



VNIVERSITAT  
E VALÈNCIA



**Departamento de Biología Vegetal**

**Facultad de Farmacia**

**Aplicación de la embriogénesis somática y el  
“priming” para mejorar la tolerancia a  
*Phytophthora cinnamomi* en *Quercus ilex* L.**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIODIVERSIDAD Y  
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

Tesis Doctoral presentada por

M<sup>a</sup> Ángeles Morcillo Benlloch

Dirigida por la Dra. Isabel Arrillaga Mateos

Valencia, julio 2021



Doña Isabel Arrillaga Mateos, Catedrática de Fisiología Vegetal de la Universitat de València

CERTIFICA: que la investigación recogida en la presente memoria titulada “Aplicación de la embriogénesis somática y el “priming” para mejorar la tolerancia a *Phytophthora cinnamomi* en *Quercus ilex* L.”, presentada por M<sup>a</sup> Ángeles Morcillo Benlloch para optar al grado de Doctora en Ingeniería de Montes, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Biología Vegetal de la Universitat de València y autorizo su presentación.

Fdo. Isabel Arrillaga Mateos



Este trabajo ha sido subvencionado por el Ministerio de Economía y Competitividad y la Unión Europea (Proyectos AGL2013-47400-C4-4-R, AGL2016-76143-C4-01-R); por un contrato de Formación de Personal Investigador (FPI BES-2014-069171), y por La Generalitat Valenciana (Prometeo II/2014/052).



Quiero agradecer las siguientes colaboraciones:

- Al Dr. Jesús Jorrín Novo, Catedrático de la Universidad de Córdoba (grupo Bioquímica Vegetal y Agroforestal, Proteómica y Biología de sistemas) y a todas las personas de su equipo, especialmente a la Dra. Rosa Sánchez Lucas por la formación, ayuda y colaboración en la parte de proteómica del estrés, así como por su acogida durante la duración de la estancia en la Universidad de Córdoba en 2017.
- A las Dras. Elena Corredoira y M<sup>a</sup> Teresa Martínez (Instituto de Investigaciones Agroecológicas de Galicia, CSIC), por su ayuda y asesoramiento en la parte de embriogénesis somática, así como por la cesión de material para diferentes ensayos. También agradecer su acogida y la de los miembros de su grupo en el IIAG durante la estancia en 2016.
- A las Dras. Paloma Abad y Beatriz Mora (Instituto Agroforestal Mediterráneo, UPV) por la cesión de la cepa de *Phytophthora cinnamomi* empleada en nuestro estudio y las instrucciones para los test de tolerancia.
- Al Dr. Mariano Toribio (Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario, IMIDRA), por el envío de líneas embriogénicas de encina.
- A Pedro Lázaro, Miguel Agueras y M<sup>a</sup> Jesús Sanchís, técnicos forestales en el vivero forestal de La Hunde, el carrascal de Vallivana y el Parc Natural de La Font Roja, respectivamente, por su colaboración en las tomas de muestras de los diferentes años; y al personal del Parc Natural de La Font Roja, por su predisposición a facilitarnos la toma de muestras cada año.

## AGRADECIMIENTOS

Finalmente, a pesar de todas las dificultades provocadas por estos dos años convulsos que estamos dejando atrás, me encuentro escribiendo los agradecimientos de mi tesis doctoral, algo que veía muy lejano, pero en estos momentos, sólo puedo acordarme de lo bueno que me ha traído este periodo profesional y de las personas que han contribuido a ello:

A Isabel Arrillaga y Juan Segura, por la oportunidad que me disteis de entrar a formar parte del grupo BIOFORA, antes C y D, y poder dedicarme a la investigación durante estos casi 13 años en los que he aprendido tanto.

A Isabel también gracias por animarme a llevar a cabo este reto de la tesis doctoral que *a priori* no tenía en mente y que me ha aportado un gran aprendizaje a nivel profesional y personal. Por buscar siempre soluciones a todos los problemas para seguir hacia delante y por tratar siempre de encontrar los medios para continuar investigando con especies forestales tan complicadas como la encina. Por tu paciencia, dedicación y ánimos.

A Juan gracias por tu apoyo y ayuda durante estos años, y por querer compartir siempre con nosotros los buenos momentos.

A mis compañeros de BIOFORA, habéis sido muchos durante estos años, Álex, Miguel Ángel, Amparo, Lorena, Leo, Isabel, María, Miquel, Vicente, Alicia, Toñi, Juani, Alberto, además de todos los que habéis pasado por el grupo durante menos tiempo, ya sea como colaboradores, becarios o contratados, sois tantos que no puedo nombraros a todos, gracias por vuestra ayuda con mi trabajo y por amenizar el día a día siempre.

A Roc Ros y su grupo, que habéis sido como la prolongación del nuestro, Sara, Armand, María, Jesús, Rubén, Andrea y todos los colaboradores y becarios, también a César de bioquímica, gracias por vuestro apoyo, ánimos y ayuda con esas dudas en la parte de molecular.

A Ester Sales, ¿qué habría hecho yo sin ti en este tiempo?, gracias por tu incalculable ayuda, por tu manera de hacer las cosas, por transformar en fácil lo difícil y por la alegría y optimismo que transmites siempre que vienes al labo.

A Estrella muchas gracias por el apoyo que siempre me has dado, además de hacer mi trabajo más fácil por hacer tan bien y tan rápido el tuyo, gracias por ser como eres también a nivel personal. También a Carolina y antes a Carmina por contribuir a ello y por vuestro ánimo siempre.



A mis chicas de secretaría, M<sup>a</sup> José, M<sup>a</sup> Carmen y Consuelo, gracias por vuestra alegría apoyo y acompañamiento todo este tiempo.

También quiero agradecer al resto de profesores del departamento vuestra ayuda con algunas partes de mi tesis, así como con la docencia: Paco Marco, Esther Pérez, Carmen Calvo, Charlie, Jesús, Juan Bautista Peris. A los profesores y técnicos del departamento de bioquímica y a todos aquellos que en mayor o menor medida habéis contribuido con mi trabajo durante estos años.

Y como no, de manera muy especial, quiero agradecer a mi familia y amigos por estar siempre a mi lado para todo, gracias papás por educarme en la cultura del esfuerzo, la superación y la constancia, por vuestro amor incondicional y vuestro sacrificio y apoyo durante todas las etapas de mi vida. Gracias hermanos por ser como sois y por apoyarme desde pequeña en todo, también a mis sobrinos y cuñados que forman parte de esta gran familia que me ha hecho tan feliz.

Por último quiero mencionar a la familia que he formado en estos años de tesis, gracias Rado por tu paciencia y por facilitarme la vida en esta etapa de estrés y nervios. Gracias Abel y Rubén por la alegría y el amor que me hacéis sentir cada día.



*A mis padres*



## ÍNDICE

---



## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>I.1. La encina (<i>Quercus ilex</i> L.).....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Caracterización biológica y distribución .....	1
1.1.2. Importancia de la especie a nivel ecológico y económico .....	5
1.1.3. Problemática actual y perspectivas .....	6
<b>I.2. Métodos de cultivo y propagación en especies forestales.....</b>	<b>7</b>
<b>I.3. La embriogénesis somática como método de regeneración en especies del género <i>Quercus</i> .....</b>	<b>10</b>
1.3.1. Inducción .....	10
1.3.2. Proliferación .....	11
1.3.3. Maduración .....	12
1.3.4. Germinación/ conversión .....	14
1.3.5. Aclimatación.....	15
<b>I.4. Estrés biótico en <i>Quercus ilex</i> L. La patología de “la seca” .....</b>	<b>17</b>
<b>I.5. Respuesta de las plantas a estrés.....</b>	<b>26</b>
1.5.1. Las especies reactivas de oxígeno (ROS).....	29
<b>I.6. Elicitación, “priming” e inducción de memoria epigenética.....</b>	<b>31</b>
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
<b>III.1. Material biológico .....</b>	<b>39</b>
<b>III.2. Aprovechamiento de la variabilidad natural para la obtención de genotipos tolerantes a <i>Phytophthora</i> spp. ....</b>	<b>40</b>
III.2.1. Selección de genotipos escape para su propagación.....	40
III.2.1.1. Detección de <i>Phytophthora</i> spp. en las raíces de los genotipos seleccionados .....	42
III.2.2. Clonación de genotipos mediante ES .....	43
III.2.2.1. Medios y condiciones de cultivo.....	43
III.2.2.2. Esterilización y establecimiento de los cultivos .....	46
III.2.2.3. Inducción de embriogénesis somática.....	46

III.2.2.4. Proliferación de líneas embriogénicas .....	48
III.2.2.5. Maduración de embriones somáticos.....	48
III.2.2.6. Germinación/ conversión .....	48
III.2.2.7. Clonación de brotes .....	49
III.2.2.8. Enraizamiento de brotes.....	50
III.2.2.9. Aclimatación de las plántulas obtenidas.....	51
<b>III.3. Inducción de memoria epigenética para la tolerancia a estrés biótico .....</b>	<b>52</b>
III.3.1. Elicitación de líneas embriogénicas con extractos estériles de <i>Phytophthora cinnamomi</i> y elicitores químicos.....	52
III.3.1.1. Preparación de los extractos del oomiceto y elicitores químicos .....	52
III.3.1.2. Proceso de elicitación .....	53
III.3.1.3. Efecto de la aplicación de elicitores sobre las líneas embriogénicas .....	54
III.3.1.3.1. Medida del crecimiento .....	54
III.3.1.3.2. Influencia en la integridad de la membrana celular ....	54
III.3.1.3.3. Determinación del daño oxidativo .....	55
III.3.1.4. Ensayo de elicitación en medio sólido y durante periodos largos de tiempo.....	55
III.3.1.5. Ensayos de elicitación en medio líquido y durante periodos cortos de tiempo .....	56
III.3.1.6. Evaluación de la efectividad de la elicitación induciendo tolerancia a <i>P. cinnamomi</i> .....	56
III.3.1.6.1. Cultivos duales .....	57
III.3.1.6.2. Medida de la respuesta a estrés biótico (actividad ROS).....	58
III.3.1.6.2.1. Determinación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	59
III.3.1.6.2.2. Determinación de actividades enzimáticas.....	59
<b>III.4. Determinación de marcadores precoces de tolerancia a estrés biótico .....</b>	<b>60</b>



---

III.4.1. Variaciones en los niveles de expresión de genes de respuesta a estrés .....	61
III.4.1.1. Extracción de ARN y preparación del ADN complementario (ADNc) .....	61
III.4.1.2. Amplificación por PCR a tiempo real .....	62
III.4.2. Variaciones en el perfil proteico .....	64
III.4.2.1. Extracción de proteínas y preparación de las muestras ....	64
III.4.2.2. Identificación y cuantificación de proteínas por nLC-MS/MS.....	65
III.4.2.3. Tratamiento de datos y clasificación funcional de proteínas .....	66
III.4.3. Variaciones en el perfil fenólico .....	67
III.4.4. Variaciones en el perfil hormonal.....	67
III.4.5. Actividad enzimática.....	69
III.4.5.1. Catalasa .....	69
III.4.5.2. Peroxidasa .....	70
III.4.5.3. Glutatión.....	71
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>73</b>
<b>IV.1. Aprovechamiento de la variabilidad natural para la obtención de genotipos tolerantes a <i>Phytophthora</i> spp. ....</b>	<b>73</b>
IV.1.1. Determinación de genotipos escape .....	73
IV.1.2. Clonación de genotipos mediante ES .....	75
IV.1.2.2. Maduración y germinación de los embriones somáticos ..	77
IV.1.2.3. Aclimatación de plántulas obtenidas.....	78
IV.1.2.4. Establecimiento y clonación de brotes axilares .....	79
<b>IV.2. Inducción de memoria epigenética para la tolerancia a estrés biótico .....</b>	<b>80</b>
IV.2.1. Efecto de la elicitación con extractos estériles de <i>Phytophthora cinnamomi</i> y elicitores químicos .....	80
IV.2.1.1. Efecto de la aplicación de elicitores en medio sólido durante periodos largos de tiempo .....	80

IV.2.1.2. Efecto del tiempo de elicitación en medio líquido sobre la línea embriogénica .....	82
IV.2.1.3. Efecto de la concentración del elicitor sobre el desarrollo de las líneas embriogénicas .....	85
IV.2.2. Evaluación de la efectividad de la elicitación de líneas embriogénicas en la inducción de tolerancia a <i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	94
IV.2.2.1. Evaluación de la tolerancia a <i>P. cinnamomi</i> mediante cultivos duales con la línea Ha13 .....	94
IV.2.2.1.1. Determinación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> tras cultivo dual .....	97
IV.2.2.1.2. Determinación de la actividad catalasa tras el cultivo dual.....	98
IV.2.2.2. Evaluación de la actividad ROS tras la infección con extracto activo de <i>P. cinnamomi</i> al 20% (v/v).....	99
<b>IV.3. Análisis de marcadores como indicadores precoces de tolerancia a estrés biótico .....</b>	<b>102</b>
IV.3.1. Variaciones en los niveles de expresión de genes de respuesta a estrés .....	102
IV.3.2. Variaciones en el perfil proteico .....	109
IV.3.3. Variaciones en el perfil fenólico .....	119
IV.3.4. Variaciones en el perfil hormonal.....	127
IV.3.5. Actividad ROS .....	130
IV.3.5.1. Catalasa .....	130
IV.3.5.2. Peroxidasa .....	131
IV.3.5.3. Glutación .....	133
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>135</b>
<b>V.1. Clonación de genotipos escape .....</b>	<b>135</b>
V.1.1. Aclimatación de plántulas .....	137
<b>V.2. Inducción de memoria epigenética para tolerancia a estrés biótico .....</b>	<b>138</b>
V.2.1. Optimización de protocolos de elicitación con extractos de oomiceto y elicitores químicos .....	139

---

V.2.1.1. Respuesta de la elicitación en medio de cultivo sólido durante periodos largos de tiempo .....	140
V.2.1.2. Respuesta de las líneas embriogénicas a la elicitación en medio líquido .....	141
V.2.1.3. Evaluación de la efectividad de la elicitación de líneas embriogénicas en la inducción de tolerancia a <i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	143
V.2.2. Determinación de marcadores precoces de tolerancia a estrés en el material elicitado .....	145
V.2.2.1. Evaluación de las variaciones en los niveles de expresión de genes de respuesta a estrés .....	145
V.2.2.2. Evaluación de las variaciones en el perfil proteico .....	147
V.2.2.3. Evaluación de las variaciones en el perfil fenólico.....	152
V.2.2.4. Evaluación de las variaciones en el perfil hormonal .....	154
V.2.2.5. Evaluación de la actividad ROS .....	156
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>161</b>
<b>VI.1. Clonación de genotipos escape de encina .....</b>	<b>161</b>
<b>VI.2. Inducción de memoria epigenética para tolerancia a estrés biótico .....</b>	<b>161</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>165</b>
<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>205</b>



**ABREVIATURAS**

ADHP: 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina  
ADN: Ácido desoxirribonucleico  
ADNasa: Desoxirribonucleasa  
ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario  
AGC: Control automático de ganancia  
AJ: Ácido jasmónico  
ANA: Ácido naftalén-acético  
APS: Persulfato de amonio  
ARN: Ácido ribonucleico  
ARNasa: Ribonucleasa  
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero  
AS: Ácido salicílico  
B5: Medio de cultivo con macronutrientes B5 (Gamborg, 1968)  
BA: Benciladenina  
BA: Bicarbonato amónico  
BABA: Ácido beta-amino butírico  
BSA: Albúmina de suero bovino  
BTH: Benzotiadiazol  
CA: Carbón activo  
*CAD1Qs*: Cinamil Alcohol Deshidrogenasa de *Quercus suber*  
CAT: Catalasa  
CDS: Sistema de inyección de calibrante externo  
CE: Energía de colisión  
CHAPS: 3-[(3-cholamidopropilo) dimetilamonio]-1-propanosulfonato  
*ChSQs*: Chalcona Sintasa de *Q. suber*  
CID: Disociación inducida por colisión  
*CSQs*: Corismato Sintasa de *Q. suber*  
*CsTL1*: Proteína similar a la Taumatina de *Castanea sativa*  
CT: Umbral de ciclo  
DAMPs: Patrones moleculares asociados a peligro  
DCR: Medio de cultivo con macronutrientes DCR (Gupta y Durzan, 1986)  
DTT: Ditioneitol  
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético  
ES: Embriogénesis somática  
ESM: Medio de secreción de elicinas (Horta et al, 2008)  
ET: Etileno  
ETI: Inmunidad activada por efectores  
FDR: Tasa de falsas identificaciones

## Abreviaturas

---

GC: Fuente de iones de gas  
GD: Gresshoff y Doy, 1972  
GSH: Glutación reducido  
GSSG: Glutación oxidado  
HR: Respuesta hipersensible  
HRP: Peroxidasa de rábano  
IAA: Ácido indolacético  
IBA: Ácido indolbutírico  
IDA: Adquisición dependiente de información  
IIAG: Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia  
IMIDRA: Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario  
ISR: Inmunidad sistémica inducida  
ISVF: Voltaje de pulverización de iones  
JA: Jasmonato  
MAPKS: Cascadas de señalización mediadas por proteínas quinasas activadas por mitógenos  
MDA: Malondialdehído  
MeJA: Metil jasmonato  
MFR: Materiales forestales de reproducción  
MS: Murashige y Skoog, 1962  
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
nLC-MS/MS: Espectrometría de masas en tándem con cromatografía líquida en nano escala  
OCF: Cultivos filtrados de oomiceto  
PABA: Ácido para-aminobenzoico  
PALQs: Fenilamonio Liasa de *Q. suber*  
PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos  
PARPNH: Medio selectivo de aislamiento de *Phytophthora cinnamomi*, que contiene los antibióticos pimaricina, ampicilina, rifampicina, pentacloronitrobenzoceno, nistatina e himexazol  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
PDA: Agar de dextrosa de patata  
PEG: Polietilenglicol  
PEMs: Masas proembriogénicas  
PF: Peso fresco  
PGR: Reguladores de crecimiento de plantas  
PPA: Agar para propagación de plantas  
PRRs: Receptores de reconocimiento de patrones  
PS: Peso seco

PTI: Inmunidad activada por PAMPs  
*QpTUBq*: Tubulina de *Quercus petraea*  
*QsACT*: Actina de *Quercus suber*  
*QsEFse*: Factor de Elongación de la Polimerasa  
R: Genes de enfermedad-resistencia  
RCCI: índice regional de cambio climático  
RITA: Recipientes de inmersión temporal automatizados  
ROS: Especies reactivas de oxígeno  
SA: Salicilato  
SAR: Inmunidad sistémica adquirida  
SCAI: Servicio central de apoyo a la investigación  
SCSIE: Servicio central de apoyo a la investigación experimental  
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico  
SH: Schenk y Hildebrandt, 1972  
SOD: Superóxido dismutasa  
STS: Tiosulfato de plata  
SYBR Green: N',N'-dimetil-N--N-propilpropano-1,3-diamina  
TBA: Ácido tiobarbitúrico  
TBE: Tris borato EDTA  
TCA: Ácido tricloroacético  
TEMED: N,N,N',N'- tetrametilendiamina  
TFA: Ácido trifluoroacético  
TIS: Sistema de inmersión temporal  
UCO: Universidad de Córdoba  
UPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento  
UPV: Universidad politécnica de Valencia  
UV: Universidad de Valencia  
WPM: Woody plant medium (Lloyd y McCown, 1980)  
WV5: Medio de cultivo con macronutrientes WestVaco (Coke, 1996)  
XOD: Xantina oxidasa





## **I. INTRODUCCIÓN**

---



## I. INTRODUCCIÓN

### I.1. La encina (*Quercus ilex* L.)

#### I.1.1. Caracterización biológica y distribución

La encina (*Quercus ilex* L.), también conocida como carrasca o chaparro (Fig. I.1A), constituye la especie perenne más representativa de los ecosistemas forestales naturales de la cuenca mediterránea (Valero Galván et al., 2012). Esta especie, perteneciente a la familia de las Fagáceas, se caracteriza por ser un árbol o arbusto de copa amplia y redondeada que puede alcanzar los 27 m de altura, aunque normalmente no sobrepasa los 15 o 20 m (López González, 2001).

Posee un tronco derecho o algo torcido con corteza gris oscura resquebrajada en grietas poco profundas. Las ramas son robustas y abiertas entre erguidas y horizontales y las ramillas están cubiertas por una borra blanquecina o cenicienta. Las hojas se mantienen hasta 3 o 4 años en el árbol, por lo que éste permanece siempre verde; son simples y alternas, coriáceas, verdes por el haz y cubiertas por un fieltro blanquecino por el envés (López González, 2001). Presentan gran variabilidad de tamaño y forma dentro de un mismo ejemplar. Las de los rebrotes suelen presentar bordes aserrados o espinosos, mientras que las de la copa muestran bordes enteros y pecíolos más largos. Las hojas de luz son más escleromorfas que las de sombra. También existe una reducción del tamaño foliar al aumentar la aridez en la que se asientan las poblaciones (Castro-Díez et al., 1997; Villar-Salvador et al., 2013).

La encina es una especie monoica con pequeñas flores masculinas amarillas que se agrupan en ramillos llamados amentos (Fig. I.1C), que se producen en gran número en grupos, primero erectos y después colgantes en la terminación de las ramillas (López González, 2001). Las flores femeninas son pequeñas y se desarrollan sobre los brotes del año de manera aislada o en grupos de dos sobre un pedúnculo muy corto. Florece de marzo a mayo, a veces en junio en zonas más frías, cuando la temperatura media es de alrededor de 20 °C y el fotoperiodo de 10 horas de sol. La dispersión del polen es anemófila en la mayor parte de los casos, aunque también se produce polinización entomófila (Crespo, 1988).

Sus frutos son bellotas largamente ovoides (Fig. I.1B), de color marrón brillante cuando maduran y que tienen en su base una cúpula hemisférica de color ceniza con escamas casi planas muy apretadas y no apiculadas (López

González, 2001). Las bellotas, que no empiezan a producirse en la planta hasta que ésta tiene una edad de 15 o 20 años, maduran y se diseminan de octubre a noviembre, a veces en diciembre.

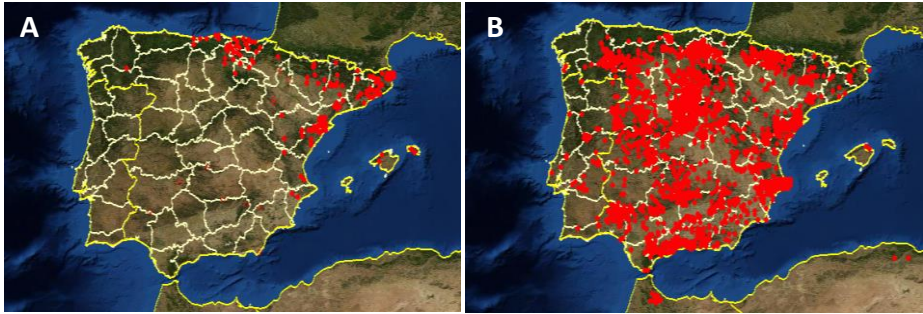


**Figura I.1.** Ejemplar de *Quercus ilex* L. localizado en el Monte de La Hunde, Ayora, Valencia (A). Bellotas (B) y amentos de encina (C).

La encina tiene dos subespecies principales, *Quercus ilex* L. subsp. *ilex* y *Quercus ilex* L. subsp. *ballota*. La primera (*Q. ilex* L. subsp. *ilex*) se distribuye en zonas más húmedas de la cornisa cantábrica y Cataluña (Fig. I.2A), en zonas próximas a la costa, en todo tipo de sustratos, aunque prefiere los calizos, desde el nivel del mar hasta unos 1000 m. Árbol de hasta 27 m con las hojas más grandes y alargadas y con pecíolos más largos (entre 6-15 mm) con nervios formando un ángulo agudo con el principal y con los amentos muy pelosos (López González, 2001).

*Q. ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp. también denominada *Q. ilex* L. subsp. *rotundifolia* (Lam.) O. Schwarz ex Tab. Morais, se conoce como encina de bellota dulce (aunque sus bellotas también pueden ser amargas). Es un árbol de 5 a 15 m, a veces reducido a porte arbustivo, tiene una distribución menos exigente que la subespecie anterior, localizándose en zonas interiores de clima más o menos continental y en zonas litorales con veranos cálidos y secos (Fig. I.2B), en todo tipo de sustratos, incluso los más pobres y desde el nivel del mar a unos 1500 m de altitud. Posee hojas más redondeadas y con borde más o menos espinoso, pelosas por el haz, con pecíolos más cortos, 6 mm como máximo y nervadura más abierta (Figura I.3). Los amentos no son pelosos. Esta subespecie está dispersa por toda la península, excepto norte

y noroeste, gran parte de Cataluña y zonas bajas del sudeste árido (López González, 2001). Muchos autores creen que esta última es una especie independiente, pero su separación es casi imposible a nivel morfológico, existiendo ejemplares con características intermedias, principalmente en zonas de contacto de ambas subespecies (López González, 2001).



**Figura I.2.** Distribución de las subespecies de encina *Q. ilex* L. subsp. *ilex* (A) y *Q. ilex* L. subsp. *ballota* (B). Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, [www.anthos.es](http://www.anthos.es)



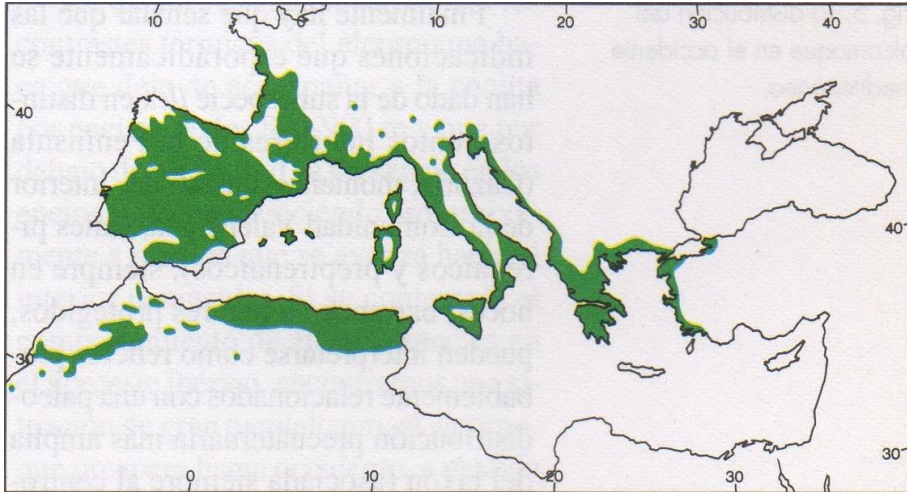
**Figura I.3.** Hojas de *Quercus ilex* subsp. *ilex* (A) y subsp. *ballota* (B). Fuente: Centre Tecnològic Forestal de Catalunya, [www.eforown.ctfc.cat](http://www.eforown.ctfc.cat)

La encina, aparte de extenderse por casi toda la península ibérica, se localiza en el sudeste de Francia, Marruecos, Algeria e Italia (Fig. I.4). La península ibérica y Marruecos suman el 90% de la distribución mundial de la especie (Villar-Salvador et al., 2013).

Debido a la existencia de diferencias genéticas entre poblaciones, principalmente relacionadas con el crecimiento, producción y adaptación, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación ha definido grandes unidades para la comercialización de materiales forestales de reproducción (MFR), que se basan fundamentalmente en divisiones en su distribución geográfica, de

# I. Introducción

manera que en encina se han definido 28 regiones de procedencia, 11 de las cuales son de acceso restringido (Villar-Salvador et al., 2013) (Fig. I.5).



**Figura I.4.** Distribución de *Quercus ilex* L. en la región Mediterránea. Adaptado de Blanco et al. (2005).



**Figura I.5.** Regiones de procedencia de *Quercus ilex*. 1.- Región Galaico-leonesa. 2.- Cuenca Central del Duero. 3.- Alto Ebro. 4.- Prepirineo. 5.- Cataluña Nororiental. 6.- Montsant. 7.- Sierras de Ávila y Segovia. 8.- Sur de Guadarrama. 9.- La Alcarria y Serranía de Cuenca. 10.- Sistema Ibérico. 11.-Región Extremadureña. 12.- La Mancha. 13.- Sierras de Cádiz-Ronda. 14.- Sierras Béticas Occidentales. 15.- Sierras Béticas Orientales. 16.- Sierra Nevada-Filabres. 17.- Mallorca. A.- Galicia-El Bierzo. B.- Cuenca del Navia. C.- Picos de Europa y Litoral Asturiano. D.- Cantabria. E.- Litoral Vasco. F.- Monegros. G.- Valle del Guadalquivir. H.- Sierras Almerienses. I.- Sierras Murcianas. J.- Sierras Béticas Valencianas. K.- Menorca. (<https://www.mapa.gob.es>).

### **I.1.2. Importancia de la especie a nivel ecológico y económico**

La encina es el árbol más abundante y representativo de los bosques esclerófilos mediterráneos, que constituyen la vegetación potencial de la mayor parte de la península (López González, 2001; Valero Galván et al., 2012). Solo en España, la encina ocupa alrededor de 3 millones de hectáreas (Mauri y Manzanera, 2003), donde conforma bosques mixtos en asociación con otras especies de *Quercus*, como *Q. suber* y *Q. coccifera* (Díaz y Pulido, 2009; Martínez et al., 2019) o con otras especies mediterráneas, como pinos en el estrato arbóreo y *Arbutus unedo*, *Phillyrea angustifolia*, *Rhamnus alaternus*, *Pistacia terebinthus*, *Rubia peregrina*, etc, en el estrato arbustivo (Rodà et al., 2009).

En el suroeste de la península ibérica la encina se encuentra formando parte de las dehesas (en España) o montados (en Portugal). La dehesa es un ecosistema agro-silvo-pastoral de gran importancia a nivel ecológico incluido como área de especial conservación en la Directiva Hábitats 92/43/CEE del Consejo, modificada por la Directiva 2013/17/EU de la Unión Europea (Cernadas et al., 2018; Corredoira et al., 2018) y en la Red Natura 2000. Las dehesas son un tipo de hábitat de origen y mantenimiento antrópico. Proceden del aclarado del monte mediterráneo, eliminando el matorral y parte del arbolado para dar lugar a una distribución sabanoide (Díaz y Pulido, 2009). Las dehesas constituyen un sistema agroforestal estable y equilibrado, que se mantiene con el propio aprovechamiento; es decir, su persistencia requiere gestión (Serrada y San Miguel Ayanz, 2008).

Los bosques de encina y las dehesas proporcionan numerosos beneficios a la sociedad; son soporte de una gran biodiversidad tanto de flora como de fauna, contribuyen a la regulación del cambio climático gracias a la capacidad de fijación de carbono (Pinto-Correia et al., 2011), regulan la calidad del aire y colaboran en la formación y protección del suelo frente a la erosión (Marañón et al., 2012), permiten el desarrollo de actividades recreativas, tienen gran valor paisajístico, cultural e histórico y permiten el desarrollo rural (Serrada y San Miguel Ayanz, 2008).

El valor a nivel económico de la encina radica en la diversidad de actividades productivas ligadas a ella; en primer lugar, es la especie más cultivada para la producción de trufa negra (*Tuber melanosporum*), mediante el establecimiento de una asociación micorrízica por inoculación entre las raíces de la planta y el hongo. La trufa negra es una especie gastronómica muy cotizada, con un gran valor de mercado. La producción de trufa silvestre

es cada vez más escasa, por lo que el interés por el cultivo de encinas para la inoculación de sus raíces con esporas de *T. melanosporum* está aumentando en las últimas décadas, siendo España el principal país productor a nivel mundial (Suz et al., 2008). Esta actividad, además, podría contribuir al incremento del desarrollo rural y consecuentemente permitir la estabilización de la población en las áreas deprimidas donde se lleva a cabo (Mauri y Manzanera, 2004; Gea-Izquierdo et al., 2006).

Por otro lado, el ganado porcino ibérico criado de manera extensiva se alimenta de las bellotas de encina en las dehesas de la península, siendo esta actividad el producto directo más importante en las mismas, aunque no el único, ya que la caza mayor y menor, las setas, los pastos, la leña y los cultivos agrícolas de cereales también se consideran productos directos de la dehesa. Como producto indirecto se podría añadir el turismo, que atraído por el paisaje, las actividades recreativas y la gastronomía, contribuye al desarrollo rural en estas zonas (Serrada y San Miguel Ayanz, 2008).

### **1.1.3. Problemática actual y perspectivas**

A pesar de su importancia, la sostenibilidad de la encina y sus ecosistemas asociados está amenazada debido al decaimiento y muerte de numerosos pies a causa de una combinación de condiciones climáticas adversas y ataques de patógenos (González-Rodríguez et al., 2011), entre ellos *Phytophthora cinnamomi*, como se verá posteriormente, sumado a su escasa regeneración natural (Smit et al., 2009; González-Rodríguez et al., 2011).

El decaimiento de la especie puede verse agravado por los grandes cambios a nivel ambiental a que nos enfrentamos en la actualidad, que facilitarán el ataque de patógenos. Aunque las nuevas condiciones ambientales no se pueden conocer con exactitud y la respuesta biológica es imprevisible, el área mediterránea, en la cual se incluye la península ibérica, es considerada uno de “los puntos calientes” más importantes por el *Regional Climate Change Index* (RCCI), debido a su localización en una zona de transición entre Europa central, templada y lluviosa, y el Norte de África, típicamente árido. Este hecho implica que nuestra área es más susceptible a las variaciones provocadas por el cambio climático (Giorgi, 2006).

Ante esta perspectiva se puede prever un empeoramiento de las condiciones en las que se deberán desarrollar los bosques de encina y las dehesas del suroeste de la península ibérica, lo que puede producir un incremento de la afección que viene sufriendo la especie, comprometiendo



seriamente su supervivencia y por ende la de los ecosistemas asociados a ella. Es por ello que se deben implementar programas de conservación y mejora de la especie, facilitando su evolución bajo las nuevas condiciones ambientales de los ecosistemas.

En este contexto en los últimos años se están desarrollando proyectos dentro del Plan Estatal de I+D+i, así como del Plan Nacional de Desarrollo Rural (PNDR) ambos co-subsuencionados por la Unión Europea (Fondo Europeo Agrícola de desarrollo rural). Estos proyectos coordinados aúnan esfuerzos para llevar a cabo programas de prevención y restauración, implementar nuevos métodos de protección de los bosques de encina y las dehesas, que implican la aplicación de herramientas biotecnológicas para la mejora de estas especies, favoreciendo la conservación de estos ecosistemas de gran importancia. En el marco de tres de estos proyectos (AGL2013-47400-C4-04-R; AGL2016-76143-C4-01-R y el Programa Nacional de mejora y conservación de los recursos genéticos de la encina y el alcornoque frente al síndrome de “la seca”, recientemente iniciado) se ha llevado a cabo parte de la investigación de nuestro grupo en los últimos años.

## **I.2. Métodos de cultivo y propagación en especies forestales**

Las encinas se pueden reproducir sembrando las bellotas o por rebrote de raíz o cepa (Crespo, 1988). La propagación tradicional de especies mediante el uso de semillas obtenidas a partir de la polinización controlada de progenitores seleccionados provoca una amplia variabilidad en las características genéticas individuales de cada árbol dentro de una plantación (Nehra et al., 2005), de manera que se limita enormemente el aprovechamiento del total de las cualidades genéticas deseables (Celestino et al., 2005). Si el objetivo es obtener árboles con iguales características que los seleccionados, ya sea por su producción o tolerancia a estrés abiótico o biótico, la propagación clásica no es aplicable, ya que no permite la reproducción del mismo genotipo a lo largo del tiempo (Park et al., 1998).

La propagación vegetativa se ha utilizado ampliamente en distintas fases de los programas de conservación y mejora de muchas especies forestales, aplicándose incluso con fines operativos en algunas especies (Celestino et al., 2005). Esta propagación vegetativa tradicional, consistente en el injerto o enraizamiento de estaquillas, es la principal herramienta de mejora que ha propiciado el desarrollo de los cultivos leñosos, sin embargo, estas técnicas son adecuadas cuando la planta donante es juvenil, pero inviable con individuos adultos o también impracticables cuando las especies

son consideradas recalcitrantes, como es el caso de la encina, que presenta una gran dificultad de enraizamiento de las estaquillas (Zobel y Talbert, 1984; Park, 2002). Este hecho representa una gran limitación, ya que es aconsejable seleccionar los genotipos a propagar una vez se han desarrollado, para conocer totalmente su potencial genético (Bonga y von Aderkas, 1992; Bonga et al., 2010) y cuando llega el momento de evaluar las nuevas líneas clonales, la planta donante ya ha madurado y no puede ser propagada mediante las técnicas tradicionales de propagación vegetativa (Park, 2002). Debido a esto, los programas de mejora clásica están siendo potenciados por las nuevas técnicas de propagación vegetativa que, al aprovechar el componente no aditivo de la variación genética, transfiere a la descendencia todo el potencial genético de los individuos seleccionados y/o mejorados y les confiere uniformidad. Esto permite la conservación de genes y genotipos (Celestino et al., 2005).

Actualmente las técnicas de mejora contemplan la transformación genética y propagación de estas especies (Cano et al., 2020), la clonación de genotipos tolerantes o resistentes (Martínez et al., 2020) y la inducción de memoria epigenética, como se detallará posteriormente.

El cultivo *in vitro* ha incrementado el éxito de la propagación vegetativa debido a las grandes ventajas que presenta, como la capacidad de optimizar las condiciones ambientales mediante factores físicos, nutricionales y hormonales, eliminando la estacionalidad; permite evitar la propagación de microorganismos y otras plagas de las plantas superiores que pueden dañar los cultivos, posibilita la captura rápida y la clonación masiva de genotipos valiosos y proporciona métodos para el almacenamiento de germoplasma a largo plazo (Pierik 1997; Sutton, 2002; Nehra et al., 2005). El cultivo *in vitro* se basa en aislar órganos, tejidos o células vegetales (explantos) en condiciones asépticas y en ajustar las condiciones necesarias (fotoperíodo, temperatura y composición nutritiva de los medios de cultivo) para obtener respuestas fisiológicas o morfogénicas a partir de ellos (Höxtermann, 1997; Pijut et al., 2011).

Actualmente, el método de regeneración de plantas mediante cultivo *in vitro* que se considera más adecuado para conseguir una propagación vegetativa óptima en especies forestales es la embriogénesis somática (Merkle y Dean, 2000; Sutton, 2002; Celestino et al., 2005; Bonga et al., 2010). La embriogénesis somática (ES) es el proceso mediante el cual se obtienen embriones a partir de células somáticas. Estos embriones se desarrollarán para dar lugar a plantas con las mismas cualidades genéticas

que las plantas de origen. La embriogénesis somática pone de manifiesto como todas las células de una planta contienen la información genética necesaria para generar una planta completa y funcional (Merkle, 1995; von Arnold et al., 2002), esta capacidad se conoce como totipotencia. Los embriones somáticos poseen los órganos típicos de los embriones zigóticos, radícula, hipocótilo y cotiledones, aunque se desarrollen mediante una ruta diferente (von Arnold et al., 2002). Pueden diferenciarse directamente a partir del explanto de la planta donante o indirectamente, después de una fase de formación de callo embriogénico (Williams y Maheswaran, 1986; von Arnold et al., 2002). Los callos embriogénicos están compuestos por masas proembriogénicas (PEMs). La regeneración de plantas a partir de células o tejidos se puede considerar como el elemento central de la biotecnología vegetal. Disponer de una herramienta que permita regenerar plantas es imprescindible para que la clonación, el saneamiento de plantas, la crioconservación de material vegetal o la transformación genética se conviertan en biotecnologías de aplicación (Celestino et al., 2005). El objetivo que persiguen los programas biotecnológicos de conservación forestal es la propagación clonal de genotipos maduros de élite, especies arbóreas amenazadas o en peligro de extinción, o genotipos que sean resistentes o tolerantes de manera natural a plagas y/o enfermedades (Pijut et al., 2011).

A la hora de regenerar plantas por medio de ES hay que tener en cuenta varios factores que influyen en el éxito de la inducción de las líneas embriogénicas, unos son los relacionados con la planta de origen, como son el tipo de explanto, (genotipo, edad y estado fisiológico de la planta madre; si el tejido elegido se localiza en partes de la planta que contienen las células que mejor responden) y la época del año en que se recoge este explanto (Bonga et al., 2010). Otros son los relacionados con las condiciones ambientales en las que se establecen los cultivos (composición del medio nutritivo, concentración y combinación de los reguladores de crecimiento, tipo y volumen de los envases utilizados, fotoperiodo y temperatura (Blasco, 2013).

La propagación clonal *in vitro* de especies forestales presenta numerosas dificultades que no se dan en plantas herbáceas, como la incapacidad de propagación de algunos genotipos (Bonga et al., 2010), los problemas a la hora de esterilizar el material a introducir, principalmente por el tamaño del material vegetal, y que este material expulsa compuestos fenólicos potencialmente tóxicos al medio de cultivo que pueden comprometer la inducción de ES (Blasco, 2013; Barra Jiménez, 2015).

Además, algunas especies frondosas del género *Quercus* tienen la dificultad añadida de considerarse recalcitrantes con una tasa de producción de embriones somáticos muy baja (Bonga et al., 2010). Los protocolos de inducción de ES en estas especies están mucho menos desarrollados que en las especies arbóreas de ciclo corto y también van por detrás de las coníferas (Vieitez et al., 2012), por este motivo, nuestro grupo de investigación junto con otros grupos con los que participamos en diferentes proyectos coordinados a nivel nacional, hemos venido desarrollando en los últimos años protocolos para la inducción de ES en especies del género *Quercus* y en especial en *Quercus ilex*, (Blasco et al., 2013; Barra-Jiménez et al., 2014; Martínez et al., 2017a, 2017b; Martínez et al., 2020).

### **I.3. La embriogénesis somática como método de regeneración en especies del género *Quercus***

La regeneración de plantas vía embriogénesis somática es un proceso que se desarrolla en 5 pasos, durante los que se deben aplicar una serie de tratamientos físicos y químicos críticos en el momento adecuado, para que se lleve a cabo de manera eficiente: (1) Inducción de los tejidos proembriogénicos (PEMs) mediante el cultivo del explanto de la planta donante en medio suplementado o no con reguladores de crecimiento (PGRs), principalmente auxinas, aunque también se incluyen citoquininas en muchos casos; (2) multiplicación de los cultivos embriogénicos o proliferación en medio suplementado con menor proporción o sin PGRs; (3) maduración de los embriones somáticos mediante el cultivo en medio suplementado con ABA y/o con potencial osmótico reducido; (4) germinación o conversión a planta, generalmente en medios sin PGRs y (5) aclimatación (von Arnold et al., 2002).

#### **I.3.1. Inducción**

La inducción de la respuesta embriogénica consiste en la transformación del patrón de expresión génica que tiene en ese momento el tejido del explanto inicial en un programa de expresión embriogénica (von Arnold et al., 2002), a partir de entonces se activa la división de las células determinadas para constituir el nuevo patrón de expresión. Después, la nueva estructura que se ha formado, desarrolla un programa autónomo condicionado por una nutrición heterotrófica, generando así los embriones somáticos iniciales (Zoglauer et al., 2003).

La transición de célula somática a embriogénica se da mediante los siguientes pasos: desdiferenciación, reactivación celular, división y cambios

metabólicos y desarrollo y reprogramación génica (Fehér et al., 2003); esta reprogramación de la expresión génica depende de una serie de factores como son la acción de los reguladores de crecimiento presentes en el medio (PGRs); el estrés generado por el cultivo *in vitro* del explanto; la naturaleza de las células del explanto cultivado y el genotipo de la planta donante (von Arnold et al., 2002; Fehér et al., 2003).

Dentro de cada especie, los genotipos individuales presentan diferencias considerables en su capacidad embriogénica (Parrott, 1991; Park et al., 1993, 1994), por este motivo, cada genotipo individual puede necesitar una serie de condiciones específicas para una óptima capacidad de regeneración. Este fenómeno se ha observado en especies como *Robinia pseudoacacia* (Arrillaga et al., 1994), *Coffea arabica* (Molina et al., 2002), varias especies del género *Pinus* (Bercetche y Pâques, 1995; Lelu et al., 1999; MacKay et al., 2006; Choudhury et al., 2008) y del género *Quercus* (Cuenca et al., 1999; von Arnold et al., 2002; Hernández, 2007).

La inducción de ES a partir de explantos de individuos adultos ha avanzado notablemente en los últimos años, se ha conseguido inducir embriogénesis somática a partir de renuevos basales, vástagos de raíz y tallos apicales en *Quercus* (Vieitez et al., 2012) brotes epicórmicos en *Q. suber* (Hernández et al., 2003), hojas de *Q. robur* (Toribio et al., 2004), brotes axilares de *Q. ilex* (Martínez et al., 2017a, 2017b), amentos e integumentos de ovarios en desarrollo, en *Q. ilex* (Blasco et al., 2013; Barra-Jiménez et al., 2014).

Algunos de los medios de cultivo utilizados en la fase de inducción de ES en el género *Quercus* son MS (Murashige y Skoog, 1962), SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) y WPM (Lloyd y McCown, 1980). El medio de inducción normalmente contiene (PGRs), generalmente auxinas (2,4-D, ANA, AIB o AIA) y citoquininas (BA, zeatina). Los explantos que responden a la inducción suelen comenzar con la formación de masas proembriogénicas en 4 o 6 semanas (Park, 2014).

### **I.3.2. Proliferación**

Una vez se ha producido la inducción de ES, los embriones somáticos se multiplican mediante ES secundaria; este proceso presenta una gran capacidad proliferativa (Hernández, 2007). La embriogénesis secundaria es el fenómeno recurrente de multiplicación de los embriones somáticos, que permite una producción masiva y continua de propágulos a lo largo del tiempo y además no tiene ninguna limitación estacional. Debido a estas

características, este proceso presenta un potencial multiplicativo prácticamente ilimitado. La proliferación de las masas embriogénicas continúa siempre y cuando se les proporcione medio de cultivo fresco; este medio de cultivo puede ser el mismo que se ha empleado en la inducción, o un medio similar, ligeramente modificado (Park, 2014) con baja suplementación de auxinas y/o citoquininas (Merkle, 1995).

La ES secundaria se puede originar a partir de masas proembriogénicas (PEMs) (Halperin, 1966; Merkle, 1995) o como embriones en diferentes estados de desarrollo (Puigdejarrols et al., 1996).

