo o tallar, donde los pies proceden de brote de cepa (chirpiales) (Álvarez 2000).

Cuando los árboles proceden de semilla mantienen su vigor durante períodos de tiempo más prolongados, pudiendo alcanzar dimensiones muy importantes. Presentan un

sistema de rotación largo en que los turnos están situados entre 70 y 90 años (Berrocal et al. 1998). El rebrote, por el contrario, tiene un importante vigor y crecimiento inicial, ya que todo el sistema radical de la cepa está implantado en el terreno, pero a la larga, el vigor se reducirá en comparación con el de los árboles que proceden de semilla. Su sistema de rotación alcanza los 7-9 años.

En Andalucía, quedan pocas masas dedicadas a la producción de madera, localizándose principalmente en el Parque Natural “Sierra Norte de Sevilla” y en la Sierra de Córdoba (Martín et al. 2007). Estas dos localizaciones, manejadas como Monte Bajo, se estudian en el Capítulo I de esta Tesis.

b) Producción de fruto.

Tal como se ha señalado, para la producción de fruto el castaño se injerta sobre patrón, generalmente procedente de semilla. El injerto (parte vegetativa) suele ser una variedad de origen local. Los agricultores suelen aprovechar el regenerado natural para la reposición de árboles. Es decir, las plántulas que han nacido a partir de castañas caídas al suelo se trasplantan para obtener un nuevo árbol. Estos individuos, pueden ser injertados o no, dependiendo de las características de su fruto (Martín et al. 2009).

La superficie de las plantaciones en Andalucía es de casi 9000 ha (MAPAMA 2017). Las principales extensiones aparecen en las provincias de Huelva (algo más de 5000 ha) y Málaga (algo más de 3000 ha). Ambas localizaciones se encuentran en zonas de protección ambiental, Parque de la Sierra de Aracena y los Picos de Aroche y Valle del Genal (incluida en la Red Natura 2000).

Aunque también existen algunas superficies de castaños de fruto en otras provincias, son muy pequeñas (Pereira-Lorenzo et al. 2001; Martín et al. 2007).

4.4. Situación genética del castaño.

Tal como se ha descrito anteriormente, las masas de castaño están constituidas por poblaciones dedicadas a la producción de madera, o por sotos dedicados a la producción de fruto, siendo la estructura genética de unos y otros muy diferentes.

a) Estudio de las poblaciones.

Debido a su reproducción sexual, el origen geográfico de las poblaciones determina su adaptación a condiciones ambientales. Así los marcadores enzimáticos han detectado una relación entre la estructura de las poblaciones y los factores climáticos (Pigliucci et al. 1990). Otra herramienta utilizada para conocer la diversidad genética entre las poblaciones de castaños ha sido el uso de la discriminación de isótopos de carbono (Δ). Este parámetro posibilita el estudio del rendimiento en plantas bajo condiciones de estrés hídrico. Estos ensayos permitieron destacar mecanismos diferenciales de respuesta al estrés hídrico dependiendo del lugar de origen de cada población (Lauteri et al. 1997, 2004). Otros trabajos sobre poblaciones europeas de diferentes orígenes mostraron variabilidad en caracteres morfológicos como altura, peso del fruto y distribución de la biomasa en diferentes condiciones (Pliura y Erikson 2002). En general, los resultados de estos trabajos indican que las poblaciones de castaño europeas procedentes de sitios "húmedos" están más localmente adaptadas y son menos plásticas que las de sitios "secos" y por lo tanto resultan más vulnerables a posibles cambios climáticos.

Estos resultados han sido confirmados y además ampliados gracias al uso de marcadores de ADN de tipo microsatélite; así tales herramientas han permitido conocer tanto el origen de *C. sativa* como su diversificación en poblaciones con diferentes acervos genéticos y el flujo genético entre estas poblaciones (Villani et al. 1991, 1999; Fineshi et al. 2000). Gracias al uso de microsatélites (SSR) se han identificado tres

grupos genéticos distintos entre las poblaciones europeas: i) poblaciones de Turquía oriental y central, ii) poblaciones del oeste de Turquía y Grecia iii) y poblaciones de Italia y España (Mattioni et al. 2013). Parte de esas poblaciones han sido analizadas con marcadores funcionales (EST-SSR), mostrando un patrón norte-sur de distribución de la diversidad genética (Martín et al. 2010a). Un estudio reciente realizado con marcadores SSR en 73 poblaciones de 14 países europeos ha vuelto a mostrar el origen geográfico de los tres grandes grupos genéticos que separan a las poblaciones del este, centro y oeste de Europa (Mattioni et al. 2017).

En España, un estudio de la diversidad genética utilizando marcadores neutrales mostró un claro patrón geográfico con tres grupos de poblaciones correspondientes al noroeste, noreste y sureste de España respectivamente (Martín et al. 2012). Sin embargo, cabe resaltar que hasta ahora no se había evaluado la diversidad genética adaptativa de las poblaciones andaluzas con marcadores funcionales, tal como se aborda en el Capítulo I de esta Tesis.

b) Estudio de los cultivares.

Los primeros trabajos que se realizaron para la identificación de cultivares en nuestro país estuvieron basados en las características morfológicas del árbol y del fruto (Pereira-Lorenzo et al. 1996). Sin embargo, estos métodos tradicionales están supeditados a los efectos de las condiciones ambientales. Una vez más el uso de herramientas moleculares se reveló como una metodología imprescindible para la diferenciación e identificación de cultivares (Pereira-Lorenzo et al. 2006, 2010; Martín et al. 2009).

Un estudio molecular a gran escala utilizando microsatélites permitió observar el proceso de diversificación de los cultivares presentes en España y Portugal, incluidas las islas Canarias y Azores (Pereira-Lorenzo et al. 2011). Los resultados de dicho estudio mostraron una estructura geográfica y genética en diez grupos principales de cultivares.

El origen de los cultivares y el proceso de diversificación fue una combinación de: hibridación entre cultivares (61% de la carga de diversificación), propagación clonal de plántulas seleccionadas (33%) y mutación (6%).

En Andalucía, los cultivares han sido caracterizados mediante descriptores morfológicos y microsatélites, encontrando un total de 38 cultivares diferentes entre las principales zonas de producción (Martín et al. 2007, 2009). Estos estudios han permitido constatar un sistema de manejo que hace que las masas dedicadas a la producción de fruto constituyan importantes reservorios de conservación dinámica de recursos genéticos. Así, se ha constatado que los agricultores, para la reposición de nuevos árboles emplean en las plantaciones tradicionales, brinzales procedentes de regeneración natural. El corto período de juvenilidad que presenta el castaño en Andalucía (4-5 años), permite esperar a que estos brinzales (procedentes de semilla) den fruto, para así juzgar la idoneidad de dichos frutos. Según sea esta calidad, el árbol será despuntado e injertado con otra variedad más adecuada, se le dejará producir a pie franco o se empleará para injertar con él a otros árboles, generándose así una nueva variedad clonal (Martín et al. 2009). El estudio sistemático de identificación con marcadores microsatélites de un castañar tradicional constató que ambas partes, patrones y parte aérea, atesoraban una elevada diversidad genética, siendo a su vez distinta la composición genotípica de una y otra (Martín et al. 2017).

4.5. Situación fitosanitaria del castaño.

Los castaños se ven afectados por diversos fitófagos y fitopatógenos que pueden llegar a causar importantes pérdidas económicas. Los problemas fitosanitarios más frecuentes en España son:

a) Enfermedades fúngicas:

La “tinta” cuyo agente causal es *Phytophthora cinnamomi* (Rands), que produce pudrición radicular, y el “chancro” debido a *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr que causa daños en el sistema conductor del tronco.

b) Daños causados por insectos carpófagos:

Por su abundancia y efecto directo sobre la producción de frutos, destacan el lepidóptero *Cydia splendana* (Hübner) y el coleóptero *Curculio elephas* (Gyllenhal), conocidos como la carpocapsa y el balanino, respectivamente.

c) Daños causados por la avispa del castaño:

Dryocosmus kuriphilus (Yasumatsu): himenóptero formador de agallas que originario de China ha invadido los castañares de Asia, Norte América y Europa en los últimos 60 años.

Evidentemente, el castaño sufre los daños de otros fitófagos y agentes infecciosos que se pueden constituir en plagas en función de la zona, del manejo de los árboles y del año en cuestión. Se dan en España otras enfermedades de menor importancia como; la Socarrina o Antracnosis (*Micosphaerella maculiformis* (Person) Shoret) que afecta a las hojas. Según la naturaleza de los daños podemos mencionar la incidencia de defoliadores como la Lagarta *Lymantria dispar* (Linneaus), xilófagos como *Zeuzera pyrina* (Linneaus) o algunas especies de pulgones como *Lachnus roboris* (Linneaus) (Mansilla et al 2000). En los Capítulos II y III de esta Tesis se estudian dos de los principales problemas fitosanitarios del castaño en Andalucía: carpófagos y avispa, en relación con la diversidad genética del castaño.

5. Los carpófagos del castaño.

Los daños principales causados por insectos en los castañares se deben a carpófagos que pueden llegar a ser plagas principales; los lepidópteros totrícidos *Cydia splendana* (Hübner), *Cydia fagiglandana* (Zeller) y *Pammene fasciana* (Linnaeus) y el coleóptero *Curculio elephas* (Gyllenhal) (Mansilla et al. 2000). En Andalucía, estas especies pueden llegar a causar pérdidas en producción de fruto de hasta un 60%, siendo *C. splendana* la principal responsable de estos daños (Vargas Osuna et al. 2003; Romero 2013). La incidencia de estas especies es muy variable entre zonas, dependiendo del manejo del castaño (laboreo, aprovechamiento ganadero), de las condiciones climáticas locales, así como también de las diferencias en susceptibilidad entre variedades, siendo este último factor el objetivo planteado en el Capítulo II de esta Tesis.

5.1. *Cydia splendana* (Hübner).

La polilla o carpocapsa del castaño, *C. splendana*, es un lepidóptero de la familia Tortricidae que se distribuye por toda Europa. Entre sus plantas hospedantes se encuentran especies de *Castanea*, *Quercus*, *Fagus* y *Juglans*. (Bogenschütz 1991).

a) Morfología.

El estado adulto presenta una envergadura alar de 14 a 22 mm, diferenciándose dos tipos de coloración que se corresponden con sendas formas del imago. En la forma típica, las alas anteriores presentan una tonalidad gris-ceniza a gris-marrón y una zona basal gris oscura bien diferenciada; en la forma *reamurana* las alas anteriores son más oscuras, sin la zona basal típica pero con dos bandas plateadas en el ángulo posterior y 4 ó 5 trazos negros en ellas (Mansilla et al. 2000) (Figura 3).

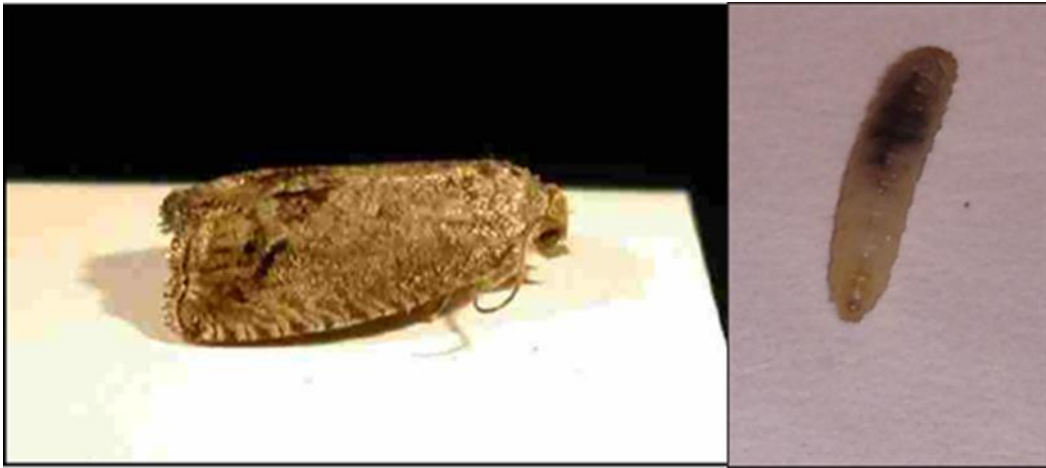


Figura 3. Individuo adulto y larva de *Cydia splendana*.

La larva del último estadio tiene aproximadamente 13-15 mm de longitud con un abdomen de grisáceo a amarillo pálido. La cabeza es de color marrón amarillento y el escudo protorácico es más pálido que la cabeza y débilmente esclerotizado. (Bogenschütz 1991).

b) Ciclo de vida.

Este tortricídeo es una especie univoltina. El periodo de vuelo de los adultos es durante Junio-Julio (Europa central) o en Agosto-Septiembre (Sur de Europa y Hungría). Los huevos son depositados principalmente en las nervaduras de las hojas cercanas a los frutos jóvenes, no existiendo ninguna cara de la hoja preferente para la puesta (Bugenschütz 1991). Después de un período de incubación de 10 a 15 días, eclosionan los huevos y las larvas se dirigen a los frutos en los que penetran para alimentarse y desarrollarse en su interior hasta dejarlos completamente vacíos, pudiendo encontrar en su interior los excrementos granulados procedentes de la alimentación. Generalmente dentro del mismo fruto desarrolla sus cinco estadios larvarios, y tras uno o dos meses, éste suele caer al suelo prematuramente. La larva practica en el fruto un orificio de salida y una vez en el suelo se entierra superficialmente fabricando un capullo de seda

aglutinado con partículas terrosas, donde pasará el invierno y primavera, pupando y alcanzando el estado adulto en el verano (Mansilla et al. 2000).

En un mismo fruto se desarrolla una sola larva de esta especie. Sin embargo, puede ocurrir que dentro de un fruto se encuentren larvas de *C. splendana* y del balanino o gorgojo de la castaña *C. elephas*. Se ha visto que esto ocurre porque las larvas del tortricido no muestran discriminación interespecífica con las del balanino, pudiendo éstas penetrar en frutos en donde se estén desarrollando larvas de *C. elephas*. Esto no ocurre en el caso contrario, ya que el balanino sí es capaz de discriminar y seleccionar frutos que no estén atacados por *C. splendana* (Debouzie et al. 1996).

Como enemigos naturales de *C. splendana* se citan en Europa parasitoides de huevos, larvas y pupas, como los icneumonidos *Itopectis maculator* (Fabricius), *Pristomerus vulnerator* (Panzer) y *Epirus ventricosus* (Tschek); los braconidos *Ascogaster quadridentatus* (Wesmael), *Phanerotoma dentata* (Panzer) y *Microdus tumidulus* (Nees); los calcidoideos *Trichogramma* sp. y *Elachertus* sp.; y los dípteros taquínidos *Bessa selecta* (Meigen) y *Zenillea roseanae* (Brauer y Bergenstamm) (Bogenschütz, 1991).

c) Daños.

Se distinguen dos tipos de daños, derivados de la alimentación larvaria:

- Directos: disminución de la capacidad germinativa de las semillas, pérdida de tamaño y peso y caída temprana de los frutos.
- Indirectos: merma apreciable en la calidad organoléptica de los frutos, lo cual incluso puede derivar en su inviabilidad comercial.

d) Métodos de control.

Existen algunas medidas preventivas, como la recogida periódica de los frutos caídos al suelo, lo que evita que una parte de las larvas se entierren para invernar. Otra técnica es

la colocación de redes (mallas de polietileno) sobre el suelo para impedir que las larvas que caen del árbol puedan enterrarse y pupar (Mansilla et al. 2000).

El control químico de esta especie es difícil debido a que muchas de los castaños se encuentran en zonas con irregular orografía en donde las aplicaciones resultan muy complicadas, o en áreas de especial protección medioambiental. Además, no es sencillo elegir el momento adecuado de las aplicaciones, las cuales se deben realizar durante el periodo de emergencia de los adultos justo en el momento de mayor nivel de población y de máxima eclosión de huevos, pero antes de que las larvas penetren en los frutos. Ninguno de los productos insecticidas (Landa-cihalotrin, Metil-azinfos), que han dado buenos resultados experimentales para el control de la especie en castaños de Galicia (Mansilla et al 1999), están autorizados actualmente en España.

Una herramienta utilizada para el control de esta especie es el uso de su feromona sexual (Den Otter et al. 1996). Sin embargo, está bien documentada la baja selectividad de las feromonas sintéticas actualmente en el mercado entre las diferentes especies de *Cydia* (Schmidt et al. 2007; Aguin-Pombo et al. 2008; Rotundo et al. 2010), hecho que se ve agravado por la existencia de polimorfismo geográfico de esta especie (Delisle et al. 2005, Bengtsson et al. 2014). Algunos autores proponen mejorar la eficacia de atracción de la feromona de *C. splendana* mediante la incorporación de semioquímicos de origen vegetal que han dado buenos resultados de atracción en ensayos realizados en el Sur de Italia (Rotundo et al. 2010).

Este es el único método disponible hasta ahora, por lo que se han realizado experiencias en campo para el control de esta especie mediante la técnica de captura masiva de machos en Andalucía, tanto en La Sierra de Aracena como en la Serranía de Ronda. Los resultados han sido prometedores, sobre todo en las fincas y zonas que presenten niveles

medios de incidencia, menores del 25% de frutos dañados (Fernández y Vargas Osuna 2006; Romero 2013).

Con respecto a los métodos de control biológico, se han encontrado varios aislados del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin, procedente de larvas de carpófagos del castaño, que en ensayos de laboratorio han mostrado actividad insecticida contra larvas de *C. splendana*. Su desarrollo como insecticida microbiano permitiría su utilización para el control de esta especie mediante aplicaciones en el suelo para reducir las poblaciones de larvas y pupas (Romero 2013).

La posible respuesta diferencial de las variedades de castaño al ataque de este fitófago, como se explora en el Capítulo II de esta Tesis, contribuiría a diseñar programas de control integrado en función de las características genéticas, ambientales y de manejo de zona.

5.2. *Curculio elephas* (Gyllenhal).

El gorgojo del castaño es un coleóptero que pertenece a la familia Curculionidae que ha sido citado sobre *Quercus suber* (Linnaeus), *Quercus rotundifolia* (Lamarck), *Quercus petraea* (Lieblein), *Quercus virginiana* (Miller) y *Castanea sativa* (Miller) (Soria et al. 1995).

Su distribución geográfica abarca el norte de África, Italia, España, centro y sur de Francia, Balcanes, Suiza y Alemania occidental (Desouhant 1998; Speranza 1999; Junta de Andalucía 2002).

a) Morfología.

El gorgojo de las castañas es un insecto que en estado adulto tiene una longitud de 6 a 9 mm, con tegumentos marrones recubiertos dorsalmente con escámulas lanceoladas amarillas o cenicientas, que en las estrías de los élitros son mayores y oblongas, y

ventralmente son apretadas y ovaes (Hoffman et al. 1963; Junta de Andalucía 2002). El rostro es rojizo, punteado-acanalado en la base, el del macho más corto que el de la hembra, siendo en ésta tan largo o más que el cuerpo. Las patas son largas de coloración ferruginosa y con los fémures presentando un fuerte diente. Tiene las antenas muy largas, del mismo color que las patas, y con maza fusiforme. El protórax poco convexo, casi transversal. Escudo alargado. Los élitros son acorazonados, convexos por detrás, arqueados lateralmente, con estrías visibles, punteadas e interestrías planas (Mansilla et al. 2000; Junta de Andalucía 2002).

