

TESIS DOCTORAL

“Resiliencia de *Castanea sativa* Mill. ante factores de estrés relacionados con el cambio global”

DOCTORANDO: Francisco Javier Dorado Reyes, del Dpto. de Ingeniería del Medio Agronómico y Forestal, Ingeniería Forestal y del Medio Natural, Universidad de Extremadura.

DIRECTORES: Alejandro Solla Hach, Catedrático de la Universidad de Extremadura y M.^a Ángela Martín Cuevas, Profesora Titular de Universidad de la Universidad de Córdoba.

FECHA Y LUGAR DE LECTURA: 10 de marzo de 2023.

RESUMEN

El castaño (*Castanea sativa* Mill.) es un árbol termófilo de clima templado que se distribuye por toda la cuenca mediterránea y es apreciado por sus múltiples aprovechamientos. El aumento de las temperaturas, las olas de calor cada vez más frecuentes y el ataque de agentes bióticos como *Phytophthora cinnamomi* Rands. (*Pc*), están diezmando su productividad y supervivencia. El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido contribuir, mediante un enfoque multidisciplinar, al conocimiento de las respuestas de *C. sativa* a factores relacionados con el cambio global, incluyendo el incremento de temperatura, las olas de calor y la combinación del incremento de temperatura y la infección por *Pc*.

En un primer artículo se describió la fisiología, el metabolismo secundario y la supervivencia de plántulas de *C. sativa* de 6 meses de edad tras su exposición a escenarios de temperatura ambiente, temperatura elevada y olas de calor, y a la posterior infección por *Pc*. Diez días después de la finalización de los escenarios de calentamiento, se cuantificó la bioquímica de las hojas y raíces de las plántulas y se evaluó el efecto de su recuperación. El crecimiento de las plántulas y la biomasa de las raíces a temperatura ambiente elevada fueron significativamente superiores a los de las plantas a temperatura ambiente y olas de calor. Siete metabolitos secundarios de hoja y tres de raíz se alteraron significativamente ante la temperatura. De forma general, los compuestos fenólicos disminuyeron en respuesta al aumento de la temperatura, y el ácido elágico en raíz aumentó. Durante la recuperación, los contenidos foliares de procianidina y catequina de las plántulas expuestas a temperatura ambiente elevada continuaron mostrando siendo bajos. La mortalidad por *Pc* fue más rápida y elevada en las plántulas expuestas a temperatura ambiente y más baja en las plántulas sometidas a temperatura ambiente elevada (Figura 1). Los cambios en el perfil de metabolitos secundarios de las plántulas en respuesta a *Pc* dependieron de los escenarios de calentamiento, con cinco compuestos en hojas y tres en raíces que mostraron una interacción significativa 'escenario de calentamiento' × '*Pc*'. El grupo de plántulas que mejor sobrevivió a la infección por *Pc* se caracterizó por un aumento del 3-O-glucurónido de quercetina, el ácido 3-feruloilquínico, el éster etílico del ácido gálico y el ácido elágico.

En el artículo II se describieron respuestas fisiológicas y bioquímicas de plántulas de *Castanea sativa* Mill. sometidas a estrés térmico. Para ello, plántulas de seis meses de tres poblaciones climáticamente contrastantes (norte, centro y sur de España; Figura 2) fueron sometidas a condiciones control y de estrés térmico durante 7 días. Los efectos del estrés térmico y su recuperación (10 días después del estrés térmico) se describieron mediante la evaluación de los síntomas foliares, el crecimiento, la mortalidad, el intercambio gaseoso foliar, la cuantificación de compuestos implicados en el metabolismo primario y secundario, y la eliminación de radicales libres 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