En las especies del género *Quercus* es posible obtener un gran número de embriones somáticos a partir de ES secundaria una vez conseguida la inducción, a pesar de que los porcentajes de inducción de ES son bastante bajos (Vieitez et al., 2012). Esta proliferación de embriones secundarios asegura la producción de líneas embriogénicas clonales (Toribio et al., 2004; Valladares et al., 2006). La capacidad de proliferación de embriones secundarios en el género *Quercus* también se ve reducida al cabo de 2 o 3 meses de iniciarse los cultivos (Martínez et al., 2017b).

En la fase de proliferación de las líneas embriogénicas en *Quercus* se han utilizado generalmente medios de cultivo con una composición baja en PGRs (auxinas y/o citoquininas) (Valladares et al., 2006) o sin ellos (Fernández-Guijarro et al., 1995; Martínez et al., 2017b). Otros estudios destinados a la optimización de la embriogénesis recurrente en líneas de roble procedentes de árboles adultos han demostrado que la adición de 0.44  $\mu\text{M}$  de BA al medio de cultivo favorece la formación de nuevos embriones (Mallón et al., 2012). Martínez et al. (2017b) utiliza un medio de cultivo SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) sin PGRs para proliferar embriones a partir de estructuras embriogénicas nodulares obtenidas en la fase de inducción.

### **I.3.3. Maduración**

Durante la fase de maduración los embriones somáticos experimentan una serie de cambios morfológicos y bioquímicos. Estos cambios pasan por la acumulación de sustancias de reserva en los cotiledones, la represión de la germinación y la adquisición de la tolerancia a la desecación (Thomas, 1993; von Arnold et al., 2002; Klimaszewska et al., 2007). Para que la maduración permita la obtención de plantas viables se ha de garantizar la detención de la embriogénesis secundaria y que el desarrollo embriogénico se mantenga estable hasta completar la maduración. El desarrollo de los embriones somáticos hasta llegar al embrión maduro pasa por los mismos

estadios que los embriones zigóticos: globular, corazón, torpedo y cotiledonar (Merkle et al., 1995).

En encina se ha demostrado que la aplicación de ABA a bajas concentraciones en el medio de maduración favorece la regeneración de plantas y reduce la ES secundaria (Mauri y Manzanera, 2004). Sin embargo, en otras especies del género *Quercus*, no hay resultados concluyentes sobre que la aplicación de esta fitohormona promueva la maduración de los embriones (Toribio et al., 2005; Vieitez et al., 2012; Martínez et al., 2019). En cuanto al incremento de la concentración de azúcares en el medio de cultivo para favorecer la restricción del agua disponible y favorecer la posterior germinación de los embriones, se han obtenido diversidad de resultados en diferentes estudios; en el caso de ES en *Q. robur* a partir de tejidos juveniles de hoja y tallo (Sánchez et al., 2003), la aplicación de sorbitol junto a sacarosa en el medio de maduración favoreció la posterior conversión a planta; sin embargo, este tratamiento no favoreció el desarrollo de los embriones somáticos cuando se aplicó a cultivos procedentes de material adulto en esta misma especie (Valladares et al., 2006). En alcornoque, los resultados obtenidos manteniendo estable la concentración de azúcares en las primeras fases del proceso, para después aumentar esta concentración, indican que estas condiciones de cultivo durante la maduración favorecen el desarrollo de los embriones, conteniendo la tendencia a dar embriogénesis secundaria (Hernández, 2007).

En muchas especies de frondosas se deben llevar a cabo una serie de tratamientos previos a la germinación y desarrollo de la planta tras la maduración para favorecer el aumento de las tasas de germinación y el normal desarrollo de los embriones; estos tratamientos de pre-germinación tienen el propósito de romper la dormición generada por el ABA o por los agentes osmóticos, para incrementar los niveles de ácido giberélico y así estimular la germinación y sincronizar el desarrollo simultáneo de la raíz y el brote (Merkle et al., 1995; Gaj, 2004; Martínez et al., 2019). Estos tratamientos incluyen la desecación y conservación en frío de los embriones, así como la adición de ácido giberélico en el medio de germinación (Merkle et al., 1995).

Los mejores resultados en conversión a planta en encina se han obtenido mediante el almacenamiento de los embriones en frío (4° C) durante dos meses (Mauri y Manzanera, 2004) o sin este tratamiento previo (Barra-Jiménez et al., 2014; Martínez et al., 2017b). Este almacenamiento puede ser en placas con medio SH (Barra-Jiménez et al., 2014; Mauri y

Manzanera, 2004) o en placas Petri vacías, lo que favorece la inanición y la desecación parcial durante el periodo de permanencia en frío (Martínez et al., 2017b). En *Q. suber* la conservación en frío también estimuló la germinación y conversión (Fernández-Guijarro et al., 1995; Hernández et al., 2003b).

### **I.3.4. Germinación/ conversión**

Los embriones somáticos deben germinar y desarrollar su parte aérea para poder regenerar una planta. La calidad, supervivencia y crecimiento posterior de las plantas somáticas va a depender de las condiciones en las que se desarrollen en las etapas previas de la ES (von Arnold, 2008). Durante la etapa de germinación de embriones somáticos se pueden producir ciertos problemas, como el desarrollo de la raíz sin que se produzca la emergencia del brote simultáneamente (conversión a plántula), normalmente los porcentajes de conversión en las especies leñosas son bajos (Ballester et al., 2016). Los embriones que presenten una morfología adecuada, hayan acumulado suficientes sustancias de reserva y muestren tolerancia a la desecación, podrán desarrollarse en plantas normales, produciendo la elongación sincronizada del tallo y la raíz (von Arnold, 2008). Otras dificultades que se suelen producir en el crecimiento de los embriones somáticos es que la calidad de las plántulas regeneradas sea menor que aquellas que provienen de la germinación de embriones zigóticos, de manera que presentan menos vigor, un desarrollo deficiente de la raíz y son de menor talla. Estos problemas suelen tener su origen en unas condiciones poco óptimas durante la maduración y/o en un bajo desarrollo del brote apical (Corredoira et al., 2019; Martínez et al., 2019).

En las especies del género *Quercus*, el porcentaje de germinación y conversión a plántula es muy dependiente del genotipo (Hernández et al., 2003b; Sánchez et al., 2003; Toribio et al., 2004; Valladares et al., 2006). En *Q. ilex* se consiguió la germinación de los embriones somáticos utilizando medio SH con ausencia de PGRs (Mauri y Manzanera, 2004; Barra-Jiménez et al., 2014), aunque la aplicación de BA e IBA produjo un aumento en el porcentaje de embriones germinados (Barra-Jiménez et al., 2014). En *Q. robur* algunos genotipos ensayados alcanzaron porcentajes de 60% de conversión al cultivarse los embriones somáticos en medio MS suplementado con bajas concentraciones de BA (Toribio et al., 2004). En *Q. suber*, bajas concentraciones de BA en el medio de germinación también mejoraron el desarrollo del brote sin perjudicar el crecimiento de la raíz (González-Benito et al., 2002). En esta especie, la aplicación elevada de



compuestos osmóticos junto con la conservación en frío de los embriones somáticos durante 2 meses, produjo altos porcentajes de conversión (García-Martín et al., 2001); este tratamiento de conservación en frío durante 2 meses también se aplicó en *Q. ilex* resultando la mejor manera de obtener una germinación sincronizada (Mauri y Manzanera, 2004). Estudios recientes revelan que la utilización de medio GD (Gresshoff y Doy, 1972) suplementado con 0.1 mg/L de BA y 20  $\mu$ M de tiosulfato de plata (STS) como medio de germinación, tras someter a los embriones somáticos de *Q. ilex* al periodo de 2 meses a 4 °C, produce una tasa aceptable de conversión a planta (Martínez et al., 2017b). No obstante, esta fase sigue siendo problemática por cuanto depende del genotipo y de la calidad del embrión somático (Corredoira et al., 2019; Martínez et al., 2019).

### **I.3.5. Aclimatación**

La aclimatación se define como la adaptación de las plantas cultivadas *in vitro* a partir de tejidos a las condiciones ambientales *ex vitro* (Kozai y Zobayed, 2000).

La aplicación práctica de la embriogénesis somática con el objetivo de propagar genotipos seleccionados de ciertas especies forestales se alcanza únicamente cuando se consigue la aclimatación a las condiciones de campo de un gran número de plantas (Pinto et al., 2013). Los beneficios de la propagación de especies forestales utilizando explantos pertenecientes a individuos adultos mediante la técnica de ES ha sido expuesta en apartados anteriores, sin embargo, el éxito del proceso es todavía muy dependiente de la habilidad a la hora de aclimatar las plántulas procedentes de la germinación de los embriones somáticos (Romano y Martins-Loução, 2003).

La transferencia de las plántulas somáticas a las condiciones *ex vitro*, implica que estas deban soportar cierto estrés producido por el aumento de la intensidad lumínica y la concentración de CO<sub>2</sub>, la disminución de la humedad relativa y del suministro de carbohidratos y nutrientes presentes en el medio de cultivo, y la presencia de microorganismos. El continuo aporte de nutrientes y azúcares hace que estas plántulas no necesiten desarrollar el aparato fotosintético, por lo que contienen bajos niveles de clorofila y están poco adaptadas a la asimilación de carbono (Rodríguez et al., 2008). La duración del cambio de metabolismo heterótrofo a autótrofo es un factor clave en la supervivencia de las plantas aclimatadas (Pérez-Jiménez et al., 2015). El proceso de aclimatación implica cambios graduales en la morfología de las hojas, epidermis y raíces, por este motivo es aconsejable ir

modificando también gradualmente las condiciones ambientales antes de alcanzar las que finalmente tendrán las plantas en el campo (Romano y Martins-Loução, 2003).

En *Quercus* también se deben aclimatar las plántulas adecuando progresivamente las condiciones de iluminación, temperatura y humedad relativa. La clonación de genotipos selectos de alcornoque para su conservación o para establecer ensayos clonales a fin de obtener información sobre parámetros genéticos e influencia del ambiente sobre los caracteres de interés se ha conseguido en años anteriores (Hernández et al., 2003b). Sin embargo, con respecto a la aclimatación en *Q. ilex*, la información disponible es todavía muy limitada (Martínez et al., 2019); en Barra-Jiménez et al. (2014) no se observa supervivencia de las plántulas somáticas transferidas a contenedores forestales con una mezcla de turba y perlita; Martínez et al. (2017b) consiguieron la aclimatación de plántulas somáticas transfiriéndolas a contenedores con tierra humedecida y perlita en proporción (1:2), pero el porcentaje de supervivencia fue de un 10%.

La aclimatación de especies forestales de gran importancia, como *Q. ilex*, a nivel operativo es el objetivo que se persigue actualmente en los programas de mejora con aplicaciones biotecnológicas como la ES. En la tabla I.1 se resumen los diferentes estudios llevados a cabo durante las últimas décadas para establecer protocolos fiables de propagación clonal de especies de interés del género *Quercus* mediante ES.

A pesar de los grandes avances en los últimos años, el proceso de ES en *Quercus* no está controlado totalmente; una de las principales dificultades encontradas en algunas de estas especies es la inducción de la respuesta embriogénica a partir de explantos provenientes de árboles maduros (Corredoira et al., 2014). Otro problema es la baja tasa de supervivencia de las plántulas somáticas cuando se transfieren a condiciones *ex vitro* en la fase de aclimatación, ya que, en especies como *Q. ilex*, las tasas de supervivencia son muy bajas o nulas.

**Tabla I.1** Principales estudios sobre ES en *Quercus* llevados a cabo en las últimas 2 décadas

Especies	Referencias	
	Material juvenil	Material adulto
<i>Q. robur</i> L.	Cuenca et al. 1999	Chalupa 2000
	Zegzouti et al. 2001	Toribio et al. 2004
	Sunderlikova y Wilhelm 2002	Valladares et al. 2006
	Sánchez et al. 2003	Corredoira et al. 2006
	Prewein et al. 2004	Sánchez et al. 2008
		Martínez et al. 2008 San-José et al. 2010
<i>Q. suber</i> L.	Puigderrajols et al. 1996, 2001	Hernández et al. 2001
	García-Martín et al. 2001	Pinto et al. 2002
	González-Benito et al. 2002	Hernández et al. 2003a y b
	García-Martín et al. 2005	Bueno et al. 2003 Toribio et al. 2005 Celestino et al. 2007 Pintos et al. 2010
<i>Q. rubra</i> L.	Vengadesan y Pijut 2009	Martínez et al. 2015
<i>Q. ilex</i> L.	Mauri y Manzanera 2003, 2004	Blasco et al. 2013
	Cernadas et al. 2018	Barra-Jiménez et al. 2014 Martínez et al. 2017a y b, 2019, 2020
<i>Q. accutissima</i> Carruth.		Kim 2000

#### I.4. Estrés biótico en *Quercus ilex* L. La patología de “la seca”

Durante la década de los 80, la mortalidad que afectaba a *Q. ilex* y *Q. suber* desde principios del siglo XX en la cuenca mediterránea incrementó su severidad notablemente (Moreira y Martins, 2005; Camilo-Alves et al., 2013; Corcobado et al., 2013). A principios de los 90 se consiguió aislar un patógeno asociado al suelo en todas las prospecciones realizadas en zonas afectadas en España y Portugal a partir de muestras de raíces y rizosfera de encinas y alcornoques con síntomas de decaimiento. Este patógeno era el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands (Braisier, 1996; Moreira y Martins, 2005; Torres-Álvarez et al., 2006; Camilo-Alves et al., 2013; Corcobado et al., 2013). A partir de entonces, *P. cinnamomi* se considera el principal agente causante del decaimiento y muerte de alcornoques y en mayor medida de encinas, en

los bosques y dehesas de la península ibérica (Torres-Álvarez et al., 2006; Camilo-Alves et al., 2013), comprobándose su poder patógeno en plántulas (Rodríguez-Molina et al., 2002), plantas jóvenes (Tuset et al., 1996; Robin et al., 1998; Gallego et al., 1999; Luque et al., 2000; Sánchez et al., 2000) e individuos adultos de encina y alcornoque (Tuset et al., 1996), aunque estudios recientes (Mora-Sala et al., 2019) demuestran la presencia de especies como *Phytophthora quercina* en zonas afectadas por “la seca” en la Comunidad Valenciana y Andalucía, por lo que esta especie también podría considerarse causante de este síndrome.

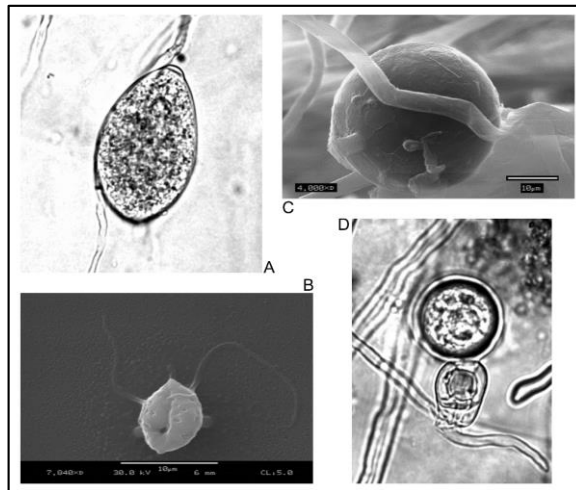
*P. cinnamomi* es uno de los patógenos primarios más devastadores a nivel mundial que afecta a un rango de alrededor de 5000 especies de plantas leñosas, algunas de ellas de gran importancia a nivel agronómico, forestal y ornamental (Brasier, 1996; Jung et al., 2013; Hardham y Blackman, 2018). Está entre los 10 oomicetos patógenos de plantas más importantes desde el punto de vista económico y científico (Hardham y Blackman, 2018).

El origen de *P. cinnamomi* no es del todo conocido, aunque la mayoría de las evidencias de su distribución natural se localizan en puntos de las zonas montañosas del Sudeste de Asia, que se encuentran dentro de la influencia de un clima templado dentro de los trópicos (Ko et al., 1978; Arentz y Simpson, 1986; Martin y Coffey, 2012; Jung et al., 2017). *P. cinnamomi* se describió por primera vez como el agente causante del chancro rayado de la canela de Java (*Cinnamomum burmannii*) en Sumatra (Rands, 1922), aunque se ha aislado en zonas orientales de Sudáfrica (Zentmyer, 1988), sur de California (Kovacs et al., 2011; Cunniffe et al., 2016), oeste de Australia (Shearer et al., 2007, 2012) y sur de Europa (Brasier, 1996; Duque-Lazo et al., 2016); todas estas áreas poseen un clima mediterráneo, con inviernos frescos y húmedos y veranos cálidos y secos (Camilo-Alves et al., 2013; Scanu et al., 2013; Burgess et al., 2017).

Aunque este patógeno también produce daños en la agricultura en zonas tropicales y subtropicales (Drenth y Guest, 2004), es en los ecosistemas con clima mediterráneo donde su impacto es mayor (Burgess et al., 2017). *P. cinnamomi* fue introducido a escala mundial a través de especies hortícolas, extendiéndose por Europa, Norte América, África y Australia, donde se ha convertido en una especie invasiva causando enfermedades muy destructivas en especies leñosas y en ecosistemas naturales (Jung et al., 2013) tales como la tinta del castaño y decaimiento en *Quercus* en Europa, EEUU y México (Crandall, 1950; Brasier et al., 1993; Gallego et al., 1999; Tainter et al., 2000; Vettrai et al., 2002, 2005; Balci et al., 2007; Jung et al.,

2013), la “enfermedad de la hoja pequeña” en especies de pinos en el sureste de EEUU y Caribe (Tainter y Baker, 1996; Jung y Dobler, 2002), la podredumbre de raíces y cuello en aguacate en California, Sudáfrica y Australia (Zentmyer, 1980; Erwin y Ribeiro, 1996), el decaimiento en los brezales del fynbos en la región del Cabo en Sudáfrica (Von Broembsen y Kruger, 1985), y el decaimiento de los bosques de eucaliptus y áreas de *Banksia* y brezales en la Australia occidental (Shearer y Tippett 1989; Shearer y Dillon 1995, 1996; Shearer et al., 2004) y Victoria (Weste y Marks 1987; Marks y Smith 1991; Weste, 2003; Cahill et al., 2008).

*P. cinnamomi* es una especie perteneciente al género *Phytophthora*, de la familia Peronosporáceas, Orden Peronosporales, Clase Peronosporomicetes (antes Oomicetes), Filo Oomycota, Reino Stramenipila (antes Chromista) (Beakes et al., 2014; Hardham y Blackman, 2018; Jung et al., 2018). A diferencia de los verdaderos hongos, los oomicetos se caracterizan por presentar paredes hifales finas y ricas en celulosa y no en quitina; producir zoosporas biflageladas (Fig. 1.6B), con un flagelo liso dispuesto hacia atrás y otro barbulado dispuesto hacia delante; y por poseer hifas no septadas.

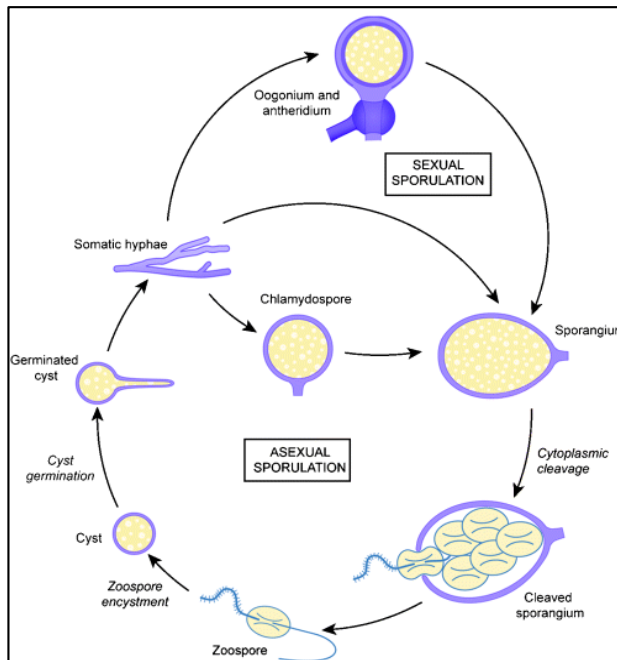


**Figura 1.6.** Estructuras reproductivas de *Phytophthora*: **A** esporangio, **B** zoospora, **C** clamidospora, **D** oospora. Adaptado de Nicholls (2004).

Además, presentan una reproducción sexual oogámica, por contacto gamentangial. Las células de los oomicetos se diferencian morfológicamente de las de los hongos por poseer mitocondrias con crestas tubulares mientras que los hongos poseen crestas aplanadas (Brasier, 1996; Cavalier-Smith y

Chao, 2006; Beakes et al., 2012; Fawke et al., 2015; Hardham y Blackman, 2018).

El ciclo vital de *P. cinnamomi* (Fig. 1.7) se caracteriza por la alternancia de fases activas cortas, en las que se propaga e infecta, cuando las condiciones húmedas del suelo lo permiten, y fases más largas de inactividad, cuando el suelo permanece seco y la competencia de otros patógenos como los hongos verdaderos no le permitiría sobrevivir. Durante las fases activas se reproducen de manera asexual formando los esporangios y las clamidosporas (Fig. 1.6A y C) que contienen las zoosporas.



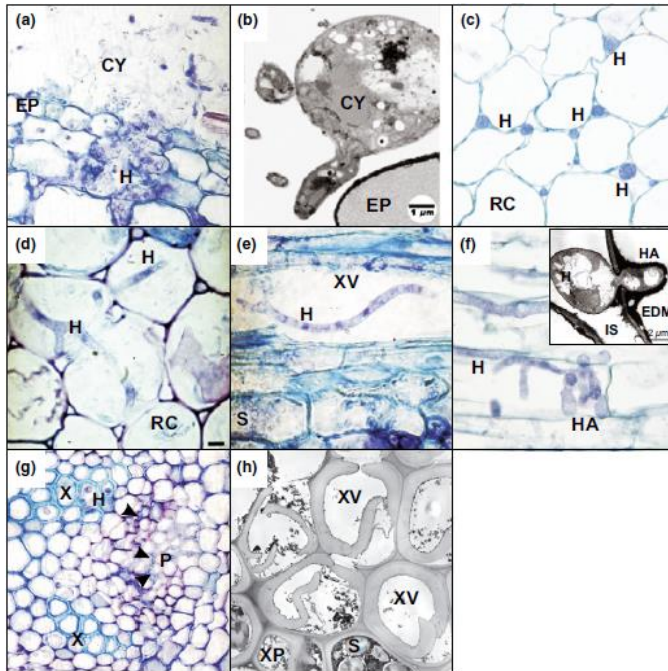
**Figura 1.7.** Diagrama del ciclo vital de *P. cinnamomi*. Esporulaci3n sexual/ Esporulaci3n asexual. Oogonio y anteridio- Esporangio- Escisi3n citoplasm3tica- Esporangios escindidos- Zoosporas- Enquistamiento de zoosporas- Quiste- Germinaci3n- Quiste germinado- Hifas som3ticas- Clamidosporas. Adaptado de Hardham (2005).

Estas esporas m3viles son las que comienzan la infecci3n, provocando el desarrollo del micelio, que emite unas estructuras llamadas haustorios en sus hifas intercelulares, las cuales penetran en el interior de las c3lulas vegetales y absorben los nutrientes presentes en ellas. En la fase inactiva se reproduce sexualmente y forma las oosporas (Fig. 1.6D) dentro del oogonio

en los tejidos infectados, estas oosporas son estructuras de conservación del patógeno a largo plazo y le permiten soportar los periodos desfavorables. Las oosporas son muy resistentes a la sequía y a la destrucción microbiana, gracias al pequeño espesor y a la composición química de sus paredes, de manera que *P. cinnamomi* puede sobrevivir a las condiciones de sequía, calor y frío en el suelo durante varios años (Blackwell, 1949; Hickman, 1958; Erwin y Ribeiro 1996; Jung et al., 1999; Turkensteen et al., 2000).

*P. cinnamomi* se localiza en los suelos de las regiones templadas y tropicales, como se ha expuesto anteriormente, con un máximo de eficiencia entre los 25 y los 30 °C, e infecta las raíces de las plantas vivas, aunque posee capacidad saprófita en suelos con baja actividad de microorganismos y suelos saturados, donde compite favorablemente con otros microorganismos (Brasier, 1996, 1999; Camilo-Alves et al., 2013; Hardham y Blackman, 2018). En los árboles comienza atacando las raicillas finas absorbentes y también aparece en la región del cuello de la raíz (Fig. 1.8), posteriormente, el oomiceto se puede propagar en raíces más gruesas o ascender a lo largo del tronco (Fig. 1.9), infectando principalmente la corteza interior (cámbium y floema) (Brasier, 1999). Este proceso de infección produce la pérdida de las raíces absorbentes, provocando la incapacidad de captar agua y nutrientes. En localizaciones donde las condiciones son favorables para el patógeno, se produce una acumulación de zoosporas y los árboles genéticamente o estacionalmente más susceptibles pueden sufrir una afección aguda, muriendo de repente por el estrés hídrico consecuencia de la pérdida de las raíces absorbentes, o por el colapso del sistema vascular. La deficiencia de agua reduce la tasa de transpiración, la eficiencia del fotosistema II y la absorción de CO<sub>2</sub>, así como la conductancia estomática (Jung et al., 1996; Robin et al., 1998; Gallego et al., 1999). Como consecuencia del estrés hídrico se produce una disminución de los niveles de proteínas implicadas en los procesos fotosintéticos y un aumento de aquellas relacionadas con la biosíntesis de almidón, la glucólisis y la respuesta a estrés (Sghaier-Hammami et al., 2013).

En otras condiciones menos favorables para el oomiceto, los niveles de zoosporas se mantienen bajos y el árbol permanece en un estado crónico de afección, consiguiendo compensar la pérdida de las raíces con el reemplazo de las mismas, hasta que otro estrés produzca un empeoramiento rápido que conduzca a la muerte o a un decaimiento progresivo (Brasier, 1996, 1999; Robin et al., 1998; Gallego et al., 1999).

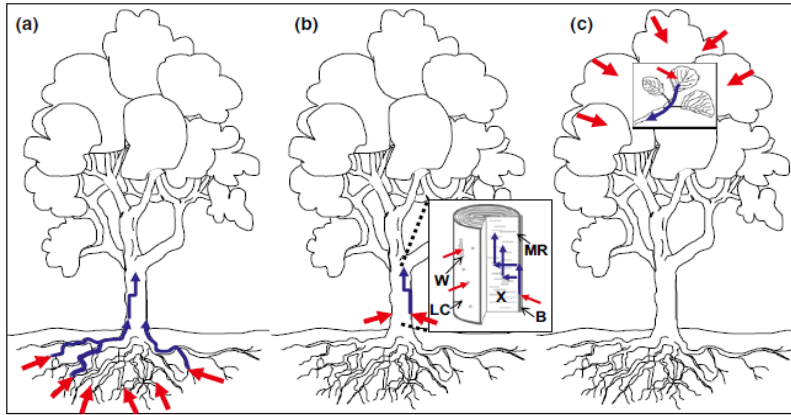


**Figura 1.8.** Observaciones histopatológicas al microscopio óptico y al microscopio electrónico de transmisión (Fig. 8b, inserto de 8f y 8h) en raíces sobre infección por *Phytophthora*: (a) zoosporas enquistadas en la vecindad de células infectadas de la corteza de la raíz; (b) quiste en germinación formando una hifa de penetración; (c) crecimiento intercelular de hifas en la corteza de la raíz; (d,e) crecimiento intracelular de hifas en la corteza radicular y en vasos del xilema respectivamente; (f) estructuras similares a haustorios formadas en células de la corteza de la raíz; (g) destrucción del tejido del floema (flechas) y crecimiento intracelular de hifas en vasos del xilema; (h) destrucción de las paredes celulares de los vasos del xilema en el hipocótilo en ausencia de *P. hyphae*. Todas las figuras muestran raíces de *Fagus sylvatica* infectadas artificialmente con zoosporas de *P. plurivora*, excepto la fig. 8b (raíz de *Chamaecyparis lawsoniana* infectada con *P. lateralis*) y el inserto de la fig. 3f (*Quercus robur*). Adaptado de Oßwald et al. (2014).

Cuando el árbol se encuentra en una fase de enfermedad crónica, la sintomatología es muy poco específica (Brasier, 1999); se produce una pérdida gradual del follaje, una desecación parcial de la copa, en ocasiones aparecen ramas aparentemente sanas mientras otras están completamente secas; también pueden aparecer úlceras corticales (Gallego et al., 1999). Los árboles afectados pueden distribuirse en grupos de diferente tamaño en el interior de un bosque aparentemente sano, o pueden observarse aislados



(Moreira y Martins, 2005; Camilo-Alves et al., 2013; Corcobado et al., 2014; Duque-Lazo et al., 2018).

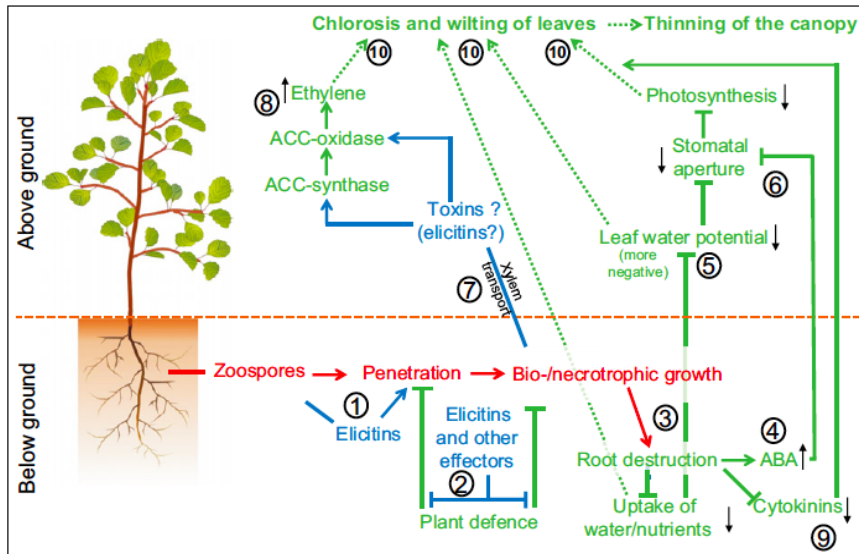


**Figura I.9.** Modelos de infestación por *Phytophthora*: (a) Infestación primaria de raíces; flechas rojas: infección primaria de raicillas finas; flechas azules: crecimiento secundario en el interior de la corteza y/o xilema del tronco. (b) Infestación primaria del tronco; flechas rojas: infección primaria del tronco vía lenticelas (LC) o heridas (W); flechas azules: crecimiento secundario en el tejido de la corteza (B) y vía líneas medulares (MR) en el xilema (X) del tronco. (c) Infestación primaria de las hojas; flechas rojas: infección primaria de hojas; flechas azules: crecimiento secundario en peciolo y ramillas. Adaptado de Oßwald et al. (2014).

La figura I.10 muestra un esquema de los efectos de la infección de las raíces de una planta huésped sensible a *Phytophthora* a nivel fisiológico, bioquímico y molecular (Oßwald et al., 2014).

El decaimiento de *Q. ilex* asociado a la infección por *P. cinnamomi* forma parte de una patología compleja en la que las condiciones climáticas y otros factores ambientales tienen mucha influencia (Brasier, 1996, 1999; Jung et al., 1996, 2018; Robin et al., 1998; Gallego et al., 1999; Camilo-Alves et al., 2013). La “seca” es la denominación que adoptó en España esta patología que afecta a los *Quercus*, especialmente a la encina y al alcornoque, en mayor medida en el sudoeste de la península ibérica (Tuset et al., 2006). Esta enfermedad tiene mayor incidencia en la encina (*Quercus ilex* L.), debido a la mayor susceptibilidad de esta especie y está provocada por la combinación de una serie de factores abióticos (climatología, edafología, topografía, competencia inter e intraespecífica) y bióticos (insectos xilófagos y patógenos) (González-Rodríguez et al., 2011; Corral et al., 2018; Duque-Lazo et al., 2018). Entre estos últimos destaca el oomiceto *Phytophthora*

*cinnamomi*, como se ha detallado anteriormente (Brasier, 1996; Torres-Álvarez et al., 2006; Camilo-Alves et al., 2013).



**Figura 1.10.** Efectos de la infección y crecimiento de *Phytophthora* a nivel fisiológico, bioquímico y molecular en plantas susceptibles. 1: liberación de elicitinas en la rizosfera, facilitando la penetración; 2: inhibición de la expresión de genes de defensa, lo que facilita el crecimiento del patógeno; 3: destrucción de raíces durante el crecimiento, dificultando la absorción de agua y nutrientes; 4: incremento de ácido abscísico (ABA) en raíces; 5: disminución del potencial hídrico foliar; 6: cierre de estomas y como consecuencia, decrecimiento de la fotosíntesis; 7: posible liberación de toxinas y moléculas efectoras en el tejido del huésped durante el crecimiento biotrófico del patógeno y transporte a la copa mediante el flujo de savia; 8: sobreexpresión de genes de la ruta del etileno y liberación de la fitohormona por las hojas; 9: decrecimiento en el contenido de citoquininas en las raíces durante el crecimiento necrotrofico del patógeno; 10: clorosis y marchitamiento de las hojas de la copa como consecuencia del cambio del estado hormonal e hídrico de la planta huésped causado por la infección. Líneas y texto rojos: crecimiento de *Phytophthora*; líneas y texto azules: estimulación del factor correspondiente; líneas verdes y azules bloqueadas y texto: inhibición del correspondiente factor; flechas negras: sobreexpresión o inhibición de la expresión de metabolitos y/o genes. Adaptado de Oßwald et al. (2014).

El aumento de la mortalidad de las encinas afectadas por esta patología depende mucho de la interacción entre el patógeno y los factores abióticos involucrados en ella, especialmente las condiciones climáticas. Las zonas caracterizadas por inviernos fríos y húmedos, pero sin precipitaciones en forma de nieve, y veranos cálidos y secos, son más susceptibles al decaimiento (Camilo-Alves et al., 2013; Burgess et al., 2017; Duque-Lazo et al., 2018), además, durante los periodos de sequía, los daños en las encinas

se ven intensificados (Brasier, 1993; Robin et al., 1998; Gallego et al., 1999; Camilo-Alves et al., 2013; Corcobado et al., 2014). Las sequías de 1985-1986 y 1993-1994 redujeron el crecimiento radial y longitudinal de poblaciones de encina y quejigo del sistema Ibérico, afectando en mayor medida a los montes bajos que habían sufrido cambios en su estructura debido al abandono de sus usos tradicionales (Camarero et al., 2004), estas condiciones de debilidad predisponen a los árboles al ataque del patógeno intensificando el decaimiento.

Las condiciones del suelo también influyen en el grado de afección de “la seca”; los suelos con alta capacidad de retención de agua son más favorables a la dispersión e infección del patógeno (Brasier, 1996; Duque-Lazo et al., 2018), sin embargo, los cambios bruscos en el contenido de humedad del suelo provocados por inviernos altamente húmedos seguidos de veranos excesivamente secos que provocan una desecación muy rápida del suelo, también favorecen la disminución del crecimiento y la vitalidad de los árboles (Fisher et al., 2011; Corcobado et al., 2013). Los árboles afectados suelen mostrar daños importantes en las raíces finas absorbentes en suelos con menor profundidad y más secos (Brasier, 1996; Camarero et al., 2004), mientras que los daños en raíces gruesas y cuello de la raíz se observan en suelos más profundos y húmedos (Brasier, 1996). Los suelos con bajo pH y baja concentración de cal activa también favorecen la intensidad de la afección (Duque-Lazo et al., 2018)

La topografía de la zona donde se encuentran los árboles está estrechamente relacionada con la intensidad de la afección de “la seca”, de manera que los ejemplares más afectados suelen localizarse en las riberas de los ríos, en zonas deprimidas, en vaguadas donde discurre agua de manera estacional y en las laderas bajas de las montañas o colinas (Brasier, 1996; Gallego et al., 1999; Moreira y Martins, 2005; Corcobado et al., 2013; Duque-Lazo et al., 2018); los árboles situados en zonas de pendiente orientadas hacia el sudoeste, que están expuestos durante más horas a la insolación en verano y otoño, también presentan mayor predisposición a “la seca” (Brasier, 1996; Camilo-Alves et al., 2013; Duque-Lazo et al., 2018), así como los situados en los márgenes de caminos y zonas de tránsito de animales (Brasier, 1996).

La competencia intraespecífica o interespecífica intensifica la afección de “la seca”, de manera que zonas altamente cubiertas por otras encinas o *Quercus* se ven más afectadas por el decaimiento (Duque-Lazo et al., 2018).

Las zonas más afectadas por “la seca” se localizan en el sudoeste de la península ibérica, donde se dan las condiciones más favorables para el avance de *P. cinnamomi*. Estas zonas están ocupadas en mayor medida por las dehesas. Las consecuencias del cambio climático en relación al incremento de episodios de lluvias torrenciales seguidos de largos periodos de sequía, así como el aumento de las temperaturas medias, influirán de manera evidente en la intensidad de la afección de “la seca” de la encina en estas zonas del sudoeste de la península ibérica, como se ha comentado anteriormente (Gea-Izquierdo et al., 2013; Ruiz-Gómez et al., 2018).

### **I.5. Respuesta de las plantas a estrés**

Las plantas, al contrario que los vertebrados, son organismos sésiles que carecen de células inmunes móviles especializadas y de un sistema inmune adaptativo, sin embargo, poseen mecanismos de defensa como barreras físicas o estructurales y a lo largo del tiempo han desarrollado un sistema inmune complejo, mediante el cual son capaces de producir respuestas específicas tras la infección de ciertos patógenos potenciales (Spoel y Dong, 2012; Wang et al., 2019). Por su parte los patógenos han desarrollado diferentes estrategias para aumentar la virulencia de la infección.

Las barreras físicas de las plantas, formadas principalmente por la pared celular y la cutícula, forman parte de los mecanismos de defensa de respuesta pasiva, constituidos también por barreras bioquímicas, que son metabolitos que pueden resultar tóxicos para los patógenos. Ambas estructuras son barreras preformadas, están presentes en las plantas antes de que se produzca el ataque (Kovalchuk et al., 2013; Dotor y Cabezas, 2014).

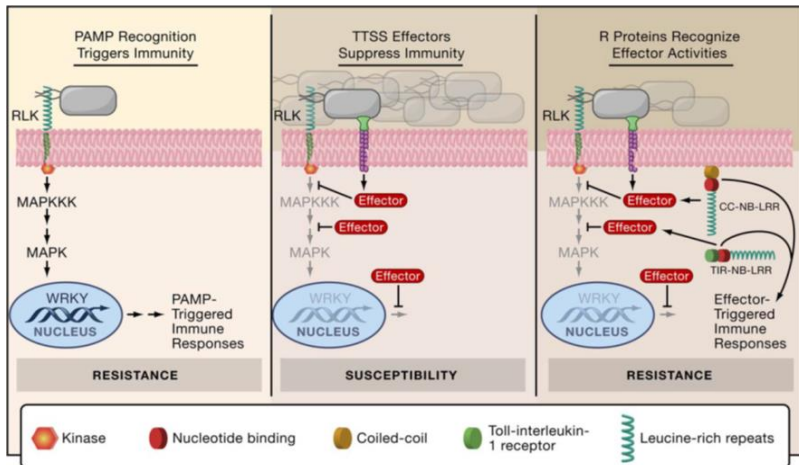
Cuando los patógenos superan las barreras preformadas, se activa la denominada defensa activa o inducible (Dotor y Cabezas, 2014). Las plantas poseen dos estrategias para detectar patógenos; por un lado, en la parte externa de sus células o en el apoplasto, las células detectan su presencia mediante unas proteínas llamadas receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PRRs), al reconocer los elicitores microbianos llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Dodds y Rathjen, 2010; Fawke et al., 2015; Bektas y Eulgem, 2015; Wang et al., 2019). Los PAMPs son componentes esenciales de diversas clases de patógenos, como la flagelina de las bacterias o la quitina de los hongos, que poseen una estructura conservada. Las plantas también responden a moléculas endógenas liberadas por la invasión de los

patógenos, como fragmentos de la pared celular o de la cutícula, llamados patrones moleculares asociados a peligro (DAMPs), (Dodds y Rathjen, 2010; Wang et al., 2019). La estimulación de los PRRs activa un mecanismo de defensa llamado inmunidad activada por PAMPs (PTI).

En una segunda fase o estrategia, los patógenos emiten moléculas efectoras que son reconocidas por receptores específicos intracelulares de moléculas de virulencia de los patógenos llamados efectores o elicitores, codificados por genes de virulencia (*avr*), que inhiben la PTI o evitan el reconocimiento de los efectores. Ante los genes *avr*, las plantas activan genes de resistencia (genes *R*) que son específicos para cada *avr*, este reconocimiento provoca el mecanismo de defensa llamado inmunidad activada por efectores (ETI), (Fig. I.11). Este mecanismo es bastante diferente de la PTI, ya que, en contraste con los PAMPs, los efectores tienen características variables, normalmente hay una amplia diversificación de receptores de ETI y de efectores de patógenos dentro de la misma especie y también entre especies, mientras que la función y estructura de los PRR se conservan ampliamente a través de las familias (Dodds y Rathjen, 2010; Bektas y Eulgem, 2015; Bigeard et al., 2015).

Aunque PTI y ETI pueden dar lugar a respuestas similares, ETI es cualitativamente más fuerte y rápida, aunque también más inespecífica y está relacionada con la respuesta hipersensible (HR), que implica la muerte programada de las células en el sitio de la infección evitando el avance del patógeno al bloquear su acceso al agua y nutrientes (Thatcher et al., 2005; Dodds y Rathjen, 2010; Fawke et al., 2015; Bektas y Eulgem, 2015; Wang et al., 2019). El ataque del patógeno desencadena una actividad hidrolítica que a su vez genera un flujo de iones a través de la membrana plasmática y la pared celular de las células vegetales, provocando un aumento de la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Dotor y Cabezas, 2014), dando lugar a la mencionada respuesta hipersensible mediante la que se produce la necrosis de los tejidos en las zonas próximas al lugar de la infección (Mur et al., 2008; Ali et al., 2018). Junto a la respuesta hipersensible se produce una acumulación de ácido salicílico (AS), etileno (ET) y ácido jasmónico (AJ) (Dotor y Cabezas, 2014; Ali et al., 2018). PTI es efectiva frente a patógenos no adaptados, mientras que ETI es activa frente a patógenos adaptados, aunque estas relaciones no son exclusivas y dependen de las moléculas elicitoras presentes en cada infección (Dodds y Rathjen, 2010). Tanto la ETI como la PTI activan a su vez una serie de cascadas de señalización mediadas por

proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), que finalmente inducen la expresión de genes de defensa.



**Figura I.11.** Modelo de evolución de la resistencia a bacterias en plantas. De izquierda a derecha, reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (como flagelina bacteriana) por quinasas similares a receptores extracelulares (RLK), este reconocimiento desencadena rápidamente la inmunidad basal, que requiere señalización a través de cascadas de MAP quinasa y reprogramación transcripcional mediada por factores de transcripción WRKY de la planta. Las bacterias patógenas utilizan el sistema de secreción de tipo III para administrar proteínas efectoras que se dirigen a múltiples proteínas del huésped para suprimir las respuestas inmunes basales, lo que permite una acumulación significativa de bacterias en el apoplasto de la planta. Las proteínas de resistencia vegetal (representadas por CC-NB-LRR y TIR-NB-LRR) reconocen la actividad efectora y restauran la resistencia a través de respuestas inmunes activadas por los efectores. La acumulación limitada de bacterias se produce antes del inicio efectivo de las respuestas inmunes activadas por efectores. Adaptado de Chrisohm et al. (2006).

Estos genes activan una serie de componentes de señalización que incluyen múltiples proteínas reguladoras, especies reactivas de oxígeno (ROS) y fitohormonas con especial implicación en la defensa, como el ácido jasmónico (AJ), el etileno (ET) o el ácido salicílico (AS). Los niveles de ROS, AS, ET y AJ normalmente aumentan en los tejidos de las plantas después de la infección de un patógeno (Jones y Dangl, 2006; Dodds y Rathjen, 2010; Fawke et al., 2015; Bektas y Eulgem, 2015), así como ciertos compuestos fenólicos que juegan un importante papel en la resistencia a estrés de las plantas (Kulbat, 2016).

PTI y ETI son respuestas locales transitorias que se limitan a los tejidos infectados, sin embargo, las plantas son capaces de activar una inmunidad sistémica duradera, a través de interacciones locales compatibles o incompatibles (Bektas y Eulgem, 2015). La resistencia sistémica inducida (ISR) se desencadena por la acción de algunas cepas no patógenas de rizobacterias. La activación de la ISR está regulada por la acción del ácido jasmónico y el etileno y se asocia generalmente con un estado fisiológico en el que las plantas pueden reaccionar más eficientemente al ataque de un amplio rango de patógenos (Gozzo y Faoro, 2013; Bektas y Eulgem, 2015; Salla et al., 2016).

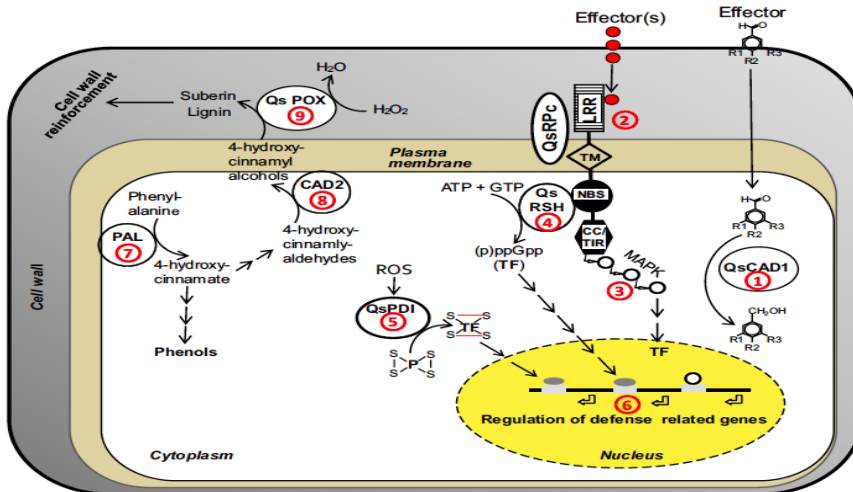
La resistencia sistémica adquirida (SAR) se activa en muchas especies por la acción de patógenos que causan necrosis, bien como respuesta HR, o como síntoma de enfermedad (Durrant y Dong, 2004; Bektas y Eulgem, 2015), es efectiva contra un amplio rango de patógenos a largo plazo y se produce en lugares alejados del lugar de infección (Fu y Dong, 2013; Gozzo y Faoro, 2013). En la SAR, el ácido salicílico, compuesto fenólico derivado de la fenilalanina, se acumula en los lugares de infección y posteriormente se transporta a lugares no infectados de la planta a través del floema, donde induce el desarrollo de la SAR, por tanto está implicada en el transporte de la señal generada en el tejido inoculado (Dempsey y Klessig, 2012; Dotor and Cabezas, 2014; Maruri-López et al., 2019).