Las larvas alcanzan una longitud de 6 a 9 mm; son ápodas, carnosas, presentan el cuerpo curvado y su coloración es blanco-marfil. Su cabeza es de color marrón, tan larga como ancha o ligeramente más larga y provista de mandíbulas grandes, con un par de dientes cortantes. Las antenas tienen solamente un artejo basal en forma de escudo (Figura 4).



Figura 4. Adulto y larva de *Curculio elephas*.

b) Ciclo de vida.

Se trata de una especie univoltina, aunque puede presentar diapausa que en ocasiones alcanza hasta 4 años. Los adultos aparecen en verano, entre agosto y septiembre. La

puesta la realizan las hembras efectuando un orificio en el fruto donde deposita de uno a varios huevos. Puede suceder que haya varias puestas en un mismo fruto, no existiendo competencia intraespecífica (Menú 1993). A los 10 días aproximadamente se produce la eclosión de los huevos, alimentándose la larva dentro del fruto en donde se desarrollará durante unos 40 días, tras lo cual (coincidiendo en los meses de octubre-noviembre) practicará un orificio circular de salida y caerá al suelo, donde invernará a una profundidad variable entre 10 y 70 cm. Las larvas permanecerán allí hasta el año siguiente, en que se transforman en pupas durante los meses de julio y agosto, para alcanzar transcurridos 15 días el estado adulto (Debouzie 1996).

Las poblaciones de esta especie están muy poco controladas por enemigos naturales, debido a que durante gran parte de su desarrollo se encuentra en el interior del fruto o en el suelo a bastante profundidad. Por ello no es de extrañar que apenas existan registros de especies depredadoras o de parasitoides. En España solo hemos encontrado la referencia del braconido *Schizoprymnus longiseta* en encinares de los Montes de Toledo (Ciudad Real) (Fernández Carrillo et al. 2004).

c) Daños.

Los daños son similares a los causados por *C. splendana* y se deben principalmente a la actividad trófica de las larvas que provocan disminución de la capacidad germinativa de las semillas, disminución de tamaño y peso, así como caída temprana de frutos.

d) Métodos de control.

El control preventivo mecánico consiste, como para *C. splendana*, en la colocación de redes (mallas) de polietileno sobre el suelo para evitar que las larvas que caen al suelo puedan enterrarse (Mansilla et al. 2000).

El control químico tiene las mismas limitaciones que para *C. splendana*, teniendo incluso que ajustar aún mejor el momento de las aplicaciones, que en este caso se deben

hacer coincidir con el máximo de emergencia de los adultos (único estado de desarrollo expuesto). La metodología para determinar la presencia de los adultos consiste en el vareo periódico de los árboles o bien en la colocación de un pupario con larvas (recipiente de 75x10x15 cm) enterrado en el suelo y cubierto en su parte superior, que se coloca el año anterior y se revisa semanalmente en verano comprobando el momento en el que emergen los adultos (Mansilla *et al.* 2000).

El control con enemigos naturales solo se está desarrollado a partir de hongos entomopatógenos, la mayoría de la especie *Beauveria bassiana*. En España se ha obtenido un aislado de *B. bassiana* que se encontró infectando a larvas de esta especie en el Valle de los Pedroches (Santoyo 2005) y ha sido evaluado en laboratorio con resultados aceptables (Romero 2013).

6. La avispa del castaño *Dryocosmus kuriphilus* (Yasumatsu).

La avispa del castaño *Dryocosmus kuriphilus* (Yasumatsu) es un himenóptero de la familia Cynipidae que se considera, actualmente, una de las plagas más preocupantes del género *Castanea*. La hembra deposita los huevos en las yemas vegetativas induciendo la formación de agallas en los brotes del castaño lo que puede llegar a producir la muerte del árbol en casos extremos (Payne *et al.* 1983; Moriya *et al.* 2003; Cooper y Rieske 2010; Sartor *et al.* 2015) (Figura 5). Las agallas le permiten refugio y alimento durante su desarrollo hasta convertirse en adulto, proporcionándole además protección contra enemigos naturales.



Figura 5. Hembra de *Dryokosmus kuriphilus* ovipositando en una yema de castaño y agallas formadas por el árbol donde se desarrollan las larvas de la avispa. Fuente de la imagen de la izquierda: Servicio de Sanidad Vegetal de la Junta de Andalucía.

Esta especie es originaria de China, donde ataca principalmente a *C. mollisima* (Blume). En 1941 fue introducida accidentalmente en Japón afectando a *C. crenata* (Siebold y Zuccarini) donde colonizó en diez años la mayor parte del país y más tarde Corea en 1958 (Moriya et al. 2003). A principios de los años 70 se localizó por primera vez en el este de la Costa Norte de Estados Unidos en individuos de *C. dentata* (Marshall), afectando más tarde a poblaciones de *C. crenata* y *C. sativa* (Rieske 2007). En Europa fue detectada por primera vez en Italia en 2002 (Brussino et al. 2002) desde donde se extendió a otros países europeos limítrofes como Croacia (Matošević et al. 2010) y Eslovenia (Knapič et al. 2010). En los últimos años, la especie se ha extendido hasta Francia, Portugal, España, Grecia, Hungría y Suiza (Quacchia et al. 2008; EFSA 2010; Michaelakis et al. 2016). También se ha detectado en otros países fuera de Europa como Nepal (Abe et al. 2007), Canadá (Huber y Read 2016) y Turquía. En España la especie es detectada por primera vez en Cataluña (Pujade-Villar et al. 2013) y en el año 2014 se detectó en Andalucía, concretamente en la provincia de Málaga (Junta de Andalucía 2017).

El hecho de que su propagación haya sido a nivel global en un periodo de tiempo relativamente corto, indica que el intercambio humano de material infestado es el principal factor que facilita su dispersión (Aebi et al. 2007; EFSA 2010).

a) Morfología.

Según la información disponible por la Junta de Andalucía (2017), sus caracteres morfológicos se pueden resumir como se indica seguidamente.

Los adultos son de color negro con las extremidades amarillentas, pudiendo llegar a medir entre 2.5 y 3mm. Los huevos son de color lechoso blanco, ovalados y miden entre 0.1 y 0.2 mm de largo. Las larvas son ápodas, pudiendo alcanzar una longitud de 2.5 mm en su madurez y son de color blanco lechoso. Las pupas puede llegar a medir 2.5 mm y son de color marrón oscuro o negro.

b) Ciclo de vida.

D. kuriphilus es una especie univoltina cuyas poblaciones están compuestas íntegramente por hembras que se reproducen por partenogénesis (Abe et al. 2007). La emergencia de la avispa adulta ocurre a principios de verano (Ôtake 1980; Cooper y Rieske 2010). La longevidad del adulto puede ser de hasta 10 días y cada hembra puede poner más de 100 huevos durante este tiempo (EPPO 2005). La oviposición tiene lugar en las nuevas yemas invernantes (Cooper y Rieske 2010). Las larvas nacen de los huevos a los 30-40 días y pasan el invierno como larvas de primer estadio dentro las yemas (EPPO 2005). Durante la brotación del castaño, la presencia de las larvas en las yemas induce la formación de agallas. Dentro de estas agallas prosigue el desarrollo larvario con dos estadios más, que se continua con el periodo de pupación desde mitad de mayo hasta principios de junio (Viggiani y Nugnes 2010).

c) Daños.

Los principales daños que causa *D. kuriphilus* en el castaño son:

- Disminución de la actividad fotosintética a causa de la pérdida de área foliar y biomasa provocada por la formación de las agallas (Kato e Hijii 1997; Guyot et al. 2015).
- Debilitamiento del árbol como consecuencia de dicha disminución de superficie fotosintética, así como del consumo excesivo de reservas para la activación de yemas latentes, que es una reacción que el árbol presenta ante la infestación por la avispa. Estos efectos pueden verse agravados por condiciones ambientales como heladas tempranas o sequía (Gehring et al. 2017). También puede presentarse un incremento de la susceptibilidad a enfermedades como el chancro (Prospero y Forster 2011).

Los daños causados resultan en una disminución significativa del rendimiento en la producción de frutos, con pérdidas que pueden llegar al 80% (Battisti et al. 2014).

d) Métodos de control.

Son varias las medidas de control que se han propuesto en los diferentes países en los que se ha introducido la avispa del castaño. Algunas de estas medidas están en fase de experimentación y no han sido puestas en prácticas a nivel general.

- Medidas legislativas.

La razón de la rápida propagación a larga distancia de esta especie se explica por el transporte de plantas jóvenes infestadas, pues la presencia del insecto dentro de las yemas no es detectable (Quacchia et al. 2008). Por esta razón, la Organización Europea y Mediterránea para la Protección de las Plantas añadió en 2003 a *D. kuriphilus* como una plaga de cuarentena (EPPO 2005). La medida fitosanitaria más importante en este

aspecto fue prohibir la importación de plantas de castaño procedentes de Asia y América.

- Control mecánico.

La poda de las ramas afectadas es una medida principalmente usada cuando la especie aparece por primera vez en una zona. Se suele combatir contra el insecto mediante la corta y quema de árboles que resultan afectados (Payne et al. 1983). Pero este procedimiento es muy costoso para los productores y escasamente eficaz.

- Control químico.

La efectividad del control químico está limitada por varios aspectos. La aplicación de insecticidas químicos contra estados inmaduros no es posible debido a que huevos, larvas y pupas se encuentran protegidas en las yemas o las agallas (EFSA 2010). Los tratamientos contra los adultos a menudo son impracticables debido a la distribución natural de los castaños en terrenos escarpados (Germinara et al. 2011). Los intentos en otros países como Japón, durante los primeros años de infestación, no obtuvieron resultados positivos (Quacchia et al. 2008).

- Control biológico.

Se han realizado varios estudios sobre enemigos naturales y sobre su papel en el control biológico de *D. kuriphilus*. En Italia, los principales agentes biológicos que realizan un control natural de la avispa son himenópteros parasitoides de larvas (Aebi et al. 2007; Quacchia et al. 2008; Santi y Maini 2011). La incidencia de parasitismo en las nuevas áreas de introducción de la avispa es muy escasa, limitándose a algunas especies autóctonas que parasitan a cinípidos que producen agallas en otras plantas presentes en el ecosistema, principalmente las del género *Quercus*. Los niveles de incidencia de parasitoides autóctonos es muy bajo, al menos en los primeros años después de la llegada de la avispa (0.5% -1.6% de las agallas) y los valores no suelen aumentar

mucho más debido a la baja especificidad de estos parasitoides autóctonos (Bernardinelli et al. 2016).

Torymus sinensis (Kamijo) es un parasitoide del orden Hymenoptera procedente de China que tiene como huésped específico a la avispa del castaño (Moriya et al. 2003). Presenta la ventaja de tener una mayor tasa de parasitación respecto a los parasitoides nativos. Este insecto fue introducido con éxito en Japón y Estados Unidos, y más recientemente en Italia y Francia (Quachia et al. 2008; Gibbs et al. 2011) reduciendo las poblaciones de *D. kuriphilus* a niveles tolerables (infestación inferior al 30%).

- Variedades resistentes.

La utilización de variedades resistentes al ataque de la avispa tuvo éxito durante aproximadamente 20 años en Japón, aunque la resistencia de las plantas fue superada por una adaptación de las poblaciones de *D. kuriphilus* (Murakami 1981).

En los últimos años se han realizado ensayos para detectar diferencias en susceptibilidad de variedades de *C. sativa*, así como en cultivares híbridos (Panzavolta et al. 2012; Sartor et al. 2015). Los resultados han mostrado un amplio espectro de variación. Así, se encontraron hasta siete cultivares resistentes a la avispa en los cuales no se encontraron agallas. Algunos de estos cultivares pertenecen a la especie europea mientras que en otros casos se trata de híbridos (*C. crenata* x *C. sativa*). Tal es el caso de “Bouche de Bétizac”. Este híbrido euro-japonés presenta una reacción de hipersensibilidad de forma que no desarrolla agallas a pesar de encontrarse huevos y larvas en sus yemas latentes. La respuesta de la planta a la infestación por el cinípido origina la muerte de las larvas (Dini et al. 2012). En el Capítulo III de la presente Tesis se aborda el posible ataque diferencial de este fitófago en variedades tradicionales utilizadas en Andalucía para la producción de fruto.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

A partir de lo expuesto, el objetivo general de esta tesis es el estudio de la diversidad genética frente a factores abióticos y bióticos de los sistemas agroforestales relacionados con el castaño en Andalucía. Para ello, nos hemos centrado en tres objetivos concretos que dan lugar a los tres capítulos de este trabajo y que a continuación se presentan;

1. Caracterización de la diversidad genética adaptativa de las poblaciones de castaño en Andalucía mediante el empleo de marcadores EST-SSR
2. Evaluación de la incidencia de especies carpófagas e intensidad de los daños en diferentes cultivares de las principales zonas productoras de Andalucía.
3. Evaluación de los primeros daños producidos por *D. kuriphilus* en el Sur de España y el estudio de la respuesta diferencial de las variedades afectadas por el ataque de avispa.

CAPÍTULO I

Estudio de la diversidad genética funcional de las poblaciones de castaño (*Castanea sativa* Miller) en Andalucía.

Publicado como:

Cuestas MI, Mattioni C, Martín LM, Osuna E V, Cherubini M, Martin MA (2017)
Functional genetic diversity of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) populations from southern Spain. Forest Systems 26; 10.

Resumen.

El castaño europeo (*Castanea sativa* Miller) está presente en Andalucía en masas arbóreas dispersas por toda la región. En esta región, muchos castañares fueron abandonados de forma progresiva debido al éxodo rural ocurrido en los años 60 y 70 del pasado siglo y se han convertido en rodales "naturalizados" que forman parte de áreas con un alto valor ambiental. Además, es ampliamente aceptado que la ubicación geográfica de esta región implica una mayor exposición a los efectos del cambio climático, por lo que el conocimiento de la diversidad genética de estas poblaciones podría ser útil para minimizar este riesgo y el de otros factores relacionados con el cambio global en las mismas. El objetivo de este estudio fue evaluar la variabilidad genética adaptativa de ocho poblaciones de castaño del sur de España mediante marcadores microsatélites génicos (EST-SSR, expressed sequence tags simple sequence repeat). Estos marcadores EST-SSR han permitido evaluar la diversidad genética en las citadas poblaciones, detectando diferencias significativas entre ellas. Sin embargo, no se encontró señal de adaptación, posiblemente debido a la limitación del área estudiada. Las ocho poblaciones se agruparon en dos clusters diferentes, destacando dos poblaciones que presentaron alelos exclusivos. Los resultados de este estudio pueden contribuir al desarrollo de estrategias de conservación de la especie en Andalucía.

Introducción.

El castaño (*Castanea sativa* Miller) es un árbol de la familia Fagaceae que representa la única especie nativa del género *Castanea* en Europa. Este árbol ha sido explotado como especie multipropósito desde época de los romanos, momento en el que ya se realizaban técnicas de injerto para la producción de fruto (Columela 1979). Su cultivo se expandió en la Edad Media, siendo una de las principales fuentes de alimentos básicos para las poblaciones rurales en las zonas de montaña (Bourgeois 1992). Sin embargo, durante la Edad Moderna, el área dedicada a la producción de castañas se redujo debido a la introducción de cultivos importados de América. Actualmente, esta especie puede encontrarse en diferentes formaciones según su aprovechamiento. Podemos encontrar castañares de naturaleza sexual formando parte de poblaciones naturalizadas con valor fundamentalmente paisajístico y medioambiental, así como plantaciones dedicadas a la producción de fruto que emplean variedades tradicionales injertadas sobre patrones que proceden de semilla.

Las poblaciones naturalizadas se hallan seriamente amenazadas por los efectos del cambio global, en particular por el cambio climático y los cambios de uso del suelo, que han llevado a un absoluto abandono de muchas de estas masas arbóreas. El manejo tradicional del castaño requiere una serie de prácticas culturales continuas y su ausencia ha favorecido la invasión de muchas de estas masas por otras especies y su evolución a bosques caducifolios mixtos. Esto ha causado una disminución severa de la biodiversidad en las regiones afectadas y una menor prestación de servicios ecosistémicos (Conedera et al. 2016). Asimismo, su abandono ha favorecido otro de los efectos del cambio global como es la invasión de organismos exóticos. La falta de control sanitario en estas masas ha propiciado la aparición y propagación de plagas y enfermedades. Este es el caso de las dos enfermedades más importantes del castaño; la

“tinta” producida por *Phytophthora cinnamomi* (Rands) y el “chancro” generado por *Cryphonectria parasitica* (Murril) Recientemente, la introducción accidental de la avispa del castaño *Dryocosmus kuriphilus* (Yasumatsu) en Europa ha puesto en peligro muchos de los castaños convirtiéndose en la principal plaga de la mayoría de las regiones afectadas (EFSA 2010).

La diversidad genética juega un papel vital en la determinación de la capacidad adaptativa de las poblaciones forestales a las nuevas condiciones producidas por los efectos de este cambio global (Franks et al. 2014; Fady et al. 2016). Es fundamental, por tanto, estimar dicha diversidad. Para tal fin, el uso de marcadores moleculares está cada vez más extendido. Los microsatélites (SSR, simple sequence repeat) son marcadores que se han convertido en la herramienta más utilizada para estudiar la diversidad genética en plantas, ya que son altamente polimórficos, codominantes y representativos de todo el genoma (Powell et al. 1996). Resultan de enorme utilidad para estudios de poblaciones y de parentesco genético dada su alta capacidad de detectar variación en los individuos. Sin embargo, solo son capaces de detectar variación neutra. Los marcadores EST-SSR (expressed sequence tags simple sequence repeat), desarrollados a partir de secuencias expresadas del genoma, pueden usarse para examinar la diversidad funcional en relación con la variación adaptativa (Varshney et al. 2005). En los últimos años, estos marcadores se han utilizado ampliamente para evaluar la diversidad genética en muchas especies forestales debido a su alta transferibilidad entre especies relacionadas, y a que proporcionan información complementaria a la obtenida con otros marcadores neutrales como los SSR, RAPD (random amplification of polymorphic DNA), AFLP (amplified fragment polymorphisms), etc., (Homolka et al. 2013; Uchiyama et al. 2013; Shen et al. 2014; Leonarduzzi et al. 2016).

La diversidad genética de las poblaciones de castaño ha sido ampliamente estudiada usando diferentes marcadores moleculares como isoenzimas, repeticiones de secuencias inter-simples (ISSR), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y microsatélites (Fineschi et al. 2000; Villani et al. 1999; Mattioni et al. 2013) mostrando patrones de diferenciación genética entre poblaciones. Uno de estos estudios ha evidenciado una gran diversidad genética en poblaciones de castaño europeas utilizando marcadores SSR. Sus resultados han permitido identificar tres grupos genéticos distintos: poblaciones del este y centro de Turquía, poblaciones del oeste de Turquía y Grecia, y poblaciones de Italia y España. Este patrón geográfico podría corresponderse con diferentes refugios glaciales que habrían mantenido esta separación entre poblaciones (Mattioni et al. 2013). El estudio de Martín et al. (2010a) es un ejemplo de como la utilización de dos tipos de marcadores ha permitido obtener información complementaria para poder caracterizar de una forma más completa a un conjunto de poblaciones europeas. Sus resultados mostraron diferentes formas de agrupación según se utilicen marcadores neutros o funcionales. Así, los marcadores SSR mostraron un patrón geográfico en la diferenciación entre las poblaciones, mientras que la forma de agrupación con los EST-SSR estaba relacionada con las condiciones ambientales. Asimismo, el uso de SSR ha permitido la identidad genética de los principales cultivares de Europa (Martín et al. 2010b; Pereira-Lorenzo et al. 2010).

