

## TESIS DOCTORAL



### **TÍTULO DE LA TESIS DOCTORAL**

**“Caracterización funcional de una colección de germoplasma de olivo silvestre para la mejora del olivar”.** La Tesis Doctoral está conformada por compendio de publicaciones de alta relevancia científica, cumpliendo con lo establecido en la normativa vigente referente a Estudios de Doctorado de la Universidad de Sevilla.

**DOCTORANDO:** Pablo Díaz Rueda

**PROGRAMA DE DOCTORADO:** “Biología Integrada” de la Universidad de Sevilla (US).

**DIRECTORES:** Dr. José Manuel Colmenero Flores, científico titular del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IRNAS-CSIC) y la Dra. María Nieves Capote Maínez, investigadora principal del Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA “Las Torres”).

**TUTORA:** Dra. María Rosario Álvarez Morales, profesora titular del área de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla.

**CENTRO DE TRABAJO Y FINANCIACION:** Esta tesis doctoral se ha realizado en el departamento de Biotecnología vegetal dentro del grupo de Regulación Iónica e Hídrica en plantas (RIH) del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IRNAS-CSIC). Ha sido financiado con el proyecto Recupera-2020, FEDER-MINECO (Ref. 20134R089), mediante los proyectos intramurales del CSIC: CSIC-201640E069, CSIC-201740E041, CSIC-201940E077 y CSIC-202040E057, y con un contrato de la empresa 'Viveros Sevilla S.A.' que ha cofinanciado esta investigación.

**FECHA Y LUGAR DE LECTURA:** 15 de julio de 2022. Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.

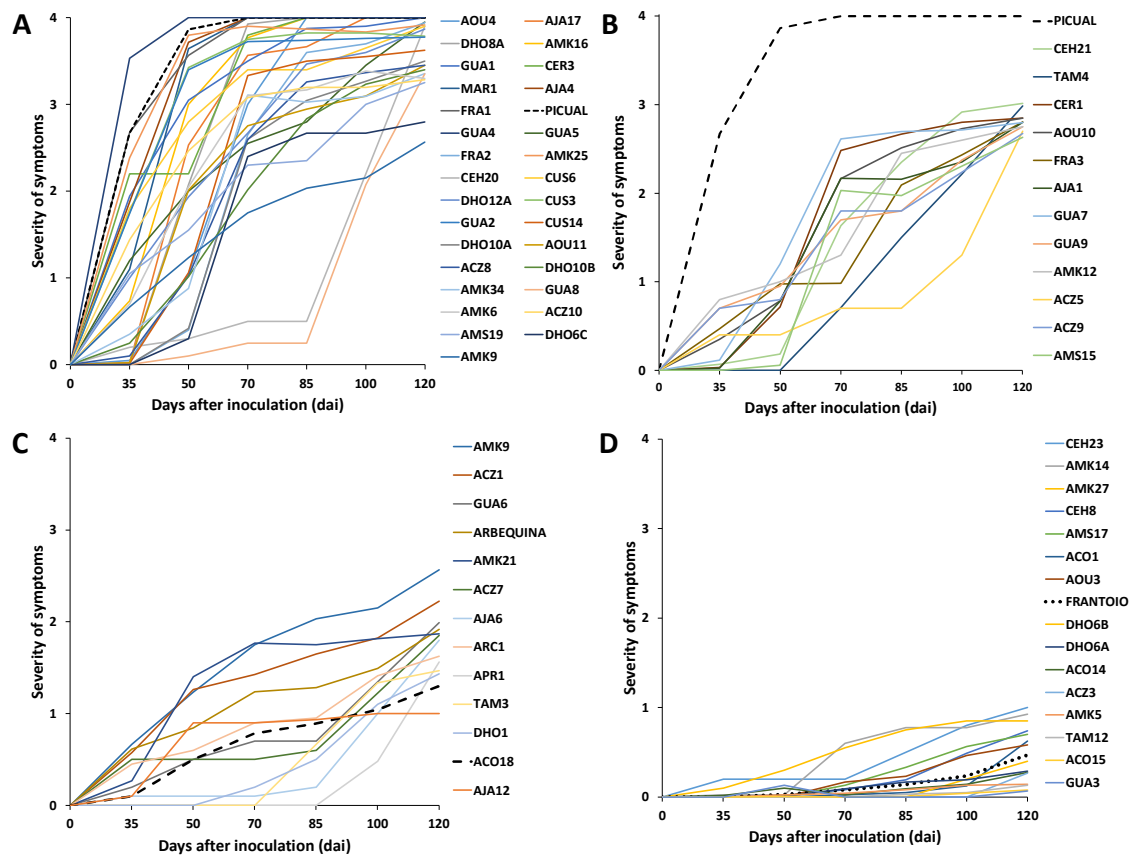
**COMPOSICIÓN DEL TRIBUNAL:** Alfonso Moriana Elvira (Presidente), Pilar Rallo Morillo (Secretaria), María del Pilar Cordovilla Palomares (Vocal), Francisco Javier López Escudero (Vocal) y María Ángeles Forner Giner (Vocal).