De esta manera, el sistema de defensa de las plantas está influenciado por el tipo de patógeno que produzca el ataque, el cual determinará la ruta que se activa, si la mediada por el AS cuando se trata de un patógeno biótrofo o la del AJ/ET si es por la acción de un patógeno necrótrofo, o por la presencia de rizobacterias del suelo (Glazebrook, 2005; Thaler et al., 2012). La figura I.12 muestra un modelo hipotético de respuesta a estrés provocado por *Phytophthora* en plantas leñosas (Oßwald et al., 2014) que ilustra la posible implicación de los derivados de la fenilalanina, precursora de los fenoles, entre ellos la lignina y la actividad ROS en la tolerancia al oomiceto.

### **I.5.1. Las especies reactivas de oxígeno (ROS)**

En respuesta a estrés biótico o abiótico las plantas liberan especies reactivas de oxígeno (ROS). A pesar de que a altas concentraciones resultan tóxicas para las plantas, las ROS juegan un importante papel como moléculas de señalización en la regulación de numerosos procesos biológicos de la planta, a parte de la respuesta a estrés (Mittler et al., 2011; Baxter et al., 2014). Después del reconocimiento de cierta variedad de patógenos se ha

documentado una generación apoplástica de superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o del producto de su dismutación, peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Torres et al., 2006).



**Figura I.12.** Modelo hipotético del mecanismo molecular de respuesta a estrés frente a *Phytophthora* en plantas leñosas. 1: desactivación de factores de virulencia del patógeno por la proteína QsCAD1 (*Quercus suber* cinamil alcohol deshidrogenasa 1). 2: interacción específica entre las moléculas efectoras de *Phytophthora* y la región LRR de la proteína QsRPC (proteína de resistencia de *Q. suber* a *Phytophthora cinnamomi*), así como transducción de la señal a través de NBS y dominios en estructura superenrollada (coiled-coil (CC) / TIR). 3: activación de la cascada MAPK y liberación de factores de transcripción. 4: síntesis y liberación del factor de transcripción (p) ppGpp del ATP y GTP catalizada por la proteína QsRSH (homóloga de *Q. suber* RelA / SpoT). 5: activación de factores de transcripción y otras proteínas, por oxidación o reducción y / o isomerización de residuos de cisteína, catalizada por QsPDI (*Q. suber* disulfuro isomerasa), en respuesta a ROS. 6: regulación de genes relacionados con la defensa por diferentes factores de transcripción resultantes de las reacciones 2 a 5. 7/8: activación de fenilalanina liasa de amonio (PAL) y CAD2 (cinamil alcohol deshidrogenasa2) implicados en la síntesis de compuestos fenólicos, precursores de lignina y suberina (mostradas para eucalipto y cítricos). 9: polimerización dependiente de  $H_2O_2$  de fenoles que forman lignina y suberina catalizada por la peroxidasa QsPOX, (*Q. suber* peroxidasa). Abreviaturas: TF (factor de transcripción); TIR (receptor de interleucina 1 de peaje); ROS (especies reactivas de oxígeno); (p) ppGpp (tetra y pentafofato de guanosina); TM (dominio transmembrana); CC (dominio en estructura coiled-coil); NBS (unión de nucleótidos sitio); LRR (repetición rica en leucina); MAPK (proteína quinasas activadas por mitógenos); ATP (trifosfato de adenosina); ADP (adenosina difosfato); GTP (trifosfato de guanosina), proteína QsCAD1 (*Q. suber* alcohol cinámico deshidrogenasa 1), proteína QsRPC (proteína *Q. suber* de resistencia a *P. cinnamomi*), QsRSH (homólogo *Q. suber* RelA / SpoT), QsPDI (*Q. suber* disulfuro isomerasa), PAL (fenilalanina amonio liasa), CAD2 (alcohol cinámico deshidrogenasa2), CW = pared celular, PI = plasmalema, Cyt = citoplasma. Adaptado de Oßwald et al. (2014).



Las señales generadas por las ROS provocan respuestas rápidas tras el estrés como el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, la activación de cascadas de MAPKs o la fosforilación diferencial de proteínas, a largo plazo las respuestas controlan cambios fenotípicos como el crecimiento, desarrollo y supervivencia de las células (Zhao et al., 2001; Baxter et al., 2014). Las ROS están implicadas en la activación de mecanismos de defensa como la SAR, la cual tiene gran importancia en la prevención de posteriores infecciones o daños en la totalidad de la planta (Mittler et al., 2011; Baxter et al., 2014).

Cuando la elevada concentración de ROS resulta tóxica para las propias especies vegetales, se activan distintos mecanismos para paliar el estrés oxidativo. En los peroxisomas la catalasa (CAT) convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, mientras que en los cloroplastos la superóxido dismutasa (SOD) cataliza la conversión de aniones de oxígeno en peróxido de hidrógeno, que posteriormente será transformado por otros mecanismos antioxidantes (Mittler et al., 2004; Chong et al., 2005). La peroxidasa (POX) también actúa como catalizador de la degradación del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , convirtiéndolo en agua y un radical libre derivado del sustrato fenólico o no fenólico acompañante de la peroxidasa (Pandey et al., 2017). La glutatión reductasa (GRd) actúa como un poderoso antioxidante que contribuye a la detoxificación del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y a la neutralización de los radicales superóxido e hidroxilo cuando es oxidado por estos ROS. Una vez que el GSH ha revertido a GSSG, y a diferencia de las formas oxidadas de otras moléculas que participan en la neutralización de ROS, el GSSG se regenera rápidamente a GSH por la acción de esta enzima glutatión reductasa (GRd) hasta su nivel de equilibrio. Este mecanismo de reciclaje del GSH funciona como barrera química que previene la propagación de ROS y la oxidación de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, y que es favorecida por la abundancia de GSH en la célula (Noctor et al., 2012; Hasanuzzaman et al., 2017). En ausencia de la activación de mecanismos que palíen la actividad oxidativa de las ROS se puede llegar a alcanzar un estado de necrosis celular (Cervilla et al., 2007; Kobayashi et al., 2007; Wi et al., 2012; Baxter et al., 2014).

## **I.6. Elicitación, “priming” e inducción de memoria epigenética**

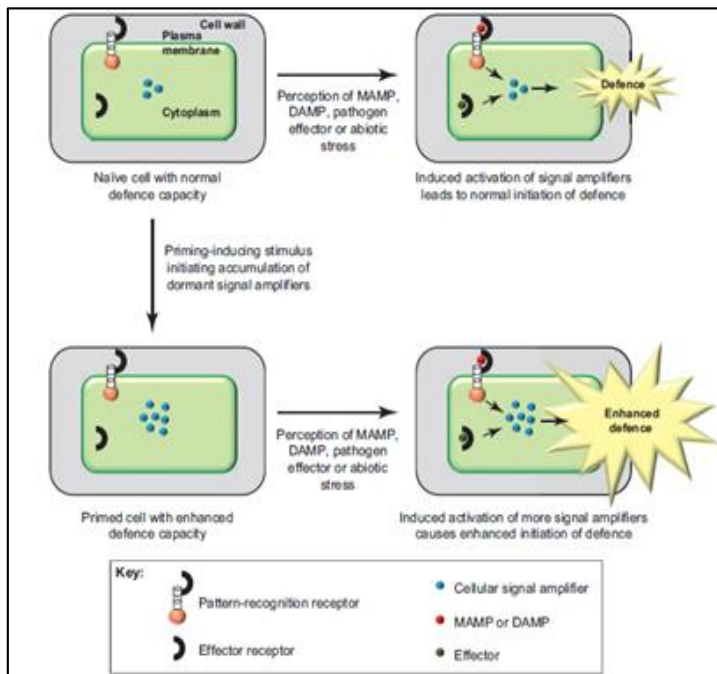
La infección de las plantas causada por patógenos necrotizantes, o la colonización de sus raíces con ciertos microbios beneficiosos como las rizobacterias causan la inducción de un estado fisiológico único llamado “priming”. Las plantas imprimadas son capaces de activar más eficientemente los mecanismos celulares de defensa, mediante una

respuesta más rápida, fuerte, o ambas, al ser atacadas nuevamente por patógenos, insectos o en respuesta a un estrés abiótico (Conrath et al., 2006, 2015; Conrath, 2011), la figura I.13 muestra un esquema sobre el fenómeno de “priming” incluido en Conrath (2011). Este proceso de sensibilización también puede ser inducido mediante el tratamiento de las plantas con ciertos compuestos naturales, como las propias elicinas de los patógenos (Ebadzad et al., 2015), o sintéticos (Walters et al., 2005; Conrath et al., 2006, 2015; Vivas y Solla, 2012; Bektas y Eulgem, 2015), que incluyen compuestos químicos que actúan en varios momentos en las rutas de señalización implicadas en la resistencia a enfermedad (Walters et al., 2005). Estos compuestos, llamados inductores o elicitores, son capaces de provocar reacciones similares a las elicinas y en algunas especies se han aplicado a cultivos *in vitro* y se han obtenido y seleccionado líneas con mayor resistencia a patógenos (Švábová y Lebeda, 2005).

Los primeros elicitores sintéticos se identificaron en los años 70 (Gianinazzi y Kassanis, 1974; Kassanis y White, 1975; Langcake y Wickins, 1975; White, 1979) y desde entonces se han ido conociendo nuevas sustancias capaces de activar la resistencia sistémica inducida (ISR) o adquirida (SAR) de las plantas tras verse sometidas a estrés, como por ejemplo, el ácido  $\beta$ -amino butírico (BABA), el ácido salicílico (AS), el ácido p-aminobenzoico (PABA), el metiljasmonato (MeJA) o el benzotiadiazol (BTH) entre otros (Conrath, 2011). La aplicación externa de estos elicitores en la planta provoca una serie de cambios bioquímicos como la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), el refuerzo de la pared celular mediante la producción de compuestos fenilpropanoides, la biosíntesis de fitoalexinas y proteínas relacionadas con la patogénesis, y la activación de enzimas ligadas a las respuestas de defensa (Jaiti et al., 2009; Thakur y Sohal, 2013).

Numerosos estudios han demostrado la efectividad de los tratamientos exógenos con MeJA a la hora de inducir resistencia al ataque de ciertas plagas o patógenos aplicados en plántulas de coníferas (Kozłowski et al., 1999; Heijari et al., 2005; Holopainen et al., 2009; Zas et al., 2014), plantas de *Arabidopsis* (Thomma et al., 2000), hojas de vid (Belhadj et al., 2006), plántulas de tomate (Kepczyńska y Król 2012), bayas de laurel (Wang et al. 2014, 2015) y racimos de uva (Jiang et al., 2015). Otros estudios realizados ensayando la efectividad de los tratamientos con BTH y BABA en brinzales de *Pinus pinaster* ante el ataque de *Fusarium circinatum* (Vivas y Solla, 2012) demostraron que la inducción de resistencia dependía de la familia ensayada. Aplicaciones exógenas de ácido salicílico (AS) y carvacrol

en *Ulmus minor* incrementaron la resistencia de los árboles al hongo patógeno *Ophiostoma novo-ulmi* (Martín et al., 2008, 2010). También aplicaciones foliares de AS o BTH en *Pinus radiata* produjeron una disminución significativa de las infecciones provocadas por *Diplodia pinea* o *Phytophthora cinnamomi* respectivamente (Reglinski et al., 1998; Ali et al., 2000).



**Fig. I.13.** Un estímulo inductor de “priming” parece aumentar el nivel de proteínas inactivas con un papel importante en la amplificación de la señal celular. La exposición posterior a MAMP, DAMP, efectores de patógenos o estrés abiótico activa más estas proteínas de señalización latentes en células imprimadas que en células no imprimadas, de manera que provoca una fuerte amplificación de la señal que conduce a una activación más rápida y robusta de la defensa asociada con la inmunidad y tolerancia al estrés. Clave: de izda. a dcha., receptor de reconocimiento de patrones, efector receptor, amplificador de la señal celular, MAMP o DAMP, efector. Adaptado de Conrath (2011).

La elicitación de semillas con estos compuestos produce una serie de cambios que permiten que, cuando se desarrollan en plantas, estas estén imprimadas (“primed”) para dar respuestas de defensa más rápidas y/o con mayor intensidad al ser atacadas por patógenos microbianos, insectos, herbívoros o incluso si sufriesen un estrés abiótico (Kepczyńska y Król, 2012; Worrall et al., 2012; Król et al., 2015). No obstante, la efectividad de los

tratamientos elicitors a la hora de incrementar la respuesta a estrés biótico depende de qué tipo de patógeno está infectando, ya que como se ha comentado en apartados anteriores, las plantas activan diferentes rutas de defensa y las respuestas que dependen del ácido jasmónico (AJ) y del etileno (ET) son activadas por los patógenos necrotróficos y las que dependen del ácido salicílico (AS) son activadas por patógenos biotróficos (Thakur y Sohal, 2013).

Horta et al. (2010) y Ebadzad et al. (2015) evaluaron los efectos de la cinnamomina, elicitor segregado por *P. cinnamomi*, en plantas de alcornoque y encina, demostrando que está implicada en el proceso de infección y es capaz de inducir respuesta de defensa a este oomiceto, sin embargo, no se tiene conocimiento hasta la fecha de trabajos sobre el uso de elicitorinas o elicitors para inducir respuestas de defensa en semillas de *Quercus sp.* Mediante la técnica de embriogénesis somática, que se ha descrito en apartados anteriores, se puede obtener un gran número de embriones genéticamente iguales (Ruiz-Galea et al., 2017). Suponiendo que el desarrollo de los embriones somáticos imita al de los embriones zigóticos, se podría estudiar si la elicitación de estos embriones somáticos durante la fase de proliferación genera alguna señal de inducción de mecanismos de defensa, y si estos mecanismos se transmiten de manera transgeneracional, obteniéndose plantas más resistentes a la infección de *P. cinnamomi*.

Los cambios heredables en la expresión y función génica que no pueden ser explicados por cambios en la secuencia de DNA se denominan variaciones epigenéticas (Richards, 2006). Las variaciones epigenéticas están influenciadas por el ambiente, de manera que un mismo genotipo puede mostrar fenotipos alternativos (Masuelli y Marfil, 2011). Diferentes estreses pueden inducir cambios epigenéticos en las plantas, entre otros, el ataque de patógenos, el cultivo *in-vitro* y la hibridación interespecífica (McClintock, 1984).

Las variaciones epigenéticas incluyen mecanismos moleculares como modificaciones en la cromatina, metilación del DNA, cambios en las histonas, variaciones postranscripcionales y acumulación de pequeños ARNs y ARN de interferencia (Kraska y Schönbeck, 1993; Richards, 2006; Jaskiewicz et al., 2011; Boyko y Kovalchuk, 2011; Masuelli y Marfil, 2011; Holeski et al., 2012). A través de estos cambios las plantas no sólo son capaces de adquirir inmunidad por medio de la sensibilización o “priming” durante toda su vida, sino que además pueden transmitir esta inmunidad a las siguientes generaciones (Henry et al., 2013). Existen evidencias de que los estreses

bióticos provocados por herbívoros o patógenos sobre las plantas madre pueden inducir defensas transgeneracionales en la progenie cuando ésta se ve sometida a condiciones ambientales severas (Holeski et al., 2012; Rasmann et al., 2012; Vivas et al., 2013).

Sin embargo, la mayoría de estudios de inducción transgeneracional de defensas frente a plagas y patógenos en plantas se enfocan en especies anuales de ciclo corto; Luna et al. (2012) y Slaughter et al. (2012) demostraron que el tratamiento de plantas de *Arabidopsis* con el elicitor BABA, que interviene en la activación de la SAR, así como el tratamiento con cepas virulentas o avirulentas de *P. syringae* pv. *tomato* provocaba que su progenie mostrara un incremento de la resistencia a este patógeno, con una expresión mayor y más rápida de genes implicados en la defensa mediada por el AS. La progenie de plantas de *Arabidopsis* imprimadas con este elicitor también mostró una mayor resistencia al oomiceto biotrófico *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Luna et al., 2012; Slaughter et al., 2012).

A pesar de esto, todavía se desconoce en gran medida si este tipo de plasticidad transgeneracional también se da en especies forestales de ciclo largo (Holeski et al., 2012). Vivas et al. (2013) demostraron que las condiciones ambientales sufridas por árboles madre de pino marítimo influían en la tolerancia a estrés biótico de su descendencia y más recientemente, el trabajo de Camisón et al. (2019) demostró que plántulas jóvenes de castaño descendientes de árboles madre afectados por la enfermedad de la tinta, tenían una mayor tolerancia a *P. cinnamomi*; este incremento en la tolerancia se observó en plantas provenientes de las semillas de menor tamaño, pero no estaba influenciado por el tamaño de la semilla, sino que probablemente era consecuencia del efecto del fenómeno de “priming” de la semilla durante el desarrollo del fruto. En su último trabajo Vivas et al. (2021) demostraron que las plántulas descendientes de encinas infectadas de manera natural por *P. cinnamomi* en campo mostraban mayor grado de tolerancia que las procedentes de encinas sanas cuando eran infectadas por el patógeno en condiciones de invernadero.

Como se ha comentado, si el desarrollo de los embriones somáticos imita al de los embriones zigóticos, se podría estudiar si la elicitación de estos embriones somáticos de encina durante la fase de proliferación genera alguna señal de inducción de mecanismos de defensa, y si estos se transmiten de manera transgeneracional, obteniéndose plantas más resistentes a la infección de *P. cinnamomi*. En este sentido y hasta la fecha hay escasas referencias (Ruiz-Galea et al. 2017) que estudien el efecto de

elicitores como el MeJA, BABA y BTH y extractos filtrados del oomiceto *P. cinnamomi* (OCF) sobre líneas embriogénicas de encina, en relación a la integridad de las líneas y a la inducción de tolerancia a este patógeno.

Todos estos estudios referenciados anteriormente sugieren que ciertos tratamientos elicitores activan mecanismos de defensa en las plantas imitando el efecto que experimentan las mismas cuando sufren un estrés biótico y/o abiótico y que, además, esta resistencia o tolerancia inducida se transmite a la descendencia, también en especies forestales de coníferas y de frondosas, por tanto, es necesario implementar el estudio del fenómeno de “priming” y de los mecanismos epigenéticos en otras especies forestales de importancia, como en este caso en la encina (*Quercus ilex* L.).

## **II. OBJETIVOS**

---





## II. OBJETIVOS

La mortalidad que viene sufriendo la encina (*Quercus ilex* L.) desde la década de los 80 en la península ibérica se ha incrementado preocupantemente en los últimos años debido a la sequía y las altas temperaturas provocadas por el cambio climático. La enfermedad que afecta a esta especie está causada en gran medida por el oomiceto *Phytophthora* spp., el cual es el responsable del decaimiento de los bosques de quercíneas y áreas de dehesa del sudoeste de la península. La encina y los ecosistemas de los que forma parte tienen una gran importancia a nivel económico, ecológico, paisajístico, social y cultural. En este contexto se hace necesaria la implementación de nuevos métodos de protección de los bosques, aplicando herramientas biotecnológicas que permitan alcanzar con éxito los objetivos de los programas de prevención y restauración, permitiendo la conservación de estos ecosistemas.

El objetivo general de este trabajo es desarrollar herramientas para generar genotipos de encina con mayor tolerancia al patógeno causante de este decaimiento conocido como “la seca”. El trabajo se centra en la propagación de genotipos escape (tolerantes de manera natural al patógeno) y en la búsqueda de metodologías de elicitación de embriones somáticos de encina que permitan, sin afectar la integridad de las líneas embriogénicas, la inducción de memoria epigenética “priming”, esto es, que las plantas imprimadas sean capaces de responder más rápida o contundentemente al estrés biótico producido por la infección de *P. cinnamomi*, esta capacidad de respuesta se transmite a las siguientes generaciones. Además, se pretende identificar marcadores precoces de respuesta a estrés para poder seleccionar, en una fase inicial, la efectividad de los elicitores antes de que los embriones somáticos se desarrollen en plantas que puedan ser testadas en campo.

Los objetivos específicos son los siguientes:

Objetivo 1. Clonación de genotipos escape de encina.

- 1.1. Selección de genotipos escape.
- 1.2. Clonación de genotipos mediante embriogénesis somática.
- 1.3. Aclimatación de plántulas.

Objetivo 2. Inducción de memoria epigenética para tolerancia a estrés biótico.

- 2.1. Optimización de protocolos de elicitación con extractos de oomiceto y elicitores químicos.

## II. Objetivos

---

- 2.2. Determinación de marcadores precoces de tolerancia a estrés en el material elicitado.

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

---



### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### III.1. Material biológico

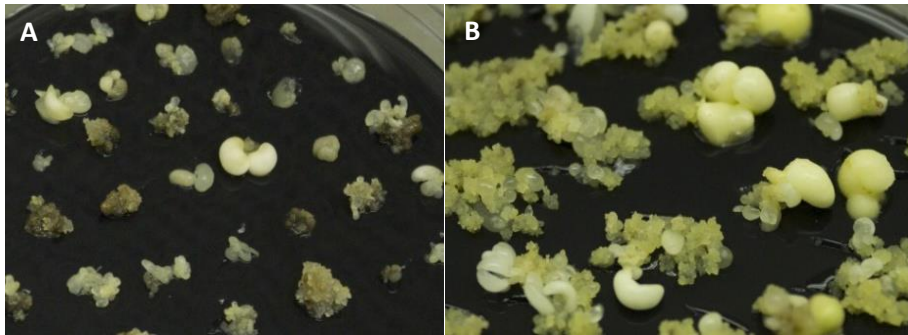
Como material biológico de partida, se utilizaron flores masculinas (amentos) de encina (*Quercus ilex* L.) recogidas de genotipos escape (ver apartado III.2); líneas embriogénicas de esta especie previamente establecidas, y el oomiceto *Phytophthora cinnamomi*.

Los amentos de encina, en diferentes estadios de desarrollo, se colectaron de ejemplares adultos (30-100 años). Concretamente, se recogieron amentos con un pedúnculo corto, al descubierto, con flores distinguibles y longitud no mayor de 1 cm (Fig. III.1A), o bien erectos de más de 1 cm de longitud, con flores cerradas distinguibles y algunos más desarrollados, colgantes y con flores abiertas (Fig. III.1B). Estos amentos se utilizaron para la inducción de líneas embriogénicas.



**Figura III.1.** Grado de desarrollo de los amentos utilizados para la inducción de ES; (A) estadio B y (B) estadio más desarrollado que C según Blasco et al. (2013).

También se utilizaron las líneas embriogénicas Ha13 (Fig. III.2A) y VA5 11f, obtenidas previamente en nuestro laboratorio; y las líneas Q8 y E00 (Fig. III.2B) cedidas por el grupo del Dr. Mariano Toribio (IMIDRA, Madrid). Todas las líneas se mantuvieron in vitro mediante subcultivos mensuales en medio de proliferación según se describe en Martínez et al. (2015), que contenía las sales y vitaminas de MS (Murashige y Skoog, 1962), 20  $\mu$ M de tiosulfato de plata, 4 g/L de carbón activo y 8 g/L de Sigma agar (A-1296, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), (MS+STS+CA).



**Figura III.2.** Líneas embriogénicas Ha13 (A) y E00 (B) utilizadas en diferentes ensayos de elicitación.

En los ensayos para inducir tolerancia a estrés biótico se utilizó la Cepa 1630 de *Phytophthora cinnamomi* cedida por el grupo de la Dra. Paloma Abad (Instituto Agroforestal Mediterráneo, UPV). La cepa se mantuvo en placas (90 x 15mm) con 25 mL de medio PDA (Potato Dextrose Agar, Pronadisa®), pH de  $5.6 \pm 0.2$ , mediante subcultivos de porciones de micelio de  $0.5 \text{ cm}^2$  (Fig. III.3) a medio fresco cada 15 días. Las placas se sellaron con Parafilm® y se conservaron en una cámara de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  en oscuridad.



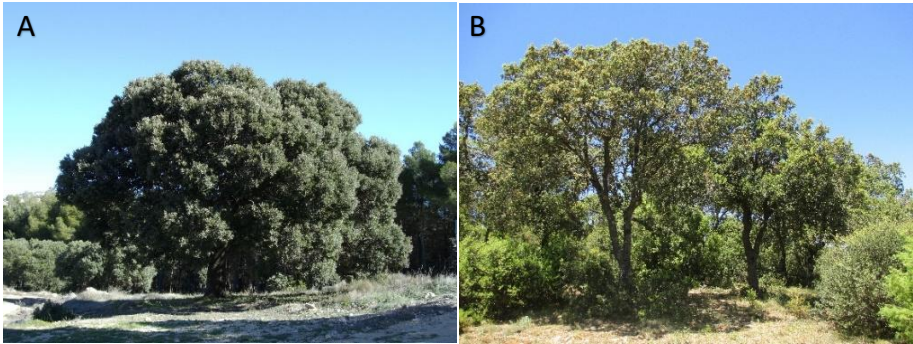
**Figura III.3.** Cepa 1630 de *P. cinnamomi*.

## III.2. Aprovechamiento de la variabilidad natural para la obtención de genotipos tolerantes a *Phytophthora* spp.

### III.2.1. Selección de genotipos escape para su propagación

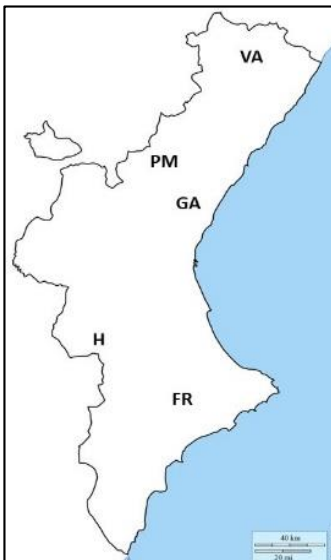
Para seleccionar genotipos escape se eligieron pies, aparentemente sanos, situados en zonas sintomáticamente afectadas por *Phytophthora* spp. La figura III.4A y B muestra los genotipos H1 y VA5 respectivamente,

seleccionados para la inducción de embriogénesis somática. También se seleccionaron pies con síntomas de afección.



**Figura III.4.** Pies de encina seleccionados para la obtención de líneas embriogénicas de los genotipos H1 (A) y VA5 (B).

La toma de muestras de los amentos se llevó a cabo en diferentes puntos de la Comunidad Valenciana (Figura III.5) durante los meses de junio de 2014 y abril - mayo de los años 2016 y 2017. Todas las muestras se colocaron en bolsas cerradas y en oscuridad a 4 °C hasta su utilización. La tabla III.1 detalla los puntos de toma de muestra y las características de los genotipos seleccionados en relación a la presencia (S) o ausencia de síntomas (A).



**Figura III.5.** Localización geográfica de los genotipos seleccionados Valliviana (VA) y Pina de Montalgrao (PM) en Castellón; Garbí (GA) y Hunde (H) en Valencia y Font Roja (FR) en Alicante.

### III. Material y Métodos

**Tabla III.1.** Detalle de los puntos de toma de muestra y presencia (S) o ausencia (A) de sintomatología propia de la afección por *P. cinnamomi* en los pies seleccionados.

Provincia	Localidad	Lugar de recogida	Nº genotipos (S)	Nº genotipos (A)	Denominación genotipo
Alicante	Alcoi	Parque Natural de la Font Roja	3	5	FR
Castellón	Pina de Montalgrao	Monte de Santa Bárbara	1	4	PM
Castellón	Morella	Monte de la Vallivana	7	3	VA
Valencia	Segart	Pic del Garbí	2	2	GA
Valencia	Ayora	Monte de la Hunde	2	4	H

#### III.2.1.1. Detección de *Phytophthora* spp. en las raíces de los genotipos seleccionados

La presencia del oomiceto *P. cinnamomi* en las muestras de suelo y raicillas de genotipos seleccionados se determinó mediante el protocolo de aislamiento descrito por Jung et al. (1996), que emplea la técnica de “baiting” con manzana.

Para la toma de muestras de suelo, se realizaron cuatro hoyos alrededor del pie seleccionado; se retiró el mantillo superficial y se cavó a 20 cm de profundidad seleccionándose el material situado en esa franja que comprende las 4 submuestras recogidas en los 4 puntos alrededor del mismo. El material se almacenó a 4 °C en bolsas cerradas de plástico y se trasladó al laboratorio.

En el laboratorio se aislaron las raicillas presentes en las muestras de suelo (Fig.III.6A) y se esterilizaron con una dilución al 10 % de lejía comercial (3.5 % de cloro activo). Por otro lado, se esterilizaron manzanas de la variedad Golden sumergiéndolas en etanol al 96 %. De cada manzana ya esterilizada se extrajeron 4 porciones en forma de cuadrado de 1 cm<sup>2</sup> y las cavidades formadas se rellenaron con las raicillas aisladas cortadas en segmentos de 1 cm y se taparon con las porciones de manzana anteriormente extraídas. Las manzanas rellenas se conservaron en la cámara de 20 °C bajo condiciones oscuridad hasta la detección de un halo de infección alrededor de cada una de las cavidades tapadas (Fig III.6C). Una vez aparecido el halo, se realizó una sección de 0.5 cm<sup>2</sup> en el mismo y se cultivó en medio de aislamiento específico de *P. cinnamomi*, PARPNH (Jung et al., 1996) que contenía 100 mL/L de zumo multivitamínico y 3 g/L de CaCO<sub>3</sub> y estaba suplementado con 20 mg/L de ampicilina, 10 mg/L de rifampicina, 50



mg/L de nistatina, 50 mg/L himexazol, 10 mg/L de pimaricina y 25 mg/L de pentacloronitrobenzenu (PCNB), se añadieron 20 g/L de agar Pronadisa® como agente solidificante.



**Figura III.6.** Etapas del proceso de detección del oomiceto *P. cinnamomi* mediante la técnica de “baiting” con manzana. A) recogida de muestras de tierra y raicillas en las inmediaciones del árbol del genotipo H. B) selección de raicillas de las muestras recogidas. C) manzanas con las cavidades rellenas con las raicillas en la cámara a 20 °C.

El cultivo permaneció 5 días en la cámara de 20 °C y en oscuridad, hasta que el oomiceto creció lo suficiente como para poder ser identificado morfológicamente. La determinación de la presencia o ausencia de *Phytophthora* spp. se realizó posteriormente con métodos moleculares en el laboratorio de la Dra. Paloma Abad, del grupo Hongos Fitopatógenos, Instituto Agroforestal Mediterráneo (UPV).

### III.2.2. Clonación de genotipos mediante ES

La clonación de los genotipos seleccionados se abordó mediante la técnica de embriogénesis somática descrita en Blasco et al. (2013). La tabla III.2 muestra los amentos sembrados de cada genotipo.

#### III.2.2.1. Medios y condiciones de cultivo

Los medios de cultivo utilizados para la clonación de los genotipos seleccionados mediante ES se exponen en la tabla III.3. Los medios utilizados contenían una de las combinaciones de macronutrientes que se citan, MS (Murashige y Skoog, 1962), SH (Schenk y Hildebrandt, 1972), B5 (Gamborg, 1968), GD (Gresshoff y Doy, 1972) o WPM (Woody Plant Medium, Lloyd y McCown, 1980); los micronutrientes MS, GD o WPM, según se especifica en cada fase de la ES y las vitaminas de MS, GD o WPM según se indica en cada medio de cultivo empleado. Todos los medios contenían 30 g/L de sacarosa si no se especifica lo contrario.

Los reguladores de crecimiento benciladenina (BA), ácido naftalén-acético (ANA) y ácido indolbutírico (IBA) se adicionaron a los medios de

### III. Material y Métodos

cultivo antes de proceder a su esterilización, mientras que el regulador de crecimiento zeatina y el suplemento tiosulfato de plata se esterilizaron por filtración y se adicionaron al medio de cultivo una vez esterilizado y atemperado a 60 °C. Las concentraciones de cada regulador y/o suplemento se detallan en cada apartado. Los medios se solidificaron con 6 g/L de Plantagar S1000 (B&V, Italia), 6 o 6.5 g/L de agar para propagación de plantas (PPA, Conda-Pronadisa) u 8 g/L de Sigma agar según se especifica en cada apartado. El pH de los medios se ajustó a 5.8 con HCl y KOH, antes de proceder a su esterilización en autoclave (105 Pa a 120 °C, 20 min).

**Tabla III.2.** Establecimiento in vitro de amentos procedentes de genotipos seleccionados en la Comunidad Valenciana. Número de amentos cultivados en placa con 10 amentos/placa.

Año	Punto de recogida	Genotipo	Total amentos establecidos
Año 2014	Vallivana	VA5	100
Año 2016	Font Roja	FR3	1300
	Font Roja	FR5	1450
	Font Roja	FR6	1000
	Vallivana	VA1	1010
	Vallivana	VA5	320
	Vallivana	VA8	900
	Vallivana	VA9	1000
	Vallivana	VA10	640
	Hunde	H1	2010
	Hunde	H2	1460
	Hunde	H3	1640
	Hunde	H5	1680
	Garbí	GA1	520
	Garbí	GA2	790
	Garbí	GA3	1140
	Garbí	GA4	460
Año 2017	Hunde	H1	230
	Hunde	H5	260
	Hunde	H6	300
	Font Roja	FR7	300
	Font Roja	FR8	300

**Tabla III.3.** Composición de los medios utilizados en los ensayos de clonación de genotipos mediante embriogénesis somática en encina (mg/L).

	MS	SH*	B5*	GD	WPM
<b>Macroelementos</b>					
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170				170
KNO <sub>3</sub>	1900	2500	500	1000	
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>					990
KCl			150	300	
MgSO <sub>4</sub>	370	400	125	122	180.54
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	330	165	75	150	
CaCl <sub>2</sub>					72.50
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O					471.26
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	300			400
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·SO <sub>4</sub>			100	200	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O			37.81	75.70	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O			50.87	90	
<b>Microelementos</b>					
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025			0.25	
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025			0.25	0.25
FeNaEDTA	36.70			36.70	36.70
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20			3	6.20
KI	0.83			0.75	
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	22.30			10	22.30
MoO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25			0.25	0.25
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.60			3	8.60
<b>Vitaminas</b>					
Mioinositol	100			10	100
Ácido nicotínico	0.50			0.10	0.50
Piridoxina HCl	0.50			0.10	0.50
Tiamina HCl	0.10			1	1
Glicina	2			0.40	2
<b>Suplementos (g/L)</b>					
Sacarosa	30	30	20	30	30

\* Los medios SH y B5 contenían los micronutrientes MS.

Los recipientes de cultivo utilizados fueron placas Petri de plástico de 60 x 15 mm (sólo para el medio de preacondicionamiento) y 90 x 15 mm, con 15 y 25 mL de volumen, respectivamente. Las placas se sellaron con Parafilm®. Los cultivos se mantuvieron en cámara de crecimiento a  $25 \pm 2$  °C en oscuridad o fotoperiodo de 16 h (tubos fluorescentes SYLVANIA GRO-LUX® y Philips cool-white, 120-180 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

#### **III.2.2.2. Esterilización y establecimiento de los cultivos**

Los amentos se distribuyeron en pequeños sacos de muselina bien atados y se esterilizaron sumergiéndolos en etanol (70 %) durante 2 minutos con agitación fuerte y a continuación en lejía comercial diluida al 10 % (3.5 % de cloro activo) con dos gotas de Tween 20, durante 15 minutos. Después se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril.

Tras ser esterilizados, los amentos enteros o sus flores aisladas se sembraron en medio de preacondicionamiento que contenía los macronutrientes B5 diluidos a la mitad de su concentración original (B5/2), los micronutrientes y vitaminas de MS, 20 g/L de sacarosa y 6 g/L de Plantagar. Los cultivos se mantuvieron en cámara de cultivo a  $25 \pm 2$  °C y en oscuridad. Transcurridos 10 días, los explantos contaminados se eliminaron y el resto se transfirió a medio primario de inducción.

#### **III.2.2.3. Inducción de embriogénesis somática**

En esta etapa de la ES se utilizaron medios nutritivos que incluían los macronutrientes de MS completos o a la mitad de su concentración original (MS/2) y SH según se especifica a continuación.

Durante los años 2014 y 2016 se utilizó medio primario de inducción que contenía los macronutrientes MS/2 con sus micronutrientes y vitaminas, 30 g/L de sacarosa y 6 g/L de Plantagar suplementado con 10 µM de BA y 50 µM de ANA. Los cultivos se mantuvieron en cámara de cultivo a  $25 \pm 2$  °C y en oscuridad. Tras 30 días en estas condiciones, los cultivos se transfirieron a medio secundario de inducción con los macronutrientes SH, los micronutrientes y vitaminas MS, 30 g/L de sacarosa, 6 g/L de Plantagar, suplementado con 0.5 µM de BA y 0.5 µM de ANA. Los cultivos se mantuvieron en cámara de cultivo a  $25 \pm 2$  °C con fotoperiodo de 16 h durante 30 días y a continuación se pasaron a medio de manifestación que contenía los macronutrientes MS con el NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> a la mitad de su concentración original, micronutrientes y vitaminas MS, 30 g/L de sacarosa, 6 g/L de Plantagar, 0.5 µM de BA y 0.5 µM de ANA; los cultivos se mantuvieron en

cámara de cultivo a  $25 \pm 2$  °C con fotoperiodo de 16 h durante 30 días y los callos embriogénicos formados se transfirieron a medio MS de proliferación de embriones (Martínez et al., 2015) o SH, estos medios se describen detalladamente en el siguiente apartado.

En el año 2017 la mitad de los amentos se sembró en el medio primario de inducción MS/2 suplementado con 10  $\mu$ M de BA y 50  $\mu$ M de ANA y el resto se cultivó en el medio secundario de inducción SH sin reguladores de crecimiento, continuando con este medio en la fase de manifestación. Los explantos se mantuvieron en el medio de manifestación hasta la aparición de estructuras proembriogénicas (PEMs). En las tablas III.4 y III.5 se resumen las composiciones de los medios nutritivos utilizados en los diferentes ensayos de inducción de líneas embriogénicas a partir de amentos de encina.

**Tabla III.4.** Resumen de los medios de cultivo utilizados para la inducción de embriogénesis somática a partir de amentos de encina durante los dos primeros años de estudio.

	Preacondi- cionamiento	Primario de Inducción	Secundario de inducción	Manifestación
Macronutrientes	B5	MS/2	SH	MS (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1/2)
Micronutrientes	MS	MS	MS	MS
Vitaminas	MS	MS	MS	MS
Sacarosa (g/L)	20	30	30	30
Reguladores ( $\mu$ M)		BA/ANA (10/50)	BA/ANA (0.5/0.5)	BA/BA (0.5/0.5)
Plantagar (g/L)	6	6	6	6
Condiciones de cultivo	Oscuridad	Oscuridad	Fotoperiodo 16 h	Fotoperiodo 16 h

**Tabla III.5.** Medios de cultivo utilizados para la inducción de embriogénesis somática a partir de amentos de encina durante el último año de estudio.

	Preacondicionamiento	Primario de Inducción/Manifestación*
Macronutrientes	B5	SH
Micronutrientes	MS	MS
Vitaminas	MS	MS
Sacarosa (g/L)	20	30
Plantagar (g/L)	6	6
Condiciones de cultivo	Oscuridad	Oscuridad/Fotoperiodo 16 h

\* El medio primario de inducción y de manifestación tenían la misma composición; estas fases únicamente se diferenciaban en las condiciones del cultivo (oscuridad y fotoperiodo de 16 h respectivamente).

#### III.2.2.4. Proliferación de líneas embriogénicas

Para la proliferación y diferenciación de las líneas embriogénicas establecidas, las estructuras proembriogénicas (PEMs) se transfirieron a placas Petri con medio de MS+STS+CA (Martínez et al., 2015). Este medio de cultivo contenía los macronutrientes, micronutrientes y vitaminas MS, 30 g/L de sacarosa, 0.5 g/L de hidrolizado de caseína, 20  $\mu$ M de STS, 4 g/L de carbón activo y 8 g/L de Sigma agar. Los cultivos se mantuvieron en cámara de crecimiento a  $25 \pm 2$  °C con fotoperiodo de 16 horas, tapándose las placas con papel de filtro para crear condiciones de luz difusa y se subcultivaron cada 30 días hasta que los embriones somáticos evolucionaron a un estadio de corazón-torpedo.

#### III.2.2.5. Maduración de embriones somáticos

Los embriones en estado corazón-torpedo se transfirieron a medio SH sin reguladores de crecimiento con 30 g/L de sacarosa y 6 g/L de Plantagar donde permanecieron 6 -8 semanas hasta que comenzaron a diferenciar los cotiledones.

Para finalizar la maduración y favorecer la posterior germinación, los embriones en estado cotiledonar, bien formados y mayores de 6 mm, se transfirieron durante el primer año de estudio a medio SH fresco sin reguladores de crecimiento y se mantuvieron en cámara a 4 °C y en oscuridad durante 8 semanas. En el segundo y tercer año de estudio, para favorecer la desecación, se pasó a utilizar placas Petri vacías de vidrio estériles para mantener los embriones en frío durante las 8 semanas (Martínez et al., 2017b).

#### III.2.2.6. Germinación/ conversión

Después de las 8 semanas en frío, los embriones somáticos se transfirieron a botes de vidrio con 70 mL de medio SH que contenía los micronutrientes y vitaminas de MS, 30 g/L de sacarosa, 6 g/L de Plantagar y estaba suplementado con 0.25  $\mu$ M de IBA y 0.11  $\mu$ M de BA. Se colocaron 6 embriones por bote y se mantuvieron una semana en oscuridad a  $25 \pm 2$  °C y a continuación se transfirieron a condiciones de fotoperiodo de 16 horas.

A partir del año 2016 se sustituyó este medio SH para la germinación por el medio GD (parcialmente modificado, tabla III.3) que contenía los macronutrientes GD, micronutrientes GD parcialmente modificados (3 mg/L  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0.25 mg/L  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ; 0.25 mg/L  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ), vitaminas GD, 20  $\mu$ M de STS, 0.44  $\mu$ M de BA y 30 g/L de sacarosa, solidificado con 6 g/L de PPA

(Martínez et al., 2017b). Los cultivos se mantuvieron a  $25\pm 2$  °C con fotoperiodo de 16 horas. Los embriones se subcultivaron cada 8 semanas.

Una vez germinados, los embriones con la radícula poco desarrollada se transfirieron a medio de enraizamiento o a la fase de aclimatación si las plántulas tenían  $2\pm 0.5$  cm de longitud de tallo. En la tabla III.6 se muestran los medios empleados en la fase de germinación de embriones somáticos.

**Tabla III.6.** Medios de cultivo utilizados para la germinación de los embriones somáticos.

	SH	GD
Macronutrientes	SH	GD
Micronutrientes	MS	GD
Vitaminas	MS	GD
Sacarosa (g/L)	30	30
STS ( $\mu$ M)		20
Reguladores ( $\mu$ M)	IBA/BA 0.25/0.11	BA 0.44
PPA (g/L)		6
Plantagar (g/L)	6	
Condiciones de cultivo	Fotoperiodo 16 h	Fotoperiodo 16 h

### III.2.2.7. Clonación de brotes

Con la finalidad de incrementar el material clonado, se aislaron brotes de los embriones germinados y se transfirieron a medio de proliferación de brotes.

La clonación de las líneas embriogénicas a partir de los brotes se inició a partir de un tallo aislado de un embrión somático de encina germinado en el medio de cultivo GD descrito en el apartado anterior, cuando el tamaño de las primeras hojitas era de 0.5 cm aproximadamente. Se utilizó el protocolo descrito por Martínez et al., (2017a) que consiste en un ciclo de tres subcultivos quincenales de los brotes en medios con concentraciones decrecientes de BA. Los medios contenían los macronutrientes WPM (Tabla III.3) y estaban suplementados con las concentraciones decrecientes de BA, 20  $\mu$ M STS, 30 g/L de sacarosa y se solidificaron con 8 g/ L de Sigma agar. Los cultivos se mantuvieron a  $25\pm 2$  °C con fotoperiodo de 16 horas. Cada ciclo de multiplicación duró 6 semanas en total.

En primer lugar y antes de empezar el ciclo, se aislaron los brotes de los embriones germinados y se transfirieron a botes de vidrio que contenían

### III. Material y Métodos

70 mL de medio WPM descrito anteriormente suplementado con 0.88  $\mu\text{M}$  de BA (W0) para vigorizar el brote. En este medio permanecieron durante 21 días.

El ciclo de subcultivos comenzó transfiriendo los brotes del medio W0 a medio WPM suplementado con 0.44  $\mu\text{M}$  de BA (W1) donde permanecieron 15 días, posteriormente, los brotes se pasaron a medio WPM con la misma composición que el medio anterior, pero suplementado con 0.22  $\mu\text{M}$  de BA (W2) donde permanecieron otros 15 días. Finalmente, los brotes se transfirieron a medio WPM con la misma composición que los anteriores, pero suplementado con 0.044  $\mu\text{M}$  de BA y 0.46  $\mu\text{M}$  de Zeatina (W3). En este medio permanecieron otros 15 días para completar su crecimiento y para que se produjera su elongación. En la tabla III.7 se muestra el protocolo seguido para la multiplicación de los brotes. Después de 6 semanas, cuando los brotes ya habían proliferado y crecido, se inició un nuevo ciclo de multiplicación aislando aquellos brotes con mejor aspecto y una longitud de 1-1.5 cm para cultivarlos de nuevo en el medio W1 durante 15 días, comenzando de nuevo la secuencia descrita.

**Tabla III.7.** Medios de cultivo utilizados y condiciones de los cultivos durante la fase de propagación de brotes.

	<b>W0 *</b>	<b>W1</b>	<b>W2</b>	<b>W3</b>
Macronutrientes	WPM	WPM	WPM	WPM
Micronutrientes	WPM	WPM	WPM	WPM
Vitaminas	WPM	WPM	WPM	WPM
Sacarosa (g/L)	30	30	30	30
STS ( $\mu\text{M}$ )	20	20	20	20
Reguladores ( $\mu\text{M}$ )	BA 0.88	BA 0.44	BA 0.22	BA/Z 0.044/0.46
Agar Sigma 1296	8	8	8	8
Condiciones de cultivo	Fotoperiodo 16 h 3 semanas	Fotoperiodo 16 h 2 semanas	Fotoperiodo 16 h 2 semanas	Fotoperiodo 16 h 2 semanas

\* El medio W0 únicamente se utilizó al comienzo del primer ciclo de 6 semanas, para brotes que se acababan de transferir del medio GD de germinación.