En España, un estudio de la diversidad genética en poblaciones de castaños utilizando marcadores SSR mostró un claro patrón geográfico con tres grupos diferentes de poblaciones correspondientes al noroeste, noreste y sureste de España, respectivamente (Martín et al. 2012). En particular, las poblaciones del sur de España tuvieron un alto nivel de diferenciación y diversidad genética. En esta región, los castaños se abandonaron progresivamente debido al éxodo rural ocurrido entre los años 60 y 70 y se

convirtieron en rodales "naturalizados", constituyendo en algunos casos bosques relictos (Martín et al. 2007). Hasta ahora, la diversidad adaptativa de los rodales naturalizados del sur de España no se ha evaluado utilizando marcadores funcionales. Considerando que el sur de Europa es un área particularmente afectada por el cambio climático (IPCC 2014), cabe esperar que las consecuencias de este efecto de calentamiento se manifiesten en los bosques de la cuenca mediterránea. Surge, por tanto, la necesidad de conocer las fuentes de diversidad que permitan a estas poblaciones adaptarse a las nuevas condiciones y que a la vez contribuyan a establecer futuras estrategias de conservación.

El principal objetivo de este capítulo de Tesis ha sido evaluar la variabilidad genética adaptativa en un conjunto de poblaciones de castaños del sur de España mediante marcadores EST-SSR. Con este propósito se establecieron los siguientes objetivos secundarios: 1) evaluar el polimorfismo de estos marcadores en estas poblaciones, 2) detectar una posible respuesta en el potencial adaptativo de estas poblaciones en relación con la apertura de yemas y estrés hídrico, y 3) comparar la diversidad genética obtenida en EST-SSR para estas poblaciones con la diversidad mostrada por análisis realizados previamente con marcadores neutrales por Martín et al. (2012).

Materiales y Métodos.

Material vegetal.

Se tomaron muestras de 126 árboles correspondientes a ocho poblaciones diferentes de castaño en Andalucía (Tabla 1). Siete de estas poblaciones habían sido evaluadas previamente utilizando SSR neutrales dentro de un estudio sobre diversidad genética, junto con otras poblaciones españolas (Martín et al. 2012).

Tabla 1. Poblaciones muestreadas, localización geográfica y número de árboles en cada población (NA).

Población	Provincia	NA	Longitud (N)	Latitud (O)	Altitud (m)
Santa María Trassierra	Córdoba	29	37°55'23"	4°50'51"	515
Sierra Norte	Sevilla	14	37°54'55"	5°37'45"	680
Gaucín	Málaga	16	36°32'20"	5°18'34"	730
Santa Elena	Jaén	10	38°25'04"	3°33'37"	800
Pujerra	Málaga	12	36°35'38"	5°08'37"	870
Güejar	Granada	15	37°08'58"	3°25'50"	1144
Paterna	Almería	15	37°01'26"	2°56'34"	1160
Bubión	Granada	15	36°56'46"	3°21'08"	1400

Extracción de ADN y análisis EST-SSR.

El ADN genómico se aisló a partir de 20 mg de tejido foliar liofilizado. Su extracción se llevó a cabo utilizando el método comercial DNeasy® Plant Mini Kit. Se evaluaron un conjunto de nueve EST-SSR desarrollados a partir de secuencias expresadas durante el estrés por sequía y la apertura de yemas en *Quercus robur* y *Quercus petraea* (Durand et al. 2010). Tales marcadores ya habían sido testados con éxito en poblaciones europeas de castaño (Martín et al. 2010a).

Se realizó una PCR múltiple combinando tres pares de cebadores en cada mezcla en un volumen total de 12.5 µL utilizando el kit de PCR de microsatélites Type-it (QIAGEN, Hilden, Alemania). La amplificación se llevó a cabo utilizando el siguiente programa: (1) desnaturalización inicial a 95 ° C durante 5 min; (2) 28 ciclos a 95° C durante 30 s, hibridación a 57° C durante 90 s, y elongación a 72° C durante 30 s; y (3) un paso de extensión final a 60° durante 30 minutos. Se añadieron productos de amplificación (1 µL) a 9.75 µL de Formamida Hi-Di™ y Estándar de Tamaño de LIZ GeneScan™ -500 de 0.25 µL y se separaron en un secuenciador de ADN ABI PRISM 3100. La puntuación de los alelos se realizó utilizando el software Gen Mapper.

Índices de diversidad genética dentro de las poblaciones.

Para la evaluación de la diversidad genética se emplearon los siguientes parámetros: el número de alelos por locus (A), el número medio de alelos por población (N_a), la heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e) y heterocigosidad esperada insesgada (uH_e), así como los alelos exclusivos en cada población (PA), se estimaron utilizando GeneAIEx 6 (Peakall y Smouse 2005). La riqueza alélica (A_r) promedio de los nueve loci, basada en un tamaño muestral de 10 individuos, se calculó usando FSTAT (Goudet 2001). El coeficiente de endogamia de cada población F_{IS} (Weir y Cockerham 1984) se calculó utilizando el análisis jerárquico de la varianza molecular (AMOVA) usando el programa Arlequin 3.11 (Excofier et al. 2005). La significación de cada uno de los componentes de la varianza se estimó a partir de distribuciones generadas mediante 10000 permutaciones al azar.

Análisis de la estructura de las poblaciones.

La diferenciación genética entre poblaciones se estimó mediante el estadístico F_{ST} siguiendo el método descrito por Weir y Cockerham (1984) y su análogo R_{ST} (Slatkin 1995).

Para detectar la posible estructura genética del material evaluado se empleó un método de agrupación Bayesiana implementado con el programa STRUCTURE v.2.3.4 (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 200). En este método se establece el número más probable de grupos genéticos (K) suficientemente diferenciados. Posteriormente, se asignan probabilísticamente los individuos a los distintos grupos, sin haber establecido *a priori* las frecuencias alélicas de cada uno de esos grupos. El número de grupos diferentes (K) fue confirmado mediante el método MCMC (Markov Chain Monte Carlo) por el que el programa calcula la probabilidad a posteriori (Q) de cada individuo de pertenecer a cada

uno de los citados grupos. Consideramos un umbral mínimo de 0.75 en el valor de Q (Mattioni et al. 2013). Para obtener la matriz promedio de los coeficientes de pertenencia individual de las seis ejecuciones para el valor estimado de K se utilizó el programa CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson y Rosenberg 2007). Posteriormente dichas matrices se procesaron con el programa DISTRUCT 1.1 (Rosenberg 2004), con lo que se obtuvo un gráfico de barras en el que se representa cada individuo con los coeficientes (Q) estimados de pertenencia a cada uno de los K grupos.

Resultados y discusión.

Se identificaron un total de 38 alelos diferentes en los 126 individuos con un promedio de 4.22 alelos por locus. El rango de alelos detectados fue de 3 (loci *PIE223* y *FIR030*) a 7 (locus *PIE227*) (Tabla 2).

Tabla 2. Descripción de la diversidad mostrada por los nueve marcadores en todas las poblaciones

Locus	Rango (pb)	A	Ho	He
<i>FIR030</i>	168-173	3	0.447	0.477
<i>GOT014</i>	108-116	4	0.306	0.580
<i>PIE227</i>	154-179	7	0.528	0.506
<i>PIE228</i>	177-196	5	0.658	0.629
<i>PIE233</i>	162-168	3	0.208	0.275
<i>PIE260</i>	154-168	4	0.721	0.558
<i>POR009</i>	122-140	4	0.629	0.531
<i>POR026</i>	137-148	4	0.715	0.589
<i>WAG004</i>	260-271	4	0.118	0.133
Media		4.22	0.481	0.475

A: número de alelos, *Ho*: heterocigosidad observada, *He*: heterocigosidad esperada

Cuatro de las poblaciones fueron polimórficas para todos los loci, mientras que las poblaciones de Bubión, Sierra Norte y Gaucín fueron monomórficas para el locus *WAG004* y la población de Santa Elena para el locus *PIE233*. Todas las poblaciones presentaron valores similares de diversidad genética, aunque los más bajos se detectaron

en Gaucín (en términos de Na, Ar, uHe) (Tabla 3). Dos poblaciones, Gaucín y Santa María de Trassierra, mostraron alelos exclusivos (PA). El coeficiente de endogamia (F_{IS}) se desvió significativamente de cero solo en la población de Bubión indicando desequilibrio de Hardy-Weinberg por un déficit significativo de heterocigotos.

Tabla 3. Diversidad genética dentro de las ocho poblaciones andaluzas y los coeficientes de diferenciación genética entre poblaciones.

Población	Na	Ar	PA	Ho	He	uHe	F_{IS}	Q1	Q2	F_{ST}	R_{ST}
Santa María											
	3.56	3.15	3	0.521	0.466	0.474	-0.204	0.09	0.91		
Trassierra											
Sierra Norte	3.22	3.04	0	0.529	0.465	0.482	-0.021	0.47	0.53		
Gaucín	2.78	2.57	1	0.444	0.424	0.437	-0.189	0.33	0.67		
Santa Elena	3.00	3.00	0	0.433	0.454	0.478	-0.226	0.50	0.50		
Pujerra	3.22	3.12	0	0.519	0.443	0.462	-0.206	0.77	0.23		
Güejar	3.22	3.10	0	0.481	0.509	0.527	0.075	0.83	0.17		
Paterna	3.11	2.92	0	0.437	0.508	0.526	0.056	0.85	0.15		
Bubión	3.00	2.94	0	0.489	0.533	0.552	0.251*	0.83	0.17		
Total										0.150	0.099

Na número medio de alelos por población, Ar riqueza alélica, PA Alelos exclusivos, Ho heterocigosidad observada, He heterocigosidad esperada, uHe heterocigosidad esperada insesgada, F_{IS} coeficiente de endogamia, Q1 y Q2 porcentaje de pertenencia a una población predefinida estimada por el programa STRUCTURE ($Q > 0.75$ en negrita) F_{ST} coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones según el método de Weir y Cockerham (1984), R_{ST} coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones según Slatkin (1995), * $P < 0.05$.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos en un trabajo anterior que comparó marcadores genómicos y génicos en poblaciones de castaño europeo (Martín et al. 2010a), aunque el nivel de polimorfismo y diversidad genética fue más bajo que el obtenido por Martín et al (2012) utilizando marcadores SSR en las mismas poblaciones. Niveles más bajos de polimorfismo han sido también descritos para marcadores EST-

SSR en especies del género *Quercus*, aunque las diferencias entre ambos tipos de marcadores no fueron significativas, lo cual indica que la mayoría de EST-SSR escogidos para el estudio presentaban una variación neutral (Lind y Gailing 2013).

Los coeficientes de diferenciación genética entre las ocho poblaciones fueron $F_{ST} = 0.150$ y $R_{ST} = 0.099$ (Tabla 3). De igual modo, el resultado del AMOVA indicó diferencias significativas entre las poblaciones a pesar del tamaño del área de estudio (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados AMOVA de las ocho poblaciones.

Fuente de variación	g.l.	SC	Varianza	Porcentaje
Entre poblaciones	7	4303.325	15.332	9.89%
Dentro de las poblaciones	244	34088.798	139.708	90.11%
Total	251	38393.192	155.040	

g.l. grados de libertad, *SC* suma de cuadrados

Los resultados obtenidos del programa STRUCTURE indicaron $K = 2$ como el número de clústeres más probable, separando las poblaciones en dos grupos (Fig. 1). Las poblaciones de Paterna, Güejar y Bubión pertenecen claramente al Grupo I (azul) con más del 80% de sus miembros agrupados en el mismo clúster y Pujerra con el 77% (Tabla 3). Por otro lado, Santa María de Trassierra fue la única población que perteneció al Grupo II (naranja). El resto de las poblaciones mostraron una mezcla de ambos clústeres, siendo la población de Gaucín la más similar a la población de Santa María de Trassierra ($Q_2 = 67\%$). Del mismo modo, Gaucín y Santa María de Trassierra fueron las únicas poblaciones con alelos exclusivos, considerados generalmente con potencial para responder a la selección o que tienen un significado evolutivo (Petit et al. 1998).

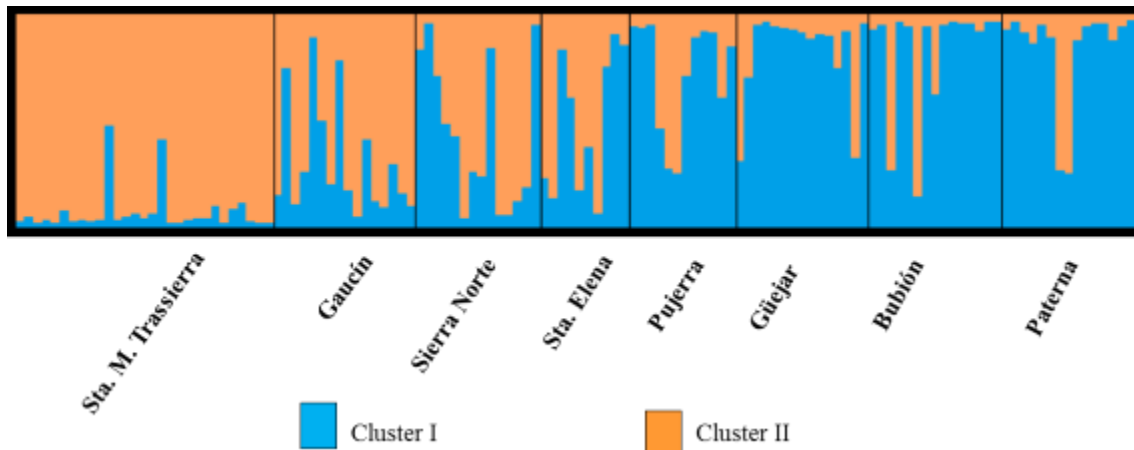


Figura 1. Estructura de las ocho poblaciones de castaño de Andalucía calculada a partir del programa STRUCTURE basado en métodos bayesianos y visualizados con el programa DISTRUCT. Cada individuo se muestra en una barra vertical y cada color representa la proporción del clúster al que pertenece.

La estructura genética obtenida con los marcadores funcionales se comparó con la mostrada para marcadores neutrales por Martín et al. (2012). Las poblaciones orientales (Bubián, Güejar y Paterna) mostraron el mismo patrón de agrupamiento con ambos tipos de marcadores. Del mismo modo, las poblaciones de Pujerra, Santa Elena y Sierra Norte mostraron un alto grado de mezcla para ambos tipos de marcadores. Sin embargo, el comportamiento de la población de Gaucín fue diferente para ambos tipos de marcadores, mostrando una gran similitud con las poblaciones andaluzas en el caso de los marcadores funcionales, y una asociación con poblaciones del noroeste de España en el caso de los marcadores neutros (Martín et al. 2012). Además, se encontraron coeficientes de diferenciación similares en ambos tipos de marcadores (0.150 frente a 0.145). Este agrupamiento similar entre la mayoría de las poblaciones independientemente del tipo de marcador empleado (EST-SSR y SSR), podría estar indicando una variación neutral, como también han descrito otros autores usando EST-SSR (Lind y Gailing 2013). Sin embargo, el comportamiento diferente de Gaucín podría

indicar una señal de adaptación para esta población, aunque sería necesario realizar más análisis con un mayor número de marcadores EST-SSR.

En conclusión, los marcadores EST-SSR utilizados en este trabajo han revelado una clara estructura genética de las poblaciones andaluzas y diferencias en la diversidad dentro de las poblaciones. Sin embargo, no se detectó señal de adaptación, probablemente debido al pequeño tamaño del área muestreada. Muestreos y análisis adicionales de la variación genética dentro y entre poblaciones podrían proporcionar una mejor comprensión sobre la adaptación de la especie e información útil para establecer futuras estrategias de conservación. Por lo tanto, destacamos la importancia de las poblaciones de Santa María de Trassierra y Gaucín, como representativas del grupo genético menos abundante que ha sido detectado con nuestros marcadores, así como por la presencia de alelos exclusivos.

CAPÍTULO II

Respuesta diferencial al ataque de carpófagos entre variedades tradicionales de Andalucía.

Cuestas MI, Martín MA, Aldebis HK, Mena JD, Martín LM, Vargas Osuna E.
Differential response among chestnut traditional varieties to the attack of *Cydia splendana* (Hübner).

Enviado para su publicación al Journal of Agricultural and Forest Entomology.

Resumen.

La producción de fruto de *Castanea sativa* (Miller) en el sur de España se lleva a cabo en plantaciones tradicionales utilizando un gran número de variedades locales diferentes. Las principales áreas de producción se encuentran en el Parque Natural de la Sierra de Aracena y Picos de Aroche (Huelva) y el Valle del Genal (Málaga). Estos sistemas agroforestales han demostrado una gran diversidad genética y representan un ejemplo de conservación *in situ*. En esta región, el castaño sufre principalmente el ataque de *Cydia splendana* (Hübner) y *Curculio elephas* (Gyllenhal), cuyas larvas se alimentan de sus frutos provocando pérdidas en la producción y la calidad de la cosecha. El objetivo de este estudio fue evaluar la existencia de una respuesta diferencial entre las variedades locales de castaño al ataque de ambos carpófagos. Para tal fin, se evaluaron árboles de las variedades más representativas de la región en diferentes fincas y localidades. En los casos en que fue necesario, los árboles se identificaron con marcadores microsatélites. La incidencia de daños, calculada mediante la Tasa de infestación (porcentaje de frutos infestados respecto del total de frutos analizados por árbol), ha mostrado que las variedades responden de manera diferente al ataque de *C. splendana* evidenciando un alto componente genético en este efecto. Sin embargo, los ataques derivados de *C. elephas* han sido minoritarios presentando una distribución agregada en la que no se aprecia ninguna tendencia por parte del fitófago a alguna variedad en concreto. Los resultados obtenidos en este estudio abren la posibilidad de utilizar esta respuesta diferencial en el control de la plaga de *C. splendana* en las variedades locales andaluzas.

Introducción.

El castaño europeo (*Castanea sativa* Miller) es una especie que ha sido cultivada principalmente para la producción de fruta y madera. Los castañares dedicados a la producción de fruto se cultivan en plantaciones donde se desarrollan variedades de origen clonal injertadas mayoritariamente en portainjertos producidos a partir de semilla (Bounous y Marinoni 2005). Muchas de estas plantaciones se establecen de acuerdo con métodos silvícolas tradicionales que utilizan variedades locales desarrolladas por los agricultores con diferentes propósitos (Conedera et al. 2004; Martín et al. 2007). En los últimos años, el desarrollo de herramientas moleculares como los marcadores microsatélites (SSR) ha permitido la identificación genética de un gran número de estas variedades en diferentes países europeos (Gobbin et al. 2007, Martín et al. 2010b, Marinoni et al. 2013). Así, en España estos marcadores han puesto de manifiesto que los sistemas tradicionales de castaño albergan una elevada diversidad genética, tanto en las variedades (Pereira-Lorenzo et al. 2001; Martín et al. 2009; Pereira-Lorenzo et al. 2011) como en los patrones sobre los que se injertan (Martín et al. 2017).

