

## **TESIS DOCTORAL**

### **“Diversidad de *Castanea sativa* Mill. en base a marcadores genéticos relacionados con el estrés hídrico y la tolerancia a *Phytophthora cinnamomi* Rands”**

**DOCTORANDO:** Francisco Alcaide Romero, del Dpto. de Ingeniería del Medio Agronómico y Forestal, Ingeniería Forestal y del Medio Natural, Universidad de Extremadura.

**DIRECTORES:** M.<sup>a</sup> Ángela Martín Cuevas, Profesora Titular de Universidad de la Universidad de Córdoba y Alejandro Solla Hach, Catedrático de la Universidad de Extremadura.

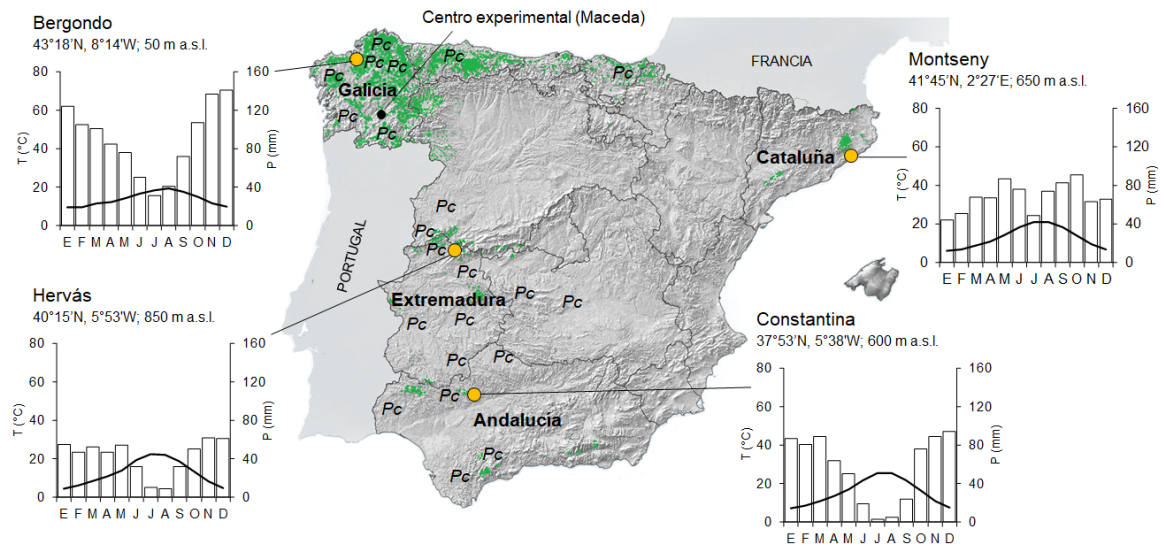
**FECHA Y LUGAR DE LECTURA:** 1 de abril de 2022.

## **RESUMEN**

*Castanea sativa* Mill. (castaño dulce o europeo) es una especie forestal multipropósito y la única especie de su género nativa de Europa, donde es importante por sus valores ecológicos y se cultiva para la producción de madera y fruto en sotos injertados. La especie está amenazada por la ocurrencia cada vez más frecuente de eventos climáticos extremos como sequías prolongadas, especialmente en los países mediterráneos. La especie también se ve afectada por la enfermedad de "la tinta", consistente en la podredumbre radicular causada por el oomiceto edáfico de origen asiático *Phytophthora cinnamomi* Rands.

La diversidad genética es importante para el mantenimiento de la viabilidad y el potencial adaptativo de las especies. La evolucionabilidad es la capacidad de un sistema biológico para evolucionar a través de la selección natural y la adaptación local. Por tanto, se espera que las poblaciones de árboles con una plasticidad fenotípica y variación genética elevadas no tengan dificultad para reaccionar y adaptarse a los cambios ambientales. La adaptación local y la diferenciación significativa de genes implicados en rasgos adaptativos (por ejemplo, la tolerancia a la sequía o la resistencia a *P. cinnamomi*) son elementos clave para permitir la adaptabilidad de las poblaciones forestales a futuros escenarios. La genómica proporciona información útil sobre cómo la selección puede dar forma a patrones de diversidad genética funcional. Además, las actuales herramientas moleculares arrojan luz sobre la evolución de poblaciones forestales ante los factores de estrés del cambio global. Los marcadores microsatélites de secuencia expresada (siglas en inglés EST-SSR) se han convertido en uno de los más utilizados para estudiar la diversidad genética adaptativa de las poblaciones.