#### III.2.2.8. Enraizamiento de brotes

Se seleccionaron brotes que tenían buen aspecto y una longitud de 1 cm y se transfirieron a botes de vidrio que contenían 70 mL de medio de enraizamiento con los macronutrientes MS/2, los micronutrientes y vitaminas de MS, 19.7  $\mu\text{M}$  de IBA, 0.54  $\mu\text{M}$  de ANA, 20 g/L de sacarosa y



estaba solidificado con 6.5 g/L de PPA (modificado de Martínez et al. (2017a). Se mantuvieron en oscuridad y a  $25\pm 2$  °C durante 7 días, tras los cuales se destaparon y se mantuvieron en cámara de cultivo a  $25\pm 2$  °C con fotoperiodo de 16 h otros 7 días, posteriormente se transfirieron a medio sin reguladores de crecimiento.

### III.2.2.9. Aclimatación de las plántulas obtenidas

Para determinar las condiciones de aclimatación más favorables se hizo un ensayo preliminar de aclimatación testando 4 tipos de sustrato (Tablas III.8 y III.9), utilizando plántulas de encina de otros genotipos obtenidas por embriogénesis somática anteriormente en el laboratorio, y otras cedidas por el grupo de la Dra. Elena Corredoira (IIAG-CSIC). Después de este ensayo se seleccionaron los dos sustratos que menos marras habían producido para emplearlos en la aclimatación de todas las plántulas obtenidas tras 8 semanas de cultivo en medio de germinación, o 2 semanas en medio de enraizamiento. Las plántulas bien desarrolladas, con buen aspecto y con una longitud de  $2\pm 0.5$  cm se transfirieron a bandejas de alveolos forestales (QUICK-POT, modelo QP 35 T, Projar) con una medida de bandeja de 280 x 360 mm y alveolo de 5 x 50 x 115 mm con 35 alveolos por bandeja, que contenían los sustratos descritos en la tabla III.8

**Tabla III.8.** Composición de cada uno de los sustratos ensayados.

<b>Sustrato 1</b>	70 % SeedPro 50 50 + 30 % perlita
<b>Sustrato 2</b>	Turbatruf
<b>Sustrato 3</b>	33 % DSM 1W + 33 % perlita+ 33 % Lana de roca
<b>Sustrato 4</b>	70 % (70 % DSM 1W + 30 % perlita) + 30 % arena+ 3g/L dolomita cálcica

Las bandejas se introdujeron en cajones de plástico Congost de 40 litros y se cubrieron con plástico transparente para mantener inicialmente una humedad relativa alta y se colocaron en cámara de crecimiento a 25 °C, 70-80 % de humedad relativa y fotoperiodo de 16 horas (SYLVANIA GRO-LUX® y Philips cool-white 95–100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). La cubierta de plástico se fue agujereando y abriendo progresivamente para acostumar a las plántulas a una humedad relativa menor y prepararlas para el paso a invernadero, finalmente, transcurridas 6 semanas, se retiró. Tras dos semanas más en cámara de crecimiento, las bandejas se trasladaron a invernadero bajo condiciones de luz natural. Se observaron las plántulas durante 2 meses, y tras este periodo, se tomaron los datos de supervivencia y crecimiento.

### III. Material y Métodos

**Tabla III.9.** Composición de los sustratos comerciales utilizados en la preparación de los sustratos ensayados.

	<b>Seed Pro 50 50 Projar</b>	<b>Turbatruf Projar</b>	<b>DSM 1W KEKKILÄ</b>
Materia prima	50 % Turba rubia fina	25 % Turba rubia	70 % Turba rubia
	50 % Turba negra:	55 % Turba negra 17% Fibra de coco 3 % Perlita	30 % Turba parda
Aditivos	Dolomita cálcica: 3 kg/m <sup>3</sup> Fertilizado base: 0,8 kg/m <sup>3</sup> (Multi-mix: N-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> -K <sub>2</sub> O 14-16-18)	Dolomita cálcica: 6 kg/m <sup>3</sup>	Dolomita cálcica: 4-6 kg/m <sup>3</sup> Fertilizado base: 0.8 kg/m <sup>3</sup> (Multi-mix: N-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> -K <sub>2</sub> O 14-16-18) (NO <sub>3</sub> -N 5.4 %, NH <sub>4</sub> -N 8.6 %)
	Microelementos		Microelementos
pH método EN 1+5	6-6.5	7.5-8	5.8-6
pH método pasta saturada	5.5-6	7-7.5	5.5-6

### III.3. Inducción de memoria epigenética para la tolerancia a estrés biótico

Los ensayos para la inducción de memoria epigenética se realizaron con las líneas embriogénicas Ha13, VA5 11f, Q8 y E00.

Estos ensayos se llevaron a cabo con dos tipos de elicitores de manera simultánea; extractos filtrados (OCF) de la cepa 1630 de *Phytophthora cinnamomi* (a 0, 10, 30 o 50 % v/v de concentración) y los elicitores químicos metil jasmonato (MeJA), benzotriazol (BTH), ácido para-aminobenzoico (PABA), ácido beta-amino butírico (BABA) y ácido salicílico (AS) a las concentraciones 0, 5, 10, 25 y 50  $\mu$ M. En estos ensayos se determinó la influencia del tipo y concentración del elicitador, la duración de la elicitación y la consistencia del medio de cultivo que contenía los diferentes elicitores.

#### III.3.1. Elicitación de líneas embriogénicas con extractos estériles de *Phytophthora cinnamomi* y elicitores químicos

##### III.3.1.1. Preparación de los extractos del oomiceto y elicitores químicos

Para la preparación del extracto estéril de la cepa 1630 de *P. cinnamomi* (OCF) se utilizaron 3 matraces estériles de 250 mL. En cada matraz, que contenía 40 mL del medio ESM (Elicitin Secretion Medium,

(Horta et al., 2008)) (500 mg/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 250 mg/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1000 mg/L de asparagina, 1 mg/L de tiamina, 20 g/L de glucosa y 500 mg/L de extracto de levadura) se colocaron 8 recortes de  $0.5 \text{ cm}^2$  provenientes de la parte externa del micelio de *P. cinnamomi*, que había estado creciendo en medio PDA a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  y oscuridad durante 10 días. Seguidamente, los matraces se pusieron en agitación (50 rpm) y oscuridad, en una cámara de  $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 5 días. Transcurrido este periodo se recolectó el extracto haciendo pasar los cultivos a través de discos de papel de filtro Whatman® No. 2 (90 mm de diámetro), utilizando embudos y matraces kitasatos Büchner. A continuación, el extracto se esterilizó utilizando filtros Whatman® de  $22 \text{ }\mu\text{m}$ ; finalmente, el extracto estéril se diluyó a diferentes concentraciones según el experimento, con medio ESM.

Se prepararon disoluciones stock de cada uno de los elicitores químicos a 5, 10, 25 y  $50 \text{ }\mu\text{M}$ . Se añadió el volumen correspondiente de cada una de estas disoluciones stock a cada tratamiento en matraces que contenían el medio ESM.

### III.3.1.2. Proceso de elicitación

La elicitación de las líneas embriogénicas se realizó en matraces estériles de 250 mL. En cada matraz se introdujeron 40 mL de una disolución compuesta por medio ESM y el elicitador correspondiente; en el caso del extracto estéril del oomiceto la disolución se preparó a las concentraciones 0 (control), 10, 30 y/o 50 % (v/v), que constituyen los tratamientos control, OCF10, OCF30 y OCF50 respectivamente. En el caso de los elicitores químicos, la disolución se preparó a las concentraciones 0 (control), 5, 10, 25 y  $50 \text{ }\mu\text{M}$  de cada elicitador, constituyendo los tratamientos control, y como ejemplo, para el MeJA, MeJA5, MeJA10, MeJA25 y MeJA50, siguiendo la misma nomenclatura para cada elicitador, utilizando su abreviatura correspondiente.

A continuación, se pesó  $1 \pm 0.1 \text{ g}$  de material embriogénico en fase globular y se introdujo en cada uno de los matraces que contenían las disoluciones anteriores. Los matraces con las líneas embriogénicas en suspensión se mantuvieron en agitación (100 rpm) y oscuridad ( $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) durante 3 días. Se realizaron 3 repeticiones de cada tratamiento. Después de 3 días de agitación se recogió el material elicitado con ayuda de embudos y matraces kitasatos Büchner y papel Whatman No. 2, de 90 mm de diámetro. El material recogido se cultivó en placas Petri (90 x 15 mm) con medio MS+STS+CA (Martínez et al., 2015) para su mantenimiento.

Para la elicitación en medio sólido se preparó medio SH sin reguladores de crecimiento que contenía 50  $\mu\text{M}$  de los elicitores MeJA, BTH y PABA y se sembró  $1\pm 0.1$  g de material embriogénico en fase globular de la línea Ha13. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento. Se mantuvieron los cultivos en este medio con elicitores durante 60 días.

#### **III.3.1.3. Efecto de la aplicación de elicitores sobre las líneas embriogénicas**

Durante los primeros ensayos de elicitación se determinaron las condiciones del cocultivo entre las líneas embriogénicas y los elicitores (concentración, tiempo y medio de cultivo utilizado para la aplicación) que no afectaran al crecimiento de las primeras, ni produjeran daños como consecuencia del estrés oxidativo, para ello se midió el crecimiento de las líneas y se determinó la concentración de MDA y  $\text{H}_2\text{O}_2$  liberados en las mismas transcurridos diferentes periodos tras la elicitación.

##### **III.3.1.3.1. Medida del crecimiento**

Transcurridos 30 o 60 días tras la elicitación se pesó el total de material embriogénico en cada tratamiento y se calculó el incremento relativo de peso fresco que habían experimentado las líneas en cada uno de ellos. Posteriormente se determinó el porcentaje de material embriogénico que no había revertido a callo embriogénico y no se había necrosado para establecer el porcentaje de material que se había desarrollado en buenas condiciones.

##### **III.3.1.3.2. Influencia en la integridad de la membrana celular**

La cuantificación del daño oxidativo causado como consecuencia del proceso de elicitación se realizó mediante el análisis de la concentración de MDA. Se siguió el protocolo descrito por Cervilla et al. (2007), para ello se homogeneizaron 0.1, 0.3 o 1 g de material embriogénico recogido 7, 15, 30 o 60 días tras la elicitación, con 1 mL de tampón fosfato 0.05 M (0.07 %  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1.6 %  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ). Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 25 minutos a 4 °C. Se pipetearon 200  $\mu\text{L}$  de sobrenadante y se añadieron a 800  $\mu\text{L}$  del tampón TBA-TCA, el cual contenía un 0.5 % (p/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) (Sigma-Aldrich, USA) y un 20 % (p/v) de ácido tricloroacético (TCA) (Sigma-Aldrich, USA). Las muestras se incubaron a 95 °C durante 30 minutos y a continuación se enfriaron rápidamente en un baño de hielo, después se centrifugaron nuevamente a 13000 rpm durante 10 minutos.

La absorbancia del sobrenadante se midió a 532 nm, mientras que el valor de la turbidez no específica se midió a 600 nm en un espectrofotómetro

Eppendorf BioSpectrometer®. La concentración de MDA presente en la muestra se determinó empleando el coeficiente de extinción del MDA, el cual es de  $155\text{ nM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  (Cervilla et al., 2007).

El total de MDA se calculó de acuerdo a la fórmula expresada por Heath y Packer (1968):

$$\text{Total MDA (nmol gPF}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Tampón de extracción (mL)} \times \text{Sobrenadante (mL)} \times \left[ \frac{\text{Abs } 532 - \text{Abs } 600}{155} \right] \times 10^3}{\text{Cantidad de material (g)}}$$

### **III.3.1.3.3. Determinación del daño oxidativo**

En los primeros ensayos de elicitación se determinó también la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  liberado después de poner en contacto el material embriogénico con los elicitores, como medida del posible estrés oxidativo generado por la elicitación y con el objetivo de seleccionar el tratamiento menos lesivo para las líneas embriogénicas.

Para esta determinación se empleó el protocolo descrito por Chong et al. (2005). Se homogeneizaron 0.1, 0.3 o 1 g de las muestras con 1 mL de TCA al 0.1 % y se centrifugaron a 13000 rpm a 4 °C durante 15 minutos; se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de sobrenadante a 250  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato de potasio 10 mM (pH = 7.0) y 500  $\mu\text{L}$  de yoduro de potasio 1 M. La absorbancia se midió a 390 nm en espectrofotómetro Eppendorf BioSpectrometer®. El contenido en  $\text{H}_2\text{O}_2$  se expresó en  $\mu\text{g/mL}$ . Se llevaron a cabo 3 repeticiones de cada tratamiento.

### **III.3.1.4. Ensayo de elicitación en medio sólido y durante periodos largos de tiempo**

En el primer ensayo se utilizó la línea Ha13 y los elicitores MeJA, BTH y PABA a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  en medio sólido que contenía los macronutrientes SH, micronutrientes y vitaminas MS y estaba suplementado con 30 g/L de sacarosa. El medio se solidificó mediante la adición de 6 g/L de Plantagar y no contenía reguladores de crecimiento. Los elicitores se añadieron al medio después de autoclavarlo y atemperarlo a 60 °C. La línea embriogénica se cultivó en este medio durante 60 días. Tras este periodo se determinó su crecimiento (incremento relativo de peso fresco), para averiguar qué tratamientos mermaban este crecimiento. También se determinaron las concentraciones de MDA y  $\text{H}_2\text{O}_2$  como medida de la peroxidación de las membranas y del estrés oxidativo causados en la línea embriogénica, de esta manera se descartaron tratamientos que resultaran lesivos para la línea embriogénica.

#### **III.3.1.5. Ensayos de elicitación en medio líquido y durante periodos cortos de tiempo**

Para determinar el elicitor más adecuado para favorecer una respuesta ante el ataque del patógeno sin alterar el crecimiento de la línea embriogénica se realizaron cuatro experimentos.

El primer ensayo se realizó con la línea Ha13 y los elicitores OCF y MeJA, BTH y PABA a las concentraciones (0, 10 y 30 % v/v) y 50  $\mu\text{M}$  respectivamente, aplicados utilizando medio líquido ESM. La línea se cultivó en contacto con los elicitores durante 3 y 5 días en este medio líquido y posteriormente se transfirió a medio sólido SH sin reguladores de crecimiento donde permaneció 30 días. Tras este periodo se determinó el crecimiento de la línea y se midió el contenido de MDA y  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

En un segundo ensayo se elicitaron las líneas embriogénicas Ha13, Q8 y VA5 11f con MeJA en medio líquido ESM a las concentraciones (0, 5, 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ ) durante 6 y 24 horas. Transcurrido este periodo las líneas embriogénicas se transfirieron a medio sólido SH sin reguladores de crecimiento y tras 30 días se determinó el contenido en MDA y  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

En el tercer ensayo se testó la línea Ha13 y los elicitores OCF, MeJA, BTH y PABA a las concentraciones (0, 30 y 50 % v/v) para OCF y (0, 5, 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ ) para los elicitores químicos. Todos los elicitores se aplicaron en medio líquido a la línea embriogénica durante tres días. Transcurrido este periodo la línea embriogénica se transfirió a medio sólido MS+STS+CA y tras 60 días se determinó el crecimiento (incremento relativo de peso fresco) y desarrollo de la línea (porcentaje de embriones bien formados), y el contenido en MDA.

En un último ensayo se elicitoró la línea E00 con OCF (0, 30 y 50 % v/v), MeJA, BABA y AS (0, 5, 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ ). Todos los elicitores se aplicaron en medio líquido a la línea embriogénica durante tres días. Transcurrido este periodo la línea embriogénica se transfirió a medio sólido MS+STS+CA y tras 60 días se determinó el crecimiento (incremento relativo de peso fresco) y desarrollo de la línea (porcentaje de embriones bien formados), y el contenido en MDA.

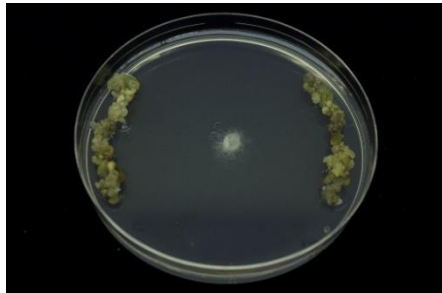
#### **III.3.1.6. Evaluación de la efectividad de la elicitación induciendo tolerancia a *P. cinnamomi***

Para evaluar la eficacia de los tratamientos de elicitación a la hora de activar la respuesta a estrés biótico en las líneas elicidadas se realizaron una

serie de ensayos preliminares poniendo en contacto las líneas embriogénicas elicidadas con el patógeno y estudiando, por un lado, el desarrollo de este patógeno y la respuesta del material embriogénico (en los cultivos duales) y, por otro lado, la producción de ROS y, en los ensayos de infección en medio líquido con extractos activos de *P. cinnamomi*, la actividad de algunas enzimas relacionadas con la detoxificación de ROS en las líneas embriogénicas.

#### **III.3.1.6.1. Cultivos duales**

Se establecieron cultivos duales enfrentando embriones somáticos y porciones de micelio de *P. cinnamomi* (cepa 1630), para ello, se colocaron 0.3 g de material embriogénico de la línea Ha13 sin elicitar (control) a 0.5 cm del extremo de una placa Petri (90 x 15 mm) con 25 mL de medio SH sin reguladores de crecimiento y en el medio de la placa se añadió un recorte de 0.5 cm<sup>2</sup> de medio PDA que contenía micelio del oomiceto. En el lado opuesto de la placa se dispuso la misma cantidad de material embriogénico elicitado (Fig. III.7). El material elicitado se había tratado previamente con OCF (30 y 50 % v/v), MeJA, BTH y PABA (5, 10, 25 y 50  $\mu$ M). Se prepararon 3 repeticiones por tratamiento y los cultivos se mantuvieron a 25 $\pm$ 2 °C con fotoperiodo de 16 h de luz difusa.



**Figura III.7.** Ejemplo de placa de cultivo dual en medio SH a tiempo 1 con material embriogénico control (izda.) y material elicitado con OCF30 (dcha.).

Se midió diariamente el crecimiento del radio del micelio hacia el material embriogénico control y hacia los embriones elicitados hasta que el micelio del oomiceto alcanzó el material embriogénico, el 3<sup>er</sup> día del ensayo.

Se calculó la ratio de crecimiento entre el control y el material elicitado de manera que ratios superiores a 1 indicaban un crecimiento mayor del micelio hacia la zona del material embriogénico control, lo que se interpretó

como una inhibición del crecimiento del patógeno por parte del material elicitado. Finalmente, el material embriogénico se recogió y conservó en congelador a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **III.3.1.6.2. Medida de la respuesta a estrés biótico (actividad ROS)**

Estas determinaciones se llevaron a cabo con el material embriogénico de la línea Ha13 que había sido elicitado con OCF (30 y 50 % v/v) MeJA, BTH y PABA (5, 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ ) y material control, ambos tipos de material se había puesto en contacto previamente con el oomiceto en los ensayos de cultivo dual. También se utilizó material embriogénico de la línea Ha13 elicitado con los mismos tratamientos anteriores y material control, que se había cultivado en medio líquido ESM que contenía extracto activo del oomiceto diluido al 20 % (v/v), así como material de la línea E00 elicitado con OCF (30 % v/v), MeJA (5 y 25  $\mu\text{M}$ ), AS (5 y 50  $\mu\text{M}$ ) y BABA (10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ ) después de haber sido infectado con el extracto anterior.

Para la preparación del extracto activo de *P. cinnamomi* en medio líquido (cepa 1630) se utilizaron matraces estériles de 250 mL. En cada matraz, que contenía 40 mL de medio ESM, se colocaron 5 recortes de 0.5  $\text{cm}^2$  provenientes de la parte externa del micelio, crecido en medio PDA durante 10 días. A continuación, los matraces se pusieron en agitación (50 rpm), a  $23\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  y en oscuridad durante 4 días. Transcurrido este periodo se recuperó el extracto activo del oomiceto haciendo pasar los cultivos a través de discos de papel de filtro Whatman® No. 2 (90 mm de diámetro), ayudados por embudos Büchner y matraces kitasatos. Finalmente, el extracto se diluyó al 20 % (v/v) con medio ESM fresco.

Las líneas embriogénicas elicitadas y control se sumergieron durante 3 horas en esta disolución al 20 % de extracto activo de *P. cinnamomi* y se volvieron a depositar en medio MS de proliferación durante 24 horas, tras las cuales, se liofilizaron y/o congelaron.

Como medida de una respuesta primaria a estrés se determinó la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el material embriogénico elicitado y se comparó con la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el material control, después de haber sido infectados ambos tipos de material con *P. cinnamomi*.

Posteriormente se determinó la actividad de las enzimas catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) en estas muestras elicitadas y sus controles, para tratar de dilucidar si en las muestras elicitadas la actividad de



estas enzimas era superior y por tanto se podía concluir que la elicitación favorecía la actividad enzimática para neutralizar el efecto de las ROS.

#### III.3.1.6.2.1. Determinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Para esta determinación se empleó el protocolo descrito por Chong et al. (2005). Se homogeneizaron 0.3 g de las muestras con 1 mL de TCA al 0.1 % y se centrifugaron a 13000 rpm a 4 °C durante 15 minutos; se añadieron 250 µL de sobrenadante a 250 µL de tampón fosfato de potasio 10 mM (pH = 7.0) y 500 µL de yoduro de potasio 1 M. La absorbancia se midió a 390 nm. El contenido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se expresó en µg/g de peso fresco. Se llevaron a cabo 3 repeticiones de cada tratamiento.

#### III.3.1.6.2.2. Determinación de actividades enzimáticas

Catalasa: la actividad enzimática de la catalasa (CAT) se determinó inicialmente en la línea Ha13 después de ser elicitada con OCF (OCF30 y OCF50) y puesta en contacto con el oomiceto en un cultivo dual siguiendo el protocolo descrito en Chong et al. (2005).

Para la cuantificación de proteína presente en las muestras (mg) se homogeneizaron 0.1 g de material en 1 mL de tampón fosfato 0.2 M (pH = 7.4) y se centrifugaron a 13000 rpm a 4 °C durante 20 minutos. Se añadieron 200 µL del reactivo de Bradford a 800 µL del sobrenadante. Para la preparación del blanco se emplearon 800 µL de tampón fosfato 0.2 M (pH = 7.4) y 200 µL de reactivo de Bradford. La absorbancia se midió a 595 nm. La concentración de proteína se determinó en comparación con una recta patrón preparada con diluciones seriadas de albúmina de suero bovino (BSA) y reactivo Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio Rad®).

La actividad CAT se determinó midiendo los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante un periodo de 4 minutos. Para ello se homogeneizaron 0.2 g de material con 500 µL de tampón fosfato 0.2 M (pH = 7.4). Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. El mix de reacción contenía 1 mL del tampón de reacción (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 19 mM en tampón fosfato 50 mM, pH = 7.0) al cual se le añadieron 150 µL de sobrenadante. Los cambios de la absorbancia de la reacción fueron medidos a 240 nm durante 5 minutos. El coeficiente de extinción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es de 43.6M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

Superóxido dismutasa: la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) se determinó en líneas embriogénicas del genotipo E00 elicitadas con OCF (30 % v/v), MeJA (5 y 25 µM), AS (5 y 50 µM) o BABA (10, 25 y 50 µM) y,

posteriormente, puestas en contacto con un extracto activo del oomiceto diluido al 20 % (v/v).

La cuantificación se realizó mediante el ensayo OxiSelect™ Actividad Superóxido Dismutasa (Cell Biolabs, inc. Ref. STA-340) que se basa en que la enzima SOD cataliza la dismutación del anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Los aniones superóxido ( $O_2^-$ ) son generados por un sistema Xantina / Xantina Oxidasa (XOD) que es detectada con una solución de cromogen, sin embargo, en presencia de SOD, la concentración de estos aniones superóxido se reduce, produciendo menos señal colorimétrica.

Se homogeneizaron 0.3 g de tejido en 1.5 mL de tampón de lisis 1X frío (10 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA); las muestras se centrifugaron a 12000 x g durante 10 minutos y se colectó el sobrenadante. Se preparó una placa multipocillo con 30  $\mu$ L de cada muestra en cada pocillo y se añadieron 5  $\mu$ L de la disolución de xantina, 5  $\mu$ L de la disolución de cromogen, 10  $\mu$ L del tampón de lisis 10X y 40  $\mu$ L de agua desionizada; finalmente se añadieron 10  $\mu$ L de una dilución de la solución de xantina oxidasa a cada pocillo, se mezcló y se incubó la placa durante 1 hora a 37 °C. Se hicieron tres repeticiones por muestra y se midió la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro de lectura de placas Perkin Elmer 1420 multilabel counter VICTOR<sup>3</sup><sub>TM</sub>V.

#### **III.4. Determinación de marcadores precoces de tolerancia a estrés biótico**

Para determinar posibles cambios moleculares inducidos por el proceso de “priming” y relacionados con una mejor respuesta ante un posterior ataque del patógeno, se estudiaron las variaciones en la expresión de genes de respuesta a estrés y en los perfiles proteico, fenólico y hormonal de las líneas elicidadas y control sometidas o no a la infección por el oomiceto. También se determinó la actividad enzimática catalasa, peroxidasa y el contenido en glutatión total, todo ello relacionado con la eliminación de ROS.

Las líneas Q8, E00 y VA5 11f se elicitaron o no (controles) con 50  $\mu$ M de MeJA en medio líquido ESM durante tres días y las muestras se tomaron en las condiciones que se describen en el apartado III.3.1.2. Tras la elicitación se transfirieron a medio MS+STS+CA donde permanecieron 14 días. Transcurrido este periodo se pusieron en contacto con un extracto activo de *P. cinnamomi* al 20 % (v/v) (infección) en medio líquido ESM durante 3 horas como se describe en el apartado III.3.1.6.2, y se volvieron a depositar en

medio MS+STS+CA donde permanecieron 24 horas. Tras este periodo se congelaron y/o liofilizaron para llevar a cabo los diferentes análisis.

### **III.4.1. Variaciones en los niveles de expresión de genes de respuesta a estrés**

Para estos ensayos se seleccionaron 5 genes relacionados con la síntesis de fenilpropanoides e implicados en la respuesta a estrés biótico. Concretamente, los genes *CSQs* (codifica una Corismato Sintasa de *Q. suber*), *PALQs* (codifica una Fenilamonio Liasa de *Q. suber*), *CAD1Qs*, (*CAD*) (codifica una Cinamil Alcohol Deshidrogenasa de *Quercus suber*), *ChSQs* (codifica una Chalcona Sintasa de *Q. suber*), *CsTL1* (codifica una proteína similar a la Taumatina de *Castanea sativa*). Como genes de referencia se utilizaron inicialmente *QpTUBq* (Tubulina), *QsACT* (Actina) y *QsEFse* (Factor de Elongación de la Polimerasa).

#### **III.4.1.1. Extracción de ARN y preparación del ADN complementario (ADNc)**

Se trituraron 0.1 g de material embriogénico de cada muestra de las líneas Q8, E00 y VA5 11f, elicidadas o no, e infectadas o no, como se ha descrito en el apartado anterior, en presencia de nitrógeno líquido y se almacenaron en microtubos de 2 mL. Los microtubos se mantuvieron sumergidos en nitrógeno líquido hasta que se acabó el procesado de todas las muestras. Para la extracción de ARN se empleó el kit de purificación de ARN total en plantas/hongos (Norgen Biotek Corp.). Se añadió tampón de Lisis C con  $\beta$ -mercaptoetanol al 10 % hasta completar un volumen final de 600  $\mu$ L. El tampón se añadió a cada muestra en dos tandas de 300  $\mu$ L, agitando con vórtex suave entre ellas. Posteriormente se incubaron las muestras durante 5 minutos a 55 °C en termobloque, agitando los tubos cada 2 minutos. El lisado se pipeteó a través de una columna de filtrado ensamblada en un microtubo de 2 mL y finalmente las muestras se centrifugaron durante 2 minutos a 14000 rpm. El sobrenadante claro, libre de impurezas, se transfirió a un microtubo de microcentrifuga libre de ARNasas en el que se incorporó el mismo volumen de etanol de 96 ° que el presente en las muestras (100 mL de etanol por cada 100 mL de eluyente). Esta mezcla se aplicó a la columna de spin y se centrifugó 1 minuto a 6000 rpm. El ARN retenido en la resina de la columna se lavó aplicando 400  $\mu$ L de la solución de lavado A a la columna y se centrifugó 1 minuto a 9000 rpm, descartando el sobrenadante. Tras repetir el lavado 4 veces, las muestras se centrifugaron 2 minutos a 13000 rpm para secar la resina de la columna. Finalmente, la columna se incorporó en un tubo de elución de 1.7 mL. Se

añadieron 40  $\mu\text{L}$  de solución de elución A a la columna. Se centrifugaron a 2000 rpm 2 minutos y 1 minuto a 14000 rpm. Por último, se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de solución de elución A a la columna, para volver a centrifugar a 2000 rpm 2 minutos y 1 minuto a 14000 rpm. El ARN extraído se almacenó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Se purificaron las muestras mediante la digestión de ADN genómico presente en las mismas usando el kit ARNasa-Libre ADNasa (Takara Bio Inc.). Se preparó la mezcla de reacción para la digestión con tampón 10X ADNasa y ADNasa recombinante I y se incubaron las muestras durante 30 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a continuación, se añadieron 2.5  $\mu\text{L}$  de una disolución de EDTA 0.5 M y se incubaron las muestras 2 minutos a  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura estéril y 10  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 3 M; se diluyó bien la mezcla y se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de etanol congelado, se mezcló bien y se incubaron las muestras 30 minutos a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , posteriormente se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se descartó el sobrenadante de cada una de ellas y se lavó el precipitado con 250  $\mu\text{L}$  de etanol congelado, a continuación, se volvieron a centrifugar las muestras a 12000 rpm durante 5 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se descartó el sobrenadante, se secó el precipitado y finalmente se redisolvió en 50  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura estéril.

El ARN aislado en cada una de las muestras se cuantificó mediante un espectrofotómetro NanoDrop™ One, Thermo Scientific™. Se realizaron 3 medidas por muestra y se calculó una media (expresada en ng de ARN por  $\mu\text{L}$ ). A partir de esta medida se calculó el volumen de muestra necesario para obtener 1  $\mu\text{g}$  de ARN.

Para la síntesis de ADNc se empleó 1  $\mu\text{g}$  de ARN y el kit de transcripción reversa (Takara Bio Inc.). Se preparó la mezcla de reacción con 4  $\mu\text{L}$  de tampón 5X, 1  $\mu\text{L}$  de enzima, 1  $\mu\text{L}$  de oligos dT y 1  $\mu\text{L}$  de hexámeros aleatorios, se añadieron 7  $\mu\text{L}$  de la mezcla a cada muestra y se completó el volumen hasta 20  $\mu\text{L}$  con agua libre de ARNasas. La reacción consistió en una incubación durante 15 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 5 segundos a  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### III.4.1.2. Amplificación por PCR a tiempo real

Se emplearon los cebadores (Tabla III.10) de los genes *PAL*, *CAD*, *ChS* y *CS* descritos por Chaves et al. (2011), y los correspondientes a los controles internos (*ACT*, *EF* y *TUB*) y *CsTL1* fueron los empleados por Cano et al. (2021) y Soler et al. (2008). En primer lugar, se probaron con ADNc de *Quercus ilex* mediante PCR a tiempo final. Las condiciones seleccionadas para esta PCR fueron las siguientes; 5 minutos a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a continuación 35 ciclos compuestos

de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C y 30 segundos a 72 °C, finalmente 3 minutos a 72 °C. Los productos de la PCR se analizaron en gel de agarosa al 2.6 % en tampón TBE 1X junto con el tampón de carga y el marcador de 100 pares de bases (Takara Bio Inc).

**Tabla III.10.** Cebadores utilizados para la PCR

Gen	Cebador directo	Cebador reverso
<i>CSQs</i>	TGGATTGATTGGAAACAGATTAC	CAAGGAAGCAGCACACAG
<i>PALQs</i>	ATTAGCAGGGATTGATGG	CAAGTGGTCTGTAAATTCG
<i>CAD1Qs</i>	CAGATGATAAGCCATTTGCG	AGGAACTTCAGGGTGCTAC
<i>ChSQs</i>	TGAGATCACAGCAGTTAC	CAAGTTGAAACAGTGGAC
<i>CsTL1</i>	GTTCAAGCTCCATGGAAAGG	ACCTGACCCGGTGCTACAATC
<i>QpTUBq</i>	CTCGTGCTGTTCTCATGGATCT	TGGCCGAAAACGAAGTTGTC
<i>QsACT</i>	GCCCCACGAGCTGTGTTC	TCTGGCCCCATTCCAACCA
<i>QsEF</i>	TTGTGCCGTCCTCATTATTGACT	TCACGGGTCTGACCATCCTT

Los análisis de RT-PCR se realizaron en un equipo Step One Plus de Applied Biosystems (SCSIE, UV) empleando el kit SYBR® *Premix Ex Taq™*, ((Tli RNaseH Plus), Takara Bio Inc.) siguiendo las especificaciones del fabricante. Para la amplificación de ADNc se utilizaron 40 ciclos de 3 segundos de desnaturalización a 95 °C y 30 segundos de anillamiento a 60 °C. Tras cada ciclo se generaron curvas de melting de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 15 segundos a 95 °C para asegurar que se habían obtenido productos uniformes. Las muestras se procesaron por triplicado en un volumen final de reacción de 20 µL que contenía 1 µL de ADNc y 0.3 µM de cada cebador.

En primer lugar, se determinó la eficiencia de la amplificación de los cebadores, para lo cual se realizaron diluciones seriadas 1:4 de una muestra de ADNc, a fin de obtener mediante los valores de  $C_T$  (*threshold cycle*, ciclo umbral) de cada una de ellas 5 puntos a partir de los cuales desarrollar una recta patrón para cada cebador. A través de la pendiente de la recta patrón se calculó la eficiencia de la amplificación siguiendo la fórmula de Bustin et al. (2009).

$$Eficiencia = 10^{-1/pendiente} - 1$$

En segundo lugar, se amplificaron muestras de las tres líneas embriogénicas con los cebadores de los tres genes de referencia para comprobar la estabilidad de la amplificación.

Finalmente, se amplificaron por triplicado las muestras de cada línea embriogénica y tratamiento, y se determinó el nivel de expresión de los cinco

genes para cada una de ellas mediante el parámetro  $2^{-\Delta CT}$  (Pfaffl, 2001), utilizando como gen de referencia *QsEFse*.

#### III.4.2. Variaciones en el perfil proteico

Este análisis se realizó con muestras de la línea E00 tratadas como se describe en el apartado III.4, con la excepción de que la infección se produjo a los 5 días de la elicitación. Se utilizó material liofilizado de estas muestras.

##### III.4.2.1. Extracción de proteínas y preparación de las muestras

La extracción de proteínas de las muestras se llevó a cabo mediante el método de TCA –Acetona optimizado para bellotas de *Quercus ilex* subsp. *ballota* (Valero-Galván et al., 2014).

Se introdujeron 0.1 g de material liofilizado de cada muestra en microtubos de 2 mL y se añadió 1 mL de una solución de 10 % (p/v) TCA/acetona con 0.07 % (p/v) DTT (ditiotreitól). Se mezcló bien utilizando vórtex. A continuación, se sonicaron las muestras  $3 \times 10$  s (50 W, amplitud 60) a 4 °C y se dejaron precipitar las proteínas durante la noche. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a  $15000 \times g$  y a 4 °C durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó dos veces con una disolución de acetona con 0.07 % (p/v) DTT, y se volvieron a centrifugar las muestras a  $15000 \times g$  y a 4 °C durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado obtenido se secó a temperatura ambiente para eliminar la acetona residual. Las proteínas se disolvieron en una solución de solubilización (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4 % (3-[(3-cholamidopropilo) dimetilamonio]-1-propanosulfonato), tritón 2 %) durante 2 horas, mediante agitación en un vórtex a 4 °C.

El contenido en proteína de las muestras se cuantificó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Se midió la absorbancia a 595 nm. Los extractos de proteínas de las muestras se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

Los extractos de proteína se purificaron mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS) al 12 % de poliacrilamida (Laemmli, 1970). Se prepararon geles utilizando un kit de electroforesis (Protean II, Bio-Rad, USA). La fase separadora contenía 12 mL de acrilamida/bisacrilamida al 40 %, 10 mL de Tris-HCl, pH 8.8, 0.4 mL de 10 % SDS, (dodecilsulfato sódico) 17.4 mL de agua destilada, 0.2 mL de 10 % APS (persulfato de amonio) y 0.02 mL de TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina). La fase concentradora contenía 1.2 mL de acrilamida/

bisacrilamida al 40 %, 3.024 mL de Tris-HCl, pH 6.8, 0.12 mL de 10 % SDS, 7.632 mL de agua destilada, 0.06 mL de APS y 0.012 mL de TEMED.

Se cargaron las muestras en el gel (100 µg de equivalentes de proteína de BSA) y se conectó la fuente a 80 V hasta que el frente de electroforesis hubo penetrado 1 cm en el gel separador. El gel se extrajo y se fijó (10 % metanol, 7 % ácido acético) durante media hora. Tras la fijación el gel se tiñó con una solución de azul brillante de Coomassie G-250 (Sigma-Aldrich, USA) (Mathesius et al., 2001).

A continuación, se cortaron las bandas que contenían las proteínas, se trocearon y se mantuvieron en agua hasta su digestión. Las porciones de gel se destiñeron aplicando 200 mM de bicarbonato amónico (BA) que contenía 50 % de acetonitrilo durante 15 minutos, posteriormente se aplicó acetonitrilo al 100 % durante 5 minutos. Se redujeron las proteínas mediante la adición de 20 mM DTT en 25 mM BA y la incubación a 55 °C durante 20 minutos. Se enfriaron las muestras a temperatura ambiente y posteriormente se aplicó yodoacetamida 40 mM en BA 25 mM a las mismas, y se mantuvieron en oscuridad durante 20 minutos para provocar la alquilación de los tioles libres. Se lavaron las porciones de gel dos veces en 25 mM BA. La digestión proteolítica se llevó a cabo mediante la adición de tripsina (Promega, Madison, WI) a 12.5 ng/µL de enzima en 25 mM BA y se incubaron a 37 °C durante la noche. La digestión de proteínas se detuvo por la adición de ácido trifluoroacético al 1 % y las muestras digeridas se secaron en Speedvac (Valledor y Weckwerth, 2014; Romero-Rodríguez et al., 2019).

#### **III.4.2.2. Identificación y cuantificación de proteínas por nLC-MS/MS**

La nLC se llevó a cabo en un equipo Dionex Ultimate 3000 nano UPLC (Thermo Scientific, SCAI, UCO) con columna C18 75 µm x 50 Acclaim Pepmam (Thermo Scientific). La mezcla de péptidos se cargó previamente en una precolumna de 300 µm x 5 µm Acclaim Pepmap (Thermo Scientific) con acetonitrilo 2 % /TFA 0.05 % durante 5 minutos a 5 µL/min. La separación de péptidos se realizó a 40 °C en todas las tandas. El tampón de la fase móvil A (A) estaba compuesto por agua y ácido fórmico 0.1 %. La fase móvil B (B) se componía de acetonitrilo 20 % y ácido fórmico 0.1 %. Las muestras se separaron a 300 nL/min. Las condiciones de elución fueron 4-35 % B durante 60 minutos; 35-55 % B durante 3 minutos; 55-90 % B 3 minutos; un lavado de 8 minutos con 90 % B y 12 minutos de reequilibración a 4 % B. El tiempo total de duración de la cromatografía fue de 85 minutos.

Los cationes peptídicos eluidos se convirtieron a iones en fase gaseosa mediante ionización con nano electro spray y se analizaron en un espectrómetro de masas Thermo Orbitrap Fusion (Q-OT-qIT, Thermo Scientific) en modo positivo. El escaneo de precursores de péptidos de 400 a 1500 m/z se realizó a una resolución de 120K (a 200 m/z) con un objetivo de recuento de  $4 \times 10^5$  iones. El tándem MS se llevó a cabo mediante el aislamiento a 1.2 Da con el cuadrupolo, fragmentación CID con una energía de colisión normalizada de 35, y MS análisis con escaneo rápido en la trampa de iones. El objetivo de recuento de iones AGC se estableció en  $2 \times 10^3$  y el tiempo máximo de inyección fue de 300 ms. Se muestrearon por MS2 únicamente aquellos precursores en estado de carga 2–5. La duración de la exclusión dinámica se estableció en 15 s con una tolerancia de 10 ppm alrededor del precursor seleccionado y sus isótopos. Se activó la selección de precursor monoisotópico. El equipo actuó en modo top 30 con ciclos de 3 s, de manera que el equipo realizaría eventos MS2 continuos hasta un máximo de 30 precursores no excluidos o 3 s, lo que resultara más rápido.

#### III.4.2.3. Tratamiento de datos y clasificación funcional de proteínas

Los datos se procesaron utilizando el programa Proteome Discoverer (versión 2.1.0.81, Thermo Scientific). Los espectros MS2 se buscaron mediante motor SEQUEST enfrentándolos a una base de datos de genoma de *Quercus*. Los péptidos se generaron mediante una digestión triptica teórica permitiendo como máximo la ausencia de un único fragmento, la carbamidometilación de cisteínas como modificación fija y la oxidación de metionina como modificación variable. La tolerancia de masa de precursor fue de 10 ppm y los iones producidos se buscaron con 0.1Da de tolerancia. Las identificaciones de péptidos se agruparon en proteínas de acuerdo a la ley de Parsimony y se filtró al 1 % FDR, y la cuantificación de péptidos se basó en el área de pico de intensidad.

Los valores de proteína se normalizaron mediante suma y transformación con log2 antes de los análisis estadísticos. La estadística se llevó a cabo con el paquete mixOmics de *RStudio* v1.2.1335: *Integrated development environment for R* (RStudio Boston, MA) (SCSIE, UV). Se realizaron tres réplicas biológicas para cada tratamiento. Se aplicó la penalización Lasso para obtener las proteínas diferenciales del total de las proteínas identificadas en la base de datos. Las proteínas se clasificaron funcionalmente de acuerdo a Mapman (Thimm et al., 2004). Para los análisis cluster también se empleó el paquete mixOmics de R (SCIE, UV). Posteriormente se analizaron estadísticamente los datos de las proteínas



diferenciales mediante el programa SPSS Statistics para Windows versión 26 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

### III.4.3. Variaciones en el perfil fenólico

En este estudio se analizaron muestras de 0.1 mg de material embriogénico de las líneas Q8, E00 y VA5 11f tratadas como se describe en el apartado III.4.

Las muestras se extrajeron con 1 mL de metanol al 80 % en un baño de ultrasonidos a temperatura ambiente durante 30 minutos y se filtraron (0.22  $\mu\text{m}$ ) para eliminar partículas. Los extractos se inyectaron en un equipo de cromatografía líquida conectado a un espectrómetro de masas en tándem ABSciex TripleTOF™ 5600 LC/MS/MS. La elución de los extractos se realizó empleando un gradiente de metanol y agua acidificados con 0.1 % de ácido fórmico (Tabla III.11) con flujo de 0.4 mL/min en una columna Waters UPLC C18 de 1.7  $\mu\text{m}$  (2.1 x 50 mm). El tiempo de acumulación fue de 100 ms. Las condiciones de ionización fueron: fuente de iones de gas 1 (GC1) 50 psi, fuente de iones de gas 2 (GC2) 50 psi, cortina de gas 1:25 psi, temperatura 400 °C, voltaje de pulverización de iones (ISVF) -4500 y energía de colisión (CE) -50. La adquisición de datos se hizo en modo negativo, en un rango de masa de 80 - 1200 m/z.

**Tabla III.11.** Condiciones de medición del equipo HPLC.

Tiempo (min)	H <sub>2</sub> O (0.1 % ácido fórmico)	MeOH (0.1 % ácido fórmico)
0	90	10
2	90	10
13	0	100
15	0	100
15.1	90	10
22	90	10

La calibración automatizada se realizó utilizando un sistema de inyección de calibrante externo (CDS) que infunde solución de calibración antes de la introducción de la muestra. El equipo MS utilizaba un método de adquisición IDA con tipo de escaneo topográfico dependiente del ion del producto. Los datos se evaluaron cualitativamente utilizando el software PeakView™. La recta de calibrado se realizó con el flavonol quercetina y se preparó entre 1 ppb y 250 ppb.

Entre los compuestos detectados se determinaron las concentraciones de los ácidos sinápico, elálgico, ferúlico y cafeico, del flavonol quercetina y de la proantocianina prodelfinidina B3, empleando rectas patrón preparadas mediante diluciones seriadas (25, 50, 100, 250, 500 y 1000 mg/mL) de los compuestos de referencia adquiridos; ácidos sinápico, elálgico, ferúlico y cafeico, y glucósido de quercetina (Sigma- Aldrich, USA).

#### III.4.4. Variaciones en el perfil hormonal

Para estudiar la variación en la producción de hormonas relacionadas con la respuesta a estrés se utilizaron las líneas Q8, E00 y VA5 11f tratadas como se describe en el apartado III.4 y se determinó la concentración de ácido abscísico (ABA), jasmonato (JA) y salicilato (SA).

Se pesaron  $25 \pm 3$  mg de material liofilizado y se llevó a cabo la cuantificación de las hormonas mediante un UPLC y MS/MS (*Ultra performance liquid chromatography/mass spectrometer*) utilizando un equipo Q-Exactive Orbitrap (Thermo Fisher) (VLC/Campus, IBMCP, Valencia). El tejido finamente molido se suspendió en metanol 80 % con un 1 % de ácido acético conteniendo estándares internos y se mezcló bien con agitación durante 1 hora a 4 °C. El extracto se mantuvo a -20 °C durante la noche y después se centrifugó y se secó el sobrenadante mediante un evaporador al vacío. El residuo seco se disolvió en ácido acético 1% y se pasó a través de una columna de fase reversa (HLB Oasis 30 mg, Waters), como se describe en Seo et al. (2011). Los residuos finales se secaron y disolvieron en acetonitrilo 5 % - ácido acético 1 % y se separaron las hormonas mediante UHPLC con una columna reversa Accucore C18 (de 2.6 mm, 100 mm; Thermo Fisher Scientific) con un gradiente 2–55 % de acetonitrilo conteniendo 0.05 % de ácido acético, a 400 mL/min durante más de 21 minutos.

Las hormonas fueron analizadas por el servicio de hormonas del IBMCP (Instituto de Biología Molecular Celular y Genética, Valencia) con un espectrómetro de masas Q-Exatractive mediante Monitorización Selectiva de Iones (tSIM; temperatura capilar 300 °C, lentes-S RF nivel 70, resolución 70000) y electrospray de ionización (voltaje de spray 3.0 kV, temperatura de calentador 150 °C, caudal de gas de la envoltura 40 mL/min, caudal de gas auxiliar 10 mL/min) en modo negativo. Las concentraciones de ABA, JA y SA de los extractos se determinaron utilizando curvas de calibración integradas y los programas Xcalibur 4.0 y TraceFinder 4.1 SP1. Los estándares internos para la cuantificación de cada una de las hormonas vegetales fueron las

hormonas marcadas con deuterio (adquiridas de OIChemim Ltd, Olomouc, República Checa).