**CALIFICACIÓN:** Sobresaliente *cum laude*.

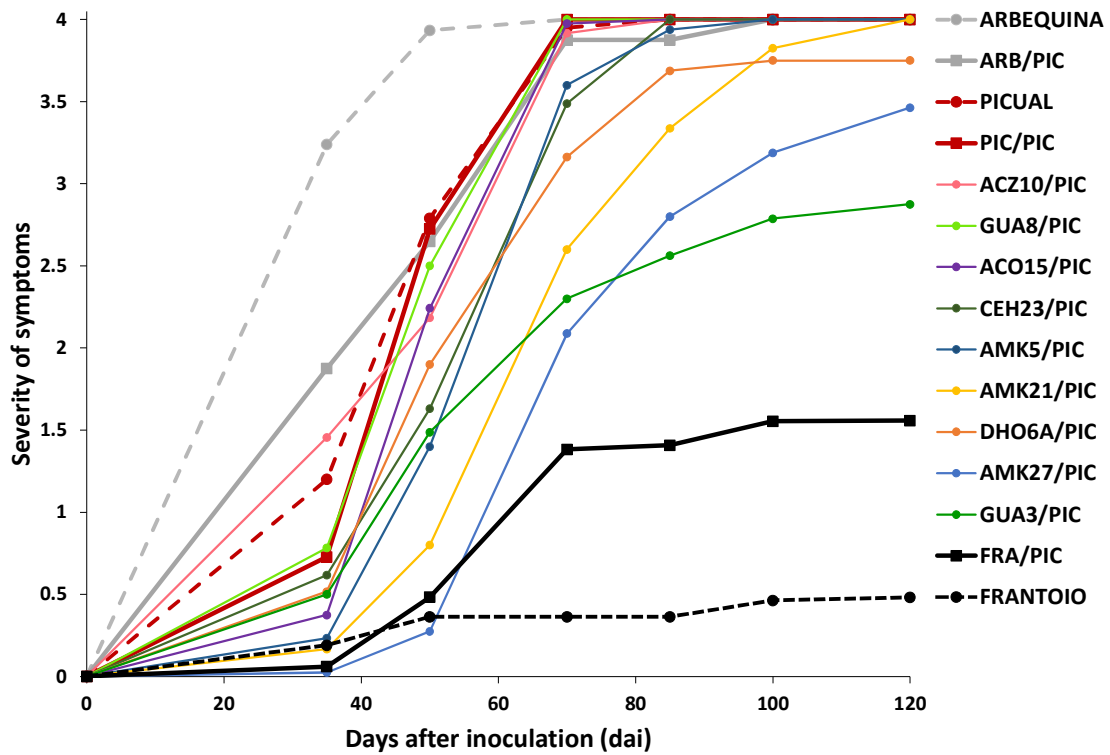
#### **RESUMEN:**

En esta tesis doctoral se ha llevado a cabo la obtención y caracterización morfológica, fisiológica y molecular de una colección de germoplasma de variedades silvestres de olivo pertenecientes a las distintas subespecies de *Olea europaea*. Se realizaron prospecciones directas del material vegetal de partida (semillas procedentes de árboles madre) en distintas regiones de la cuenca mediterránea y también se recolectaron semillas en diferentes bancos mundiales de germoplasmas de olivo. A continuación, se puso a punto el proceso de conservación del germoplasma *in-vitro*, incluyendo el establecimiento, multiplicación, crecimiento y conservación de estos genotipos silvestres, así como de diferentes cultivares maduros, generándose así la colección SILVOLIVE. Se llevó a cabo el estudio de las características lumínicas óptimas para el cultivo *in-vitro* del olivo mediante el empleo de luces LEDs. Una vez establecida la colección y obtenido el número adecuado de individuos de cada genotipo silvestre, los microtallos se enraizaron y aclimataron *ex-vitro*. Una vez crecidas las plantas durante al menos un año, los genotipos silvestres se caracterizaron genotípicamente y fenotípicamente. Se constató una alta variabilidad genética y morfológica en la colección. Al comprobar que algunos genotipos eran capaces de transmitir caracteres de vigor reducido a la variedad 'Picual' injertada sobre ellos, se planteó su potencial uso como portainjertos para sistemas de cultivo intensivo y superintensivo. Además, se estudió el consumo hídrico de los distintos genotipos silvestres bajo condiciones de irrigación óptima (capacidad de campo) y bajo riego deficitario o déficit hídrico moderado (60%