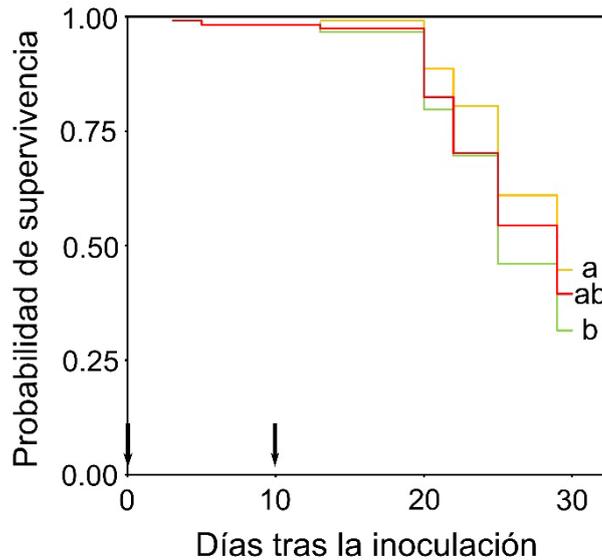


Figura 1. Probabilidades de supervivencia de plántulas de *Castanea sativa* expuestas a temperatura ambiente (verde), temperatura ambiente elevada (naranja) y olas de calor (rojo) e infectadas el día 0 con *Phytophthora cinnamomi*. El log-rank test global fue significativo con $p = 0,080$. Letras distintas indican diferencias significativas entre las curvas de supervivencia ($p < 0,05$) y las flechas indican los momentos de evaluación de los compuestos fenólicos.

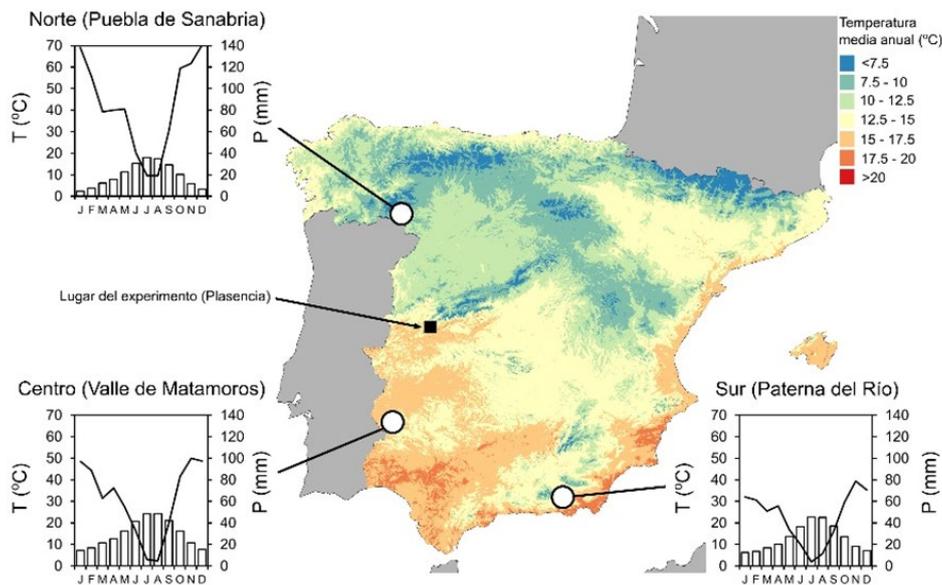


Figura 2. Temperatura media anual en España en el periodo 1940-2005 (MAPAMA), y localización y climogramas de las tres poblaciones de *Castanea sativa* estudiadas.

En respuesta al estrés, la biomasa disminuyó y la respuesta bioquímica se vio alterada en función del tejido de la planta y de la población de origen de las semillas. Las principales alteraciones del metabolismo primario se produjeron en las hojas, y se caracterizaron por un aumento de los niveles de azúcares solubles, nitrógeno y prolina, y un agotamiento del almidón. El aumento de los niveles de azúcares solubles y el agotamiento del almidón se produjo principalmente en las plántulas de la población del sur, mientras que el aumento de la prolina se produjo sólo en la

población del norte. La mayor variación en el metabolismo secundario de las plántulas se observó en el sistema radicular, aumentando los compuestos fenólicos en las raíces de las plántulas sometidas a estrés térmico. El análisis LC-MS permitió identificar y cuantificar seis compuestos inducidos por el calor, cinco de los cuales se detectaron en raíz. Se observaron respuestas bioquímicas al estrés térmico diferenciales entre poblaciones. Durante la recuperación, la mayoría de los parámetros alterados volvieron a las condiciones de control, lo que sugiere una elevada resiliencia al estrés térmico en esta especie.