### III.4.5. Actividad enzimática

El análisis de la actividad enzimática se llevó a cabo utilizando las líneas embriogénicas Q8, E00 y VA5 11f tratadas como se describe en el apartado III.4. Se cuantificó la actividad de la enzima catalasa (CAT EC 1.11.1.6), peroxidasa (POX EC 1.11.1.7) y glutatión reductasa (GRd 1.6.4.2) a través de la determinación del glutatión total (GSH). Los análisis de la actividad de la CAT y la POX se realizaron mediante determinación de fluorescencia utilizando placas de 96 pocillos de fondo plano negras VWR™. Para la lectura se utilizó un espectrofotómetro Tecan Infinite M200 PRO. La determinación del GSH se realizó por análisis colorimétrico utilizando placas de 96 pocillos de fondo plano transparentes VWR™; para esta lectura se utilizó un espectrofotómetro Perkin Elmer 1420 multilabel counter VICTOR<sup>3</sup>™ V. Previamente a la cuantificación se determinó el contenido en proteína de cada una de las muestras.

#### III.4.5.1. Catalasa

La actividad enzimática CAT se cuantificó utilizando el kit de actividad catalasa (Canvax Biotech Ref. CA063). Este ensayo se basa en que la catalasa reacciona en primer lugar con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para producir agua y oxígeno en presencia de peroxidasa de rábano (HRP), el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no convertido reacciona 1:1 con el sustrato fluorogénico 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina (ADHP, conocido como reactivo Amplex Red®) para producir un producto altamente fluorescente (resorufina), que se puede medir a  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 535/587$  nm (método fluorimétrico).

Previamente a la preparación de las muestras se realizó la curva estándar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, añadiendo 0, 2, 4, 6, 8, 10  $\mu$ L de solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1 mM en una placa de 96 pocillos para generar 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 nmol/pocillo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; se llevó el volumen final a 90  $\mu$ L con tampón de ensayo CAT; se añadieron 10  $\mu$ L de solución de parada en cada pocillo y se midió la fluorescencia para  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 535/587$  nm y se realizó la curva patrón.

Para la determinación de la actividad catalasa en las muestras se homogeneizaron 0.1 g de las mismas en 200  $\mu$ L de tampón de ensayo CAT frío en microtubos de 1.5 mL; se centrifugaron las muestras a 10000 x g durante 15 minutos a 4 °C; se recogió el sobrenadante y se añadieron 15  $\mu$ L de la muestra a cada pocillo, llevándose a un volumen final de 78  $\mu$ L con

tampón de ensayo; se preparó el control de muestra pipeteando el mismo volumen que de la muestra y llevándose a 78  $\mu\text{L}$  de volumen final con tampón de ensayo. Se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de la solución de parada en los controles de muestra, se mezcló y se incubó a 25  $^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos para inhibir la actividad de la catalasa en las muestras control, a continuación, se añadieron 12  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM fresco en cada pocillo para empezar la reacción, se incubó a 25  $^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de la solución de parada en cada pocillo.

La mezcla de reacción contenía 46  $\mu\text{L}$  del tampón de ensayo CAT; 2  $\mu\text{L}$  de reactivo Amplex Red<sup>®</sup> y 2  $\mu\text{L}$  de la solución HRP. Se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de esta mezcla a cada pocillo, se incubó la placa durante 10 minutos a 25  $^{\circ}\text{C}$  y se leyó la placa en espectrofotómetro Tecan Infinite M200 PRO en modo fluorimétrico con  $\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}} = 535/587$  nm. Las muestras se testaron por triplicado. El incremento de señal por la actividad de la catalasa es  $\Delta A = \text{AHC} - \text{AS}$ , donde AHC es la lectura del control de muestra y AS es la lectura de la muestra tras 30 minutos. Se representaron los valores de fluorescencia corregidos para cada estándar en función de la concentración final de catalasa y se aplicó  $\Delta A$  a la curva estándar de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para obtener B (nmol de  $\text{H}_2\text{O}_2$  descompuesto por catalasa en 30 minutos de reacción).

$$\text{Actividad de catalasa} = \frac{B}{30 \times V} \times D$$

Donde B es la cantidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$  descompuesto de la curva estándar de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (en nmol); V es el volumen de muestra pretratada agregado al pocillo de reacción (en mL); 30 es el tiempo de reacción (minutos) y D es el factor de dilución de muestra.

#### III.4.5.2. Peroxidasa

La actividad enzimática de la peroxidasa (POX) se cuantificó mediante el kit de Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (Ref. MAK092-1KT) que se basa en que la peroxidasa cataliza la reacción entre  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la muestra, dando como resultado un producto que se puede medir mediante colorimetría a 570 nm o fluorimetría  $\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}} = 535 / 587$  nm; este producto es proporcional a la actividad de la peroxidasa presente. Una unidad de peroxidasa se define como la cantidad de enzima que reduce 1.0  $\mu\text{moles}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por minuto a 37  $^{\circ}\text{C}$ . El ensayo se realizó por fluorimetría.

Previamente se realizó la curva estándar preparando una disolución 0.01 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y se añadieron 0, 10, 20, 30, 40, y 50  $\mu\text{L}$  de esta disolución

en 6 pocillos de una placa de 96, generando el blanco y los estándares 2, 4, 6, 8 y 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; se añadieron 50, 40, 30, 20, 10  $\mu\text{L}$  de tampón de ensayo para llevar a cada pocillo a un volumen de 50 mL. Se preparó la mezcla de reacción de la curva estándar que contenía 2  $\mu\text{L}$  de sustrato fluorescente de peroxidasa y 48  $\mu\text{L}$  del control positivo de peroxidasa. Se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción de la curva estándar a cada pocillo del estándar, se mezcló bien y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 5 minutos, a continuación, se midió la fluorescencia para  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 535/587$  nm y se realizó la curva patrón.

Posteriormente se prepararon las muestras, para lo cual se pesaron  $10 \pm 0.5$  mg de material y se homogeneizó rápidamente con 150  $\mu\text{L}$  de tampón de ensayo. Se centrifugaron las muestras a  $15000 \times g$  durante 10 minutos para eliminar materiales insolubles. Se pipetearon 50  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de cada muestra y se añadieron a una placa de 96 pocillos. Se preparó la mezcla de reacción que contenía 46  $\mu\text{L}$  de tampón de ensayo, 2  $\mu\text{L}$  de sustrato fluorescente de peroxidasa y 2  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  12.5 mM. Se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción a cada muestra, se mezcló bien mediante pipeteo y se incubó la placa a 37 °C. Después de 3 minutos se introdujo la placa en espectrofotómetro y se incubó a 37 °C tomando medidas cada 3 minutos con  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 535/587$  nm. Se continuó tomando medidas hasta que el valor de la muestra más activa fue mayor que el valor del estándar más alto (10  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). En este momento ( $T_{\text{final}}$ ) la muestra más activa estaba cerca o excedía el final del rango lineal del estándar. Se calculó el incremento en la medida de fluorescencia entre  $T_{\text{inicial}}$  y  $T_{\text{final}}$ . Se comparó este incremento en las muestras con el incremento en el estándar relacionando estos valores con los valores de concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  reducido. Las muestras se testaron por triplicado. La actividad de la enzima peroxidasa se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad peroxidasa} = \frac{B \times \text{factor dilución muestra}}{\text{Tiempo reacción} \times V}$$

Donde B es la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (expresada en nmol) reducido entre  $T_{\text{inicial}}$  y  $T_{\text{final}}$ ; el tiempo de reacción es  $T_{\text{final}} - T_{\text{inicial}}$  (minutos) y V es el volumen de muestra añadido al pocillo (mL).

#### III.4.5.3. Glutati3n

El contenido total en glutati3n se cuantific3 mediante el kit OxiSelect™ (Cell Biolabs, inc, Ref. STA-312). Este ensayo permite medir el contenido total

de glutatión dentro de una muestra (GSH/GSSG), basándose en que la glutatión reductasa reduce el glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) en presencia de NADPH. Posteriormente, el cromógeno reacciona con el grupo tiol de GSH para producir un compuesto coloreado que absorbe a 405 nm. La tasa de producción de cromóforo es proporcional a la concentración de glutatión dentro de la muestra. La velocidad se determina a partir del cambio de absorbancia a lo largo del tiempo.

En primer lugar, se preparó la curva estándar mediante diluciones seriadas a partir de una disolución de 0.5  $\mu\text{M}$  de GSSG con tampón de ensayo que contenía 0.5 % de ácido metafosfórico, (0.5, 0.25, 0.125,  $6.25 \times 10^{-2}$ ,  $3.125 \times 10^{-2}$ ,  $1.56 \times 10^{-2}$ ,  $7.8 \times 10^{-3}$  y 0  $\mu\text{M}$ ). Posteriormente se homogeneizaron 0.1 g de muestra en 1 mL de ácido metafosfórico al 5 %; las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, se colectó el sobrenadante y se diluyó a 1:10 con tampón de ensayo 1X. En una placa multipocillo de 96 se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de la solución glutatión reductasa 1X y 25  $\mu\text{L}$  de la solución NADPH 1X en cada pocillo a testar, a continuación, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de muestra, se mezcló y se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de cromogen 1X y tras volver a mezclar, se comenzó a leer la absorbancia a 405 nm a intervalos de 1 minuto durante 10 minutos.

Las muestras se testaron por triplicado. La concentración de glutatión se halló por comparación de la pendiente de las diferentes muestras con la pendiente de la recta patrón en relación a las diferentes concentraciones de GSSG.

#### III.5. Análisis estadístico

Los datos se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) y se presentan como la media  $\pm$  el error estándar de tres repeticiones independientes. Cuando fue necesario, las medias de los tratamientos se separaron mediante el test HSD (diferencias honestamente significativas) de Tukey (Tukey, 1953) a un nivel de confianza del 95%. Cuando los datos no seguían una distribución normal, los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el test de Kruskal-Wallis para análisis univariados de la varianza (k muestras independientes) o el test de U-Mann-Whitney (para 2 muestras independientes). Los datos de los porcentajes fueron transformados a su arcoseno antes del análisis estadístico. Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa SPSS Statistics para Windows versión 26 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## **IV. RESULTADOS**

---





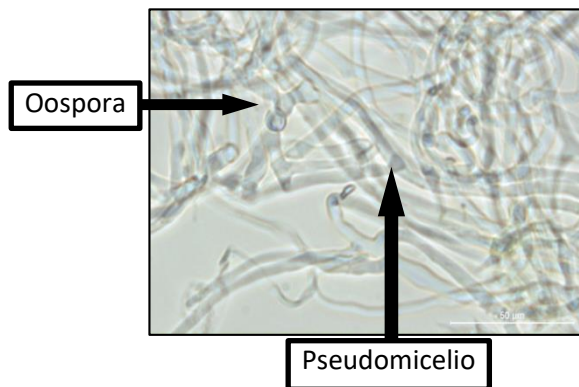
## IV. RESULTADOS

### IV.1. Aprovechamiento de la variabilidad natural para la obtención de genotipos tolerantes a *Phytophthora* spp.

Partiendo de la base de que en algunas zonas de bosques de encina o dehesas afectadas por *P. cinnamomi* existen ejemplares que no presentan síntomas (ejemplares escape), a pesar de estar rodeados de otros pies que se ven profundamente afectados, se decidió aprovechar esta variabilidad en el grado de afección y se trató de clonar estos genotipos.

#### IV.1.1. Determinación de genotipos escape

El ensayo biológico de detección del oomiceto en el suelo en los 33 genotipos ensayados confirmó la presencia de *Phytophthora* spp. en 15 de ellos (Fig. IV.1). Posteriormente se realizaron análisis mediante la técnica de pirosecuenciación por parte del laboratorio de la Dra. Abad del grupo de Hongos Fitopatógenos del Instituto Agroforestal del Mediterráneo de la UPV, para corroborar la presencia del patógeno en los suelos muestreados (Mora-Sala et al., 2019). Se consideraron genotipos escape aquellos que no presentaban síntomas de afección por *Phytophthora* a pesar de que la detección de la presencia del oomiceto en las muestras de suelo de los mismos había dado positiva.



**Figura IV.1.** Detección de *Phytophthora cinnamomi* en el control positivo VA5.

En la tabla IV.1 se detallan los resultados de las determinaciones de la presencia o ausencia de *Phytophthora* spp. en los suelos de los diferentes genotipos muestreados.

## IV. Resultados

**Tabla IV.1.** Sintomatología de pies muestreados y presencia o ausencia de *Phytophthora* spp. en los mismos.

Genotipo	Punto de recogida	Provincia	Síntomas afección	Presencia <i>Phytophthora</i> spp. en suelo
FR1	Font Roja	Alicante	Sí	No
FR2	Font Roja	Alicante	Sí	Sí
FR3	Font Roja	Alicante	No	No
FR4	Font Roja	Alicante	Sí	Sí
FR5	Font Roja	Alicante	No	Sí
FR6	Font Roja	Alicante	No	Sí
FR7	Font Roja	Alicante	No	No
FR8	Font Roja	Alicante	No	No
PM1	Sta. Bárbara	Castellón	Sí	Sí
PM2	Sta. Bárbara	Castellón	No	No
PM3	Sta. Bárbara	Castellón	No	No
PM4	Sta. Bárbara	Castellón	No	No
PM5	Sta. Bárbara	Castellón	No	No
VA1	Vallivana	Castellón	Sí	Sí
VA2	Vallivana	Castellón	Sí	Sí
VA3	Vallivana	Castellón	No	Sí
VA4	Vallivana	Castellón	No	Sí
VA5	Vallivana	Castellón	No	Sí
VA6	Vallivana	Castellón	Si	Sí
VA7	Vallivana	Castellón	Sí	Sí
VA8	Vallivana	Castellón	Sí	Sí
VA9	Vallivana	Castellón	Sí	No
VA10	Vallivana	Castellón	Sí	No
H1	Hunde	Valencia	No	No
H2	Hunde	Valencia	Si	Sí
H3	Hunde	Valencia	No	No
H4	Hunde	Valencia	Sí	Sí
H5	Hunde	Valencia	No	Sí
H6	Hunde	Valencia	No	No
GA1	Garbí	Valencia	Sí	No
GA2	Garbí	Valencia	No	No
GA3	Garbí	Valencia	No	No
GA4	Garbí	Valencia	Sí	No

### IV.1.2. Clonación de genotipos mediante ES

En el año 2014 se establecieron *in vitro* amentos del genotipo escape VA5 muestreado en el monte de la Vallivana.

En el año 2016 se establecieron *in vitro* amentos de 16 genotipos, 4 de ellos provenientes de árboles considerados escape (FR5, FR6, VA5 y H5) y el resto de pies con y sin síntomas, en los puntos de muestreo de Pic del Garbí, Monte de La Hunde, Vallivana y Parc Natural de La Font Roja (FR3, VA1, VA8, VA9, VA10, H1, H2, H3, GA1, GA2, GA3 y GA4, tabla IV.1).

En el año 2017 se establecieron *in vitro* amentos de 5 genotipos procedentes de los puntos de muestreo de Monte de La Hunde y Parc Natural de La Font Roja. De ellos, 1 genotipo (H5) era considerado escape y los demás procedían de árboles sin síntomas de afección (H1, H6, FR7 y FR8, tabla IV.1).

#### IV.1.2.1. Inducción y proliferación de ES

Los porcentajes de inducción de embriogénesis somática obtenidos en las diferentes siembras de amentos fueron muy bajos. En el ensayo realizado en el año 2014 se ensayó un único genotipo (VA5) y se consiguió establecer 2 líneas embriogénicas (VA5 11a y VA5 11f; fig. IV.2). El porcentaje de inducción en este primer año fue del 2%.



**Figura IV.2.** Callo embriogénico obtenido a partir de un amento del genotipo escape VA5.

En los experimentos iniciados en los años 2016 y 2017 se indujo callo en el 81 % de los genotipos, aunque el porcentaje de amentos con proliferación celular varió entre el 0.1 y el 59.4 % dependiendo del genotipo. En el año 2016 se indujo callo en 613 amentos de 10 genotipos diferentes, los callos inducidos en 170 de estos amentos, pertenecientes a 7 genotipos

#### IV. Resultados

diferentes, se transfirieron a la fase de proliferación de callo. Se establecieron dos líneas embriogénicas H5 1b y H5 18b, procedentes del genotipo escape H5 (Tabla IV.2). En el año 2017 se indujo callo en 89 amentos de 5 genotipos diferentes, los callos inducidos en 26 de estos amentos, pertenecientes a 4 genotipos diferentes, se transfirieron a la fase de proliferación. Finalmente se estableció una línea embriogénica del genotipo H1 (H1 22d). En la tabla IV.2 se detallan los porcentajes de inducción de callo y callo embriogénico obtenidos en los ensayos realizados en 2016 y 2017. Las modificaciones introducidas en el medio de inducción en el año 2017 no incrementaron la respuesta embriogénica.

**Tabla IV.2.** Porcentajes de inducción de callo y callo embriogénico en amentos procedentes de genotipos seleccionados en la Comunidad Valenciana.

Fecha	Genotipo	% Inducción de callo	% inducción callo embriogénico	
Año 2014	VA5	2.0	2.00	
	FR3	0.1	0.00	
	FR5	0.2	0.00	
	FR6	0.0	0.00	
	VA1	0.0	0.00	
	VA5	0.3	0.00	
	VA8	0.0	0.00	
	VA9	0.0	0.00	
	VA10	0.2	0.00	
	Año 2016	H1	0.1	0.00
H2		6.9	0.00	
H3		0.1	0.00	
H5		20.6	0.12	
GA1		10.2	0.00	
GA2		5.1	0.00	
GA3		1.1	0.00	
GA4		11.1	0.00	
Año 2017		FR7	16.1	0.00
		FR8	6.0	0.00
	H1	59.4	0.55	
	H5	6.9	0.00	
	H6	0.2	0.00	

#### IV.1.2.2. Maduración y germinación de los embriones somáticos

Las 5 líneas embriogénicas se mantuvieron en el medio de proliferación (Fig. IV.3). Los embriones cotiledonares obtenidos de las nuevas líneas presentaron un desarrollo anormal, a pesar de ello, algunos fueron sembrados en medio de maduración y mantenidos 8 semanas a 4 °C, para favorecer su germinación. No obstante, ninguno de estos embriones germinó.



**Figura IV.3.** Línea embriogénica obtenida de genotipo escape VA5.

Con la finalidad de optimizar el protocolo de maduración y germinación se añadieron al experimento 5 líneas, 3 cedidas por el Dr. Mariano Toribio (Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Agrario, Madrid; Q8, E2, E00) y 2 que habían sido obtenidas anteriormente en el laboratorio (Ha13 y Va16). Los embriones de estas líneas se sembraron en medio de maduración (SH sin reguladores de crecimiento), se mantuvieron posteriormente a 4 °C durante 8 semanas y se pasaron a la fase de germinación. En total fue posible la maduración de 1580 embriones de 8 genotipos (Q8 (1106), E00 (64), H5 1b (38), H5 18b (5), Ha13 (306), E2 (48), Va16 (6), H1 22d (7)), que pasaron a la fase de germinación.

La tabla IV.3 muestra los porcentajes de germinación de los embriones somáticos de las líneas embriogénicas ensayadas. Los porcentajes de germinación fueron muy bajos en los 3 años de estudio, la mayoría de las líneas presentan graves dificultades en esta fase, únicamente el genotipo Q8 produjo un número suficiente de plantas para proceder a su aclimatación. Este genotipo tuvo un 10.7 % de producción de raíces sin brote.

## IV. Resultados

**Tabla IV.3.** Porcentajes de germinación de embriones somáticos de genotipos inducidos y reintroducidos.

Fecha	Línea	% germinación
Año 2016	Q8	2.5
	E00	0.4
	H5 1b	0.0
Año 2017	Q8	3.4
	E00	0.0
	H5 1b	0.0
	H5 18b	0.0
	Ha13	0.0
	E2	0.0
	Va16	0.0
Año 2018	Q8	8.3
	E00	0.0
	H5 1b	0.0
	Ha13	0.0
	H1 22d	0.0

### IV.1.2.3. Aclimatación de plántulas obtenidas

La aclimatación de las plántulas obtenidas a partir de los embriones somáticos de las líneas establecidas se realizó utilizando los sustratos 1 (70 % SeedPro 50 50 + 30 % perlita) y 2 (Turbatruf) (ver tablas III.8 y III.9 sección material y métodos), ya que estos dos sustratos permitieron un mayor porcentaje de supervivencia y crecimiento de las plántulas en el ensayo preliminar de aclimatación (63.6 % de supervivencia y 36.4 % de tallos con brotes para el sustrato 1 y 45.5 % de supervivencia y 36.4 % de tallos con brotes para el sustrato 2, tabla IV.4).

**Tabla IV.4.** Resultados ensayo preliminar de aclimatación en diferentes sustratos.

Sustrato	% Supervivencia	$\Delta$ Longitud tallo (mm)	$\Delta$ N° hojas	% Tallos con brotes
1	63.6	3.5	0.5	36.4
2	45.5	2.3	1.0	36.4
3	36.4	1.0	0.2	18.2
4	36.4	1.2	0.6	27.3

La supervivencia de las plántulas en los siguientes ensayos de aclimatación fue de alrededor del 50 % tras un mes de la aclimatación, un 25 % tras tres meses de la aclimatación (Tabla IV.5) y finalmente, tras cinco meses de la aclimatación, no sobrevivió ninguna de ellas. Se aclimataron nuevas tandas de plantas cedidas por el IIAG, siendo la supervivencia aún menor que en el ensayo anterior. La baja tasa de supervivencia y crecimiento de las plántulas impidió la realización de los análisis de tolerancia a *P. cinnamomi* en raíces de encina obtenidas de genotipos escape tal y como se había planificado en un principio.

**Tabla IV.5.** Porcentajes de supervivencia en el segundo ensayo de aclimatación con sustratos 1 y 2.

Sustrato	Tiempo tras aclimatación (meses)	% Supervivencia	$\Delta$ longitud tallo (mm)
1	1	49.2	1.7
1	3	27.8	3.0
2	1	50.8	1.8
2	3	20.7	3.1

#### IV.1.2.4. Establecimiento y clonación de brotes axilares

Con la finalidad de incrementar el número de plantas para los posteriores ensayos de tolerancia, se procedió a clonar, mediante proliferación de brotes axilares, las plántulas de las líneas Q8 (Fig. IV.4) y E00 generadas en los experimentos de germinación. Para ello se utilizó el protocolo descrito por Martínez et al. (2017a), que, a lo largo de 4 años, permitió producir 1184 brotes de la línea Q8. Los posteriores ensayos de enraizamiento y aclimatación realizados con estos brotes no han permitido obtener un número de plantas adecuado para realizar ensayos posteriores.



**Figura IV.4.** Brote del genotipo Q8 clonado en medio WPM.

## **IV.2. Inducción de memoria epigenética para la tolerancia a estrés biótico**

Para inducir memoria epigenética se aplicó la técnica de “priming”. Las líneas embriogénicas se pusieron en contacto con extractos estériles del oomiceto *P. cinnamomi* o con elicitores químicos.

La selección del agente elicitador, su concentración, modo de aplicación y tiempo más adecuados se realizó teniendo cuenta que estos no afectaran a la proliferación y desarrollo de las líneas embriogénicas y que no produjeran daños tisulares. Por ello, transcurridos 30 o 60 días de los ensayos de elicitación, se determinó el crecimiento de las líneas (incremento relativo de peso fresco) y su buen desarrollo (porcentaje de embriones bien formados). Además, en los primeros ensayos se determinó la concentración de malondialdehído (MDA) liberado tras la elicitación como medida del grado de peroxidación lipídica de las membranas celulares y, en algunos ensayos, el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como medida del estrés oxidativo sufrido por la línea.

### **IV.2.1. Efecto de la elicitación con extractos estériles de *Phytophthora cinnamomi* y elicitores químicos**

#### **IV.2.1.1. Efecto de la aplicación de elicitores en medio sólido durante periodos largos de tiempo**

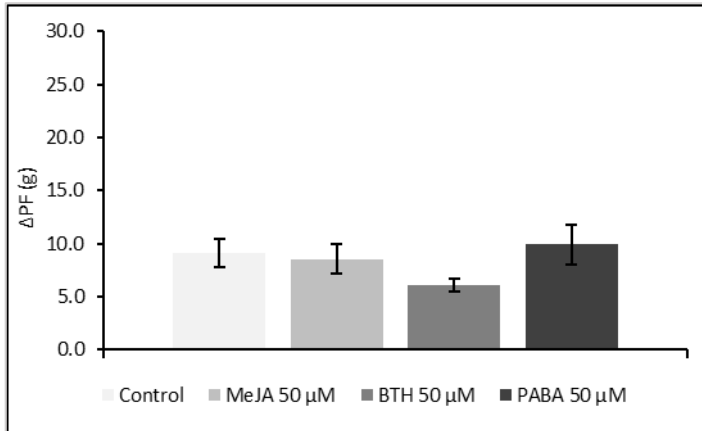
En estos ensayos se utilizó la línea Ha13 y se adicionó al medio de cultivo (medio SH solidificado con agar) los elicitores MeJA, BTH y PABA a una concentración de 50 µM durante 60 días.

Ninguno de los tratamientos afectó negativamente al crecimiento de la línea embriogénica respecto al control ( $p > 0.05$ , tabla A.1 (tabla 1 de anexos)). Los elicitores PABA y MeJA produjeron incrementos relativos de peso fresco similares al control (9.91 y 8.55 vs. 9.15 g respectivamente, fig. IV.5). El tratamiento con BTH produjo un incremento menor de este parámetro con respecto al control (6.10 vs. 9.15 g respectivamente, fig. IV.5).

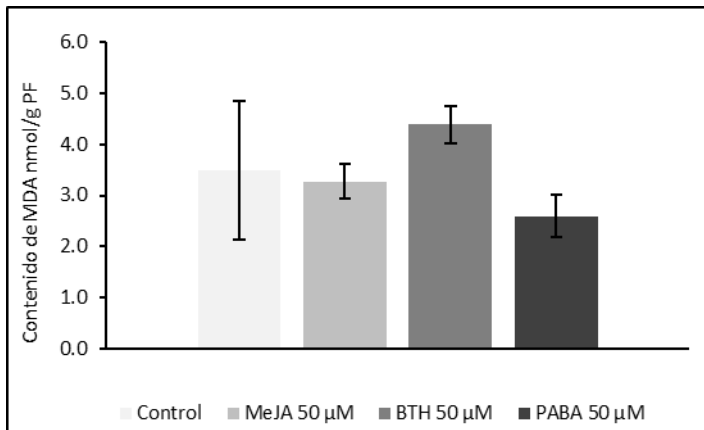
Asimismo, ninguno de los elicitores afectó significativamente a la producción de MDA medida en la línea elicitada en relación con el control ( $p > 0.05$ , tabla A.1) con medias de 3.28 vs. 3.49 nmol/g PF para las muestras tratadas con MeJA y controles, respectivamente, (Fig. IV.6). El tratamiento con PABA produjo unos niveles de MDA menores que el control (2.60 vs. 3.49 nmol/g PF respectivamente, fig. IV.6). Por el contrario, se detectó un aumento en la



producción de MDA en las muestras tratadas con BTH con respecto al control (4.38 vs. 3.49 nmol/g PF respectivamente, fig. IV.6).



**Figura IV.5.** Crecimiento del material embriogénico de la línea Ha13 tratado con los elicitors MeJA, BTH y PABA a 50 μM en medio sólido SH, medido como incremento relativo de peso fresco ( $\Delta$ PF (g)). Datos son media de tres repeticiones  $\pm$  ES tomados a los 60 días del inicio del cultivo.

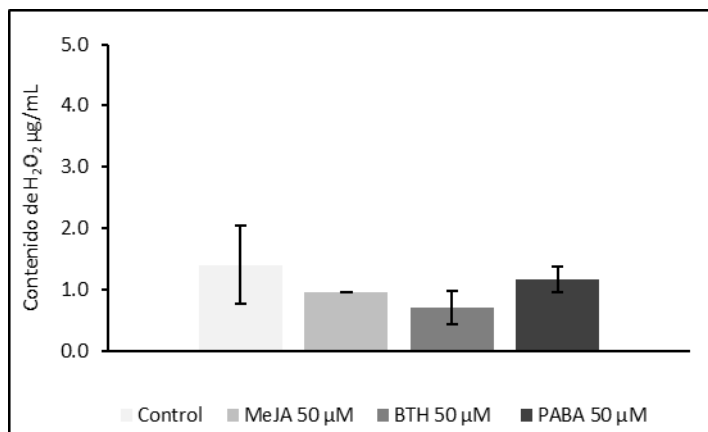


**Figura IV.6.** Niveles de MDA en el material embriogénico de la línea Ha13 tratado con los elicitors MeJA, BTH y PABA a 50 μM en medio sólido SH. Datos son media de tres repeticiones  $\pm$  ES tomados a los 60 días del inicio del cultivo.

Estos resultados muestran una correlación inversa entre crecimiento y producción de MDA (Figs. IV.5 y IV.6), observándose una disminución del crecimiento en las muestras tratadas con BTH que corresponde a un

aumento en los niveles de MDA en estas muestras, y un aumento en el crecimiento de las muestras tratadas con PABA que se correlaciona con una disminución en la producción de MDA en estas mismas muestras. En el caso de las muestras elicidadas con MeJA los valores de ambos parámetros son similares al control.

Los resultados de producción de  $H_2O_2$  tras la elicitación tampoco mostraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0.05$ , tabla A.1). Esta producción fue similar en las muestras tratadas con PABA y en las muestras control (1.16 vs. 1.40  $\mu\text{g/mL}$ , fig. IV.7), mientras que en las muestras tratadas con MeJA y BTH la concentración de  $H_2O_2$  fue inferior que en las muestras control (0.95 y 0.71 vs. 1.40  $\mu\text{g/mL}$ , fig. IV.7).



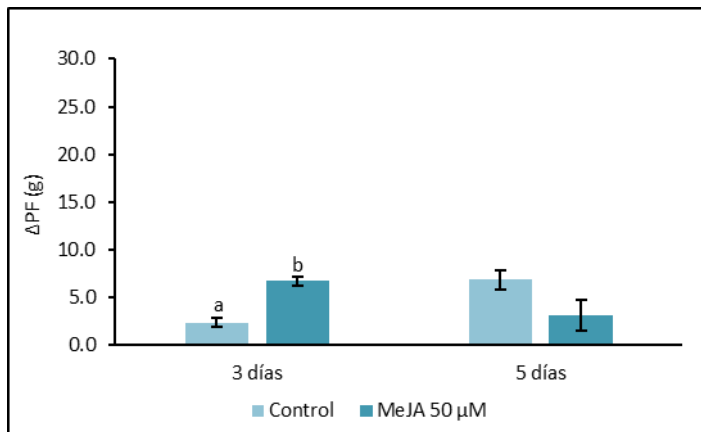
**Figura IV.7.** Niveles de  $H_2O_2$  en el material embriogénico de la línea Ha13 tratado con los elicitors MeJA, BTH y PABA a 50  $\mu\text{M}$  en medio sólido SH. Datos son media de tres repeticiones  $\pm$  ES tomados a los 60 días del inicio del cultivo.

#### IV.2.1.2. Efecto del tiempo de elicitación en medio líquido sobre la línea embriogénica

Se aplicaron los elicitors químicos MeJA, BTH y PABA a 50  $\mu\text{M}$  en medio líquido durante 3 o 5 días a la línea Ha13. En estas condiciones, los tratamientos con BTH y PABA provocaron la necrosis de los tejidos, por ello únicamente se muestran y analizan los resultados obtenidos con el elicitor MeJA.

Los análisis estadísticos de la aplicación de MeJA mostraron una interacción significativa ( $p < 0.01$ ) entre el tratamiento y el tiempo (Tabla A.2). Así, la aplicación de MeJA a la línea durante 5 días produjo una inhibición del crecimiento con respecto al control, aunque esta diferencia no

fue significativa (3.12 vs. 6.84 g de incremento relativo de peso fresco respectivamente, fig. IV.8;  $p > 0.05$ , tabla A.3), sin embargo, cuando la elicitación se aplicó durante 3 días, el tratamiento con MeJA incrementó significativamente el crecimiento de las muestras tratadas ( $p < 0.01$ , tabla A.3) con respecto al control (6.69 vs. 2.35 g de incremento relativo de peso fresco respectivamente, fig. IV.8).



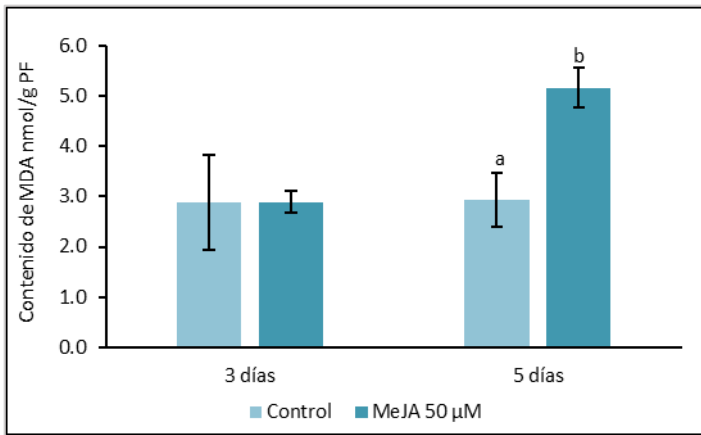
**Figura IV.8.** Crecimiento del material embriogénico de la línea Ha13 tratado con MeJA 50  $\mu\text{M}$  durante 3 y 5 días en medio líquido ESM, medido como incremento relativo de peso fresco ( $\Delta\text{PF}$  (g)). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los datos. Las diferencias significativas se muestran por separado en cada tiempo de elicitación. Datos son media de tres repeticiones  $\pm$  ES tomados a los 30 días de la elicitación.

La concentración de MDA en el material embriogénico dependió significativamente del tratamiento (elicitación), del tiempo y de la interacción entre ambos ( $p < 0.01$ , tabla A.2). La elicitación durante 3 días no varió significativamente los niveles de MDA comparando con el control (2.89 vs. 2.88 nmol/g PF, fig. IV.9;  $p > 0.05$ , tabla A.3), sin embargo, en las muestras elicidadas durante 5 días se produjo un incremento significativo de la producción de MDA ( $p < 0.05$ , tabla A.3) con respecto al control (5.16 vs. 2.94 nmol/g PF respectivamente, fig. IV.9).

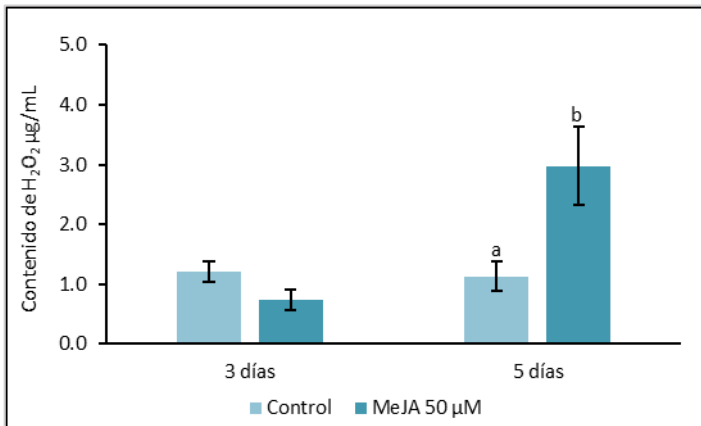
Cuando se analizó el nivel de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la línea Ha13 se observó que la elicitación aplicada durante 5 días provocaba un aumento significativo ( $p = 0.01$ , tabla A.4) de este compuesto (2.98 vs. 1.13  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente, fig. IV.10). Por el contrario, cuando la elicitación se aplicó durante 3 días, los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en las muestras elicidadas fueron menores que en el control

#### IV. Resultados

(0.74 vs. 1.22  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente, fig. IV.10), aunque estas diferencias no fueron significativas ( $p > 0.05$ ).



**Figura IV.9.** Niveles de MDA (nmol/g PF) en el material embriogénico de la línea Ha13 tratado con MeJA 50  $\mu\text{M}$  durante 3 y 5 días en medio líquido ESM. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los datos. Las diferencias significativas se muestran por separado en cada tiempo de elicitación. Datos son media de tres repeticiones  $\pm$  ES tomados a los 30 días de la elicitación.



**Figura IV.10.** Niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en el material embriogénico de la línea Ha13 tratado con MeJA 50  $\mu\text{M}$  durante 3 y 5 días en medio líquido ESM. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los datos. Las diferencias significativas se muestran por separado en cada tiempo de elicitación. Datos son media de tres repeticiones  $\pm$  ES tomados a los 30 días de la elicitación.

En este ensayo se observó que el incremento en el periodo de elicitación (5 días) inhibía el crecimiento de la línea embriogénica e

incrementaba la producción de MDA y de  $H_2O_2$ , indicando un efecto negativo sobre los cultivos. Por ello, los ensayos siguientes se realizaron durante 3 días en medio líquido.

#### IV.2.1.3. Efecto de la concentración del elicitador sobre el desarrollo de las líneas embriónicas

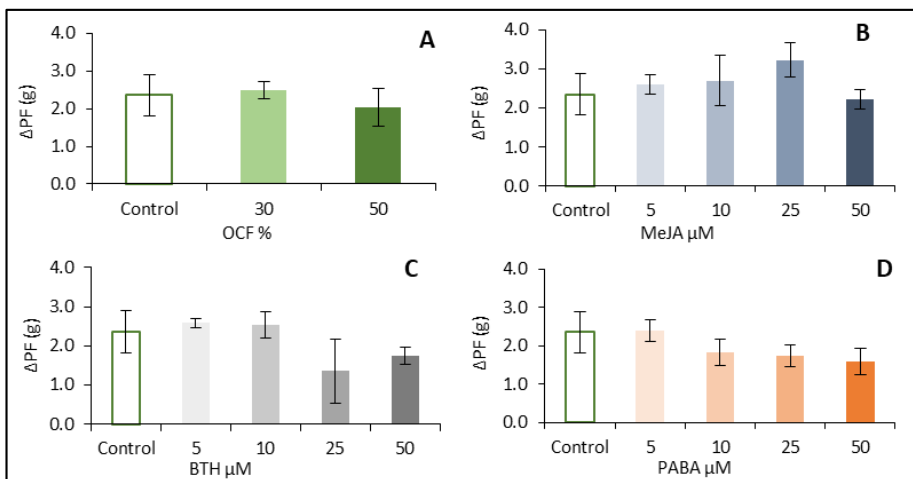
Este ensayo se realizó con las líneas embriónicas Ha13 y E00 aplicando varios elicitores a diferentes concentraciones durante 3 días.

##### Elicitación de la línea Ha13

Se aplicaron los elicitores OCF, MeJA, BTH y PABA durante 3 días en medio líquido ESM. Las concentraciones ensayadas fueron 30 % y 50 % (v/v) para OCF y 5, 10, 25 y 50  $\mu$ M para el resto de los elicitores, además de los correspondientes controles.

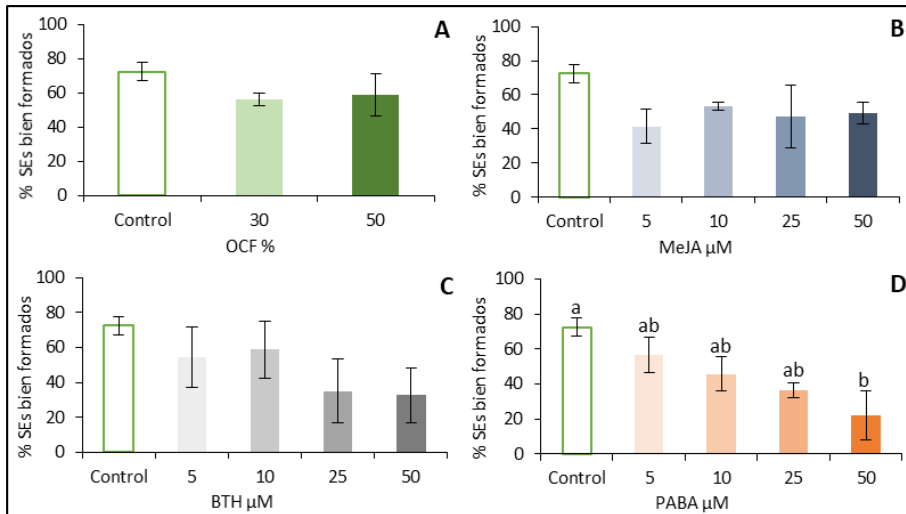
##### *Efecto de la elicitación sobre el crecimiento*

La aplicación de OCF no afectó significativamente al crecimiento de la línea embriónica ni al desarrollo de la misma ( $p > 0.05$ , tablas A.5 y A.6 respectivamente). El incremento relativo de peso fresco osciló entre 2.04 y 2.48 g, siendo el tratamiento OCF30 el que produjo el mayor valor de este parámetro (Fig. IV.11A).



**Figura IV.11.** Crecimiento del material embriónico de la línea Ha13 tratado con extracto estéril del oomiceto *P. cinnamomi* (OCF) (A) y los elicitores químicos MeJA (B), BTH (C) y PABA (D) durante 3 días en medio líquido ESM, medido como incremento relativo de peso fresco ( $\Delta$ PF (g)). Datos son la media de 3 repeticiones  $\pm$ ES tomados a los 60 días del ensayo de elicitación.

Sin embargo, OCF30 fue el tratamiento con el porcentaje más bajo de embriones bien formados con respecto al control y al tratamiento OCF50 (56 vs. 72.4 y 58.8 % respectivamente, fig. IV.12A).



**Figura IV.12.** Porcentaje de embriones de la línea Ha13 bien formados tras ser elicitados con extracto estéril del oomiceto *P. cinnamomi* (OCF) (A) y con los elicitores químicos MeJA (B), BTH (C) y PABA (D). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los datos. Datos son la media de 3 repeticiones  $\pm$ ES tomadas a los 60 días del ensayo de elicitación.

El ANOVA factorial realizado para el estudio del crecimiento de la línea Ha13 mostró efectos significativos del elicitor ( $p < 0.05$ ), mientras que la concentración del mismo y la interacción de ambos factores no fueron significativos ( $p > 0.05$ , tabla A.7). El elicitor MeJA resultó menos lesivo para la línea embriogénica que el PABA (2.69 g de incremento relativo de peso fresco vs. 1.88 g). No se encontraron diferencias significativas para este parámetro entre el BTH (2.05 g) y el PABA o el MeJA.

A pesar de que el efecto de la concentración no fue significativo, se observó que la elicitación con 25 y 50  $\mu$ M de BTH y PABA (Figs. IV.11C-D), producía un incremento relativo menor del peso fresco de los embriones que la elicitación con MeJA (Fig. IV.11B). El ANOVA realizado para cada elicitor comparando el efecto de la concentración entre las muestras elicidadas y el control corroboró las diferencias no significativas (Tabla A.5).

Como se muestra en la figura IV.12, todos los elicitores, incluso cuando se aplicaron a bajas concentraciones, afectaron negativamente al desarrollo de los embriones somáticos. El ANOVA factorial realizado para evaluar el desarrollo de la línea (Tabla A.7) demostró un efecto no significativo ( $p >$

0.05) del factor elicitador sobre este parámetro. La concentración de éste sí influyó significativamente en el desarrollo de la línea ( $p < 0.01$ ). El análisis realizado para cada elicitador (Tabla A.6), mostró un decrecimiento significativo ( $p < 0.05$ ) del porcentaje de embriones bien formados en las muestras elicitadas con PABA50, con respecto al control (21.9 % vs. 72.5 % respectivamente, fig. IV.12D). No hubo diferencias significativas entre las concentraciones de las muestras tratadas y las muestras control cuando se utilizaron los elicitores MeJA y BTH ( $p > 0.05$ , tabla A.6), aunque se pudo observar que una alta concentración del elicitador en el tratamiento MeJA50 permitió un mayor desarrollo posterior del material embriogénico (48.9 % de embriones bien formados) que la misma concentración del elicitador BTH (32.6 % de embriones bien formados) (Figs. IV.12B y C respectivamente).

El incremento en la concentración de los elicitores BTH y PABA repercutió negativamente en el desarrollo del material embriogénico, lo que coincidió en gran medida con la reducción del crecimiento observada en las muestras tratadas con las concentraciones más elevadas de estos elicitores. En las muestras elicitadas con MeJA y OCF no se observó esta tendencia, las concentraciones más altas de estos elicitores produjeron mayores porcentajes de embriones bien formados que las concentraciones más bajas de los mismos.

#### *Efecto de la elicitación sobre los niveles de MDA*

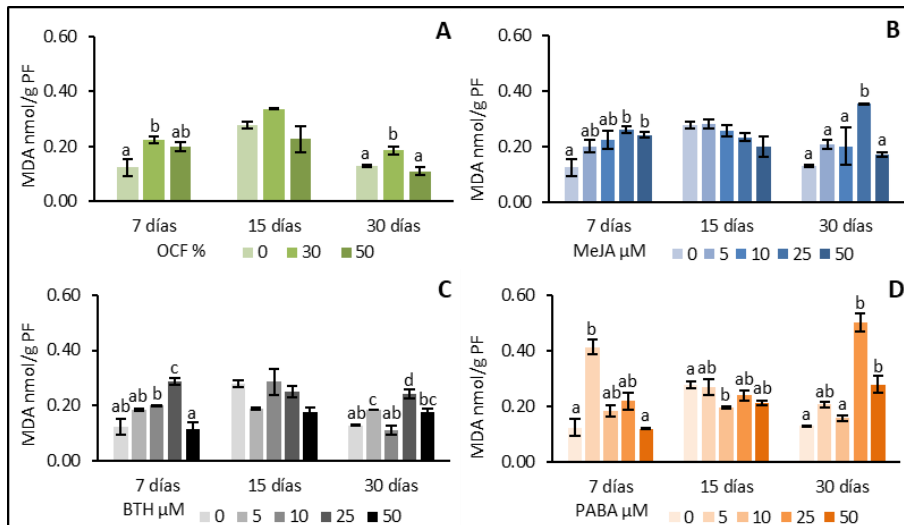
Los niveles de MDA de la línea embriogénica se midieron a diferentes tiempos tras la elicitación (7, 15 y 30 días).