de capacidad de campo), demostrando la existencia de genotipos diferenciados por el consumo hídrico y la tolerancia al déficit hídrico. Estos resultados fueron la base para la caracterización fisiológica de la colección SILVOLIVE llevada a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Antonio Díaz Espejo del IRNAS-CSIC y publicada por Hernández-Santana *et al.*, (2019). Posteriormente se evaluó el uso potencial de los genotipos silvestres como portainjertos capaces de reducir el vigor de la variedad injertada en condiciones controladas de invernadero y en condiciones de campo en cultivo de alta densidad. Por un lado, se injertaron los cultivares 'Picual' y 'Arbequina' sobre los genotipos silvestres en maceta, y posteriormente se traspasaron a campo. Paralelamente, los genotipos silvestres sin injertar se plantaron bajo un marco de plantación super-intensivo y se realizó un estudio de vigor entre 2015 y 2018. Ello permitió seleccionar en 2020 los genotipos de bajo vigor que se injertaron con el cultivar 'Arbequina' en campo, en condiciones de alta densidad de plantación, identificándose portainjertos enanizantes capaces de transmitir vigor reducido a los cultivares injertados. En relación al uso potencial de los genotipos silvestres como portainjertos para el control de la Verticilosis, se evaluó su susceptibilidad al patotipo defoliante de *V. dahliae*, lo que permitió identificar genotipos resistentes al hongo que no presentaban síntomas de la enfermedad, o los síntomas eran reducidos, y limitaban el desarrollo del hongo mediante dos estrategias (resistencia o prevención de la proliferación del hongo frente a tolerancia al hongo; Figura 1). Por último, el cultivar susceptible 'Picual' se injertó sobre genotipos silvestres clasificados previamente como de susceptibilidad muy reducida a *V. dahliae* para determinar la capacidad de los genotipos de transferir la resistencia al cultivar injertado. Se observó que los portainjertos resistentes, pero no los tolerantes, controlaban la aparición de síntomas de Verticilosis en el cultivar 'Picual' (Figura 2).



**FIGURA 1** | Evolución de la gravedad de los síntomas registrados en genotipos de olivo silvestre inoculados con el aislado defoliante VD117 de *Verticillium dahliae*. La gravedad de los síntomas se evaluó en una escala de calificación de 0 a 4 según el porcentaje de síntomas de máxima intensidad (MIS): clorosis, necrosis o defoliación de hojas y brotes: 0 = 0% MIS o sin síntomas; 1 = 25% MIS; 2 = 50% MI; 3 = 75% MI; 4 = 100% MIS o plantas muertas. (A) extremadamente susceptible, (B) susceptible, (C) moderadamente susceptible y (D) genotipos resistentes. El cultivar extremadamente susceptible 'Picual' se mantuvo en el panel 1B como referencia. Los cultivares de control de referencia 'Picual', 'Arbequina' y 'Frantoio' se indican en líneas discontinuas.



**FIGURA 2** | Progreso de la severidad de síntomas registrada en el cultivar 'Picual' injertado sobre portainjertos silvestres de olivo inoculados con el aislado defoliante VD117 de *Verticillium dahliae*. La severidad de los síntomas se evaluó en una escala de calificación de 0 a 4, de acuerdo con el porcentaje de Síntomas de Máxima Intensidad (MIS): apoplejía, clorosis y necrosis o defoliación de los brotes: 0 = 0% MIS o sin síntomas; 1 = 25% MIS; 2 = 50% MI; 3 = 75% MI; 4 = 100% MIS o plantas muertas. Los cultivares de referencia 'Picual', 'Arbequina' y 'Frantoio' no injertados se indican con líneas discontinuas.



**Fotografía del acto de Lectura y Defensa.** De izquierda a derecha: Francisco Javier López Escudero, María Ángeles Forner Giner, María Rosario Álvarez Morales, José Manuel Colmenero Flores, María del Pilar Cordovilla Palomares, Pablo Díaz Rueda, Alfonso Moriana Elvira y Pilar Rallo Morillo.