Una de las principales pérdidas económicas para los productores de castaña es el ataque de insectos carpófagos cuyas larvas viven y se alimentan en el interior del fruto (Conedera et al. 2016). Las especies más importantes que afectan a los castañares en Europa son el coleóptero *Curculio elephas* (Gyllenhal) y tres especies de lepidópteros de la Familia Tortricidae: *Cydia splendana* (Hübner), *Cydia fagiglandana* (Zeller) y *Pammene fasciana* (Linnaeus). Estos carpófagos, que pueden alcanzar el carácter de plaga, reducen significativamente tanto la calidad como la producción del fruto provocando pérdidas económicas a los agricultores (Debouzie et al. 1996; Speranza 1999; Sieber et al. 2007). Estas especies pueden afectar también a los frutos de otras especies de Fagáceas especialmente a miembros del género *Quercus* (Branco et al.

2002; Avtzis et al. 2013). El control de estas plagas se ha realizado mediante diferentes estrategias, como el uso de insecticidas (Rotundo y Rotundo 1986) o la utilización de trampas de feromonas (Den Otter et al. 1996; Delisle et al. 2005; Rotundo et al. 2010; Bengtsson et al. 2014; Jósваи et al. 2016)) con resultados muy variables.

Además de los tratamientos fitosanitarios comienza a tener interés el uso de otras medidas de control, como la utilización de variedades resistentes. Un ejemplo de esta forma de control es la desarrollada para a la avispa del castaño *Dryocosmus kuriphilus* (Yasumatsu). Este himenóptero de origen chino ha sido introducido de forma accidental en Europa recientemente y ya se ha convertido en plaga en los castañares de muchos de los países que ha colonizado (EFSA 2010). En este caso, varios estudios han demostrado la existencia de diferentes respuestas al ataque de avispa entre variedades. Esta susceptibilidad diferencial entre variedades se traduce en la existencia de variedades muy susceptibles y otras que presentan total resistencia al ataque (Dini et al. 2012; Panzavolta et al. 2012; Sartor et al. 2015). Del mismo modo, un ensayo realizado con castaño chino (*Castanea mollissima* Blume) ha mostrado la preferencia del lepidóptero *Conogethes punctiferalis* (Guenée) para la oviposición y desarrollo en ciertas variedades (Du et al. 2016). Sin embargo, en el caso del ataque de los carpófagos no se han realizado estudios hasta la fecha para conocer si existen diferencias en la susceptibilidad varietal del castaño.

La producción de fruto en Andalucía se ubica principalmente en dos zonas de interés ambiental: el Parque Natural de la Sierra de Aracena y Picos de Aroche (Huelva) y en el Valle del Genal (Málaga). Estudios previos realizados, en ambas zonas, han detectado que la mayoría de daños en la producción de fruto son causados por el lepidóptero tortricido *C. splendana* seguidos por el coleóptero curculiónido *C. elephas* (Vargas-Osuna et al. 2003; Romero 2013). El cultivo del castaño en estas zonas se lleva a cabo

en plantaciones en las que se desarrollan una mezcla de diferentes variedades locales injertadas en patrones procedentes de semilla. La diversidad genética de estos sistemas agroforestales ha sido analizada mediante marcadores moleculares lo que ha permitido caracterizar e identificar genéticamente un total de 38 variedades locales (Martín et al. 2009). En este contexto, el uso de un enfoque interdisciplinar que combina la evaluación de la incidencia de estas plagas y las herramientas de marcadores moleculares puede permitirnos establecer diferencias de respuesta al ataque y daños de estos insectos. El objetivo de este trabajo ha sido el estudio de la existencia de susceptibilidad diferencial entre variedades locales al ataque de carpófagos en las dos principales zonas de producción de castaña en Andalucía.

Material y métodos.

Material vegetal.

El material vegetal fue recolectado durante tres años en las dos zonas de estudio: Parque Natural de la Sierra de Aracena y Picos de Aroche (Huelva) y el Valle del Genal (Málaga). Se evaluaron un total de 40 árboles, incluidos en este conjunto un grupo de 18 previamente identificados por Martín et al. (2009). En 2014 se muestrearon tres árboles por variedad. En este año, las variedades estudiadas en la zona de Málaga fueron *Pilonga*, *Temprana de Jubrique* y *Tomasa*, mientras que las variedades estudiadas en Huelva fueron *Comisaria*, *Helechal*, *Planta Alájar* y *Temprana*. Las mismas variedades fueron muestreadas en 2015 y 2016, pero se añadió una nueva variedad denominada *Portuguesa* al grupo de Málaga. Además, se incrementaron el número de repeticiones utilizando cinco árboles por variedad. Los árboles elegidos en cada variedad pertenecen como mínimo a tres fincas diferentes distribuidos en diferentes municipios, como se

muestra en la Tabla 1, por lo que el diseño experimental para evaluar la susceptibilidad varietal a carpófagos fue completamente aleatorizado.

Tabla 1. Variedades locales estudiadas en Huelva y Málaga, municipios donde se localizan las fincas y número de árboles (NA) muestreados por finca y variedad durante los años 2015 y 2016.

Variedades locales	Fincas	Municipios	NA
Huelva			
<i>Comisaria</i>	Arropero	Los Marines	1
	Chaparral	Aracena	1
	Madroño Bajo	Galaroza	1
	Vicario	Fuenteheridos	2
<i>Helechal</i>	Arropero	Los Marines	1
	Madroño Bajo	Galaroza	3
	Vicario	Fuenteheridos	1
<i>Planta Alájar</i>	Arropero	Los Marines	1
	Chaparral	Aracena	2
	Matanza	Cortegana	1
	Vicario	Fuenteheridos	1
<i>Temprana</i>	Barranco de los Nogales	Cortegana	3
	Madroño Bajo	Galaroza	1
	Matanza	Cortegana	1
Málaga			
<i>Pilonga</i>	Benajarón	Jubrique	2
	Matachal	Benadalid	1
	Umbría	Jubrique	2
<i>Portuguesa</i>	Benajarón	Jubrique	2
	Cerro del Haba	Juzcar	2
	Umbría	Jubrique	1
<i>Temprana de Jubrique</i>	Benajarón	Jubrique	2
	Hoyos	Cartajima	1
	Umbría	Jubrique	2
<i>Tomasa</i>	Benajarón	Jubrique	2
	Matachal	Benadalid	2
	Umbría	Jubrique	1

Extracción de ADN y amplificación con marcadores SSR.

Para la identificación varietal, se recolectaron muestras de hojas de 22 árboles que no habían sido incluidos en la caracterización genética realizada por Martín et al. (2009).

El ADN se extrajo de 20 mg de tejido foliar liofilizado siguiendo el protocolo de Murray y Thomson (1980) con ligeras modificaciones. Se emplearon ocho microsatélites polimórficos desarrollados en *C. sativa* (Buck et al. 2003; Marinoni et al. 2003) (Tabla 2).

Tabla 2. Descripción de los ocho marcadores SSR utilizados en la identificación de las variedades.

Locus	Secuencias repetidas	Rango (pb)
<i>CsCAT1</i>	(TG) ₂₅ TA (TG) ₂₄	175-221
<i>CsCAT2</i>	(AG) ₁₆	193-233
<i>CsCAT3</i>	(AG) ₂₀	197-257
<i>CsCAT6</i>	(AC) ₂₄ AT (AC) ₄	156-195
<i>CsCAT14</i>	(CA) ₂₂	130-164
<i>CsCAT16</i>	(TC) ₂₀	124-145
<i>EMCs25</i>	(GA) ₁₂	141-192
<i>EMCs38</i>	(AG) ₃₁	233-276

La mezcla de reacción se preparó usando el kit de PCR de microsatélites Type-it (QIAGEN, Hilden, Alemania) en 12.5 µl de volumen total con una concentración de primers (cebadores) de 2 µM y 12 ng de ADN genómico. Para verificar la fiabilidad de la amplificación, los productos de amplificación de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 2%. El análisis de fragmentos fue realizado por la Unidad de Genómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba. El análisis de los datos se realizó utilizando el software Genotyper 3.7 (Applied Biosystems).

Incidencia de daños causada por carpófagos en los frutos de castaño.

El muestreo de frutos se llevó a cabo en los árboles previamente identificados que fueron marcados para su posterior localización (Fig. 1). Se recogieron veinticinco erizos por árbol para determinar los daños ocasionados por carpófagos. Las fechas de recolección tuvieron lugar a finales de Septiembre en Málaga y a mediados de Octubre en Huelva. Los frutos se abrieron manualmente en el laboratorio para verificar la presencia de larvas en su interior.



Figura 1. Árbol marcado para posteriores muestreos. Los datos de cada árbol son registrados en un croquis con su localización en coordenadas geográficas. Los frutos de cada árbol son analizados de forma separada en el laboratorio.

Las larvas encontradas se separaron inicialmente en dos categorías (larvas de tortricidos y de curculiónidos) en función de los rasgos morfológicos (Hoffman et al. 1963; Bogenschütz 1991). En los casos en que las larvas ya hubieran abandonado el fruto, la identificación del carpófago se llevó a cabo por la observación de las características de los daños: tipo de galería abierta por la larva, textura y color del excremento en la

galería y forma del orificio de salida (Fig. 2). La incidencia de daños se determinó mediante la Tasa de infestación (Ti) calculada como: porcentaje de frutos infestados respecto del número total de frutos analizados en cada árbol.



Figura 2. Fruto de castaño con larva de *Cydia splendana* y orificio de salida. Restos de excrementos con forma granular procedentes de una larva de *Cydia splendana*.

Análisis estadístico

Las medias obtenidas de la Tasa de infestación de cada variedad se sometieron a análisis de la varianza. Antes de ejecutar dicho análisis, se comprobaron todos los supuestos requeridos mediante las pruebas de Levene para la homogeneidad de varianzas y de Shapiro-Wilk para la comprobación de normalidad. Para lograr la normalidad de los datos se llevó a cabo la transformación angular ($\arcsen(\sqrt{x/100})$).

Para comprobar los efectos de los factores Año y Zona en la variable dependiente Ti, se llevaron a cabo dos análisis. Primero se realizó un ANOVA factorial por cada zona para comparar los factores principales de Variedad y Año, así como el factor interacción (Variedad x Año). Seguidamente, para descartar que el efecto zona sea el factor principal que influye en la Ti de las variedades se realizó un ANOVA jerárquico para cada año. Teniendo en cuenta que las variedades son diferentes en cada zona se

analizaron los efectos principales del análisis de la varianza en el que Zona es el factor principal y el factor Variedad está anidado a Zona.

Finalmente, se utilizó un ANOVA de una vía para determinar las diferencias significativas entre las variedades para la variable Ti. Este análisis se llevó a cabo con los datos obtenidos para cada año y zona. En los casos donde la prueba F indicó diferencias significativas entre las medias se realizó la prueba *post hoc* de Mínima Diferencia Significativa (MSD o LSD) con $\alpha = 0.05$. En el caso de la Ti para *C. elephas*, ante el bajo número de árboles afectados, únicamente se realizó el ANOVA de una vía con los datos de Huelva en 2015. Todos los análisis se realizaron utilizando la versión del software estadístico SPSS 15.0.

Para saber qué parte de la variación se debe a los efectos del genotipo (variedad), se estimó la heredabilidad en sentido amplio (H) utilizando las varianzas genéticas y fenotípicas obtenidas mediante el análisis de ANOVA equilibrado de un factor (Allard 1960).

Resultados.

El uso de marcadores SSR nos ha permitido caracterizar a 22 nuevos árboles que completaron el total de 40 utilizados para este estudio. Según muestran los resultados, *C. splendana* y *C. elephas* son las dos especies que han causado daños en los frutos, siendo las larvas del tortricido las de mayor presencia con un número muy superior de árboles afectados. El porcentaje medio de árboles infestados por *C. splendana* a lo largo del experimento fue del 92.19% en Huelva y el 83.33% en Málaga. Por el contrario, los daños por *C. elephas* afectaron solo al 29.69% y 11.11% de los árboles muestreados en Huelva y Málaga, respectivamente.

La mayoría de castañas infestadas por *C. splendana* contienen una única larva en su interior. Las larvas aparecen de forma solitaria en un 96% de los frutos atacados por este tortricido. Sin embargo, en el 63% de los casos en que la infestación ocurre por *C. elephas* se encontró más de una larva en el interior del mismo fruto. Por otro lado, solo el 0.08% de todos los frutos analizados fueron coinfectados por ambas especies.

Incidencia de Curculio elephas.

El valor medio de la Tasa de infestación de los frutos en los árboles afectados por *C. elephas* a lo largo de los tres años fueron de 4.11% y el 10.10% en Huelva y Málaga, respectivamente. Cabe destacar el efecto del árbol MA-62 cuyo valor, muy superior respecto al conjunto de datos observados, ha hecho incrementar la media de Ti en el caso de Málaga (Tabla 3). Solo dos cultivares fueron afectados por el curculiónido en la zona de Málaga (*Temprana de Jubrique* y *Tomasa*), por lo que en esta zona no se realizó ningún análisis estadístico para este caso. Sin embargo, en la zona de Huelva todos los cultivares se vieron afectados en el año 2015. Los resultados del ANOVA de una vía para ese año no mostraron diferencias significativas entre los cultivares ($F_{(3,8)}=2.21$, $p=0.16$).

Las observaciones en el campo revelaron una distribución agregada de los daños, de forma que el ataque ocurre en árboles muy próximos o incluso se repite en los mismos árboles a lo largo de varios años.

Tabla 3. Tasa de infestación (Ti) de los árboles afectados por *Curculio elephas* en Huelva y Málaga.

Año	Huelva		Ti (%)	Málaga		Ti (%)
	Árbol	Variedad		Árbol	Variedad	
2014	HU-64	<i>Comisaria</i>	4.0	MA-62	<i>Tomasa</i>	39.7
	HU-82	<i>Helechal</i>	4.0			
	HU-65	<i>Helechal</i>	1.3			
	HU-81	<i>Planta Alájar</i>	2.7			
2015	HU-64	<i>Comisaria</i>	1.0	MA-124	<i>Temprana Jubrique</i>	6.3
	HU-80	<i>Comisaria</i>	2.1	MA-125	<i>Temprana Jubrique</i>	5.0
	HU-82	<i>Helechal</i>	3.6	MA-61	<i>Tomasa</i>	2.2
	HU-107	<i>Helechal</i>	4.0	MA-128	<i>Tomasa</i>	5.6
	HU-108	<i>Helechal</i>	3.9			
	HU-109	<i>Helechal</i>	12.8			
	HU-111	<i>Helechal</i>	8.6			
	HU-03	<i>Planta Alájar</i>	1.2			
	HU-66	<i>Planta Alájar</i>	1.4			
	HU-112	<i>Planta Alájar</i>	2.7			
	HU-33	<i>Temprana</i>	1.3			
	HU-113	<i>Temprana</i>	6.3			
	2016	HU-107	<i>Helechal</i>	11.5	MA-137	<i>Temprana Jubrique</i>
HU-108		<i>Helechal</i>	1.4			
Media			4.1			10.1

Nota: Tasa de infestación calculada como porcentaje de frutos infestados respecto del número total de frutos analizados en cada árbol.

Incidencia de Cydia splendana.

En la Figura 3 se representa la Tasa de infestación de cada variedad en las dos zonas de estudio. Los resultados del ANOVA factorial han mostrado que el factor interacción (Variedad x Año) no ha sido significativo ni en Huelva ni en Málaga (Tabla 4); lo que implica que la diferencia de medias entre las variedades es independientemente de los años. El factor Variedad mostró diferencias significativas entre sus medias también en ambas zonas. Sin embargo, el factor Año solo mostró diferencias significativas en

Huelva, siendo la Tasa de infestación del año 2016 significativamente inferior a las de los años 2014 y 2015. Por el contrario, la Tasa de infestación en Málaga se ha mantenido constantemente baja durante los tres años del trabajo por lo que no se observaron diferencias significativas entre años (Tabla 4)

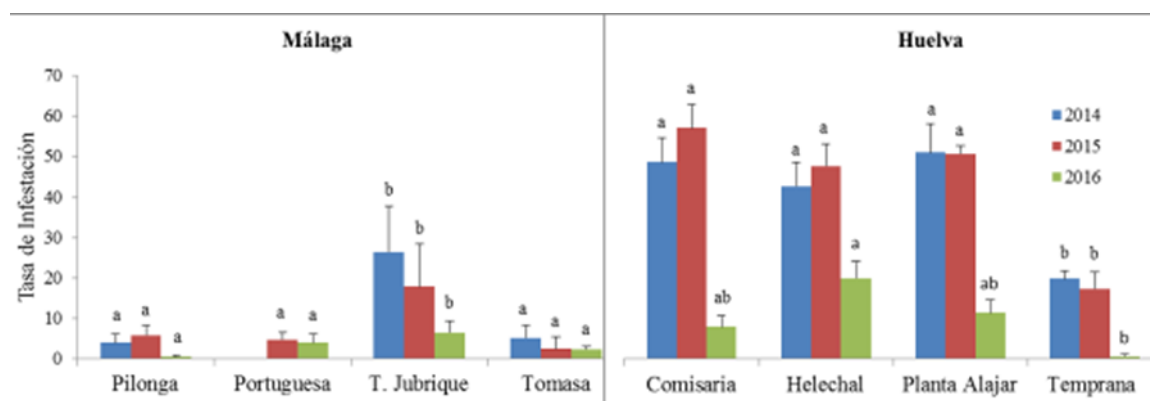


Figura 3. Valores medios (\pm SE) de la Tasa de infestación de *Cydia splendana* en diferentes variedades en las zonas de Huelva y Málaga durante los tres años del trabajo. Las barras coronadas con la misma letra en cada zona indican que no difieren significativamente entre sí de acuerdo con la prueba de comparación de LSD ($p \leq 0.05$)

Tabla 4 Resultados del ANOVA factorial para la determinación de los efectos de Año, Variedad y la interacción Año x Variedad en las dos zonas por separado

Zona	Fuente de variación	g.l.	F
Huelva	Año	2	44.53***
	Variedad	3	12.77**
	Año x Variedad	6	1.94
	Error residual	40	
Málaga	Año	2	2.26
	Variedad	3	6.77*
	Año x Variedad	5	2.16
	Error residual	38	

* $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$, g.l. grados de libertad

Los resultados del ANOVA jerárquico mostró diferencias significativas entre Ti para el factor principal Zona en 2014 y 2015 (Tabla 5), siendo Huelva la zona más afectada (Fig. 3).