En las muestras tratadas con OCF se observó un efecto significativo de la concentración y del tiempo transcurrido desde la elicitación ( $p = 0.001$ ,  $p < 0.001$ , tabla A.8) sobre los niveles de MDA en la línea, pero no de su interacción.

El tratamiento OCF30 provocó, a los 7 y 30 días de la elicitación un aumento significativo de la concentración de MDA con respecto al control (0.223 vs. 0.124 nmol/g PF y 0.185 vs. 0.129 nmol/g PF respectivamente, fig. IV.13A). El tratamiento OCF50 no provocó cambios significativos de este parámetro en las medidas realizadas tras 7, 15 y 30 días de la elicitación. Los valores de MDA medidos en la línea Ha13 15 días después de la elicitación eran significativamente superiores a los medidos tras 7 y 30 días, con lo que se observó que la elicitación provocaba un aumento de este parámetro a los

## IV. Resultados

15 días, y que posteriormente, alrededor de los 30 días, permitía una recuperación de los valores iniciales (Fig. IV.13A).



**Figura IV.13.** Concentración de MDA (nmol/g PF) en el material embriogénico de la línea Ha13 elicitado con extracto estéril del oomiceto *P. cinnamomi* (OCF) (A) y con los elicitors químicos MeJA (B), BTH (C) y PABA (D). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los datos. Las medidas se llevaron a cabo en el material vegetal recogido a diferentes tiempos tras la elicitación: 7, 15 y 30 días. Las diferencias significativas se muestran por separado para cada periodo tras la elicitación en que se realizaron las medidas.

El análisis factorial de Kruskal-Wallis realizado para los elicitors químicos (Tabla A.9) mostró que el efecto del elicitor ( $p > 0.05$ ) dependía de la concentración empleada y del tiempo tras la elicitación ( $p = 0.001$ ,  $p < 0.001$ ) cuando se midió la concentración de MDA en las muestras. En general se observó la misma tendencia que en las muestras tratadas con OCF, los valores de MDA eran superiores a los 15 días de la elicitación, comparados con los medidos a los 7 y a los 30 días de la misma.

En las muestras tratadas con MeJA, la concentración y la interacción entre concentración y tiempo influyeron significativamente en la concentración de MDA ( $p = 0.001$ , tabla A.8). Transcurridos 7 días desde la elicitación, los tratamientos que provocaron un aumento significativo ( $p < 0.05$ , tabla A.10) de este parámetro en la línea Ha13 con respecto al control fueron MeJA25 y MeJA50 (0.259 y 0.242 vs. 0.124 nmol/g PF respectivamente, fig. IV.13B). Tras 15 días de la elicitación, las diferencias entre tratamientos no fueron significativas ( $p > 0.05$ , tabla A.10), sin embargo, a los 30 días, únicamente el tratamiento MeJA25 mantuvo un



incremento significativo ( $p < 0.01$ , tabla A.10) de la concentración de MDA en la línea con respecto al control (0.354 vs. 0.129 nmol/g PF respectivamente, fig. IV.13B), mientras que el tratamiento MeJA50 permitió la recuperación de la línea, mostrando niveles de MDA no significativamente diferentes al control (Fig. IV.13B).

En el tratamiento con BTH, la concentración, el tiempo y la interacción entre ambos, influyeron significativamente en la producción de MDA en la línea embriogénica ( $p < 0.001$ , tabla A.8). Después de 7 días de la elicitación, los tratamientos BTH10 y BTH25 produjeron incrementos significativos ( $p < 0.001$ , tabla A.10) en la concentración de MDA en la línea embriogénica con respecto al control (0.199, 0.289 respectivamente vs. 0.124 nmol/g PF, fig. IV.13C), sin embargo, 15 días tras la elicitación no se pudieron establecer diferencias significativas entre los tratamientos. Transcurridos 30 días, se observó un incremento significativo ( $p < 0.001$ , tabla A.10) de la concentración de MDA únicamente en las muestras tratadas con BTH5 y BTH25 (0.186 y 0.243 vs. 0.129 nmol/g PF, respectivamente, fig. IV.13C), de manera que el tratamiento BTH10 permitió una recuperación de la línea a los 30 días tras la elicitación.

El análisis de la varianza de Kruskal-Wallis realizado para el elicitador PABA mostró un efecto significativo de la concentración ( $p < 0.01$ , tabla A.8) y no significativo del tiempo transcurrido tras la elicitación ( $p > 0.05$ , tabla A.8) sobre la concentración de MDA en la línea embriogénica Ha13. Tras 7 días de la elicitación el tratamiento PABA5 provocó un aumento significativo de la concentración de MDA en la línea embriogénica ( $p < 0.05$ , tabla A.10) con respecto al control (0.413 vs. 0.124 nmol/g PF respectivamente, fig. IV.13D). Transcurridos 15 días de la elicitación se produjo un aumento generalizado de la concentración de MDA en las muestras, excepto en las tratadas con PABA5 (Fig. IV.13D) y ningún tratamiento superó significativamente al control. A los 30 días de la elicitación los tratamientos PABA25 y PABA50 provocaron un incremento significativo de la concentración de MDA en las muestras ( $p = 0.01$ , tabla A.10) con respecto al control (0.501 y 0.279 vs. 0.129 nmol/g PF, respectivamente fig. IV.13D), estos tratamientos no permitieron una recuperación de los niveles de MDA.

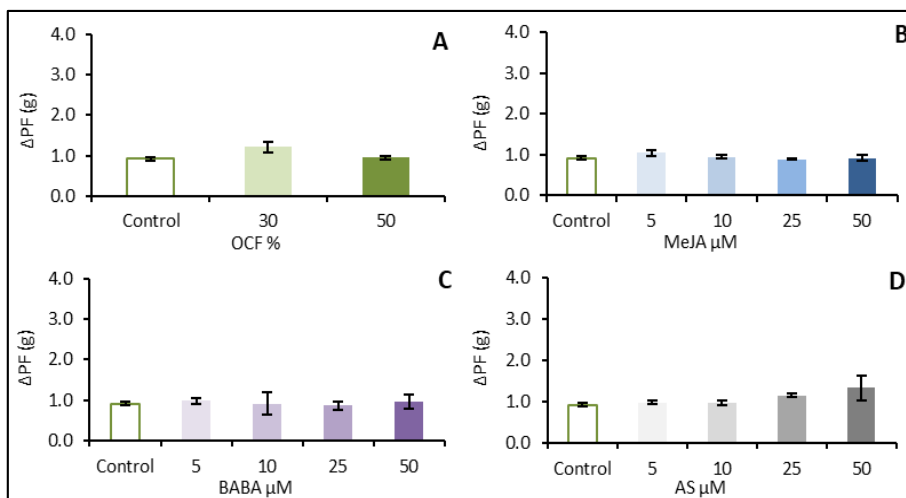
#### Elicitación de la línea E00

En los ensayos con la línea E00 se utilizaron los extractos estériles de *P. cinnamomi* (OCF) a concentraciones de 30 % y 50 %, y se ensayaron varias concentraciones (0, 5, 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ ) de otros elicitores químicos, BABA y

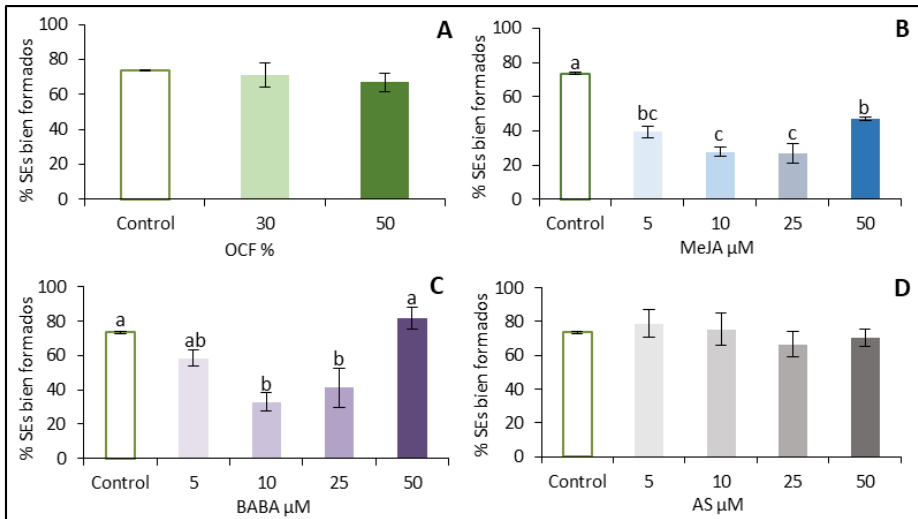
AS, y el elicitor MeJA que había producido resultados prometedores en la línea Ha13.

*Efecto de la elicitación sobre el crecimiento de la línea E00*

Ninguno de los elicitores promovió alteraciones en el crecimiento de la línea embriogénica medido como incremento relativo de peso fresco ( $p > 0.05$ , fig. IV.14, tablas A.11, A.12). No obstante, todos los tratamientos con MeJA y los tratamientos BABA10 y BABA25 redujeron significativamente ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ , tabla A.13) el porcentaje de embriones bien formados con respecto al control (39.3, 27.7, 26.6 y 48.9 vs. 73.5 % en los tratamientos MeJA5, MeJA10, MeJA25 y MeJA50 respectivamente vs. control y 32.9 y 41.3 vs. 73.5 % para los tratamientos BABA10 y BABA25 respectivamente vs. control, fig. IV.15), aunque en el caso del elicitor MeJA, el tratamiento MeJA50 resultó menos tóxico que los tratamientos con menores concentraciones del elicitor. Los factores elicitor, concentración y la interacción entre ambos, fueron, por tanto, significativos ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ , tabla A.12).



**Figura IV.14.** Crecimiento del material embriogénico de la línea E00 tratado con extracto estéril del oomiceto *P. cinnamomi* (OCF) (A) y los elicitores químicos MeJA (B), BABA (C) y AS (D) durante 3 días en medio líquido ESM, medido como incremento relativo de peso fresco ( $\Delta$ PF (g)). Datos son la media de 3 repeticiones  $\pm$ ES tomados a los 60 días del ensayo de elicitación.



**Figura IV.15.** Porcentaje de embriones bien formados de la línea E00 tras ser elicitados con extracto estéril del oomiceto *P. cinnamomi* (OCF) (A) y con los elicitores químicos MeJA (B), BABA (C) y AS (D). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los datos. Datos son la media de 3 repeticiones  $\pm$ ES tomada a los 60 días del ensayo de elicitación.

Estos resultados demuestran que, para la línea E00, altas concentraciones de los elicitores ensayados no implican necesariamente una mayor afección en el desarrollo de la línea embriogénica, al contrario de lo que ocurre con otras concentraciones más bajas de los mismos, además, en esta línea, los resultados obtenidos en el desarrollo de los embriones no coinciden con los obtenidos en el crecimiento de la línea, de manera que las concentraciones de los elicitores MeJA y BABA que afectan negativamente al primer parámetro no afectan negativamente al segundo, como se observa en las figuras IV.15 y IV.14 respectivamente.

Por todo lo anteriormente expuesto, para la línea E00 cualquiera de las concentraciones de AS utilizadas o 50  $\mu$ M BABA parecían ser los tratamientos más adecuados.

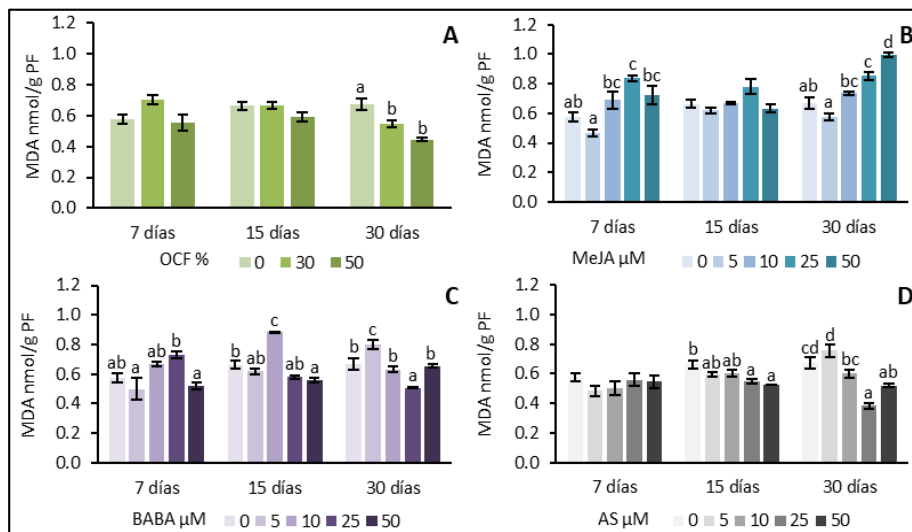
#### *Efecto de la elicitación sobre el nivel de MDA*

El ANOVA realizado para los niveles de MDA de las muestras tratadas con OCF mostró un efecto significativo de la concentración ( $p = 0.001$ ), del tiempo tras el cual se realizaron las medidas ( $p < 0.05$ ), y de la interacción entre ambos factores ( $p < 0.01$ , tabla A.14).

Cuando se analizaron los niveles de MDA a los 7 o 15 días de la elicitación no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las

#### IV. Resultados

diferentes concentraciones de OCF (Fig. IV.16A, tabla A.15). Sin embargo, 30 días tras la elicitación se observaron diferencias significativas ( $p < 0.01$ , tabla A.15) en la concentración de MDA de las muestras tratadas con OCF30 y OCF50, siendo menores estos valores con respecto al del control (0.546, 0.443 respectivamente, vs. 0.671 nmol/g PF, fig. IV.16A).



**Figura IV.16.** Concentración de MDA (nmol/g PF) en el material embriónico de la línea E00 elicitado con extracto estéril del oomiceto *P. cinnamomi* (OCF) (A) y con los elicitors químicos MeJA (B), BABA (C) y AS (D). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los datos. Las medidas se llevaron a cabo en el material vegetal recogido a diferentes tiempos tras la elicitación: 7, 15 y 30 días. Las diferencias significativas se muestran por separado para cada periodo tras la elicitación en que se realizaron las medidas.

En un análisis factorial donde se estudiaron los niveles de MDA generados por todos los elicitors, sus concentraciones y tiempos de medida tras la elicitación (Tabla A.16), se observaron efectos significativos del elicitor ( $p < 0.001$ ) y del tiempo ( $p < 0.05$ ). Las diferencias más significativas en los niveles de MDA se observaron entre las muestras elicitadas con MeJA y AS, así como entre las muestras elicitadas con BABA y AS, siendo el nivel de MDA superior en las tratadas con MeJA y BABA que en las tratadas con AS (Figs. IV.16B-D). Las diferencias significativas en los niveles de MDA se observaron entre las muestras analizadas a los 7 días de la elicitación con respecto a las analizadas a los 30 días de la elicitación, siendo en general mayores los valores de MDA obtenidos en éstas últimas.

También se analizó por separado el efecto de cada elicitor sobre la producción de MDA, comparando entre los valores medidos para cada

tratamiento y tiempo con respecto al control (Tabla A.14). En las muestras tratadas con MeJA se observó un efecto significativo de su concentración, del tiempo de medida y de la interacción entre ambos factores ( $p < 0.001$ , tabla A.14). Así, la elicitación de la línea E00 con elevadas concentraciones de MeJA (25 y 50  $\mu\text{M}$ ) incrementó significativamente ( $p < 0.001$ , tabla A.15) los niveles de MDA medidos a 7 y 30 días del tratamiento (0.839 vs. 0.576 nmol/g PF, a los 7 días entre MeJA25 y el control, fig. IV.16B y 0.582, 0.998 vs. 0.671 nmol/g PF, a los 30 días para MeJA25 y MeJA50 vs. el control, fig. IV.16B). En contraste, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en el contenido de MDA entre las muestras tratadas con este elicitor y recogidas a los 15 días.

El contenido en MDA en las muestras elicidadas con BABA dependió de la concentración, del tiempo y de la interacción de ambos factores ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ , tabla A.14). Cuando se analizó el efecto de la concentración del elicitor en cada tiempo de medida (Tabla A.15.), se observó que 7 días después de elicitar las muestras, únicamente el tratamiento BABA25 producía un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) de la concentración de MDA con respecto al control (0.731 vs. 0.576 nmol/g PF, fig. IV.16C). Sin embargo, 15 días tras la elicitación, este incremento significativo ( $p < 0.001$ ) de la concentración de MDA se dio en las muestras tratadas con BABA10, con respecto a las muestras control (0.881 vs. 0.662 nmol/g PF, fig. IV.16C). Finalmente, 30 días después de la elicitación, el tratamiento que provocó un incremento significativo ( $p < 0.001$ ) de la concentración de MDA en el tejido embriogénico de la línea E00 con respecto al control fue BABA5 (0.800 vs. 0.671 nmol/g PF), mientras que el resto de tratamientos produjeron concentraciones de MDA similares o inferiores al control (Fig. IV.16C).

El contenido en MDA en las muestras elicidadas con AS se vio afectado por los dos factores estudiados y por su interacción ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$  y  $p < 0.001$ , tabla A.14). Cuando se analizó el efecto de la concentración del elicitor en cada tiempo de medida (Tabla A.15), no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en el contenido en MDA entre las diferentes concentraciones de AS para el tiempo 7 (Fig. IV.16D). En contraste con los resultados obtenidos con el elicitor MeJA, la aplicación de elevadas concentraciones de AS (25 y 50  $\mu\text{M}$ ) redujo significativamente ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ) el contenido en MDA en relación con las muestras control, a 15 y 30 días de la aplicación (0.546, 0.529 vs. 0.662 nmol/g PF respectivamente a los

15 días y 0.383, 0.520 vs. 0.671 nmol/g PF respectivamente a los 30 días, fig. IV.16D).

Estos resultados demuestran que en la línea E00 el contenido en MDA fue mayor que en la línea Ha13 en todos los tratamientos. La tendencia a incrementar la concentración de MDA a los 15 días, para posteriormente, a los 30 días de la elicitación volver a niveles similares a los observados 7 días tras la elicitación, sólo se observó en el tratamiento con OCF. En esta línea también se observó que algunos elicitors produjeron decrecimientos de la concentración de MDA con respecto a las muestras no tratadas, como fue el caso de OCF y AS, hecho que no se observó con los tratamientos en la línea Ha13. En general, en esta línea, los niveles de MDA variaron de forma aleatoria, no pudiendo establecerse una correlación entre tratamiento y alteración de las membranas.

### **IV.2.2. Evaluación de la efectividad de la elicitación de líneas embriogénicas en la inducción de tolerancia a *Phytophthora cinnamomi***

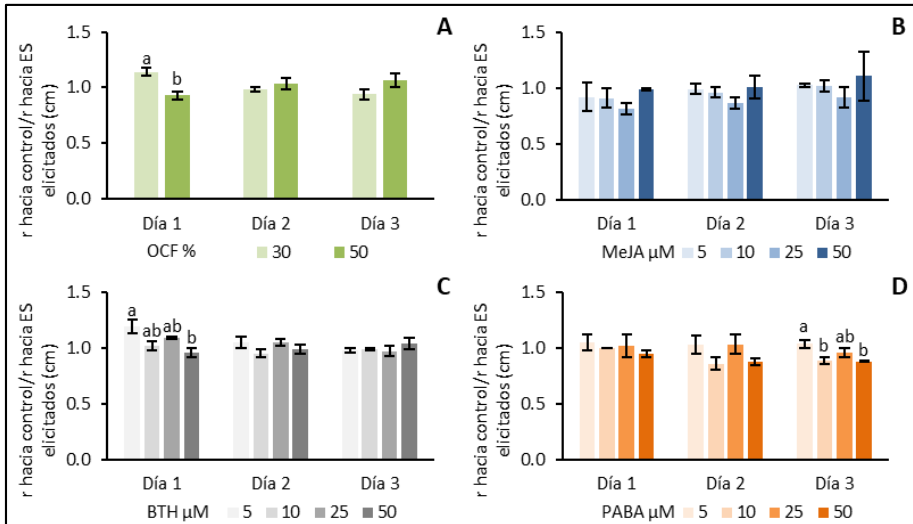
Para medir la eficacia de la elicitación, las líneas embriogénicas elicitadas y controles se infectaron con el oomiceto mediante cultivos duales en medio sólido o con extractos activos en medio líquido. Posteriormente, se midieron varios parámetros relacionados con la respuesta estrés incluyendo la producción de peróxido de hidrógeno y las actividades de enzimas encargadas de su detoxificación (CAT y SOD). Estos ensayos se realizaron con la línea Ha13 elicitada o no con OCF, MeJA, BTH y PABA y con la línea E00 elicitada o no con OCF, MeJA, BABA y AS.

#### **IV.2.2.1. Evaluación de la tolerancia a *P. cinnamomi* mediante cultivos duales con la línea Ha13**

La figura IV.17 muestra las ratios de crecimiento medido diariamente hasta que el micelio alcanzó las muestras (3 días).

El ANOVA realizado para el tratamiento con OCF (Tabla A.17) mostró un efecto no significativo de la concentración y del tiempo en el que se realizó la medida ( $p > 0.05$ ) y un efecto significativo de la interacción de ambos factores ( $p < 0.01$ ), de manera que, el primer día del ensayo, la ratio de crecimiento del micelio fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en las muestras tratadas con OCF30 con respecto a las tratadas con OCF50 (1.14 vs.

0.93 cm). El segundo y tercer día del ensayo no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0.05$ , fig. IV.17A).



**Figura IV.17.** Ratio de crecimiento del micelio (crecimiento hacia SEs no elicitados, control/crecimiento hacia SEs elicitados, en cm, en los cultivos duales. La línea embrogénica fue previamente elicitada con extracto estéril de oomiceto (OCF) (A) o con los elicitores químicos MeJA (B), BTH (C) y PABA (D). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los datos. Las diferencias significativas se muestran por separado para cada día de medida. Datos son media de tres repeticiones medidas durante 3 días. Ratios  $> 1$  muestran crecimiento más rápido hacia los ES control que hacia los ES elicitados.

El análisis factorial de Kruskal-Wallis realizado con todos los elicitores químicos empleados (Tabla A.18) mostró que el tipo de elicitador afectaba significativamente a la ratio de crecimiento del micelio ( $p < 0.05$ ), siendo BTH el elicitador con el valor más alto (1.02 cm); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las ratios de las muestras elicitadas con PABA y MeJA (0.964 y 0.960 cm, respectivamente). El efecto de la concentración sobre este parámetro también fue significativo ( $p < 0.05$ ), al contrario que el tiempo ( $p > 0.05$ ).

Se realizó un nuevo análisis agrupando todos los tratamientos (datos no mostrados) y en este caso, los resultados revelaron una única diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos BTH5 y MeJA25 en los valores de la ratio de crecimiento del micelio (1.07 vs. 0.87 cm respectivamente).

Posteriormente se realizó un nuevo análisis de la varianza para cada uno de los elicitores ensayados, con el objetivo de comparar el efecto de su concentración y del tiempo. Las muestras tratadas con el elicitador MeJA no mostraron diferencias significativas en la ratio de crecimiento del micelio

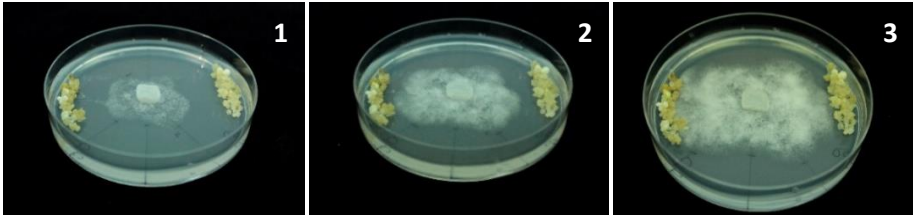
cuando se compararon las concentraciones empleadas y los diferentes tiempos de medida ( $p > 0.05$ , tabla A.17). El ANOVA realizado comparando cada uno de los tratamientos en cada uno de los tiempos de medida (datos no mostrados), tampoco mostró diferencias significativas entre los valores de ratio de crecimiento de micelio ( $p > 0.05$ ), a pesar de esto, tras los 3 días del ensayo, las muestras tratadas con MeJA50 mostraron el valor más alto de la ratio de crecimiento (1.11 cm), siguiendo una tendencia creciente (Fig. IV.17B).

En el cultivo dual establecido con las muestras elicidadas con BTH y las muestras control no se observaron diferencias significativas en la ratio de crecimiento entre las tratadas con las diferentes concentraciones del elicitor, ni entre los diferentes tiempos de medida ( $p > 0.05$ , tabla A.17). Cuando se realizó el ANOVA comparando las diferentes concentraciones del elicitor para cada uno de los tiempos de medida (datos no mostrados), únicamente se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la ratio de crecimiento del micelio entre las muestras elicidadas con BTH5 y BTH50 (1.19 vs. 0.96 cm, fig. IV.17C) en el día 1 del cultivo dual. En general, las muestras en las que se observó un valor inicial más alto en la ratio de crecimiento del micelio fueron las tratadas con BTH5, sin embargo, al final del ensayo, las muestras con este tratamiento mostraron valores más bajos de ratio que las tratadas con BTH10 y BTH50, con una tendencia decreciente (0.98 vs. 0.99 y 1.04 cm respectivamente, fig. IV.17C).

Los tratamientos con PABA mostraron diferencias significativas en la ratio de crecimiento del micelio cuando se compararon las diferentes concentraciones ( $p < 0.05$ ), mientras que el tiempo y la interacción entre estos dos factores no influyeron de manera significativa ( $p > 0.05$ ) en este parámetro (Tabla A.17). Cuando se analizaron los datos para cada uno de los tiempos en que se realizaron las medidas (datos no mostrados), se observó que en los días 1 y 2 de cultivo, las diferencias entre las ratios según las concentraciones de PABA no fueron significativas ( $p > 0.05$ ), sin embargo, el día 3 de cultivo sí se observaron diferencias significativas en este parámetro ( $p < 0.05$ ), las muestras tratadas con PABA5 mostraron una ratio de crecimiento del micelio significativamente mayor que las muestras elicidadas con PABA10 y PABA50 (1.03 vs. 0.88 y 0.88 cm respectivamente, fig. IV.17D).

La figura IV.18 muestra un ejemplo de la evolución del crecimiento del micelio de *P. cinnamomi* (cepa 1630) en el cultivo dual establecido entre el material embriogénico de la línea Ha13 elicitado previamente con MeJA50 (derecha) y material control no elicitado (izquierda).

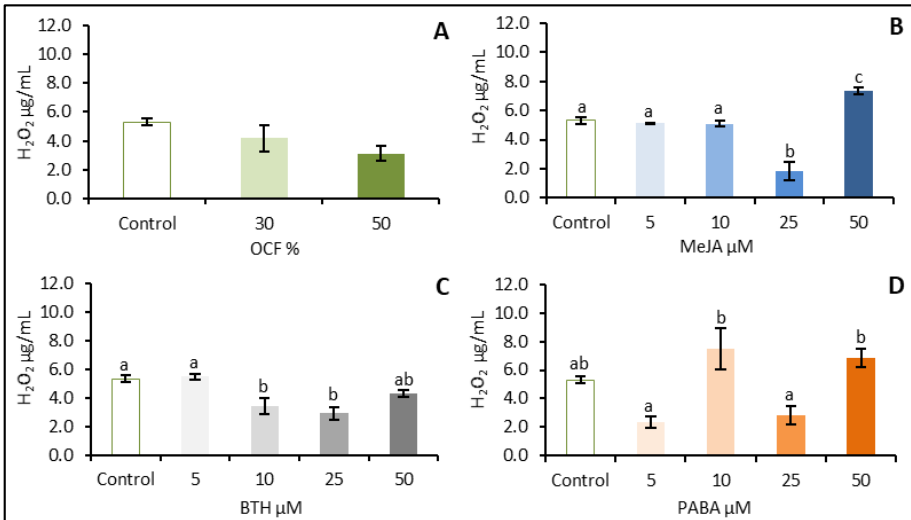




**Figura IV.18.** Evolución del crecimiento del micelio de *P. cinnamomi* (cepa 1630) durante 3 días en el cultivo dual establecido entre el oomiceto, el material embriogénico control (izquierda) y el material embriogénico elicitado con 50MeJA (derecha).

#### IV.2.2.1.1. Determinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tras cultivo dual

La producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las muestras elicitadas con OCF (Fig. IV.19A) no resultó significativamente diferente a la de las muestras control ( $p > 0.05$ , tabla A.19). A pesar de ello, se observó que la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuía a medida que incrementaba la concentración de OCF (Fig. IV.19A).



**Figura IV.19.** Medida de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (µg/mL) en el material embriogénico de la línea Ha13 tras el contacto con micelio de *P. cinnamomi* en el cultivo dual. Las gráficas representan, respectivamente, al material tratado previamente con extracto estéril de *P. cinnamomi* (OCF) (A) y con los elicitores químicos MeJA (B), BTH (C) y PABA (D). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los datos. Datos son la media de 3 repeticiones  $\pm$ ES.

El ANOVA factorial llevado a cabo con todos los elicitores químicos (Tabla A.20) mostró que el efecto del factor elicitador ( $p > 0.05$ ) dependía de la concentración aplicada ( $p < 0.001$ ), y la interacción de ambos factores también fue significativa ( $p < 0.001$ ) en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se realizaron

análisis independientes para cada elicitador empleado, comparando la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las muestras elicitadas con respecto al control.

En las muestras elicitadas con MeJA (Tabla A.19) se observó un efecto significativo de la concentración ( $p < 0.001$ ) sobre la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Así, las muestras elicitadas con MeJA50 incrementaron significativamente la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> después del contacto con el oomiceto en relación a las no elicitadas. En contraste, se observó una reducción significativa de este parámetro en las muestras elicitadas con MeJA25, con respecto a las muestras control (7.35, 1.85 y 5.31 µg/mL respectivamente, fig. IV.19B).

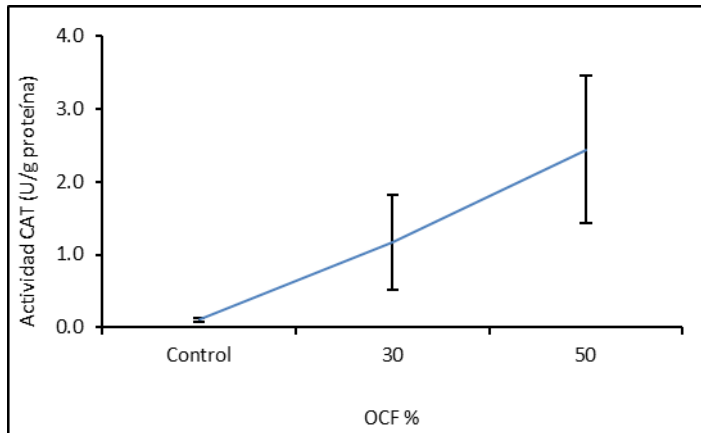
En las muestras elicitadas con BTH el efecto de la concentración sobre la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue significativo ( $p < 0.01$ , tabla A.19). Se observó que el nivel de este compuesto en las muestras elicitadas con BTH10 y BTH25 era significativamente inferior al del control (3.42, 2.90 y 5.31 µg/mL respectivamente, fig. IV.19C).

No se observaron incrementos significativos de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> después de la infección con oomiceto en ninguna de las muestras elicitadas con PABA con respecto al control. El ANOVA realizado con los datos de las muestras elicitadas con PABA, mostró un efecto significativo de la concentración ( $p < 0.01$ , tabla A.19), específicamente entre los tratamientos PABA5 y PABA25 con respecto a los tratamientos PABA10 y PABA50 (Fig. IV.19D).

### **IV.2.2.1.2. Determinación de la actividad catalasa tras el cultivo dual**

La actividad catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) se determinó en las muestras de la línea Ha13 elicitadas con OCF y posteriormente infectadas con el micelio de *P. cinnamomi* en el cultivo dual. En estas muestras se observó una reducción de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a medida que aumentaba la concentración del elicitador, de manera que se midió la actividad CAT para tratar de explicar esta reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los resultados mostraron un incremento de la actividad enzimática que fue de 0.1; 1.1 y 2.4 U/g proteína para los tratamientos control, OCF30 y OCF50 respectivamente (Fig. IV.20), observándose esta tendencia inversamente proporcional a la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el material embriogénico, a pesar de que el análisis de la varianza

realizado (datos no mostrados) no demostró diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0.05$ ).



**Figura IV.20.** Medida de la actividad CAT (U/g proteína) en el material embriogénico de la línea Ha13 tras la infección mediante el contacto con el micelio de *P. cinnamomi* en el cultivo dual. La gráfica representa el material tratado previamente con OCF. Datos son la media de 3 repeticiones  $\pm$ ES.

#### IV.2.2.2. Evaluación de la actividad ROS tras la infección con extracto activo de *P. cinnamomi* al 20% (v/v)

En este ensayo se determinó la actividad ROS como medida de la respuesta de las líneas Ha13 y E00 frente a la infección con un extracto activo del oomiceto.

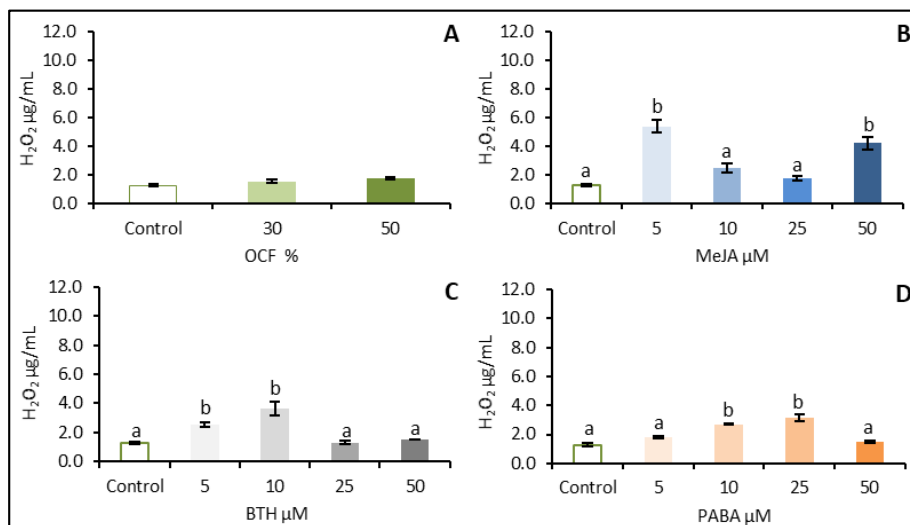
##### *Determinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*

La producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las muestras de material embriogénico de la línea Ha13 elicitado con OCF (Fig. IV.21A) e infectado con el extracto del oomiceto fue similar a la del control ( $p > 0.05$ , tabla A.21).

El análisis factorial de Kruskal-Wallis con datos de todos los elicitores químicos (Tabla A.22) mostró un efecto significativo de la concentración del elicitador ( $p < 0.001$ ) sobre la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tras la infección. En general y a pesar de que el tipo de elicitador no fue significativo, la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue superior en las muestras elicitadas previamente con MeJA que en las elicitadas con OCF, BTH y PABA (3.02 vs. 1.52, 2.05, 2.08  $\mu$ g/mL, respectivamente).

#### IV. Resultados

En las muestras elicitadas con MeJA la concentración ( $p < 0.001$ , tabla A.21) afectó significativamente la producción de  $H_2O_2$ , siendo esta superior en las muestras elicitadas con MeJA5 y MeJA50 que en las muestras control (5.38 y 4.22 vs. 1.27  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente, fig. IV.21B).



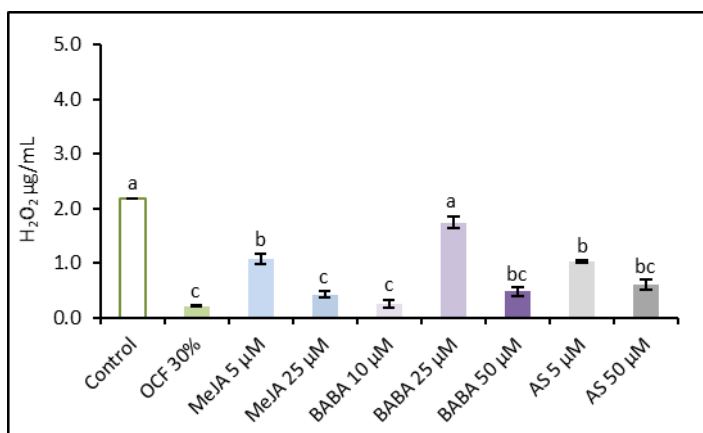
**Figura IV.21.** Medida de la producción de  $H_2O_2$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en el material embriogénico de la línea Ha13 tras la infección con un extracto activo de *P. cinnamomi* al 20 % (v/v). Las gráficas representan, respectivamente, al material tratado previamente con extracto estéril de *P. cinnamomi* (OCF) (A) y con los elicitores químicos MeJA (B), BTH (C) y PABA (D). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los datos. Datos son la media de 3 repeticiones  $\pm$ ES.

El análisis de Kruskal-Wallis reveló un efecto significativo de la concentración de BTH ( $p < 0.05$ , tabla A.21) sobre la producción de  $H_2O_2$ , siendo esta superior en las muestras elicitadas con BTH5 y BTH10 que en las muestras control (2.53 y 3.64 vs. 1.27  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente, fig. IV.21C).

En las muestras elicitadas con PABA, el ANOVA (Tabla A.21) mostró también un efecto significativo de la concentración del elicitador ( $p < 0.001$ ) sobre la producción de  $H_2O_2$  tras la infección. Así, el material embriogénico elicitado con PABA10 y PABA25 produjo más  $H_2O_2$  que el control (2.70 y 3.14 vs. 1.27  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente, fig. IV.21D).

La determinación de la producción de  $H_2O_2$  en las muestras de material embriogénico de la línea E00 se realizó únicamente con los tratamientos que habían permitido un mejor desarrollo de la línea embriogénica y/o habían producido menos daños en la membrana celular. Se realizó un análisis de la varianza agrupando todos los tratamientos llevados a cabo. El análisis de la

varianza de Kruskal-Wallis (Tabla A.23) reveló diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.01$ ). Se observaron diferencias significativas entre las muestras elicitadas con OCF30, MeJA5, MeJA25, BABA10, BABA50, AS5, AS50 y las muestras control (Fig. IV.22), sin embargo, las muestras elicitadas presentaban niveles de  $H_2O_2$  inferiores a las muestras control, no permitiendo por tanto establecer conclusiones sobre la respuesta a estrés en la línea E00.



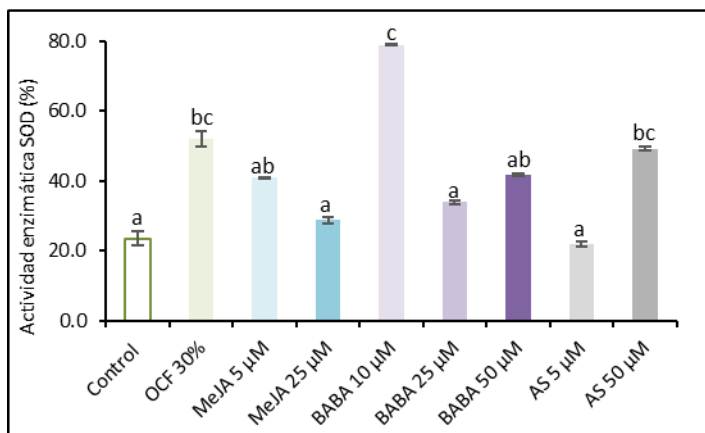
**Figura IV.22.** Medida de la producción de  $H_2O_2$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) en el material embriogénico de la línea E00 tras la infección con un extracto activo de *P. cinnamomi* al 20% (v/v). La gráfica representa el material tratado previamente con OCF30, MeJA5, MeJA25, BABA10, BABA25, BABA50, AS5 y AS50. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los datos. Datos son la media de 3 repeticiones  $\pm$ ES.

#### Determinación de la actividad enzimática SOD

La actividad superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) se midió en el material embriogénico de la línea E00 elicitado con OCF30, MeJA5, MeJA25, BABA10, BABA25, BABA50, AS5 y AS50, después de haber sido infectado con extracto activo de *P. cinnamomi* al 20% (v/v).

El análisis de la varianza de Kruskal-Wallis (Tabla A.24) llevado a cabo agrupando los elicitores con sus respectivas concentraciones en 9 tratamientos, mostró diferencias significativas entre los mismos ( $p < 0.001$ ). Las muestras tratadas con OCF30, BABA10, BABA50 y AS50 tuvieron un incremento significativo de la actividad enzimática con respecto a las muestras control (52%, 78.9%, 41.7% y 49.2% vs. 23.5%, respectivamente, fig. IV.23). Además, todos los tratamientos, excepto AS5, mostraron mayor

actividad SOD que el control, a pesar de que en algunos casos estos incrementos no fueron significativos.



**Figura IV.23.** Medida de la actividad SOD (%) en el material embriogénico de la línea E00 infectado con un extracto activo de *P. cinnamomi* al 20 % (v/v). Las muestras fueron elicitadas previamente con diferentes concentraciones de los elicitors OCF, MeJA, BABA y AS. Se hace una comparativa entre todos los tratamientos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los datos. Datos son la media de 3 repeticiones  $\pm$ ES.

### IV.3. Análisis de marcadores como indicadores precoces de tolerancia a estrés biótico

La búsqueda de marcadores que indicaran una activación de los mecanismos de respuesta a estrés de una manera más rápida o contundente en el material embriogénico elicitado, tras la aplicación un estrés biótico, provocado por la infección de este material con extractos activos de *P. cinnamomi*, se llevó a cabo mediante la determinación de las variaciones de los niveles de expresión de genes de respuesta a estrés, de compuestos fenólicos, de proteínas y de hormonas relacionadas también con esta respuesta a estrés. Posteriormente, se determinó la actividad enzimática en las muestras con el objetivo de dilucidar si esta actividad enzimática era superior en el material embriogénico elicitado que en el no elicitado. Estas determinaciones se realizaron en las líneas embriogénicas Q8, E00 y VA5 11f.

#### IV.3.1. Variaciones en los niveles de expresión de genes de respuesta a estrés

En estos ensayos se analizaron las variaciones en la expresión de 5 genes “diana” CSQs (codifica una Corismato Sintasa de *Q. suber*), PALQs

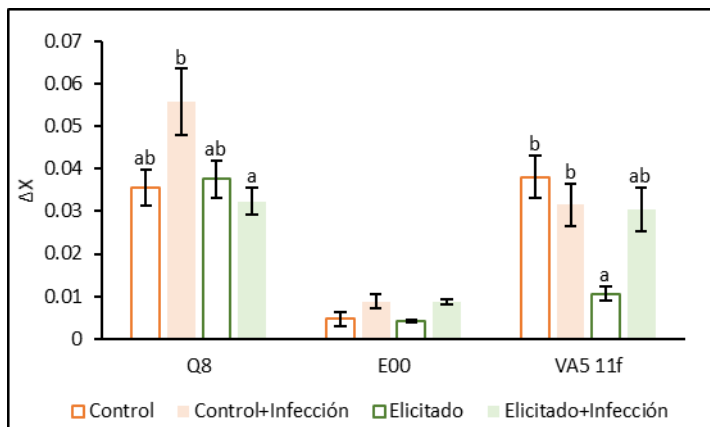
(codifica una Fenilamonioliasa de *Q. suber*), *CAD1Qs* (*CAD*), (codifica una Alcohol Cinámico Deshidrogenasa de *Quercus suber*), *ChSQs* (codifica una Chalcona Sintasa de *Q. suber*) y *CsTL1* (codifica una proteína similar a la Taumatina de *Castanea sativa*), con respecto al gen utilizado como control interno *QsEFse* (Factor de Elongación de la Polimerasa de *Quercus suber*) en tres líneas embriogénicas (Q8, E00 y VA5 11f) elicidadas (E) y no elicidadas (control, C) antes y después de ser infectadas (E+I) y (C+I) respectivamente. La elicitación consistió en la aplicación de 50  $\mu$ M de MeJA y la infección se realizó con un extracto activo al 20 % (v/v) de *P. cinnamomi*, como se detalla en el apartado III.4 de la sección de material y métodos.

#### *Expresión del gen CSQs (Corismato Sintasa de Q. suber)*

El análisis de Kruskal-Wallis mostró efectos significativos de la línea ( $p < 0.001$ , tabla A.25), pero no del tratamiento ( $p > 0.05$ ) sobre la expresión relativa del gen *CSQs*; la línea E00 mostró valores menores de la expresión que las líneas Q8 y VA5 11f (0.0065 vs. 0.0403 y 0.0276 respectivamente). Para determinar el efecto de la interacción de los factores línea y tratamiento se realizaron análisis de la varianza para cada una de las líneas ensayadas (tablas A.26, A.27, A.28).

En la línea Q8 la infección incrementó, aunque no significativamente, la expresión del gen en las líneas control, aunque no varió en las elicidadas (Fig. IV.24). Las únicas diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) se observaron entre las muestras E+I y las muestras C+I (0.0323 vs. 0.0558 respectivamente, fig. IV.24). Las muestras elicidadas e infectadas mostraron niveles de expresión de este gen similares a las muestras control (Fig. IV.24). En la línea E00 ninguno de los tratamientos produjo variaciones significativas en la expresión relativa de este gen (tabla A.27, fig. IV.24).

En la línea VA5 11f la elicitación disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) la expresión del gen *CSQs* en comparación con las muestras control o control infectadas (0.0106 vs. 0.0381 y 0.0315 respectivamente, fig. IV.24); sin embargo, la infección incrementó no significativamente la expresión del gen *CSQs* en las muestras elicidadas, situándola en niveles similares al control (0.0304 vs. 0.0381, fig. IV.24). No se observó esta diferencia en las muestras control (0.0315 vs. 0.0381, muestras C+I vs. C respectivamente, fig. IV.24).



