

RESEÑA TESIS DOCTORAL

TÍTULO DE LA TESIS DOCTORAL: El microbioma del olivo y su papel en la respuesta de la planta a la Verticilosis causada por *Verticillium dahliae*: factores determinantes y modificadores

DOCTORANDO: Manuel Anguita Maeso

PROGRAMA DE DOCTORADO: Ingeniería Agraria, Alimentaria, Forestal y de Desarrollo Rural Sostenible (Universidad de Córdoba).

DIRECTORES: Blanca B. Landa del Castillo y Juan A. Navas Cortés

TUTORA: María Esperanza Sánchez Hernández

CENTRO DE TRABAJO Y FINANCIACIÓN: Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Grupo de Investigación Fitopatología de Sistemas Agrícolas Sostenibles perteneciente al Grupo PAIDI AGR-136 'Sanidad Vegetal' del Departamento de Protección de Cultivos del Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC) de Córdoba. Manuel Anguita Maeso ha sido beneficiario de un contrato predoctoral BES-2017-082361 en el marco del programa para la formación de doctores del Subprograma Estatal de Formación del Programa Estatal de Promoción del Talento y su Empleabilidad, Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016. Además, los trabajos incluidos en esta Tesis Doctoral han sido financiados por los Proyectos de Investigación AGL2016-75606-R y PID2020-114917RB-I00 (AEI-Ministerio de Ciencia e Innovación)

FECHA Y LUGAR DE LECTURA: La presentación y defensa de la Tesis Doctoral tuvo lugar en el Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), el día 17 de febrero de 2023.

COMPOSICIÓN DEL TRIBUNAL: Emilio Montesinos Seguí (Presidente), Enrique Quesada Moraga (Secretario) y Maria Saponari (Vocal).

CALIFICACIÓN: Sobresaliente *cum laude*.

RESUMEN:

El olivo (*Olea europaea* subsp. *europaea*) es uno de los árboles cultivados más antiguos del mundo y desempeña un papel fundamental en la sostenibilidad de los ecosistemas mediterráneos. Sin embargo, en la actualidad, la salud de los olivares se está viendo seriamente amenazada por un notable incremento, tanto en incidencia como en severidad, de enfermedades causadas por diversos patógenos entre los que destaca la bacteria patógena *Xylella fastidiosa* y el hongo vascular del suelo *Verticillium dahliae*. Aunque el método más práctico y económicamente eficiente para el manejo de las enfermedades vasculares del olivo es el uso de cultivares resistentes, la mayoría de los cultivares de olivo más ampliamente utilizados en la cuenca mediterránea presentan una reacción de moderada a altamente susceptible a las variantes más virulentas de estos patógenos. Por lo tanto, es necesaria una estrategia de gestión que combine medidas preventivas y paliativas para mitigar el desarrollo de la enfermedad, entre las que se incluye la explotación del microbioma beneficioso asociado a las plantas mediante el uso de agentes de control biológico que puede representar una estrategia sostenible y respetuosa con el medio ambiente a largo plazo.

Esta Tesis Doctoral se ha centrado en la caracterización de las comunidades microbianas que habitan el xilema del olivo optimizando los enfoques metodológicos para su estudio y determinando el efecto de los principales factores bióticos y abióticos que son claves en la configuración de su estructura, diversidad y las interacciones existentes entre los componentes del microbioma. Para ello, como primer paso, se optimizó un protocolo de secuenciación masiva (NGS) para el análisis de comunidades microbianas asociadas al xilema, que incluía la evaluación de: i) el procedimiento de extracción del microbioma cuando se utiliza savia o tejido xilemático, ii) la influencia de los kits de extracción de ADN y iii) la elección de los cebadores de PCR dirigidos al ARNr 16S. Asimismo, se llevó a cabo la caracterización de la composición iónica y metabolómica de la savia para la identificación de los requerimientos nutricionales potenciales de los microorganismos limitados al xilema junto con el efecto de la edad y el genotipo de la planta sobre la composición bacteriana y química de la savia en olivo. Otros aspectos relevantes de esta Tesis Doctoral incluyeron la comparación de enfoques cultivo dependientes e independientes para el análisis de la microbiota del xilema, incluido el aislamiento y *cultivo in vitro* del núcleo central de bacterias que habitan en la savia. Además, se ha dilucidado si la propagación *in vitro* del olivo puede alterar la diversidad y composición del microbioma que habita en el xilema y si esos cambios pueden modificar la respuesta de resistencia que muestra un clon de olivo silvestre al patotipo D altamente virulento de *V. dahliae*. Finalmente, en esta Tesis Doctoral se ha caracterizado la estructura y diversidad del microbioma del olivo en condiciones naturales y sus posibles factores determinantes y modificadores, incluidos diversos factores asociados a la planta huésped, como el nicho de ésta y su genotipo, así como la influencia del medio ambiente incluyendo las condiciones climáticas, del suelo y agronómicas del olivar y la estación del año en que se lleva a cabo el muestreo.