Tabla 5. Resultados del ANOVA jerarquizado para determinar el efecto de la Zona como factor principal y la Variedad como factor anidado a Zona (Variedad(Zona)) en cada año por separado

Año	Fuente de variación	g.l.	F
2014	Zona	1	8.76*
	Variedad _(Zona)	5	7.79**
	Error residual	14	
2015	Zona	1	15.52**
	Variedad _(Zona)	6	10.89***
	Error residual	32	
2016	Zona	1	1.81
	Variedad _(Zona)	6	6.54***
	Error residual	32	

*p< .05, **p< .01, ***p<.001, g.l. grados de libertad

La menor Tasa de infestación, que se alcanzó de forma generalizada en el año 2016, no mostró diferencias significativas entre zonas. Las diferencias entre variedades dentro de cada zona resultaron altamente significativas en los tres años analizados. Los resultados del ANOVA de una vía han revelado que el efecto Variedad sobre la Tasa de infestación provocada por *C. splendana* fue significativo en todos los casos, excepto en Málaga 2016 (Tabla 6). La diferencia entre las medias de las variedades se mantiene constante en los casos en que la significación del ANOVA permitió el análisis *post hoc*. Esta comparación de medias mostró que *Temprana* presentó menor Tasa de infestación que las variedades *Comisaria*, *Helechal* y *Planta Alájar* en Huelva durante los tres años de muestreo (Fig. 3), mientras que en Málaga *Temprana* de Jubrique fue la variedad que mostró mayor nivel de ataque por *C. splendana* (Fig. 3). Los valores de heredabilidad variaron de 0.31 a 0.74, obteniendo valores más altos en Huelva que en Málaga.

Tabla 6. Resultados del ANOVA de una vía para el efecto del factor Variedad en cada zona y año. Heredabilidad genotípica (H)

Zona	Año	Fuente de variación	g.l.	F	H
Huelva	2014	Variedad	3	9.01**	0.70
		Error residual	8		
	2015	Variedad	3	15.26***	0.69
		Error residual	16		
	2016	Variedad	3	8.77**	0.74
		Error residual	16		
Málaga	2014	Variedad	2	7.59*	0.54
		Error residual	6		
	2015	Variedad	3	6.41**	0.54
		Error residual	16		
	2016	Variedad	3	3.13	0.31
		Error residual	16		

*p< .05, **p< .01, ***p< .001, g.l. grados de libertad

Discusión

La utilización de los marcadores microsatélites, como técnica para la diferenciación de genotipos, se ha mostrado especialmente útil para el estudio de campo en situaciones habituales en los castañares del sur de España que están constituidos por una mezcla de variedades en una misma finca. Este resultado debe considerarse relevante debido a las dificultades para obtener información sobre este tipo de materiales en diseños *ad hoc*.

C. splendana es la plaga principal de carpófagos que afecta a los castañares dedicados a la producción de fruto en el sur de España, coincidiendo con los datos obtenidos en estudios anteriores (Vargas-Osuna et al. 2003; Torres-Vila et al. 2008; Romero 2013).

El bajo número de castaños afectados por *C. elephas* solo permitió analizar las diferencias varietales en Huelva en el 2015, en donde a pesar de contar con variedades y árboles suficientes no se encontró diferencia intervarietal en los niveles de infestación.

Estos resultados contrastan con los obtenidos por Sieber et al. (2007) donde sí se encontraron diferencias entre variedades locales de *C. sativa* al ataque de *C. elephas*

atribuibles a diferencias fenológicas y morfológicas del fruto. Por otro lado, los daños causados por *C. elephas* mostraron una distribución agregada. Esto podría deberse a la baja movilidad de la hembra del curculiónido que generalmente deposita huevos en el mismo árbol donde emergió como adulto (Desouhant 1998; Sieber et al. 2007). Un comportamiento similar ha sido previamente informado por Soria et al. (1995) en encina.

La observación de los frutos infestados ha revelado la presencia de una sola larva en la mayoría de los casos de castañas con *C. splendana*, lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos en estudios anteriores (Bovey et al. 1975, Debouzie et al. 1996). Por el contrario, más del 63% de los frutos infestados por *C. elephas* presentaron más de una larva en su interior. Esto podría explicarse por el hecho de que las hembras de esta especie pueden depositar uno o varios huevos por fruto, tanto en castaño (Debouzie et al. 1996) como en algunas especies del género *Quercus* (Soria et al. 1995). Además, diferentes hembras del coleóptero pueden ovipositar y desarrollar sus larvas en una misma castaña (Debouzie et al. 1996; Desouhant et al. 1998). El porcentaje extremadamente bajo de frutos co-infestados por ambas especies (0.08%) sería consecuencia de una discriminación interespecífica entre las dos especies de insectos, como ha sido puesta de manifiesto por Debouzie et al. (1996). Según estos autores, se trata de una competencia asimétrica en la que la presencia de una larva de *C. splendana* en un fruto inhibe la puesta de huevos por la hembra de *C. elephas*, sin embargo la presencia de las larvas del coleóptero en un fruto no influye en la entrada de una larva del lepidóptero en el mismo.

En cuanto al ataque de *C. splendana*, hubo respuesta diferencial entre las variedades evaluadas. Las diferencias encontradas en la Tasa de infestación se mantuvieron constantes durante los tres años. El componente genético de este efecto se evidencia,

además, por los altos valores de heredabilidad. Es necesario avanzar en futuros estudios sobre los factores y mecanismos biológicos implicados en la diferencia de susceptibilidad a *C. splendana*. En otras plagas de castaño se han descrito implicaciones biológicas relacionadas con la susceptibilidad intervarietal. Así, por ejemplo, las diferencias en la composición y proporción de compuestos volátiles entre los cultivares chinos producen una respuesta en la oviposición de las hembras del lepidóptero *C. punctiferalis* (Du et al. 2016). Del mismo modo, Dini et al. (2012) han demostrado la existencia de una respuesta hipersensible a *D. kuriphilus* en el cultivar *Bouche de Bétizac*.

En nuestro estudio, las diferencias intervarietales en la susceptibilidad a *C. splendana* han demostrado que en Huelva la variedad *Temprana* es la menos susceptible, mientras que *Temprana de Jubrique* es la más afectada en Málaga. Es necesario señalar que el término "Temprana" que aparece en el nombre común de ambas variedades se refiere a la maduración temprana del fruto. Sin embargo, se desconocen los mecanismos biológicos involucrados en esta susceptibilidad diferencial.

Cabe destacar las diferencias entre zonas, en las que se observa una mayor incidencia de los carpófagos en Huelva respecto a Málaga, tal como se ha señalado también en estudios anteriores (Romero 2013). Esto podría deberse a la mayor presencia en Huelva de especies del género *Quercus*, que al ser también plantas hospedadoras de este mismo carpófago, favorecería su incremento poblacional (Soria et al. 1995; Bonal y Muñoz 2008; Jiménez-Pino 2011).

Conclusiones.

El carpófago *C. splendana* representa la mayor plaga que afecta a los frutos en las dos principales zonas productoras de castaña en Andalucía. Se ha observado una respuesta

diferencial entre variedades en la susceptibilidad a *C. splendana*. Sin embargo esta misma respuesta no ha sido registrada en *C. elephas* mostrando una distribución agregada por árboles cercanos que predominaría sobre posibles preferencia por determinadas variedades. Los resultados obtenidos abren la posibilidad de utilizar esta respuesta diferencial en el control de *C. splendana*. Además, consideramos que es necesario realizar estudios complementarios para identificar los caracteres biológicos de los cultivares que pueden ser responsables de estas diferencias en la incidencia de *C. splendana*. Así mismo, será conveniente ampliar el análisis al resto de las variedades locales de castaño que se cultivan en Andalucía.

CAPÍTULO III

Respuesta de variedades tradicionales del castaño en Andalucía al ataque de *Dryocosmus kuriphilus* (Yasumatsu).

Comunicación oral:

Mena JD, Cuestas MI, Martín MA, Aldebis HK, Vargas-Osuna E (2015) *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera, Cynipidae) en poblaciones de castaños de la provincia de Málaga. IX CONGRESO NACIONAL DE ENTOMOLOGÍA APLICADA. Valencia.

Resumen.

La avispa del castaño (*Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu) es un himenóptero de la familia Cynipidae que se considera la plaga más importante a nivel global del género *Castanea*. Este cinípido deposita sus huevos en el interior de las yemas vegetativas induciendo la formación de agallas en los nuevos brotes, lo que disminuye el crecimiento del brote y por tanto la producción de frutos. *D. kuriphilus* fue detectada por primera vez en Andalucía en la provincia de Málaga en el año 2014. Se registró un primer foco en castañares naturalizados de origen sexual y más tarde en plantaciones donde se cultivan variedades clonales para obtención de fruto. El objetivo de este trabajo fue evaluar los primeros daños producidos en las variedades de castaño en Málaga y determinar, mediante la tipología de las agallas y el Índice de infestación de éstas, si existe variabilidad en los niveles de ataque en algunas de las variedades afectadas hasta el momento. No se han observado diferencias significativas en el análisis cuantitativo del Índice de infestación entre las cinco variedades estudiadas. Sin embargo se han encontrado diferencias cualitativas en el porcentaje de tipos de agalla que presenta cada variedad. Estas diferencias podrían ser indicadoras de diferentes grado de susceptibilidad a *D. kuriphilus*. Dado el corto periodo de tiempo que ha transcurrido desde la llegada de la avispa a la zona, esta hipótesis debería ser confirmada con futuros estudios que determinen los niveles de incidencia y los efectos del fitófago a lo largo del tiempo e incluyan a más variedades afectadas.

Introducción.

El género *Castanea* está representado por 13 especies, nativas de las zonas templadas de Asia, el sur de Europa y el este de los Estados Unidos. Algunas de ellas son de especial interés para el hombre por su madera y sus frutos contribuyendo a las economías rurales de sus países de origen. La influencia humana en varias de estas especies se ve incrementada por su cultivo desde tiempos remotos (Conedera et al. 2004). El cultivo de especies vegetales, en general, origina un intercambio y un flujo de material entre agricultores que da lugar a un notable incremento de la diversidad. Sin embargo, este trasiego de recursos genéticos lleva implicado la propagación de plagas y enfermedades muchas veces a escala global. Un ejemplo de ello es el caso del castaño americano *Castanea dentata* (Marshall) La introducción accidental desde Asia del hongo *Cryphonectria parasítica* (Murril), causante de la enfermedad del chancro, redujo su posición de especie dominante en los ecosistemas forestales del este de Estados Unidos eliminando casi la totalidad de individuos adultos en un plazo de 50 años (Anagnostakis 2001).

Uno de los insectos exóticos que de forma accidental ha invadido recientemente los castaños europeos es la avispa *Dryocosmus kuriphilus* (Yasumatsu) (Himenoptera; Cynipidae). Esta avispa deposita los huevos en el interior de las yemas vegetativas y también florales e induce en los brotes la formación de agallas, en cuyo interior se desarrollan las larvas. La presencia de las agallas interrumpe el crecimiento de los brotes pudiendo causar la muerte del árbol en casos extremos (Payne et al. 1983; Kato e Hijii 1993; Rieske 2007; Battisti et al. 2014; Sartor et al. 2015).

Originaria de China, donde parasita principalmente a *C. mollissima* Blume, fue introducida de forma accidental en otras regiones de Asia y Norte América convirtiéndose en una plaga que afectaba también a otras especies del género *Castanea*

(Payne et al. 1983; Moriya et al. 2003; Rieske 2007). Finalmente la especie se detecta en Europa por primera vez en el noroeste italiano en el año 2002 (Brussino et al. 2002) atacando a *C. sativa* y extendiéndose a otros países limítrofes con presencia de castaño pocos años después (EPPO 2005).

Su reproducción partenogenética, la dificultad de observar síntomas en los árboles afectados antes de que se desarrolle la agalla, la falta de enemigos naturales y la disponibilidad de la planta huésped, han sido otros factores determinantes de que este insecto haya alcanzado el nivel de plaga en Europa. En consecuencia, la Comisión Europea solicitó al Panel de Sanidad Vegetal (Panel on Plant Health) que emitiera un dictamen científico sobre el riesgo que representaba *D. kuriphilus* para el territorio de la UE e identificar y evaluar las opciones de gestión de riesgos. Entre las opciones de manejo que fueron identificadas para reducir la magnitud del impacto de la avispa están el control biológico y la búsqueda de variedades vegetales resistentes (EFSA 2010).

Respecto al control biológico de la plaga, se ha observado la existencia de comunidades de parasitoides autóctonos que interaccionan con la avispa del castaño en las zonas colonizadas por ésta. *D. kuriphilus* es el único cinípido que desarrolla agallas en el género *Castanea* en el mundo. Sin embargo, algunos de los parasitoides de otros cinípidos que causan agallas en el género *Quercus* también son capaces de detectar y explotar las agallas de la avispa del castaño en un corto periodo de tiempo (Murakami 1981; Ôtake et al. 1982; Cooper y Rieske 2007, Aebi et al. 2006; Quacchia et al. 2008). Esta opción de control natural de la población de la avispa está limitada por los bajos niveles de parasitación de las agallas por parte de los parasitoides autóctonos. La baja parasitación parece ser común a todos los países variando desde el 0.5% al 2% (Aebi et al. 2006; Gibbs et al. 2011), con la excepción del 32% en algunas regiones de Italia

(Santi y Maini 2011). La alternativa más exitosa hasta la fecha, en cuanto a control biológico, ha sido la introducción de *Torymus sinensis* (Kamijo). Este himenóptero nativo de China, que parasita las larvas de la avispa del castaño, fue seleccionado por presentar una alta especificidad por *D. kuriphilus* y una fenología coincidente con éste (Moriya 2003).

El uso de variedades de castaño resistentes a la avispa en Japón resultó en un principio muy efectivo. Sin embargo, la especie volvió a aumentar incluso en variedades consideradas resistentes tras 20 años debido al desarrollo de un nuevo haplotipo de *D. kuriphilus* (Moriya 2003). Aun así, la búsqueda de resistencia ha sido desarrollada también en Europa tras la invasión por la avispa. Diversos trabajos han determinado una susceptibilidad varietal diferencial encontrando cultivares muy susceptibles y otros que son resistentes (Dini et al. 2012; Panzavolta et al. 2012; Sartor et al. 2015). En el caso de la variedad resistente *Bouche de Bétizac* se han reconocido los mecanismos por los que una respuesta hipersensible evita que las yemas atacadas por la avispa generen agallas (Dini et al. 2012).

El primer aviso de este cinípido en España se registra en Cataluña en el año 2012 (Pujade-Villar et al. 2013). Desde entonces, la avispa se ha ido extendiendo en poco tiempo por Cantabria, el País Vasco, Galicia y Andalucía (Nieves-Adrey y Gil-Tapetado 2017). En el año 2014 se registra por primera vez en la provincia de Málaga (Junta de Andalucía 2017). El primer foco es detectado en una población de castaños de origen sexual situada en la localidad de Ojén (Comarca Sierra de las Nieves). Las primeras medidas de control consistieron en podas masivas y quema de ramas afectadas. Al siguiente año, la avispa comenzó a afectar a los castaños de origen clonal que se cultivan en la comarca cercana del Valle del Genal. Estos castaños son sistemas agroforestales que soportan una gran diversidad genética gracias a la presencia de

numerosas variedades locales (Martín et al. 2009). La alarma creada entre los productores de fruto, hizo a las administraciones tomar medidas excepcionales. Entre estas medidas se han llevado a cabo sueltas controladas de *T. sinensis* en castañares de pequeña extensión de zonas aisladas y sueltas inoculativas al aparecer los primeros focos en las variedades productoras de fruto. El efecto de las sueltas está siendo evaluado para observar tanto la adaptación de este parasitoide en estas zonas como por su posible impacto en la fauna autóctona (IFAPA 2017).

Con tales antecedentes, el objetivo de este estudio es evaluar los primeros daños producidos en las variedades afectadas por *D. kuriphilus* en el Sur de España y determinar, mediante la tipología de las agallas y el Índice de infestación de éstas, si existe diversidad en los niveles de ataque de la avisilla en algunas de las variedades afectadas hasta el momento.

Materiales y métodos.

Material vegetal para la identificación varietal.

Se muestrearon un total de 22 castaños injertados que mostraban agallas producidas por la avisilla. Se recogieron muestras de hoja de cada uno de los árboles para llevar a cabo su posterior identificación varietal. Estos árboles se encuentran en diferentes fincas de tres localidades (Cartajima, Júzcar y Ojén) de Málaga donde la avisilla había sido detectada previamente por los agricultores. Los árboles escogidos para este estudio pertenecen a algunas de las variedades más representativas de la zona: *Gallega*, *Pilonga*, *Portuguesa* y *Temprana de Jubrique*.

La extracción de ADN y caracterización mediante microsatélites.

Para la identificación varietal, se ha analizado el ADN de cada individuo con marcadores microsatélites (SSRs, simple sequence repeats). El perfil genético de cada individuo se ha cotejado con el de las variedades ya identificadas en la región por Martín et al. (2009). El ADN se extrajo de 20 mg de tejido foliar liofilizado siguiendo el protocolo de Murray y Thomson (1980) con ligeras modificaciones. La identificación varietal se realizó utilizando un conjunto de ocho microsatélites polimórficos desarrollados en *C. sativa* (Buck et al. 2003; Marinoni et al. 2003). La mezcla de reacción se preparó usando el kit de PCR Type-it (QIAGEN, Hilden, Alemania) en 12.5 μ l de volumen total con una concentración de cebadores de 2 μ M y 12 ng de ADN genómico. Para verificar la fiabilidad de la amplificación, los productos de amplificación de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 2%. El análisis de fragmentos fue realizado por la Unidad de Genómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba. El análisis de los datos se realizó utilizando el software Genotyper 3.7 (Applied Biosystems).

Muestreo y análisis de las agallas.

El muestreo de las agallas tuvo lugar en los meses de abril, mayo y junio de 2016. En cada árbol infestado se cortaron diez brotes, de unos 10 cm de largo con presencia de un número variable de agallas, distribuidos por todo el perímetro del árbol. Una vez en laboratorio, se anotaron los códigos de árbol, brote y agalla que iba a ser analizada. Un total de 308 agallas fueron analizadas. El primer paso fue una observación externa de cada agalla que permitiera su tipificación. Las agallas fueron adjudicadas a un tipo concreto de los previamente descritos por Mena et al. (2015): basal simple (B1), basal polimórfica (B2), de hoja (H) y de peciolo (P), según su morfología y localización.

- Agalla Basal Simple (B1): Son aquellas agallas que se localizan en la base del brote del castaño, e impiden el desarrollo del mismo (Fig. 1). Habitualmente se identifican por la presencia de un penacho de hojas irregulares de un menor tamaño que las hojas libres de daño, que aparece en la parte superior de la agalla. También se caracterizan por la presencia de estípulas en su perímetro con un tamaño disminuido, en comparación a las estípulas de los brotes sanos. Su forma tiende a ser globosa con distintos tamaños generalmente no más grande de 20 mm de diámetro, con hasta 25 mm de longitud. El brote de temporada queda contenido en la agalla diferenciándose únicamente algunas hojas, por lo que este tipo de agalla ocasiona daños principalmente estructurales y desequilibrios de la copa del castaño. Además, inducen pérdidas de biomasa verde que hace disminuir la capacidad fotosintética del castaño, y con la presencia continuada de agallas de un año a otro provoca un aumento de la proporción de biomasa seca.
- Agalla Basal Polimórfica (B2). Son aquellas agallas que se localizan en la base del brote del castaño, e impiden el desarrollo del mismo con la particularidad de presentar un aspecto tumoral donde se distinguen numerosos lóculos (Fig. 1). Habitualmente presentan hojas disgregadas por encima y debajo de dichos lóculos, y en menor tamaño y número que las de tipo “B1”. Su forma tiende a ser globosa e irregular con distintos tamaños, no más grande de 35 mm de diámetro, con hasta 25 mm de longitud. El brote de temporada queda contenido en las agallas y no hay diferenciación de hojas. Los daños inducidos por este tipo de agallas son semejantes a los de la agalla basal simple, con la particularidad de que la reducción de capacidad fotosintética es más intensa y potencialmente representa un mayor aporte de individuos del fitófago.