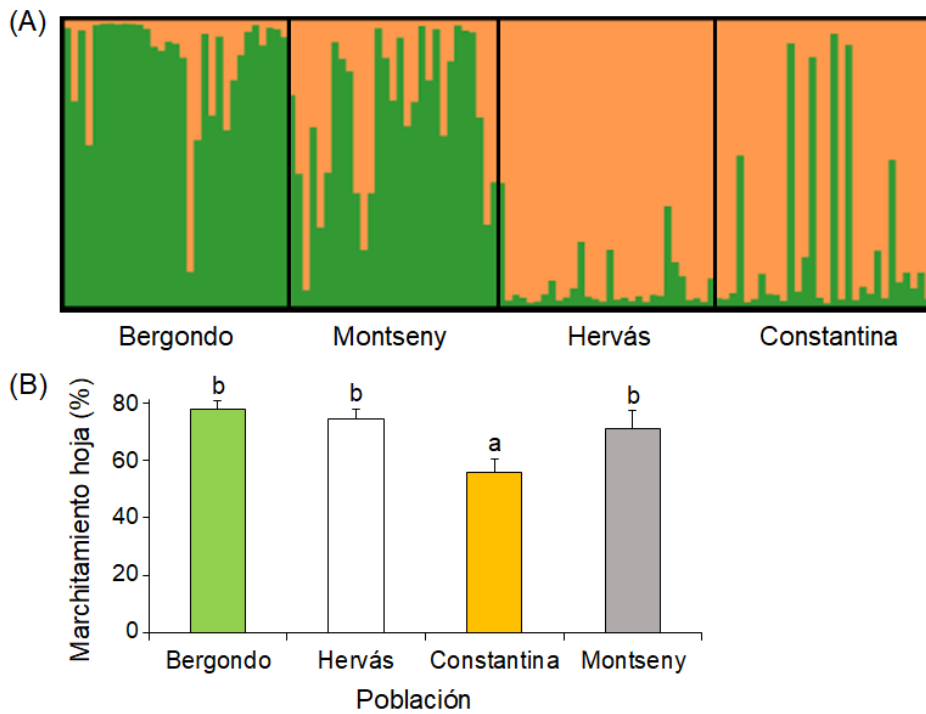
El actual escenario de cambio global en poblaciones españolas de castaño hace urgente la evaluación de su diversidad genética funcional asociada a la sequía y resistencia a *P. cinnamomi* con el fin de identificar genotipos tolerantes. En el año 2015, se concedió un Proyecto de Investigación del Plan Nacional a la Universidad de Extremadura para seleccionar árboles nativos de *C. sativa* resistentes a *P. cinnamomi* y/o tolerantes a la sequía. Dentro del contexto de esta Tesis Doctoral, se pretendía evaluar la diversidad fenotípica y genética de *C. sativa* asociada al estrés por sequía (Alcaide *et al.*, 2019; Capítulo I) y a la resistencia a *P. cinnamomi* (Alcaide *et al.*, 2020; Capítulo II). Se utilizaron cuatro poblaciones naturales de la especie situadas en regiones de España con condiciones climáticas contrastantes y sometidas a diferentes presiones de selección al impacto de *P. cinnamomi* (Figura 1). Se observó una sorprendente resistencia a *P. cinnamomi* en plántulas de castaño procedentes de la población situada en Galicia. Por ello, se planteó la hipótesis de que genes de resistencia procedentes de germoplasma de castaños asiáticos pudieran estar detrás de esta resistencia, y se comprobó experimentalmente (Alcaide *et al.*, 2021; Capítulo III).