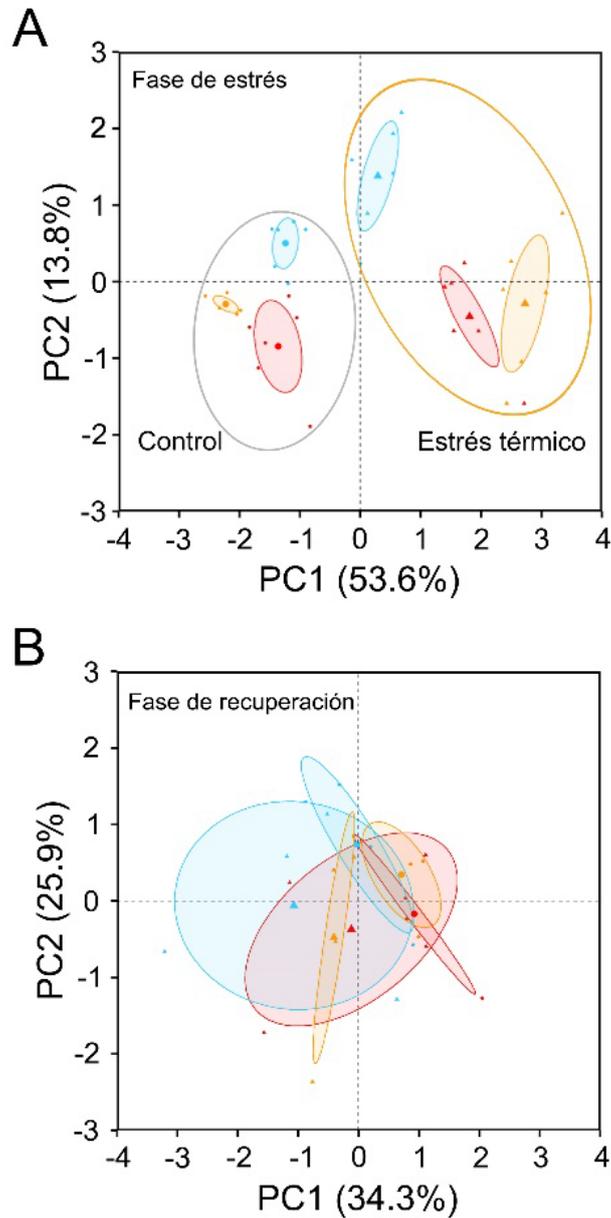


Figura 3. PCA de brinzales de *Castanea sativa* de 6 meses de edad de poblaciones norte (símbolos azules), centro (símbolos rojos) y sur (símbolos amarillos) mostrando diferencias entre tratamientos control (círculos) y estrés térmico (triángulos) en las fases de máximo estrés (**A**) y recuperación (**B**) según variables fisiológicas y bioquímicas. Las variables que más contribuyeron a los ejes PC1 y PC2 fueron el almidón de la hoja (28,4%), la proporción azúcares solubles:almidón de la hoja (27,9%), la prolina de la raíz (12,1%), la proporción azúcares solubles:almidón de toda la planta (8,1%), flavonoides radiculares (3,1%), ortofenoles radiculares (2,8%), prolina foliar (2,6%), fenoles radiculares (1,9%), eficiencia instantánea en el uso del agua (1,5%) y biomasa radicular (1,4%).

En el artículo III se evaluó la transferibilidad y polimorfismo de un conjunto de marcadores moleculares microsatélites derivados de secuencia expresada (EST-SSRs) asociados con el estrés térmico. Se preseleccionaron 20 EST-SSRs desarrollados en *Quercus spp.*, *Fagus spp.* y *Eucalyptus spp.* que se evaluaron en 48 árboles procedentes de las poblaciones del artículo II. Siete EST-SSRs resultaron transferibles a *C. sativa*, mostraron polimorfismo y fueron útiles para evaluar la diversidad genética adaptativa de poblaciones de la especie (Figura 4A). Además, se identificaron dos marcadores, *POR016* y *VIT099*, bajo selección positiva que podrían utilizarse en programas de mejora genética de la especie para la selección asistida por marcadores (Figura 4B).