- Agalla de Hoja (H). Son aquellas agallas que se localizan en las hojas ensanchando su nervio central a diferentes alturas del mismo (Fig. 1). Generalmente adoptan una forma globosa, achatada por el haz de la hoja, originando en ella un plegamiento del tejido en forma de acordeón que es más pronunciado en la etapa final de desarrollo de la agalla en respuesta a la tensión generada en los tejidos. Su tamaño puede variar en función de la denominación varietal del castaño, situándose entre los 10- 20 mm de diámetro y 20 -35 mm de largo.

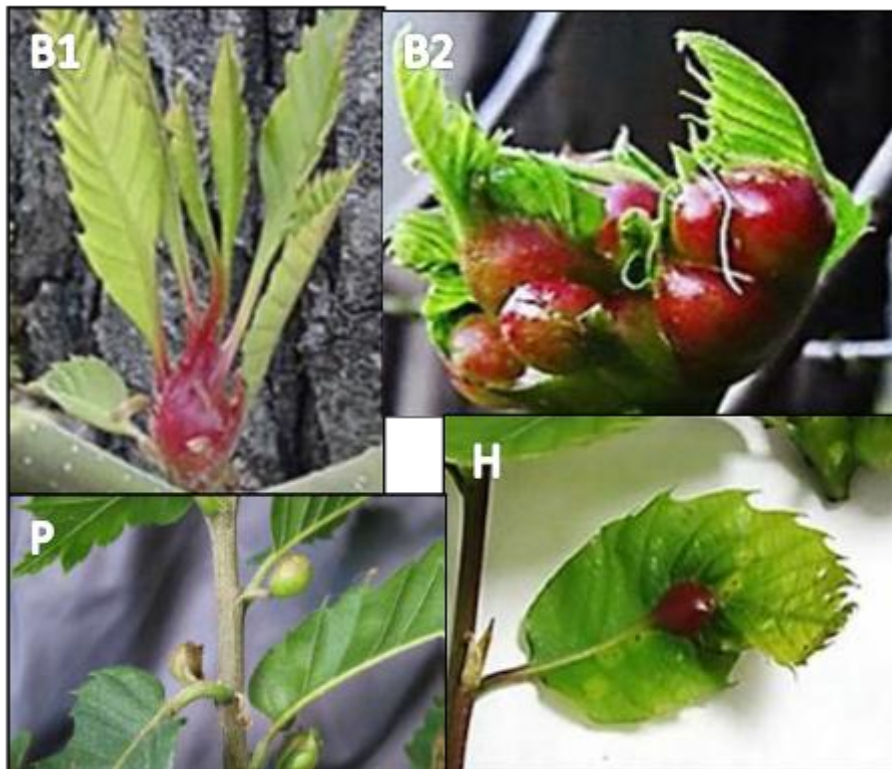


Figura 1. Tipos de agalla según la clasificación de Mena et al. (2015). B1: agalla basal simple, B2: agalla basal polimórfica, H: agalla de hoja, P: agalla de peciolo.

- Agallas de Peciolo y Estipulas (P). Son aquellas agallas que se localizan en el peciolo de las hojas e inserción de la hoja en el tallo (Fig. 1). Además, dentro de este grupo se encuentran las agallas de estípulas, que habitualmente acompañan a las agallas de peciolo en el mismo brote afectado. Las formas que adoptan las

agallas de peciolo son arriñonadas por la inserción del tallo, de donde emerge una hoja de tamaño reducido, mientras que para el caso de las agallas de estípula adoptan formas de perlas, diferenciándose algunas veces los márgenes de la estípula en sus laterales. Se caracterizan por su menor tamaño en comparación al resto de agallas, variando en función de la denominación varietal del castaño entre 10-20 mm.

Una vez caracterizadas las agallas, se determinaron los porcentajes de cada tipo para cada variedad por separado. Seguidamente, las agallas fueron abiertas con bisturí para determinar el número de celdas por agalla y observar bajo microscopio estereoscópico la presencia de larvas o pupas de *D. kuriphilus* en su interior, lo que nos permitió calcular el Índice de infestación (número medio de celdas/agalla) de cada árbol, variedad y tipo de agalla.

Análisis estadístico.

Para comprobar si existían diferencias entre Índice de infestación de los cuatro tipos de agallas (B1, B2, H y P), hubo que llevar a cabo la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ante la falta de normalidad de los datos y homogeneidad de las varianzas. Cuando se encontraron diferencias significativas entre los distintos tipos de agalla, las comparaciones múltiples a posteriori se realizaron según el método de Dunn con el programa Statistix v 10.

La comparación del Índice de infestación entre las variedades se realizó mediante el ANOVA de una vía. Para determinar si hubo diferencias entre variedades en los porcentajes de cada tipo de agalla, se hizo una prueba chi-cuadrado de homogeneidad, eligiendo como referencia los valores de la variedad *Pilonga*, por ser ésta la predominante en la zona de estudio.

Resultados.

El uso de marcadores SSR ha permitido la identificación de los 22 árboles gracias a la comparación de su perfil genético con el perfil varietal aportado por Martín et al. (2009). Los cuatro tipos de agallas (B1, B2, H y P) descritas anteriormente por Mena et al. (2015) han sido encontrados en el total de las 308 agallas analizadas. El menor porcentaje correspondió a las agallas de tipo P con un 18.88% del total de agallas analizadas, mientras que las agallas de tipo hoja (H) fueron las más numerosas con un 37.66% de presencia.

Índice de infestación de los tipos de agalla.

El test de Kruskal-Wallis mostró que existen diferencias muy significativas ($X^2=85.52$ g.l.=3, $p<0.0001$) entre el Índice de infestación de los cuatro tipos de agalla (Tabla 1). Los análisis *post hoc* mostraron que las agallas basales B1 y B2 presentan un mayor Índice de Infestación (3.50 y 3.84 celdas/agalla respectivamente) que las agallas de hoja H y peciolo P (2.19 y 1.84 celdas/agalla respectivamente). La media total del Índice de infestación fue de 2.78 celdas/agalla.

Tipos de agalla presentes en cada variedad.

El porcentaje de cada tipo de agalla en las diferentes variedades se puede observar en la Figura 2. Todas las variedades presentaron los cuatro tipos de agallas excepto la variedad *Portuguesa* que no presentó agallas de tipo B2. El mayor porcentaje de agallas de tipo B1 lo presentó *Portuguesa* con un 45.7% del total de agallas de este tipo. Las agallas de tipo B2 fueron mayoritarias en la variedad *Pilonga* con 31.6% del total de agallas de este tipo.

Tabla 1. Valores medios del contenido de cada tipo de agalla, número máximo de celdas presentes en cada agalla y el porcentaje de cada tipo respecto al total de agallas analizadas

Tipo agalla	Nº agallas	Nº medio celdas/agalla	Nº máximo de celdas	Porcentaje del total
B1	72	3.50 a ± 1.39	8	23.38
B2	64	3.84 a ± 1.92	11	20.78
H	116	2.19 b ± 1.21	7	37.66
P	56	1.84 b ± 1.21	6	18.88
Total	308	2.78 ± 1.63	11	100

Medias seguidas de la misma letra en cada tipo indica que no hay diferencias significativas ($p = 0.05$). Test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Los valores seguidos de \pm pertenecen a la desviación estándar de la media. *B1* agalla basal simple, *B2* agalla basal polimórfica, *H* agalla de hoja, *P* agalla de peciolo o estipula.

La variedad *Temprana de Jubrique* fue la que presentó mayor proporción de agallas H con un 58.1% del total de este tipo de agalla y además fue la que menor proporción de agallas tipo B1 y B2 presentó con valores de 12.9% y 6.5%, respectivamente (Fig. 2).

Los resultados de la comparación estadística entre *Pilonga* y el resto de variedades con respecto a al porcentaje de cada tipo de agalla mostró los siguientes resultados (Fig. 2):

I) Hubo una mayor proporción de agallas tipo B1 en las variedades *Gallega* y *Portuguesa* con respecto a la variedad *Pilonga*; II) Todas las variedades mostraron unos porcentajes de agallas tipo B2 significativamente menores que la variedad *Pilonga*; III)

Las agallas de tipo H mostraron una proporción significativamente mayor con respecto a *Pilonga* solo en la variedad *Temprana de Jubrique*; IV) La proporción de agallas de tipo P resultó similar entre *Pilonga* y el resto de variedades.

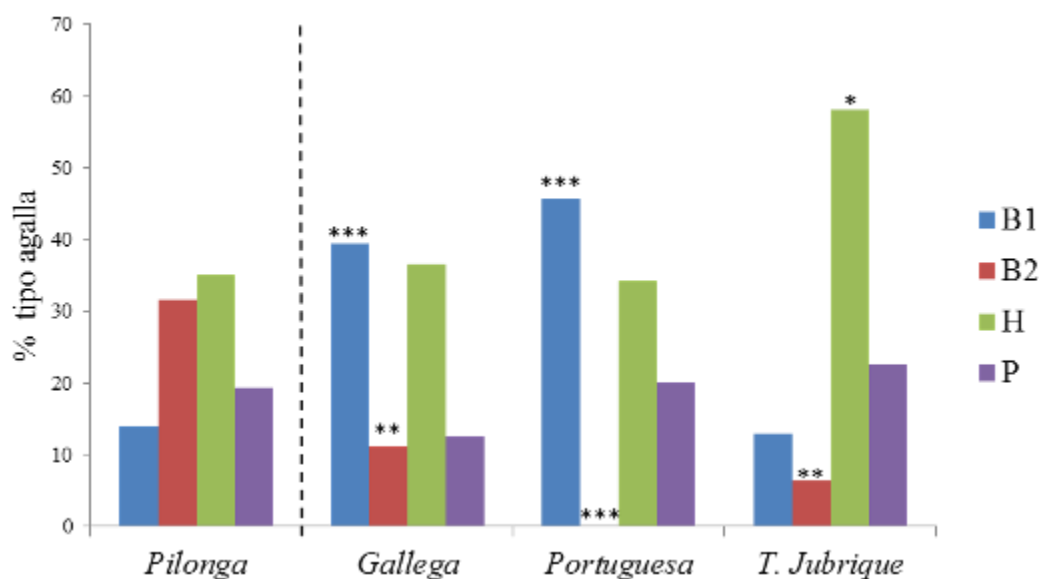


Figura 2. Porcentaje de cada tipo de agalla en cada una de las variedades. B1 agalla basal simple, B2 agalla basal polimórfica, H agalla de hoja, P agalla de peciolo y/o estipula. Los asteriscos sobre cada barra indican diferencias significativas de cada tipo de agalla respecto a la variedad Pilonga. Nivel de significación de la prueba de homogeneidad de chi-cuadrado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Índice de infestación de las variedades.

Los niveles medios del Índice de Infestación de las variedades se pueden observar en la tabla 2.

Los valores van desde las 2.34 celdas/agalla de la variedad *Portuguesa* a las 2.96 celdas/agalla de la variedad *Gallega*, no obstante el ANOVA de una vía no detectó diferencias significativas (Tabla 3).

Tabla 2. Índice de infestación (celdas/agalla) de las variedades, número de árboles muestreados y número de agallas analizadas.

Variación	Nº árboles	Nº de agallas	Nº medio celdas/agalla
<i>Gallega</i>	4	71	2.96 ± 1.54
<i>Pilonga</i>	12	171	2.83 ± 1.78
<i>Portuguesa</i>	3	35	2.34 ± 1.31
<i>Temprana de Jubrique</i>	3	31	2.55 ± 1.23

Los valores seguidos de ± pertenecen a la desviación estándar de la media.

Tabla 3. Resultados del ANOVA de una vía para la determinación de las diferencias entre el Índice de infestación de las variedades.

Fuente de variación	g.l.	SC	CM	F	Sig.
Variedad	3	11.024	3.675	1.385	0.247
Error	307	806.518	2.653		

g.l. grados de libertad, *SC* suma de cuadrados, *CM* cuadrados medios, *F* estadístico Fisher, *Sig.* Nivel de significación.

Discusión.

Tras la identificación varietal de los árboles atacados por la avispa del castaño se confirma la susceptibilidad de las variedades de castaño en el sur de España como ha ocurrido en otras zonas de Europa. El resultado del análisis de las 308 agallas presentes en los 22 árboles objeto del estudio mostró los cuatro tipos descritos previamente por Mena et al. (2015).

Los diferentes porcentajes de cada tipo de agalla en las variedades ponen de manifiesto una variabilidad de respuesta que indica diferencias en la intensidad del daño ocasionado por la avispa. La variedad *Portuguesa* no presentó agallas tipo B2. La ausencia de algún tipo de agalla también la recoge Mena et al. (2015); concretamente, todos los individuos de la variedad *Pilonga* de una de las fincas evaluadas en el primer año de ataque en la zona tampoco presentó agallas tipo B2. Para corroborar las diferencias encontradas, se necesitan más años de recogida de datos con objeto de conocer si la distribución del tipo de agallas de cada variedad se mantiene constante conforme crecen los niveles poblacionales de la avispa en sucesivos años.

En cuanto al Índice de infestación de cada tipo de agalla, las agallas basales (B1 y B2) mostraron mayor número de celdas/agalla respecto a los otros dos tipos de agallas. Estos resultados coinciden con los obtenidos con Mena et al. (2015). Así mismo, las agallas con menor cantidad de celdas son las de tipo P seguidas de H en ambos trabajos. También en ambos casos, las agallas más frecuentes en general han sido las de tipo H.

La presencia mayoritaria de agallas de hoja también ha sido señalada por Sartor et al. (2015) en su estudio de comparación de la susceptibilidad de 62 cultivares a *D. kuriphilus*.

La comparación entre las variedades estudiadas ha mostrado que no existen diferencias significativas entre ellas para el Índice de infestación de las agallas. El valor medio del Índice de infestación para las variedades resultó ser de 2.78 celdas/agalla. Este valor es ligeramente más bajo que el encontrado por Panzavolta et al. (2013) en la Toscana con variedades de *C. sativa* italianas (3.29 celdas/agalla). Lo mismo ocurre cuando comparamos con los resultados obtenidos por Mena et al. (2015) tras el primer año de detección de la avispa en Málaga en las variedades *Portuguesa* y *Pilonga* (3.47 celdas/agalla). La disminución de nuestros datos respecto del año anterior puede ser explicada por pequeñas fluctuaciones ya observadas en otras investigaciones (Sartor et al. 2015) y que puede deberse a condiciones ambientales durante el desarrollo larvario (Bossio et al. 2009) o bien a un mayor reclutamiento de parasitoides en las agallas de *D. kuriphilus*, ya observados desde el primer año de detección de la plaga (Mena et al. 2015). Valores muy superiores fueron encontrados en el este de Estados Unidos en las agallas de árboles pertenecientes *C. dentata*, *C. mollissima* y sus híbridos con valores comprendidos entre 3.5 y 5.4 celdas/agalla (Cooper y Rieske 2010). En el caso de poblaciones naturalizadas estudiadas por Mena et al. 2015, los valores totales de Índice de infestación fueron de 4.47 y 3.93 celdas/agalla para los años 2014 y 2015 respectivamente. Para el año 2016 los valores para estas mismas poblaciones naturalizadas fueron de 3.93 celdas/agalla (datos no publicados). Como los niveles de infestación son mayores en las poblaciones naturalizadas respecto a las variedades clonales de las mismas zonas, podría extrapolarse que los castaños de origen sexual son más susceptibles que los variedades cultivadas. Sin embargo, más años de observación

son necesarios, ya que estas diferencias podrían ser debidas a la mayor atención y medidas de control (poda y quema de ramas con agallas) que reciben las variedades en las plantaciones frutales.

Este trabajo sobre el primer ataque a las variedades de castaño en Andalucía permitió obtener datos de los niveles y características de la infestación de la avispiña que serán la base para el estudio de este fitófago en los próximos años en Andalucía. Además será necesario ampliar el estudio de susceptibilidad a todas las variedades locales disponibles de la zona. Así mismo, el análisis de los daños que ha dado lugar la clasificación de los tipos de agallas ha permitido conocer qué estructuras de la planta se ven más afectadas. Esta localización y sus efectos podrían ser útiles para desarrollar prácticas culturales apropiadas que puedan reducir el impacto negativo de la plaga. Así, nuevos métodos de poda enfocados al desarrollo de nuevos órganos vegetativos fuera del período de actividad de la avispiña adulta han mostrado una reducción en los niveles de infestación (Maltoni et al. 2012ab).

Conclusiones.

Se han observado los cuatro tipos de agallas definidos en la metodología desarrollada por Mena et al. (2015). Las agallas de tipo basal (B1 y B2) que afectan a yemas de brotes presentaron un mayor Índice de infestación que las agallas de tipo hoja (H) y peciolo (P). Sin embargo, las agallas más numerosas en general fueron las de tipo H. No se han observado diferencias significativas en el análisis cuantitativo del Índice de infestación entre las cinco variedades estudiadas. Pero sí se han observado diferencias cualitativas entre las variedades respecto al porcentaje de tipos de agalla que presenta cada variedad. Estas diferencias podrían ser indicadoras de diferentes grado de susceptibilidad a *D. kuriphilus*. Esta conclusión puede resultar prematura ya que los

resultados abarcan en algunos casos el primer año de infestación. Son necesarios más estudios sobre los efectos de la plaga y los niveles de población a lo largo del tiempo, así como la valoración de la susceptibilidad del resto de variedades tradicionales cultivadas en la zona.

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL.

Los diferentes enfoques de esta Tesis han supuesto un avance en el estudio de la diversidad genética relacionada con factores abióticos y bióticos en los castañares andaluces.

Los castañares del sur de España, como los de otras regiones donde está presente la especie, están sometidos a distintas formas de manejo dando lugar a estructuras genéticas muy diferentes (Martín et al. 2017). Fruto de esta situación, el capítulo I de esta Tesis se ha dedicado al estudio de la diversidad genética de las poblaciones de origen sexual frente a factores abióticos (fecha de floración y estrés hídrico). Por otro lado, los Capítulos II y III se han centrado en el estudio de la diversidad genética de las variedades de origen clonal frente a factores bióticos (plagas).