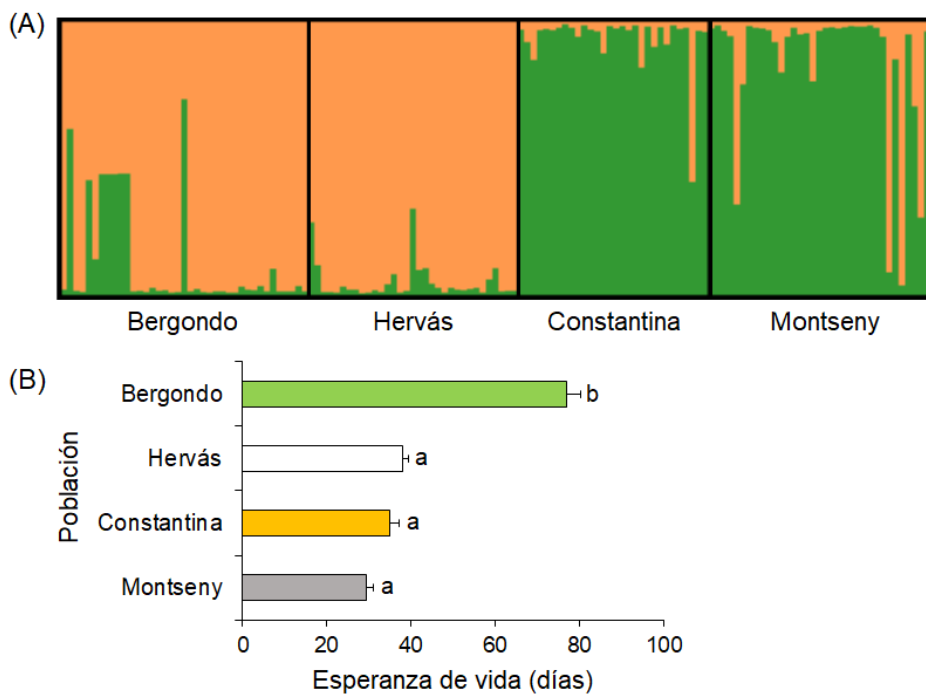
**Figura 1.** Distribución de *Castanea sativa* en España (áreas verdes), climogramas y localización de las cuatro poblaciones de estudio y centro experimental. Se muestran los puntos calientes de *Phytophthora cinnamomi* según la bibliografía e informes no publicados.

En el Capítulo I de la Tesis se han transferido con éxito por primera vez a *Castanea* ocho marcadores EST-SSR desarrollados en *Quercus* spp. asociados al estrés por sequía. Para validar los marcadores y probar su potencial para la selección temprana de material vegetal tolerante a dicho estrés, se sometió la descendencia de las poblaciones estudiadas a estrés hídrico y se evaluó su tolerancia. Los marcadores EST-SSR y el marchitamiento de las hojas de las plántulas tras el tratamiento revelaron un gradiente de variación norte-sur en las poblaciones (Figura 2). La alta variabilidad genética interpoblacional indicó el gran potencial de respuesta de *C. sativa* para adaptarse a cambios de disponibilidad hídrica. Además, las comparaciones  $Q_{ST}-F_{ST}$  indicaron evidencia de que la selección de árboles tolerantes a la sequía actuó espacialmente de forma heterogénea. El marcador *FIR080* fue identificado como un locus bajo selección positiva. Al evaluar la tolerancia fenotípica a la sequía de la descendencia, los marcadores *GOT004* y *GOT045* se identificaron como loci bajo selección equilibrada y *FIR059* como locus bajo selección positiva. Este locus asociado a mecanismos de regulación durante los procesos de adaptación al estrés hídrico mostró tres alelos privados para los individuos susceptibles a la sequía (143, 160 y 179) y dos alelos para los individuos tolerantes (152 y 176), por lo que podría considerarse como un marcador candidato para predecir la tolerancia de *C. sativa* a la sequía en árboles no estresados.