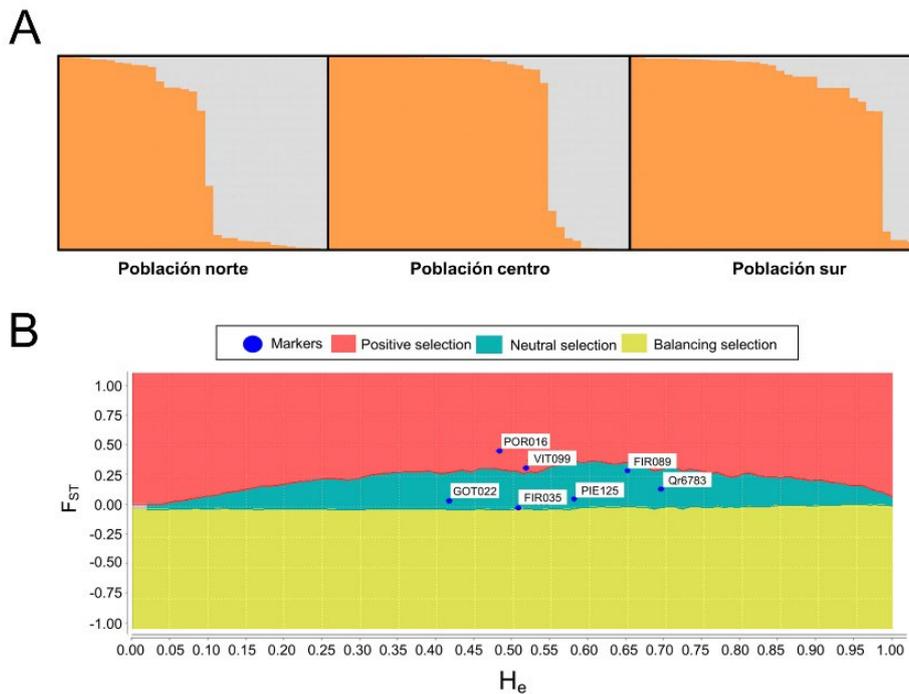


Figura 4. Estructura poblacional inferida por el programa STRUCTURE para 105 plántulas de *Castanea sativa* procedentes de tres poblaciones españolas de características climáticas contrastantes evaluadas con siete EST-SSRs ($K=2$) (A). Las líneas verticales representan individuos y las líneas negras verticales separan poblaciones. El sombreado naranja y gris indica la probabilidad de que los individuos pertenezcan a los clusters I y II, respectivamente. En B, comparaciones F_{ST} y H_e en loci polimórficos para identificar valores *outliers* y candidatos potenciales para la selección. Se utilizó el software LOSITAN.

Esta Tesis Doctoral ha permitido cuantificar la resiliencia que tiene el castaño frente a eventos climáticos extremos como las olas de calor prolongadas, lo que proporciona información muy valiosa a la hora de establecer programas de mejora encaminados a producir planta tolerante a los escenarios futuros de cambio global.

Publicaciones derivadas de la Tesis

Dorado, F. J., Alías, J. C, Chaves, N., & Solla, A. (2023). Warming scenarios and *Phytophthora cinnamomi* infection in chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Plants*, 12, 556.

Dorado, F. J., Pinto, G., Monteiro, P., Chaves, N., Alías, J. C., Rodrigo, S., Camisón, Á., & Solla, A. (2023). Heat stress and recovery effects on the physiology and biochemistry of *Castanea sativa* Mill. *Frontiers in Forests and Global Change* 5, 1072661.

Dorado, F. J., Solla, A., Alcaide, F., & Martín, M. A. (2022). Assessing heat stress tolerance in *Castanea sativa*. *Forestry*, 95, 667-677.



Fotografía del acto de lectura y defensa. (De izq. a drch.) Los directores D. Alejandro Solla Hach, Catedrático de la Universidad de Extremadura; y M.^a Ángela Martín Cuevas, Profesora Titular de la Universidad de Córdoba; la vocal del tribunal, la doctora Dña. Susana María Traquete Serrazina (Investigadora auxiliar de la Universidade de Lisboa); el presidente del tribunal el doctor D. Juan Antonio Martín García (Profesor Titular de la Universidad Politécnica de Madrid); el doctorando D. Francisco Javier Dorado Reyes; y el secretario del tribunal el doctor D. Raúl De La Mata Pombo (Contratado postdoctoral en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC). La Tesis fue calificada con Sobresaliente *cum laude* por unanimidad.