Los resultados del primer capítulo de esta tesis han mostrado una clara diferenciación genética y altos niveles de diversidad entre las poblaciones naturales de Andalucía, separando las poblaciones orientales (Bubión, Güejar y Paterna) de la población de Santa María de Trassierra. El resto de las poblaciones presentaron una mezcla de ambos grupos genéticos. Esta asociación presenta cierta similitud con los resultados obtenidos por Martín et al. (2012) utilizando marcadores neutrales SSR para estas mismas poblaciones. Por ejemplo, tanto los marcadores neutrales (SSR) como los funcionales (EST-SSR) han constatado un alto nivel de homogeneidad en el grupo de poblaciones orientales (Bubión, Güejar y Paterna), así como un alto grado de mezcla en las poblaciones de Pujerra, Santa Elena y Sierra Norte. Si bien, es preciso señalar, que aunque se hayan encontrado ciertas similitudes entre ambos tipos de marcadores, la diversidad analizada por cada tipo de marcador es diferente. Los marcadores SSR se encuentran en zonas no codificantes por lo suelen denominarse neutros, mientras que los marcadores EST-SSR, utilizados en nuestro caso, son secuencias obtenidas de la

expresión de determinados caracteres con un claro valor adaptativo. Esta diferencia la muestra el trabajo realizado por Martín et al. (2010a) al analizar un grupo de poblaciones europeas con ambos tipos de marcadores. Los resultados revelaron diferentes formas de agrupación en las poblaciones. Así, los marcadores neutros agruparon a las poblaciones según su origen geográfico, mientras que los marcadores funcionales mostraron una separación entre las poblaciones del norte y del sur.

Estas diferencias también se han observado en los niveles inferiores de polimorfismo que presentaron los marcadores EST-SSR frente a los recogidos con los marcadores SSR por Martín et al. (2012). Este menor nivel de polimorfismo de los marcadores funcionales, así como un menor número de alelos detectados y menores índices de diversidad, fue confirmado por Martín et al. (2010) en su estudio comparativo con poblaciones de castaño europeas.

En lo que se refiere a esta Tesis, la evaluación del efecto varietal ante determinados factores bióticos se ha llevado a cabo directamente en finca. Las dos principales zonas productoras de fruto en Andalucía, el Valle del Genal (Málaga) y en el Parque Natural de la Sierra de Aracena y Picos de Aroche (Huelva), se caracterizan por la presencia sistemas agroforestales donde diferentes variedades locales se mezclan en una misma plantación (Martín et al. 2017). El uso de marcadores genéticos neutros (SSR) ha permitido la identificación varietal de los árboles afectados en cada una de las fincas en los Capítulos II y III del presente documento.

Así, en el Capítulo II el estudio del ataque de carpófagos se centró en 8 variedades diferentes de cada una de las dos zonas productoras. Un total de 40 árboles fueron muestreados en diferentes fincas y localidades; lo que permitió darle el carácter aleatorio necesario para un diseño estadístico que cuantifique la diferencia entre las variedades afectadas. Los componentes de la varianza permitieron aislar los efectos

derivados del factor variedad (descartando otros factores que influyan en la variación) y estimar la heredabilidad. La evaluación de los daños causados por carpófagos confirmó que *C. splendana* es la principal plaga que afecta a las producciones de castaña en Málaga y Huelva, coincidiendo con estudios anteriores realizados en plantaciones andaluzas de ambas zonas (Vargas-Osuna et al. 2003; Romero 2013), así como en Extremadura (Torres-Vila et al. 2008). Los resultados encontrados mostraron que *Temprana de Jubrique* fue la variedad más afectada en la zona de Málaga, mientras que en Huelva la variedad *Temprana* fue la que menos. El conocimiento de esta diversidad frente al ataque de *C. splendana* puede ser útil para desarrollar estrategias de control más efectivas.

Como se ha comentado anteriormente, las plantaciones incluidas en esta tesis se caracterizan por ser sistemas tradicionales de zonas serranas. Las extensiones y la orografía dificultan, en estos casos, la aplicación de determinadas medidas de control. Un ejemplo de estas medidas es la colocación de redes bajo el suelo de los árboles para evitar que las larvas caídas al suelo puedan enterrarse (Mansilla et al. 2000). Esta medida preventiva podría, por tanto, aplicarse solo a aquellas variedades que sean más susceptibles, evitando así al agricultor recursos y esfuerzos innecesarios. Lo mismo podría aplicarse a otras medidas como el trampeo masivo o confusión sexual de adultos mediante el uso de feromona sexual (Rotundo et al. 2010; Romero 2013), que podrían ser utilizadas solo en las zonas en donde predominen las variedades más susceptibles.

Sin embargo, hay que destacar que el número de variedades estudiadas en cada zona fue solo de cuatro. Aunque se escogieron las variedades más representativas en cuanto a superficie de producción, éstas son solo ocho de las 38 variedades locales identificadas por Martín et al. (2009) en Andalucía. Se requiere incrementar el número de variedades a evaluar en futuros estudios, con objeto de completar la comparación de susceptibilidad

al ataque de *C. splendana* en las variedades de cada zona. Asimismo, los resultados de esta respuesta varietal podría ser la base de futuros trabajos para conocer los mecanismos biológicos involucrados en esta susceptibilidad diferencial.

Se detectó también la presencia de *C. elephas*, aunque sus niveles de infestación fueron muy bajos, tanto en el número de árboles afectados como en el porcentaje de frutos infestados, por lo que para esta especie no fue posible estudiar diferencias de niveles de infestación entre variedades. La distribución agregada de los daños, concentrada en pocos árboles y grupos de árboles cercanos es atribuible a la baja movilidad de los adultos (Desouhant 1998; Sieber et al. 2007). Por otro lado, el bajo número de frutos coinfectados por ambas especies de carpófagos sugiere una competencia entre ellas, que fue descrita como asimétrica por Debouzie et al. (1996) debido a que la presencia de una larva de *C. splendana* en un fruto inhibe la puesta de huevos por la hembra de *C. elephas*, pero no a la inversa.

En cuanto a la existencia de respuesta diferencial intervarietal ante el ataque de *D. kuriphilus*, en sus primeros años de aparición en la zona (Capítulo III), no se registraron diferencias significativas entre variedades en el análisis cuantitativo del Índice de infestación de las agallas, pero sí se observaron diferencias cualitativas respecto al porcentaje relativo entre los tipos de agalla que presenta cada variedad. Esta diferente respuesta podría ser indicadora de diferentes grados de susceptibilidad a la avispa del castaño. Es necesario recalcar que estos resultados son fruto de la observación de los primeros hallazgos de este insecto en Andalucía, por lo que son necesarios futuros estudios que determinen la evolución de los niveles de ataque y los efectos del fitófago, en donde se incluyan además un mayor número de variedades.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES.

Las conclusiones generales recogidas de este trabajo de Tesis son;

- Los marcadores EST-SSR utilizados han mostrado un alto grado de diversidad y una clara estructura genética que ha permitido separar las poblaciones andaluzas analizadas. Además, se ha puesto de manifiesto la singularidad genética de las poblaciones de Santa María de Trassierra y Gaucín, que debería tenerse en cuenta en posibles estrategias de conservación de la especie.
- Se ha corroborado que *C. splendana* es el principal carpófago que ataca a los frutos en las dos zonas productoras de castaña en Andalucía, y se han encontrado diferencias en la incidencia e intensidad de los daños entre variedades. Asimismo, se ha detectado también la presencia del coleóptero *C. elephas* aunque con niveles muy bajos de infestación.
- Se han caracterizado los primeros daños de *D. kuriphilus* en las variedades de castaño andaluzas. Aunque no se han observado diferencias significativas en el ataque de la misma entre las variedades afectadas, sí se han registrado diferencias cualitativas en relación al tipo de agalla que se forma como consecuencia del desarrollo de *D. kuriphilus* durante la brotación. Esto puede indicar una respuesta diferencial importante de la que puede derivarse diferencias en el desarrollo vegetativo y producción del castaño.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Abe Y, Melika G, Stone GN (2007) The diversity and phylogeography of cynipid gallwasps (Hymenoptera, Cynipidae) of the Eastern Palearctic and their associated communities. *Oriental Insects* 41:169-212.
- Aebi A, Schönrogge K, Melika G, Alma A, Bosio G, Quacchia A, Picciau L, Abe Y, Moriya S, Yara K, Seljak G, Stone GN (2006) Parasitoid recruitment to the globally invasive chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus*. En: Ozaki K, Yukwa J, Ohgushi T, Price PW (eds) *Ecology and evolution of galling arthropods and their associates*. Springer-Verlag, Tokyo, pp 103-121.
- Aebi A, Schönrogge K, Melika G, Quacchia A, Alma A, Stone GN (2007) Native and introduced parasitoids attacking the invasive chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus*. *European Plant Protection Organization Bulletin* 37: 166-171.
- Aguin-Pombo D, Arraiol A, Aguiar AM, Freitas E, Angeli G (2008) Large Infestation of Chestnuts by *Cydia* Moths in Madeira Island: Monitorization of *Cydia splendana* Populations with Pheromone Lures. *Acta Horticulturae* 784: 175-180.
- Allard RW (1960) *Principles of Plant Breeding*. John Wiley. Sons, Inc. New York. USA.
- Álvarez P, Barrio M, Castedo F, Díaz RA, Fernández JL, Mansilla P, Pérez R, Pintos C, Riesgo G, Rodríguez RJ, Salinero MC (2000) *Manual de selvicultura del castaño en Galicia*. (Escola Politécnica Superior de Lugo, ed.). Lugo. Disponible en: <http://www.agrobyte.com/publicaciones/castano>.
- Anagnostakis SL (2001) American chestnut sprout survival with biological control of the chestnut-blight fungus population. *Forest Ecology and Management* 152: 225-233.

- Aranguren-Méndez JA, Román-Bravo R, Isea W, Villasmil Y, Jordana J (2005) Los Microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal 1:30-42.
- Avtzis DN, Perlerou C, Diamandis S (2013) Geographic distribution of chestnut feeding insects in Greece. Journal of Pest Science 86: 185-191.
- Battisti A, Benvegnù I, Colombari F, Haack R (2014) Invasion by the chestnut gall wasp in Italy causes significant yield loss in *Castanea sativa* nut production. Agricultural and Forest Entomology 16: 75-79.
- Bellon MR, Gotor E, Caracciolo F (2015) Conserving landraces and improving livelihoods: how to assess the success of on-farm conservation projects? International Journal of Agricultural Sustainability 13: 167-182.
- Bengtsson M, Boutitie A, Jósvali J, Toth M, Andreadis S, Rauscher S, Rikard UC, Witzgall P (2014) Pheromone races of *Cydia splendana* (Lepidoptera, Tortricidae) overlap in host plant association and geographic distribution. Frontiers in Ecology and Evolution 2: 46.
- Bernardinelli I, Bessega D, Zanolli P, Governatori G, Zandigiaco P (2016) Survey of indigenous parasitoids affecting the invasive chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus* in the Friuli Venezia Giulia region (North-East Italy). European and Mediterranean Plant Protection Organization Bulletin 46: 286-289.
- Berrocal M, Gallardo J, Cardeñoso J (1998) El Castaño. Productor de Fruto y Madera. Creador de Paisaje y Protector. Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa S.A.
- Bogenschütz H (1991) Eurasian species in forestry. En: van der Geest LPS, Evenhuis HH (ed.) Tortricid Pests: Their Biology, Natural Enemies, and Control. World Crop Pests, Vol. 5. Elsevier, Amsterdam, pp 673-709.

- Bonal R y Muñoz A (2008) Negative consequences of premature seed abscission on insect performance: acorn growth suppression constrains *Curculio elephas* larval size. *Ecological Entomology* 33; 31- 36.
- Bosio G, Gerbaudo C, Piazza E (2009) *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu: an outline seven years after the first report in Piedmont (Italy). En I European Congress on Chestnut-Castanea (2009) 866 (pp. 341-348).
- Botta R, Vergano G, Me G, Vallania R (1995) Floral biology and embryo development in chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Horticultural Science* 30: 1283-1286.
- Bounous G y Marinoni D (2005) Chestnut: botany, horticulture, and utilization. *Horticultural Reviews* 31: 291-347.
- Bourgeois C (1992) Le châtaignier, un arbre, un bois. Paris, France. Institut pour le development Forestier.
- Bovey P, Linder A, Müller O (1975) Recherches sur les insectes des châtaignes au Tessin (Suisse). *Schweiz. Z. Forstwes* 126: 781-820.
- Branco M, Branco C, Merouani H, Almeida MH (2002) Germination success, survival and seedling vigour of *Quercus suber* acorns in relation to insect damage. *Forest Ecology and Management* 166:159-164.
- Brush SB y Meng E (1998) Farmers' valuation and conservation of crop genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution* 45: 139-150.
- Brussino G, Bosio G, Baudino M, Giordano R, Ramello F, Melika G (2002) Pericoloso insetto esotico per il castagno europeo. *L'Informatore Agrario* 37:59-61.
- Buck EJ, Russell K, Hadonou M, James CJ, Blakesley D (2003) Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in European chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Molecular Ecology Notes* 3: 239-241.

CBC Convenio sobre Diversidad Biológica de Río de Janeiro (1992) Disponible en:
<http://www.biodiv.org/doc/legal/cbd>.

Columela LJM (1979) De Res Rustica. Siglo I d.C. Los doce libros de Agricultura.
Barcelona, España: Editorial Iberia.

Comisión Europea (2013a) Reglamento (CE) n° 1306/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de diciembre de 2013 sobre la financiación, gestión y seguimiento de la Política Agrícola Común (PAC), por el que se derogan los Reglamentos (CE) n° 352/78, (CE) n° 165/94, (CE) no 2799/98, (CE) n° 814/2000, (CE) n° 1290/2005 y (CE) n° 485/2008 del Consejo. Diario oficial de la Unión Europea L347, de 20 de diciembre de 2013, pp. 608-670.

Comisión Europea (2013b) Reglamento (CE) n° 1305/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de diciembre de 2013 relativo a la ayuda al desarrollo rural a través del Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural (FEADER) y por el que se deroga el Reglamento (CE) n° 1698/2005 del Consejo. Diario oficial de la Unión Europea L347, de 20 de diciembre de 2013, pp. 487-588.

Conedera M, Krebs P, Tinner W, Pradella M, Torriani D (2004) The cultivation of *Castanea sativa* (Mill.) in Europe, from its origin to its diffusion on a continental scale. *Vegetation History and Archaeobotany* 13: 161-179.

Conedera M, Tinner W, Krebs P, de Rigo D, Caudullo G (2016) *Castanea sativa* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. En: San-Miguel-Ayánz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. (eds.), *European Atlas of Forest Tree Species* Publ. Off. EU, Luxembourg, pp. e0125e0+.

Cooper WR y Rieske LK (2007) Community associates of an exotic gallmaker, *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera: Cynipidae), in eastern North America. *Annals of the Entomological Society of America* 100; 236-244.

- Cooper WR y Rieske LK (2010) Gall structure affects ecological associations of *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera: Cynipidae). *Environmental Entomology* 39: 787-797.
- Cubero JI (2003) *Introducción a la Mejora genética Vegetal*. Mundi-Prensa. Madrid.
- Debouzie D, Heizmann A, Desouhant E, Menu F (1996) Interference at several temporal and spatial scales between two chestnut insects. *Oecologia* 108: 151-158.
- Delisle J, Marcotte M, Boutitie A, Bengtsson M, Witzgall P (2005) Pheromone trials for monitoring of *Cydia splendana* in Chestnut plantations of France. *Acta Horticulturae* 693: 605-601.
- Den Herder M, Moreno G, Mosquera-Losada MR, Palma JHN, Sidiropoulou A, Santiago JJ, Crous-Duran J, Paulo JA, Tomé M, Pantera A, Papanastasis VP, Kostas K, Pachana P, Papadopoulos A, Plieninger T, Burgess PJ (2017) Current extent and stratification of agroforestry in the European Union. *Agriculture Ecosystems and Environment* 241:121-132.
- Den Otter CJ, De Cristofaro A, Voskamp KE, Rotundo G (1996) Electrophysiological and behavioral responses of chestnut moths, *Cydia fagiglandana* and *C. splendana* (Lepidoptera: Tortricidae) to sex attractants and odours of host plants. *Journal of Applied Entomology* 120: 413-421.
- Desouhant E (1998) Selection of fruits for oviposition by the chestnut weevil, *Curculio elephas*. *Entomology Experimentalis Applicata* 86:71-78.
- Dini F, Sartor C, Botta R (2012) Detection of a hypersensitive reaction in the chestnut hybrid 'Bouche de Bétizac' infested by *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu. *Plant Physiology and Biochemistry* 60: 67-73.

- Du Y, Zhang J, Yan Z, Ma Y, Yang M, Zhang M, Zhang Z, Qin L, Cao Q (2016) Host Preference and Performance of the Yellow Peach Moth (*Conogethes punctiferalis*) on Chestnut Varieties. PLoS ONE 11: e0157609. doi:10.1371/journal.pone.0157609.
- Durand J, Bodénès C, Chancerel E, Frigerio JM, Vendramin G, Sebastiani F, Buonamici A, Galiling O, Koelewijn H, Villani F, Mattioni C, Cherubini M, Goicochea P, Herrán A, Ikarán Z, Cabané C, Ueno S, Alberto F, Dumoilin P, Guichoux E, Daruvar A, Kremer A, Ploimon C (2010) A fast and cost-effective approach to develop and map EST-SSR markers: oak as a case study. BMC genomics 11: 1.
- EFSA European Food Safety Authority (2010) Risk assessment of the oriental chestnut gall wasp, *Dryocosmus kuriphilus* for the EU territory and identification and evaluation of risk management options. European Food Safety Authority Journal 8: 1-114.
- EPPO European and Mediterranean Plant Protection Organization (2005) Data sheets on quarantine pests-*Dryocosmus kuriphilus*. European Plant Protection Organization Bulletin 35: 422-424.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics online 1: 47-50.
- Fady B, Cottrell J, Ackzell L, Alía R, Muys B, Prada A, González-Martínez SC (2016) Forests and global change: what can genetics contribute to the major forest management and policy challenges of the twenty-first century? Regional Environmental Change 16: 927-939.

- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7: 574-578.
- Fernandez Carrillo JL, Fernandez Carrillo E, Moreno Marí J (2004) Parasitismo *Schizoprymnus longiseta* (Hymenoptero, Branconidae) sobre *Curculeo elephas* (Coleoptera, Curculionidae) en encinares de los montes de Toledo , Ciudad Real (España) *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa* 35 : 257-260.
- Fernández L, Vargas Osuna E (2006) El control de la carpocapsa en la castaña: la experimentación en la serranía de Ronda. En: 3ª Feria Andaluza de la Castaña. Grupo de Desarrollo Rural de la Serranía de Ronda.
- Fineschi S, Turchini D, Villani F, Vendramin GG (2000) Chloroplast DNA polymorphism reveals little geographical structure in *Castanea sativa* Mill. (Fagaceae) throughout southern European countries. *Molecular Ecology* 9: 1495-1503.
- Franks SJ, Weber JJ, Aitken SN (2014) Evolutionary and plastic responses to climate change in terrestrial plant populations. *Evolutionary Applications* 7: 123-139.
- Gehring E, Bellosi B, Quacchia A, Conedera M (2017) Assessing the impact of *Dryocosmus kuriphilus* on the chestnut tree: branch architecture matters. *Journal of Pest Science* 91:189-202.
- Germinara GS, De Cristofaro A, Rotundo G (2011) Chemical cues for host location by the chestnut gall wasp, *Dryocosmus kuriphilus*. *Journal of Chemical Ecology* 37: 49-56.
- Gibbs M, Schönrogge K, Alma A, Melika G, Quacchia A, Stone GN, Aebi A (2011) *Torymus sinensis*: a viable management option for the biological control of *Dryocosmus kuriphilus* in Europe? *BioControl* 56: 527-538.