En el Capítulo II se han transferido con éxito nueve marcadores EST-SSR desarrollados en *Castanea* spp. asociados a la resistencia a *P. cinnamomi*. Para evaluar el potencial de los nueve EST-SSRs en la selección temprana de material vegetal resistente al patógeno, se inoculó con *P. cinnamomi* la descendencia de los individuos seleccionados. Los marcadores EST-SSR y la esperanza de vida de las plántulas tras la inoculación con el patógeno revelaron respuestas significativamente diferentes de las poblaciones de castaño a *P. cinnamomi* (Figura 3), indicando la capacidad de respuesta potencial de las poblaciones de castaño para experimentar una rápida evolución adaptativa. Los patrones genéticos reflejaron dos agrupaciones evolutivamente significativas de las poblaciones (Figura 3A), coincidiendo con la diferente presión selectiva del oomiceto entre regiones. El estudio también identificó el marcador *CsPT\_0005* bajo selección positiva que podría ser responsable de la adaptación a *P. cinnamomi* y candidato para predecir la resistencia a *P. cinnamomi* en castaños no inoculados.

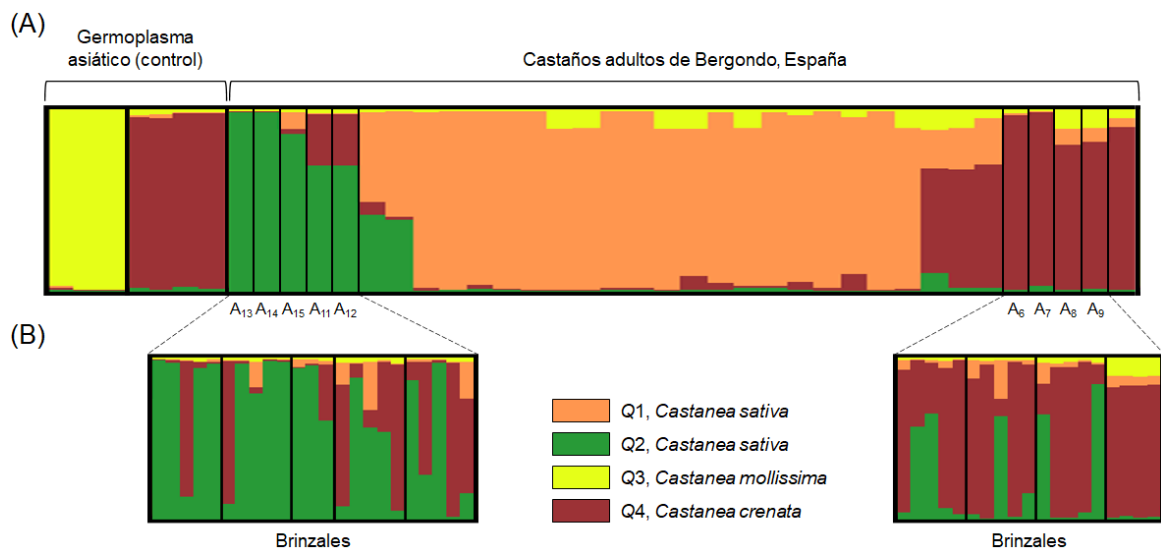


**Figura 2. (A):** Estructura de las poblaciones inferida para 136 individuos estimada mediante STRUCTURE y datos de ocho EST-SSRs para  $K = 2$ . Cada individuo está representado por una línea vertical y las poblaciones están separadas por una línea negra vertical; **(B):** Marchitamiento de las hojas de plántulas de un año de edad de diferentes poblaciones después de un mes de tratamiento de estrés hídrico severo. Las barras verticales son errores estándar y las letras diferentes indican diferencias significativas de los valores medios entre poblaciones ( $P < 0,05$ ).



**Figura 3. (A):** Estructura de las poblaciones inferida para 137 individuos estimada mediante STRUCTURE y datos de nueve EST-SSRs para  $K = 2$ . Cada individuo está representado por una línea vertical y las poblaciones están separadas por una línea negra vertical; **(B):** Esperanza de vida media de plántulas de un año de edad inoculadas con *Phytophthora cinnamomi* de diferentes poblaciones. Las barras horizontales son errores estándar y las letras diferentes indican diferencias significativas de los valores medios entre poblaciones ( $P < 0,001$ ).