**Publicaciones derivadas de este trabajo:**

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis han sido publicados en revistas indexadas (SCI, Science Citation Index) *de primer cuartil (Q1) y primer decil (D1)*:

- **Díaz-Rueda, P.**, Peinado-Torrubia P., Durán-Gutiérrez F.J., Alcántara-Romano P., Aguado A., Capote N., Colmenero-Flores J.M. (2022). Avoidant/resistant rather than tolerant olive rootstocks are more effective in controlling Verticillium wilt. *Frontiers in Plant Science* (en prensa)
- **Díaz-Rueda, P.**, Cantos-Barragán, M., Colmenero-Flores, J.M. (2021). Growth Quality and Development of Olive Plants Cultured *In-Vitro* under Different Illumination Regimes. *Plants*, 10, 2214. <https://doi.org/10.3390/plants10102214>. (Q1)

- **Díaz-Rueda, P.**, Aguado, A., Romero-Cuadrado, L., Capote, N., Colmenero-Flores, J.M. (2021). Wild Olive Genotypes as a Valuable Source of Resistance to Defoliating *Verticillium dahliae*. *Frontiers in Plant Science* 12, 662060. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.662060>. (D1)
- **Díaz-Rueda, P.**, Franco-Navarro, J., Messoro, R., Espartero, J., Rivero-Núñez, C., Aleza, P., Capote, N., Cantos, M., García-Fernández, J., De Cires, A., Belaj, A., León, L., Besnard, G., and Colmenero-Flores, J.M. (2020). SILVOLIVE, a Germplasm Collection of Wild Subspecies With High Genetic Variability as a Source of Rootstocks and Resistance Genes for Olive Breeding. *Frontiers in Plant Science* 11, 629. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00629>. (D1)
- León, L., **Díaz-Rueda, P.**, Belaj, A., De la Rosa, R., Carrascosa, C., and Colmenero-Flores, J. M. (2020). Evaluation of early vigor traits in wild olive germplasm. *Scientia Horticulturae*. 264, 109–157. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109157>. (D1)
- Hernández-Santana, V., **Díaz-Rueda, P.**, Díaz-Espejo, A., Raya-Sereno, M. D., Gutiérrez-Gordillo, S., Montero, A., Pérez-Martín A., Colmenero-Flores J.M. and Rodríguez-Domínguez C.M. (2019). Hydraulic traits emerge as relevant determinants of growth patterns in wild olive genotypes under water stress. *Frontiers in Plant Science* 10, 291. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00291>. (D1)

**Otras publicaciones en revistas SCI indirectamente relacionadas con la tesis doctoral:**

- Franco-Navarro, J.D., **Díaz-Rueda, P.**, Rivero-Núñez, C.M., Brumós, J., Rubio-Casal, A.E., de Cires, A., Colmenero-Flores, J.M., Rosales, M.A. (2021). Chloride nutrition improves drought resistance by enhancing water deficit avoidance and tolerance mechanisms. *Journal of Experimental Botany* 72, 5246–5261. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab143>. (D1)
- Rosales, M.A., Franco-Navarro, J.D., Peinado-Torrubia, P., **Díaz-Rueda, P.**, Álvarez, R., Colmenero-Flores, J.M. (2020). Chloride Improves Nitrate Utilization and NUE in Plants. *Frontiers in Plant Science* 11, 442. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00442>. (D1)
- Cubero-Font, P., Maierhofer, T., Jaslan, J., Rosales, M.A., Espartero, J., **Díaz-Rueda, P.**, Müller, H.M., Hürter, A.-L., AL-Rasheid, K.A.S., Marten, I., Hedrich, R., Colmenero-Flores,

J.M., Geiger, D. (2016). Silent S-Type Anion Channel Subunit SLAH1 Gates SLAH3 Open for Chloride Root-to-Shoot Translocation. *Current Biology* 26, 2213–2220.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.06.045>. (D1)

### **Protección y registro de la variedad de olivo OESP-A8**

En el Proyecto Recupera2020 y en colaboración con la empresa adjudicataria (Viveros Sevilla S.A) se consolidó SILVOLIVE como Grupo Operativo (Nº de registro 2016002000629) donde surgió el registro de la variedad de portainjerto de olivo OESP-A8. **'OESP-A8: Portainjerto de origen silvestre para cultivo intensivo del olivar'**.

INVENTORES/AS (p.o. de firma): José M. Colmenero Flores, Carlos Carrascosa Ferrándiz, **Pablo Díaz Rueda**.

TÍTULO: OESP-A8, un Portainjerto de origen silvestre para cultivo intensivo del olivar

Nº DE REGISTRO: NRVP 20155223 (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación)

Nº DE REF. CSIC: *PG 200 01\_F01 ed05 de 15/04/2015*

PAÍS DE PRIORIDAD: España

ENTIDAD TITULAR: CSIC, Viveros Sevilla, S.A.