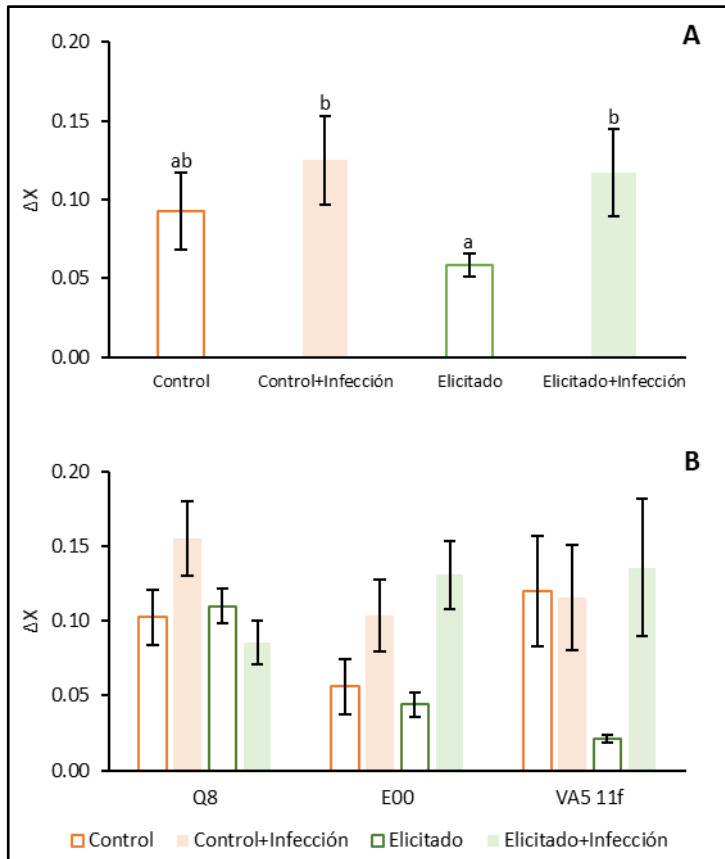
**Figura IV.24.** Medida de la variación de la expresión del gen *CSQs* en las muestras de las líneas embriónicas Q8, E00 y VA5 11f con los tratamientos control, control + infección, elicitación y elicitación + infección con un extracto activo de *P. cinnamomi* al 20 % (v/v). Las muestras fueron elicidadas previamente con 50  $\mu$ M de MeJA. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los datos. Las diferencias significativas se refieren a cada línea. Datos son la media de 3 repeticiones  $\pm$ ES.

#### *Expresión del gen PALQs (Fenilamonio Liasa de Q. suber)*

La expresión relativa del gen *PALQs* dependió únicamente del tratamiento ( $p < 0.05$ ), no observándose diferencias entre las líneas, ni en la interacción entre línea y tratamiento ( $p > 0.05$ , tabla A.25, fig. IV.25B). Las variaciones en la expresión relativa de este gen con respecto al control no fueron significativas, aunque se observó un descenso en la expresión en las muestras elicidadas y un aumento en la expresión en las muestras infectadas, tanto C+I como E+I (Fig. IV.25A). Las muestras elicidadas e infectadas E+I mostraron valores significativamente superiores a las muestras E (0.1173 vs. 0.0585 respectivamente, fig. IV.25A), sin embargo, las muestras control infectadas C+I no mostraron variaciones significativas con respecto a las muestras control C y sí a las muestras elicidadas (0.1250 vs. 0.0929 y 0.0585 respectivamente, fig. IV.25A). En las líneas E00 y VA5 11f la infección de las muestras elicidadas provocó un aumento de la expresión de este gen (Fig. IV.25B), que, aunque no fue significativo, fue notable en el caso de la línea



E00. En la línea Q8, por el contrario, la infección de estas muestras provocó un descenso de la expresión de *PALQs*.

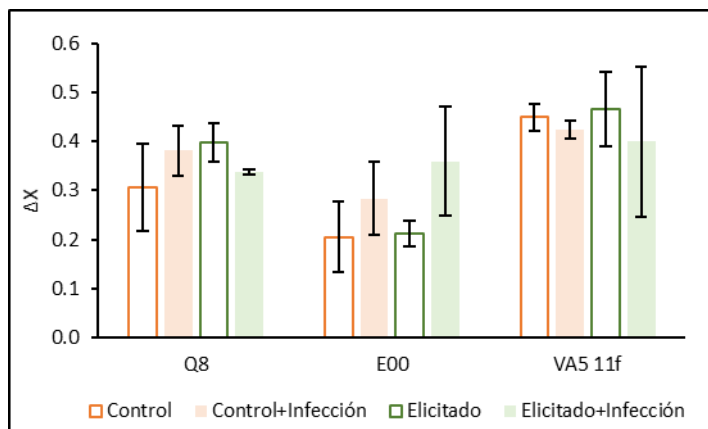


**Figura IV.25.** Medida de la variación de la expresión del gen *PALQs* en las muestras de las tres líneas (A) y en cada línea por separado (B) con los tratamientos control, control + infección, elicitación y elicitación + infección con un extracto activo de *P. cinnamomi* al 20 % (v/v). Las muestras fueron elicidadas previamente con 50  $\mu$ M de MeJA. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los datos. Las diferencias significativas se refieren a la media de todas las líneas. Datos son la media de 3 repeticiones  $\pm$ ES.

#### *Expresión del gen CAD1Qs (Alcohol Cinámico Deshidrogenasa de Quercus suber)*

La expresión relativa del gen *CAD1Qs* dependió de la línea embriogénica (Tabla A.25,  $p < 0.05$ ), observándose diferencias significativas entre las líneas VA5 11f y E00 (0.435 vs. 0.265, respectivamente). Por el contrario, ni el tratamiento (elicitación y/o infección) ni su interacción con la

línea ejercieron efectos significativos sobre la expresión de dicho gen ( $p > 0.05$ , tabla A.25, fig. IV.26). Se destaca que la línea VA5 11f, generada a partir de un árbol escape, presentaba de forma constitutiva una mayor expresión del gen *CAD1Qs*.



**Figura IV.26.** Medida de la variación en la expresión del gen *CAD1Qs* en las muestras de las líneas embriogénicas Q8, E00 y VA5 11f con los tratamientos control, control + infección, elicitación y elicitación +infección con un extracto activo de *P. cinnamomi* al 20% (v/v). Las muestras fueron elicidadas previamente con 50  $\mu$ M de MeJA. Datos son la media de 3 repeticiones  $\pm$ ES.

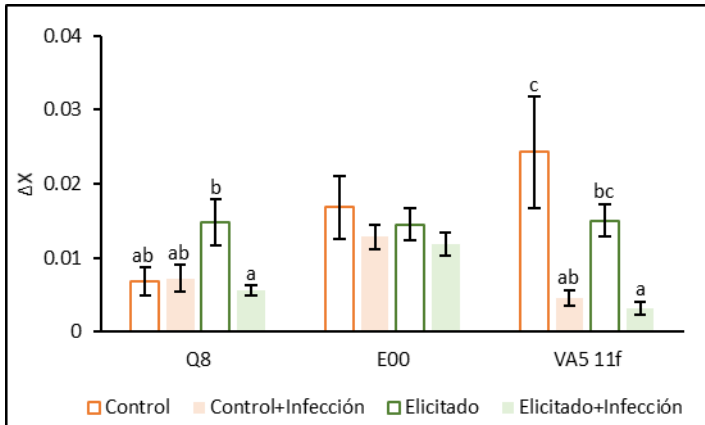
#### *Expresión del gen ChSQs (Chalcona Sintasa de Q. suber)*

La expresión relativa del gen *ChSQs* dependió de la línea (Tabla A.25,  $p = 0.05$ ), y del tratamiento ( $p < 0.01$ ). Especialmente varió entre las líneas E00 y Q8 (0.014 vs. 0.008 respectivamente). Las muestras elicidadas presentaron una expresión relativa del gen *ChSQs* similar al control (0.015 vs. 0.016, muestras E vs. C respectivamente). La infección produjo una disminución significativa en la expresión relativa de este gen con respecto al control, tanto en las muestras control como en las previamente elicidadas (0.008 y 0.007 vs. 0.016, respectivamente). Para tratar de establecer el efecto de la interacción de los dos factores anteriores, se realizaron análisis para cada una de las líneas ensayadas. En la línea Q8 la expresión del gen *ChSQs* incrementó, aunque no significativamente, en las muestras elicidadas (0.0068 vs. 0.0150 muestras C vs. E respectivamente, fig. IV.27), las muestras infectadas presentaron una expresión similar al control (0.0072 y 0.0056 vs. 0.0068, muestras C+I y E+I vs. C, respectivamente, fig. IV.27), solo se produjo una disminución significativa de la expresión entre las muestras elicidadas

después de la infección (0.0056 vs. 0.0150, muestras E+I vs. E, respectivamente, tabla A.26, fig. IV.27).

En la línea E00 ninguno de los tratamientos provocó cambios en la expresión del gen *ChSQs* ( $p > 0.05$ , tabla A.27, fig. IV.27).

En la línea VA5 11f el tratamiento influyó significativamente en la expresión del gen *ChSQs* ( $p < 0.05$ , tabla A.28). La infección con el oomiceto disminuyó significativamente la expresión de este gen tanto en las líneas control como en las elicidadas (0.004 y 0.003 vs. 0.024, muestras C+I y E+I vs. control respectivamente, fig. IV.27). Las muestras elicidadas también presentaron un decrecimiento en la expresión de este gen, pero este no fue significativo (0.015 vs. 0.024, muestras E vs. C respectivamente, fig. IV.27).



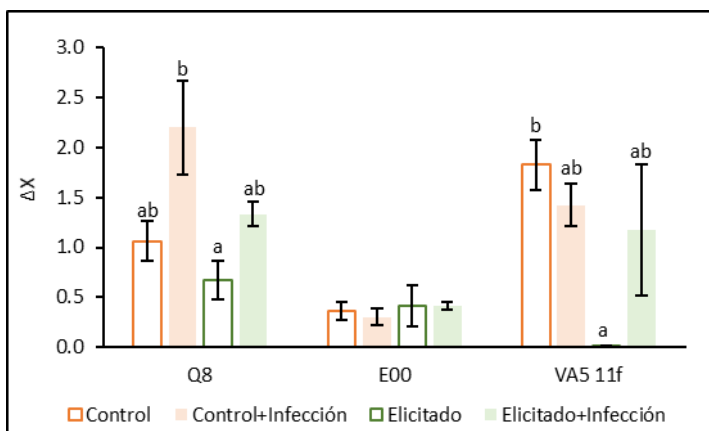
**Figura IV.27.** Medida de la variación de la expresión del gen *ChSQs* en las muestras de las líneas embriogénicas Q8, E00 y VA5 11f con los tratamientos control, control + infección, elicitación y elicitación +infección con un extracto activo de *P. cinnamomi* al 20 % (v/v). Las muestras fueron elicidadas previamente con 50  $\mu$ M de MeJA. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los datos. Las diferencias significativas se refieren a cada línea. Datos son la media de 3 repeticiones  $\pm$ ES.

#### *Expresión del gen CsTL1 (proteína similar a la Taumatina de Castanea sativa)*

El análisis Kruskal-Wallis de la expresión relativa del gen *CsTL1* (Tabla A.25) mostró un efecto significativo de la línea ( $p < 0.01$ ), siendo la expresión relativa de este gen inferior en la línea E00 que en las líneas Q8 y VA5 11f (0.373 vs. 1.310 y 1.110 respectivamente). El tratamiento también ejerció un efecto significativo ( $p < 0.05$ ), observándose una reducción en la expresión en las muestras elicidadas con respecto al control (0.368 vs. 1.082, muestras

E vs. C respectivamente). La infección incrementó significativamente la expresión de este gen en las muestras elicitadas, (0.974 vs. 0.368, muestras E+I vs. E respectivamente), de manera que los niveles de expresión en estas muestras E+I presentaron valores similares al del control. En las muestras control los valores entre las muestras infectadas y no infectadas fueron similares (1.309 vs. 1.082, muestras C+I vs. C respectivamente). Las muestras control infectadas tuvieron una mayor expresión del gen *CsTL1* que las muestras elicitadas (1.309 vs. 0.368 respectivamente  $p < 0.05$ ). El efecto de la interacción de ambos factores se estudió posteriormente (tablas A.26, A.27, A.28)

En la línea Q8 la elicitación indujo un decrecimiento no significativo ( $p > 0.05$ ) en la expresión de *CsTL1* (Fig. IV.28), mientras que la infección provocó incrementos no significativos ( $p > 0.05$ ) en las muestras control (1.060 vs. 2.201 para control y control infectado, respectivamente, fig. IV.28) y en las muestras elicitadas (0.671 vs. 1.332, muestras E vs. E+I, respectivamente, fig. IV.28). Las muestras elicitadas e infectadas E+I presentaron valores de expresión de este gen similares al control (1.332 vs. 1.060, respectivamente, fig. IV.28). Las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) se observaron entre las muestras elicitadas E y las muestras C+I (0.671 vs. 2.201 respectivamente, fig. IV.28).



**Figura IV.28.** Medida de la variación de la expresión del gen *CsTL1* en las muestras de las líneas embriogénicas Q8, E00 y VA5 11f con los tratamientos control, control + infección, elicitación y elicitación +infección con un extracto activo de *P. cinnamomi* al 20 % (v/v). Las muestras fueron elicitadas previamente con 50  $\mu$ M de MeJA. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los datos. Las diferencias significativas se refieren a cada línea. Datos son la media de 3 repeticiones  $\pm$ ES.

En la línea E00 el tratamiento no afectó los niveles de expresión de este gen ( $p > 0.05$ , tabla A.27, fig. IV.28).

En la línea VA5 11f las muestras infectadas tenían unos niveles de expresión del gen *CsTL1* similares al control (1.422 y 1.177 vs. 1.826, muestras C+I y E+I vs. C, fig. IV.28). La elicitación inhibió significativamente ( $p < 0.05$ ) la expresión del gen *CsTL1* (0.0176 vs. 1.8261, muestras elicidadas E vs. control C respectivamente, fig. IV.28).

### IV.3.2. Variaciones en el perfil proteico

El estudio del perfil proteico se realizó con la línea E00 elicitada con MeJA a dos concentraciones (25 y 50  $\mu\text{M}$ ) y posteriormente infectada con extracto activo de *P. cinnamomi* al 20 % (v/v). Como controles se emplearon muestras no elicidadas y no infectadas de este material embriogénico (Control) y muestras no elicidadas e infectadas con el extracto activo del oomiceto (Control infectado). Actualmente se está completando el perfil proteico de muestras de tejido elicitado con 50  $\mu\text{M}$  MeJA antes de proceder a su infección.

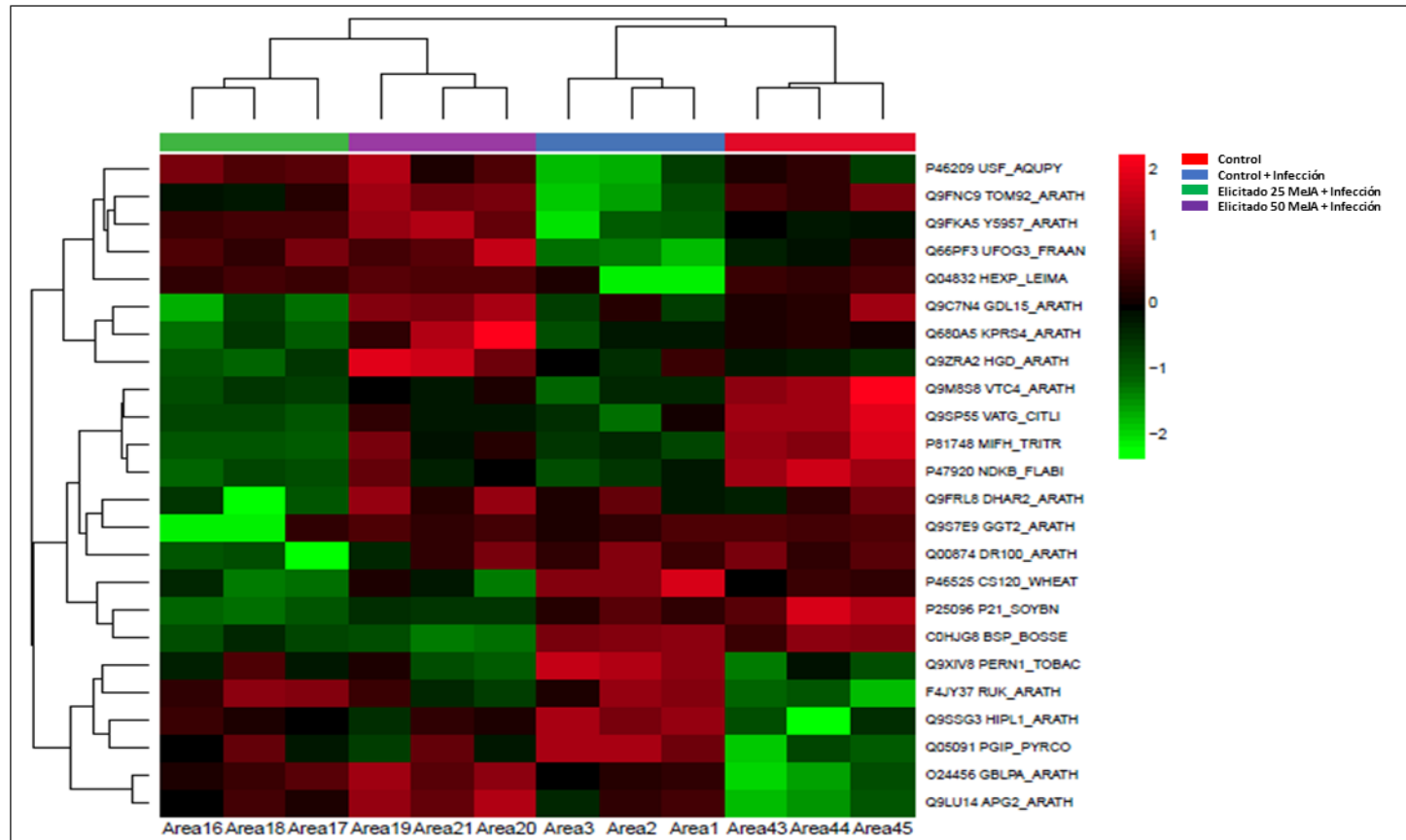
La identificación y cuantificación de proteínas por nLC-MS/MS llevada a cabo por el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba devolvió una base de datos compuesta por todas las proteínas presentes en las muestras, con un total de 1778 proteínas. El análisis estadístico se realizó con el apoyo del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia. Aplicando la metodología de penalización Lasso en el análisis multinomial, del total de proteínas se identificaron 24 con expresión diferencial (Tabla IV.6), agrupadas en 4 bloques que coincidían con los tratamientos (Fig. IV.29). El análisis PLS-DA de las muestras las agrupó según el tratamiento (Fig. IV.30). El componente 1, que explica el 29 % de la varianza, separó las muestras control infectadas de las elicidadas con MeJA50 e infectadas, mientras que el componente 2, que explica el 15 % de la varianza, separó las muestras control de las infectadas (Fig. IV.30).

De las 24 proteínas diferencialmente expresadas, 12 estaban sobreexpresadas en las muestras elicidadas con respecto al control y/o control infectado (Tabla IV.6, fig. IV.31), mientras que las otras 12 disminuyeron su expresión en respuesta a la infección por el oomiceto en las muestras elicidadas con respecto al control y/o al control infectado (Tabla IV.6, fig. IV.32).

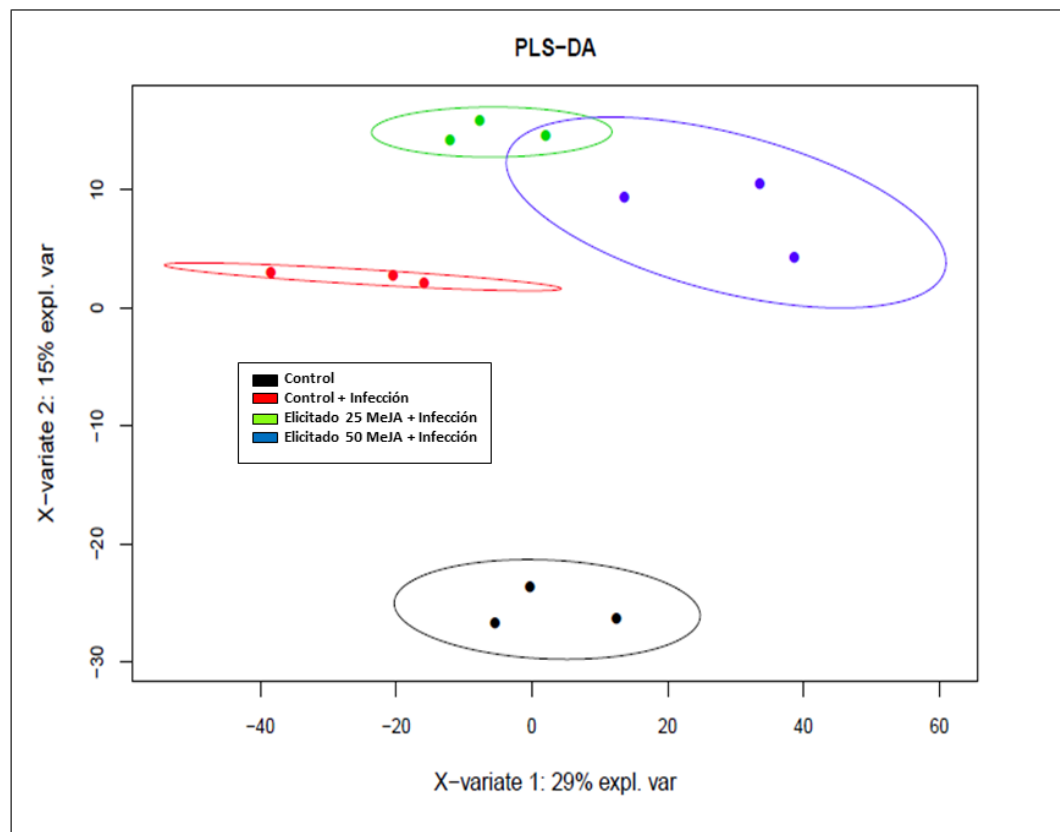
#### IV. Resultados

**Tabla IV.6.** Proteínas diferenciales halladas en las muestras analizadas que se agrupan de manera coincidente con los cuatro tratamientos estudiados en la línea E00. Se clasifican en proteínas sobreexpresadas o con menor expresión, en las muestras elicidadas con respecto a los controles.

Proteínas sobreexpresadas en las muestras elicidadas con uno o ambos tratamientos con respecto al control y/o al control infectado.	
P46209 USF_AQUPY	Proteína usf <i>Aquifex pyrophilus</i>
O24456 GBLPA_ARATH	Receptor para la quinasa C activada 1A <i>Arabidopsis thaliana</i>
Q04832 HEXP_LEIMA	Proteína de unión al ADN HEXBP <i>Leishmania major</i>
Q66PF3 UFOG3_FRAAN	Putativo UDP-glucosa flavonoide 3-O-glucosiltransferasa 3 <i>Fragaria ananassa</i>
Q680A5 KPRS4_ARATH	Ribosa-fosfato pirofosfoquinasa 4 <i>Arabidopsis thaliana</i>
Q9C7N4 GDL15_ARATH	Esterasa / Lipasa GDSL At1g29670 <i>Arabidopsis thaliana</i>
Q9FKA5 Y5957_ARATH	Proteína At5g39570 <i>Arabidopsis thaliana</i>
Q9FNC9 TOM92_ARATH	Subunidad del receptor de importación mitocondrial TOM9-2 <i>Arabidopsis thaliana</i>
Q9FRL8 DHAR2_ARATH	Glutación S-transferasa DHAR2 <i>Arabidopsis thaliana</i>
Q9LU14 APG2_ARATH	Esterasa / Lipasa GDSL APG <i>Arabidopsis thaliana</i>
Q9S7E9 GGT2_ARATH	Glutamato-glioxilato aminotransferasa 2 <i>Arabidopsis thaliana</i>
Q9ZRA2 HGD_ARATH	Homogentisato 1,2-dioxigenasa <i>Arabidopsis thaliana</i>
Proteínas con menor expresión en las muestras elicidadas con respecto al control y/ o al control infectado.	
COHJG8 BSP_BOSSE	Proteasa secretora básica <i>Boswellia serrata</i>
F4JY37 RUK_ARATH	Serina/treonina-proteína quinasa RUNKEL <i>Arabidopsis thaliana</i>
P25096 P21_SOYBN	Proteína P21 <i>Glycine max</i> (familia de la Taumatina)
P46525 CS120_WHEAT	Proteína de choque de frío CS120 <i>Triticum aestivum</i>
P47920 NDKB_FLABI	Nucleósido difosfato quinasa B <i>Flaveria bidentis</i>
P81748 MIFH_TRITR	Homólogo del factor inhibidor de la migración de macrófagos <i>Trichuris trichiura</i>
Q00874 DR100_ARATH	Proteína de tolerancia/ reparación de daños en el ADN DRT100 <i>Arabidopsis thaliana</i>
Q05091 PGIP_PYRCO	Inhibidor de la Poligalacturonasa <i>Pyrus communis</i>
Q9M8S8 VTC4_ARATH	Inositol-fosfato fosfatasa <i>Arabidopsis thaliana</i>
Q9SP55 VATG_CITLI	Protón de tipo V subunidad G de ATPasa <i>Citrus limon</i>
Q9SSG3 HIPL1_ARATH	Proteína HIPL1 <i>Arabidopsis thaliana</i>
Q9XIV8 PERN1_TOBAC	Peroxidasa N1 <i>Nicotiana tabacum</i>
	Con menor expresión en las muestras elicidadas con respecto al control infectado
	Sobreexpresadas únicamente en el tratamiento con 50 µM de MeJA



**Figura IV.29.** Mapa de calor con las proteínas diferenciales halladas en las muestras de material embriónico de la línea E00 de acuerdo a la penalización Lasso que divide las muestras en 4 grupos coincidentes con los tratamientos estudiados. SCSIE, UV.



**Figura IV.30.** Clasificación PLS-DA de las muestras en 4 grupos. SCSIE, UV. El componente 1 explica el 29 % de la varianza y separó las muestras control + infección de las elicidadas con 50 MeJA + infección, el componente 2 explica el 15 % de la varianza y separó las muestras control de todas las infectadas.



De las proteínas enumeradas anteriormente se analizan aquellas relacionadas con el estrés biótico que se sobreexpresan tras la infección y en mayor medida en las muestras previamente elicitadas, por otro lado, las proteínas cuyos niveles se ven alterados (aumentados o disminuidos) tras la infección en las muestras control, pero en las muestras elicitadas registran niveles similares al control sin infectar. También se comentarán aquellas proteínas que permanecen estables en todos los tratamientos.

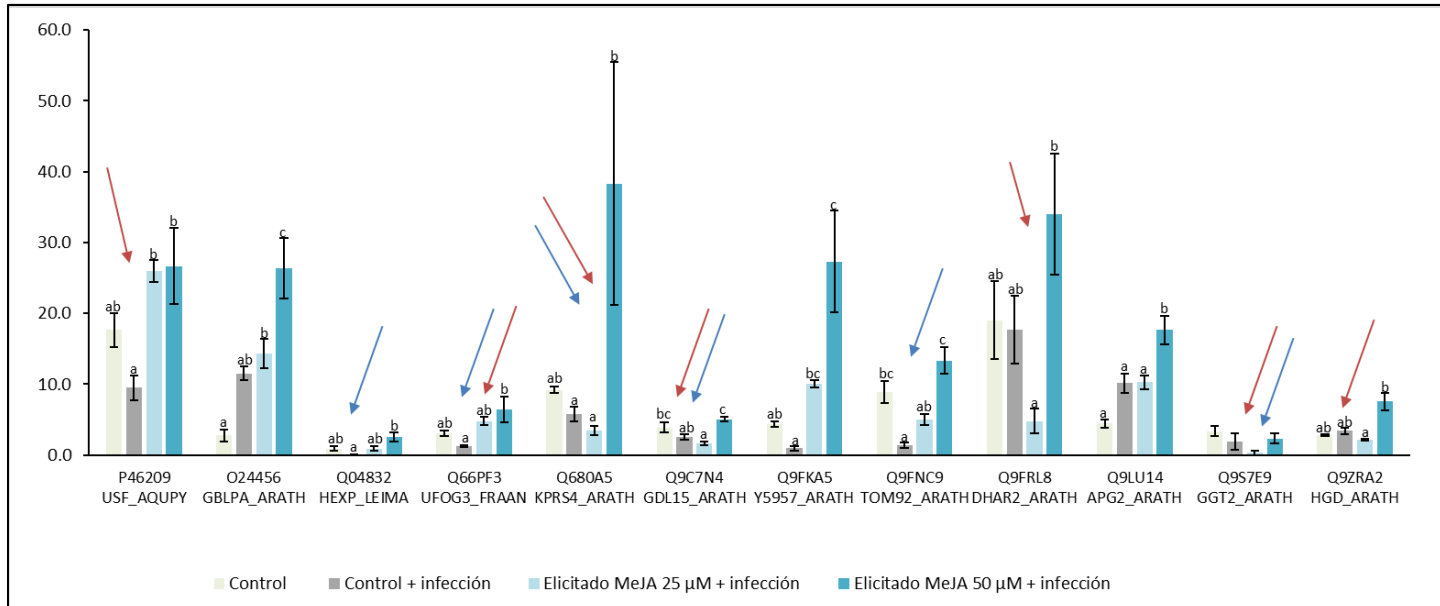
La infección con el oomiceto incrementó significativamente ( $p = 0.001$ , tabla A.29) la expresión de las proteínas O24456 GBLPA\_ARATH en las muestras elicitadas ( $1.43 \times 10^7$  y  $2.6 \times 10^7$  vs  $2.76 \times 10^6$ , para las muestras elicitadas con MeJA25 y MeJA50 vs control respectivamente, fig. IV. 31) y Q9LU14 APG2\_ARATH en las muestras elicitadas con MeJA50 ( $1.76 \times 10^7$  vs  $4.43 \times 10^6$ , muestras elicitadas vs control respectivamente, fig. IV.31).

La proteína Q9ZRA2 HGD\_ARATH, (homogentisato 1,2-dioxigenasa *Arabidopsis thaliana*), implicada en la degradación de la fenilalanina y de la tirosina, incrementó su expresión tras la infección en las muestras elicitadas con MeJA50, aunque las diferencias fueron significativas únicamente con respecto a las muestras elicitadas con MeJA25 ( $p < 0.05$ , tabla A.29, fig. IV.31), con valores de  $7.53 \times 10^6$  vs.  $2.16 \times 10^6$ , muestras elicitadas con MeJA50 vs. muestras elicitadas con MeJA25.

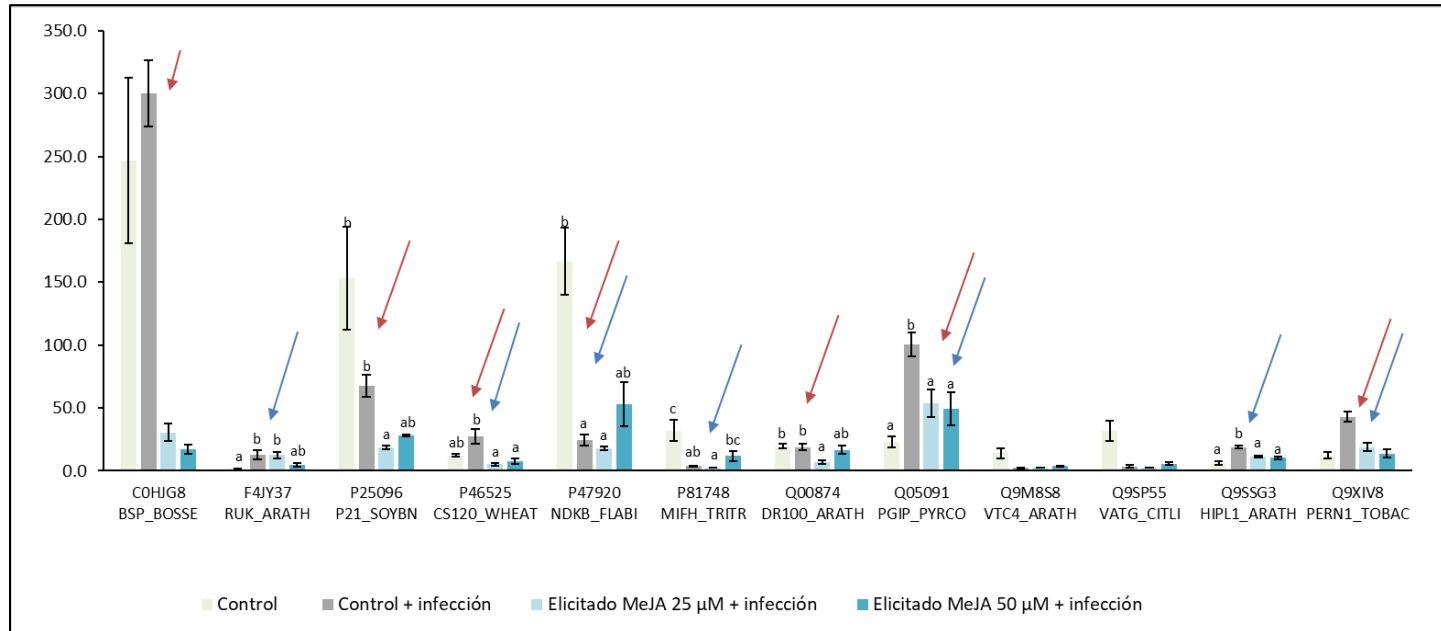
Las proteínas que incrementaron su expresión tras la infección en las muestras control y sin embargo, en las muestras elicitadas e infectadas los niveles de expresión fueron similares al control sin infectar fueron F4JY37 RUK\_ARATH (Serina/treonina-proteína quinasa RUNKEL *Arabidopsis thaliana*), P46525 CS120\_WHEAT (Proteína de choque de frío CS120 *Triticum aestivum*), Q05091 PGIP\_PYRCO (Inhibidor de la poligalacturonasa *Pyrus communis*), Q9SSG3 HIPL1\_ARATH (Proteína HIPL1 *Arabidopsis thaliana*), Q9XIV8 PERN1\_TOBAC (Peroxidasa N1 *Nicotiana tabacum*). Este aumento de la expresión en las muestras control fue significativo en el caso de la primera y la cuarta ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ , tabla A.30). Las muestras elicitadas con MeJA50 e infectadas mostraron niveles de expresión similares al control (Fig. IV.32).

La infección con *P. cinnamomi* produjo una sobreexpresión de las proteínas Q05091 PGIP\_PYRCO, que codifica un inhibidor de poligalacturonasa bacteriana, que facilita la degradación de la pared celular de las plantas en *Pyrus communis*, y Q9XIV8 PERN1\_TOBAC, que codifica una peroxidasa de tipo N1 en *Nicotiana tabacum* en las muestras control. Ambas

#### IV. Resultados



**Figura IV.31.** Proteínas sobreexpresadas (datos representados en función del área de pico) en las muestras elicidadas con uno o ambos tratamientos. Se muestran las variaciones en la expresión según los tratamientos en material embriogénico de la línea E00 con y sin infección con un extracto activo de *P. cinnamomi* al 20 % (v/v). Las muestras fueron elicidadas previamente con 25 y 50 μM de MeJA. Las proteínas señaladas con una flecha azul recuperan, en cierta medida, los niveles de expresión del control en el material elicitado e infectado; las proteínas señaladas con una flecha roja están relacionadas con la respuesta a estrés. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los datos. Las diferencias significativas se refieren a cada proteína. Datos son la media de 3 repeticiones ±ES.



**Figura IV.32.** Proteínas con menor o similar expresión (datos representados en función del área de pico) que el control en las muestras elicidadas con uno o ambos tratamientos. Se muestran las variaciones en la expresión según los tratamientos en material embriogénico de la línea E00 con y sin infección con un extracto activo de *P. cinnamomi* al 20 % (v/v). Las muestras fueron elicidadas previamente con 25 y 50 μM de MeJA. Las proteínas señaladas con una flecha azul recuperan, en cierta medida, los niveles de expresión del control en el material elicitado e infectado; las proteínas señaladas con una flecha roja están relacionadas con la respuesta a estrés. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los datos. Las diferencias significativas se refieren a cada proteína. Datos son la media de 3 repeticiones ±ES.

proteínas están parcialmente inhibidas en las muestras elicidadas (Fig. IV.32), mostrando niveles similares al control, aunque sólo en el caso de la primera se observó que esta inhibición era significativa ( $p < 0.01$ , tabla A.30), con valores de área de pico de  $5.36 \times 10^7$  y  $4.93 \times 10^7$  para las muestras elicidadas con 25 y 50 MeJA respectivamente e infectadas vs.  $1 \times 10^8$  para el control infectado (Fig. IV.32). En la segunda las diferencias no fueron significativas ( $p > 0.05$ , tabla A.30, fig. IV.32).

Otras proteínas sufrieron un decrecimiento en su expresión en las muestras control al producirse la infección, mientras que en las muestras elicidadas se observó un incremento de la expresión de las mismas: P46209 USF\_AQUY (proteína usf *Aquifex pyrophilus*), Q04832 HEXP\_LEIMA (proteína de unión al ADN HEXBP *Leishmania major*), Q9C7N4 GDL15\_ARATH (Esterasa/Lipasa GDSL At1g29670 *Arabidopsis thaliana*), Q9FKA5 Y5957\_ARATH, Q9FNC9 TOM92\_ARATH (Subunidad del receptor de importación mitocondrial TOM9-2 *Arabidopsis thaliana*), Q66PF3 UFOG3\_FRAAN (Putativo UDP-glucosa flavonoide 3-O-glucosiltransferasa 3 *Fragaria ananassa*), Q680A5 KPRS4\_ARATH (Ribosa-fosfato pirofosfoquinasa 4 *Arabidopsis thaliana*).

La infección produjo una inhibición notable, aunque no significativa, en la expresión de la proteína P46209 USF\_AQUY (proteína usf *Aquifex pyrophilus*), con actividad hidrolasa, sin embargo, en las muestras elicidadas con ambas concentraciones de MeJA e infectadas, la expresión de esta proteína fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ , tabla A.29) que las muestras control infectadas, ( $2.6 \times 10^7$  y  $2.66 \times 10^7$  vs.  $9.5 \times 10^6$ , valores de área de pico en muestras elicidadas con 25 y 50  $\mu\text{M}$  de MeJA vs. muestras control infectadas respectivamente, fig. IV.31).

En el caso de la proteína Q04832 HEXP\_LEIMA esta disminución en la expresión en las muestras control infectadas tampoco fue significativa, sin embargo, el incremento de la expresión en las muestras elicidadas e infectadas sí fue significativo ( $p < 0.05$ , tabla A.29) en el caso de las muestras tratadas con MeJA50 con respecto al control infectado y no con respecto al control (Fig. IV.31), con valores de  $2.5 \times 10^6$  vs  $5.3 \times 10^4$  respectivamente.

La infección indujo una disminución en la expresión de las proteínas Q66PF3 UFOG3\_FRAAN (putativo UDP-glucosa flavonoide 3-O-glucosiltransferasa 3 *Fragaria ananassa*), Q9C7N4 GDL15\_ARATH (esterasa/lipasa GDSL At1g29670 *Arabidopsis thaliana*) y Q9FNC9 TOM92\_ARATH (subunidad del receptor de importación mitocondrial TOM9-2 *Arabidopsis*

*thaliana*) en las muestras control, significativo en el caso de las dos últimas ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ , tabla A.29), sin embargo, en las muestras elicitadas la expresión de estas proteínas recuperó los niveles del control, en Q66PF3 UFOG3\_FRAAN en ambos tratamientos, y en Q9C7N4 GDL15\_ARATH y Q9FNC9 TOM92\_ARATH únicamente en las muestras elicitadas con MeJA50 (Fig. IV.31).

La disminución de la expresión de Q9FKA5 Y5957\_ARATH en las muestras control tras la infección no fue significativa, en las muestras elicitadas la infección provocó un incremento significativo ( $p < 0.05$ , tabla A.29) de la expresión en las muestras tratadas con MeJA25 con respecto al control infectado, pero no al control sin infectar, mientras que las muestras tratadas con MeJA50 incrementaron la expresión significativamente con respecto a ambos controles (Fig. IV.31).

En la proteína Q680A5 KPRS4\_ARATH (ribosa-fosfato pirofosfoquinasa 4 *Arabidopsis thaliana*) la infección promovió también descensos de los niveles de expresión en las muestras control y elicitadas con MeJA25, aunque no significativos (Fig. IV.31). En las muestras elicitadas con MeJA50, por el contrario, se observó una sobreexpresión de esta proteína, aunque esta variación sólo fue significativa ( $p < 0.05$ , tabla A.29) con respecto a las otras muestras infectadas, y no con respecto al control (Fig. IV.31).

Hay otras proteínas cuyos patrones de expresión no se encuentran en los grupos anteriormente citados. Entre ellas, además de la proteína C0HJG8 BSP\_BOSSE, hay otras que están directamente implicadas en la respuesta a estrés (P25096 P21\_SOYBN, Q9FRL8 DHAR2\_ARATH y Q9S7E9 GGT2\_ARATH, tabla IV.7).

La infección produjo una inhibición de la proteína P25096 P21\_SOYBN (proteína P21 *Glycine max*, de la familia de la taumatina), que fue más evidente en las muestras elicitadas e infectadas (Fig. IV.32), existiendo diferencias significativas entre las muestras elicitadas con MeJA25 e infectadas y las muestras control y control infectadas ( $p < 0.05$ , tabla A.30), con valores de área de pico que variaron entre  $15.3 \times 10^7$  y  $6.76 \times 10^7$  para las muestras control y control infectado respectivamente y  $1.86 \times 10^7$  para las muestras elicitadas con MeJA25 e infectadas (Fig. IV.32).

La expresión de la proteína Q00874 DR100\_ARATH (proteína de tolerancia/ reparación de daños en el ADN DRT100 *Arabidopsis thaliana*) se redujo significativamente en las muestras elicitadas e infectadas con MeJA25 ( $p < 0.05$ , tabla A.30, fig. IV.32), con valores de área de pico de  $6.93 \times 10^6$  vs.

## IV. Resultados

1.96×10<sup>7</sup> y 1.9×10<sup>7</sup>, muestras elicidadas con MeJA25 vs. muestras control y control infectadas respectivamente, sin embargo, ni la infección, ni la elicitación con MeJA50 y posterior infección produjeron cambios significativos en esta expresión (Fig. IV.32).

**Tabla IV.7.** Proteínas diferenciales relacionadas con la respuesta a estrés biótico halladas en las muestras de material embriogénico de la línea E00 analizadas.

COHJG8 BSP_BOSSE	Proteasa secretora básica <i>Boswellia serrata</i>
P25096 P21_SOYBN	Proteína P21 <i>Glycine max</i> (familia de la Taumatina)
P46209 USF_AQUPY	Proteína usf <i>Aquifex pyrophilus</i>
P46525 CS120_WHEAT	Proteína de choque de frío CS120 <i>Triticum aestivum</i>
P47920 NDKB_FLABI	Nucleósido difosfato quinasa B <i>Flaveria bidentis</i>
Q00874 DR100_ARATH	Proteína de tolerancia/ reparación de daños en el ADN DRT100 <i>Arabidopsis thaliana</i>
Q05091 PGPY_PYRGO	Inhibidor de la Poligalacturonasa <i>Pyrus communis</i>
Q66PF3 UFOG3_FRAAN	Putativo UDP-glucosa flavonoide 3-O-glucosiltransferasa 3 <i>Fragaria ananassa</i>
Q680A5 KPRS4_ARATH	Ribosa-fosfato pirofosfoquinasa 4 <i>Arabidopsis thaliana</i>
Q9C7N4 GDL15_ARATH	Esterasa / Lipasa GDSL At1g29670 <i>Arabidopsis thaliana</i>
Q9FRL8 DHAR2_ARATH	Glutación S-transferasa DHAR2 <i>Arabidopsis thaliana</i>
Q9S7E9 GGT2_ARATH	Glutamato-glioxilato aminotransferasa 2 <i>Arabidopsis thaliana</i>
Q9XIV8 PERN1_TOBAC	Peroxidasa N1 <i>Nicotiana tabacum</i>
Q9ZRA2 HGD_ARATH	Homogentisato 1,2-dioxigenasa <i>Arabidopsis thaliana</i>

La infección también provocó una sobreexpresión de la proteína Q9FRL8 (glutación S-transferasa DHAR2 *Arabidopsis thaliana*) en las muestras elicidadas con MeJA50. Esta proteína está implicada en la supresión de la necrosis producida por la peroxidación de las membranas tras la infección del patógeno (Fig. IV.31). Esta sobreexpresión, aunque fue muy notable, sólo fue significativa con respecto a las muestras elicidadas con MeJA25 ( $p < 0.05$ , tabla A.29, fig.IV.31).

Q9S7E9 GGT2\_ARATH (Glutamato-glioxilato aminotransferasa 2 *Arabidopsis thaliana*) y P47920 NDKB\_FLABI (Nucleósido difosfato quinasa B *Flaveria bidentis*) son también proteínas relacionadas con la respuesta a estrés. La infección no provocó cambios significativos en la expresión de la primera, ni en las muestras control ni en las elicidadas (Fig. IV.31).

Los niveles de expresión de las proteínas P47920 NDKB\_FLABI (nucleósido difosfato quinasa B *Flaveria bidentis*) y P81748 MIFH\_TRITR

(homólogo del factor inhibidor de la migración de macrófagos *Trichuris trichiura*) mostraron un decrecimiento significativo al infectar las muestras control y las elicitadas con MeJA25 ( $p < 0.05$ , tabla A.30), al contrario que los de las tratadas con MeJA50, que no resultaron significativamente diferentes al control (Fig. IV.32).

### IV.3.3. Variaciones en el perfil fenólico

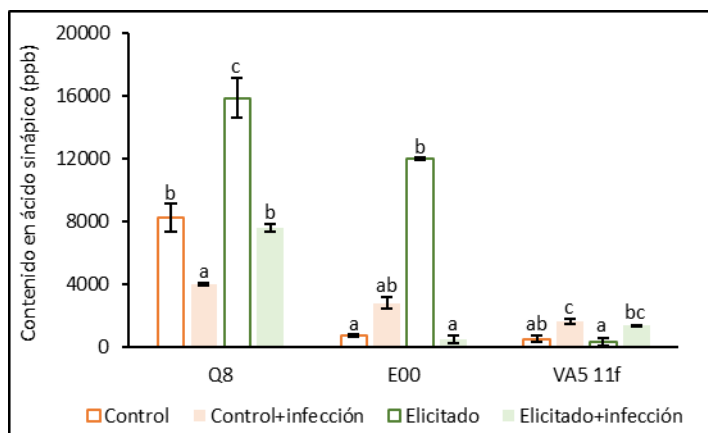
La determinación de las variaciones en el perfil fenólico se realizó en las muestras de material embriogénico procedente de las líneas embriogénicas Q8, E00 y VA5 11f elicitadas con 50  $\mu\text{M}$  de MeJA (E) y sometidas a una infección con extracto activo de *P. cinnamomi* al 20 % (v/v) (E+I), con los respectivos controles sin infectar (C) y controles sometidos a infección (C+I). Se determinó la variación en el contenido de 4 ácidos (sinápico, elágico, ferúlico y cafeico), 1 flavonol (quercetina) y 1 proantocianina, compuesto derivado de los flavonoles (prodelfinidina B3).