- 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.
- Goudet J (2001) FSTAT, a Program to estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices. Versión 2.9.3.
- Gupta P y Varshney R (2000) The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113: 163-185.
- Guyot V, Castagneyrol B, Vialatte A, Deconchat FS, Bussoti F, Jactel H (2015) Tree diversity limits the impact of an invasive forest pest. *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0136469.
- Harlan JR (1992) *Crops and Man*. 2nd edn (ASA-CSSA, Madison, WI, 1992), pp. 117-133.
- Hoffman (1963) Tribu des Balanini. En: *Entomologie appliquée a l'Agriculture* (Ed.A.S. Balachowsky.). Masson et Cie. París. Tomo I. Coleoptères. Vol. 2, 1125-1135 pp.
- Homolka A, Schueler S, Burg K, Fluch S, Kremer A (2013) Insights into drought adaptation of two European oak species revealed by nucleotide diversity of candidate genes. *Tree Genetics and Genomes* 9: 1179-1192.
- Huber JT y Read J (2016) First record of the oriental chestnut gall wasp, *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera: Cynipidae), in Canada. *The Journal of the Entomological Society of Ontario* 143: 125-128.
- IFAPA Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (2017) *La Avispilla del Castaño en Andalucía*. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, 2017. 1-15 p.

- Formato digital (e-book) - (Producción Agraria). Disponible en <https://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa>.
- IPCC International Plant Protection Convention (2014) Cambio climático 2014: Informe de síntesis. Contribución de los Grupos de trabajo I, II y III al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático [Equipo principal de redacción, R.K. Pachauri y L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Ginebra, Suiza, 157 p.
- Jakobsson M y Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23: 1801-1806.
- Jimenez-Pino A, Maistrello L, Lopez-Martinez MA, Ocete-Rubio ME, Soria-Iglesias FJ (2011) Spatial distribution of *Cydia fagiglandana* (Zeller) in an exploited holm oak (*Quercus ilex* L.) forest. *Spanish Journal of Agricultural Research* 9; 570-579.
- Jósvai JK, Voigt E, Tóth M (2016) A pear ester-based female-targeted synthetic lure for the chestnut tortrix, *Cydia splendana*. *Entomology Experimentalis Applicata* 159: 370-374.
- Junta de Andalucía (2002). *Curculeo elephas* Gyll. Fichas divulgativas. Consejería de Medioambiente. Disponible en <https://www.juntadeandalucia.es/medioambiente>.
- Junta de Andalucía (2017). *Dryocosmus kuriphilus* (Avispilla del Castaño) Disponible en <https://www.juntadeandalucia.es/agricultura>.
- Kato K e Hijii N (1993) Optimal clutch size of the chestnut gall-wasp, *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera: Cynipidae). *Researches on Population Ecology* 35; 1-14. Kato K e Hijii N (1997) Effects of gall formation by

- Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hym., Cynipidae) on the growth of chestnut trees. *Journal of Applied Entomology* 121: 9-15.
- Knapič V, Seljak G, Kolšek M (2010) Experience with *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu eradication measures in Slovenia. *European and Mediterranean Plant Protection Organization Bulletin* 40: 169-175.
- Krebs P, Conedera M, Pradella M, Torriani D, Felber M, Tinner W (2004) Quaternary refugia of the sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.): an extended palynological approach. *Vegetation History and Archaeobotany* 13: 145-160.
- Lang P, Dane F, Kubisiak TL, Huang H (2007) Molecular evidence for an Asian origin and a unique westward migration of species in the genus *Castanea* via Europe to North America. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 49-59.
- Lauteri M, Pliura A, Monteverdi MC, Brugnoli E, Villani F, Eriksson G (2004) Genetic variation in carbon isotope discrimination in six European populations of *Castanea sativa* Mill. originating from contrasting localities. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 1286-1296.
- Lauteri M, Scartazza A, Guido MC, Brugnoli E (1997) Genetic variation in photosynthetic capacity, carbon isotope discrimination and mesophyll conductance in provenances of *Castanea sativa* adapted to different environments. *Functional Ecology* 11: 675-683.
- Leonarduzzi C, Spanu I, Labriola M, González-Martínez SC, Piotti A, Vendramin GG (2016) Development and Characterization of Three Highly Informative EST-SSR Multiplexes for *Pinus halepensis* Mill. and their Transferability to Other Mediterranean Pines. *Plant Molecular Biology Reporter* 34: 993-1002.
- Li Y, Korol A, Fahima T, Nevo E (2004) Microsatellites within genes: structure, function and evolution. *Molecular Biology and Evolution* 21: 991-1007.

- Lind JF y Gailing, O. (2013) Genetic structure of *Quercus rubra* L. and *Quercus ellipsoidalis* EJ Hill populations at gene-based EST-SSR and nuclear SSR markers. *Tree Genetics and Genomes* 9: 707-722.
- Maltoni A, Mariotti B, Jacobs DF, Tani A (2012a) Pruning methods to restore *Castanea sativa* stands attacked by *Dryocosmus kuriphilus*. *New Forest* 43: 869-885
- Maltoni A, Mariotti B, Tani A. (2012b) Case study of a new method for the classification and analysis of *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu damage to young chestnut sprouts. *I Forest* 5: 50-59.
- Mansilla P, Pérez-Otero R, Salinero MC, Vela P (1999) Control integrado de las plagas del castaño en el área de Verín (Orense): Resultado de tres años de experiencia. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 25; 297-310.
- Mansilla JP, Pérez-Otero R, Pintos C, Salinero C, Iglesias C (2000) Plagas y enfermedades del castaño en Galicia. Xunta de Galicia. Consellería de Agricultura, Ganadería e Política Agroalimentaria. Pontevedra. Disponible en: www.agrobyte.com.
- MAPAMA Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (2017) Disponible en: <http://www.mapama.gob.es-es-desarrollo-rural-temas-politica-forestal-inventario-cartografia-inventario-forestal-nacional-index.aspx.pdf>.
- Marinoni D, Akkak A, Bounous G, Edwards KJ, Botta R (2003) Development and characterization of microsatellite markers in *Castanea sativa* (Mill.). *Molecular Breeding* 11: 127-136.
- Martin MA, Alvarez, JB, Mattioni C, Cherubini M, Villani F, Martin LM (2009) Identification and characterisation of traditional chestnut varieties of southern Spain using morphological and simple sequence repeats SSR markers. *Annals of Applied Biology* 154:389-398.

- Martin MA, Mattioni C, Cherubini M, Turchini D, Villani F (2010a) Genetic characterisation of traditional chestnut varieties in Italy using microsatellites (simple sequence repeats) markers. *Annals of Applied Biology* 157: 37-44.
- Martin MA, Mattioni C, Cherubini M, Turchini D, Villani F (2010b) Genetic diversity in European chestnut populations by means of genomic and genic microsatellite markers. *Tree Genetics and Genomes* 6: 735-744.
- Martin MA, Mattioni C, Cherubini M, Villani F, Martin LM (2017) A comparative study of European chestnut varieties in relation to adaptive markers. *Agroforestry Systems* 91: 97-109.
- Martin MA, Mattioni C, Molina JR, Alvarez JB, Cherubini M, Herrera MA, Villani F, Martin LM (2012) Landscape genetic structure of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Spain. *Tree Genetics and Genomes* 8: 127-136.
- Martin MA, Moral A, Martín LM, Alvarez JB (2007) The genetic resources of European sweet chestnut (*Castanea sativa* Miller) in Andalusia, Spain. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 379-387.
- Matošević D, Pernek M, Hrasovec B (2010) First record oriental chestnut gall wasp (*Dryocosmus kuriphilus*) in Croatia. *Prethodno Priopćenje* 134: 497-502.
- Mattioni C, Martin MA, Chiocchini F, Cherubini M, Gaudet M, Pollegioni P, Velichkov I, Jarman R, Chambers FM, Paule L, Damian VL, Crainic GC, Villani F (2017) Landscape genetics structure of European sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill): indications for conservation priorities. *Tree Genetics and Genomes* 13:39. <https://doi.org/10.1007/s11295-017-1123-2>.
- Mattioni C, Martin MA, Pollegioni P, Cherubini M, Villani F (2013) Microsatellite markers reveal a strong geographical structure in European populations of

- Castanea sativa* (Fagaceae): evidence for multiple glacial refugia. *American Journal of Botany* 100: 951-961.
- Mena JD, Adebis HK, Cuestas MI, Martín LM, Vargas-Osuna E (2015). *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera, Cynipidae) en poblaciones de castaño de la provincia de Málaga. IX Congreso de entomología Aplicada. Valencia. España.
- Menu F (1993) Strategies of emergence in the chestnut weevil *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae). *Oecologia* 96: 383-390.
- Michaelakis A, Papachristos D, Chytas DA, Antonopoulou PD, Milonas PG, Avtzis DN (2016) First record of *Dryocosmus kuriphilus* in Greece. *European and Mediterranean Plant Protection Organization Bulletin* 46: 290-294.
- MIMAM Ministerio del Medio Ambiente (2006). Estrategia de conservación y Uso Sostenible de los Recursos Genéticos Forestales. Dirección General para la Biodiversidad. Madrid.
- Moriya S, Shiga M, Adachi I (2003) Classical biological control of the chestnut gall wasp in Japan. En: Van Driesche RG (eds) *Proceedings of the 1st international symposium on biological control of arthropods*. USDA Forest Service, Washington, pp 407-415.
- Murakami Y (1981) The parasitoids of *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera: Cynipidae) in Japan and the introduction of a promising natural enemy from China (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University* 25:167-174.
- Murray MG y Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321-4325.
- Nieves-Aldrey JL, Tapetado-Gil D (2017) La avispa del castaño ha llegado a España desde Asia oriental. *Quercus* 382: 32-38.

- Ôtake A (1980). Chestnut gall wasp, *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera: Cynipidae): a preliminary study on trend of adult emergence and some other ecological aspects related to the final stage of its life cycle. *Applied Entomology and Zoology* 15: 96-105.
- Ôtake A, Shiga M, Moriya S (1982) A study on parasitism of the chestnut gall wasp, *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera: Cynipidae) by parasitoids indigenous to Japan. *Bulletin of the Fruit Tree Research Station* 9: 177-192.
- Panzavolta T, Bernardo U, Bracalini M, Cascone P, Croci F, Gebiola M, Guerrieri E (2013) Native parasitoids associated with *Dryocosmus kuriphilus* in Tuscany, Italy. *Bulletin of Insectology* 66: 195-201.
- Panzavolta T, Bracalini M, Croci F, Campani C, Bartoletti T, Miniati G, Tiberi R (2012) Asian chestnut gall wasp in Tuscany: gall characteristics, egg distribution and chestnut cultivar susceptibility. *Agricultural and Forest Entomology* 14: 139-145.
- Payne JA, Jaynes RA, Kays SJ (1983) Chinese chestnut production in the United States: practice, problems, and possible solutions. *Economic Botany* 37: 187-200.
- Peakall R y Smouse PE (2005) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Pereira-Lorenzo S, Diaz-Hernandez MB, Ramos-Cabrera AM (2006) Use of highly discriminating morphological characters and isozymes in the study of Spanish chestnut cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131: 770-779.

- Pereira-Lorenzo S, Fernandez-Lopez J, Moreno-Gonzalez J (1996) Variability and grouping of Northern Spanish cultivars of chestnut (*Castanea sativa*). I. Morphological traits. Journal American of Horticultural Science 121:183-189.
- Pereira-Lorenzo S, Lorenzo-Costa RM, Ramos-Cabrer AM, Marques CA, da Silva MF, Manzano G, Barreneche T (2010) Variation in grafted European chestnut and hybrids by microsatellites reveals two main origins in the Iberian Peninsula. Tree Genetics and Genomes 6: 701-715.
- Pereira-Lorenzo S, Lorenzo-Costa RM, Ramos-Cabrer AM, Marques CA, da Silva MF, Manzano G, Barreneche T (2011) Chestnut cultivar diversification process in the Iberian Peninsula, Canary Islands, and Azores. Genome 54: 301-315.
- Pereira-Lorenzo S, Ramos-Cabrer AM, Ascasíbar-Erraste J, Nieto-González L (2001) El cultivo del castaño en Andalucía. En: Actas del III Congreso Forestal Español. Mesa 3, Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía, pp. 82-86.
- Petit RJ, El Mousadik A, Pons O (1998) Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. Conservation Biology 12: 844-855.
- Pigliucci M, Villani F, Benedettelli S (1990) Geographic and climatic factors associated with the spatial structure of gene frequencies in *Castanea sativa* Mill. from Turkey. Journal of Genetics 69: 141-149.
- Pliura A y Eriksson G (2002) Genetic variation in juvenile height and biomass of open-pollinated families of six *Castanea sativa* Mill. populations in a 2 x 2 factorial temperature x watering experiment. Silvae Genetica 51: 152-160.
- Powell W, Machray GC, Provan J (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends in Plant Science 1: 215-222.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945-959.

- Prospero S y Forster B (2011) Chestnut gall wasp (*Dryocosmus kuriphilus*) infestations: new opportunities for the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *New Disease Reports* 23: 2044-2588.
- Pujade-Villar J, Torrell A, Rojo M (2013). Nota entomològica. Primeres troballes a la península Ibèrica de *Dryocosmus kuriphilus* (Hym., Cynipidae), una espècie de cinípid d'origen asiàtic altament perillosa per al castanyer (Fagaceae). *Orsis: organismes i sistemes* 27: 295-301.
- Quacchia A, Moriya S, Bosio G, Scapin I, Alma A (2008) Rearing, release and settlement prospect in Italy of *Torymus sinensis*, the biological control agent of the chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus*. *Biocontrol* 53: 829-839.
- Rieske LK (2007) Success of an exotic gallmaker, *Dryocosmus kuriphilus*, on chestnut in the USA: a historical account. *European Plant Protection Organization Bulletin* 37: 172-174.
- Romero A (2013) El control de los insectos carpófagos del castaño (*Castanea sativa*) en Andalucía mediante captura masiva con feromona sexual y evaluación de la actividad insecticida de hongos entomopatógenos. Tesis Doctoral. Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales. Universidad de Córdoba.
- Rosenberg NA (2004) DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4: 137-138.
- Rotundo G, De Cristofaro A, Parillo R, Germinara GS (2010) Monitoring of chestnut moths by intra-and interspecific semiochemicals. *Acta Horticulturae* 866: 435-441.
- Rotundo G, Rotundo A (1986) Principali fitofagi delle castagne: recenti acquisizioni sul controllo chimico e biológico. *Giornate di studio sul Castagno*. Caprarola (VT), pp 3-19.

- Santi F y Maini S (2011) New association between *Dryocosmus kuriphilus* and *Torymus flavipes* in chestnut trees in the Bologna area (Italy): first results. Bulletin of Insectology 64: 275-278.
- Santoyo E (2005) Biología de los principales perforadores del fruto, *Cydia fagiglandana* (Lep., Tortricidae) y *Curculio elephas* (Col., Curculionidae) en encinares afectados por la Seca. Trabajo Fin de Carrera. Universidad de Córdoba.
- Sartor C, Dini F, Marinoni DT, Mellano MG, Beccaro GL, Alma A, Botta R (2015) Impact of the Asian wasp *Dryocosmus kuriphilus* (Yasumatsu) on cultivated chestnut: Yield loss and cultivar susceptibility. Scientia Horticulturae 197: 454-460.
- Schmidt S, Anfora G, Ioriatti C, Germinara GS, Rotundo G, De Cristofaro A (2007) Biological activity of ethyl (E, Z)-2, 4-decadienoate on different tortricid species: electrophysiological responses and field tests. Environmental Entomology 36: 1025-1031.
- Shen D, Bo W, Xu F, Wu R (2014) Genetic diversity and population structure of the Tibetan poplar (*Populus szechuanica* var. *tibetica*) along an altitude gradient. BMC genetics 15: 1.
- Sieber TN, Jermini M, Conedera M. (2007) Effects of the harvest method on the infestation of chestnuts (*Castanea sativa*) by insects and moulds. Journal of Phytopathology 155: 497-504.
- Slatkin M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. Genetics 139:457-462.

- Smith J, Pearce BD, Wolfe MS (2013) Reconciling productivity with protection of the environment: Is temperate agroforestry the answer? *Renewable Agriculture and Food Systems* 28: 80-92.
- Soria FJ, Villagrán M, Tío R, Ocete ME (1995) Incidencia de *Curculio elephas* Gyll. (Col. Curculionidae) en alcornoques y encinares del Parque Natural Sierra Norte de Sevilla. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 21: 195-120.
- Speranza S (1999) Chestnut pests in Central Italy. *Acta Horticulturae* 494: 417-423.
- Torres-Vila LM, Cruces E, Sánchez Á, Ferrero JJ, Ponce F (2008) Dinámica poblacional y daños de *Curculio elephas* Gyllenhal (Col.: Curculionidae), *Cydia fagiglandana* Zeller, *Cydia triangulella* Goeze y *Pammene fasciana* L.(Lep.: Tortricidae) sobre *Quercus* y *Castanea* en Extremadura. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 34: 329-342.
- Uchiyama K, Fujii S, Ishizuka W, Goto S, Tsumura Y (2013) Development of 32 EST-SSR markers for *Abies firma* (Pinaceae) and their transferability to related species. *Applications in Plant Sciences* 1: 1200464.
- Valdés B, Talavera S, Fernández-Galiano E (1987) En: *Flora Vascular de Andalucía Occidental*. Vol. 1, p 159, Barcelona: Ketres Editora S.A.
- Vargas-Osuna E, Aldebis HK, Alanís R, Rodríguez J, García M (2003) Las plagas de los castaños en Andalucía. En: *El castaño en Andalucía*. Junta de Andalucía. Consejería del Medio Ambiente, pp. 139-143.
- Varshney RK, Graner A, Sorrells ME (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology* 23: 48-55.
- Viggiani G y Nugnes F (2010) Description of the larval stages of *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera: Cynipidae), with notes on their phenology. *Journal of Entomological and Acarological Research* 42: 39-45.

- Villani F, Pigliucci M, Benedettelli S, Cherubini M (1991) Genetic differentiation among Turkish chestnut (*Castanea sativa* Mill.) populations. *Heredity* 66: 131-136.
- Villani F, Pigliucci M, Cherubini M (1994). Evolution of *Castanea sativa* Mill, in Turkey and Europe. *Genetics Research* 63: 109-116.
- Villani F, Sansotta A, Cherubini M, Cesaroni D, Sbordoni V (1999) Genetic structure of natural populations of *Castanea sativa* in Turkey: evidence of a hybrid zone. *Journal of Evolutionary Biology* 12: 233-244.
- Weir BS y Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of populations structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Zimmerer KS (2010) Biological diversity in agriculture and global change. *Annual Review of Environment and Resources* 35: 137-166.