En el Capítulo III se evaluó la posible presencia de germoplasma asiático procedente de *Castanea* spp. en la población gallega de Bergondo y se desarrolló un método para detectar introgresión. En Europa existe evidencia de introgresión por las especies asiáticas de castaño (*C. crenata* y *C. mollissima*) en la autóctona *C. sativa* mediante la hibridación espontánea y posterior retrocruzamiento. Un total de 34 árboles adultos y 42 brinzales fueron genotipados utilizándose 13 marcadores neutrales SSR en una masa en la que se habían plantado individuos de *C. crenata* y *C. mollissima* resistentes a la tinta hacia 1940. Los resultados han clasificado el 70,6% de los individuos adultos y el 28,6% de los juveniles como *C. sativa* puros (Figura 4). La mayoría de los juveniles fueron híbridos interespecíficos de *C. sativa* × *C. crenata* (> 40%) y cerca del 10% de *C. crenata* × *C. mollissima* (Figura 4B). Se han catalogado seis nuevos alelos privados de *C. crenata*. El estudio cuantifica, por primera vez en Europa, la introgresión de germoplasma asiático en un bosque natural de *C. sativa* y examina el grado de introgresión en la descendencia. Frente al cambio global, la descendencia de la población estudiada podría beneficiarse de la transferencia de alelos implicados en la resistencia a la tinta, pero, por el contrario, podría verse perjudicada por la adquisición de germoplasma asiático asociado a una menor tolerancia a la sequía.



**Figura 4.** Asignación bayesiana de genotipos que revela la introgresión de germoplasma asiático en un bosque de castaños del noroeste de España. El estudio incluyó el ADN de 3 individuos de *Castanea mollissima*, 4 *C. crenata* y 34 castaños adultos (A), y 42 brinzales de castaño procedentes de nueve árboles madre (B). El software STRUCTURE basado en 13 datos SSR reveló un  $K = 4$ . Cada columna representa un árbol individual, y los colores de cada columna indican la proporción de pertenencia estimada de los árboles a los grupos genéticos Q1 y Q2 (en naranja y verde, respectivamente, asignados a *C. sativa*), Q3 (en amarillo, asignado a *C. mollissima*) y Q4 (en marrón, asignado a *C. crenata*).

Se establece por primera vez en *C. sativa* un vínculo entre la estructura de las poblaciones y las respuestas adaptativas a la selección inducida por el cambio global actual. Los resultados evidencian una elevada capacidad de respuesta de las poblaciones españolas de castaño para adaptarse a escenarios futuros, necesaria para conservar las masas y mejorar la especie.

## Publicaciones derivadas de la Tesis

Alcaide F, Solla A, Mattioni C, Castellana S & Martín MÁ (2019). Adaptive diversity and drought tolerance in *Castanea sativa* assessed through EST-SSR genic markers. *Forestry*, **92**: 287–296. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpz007>

Alcaide F, Solla A, Cherubini M, Mattioni C, Cuenca B, Camisón Á & Martín MÁ (2020). Adaptive evolution of chestnut forests to the impact of ink disease in Spain. *Journal of Systematics and Evolution*, **58**: 504–516. <https://doi.org/10.1111/jse.12551>

Alcaide F, Solla A, Cuenca B & Martín MÁ (2021). Molecular evidence of introgression of Asian germplasm into a natural *Castanea sativa* forest in Spain. *Forestry*, **95**: 95–104. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpab030>



**Fotografía del acto de lectura y defensa.** El Tribunal estuvo constituido por los Dres. D. Santiago Pereira-Lorenzo (Catedrático de Universidad del Área de Producción Vegetal de la Universidad de Santiago de Compostela), D. Jose Vicente Die Ramón (Investigador Contratado Ramón y Cajal del Grupo de Investigación AGR114-Mejora Genética Vegetal de la Universidad de Córdoba) y D. Víctor Rolo Romero (Personal Investigador del Área de Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Extremadura). La Tesis fue calificada con Sobresaliente *cum laude*.