En conclusión, esta Tesis Doctoral ha establecido los enfoques metodológicos para esclarecer los factores bióticos y abióticos que afectan a las comunidades microbianas del xilema de olivo. Asimismo, se han caracterizado algunos componentes clave del microbioma del xilema, sentando las bases para su aislamiento y cultivo. Estos microorganismos podrían utilizarse para la creación de un consorcio de microorganismos habitantes del xilema que pueden inocularse artificialmente en los vasos xilemáticos de plantones de olivo para modificar su microbioma xilemático nativo y así hacer frente a la infección por patógenos vasculares o mejorar su desarrollo fisiológico y su crecimiento.

Trabajos derivados de la Tesis Doctoral:

1. **M. Anguita-Maeso**, J. A. Navas-Cortés, B. B. Landa, Insights into the Methodological, Biotic and Abiotic Factors Influencing the Characterization of Xylem-Inhabiting Microbial Communities of Olive Trees. *Plants*. 12, 912 (2023). doi:10.3390/plants12040912. JCR Impact Factor (2021): 4.658; JIF Rank: 39/238. First Quartile (Q1) in Plant Sciences Category.

2. **M. Anguita-Maeso**, C. Haro, J. A. Navas-Cortés, B. B. Landa, Primer Choice and Xylem-Microbiome-Extraction Method Are Important Determinants in Assessing Xylem Bacterial Community in Olive Trees. *Plants*. 11, 1320 (2022). doi: 10.3390/plants11101320. JCR Impact Factor (2021): 4.658; JIF Rank: 39/238. First Quartile (Q1) in Plant Sciences Category.

3. **M. Anguita-Maeso**, C. Haro, M. Montes-Borrego, L. De La Fuente, J. A. Navas-Cortés, B. B. Landa, Metabolomic, ionic and microbial characterization of olive xylem sap reveals differences according to plant age and genotype. *Agronomy*. 11, 1179 (2021). doi:

10.3390/agronomy11061179. JCR Impact Factor (2021): 3.949; JIF Rank: 18/90. First Quartile (Q1) in Agronomy Category.

4. **M. Anguita-Maeso**, J. L. Trapero-Casas, C. Olivares-García, D. Ruano-Rosa, E. Palomo-Ríos, R. M. Jiménez-Díaz, J. A. Navas-Cortés, B. B. Landa, *Verticillium dahliae* inoculation and *in vitro* propagation modify the xylem microbiome and disease reaction to *Verticillium* wilt in a wild olive genotype. *Front. Plant Sci.* 12, 250 (2021). doi: 10.3389/fpls.2021.632689. JCR Impact Factor (2021): 6.627; JIF Rank: 20/238. First Quartile (Q1) in Plant Sciences Category.

5. C. Haro*, **M. Anguita-Maeso***, M. Metsis, J. A. Navas-Cortés, B. B. Landa, Evaluation of established methods for DNA extraction and primer pairs targeting 16S rRNA gene for bacterial microbiota profiling of olive xylem sap. *Front. Plant Sci.* 12, 296 (2021). doi: 10.3389/fpls.2021.640829. JCR Impact Factor (2021): 6.627; JIF Rank: 20/238. First Quartile (Q1) in Plant Sciences Category.

6. **M. Anguita-Maeso**, C. Olivares-García, C. Haro, J. Imperial, J. A. Navas-Cortés, B. B. Landa, Culture-dependent and culture-independent characterization of the olive xylem microbiota: effect of sap extraction methods. *Front. Plant Sci.* 10, 1708 (2020). doi: 10.3389/fpls.2019.01708. JCR Impact Factor (2020): 5.754; JIF Rank: 17/235. First Quartile (Q1) in Plant Sciences Category.



Fotografía del acto de lectura y defensa. De izquierda a derecha: Juan A. Navas (Director), Blanca B. Landa (Directora), Maria Saponari (Vocal), Emilio Montesinos (Presidente), Manuel Anguita (Doctorando), Enrique Quesada (Secretario).