#### *Contenido en ácido sinápico*

El análisis de la varianza de los datos del contenido en ácido sinápico (Tabla A.31) demostró un efecto significativo de la línea ( $p < 0.001$ ), siendo menor en la línea VA5 11f que en las líneas Q8 y E00 (962.19 vs. 8920.98 y 4006.82 ppb, respectivamente). El efecto del tratamiento no fue significativo ( $p > 0.05$ ) pero sí su interacción con la línea ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , tablas A.32, A.33 y A.34). Así, en la línea Q8 la elicitación provocó un incremento significativo en la producción de ácido sinápico (15867.11 vs. 8244.11 ppb, muestras elicitadas E y muestras control C respectivamente, fig. IV.33) y la infección indujo una disminución significativa de este parámetro (7599.11 y 3973.61 y vs. 15867.11 y 8244.11 ppb, muestras E+I y C+I vs. muestras E y C respectivamente, fig. IV.33). El contenido en ácido sinápico en las muestras elicitadas e infectadas alcanzó valores similares al control (7599.11 y 8244.11 respectivamente, fig. IV.33).

En la línea E00 se observó un incremento significativo en la producción de ácido sinápico en las muestras elicitadas E con respecto a las muestras control C (12007.11 vs. 738.7 ppb respectivamente fig. IV.33) y una reducción significativa del contenido en este compuesto en las muestras E+I con respecto a las muestras E (474.40 vs. 12007.11 ppb respectivamente, fig. IV.33). Es decir, la elicitación aumentó significativamente los niveles de ácido sinápico al igual que en la línea Q8, pero la infección produjo una disminución significativa de este compuesto únicamente en las muestras que habían sido

previamente elicitadas; en las muestras control, la infección produjo un ligero incremento no significativo del de ácido sináptico (Fig. IV.33).



**Figura IV.33.** Medida del contenido en ácido sináptico (ppb) en el material embriogénico de las líneas Q8, E00 y VA5 11f con y sin infección con un extracto activo de *P. cinnamomi* al 20 % (v/v). Las muestras fueron elicitadas previamente con 50  $\mu$ M de MeJA. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los datos. Las diferencias significativas se refieren a cada línea. Datos son la media de 3 repeticiones  $\pm$ ES.

En la línea VA5 11f la elicitación no produjo diferencias remarcables en el contenido de este compuesto, viéndose una ligera disminución en los valores de las muestras elicitadas con respecto a las muestras control (336.6 vs. 503.5 ppb respectivamente, fig. IV.33). Por el contrario, la infección incrementó significativamente el contenido de este compuesto (1646.11 vs. 503.48 ppb, muestras C+I y C respectivamente, 1362.61 vs. 336.56 ppb, muestras E+I y E respectivamente, fig. IV.33).

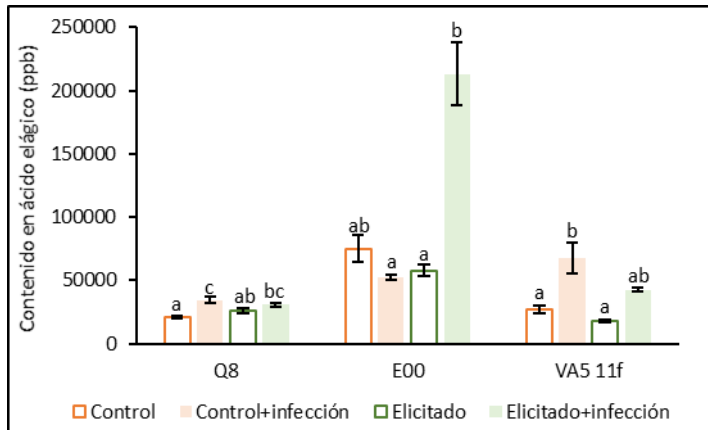
#### Contenido en ácido elálgico

El contenido en ácido elálgico (ppb) dependió de la línea embriogénica ( $p < 0.001$ , tabla A.31) siendo significativamente superior en la línea E00 que en las líneas Q8 y VA5 11f (99523.05 vs. 27968.05 y 38753.05 ppb, respectivamente, fig. IV.34). Se observó además una interacción significativa entre la línea y el tratamiento ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , tablas A.32, A.33, A.34).

En la línea Q8 la elicitación no provocó cambios significativos en el contenido de ácido elálgico (25803.05 y 20896.38 muestras elicitadas y muestras control respectivamente, fig. IV.34), aunque las muestras elicitadas



mostraron valores significativamente inferiores a las muestras control infectadas C+I (25803.05 vs. 34436.38 ppb respectivamente, fig. IV.34). La infección provocó un incremento del contenido de este ácido si se comparan las muestras infectadas con el control (34436.38 y 30736.38 vs. 20896.38 ppb, muestras C+I y E+I vs. C respectivamente, fig. IV.34).



**Figura IV.34.** Medida del contenido en ácido elálgico (ppb) en el material embriogénico de las líneas Q8, E00 y VA5 11f con y sin infección con un extracto activo de *P. cinnamomi* al 20 % (v/v). Las muestras fueron elicitadas previamente con 50  $\mu$ M de MeJA. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los datos. Las diferencias significativas se refieren a cada línea. Datos son la media de 3 repeticiones  $\pm$ ES.

En la línea E00 la elicitación no indujo cambios significativos en los niveles de ácido elálgico (Fig. IV.34), mientras que la infección provocó incrementos notables en estos niveles en las muestras elicitadas, significativo si se compara con las muestras elicitadas no infectadas E y con las muestras C+I (2131830.50 vs. 57788.05 y 52178.05 ppb, respectivamente, fig. IV.34) y no significativo si se compara con el control (Fig. IV.34).

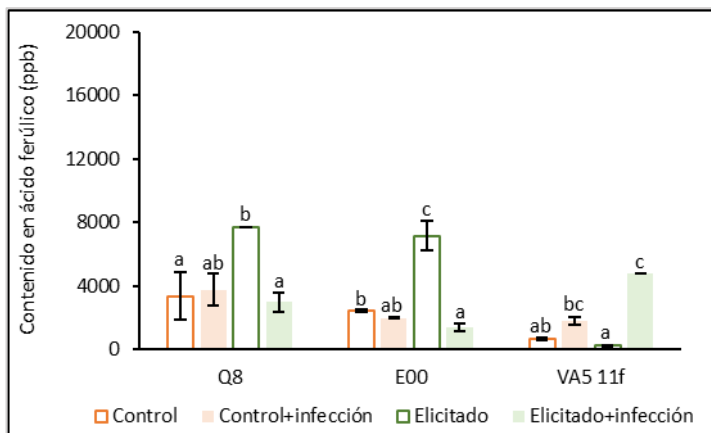
En la línea VA5 11f, la elicitación no indujo variaciones en el contenido en ácido elálgico con respecto al control (Fig. IV.34). La infección promovió un aumento significativo del contenido en ácido elálgico únicamente en las muestras control (67343.05 vs. 26676.38 ppb, muestras C+I vs. C respectivamente, fig. IV.34); estas muestras C+I también tuvieron un contenido significativamente superior a las muestras elicitadas no infectadas (67343.05 vs. 18233.05 ppb, respectivamente, fig. IV.34).

*Contenido en ácido ferúlico*

El análisis de la varianza (Kruskal-Wallis) del contenido en ácido ferúlico (Tabla A.31) demostró un efecto significativo de la línea ( $p < 0.01$ ). La línea Q8 mostró valores de este compuesto significativamente superiores a la línea VA5 11f (4447.01 vs. 1855.50 ppb, respectivamente). También se observó un efecto significativo de la interacción entre la línea y los tratamientos (Infección y/o elicitación) ( $p < 0.05$ , tablas A.32, A.33, A.34).

En la línea Q8 la elicitación provocó un aumento significativo de los niveles de este compuesto (7687.55 vs. 3350.05 ppb, muestras E vs. C respectivamente, fig. IV.35). Por el contrario, la infección provocó un decrecimiento significativo en los valores de este ácido únicamente en las muestras elicidadas (2994.72 vs. 7685.55 ppb, muestras E+I vs. E respectivamente, fig. IV.35).

En la línea E00 la elicitación provocó un incremento significativo de ácido ferúlico (7156.05 vs. 2414.55 ppb, muestras E y C respectivamente, fig. IV.35). La infección indujo un decrecimiento significativo del contenido de este compuesto en las muestras elicidadas, pero no en las muestras control (1386.35 vs. 7156.05, 1973.55 vs. 2414.55 ppb, muestras E+I vs. E, muestras C+I vs. C respectivamente, fig. IV.35).



**Figura IV.35.** Medida del contenido en ácido ferúlico (ppb) en el material embriogénico de las líneas Q8, E00 y VA5 11f con y sin infección con un extracto activo de *P. cinnamomi* al 20 % (v/v). Las muestras fueron elicidadas previamente con 50  $\mu$ M de MeJA. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los datos. Las diferencias significativas se refieren a cada línea. Datos son la media de 3 repeticiones  $\pm$ ES.

En la línea VA5 11f la elicitación provocó una disminución no significativa de los niveles de ácido ferúlico (229.15 vs. 631.85 ppb, muestras elicitadas vs. control respectivamente, fig. IV.35). La infección promovió un incremento de los niveles de este ácido, aunque sólo fue significativo en las muestras elicitadas previamente (4776.05 vs. 229.15 ppb, muestras E+I vs. E respectivamente, fig. IV.35). Las muestras elicitadas también tuvieron contenidos significativamente inferiores a las muestras control elicitadas C+I como se observa en la figura IV.35 (229.15 vs. 1785.05 ppb respectivamente).

#### *Contenido en ácido cafeico*

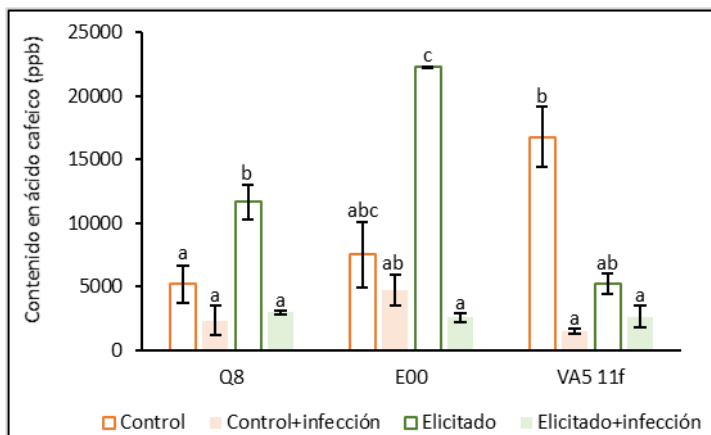
El análisis de la varianza de Kruskal-Wallis del contenido en ácido cafeico (Tabla A.31) demostró un efecto significativo del tratamiento ( $p < 0.001$ ), pero no de la línea. Se observó una disminución significativa del contenido de este ácido en las muestras infectadas con respecto a las no infectadas (2836.11 y 2709.84 vs. 9810.95 y 13045.57 ppb, muestras C+I y E+I vs. C y E respectivamente). Las interacciones de estos dos factores se analizaron mediante un análisis para cada línea.

En la línea Q8 se observó un incremento significativo ( $p < 0.01$ , tabla A.32) del contenido de ácido cafeico en las muestras elicitadas (E) con respecto a las muestras control (11661.95 vs. 5193.95 ppb respectivamente, fig. IV.36), este valor fue también significativamente superior al del resto de las muestras (Fig. IV.36). Las muestras infectadas disminuyeron su contenido de este ácido, pero sólo significativamente en aquellas que habían sido previamente elicitadas (2967.62 vs. 11661.95 ppb, muestras E+I vs. E respectivamente, fig. IV.36).

En la línea E00 se produjo un incremento, no significativo, en el contenido de ácido cafeico en las muestras E con respecto a las muestras C, aunque sí fue significativo ( $p < 0.05$ , tabla A.33) al compararlo con las muestras C+I (22265.62 vs. 4719.12 ppb respectivamente, fig. IV.36). La infección provocó un decrecimiento significativo en los niveles de ácido cafeico únicamente en las muestras previamente elicitadas (2547.62 vs. 22265.62 ppb muestras E+I vs. E respectivamente, fig. IV.36).

En la línea VA5 11f la elicitación provocó un descenso de ácido cafeico, puesto que el contenido de este compuesto en las muestras control era muy elevado, aunque los análisis mostraron que el descenso no era significativo (Fig. IV.36). La infección indujo una disminución significativa ( $p < 0.05$ , tabla A.34) de los valores de ácido cafeico en las muestras control (1459.12 vs. 16745.62 ppb, muestras C+I vs. C respectivamente, fig. IV.36), mientras que

no fue significativa en las muestras previamente elicidadas (2614.29 vs. 5209.12 ppb, muestras E+I vs. E respectivamente, fig. IV.36).



**Figura IV.36.** Medida del contenido en ácido cafeico (ppb) en el material embriogénico de las líneas Q8, E00 y VA5 11f con y sin infección con un extracto activo de *P. cinnamomi* al 20 % (v/v). Las muestras fueron elicidadas previamente con 50  $\mu$ M de MeJA. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los datos. Las diferencias significativas se refieren a cada línea. Datos son la media de 3 repeticiones  $\pm$ ES.

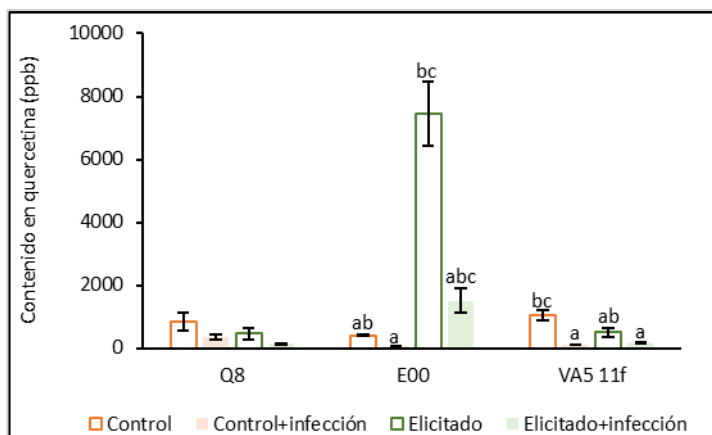
### Contenido en quercetina

El análisis de la varianza (Kruskal-Wallis) del contenido en quercetina (Tabla A.31) demostró un efecto significativo del tratamiento ( $p < 0.001$ ), observándose que la elicitación aumentaba el contenido de este compuesto (2800.24 vs. 752.65 ppb, media de las muestras E y C respectivamente). La infección provocó una disminución significativa del contenido en quercetina en las muestras (598.77 vs. 2800.24 y 164.73 vs. 752.65 ppb, media de las muestras E+I y E, C+I y C respectivamente). Las interacciones de la línea y el tratamiento se analizaron posteriormente.

En la línea Q8 el tratamiento (infección/elicitación) no alteró significativamente el contenido en quercetina ( $p > 0.05$ , tabla A.32, fig. IV.37).

En la línea E00 la elicitación aumentó de manera significativa ( $p < 0.05$ , tabla A.33) el contenido de este compuesto, únicamente con respecto a las muestras control infectadas (7448.27 vs. 45.51 ppb muestras E vs. C+I respectivamente, fig. IV.37), el incremento fue notable, aunque no significativo comparando con las muestras control (Fig. IV.37). La infección

provocó una disminución no significativa del contenido en quercetina en las muestras (Fig. IV.37).



**Figura IV.37.** Medida del contenido quercetina (ppb) en el material embriogénico de las líneas Q8, E00 y VA5 11f con y sin infección con un extracto activo de *P. cinnamomi* al 20 % (v/v). Las muestras fueron elicidadas previamente con 50  $\mu$ M de MeJA. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los datos. Las diferencias significativas se refieren a cada línea. Datos son la media de 3 repeticiones  $\pm$ ES.

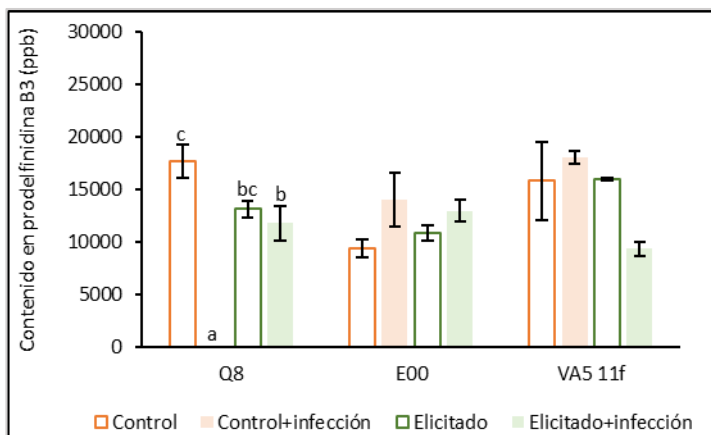
En las muestras de la línea VA5 11f la elicitación no provocó cambios significativos en el contenido de este compuesto (Fig. IV.37), mientras que la infección provocó una disminución del contenido en quercetina únicamente significativo ( $p < 0.05$ , tabla A.34) en las muestras control (104.66 vs. 1042.38 ppb, muestras C+I y C respectivamente, fig. IV.37). Las muestras elicidadas e infectadas también presentaban niveles de quercetina significativamente inferiores a los del control (164.17 vs. 1042.38 ppb respectivamente), pero no a los de las muestras elicidadas E (Fig. IV.37).

#### *Contenido en prodelfinidina B*

El contenido en prodelfinidina B no dependió de la línea ni del tratamiento de acuerdo con Kruskal-Wallis ( $p > 0.05$ , tabla A.31). Posteriormente se llevaron a cabo análisis para cada línea con el objetivo de comprobar si las interacciones de estos dos factores tenían un efecto significativo en alguna de las líneas.

En la línea Q8 la elicitación provocó una disminución no significativa ( $p > 0.05$ ) de prodelfinidina B (13134.60 vs. 17745.93 ppb, muestras elicidadas E vs. control C respectivamente, fig. IV.38). La infección produjo una

disminución no significativa ( $p > 0.05$ ) del contenido del compuesto en las muestras elicidadas (11776.60 vs. 13134.60 ppb, muestras elicidadas e infectadas E+I vs. muestras elicidadas E respectivamente). En las muestras control infectadas C+I no se detectó este compuesto, por lo que se observaron diferencias significativas entre este tratamiento y los demás ( $p < 0.001$ , tabla A.32, fig. IV.38). Las muestras E+I presentaron un contenido en prodelfinidina B3 significativamente inferior a las muestras control C (11776.60 vs. 17745.93 ppb respectivamente, fig. IV.38).



**Figura IV.38.** Medida del contenido prodelfinidina B3 (ppb) en el material embriogénico de las líneas Q8, E00 y VA5 11f con y sin infección con un extracto activo de *P. cinnamomi* al 20 % (v/v). Las muestras fueron elicidadas previamente con 50  $\mu$ M de MeJA. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los datos. Las diferencias significativas se refieren a cada línea. Datos son la media de 3 repeticiones  $\pm$ ES.

En la línea E00 el tratamiento (elicitación/infección) no varió significativamente el contenido en prodelfinidina B3 en las muestras ( $p > 0.05$ , tabla A.33, fig. IV.38).

El contenido de prodelfinidina B3 de la línea VA5 11f, no varió entre los distintos tratamientos ( $p > 0.05$ , tabla A.34). Las muestras elicidadas registraron contenidos de este compuesto similares a los de las muestras control. Sin embargo, se observó un contenido notablemente inferior de este compuesto en las muestras elicidadas e infectadas E+I con respecto a las muestras E y a las muestras C+I (Fig. IV.38).

#### IV.3.4. Variaciones en el perfil hormonal

Se analizó el contenido de tres de las hormonas con mayor implicación en la respuesta de las plantas a estrés; ácido abscísico (ABA), jasmonato (JA) y salicilato (SA), en las tres líneas embriogénicas Q8, E00 y VA5 11f elicitadas con 50  $\mu$ M de MeJA (E) y sometidas a una infección con extracto activo de *P. cinnamomi* al 20 % (v/v) (E+I), con los respectivos controles sin infectar (C) y controles sometidos a infección (C+I). Los resultados se muestran en la figura IV.39.

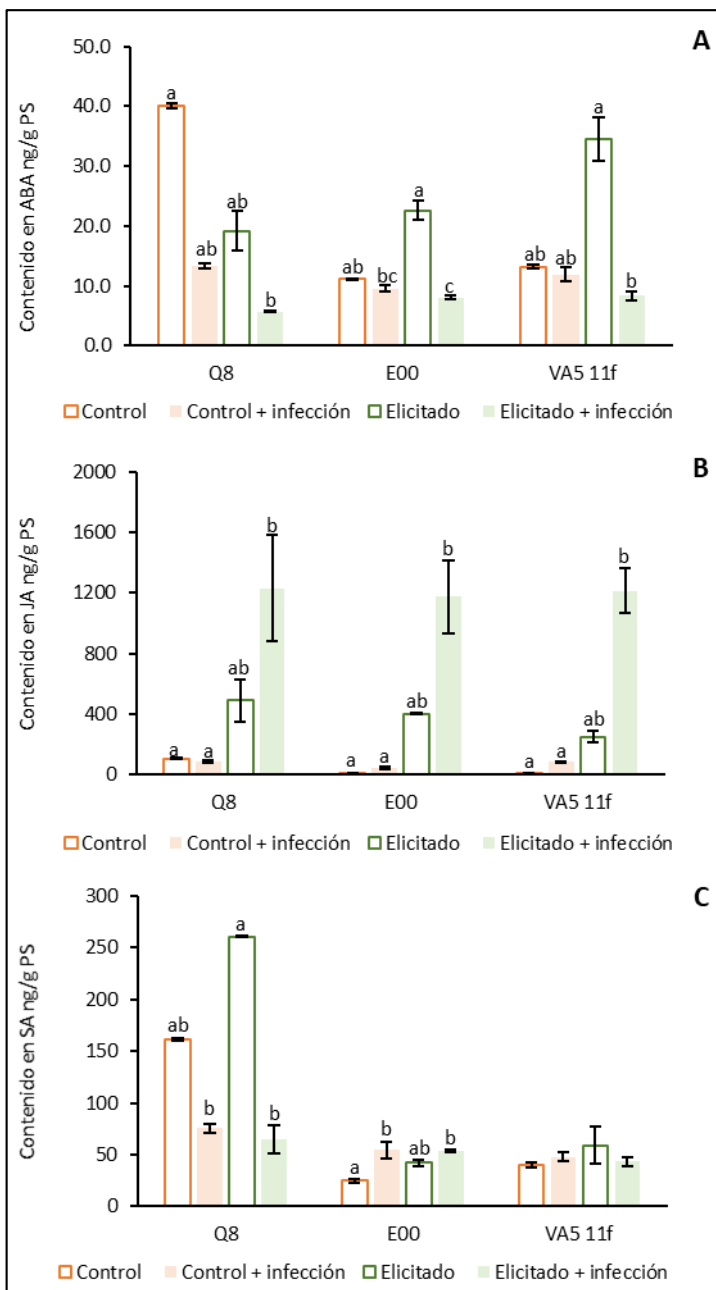
##### *Contenido en ABA*

El análisis Kruskal-Wallis del contenido en ABA (Tabla A.35) demostró un efecto significativo del tratamiento ( $p < 0.001$ ) y no significativo de la línea ( $p > 0.05$ ). Se observó que la elicitación no indujo cambios en el contenido de esta hormona (25.46 y 21.50 ng/g PS, muestras elicitadas (E) y muestras control (C) respectivamente), mientras que la infección provocó un descenso significativo en el contenido de ABA, siendo más evidente en las muestras previamente elicitadas (7.39 y 11.62 vs. 25.46 y 21.50 ng/g PS, muestras E+I y C+I vs. muestras E y C respectivamente).

Posteriormente se analizó cada línea por separado para determinar la interacción entre la línea y el tratamiento. En la línea Q8, la elicitación indujo un decrecimiento no significativo en ABA, mientras que la infección también disminuyó el contenido de esta hormona, pero sólo significativamente ( $p < 0.05$ , tabla A.36) en las muestras previamente elicitadas 5.70 vs. 40.10 ng/g PS, muestras E+I vs. C, fig. IV.39A).

En la línea E00, sin embargo, la elicitación provocó un incremento no significativo del contenido en ABA ( $p > 0.05$ ), pero la infección, al igual que en la línea Q8, provocó un descenso en el contenido de esta hormona, sólo significativo ( $p < 0.05$ , tabla A.37) en las muestras previamente elicitadas con respecto al control (8.10 vs. 11.15 ng/g PS, muestras E+I vs. C respectivamente, fig. IV.39A), y en todas las muestras infectadas con respecto a las elicitadas (9.53 y 8.10 vs. 22.60 ng/g PS, muestras C+I y E+I vs. E respectivamente, fig. IV.39A).

En la línea VA5 11f, como en la E00, la elicitación aumentó no significativamente los niveles de ABA, mientras que la infección indujo un descenso de estos niveles sólo significativo ( $p < 0.05$ , tabla A.38) en las muestras E+I con respecto a las muestras E (8.37 vs. 34.55 ng/g PS, respectivamente, fig. IV.39A).



**Figura IV.39.** Medida del contenido en ABA (A), JA (B) y SA (C) (ng/ g PS) en el material embriogénico de las líneas Q8, E00 y VA5 11f con y sin infección con un extracto activo de *P. cinnamomi* al 20 % (v/v). Las muestras fueron elicidadas previamente con 50  $\mu$ M de MeJA. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los datos. Las diferencias significativas se refieren a cada línea. Datos son la media de 3 repeticiones  $\pm$ ES.



La elicitación provocó un aumento en los niveles de ABA en todas las líneas excepto en la Q8, en la que el control ya presentaba unos niveles de ABA cuatro veces superiores a los de las otras líneas.

La infección con el oomiceto en las muestras control y elicitadas disminuyó el contenido de la hormona en todas las líneas.

#### *Contenido en JA*

El ANOVA realizado para determinar el efecto de la línea y el tratamiento (infección y/o elicitación) sobre el contenido de JA en las muestras (Tabla A.35) mostró que la línea no influía significativamente en este parámetro ( $p > 0.05$ ), pero sí el tratamiento ( $p < 0.001$ ). La elicitación aumentó significativamente los niveles de JA en las muestras (379.49 vs. 41.22 ng/g PS, media de las tres líneas para las muestras elicitadas E vs. control C, respectivamente). La infección incrementó significativamente el contenido en JA, pero sólo en las muestras previamente elicitadas con respecto a los demás tratamientos (1207.19 vs. 379.49, 70.08 y 41.22 muestras E+I vs. E, C y C+I ng/g PS respectivamente).

El estudio de la interacción entre los factores línea y tratamiento mostró que en todas las líneas (Q8, E00 y VA5 11f) el contenido en JA incrementó, no significativamente, en las muestras elicitadas E con respecto a los controles infectados o no (Fig. IV.39B). La posterior infección de las líneas elicitadas incrementó significativamente ( $p = 0.01$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ , tablas A.36, A.37 y A.38) el contenido en JA con respecto al control y al control infectado (1231.22 vs. 106.40 y 85.07 ng/g PS, respectivamente para la línea Q8, 1175.72 vs. 8.55 y 43.73 ng/g PS, respectivamente, para la línea E00 y 1214.64 vs. 8.70 y 81.45 ng/g PS, respectivamente para la línea VA5 11f, fig. IV.39B).

#### *Contenido en SA*

El contenido en SA dependió de la línea embriogénica ( $p < 0.001$ , tabla A.35) observándose un mayor contenido en las muestras de la línea Q8 (140.72 ng/g PS de media entre todos los tratamientos) con respecto a las muestras de las líneas E00 y VA5 11f (43.68 y 47.77 ng/g PS de media entre los tratamientos respectivamente). El efecto del tratamiento (elicitación/infección) no fue significativo para el contenido de esta hormona ( $p > 0.05$ ). Se realizaron nuevos análisis para tratar de determinar el efecto de la interacción entre línea y tratamiento (Tablas A.36, A.37 y A.38).

En la línea Q8 la elicitación no produjo diferencias significativas en la producción de esta hormona, aunque el contenido de SA en las muestras elicitadas fue superior a las muestras control (Fig. IV.39C). La infección produjo un descenso del contenido en SA que fue significativo ( $p < 0.05$ ) en las muestras elicitadas (65.40 vs. 260.85 ng/g PS, muestras E+I vs. E respectivamente, fig. IV.39C) y no significativo, aunque notable, en las muestras control (75.43 vs. 161.20 ng/ g PS, muestras C+I vs. C respectivamente, fig. IV.39C). Las muestras C+I mostraron un contenido significativamente menor ( $p < 0.05$ ) a las muestras E (75.43 vs. 260.85 ng/ g PS, respectivamente, fig. IV.39C).

En la línea E00 la elicitación no provocó cambios en el contenido de SA en las muestras (Fig. IV.39C). La infección produjo un aumento significativo ( $p < 0.01$ ) en el contenido de esta hormona en las muestras control (54.67 vs. 24.73 ng/g PS, muestras C+I vs. C respectivamente, fig. IV.39C). En las muestras elicitadas e infectadas el aumento no fue significativo con respecto a las muestras elicitadas, pero sí con respecto al control (53.27 vs. 24.73 respectivamente, fig. IV.39C).

En la línea VA5 11f el tratamiento no afectó significativamente al contenido de esta hormona, aunque se observó un ligero incremento del mismo en las muestras elicitadas ( $p > 0.05$ , tabla A.38, fig. IV.39C).

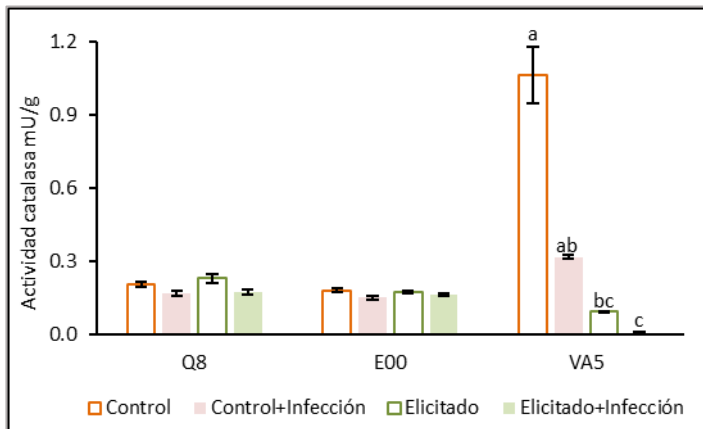
### IV.3.5. Actividad ROS

Se determinó la actividad enzimática de la catalasa (CAT EC 1.11.1.6), peroxidasa (POX EC 1.11.1.7) y el glutatión total (GSH) en las muestras de las tres líneas embriogénicas Q8, E00 y VA5 11f elicitadas con 50  $\mu$ M de MeJA (E) y sometidas a una infección con extracto activo de *P. cinnamomi* al 20 % (v/v) (E+I), con los respectivos controles sin infectar (C) y controles sometidos a infección (C+I).

#### IV.3.5.1. Catalasa

Los resultados de la determinación de la actividad de la enzima catalasa se exponen en la figura IV.40. El análisis de la varianza de Kruskal-Wallis (Tabla A.39) mostró un efecto significativo del tratamiento ( $p < 0.05$ ), existiendo una menor actividad enzimática en las muestras elicitadas (E) y elicitadas e infectadas (E+I) con respecto al control (0.164 y 0.114 vs. 0.483 mU/g de muestra respectivamente, valores media de las tres líneas para cada tratamiento mencionado).

En las líneas Q8 y E00 no se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ( $p > 0.05$ , tablas A.40 y A.41, fig. IV.40), mientras que en la línea VA5 11f sí hubo variaciones significativas entre los mismos ( $p < 0.05$ , tabla A.42). Cabe destacar que las muestras control tenían valores significativamente superiores de esta actividad con respecto a las muestras elicitadas y a las muestras elicitadas e infectadas (1.062 vs. 0.093 y 0.006 mU/g de muestra respectivamente, fig. IV.40), y notablemente superiores, aunque no significativamente, al control infectado (Fig. IV.40). Las muestras elicitadas e infectadas no mostraron diferencias significativas con respecto a las elicitadas, pero sí con respecto a los controles infectados o no (Fig. IV.40).



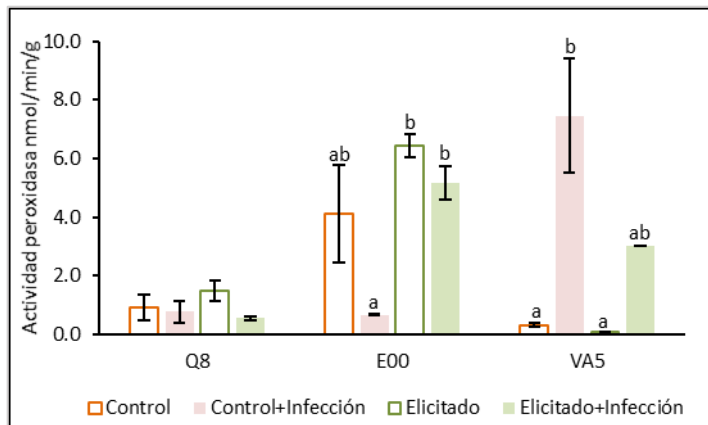
**Figura IV.40.** Medida de la actividad de la enzima catalasa (mU/g) en las muestras de las líneas embriogénicas Q8, E00 y VA5 11f con los tratamientos control, control + infección, elicitación y elicitación +infección con un extracto activo de *P. cinnamomi* al 20 % (v/v). Las muestras fueron elicitadas previamente con 50  $\mu$ M de MeJA. Datos son la media de 3 repeticiones  $\pm$ ES. Letras diferentes indican diferencias significativas entre medias. Las diferencias se refieren a cada línea por separado.

#### IV.3.5.2. Peroxidasa

La figura IV.41 muestra los resultados obtenidos en los ensayos de determinación de la actividad peroxidasa. El análisis factorial de Kruskal-Wallis (Tabla A.39) mostró un efecto significativo de la línea ( $p < 0.05$ ) sobre este parámetro, observándose una actividad enzimática significativamente superior en la línea E00 que en la línea Q8 (3.741 vs. 0.932 nmol/min/g respectivamente). La influencia de las interacciones entre línea y tratamiento se estudió posteriormente.

## IV. Resultados

En la línea Q8 el tratamiento no afectó a la actividad enzimática peroxidasa ( $p > 0.05$ , tabla A.40, fig. IV.41) observándose valores similares de dicha actividad en las muestras de todos los tratamientos.



**Figura IV.41.** Medida de la actividad de la enzima peroxidasa (nmol/min/g) en las muestras de las líneas embriogénicas Q8, E00 y VA5 11f con los tratamientos control, control + infección, elicitación y elicitación +infección con un extracto activo de *P. cinnamomi* al 20 % (v/v). Las muestras fueron elicidadas previamente con 50  $\mu$ M de MeJA. Datos son la media de 3 repeticiones  $\pm$ ES. Letras diferentes indican diferencias significativas entre medias. Las diferencias se refieren a cada línea por separado.

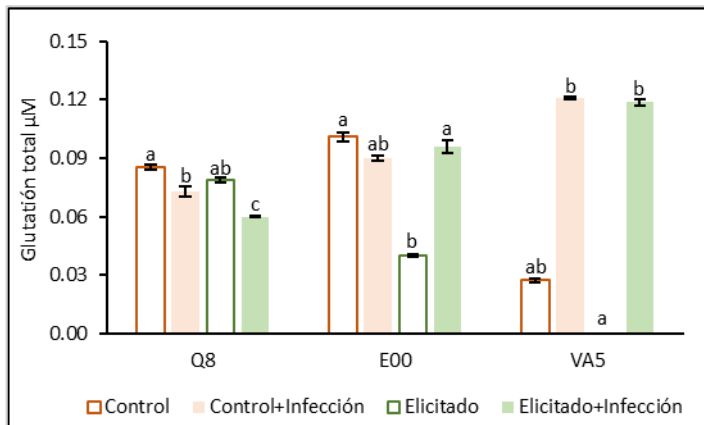
En la línea E00 el tratamiento sí produjo diferencias significativas en la actividad enzimática peroxidasa ( $p < 0.05$ , A.41), la elicitación no varió significativamente la actividad en las muestras (6.441 vs. 4.116 nmol/min/g muestras elicidadas E vs. control C respectivamente, fig. IV.41). La infección provocó un decrecimiento de la actividad peroxidasa notable, aunque no significativo, en las muestras control (0.668 v. 4.116 nmol/min/g, muestras C+I vs. C respectivamente) y un aumento no significativo de esta actividad en las muestras elicidadas (5.165 vs. 4.116 nmol/min/g, muestras E+I vs. C respectivamente, fig. IV.41). Las muestras E+I y E aumentaron la actividad POX significativamente sólo comparando con las muestras control infectadas C+I (5.165 y 6.441 vs. 0.668 nmol/min/g respectivamente, fig. IV.41).

En línea VA5 11f (Tabla A.42) la elicitación no influyó en la actividad peroxidasa y la infección provocó un incremento significativo de la actividad enzimática ( $p < 0.05$ ) en las muestras control (7.449 vs. 0.318 nmol/min/g, muestras control infectadas C+I vs. muestras control C respectivamente, fig. IV.41). Las muestras C+I también mostraron una actividad enzimática

significativamente superior a las muestras elicitadas E (Fig. IV.41). En las muestras elicitadas, la infección también provocó un aumento notable en la actividad enzimática, pero éste no fue significativo (3.007 vs. 0.064 nmol/min/g, muestras E+I vs. muestras E respectivamente, fig. IV.41).

#### IV.3.5.3. Glutación

Los resultados obtenidos en la determinación del glutatión total se observan en la figura IV.42 El análisis factorial (Tabla A.39) mostró un efecto significativo del tratamiento ( $p < 0.01$ ), detectándose contenidos menores en las muestras elicitadas E con respecto a las muestras control infectadas C+I y elicitadas e infectadas E+I (0.0395 vs. 0.0944 y 0.0915  $\mu\text{M}$  respectivamente). Para ver la influencia de las interacciones entre línea y tratamiento se realizaron análisis para cada línea (Tablas A.40, A.41, A.42).



**Figura IV.42.** Medida del contenido de glutatión total GSH ( $\mu\text{M}$ ) en las muestras de las líneas embriogénicas Q8, E00 y VA5 11f con los tratamientos control, control + infección, elicitación y elicitación +infección con un extracto activo de *P. cinnamomi* al 20 % (v/v). Las muestras fueron elicitadas previamente con 50  $\mu\text{M}$  de MeJA. Datos son la media de 3 repeticiones  $\pm$ ES. Letras diferentes indican diferencias significativas entre medias. Las diferencias se refieren a cada línea por separado.

En la línea Q8 la elicitación no produjo cambios significativos en la producción de GSH en las muestras, observándose valores similares en las muestras elicitadas E con respecto a las muestras control C (Fig. IV.42). La infección provocó una disminución significativa ( $p < 0.001$ ) del contenido de glutatión tanto en las muestras control (0.0727 vs. 0.0854  $\mu\text{M}$ , muestras control infectadas C+I vs. muestras control C respectivamente, fig. IV.42), como en las muestras elicitadas (0.0599 vs. 0.0787  $\mu\text{M}$ , muestras elicitadas e

infectadas E+I vs. muestras elicidadas E respectivamente, fig. IV.42). En las muestras E+I el contenido en este compuesto también fue significativamente menor que en las muestras control (Fig. IV.42).

En la línea E00 la elicitación provocó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) del contenido de glutatión (0.0399 vs. 0.1008  $\mu\text{M}$ , muestras elicidadas E vs. control C respectivamente, fig. IV.42). La infección influyó en las muestras elicidadas ( $p < 0.05$ ), de manera que las muestras E+I reflejaron mayor producción de GSH que las muestras elicidadas sin infectar E (0.0958 vs. 0.0399  $\mu\text{M}$  respectivamente, fig. IV.42), sin embargo, en las muestras control C y las muestras control infectadas C+I el contenido fue similar, siendo también ambos valores similares a las muestras E+I (Fig. IV.42).

En la línea VA5 11f el tratamiento influyó significativamente ( $p < 0.05$ ). En las muestras elicidadas no se detectó este compuesto, por tanto estas muestras tuvieron diferencias con las muestras C+I (control infectadas) y E+I (elicidadas e infectadas) con valores de GSH de 0.1207 y 0.1186  $\mu\text{M}$  respectivamente (Fig. IV.42). La infección produjo un aumento no significativo de la producción de glutatión, las muestras infectadas tuvieron un contenido notablemente mayor que las muestras control (Fig. IV.42).

## V. DISCUSIÓN

---





## V. DISCUSIÓN

Este trabajo se ha llevado a cabo con el objetivo general de desarrollar herramientas biotecnológicas para generar genotipos de encina con mayor tolerancia al oomiceto *Phytophthora* spp., que como se ha especificado anteriormente, es el principal agente causante del “síndrome de la seca”, responsable del decaimiento de la especie (Braisier, 1996; Moreira y Martins, 2005; Torres-Álvarez et al., 2006; Camilo-Alves et al., 2013; Corcobado et al., 2013).

Para la consecución de este objetivo se han utilizado dos estrategias. En primer lugar se abordó la clonación de genotipos tolerantes de manera natural al patógeno (genotipos escape). Posteriormente se trató de optimizar un protocolo de elicitación aplicable a embriones somáticos de encina para inducir memoria epigenética “priming”, con el fin de obtener plantas que manifestaran una mayor tolerancia al patógeno. En la última parte del trabajo se llevó a cabo la búsqueda de marcadores precoces de respuesta a estrés para evaluar la eficacia de los tratamientos elicitores, de manera que se pueda obtener cierta información relacionada con su tolerancia a *Phytophthora* spp. antes de que los embriones somáticos se desarrollen en plantas y puedan ser testados en campo.

### V.1. Clonación de genotipos escape

Se sabe de la capacidad que tienen ciertos pies de encina para sobrevivir en focos severos de seca, debido a la variabilidad genética de la especie, existiendo individuos con cierta tolerancia al patógeno (Tapias et al., 2006; Navarro Cerrillo et al., 2009; Cuenca et al., 2017). esta variabilidad puede ser aprovechada para la mejora y por ello, se seleccionaron pies aparentemente sanos situados en zonas donde se observaron otros individuos con sintomatología propia de “la seca”, y se determinó la presencia del patógeno en los suelos alrededor de los individuos seleccionados mediante aislamiento clásico. Posteriormente, se comprobó la existencia del patógeno en las zonas muestreadas mediante la técnica de pirosecuenciación (Mora-Sala et al., 2019). Los árboles sanos en los que se detectó el oomiceto *Phytophthora* sp. en el suelo, se consideraron genotipos escape. De los 33 genotipos muestreados únicamente se detectó la presencia del patógeno en los suelos de 15 de ellos, de los cuales solo 6, localizados en tres puntos de muestreo diferentes, se clasificaron como escapes: FR5, FR6, (Font Roja, Alicante) VA3, VA4, VA5 (Vallivana, Castellón) y H5 (Hunde, Valencia), con lo que se utilizaron 6 genotipos para su clonación. Para la

clonación de estos genotipos, se utilizó como sistema de propagación vegetativa la embriogénesis somática (ES), utilizando el protocolo descrito por nuestro grupo a partir de flores masculinas de encina (Blasco et al. 2013).

La frecuencia de inducción de embriogénesis somática dependió del genotipo y varió entre el 0.1 y el 0.6 % con un total de 5 líneas embriogénicas establecidas. Estos resultados son similares, aunque ligeramente inferiores, a los obtenidos en previos estudios utilizando también amentos como fuente de explantos (Blasco et al. 2013).

Es de interés señalar que de los 6 genotipos escape introducidos en cultivo (de los 33 que se ensayaron) se ha conseguido establecer líneas embriogénicas en 2 de ellos (VA5 11a, VA5 11f, H5 1b y H5 18b) provenientes de dos de las áreas testadas (Sierra Vallivana y Monte de La Hundede), mientras que los genotipos FR, procedentes del Parc Natural de la Font Roja, fueron recalcitrantes a la respuesta embriogénica generando únicamente proliferación celular.

Hasta hace unos años, la propagación mediante ES en encina se había conseguido principalmente a partir de explantos provenientes de material juvenil, concretamente de embriones zigóticos inmaduros (Mauri y Manzanera, 2003, 2004), con lo que el material propagado posee un valor genético desconocido (Corredoira et al., 2019). En los últimos años, varios grupos han desarrollado protocolos de ES a partir de material proveniente de árboles adultos utilizando amentos (Blasco et al., 2013), flores femeninas (Barra-Jiménez et al., 2014), u hojas de yemas establecidas in vitro (Martínez et al., 2017b, 2020), en todos ellos, el genotipo ha sido un factor decisivo en la respuesta embriogénica.

Aunque en este trabajo se ha conseguido establecer líneas embriogénicas de varios genotipos y los embriones cotiledonares obtenidos se almacenaron en frío, los posteriores ensayos de germinación realizados resultaron fallidos, no obteniéndose plantas que permitieran posteriores ensayos de tolerancia. La germinación de los embriones somáticos de encina continúa siendo, junto a la aclimatación de las plántulas obtenidas, uno de los cuellos de botella de esta técnica (Corredoira et al., 2019). La nula capacidad de germinación de los embriones somáticos obtenidos puede ser debida a la baja calidad de los mismos. Ensayos histológicos realizados por nuestro grupo en embriones derivados de amentos mostraron fallos en la estructura de los meristemos apicales del tallo y/o de la raíz (Blasco et al., 2013). La causa de estos fallos debe ser estudiada, aunque un posible efecto

del tejido de origen (en este caso amentos) no es descartable. En este sentido y en colaboración con el grupo de la Dra. Elena Corredoira (IIAG-CSIC- Galicia) estamos comparando el comportamiento de estas líneas embriogénicas con otras del mismo genotipo originadas a partir de yemas establecidas in vitro.

Con la finalidad de obtener plantas y mejorar la capacidad de aclimatación de las mismas, se utilizaron otras líneas embriogénicas cedidas por el Dr. Mariano Toribio (Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Agrario, Madrid) y otras obtenidas anteriormente en nuestro laboratorio. Los porcentajes de germinación de estas líneas en nuestro laboratorio fueron menores que los descritos en los laboratorios de origen (Barra-Jiménez et al., 2014; Cano, 2020).

Una alternativa a la falta de plántulas por problemas debidos a una germinación incompleta de los embriones, por ejemplo, falta de desarrollo de la raíz, es la clonación de los brotes del material germinado y su posterior enraizamiento. En nuestros ensayos, la obtención de clones a partir de los brotes producidos en la fase de germinación también varió dependiendo del genotipo, siendo superior el genotipo Q8 al E00. Este efecto del genotipo sobre la proliferación de brotes se observó también en los ensayos realizados por Martínez et al. (2017a, 2020) con otros genotipos de la especie.

### **V.1.1. Aclimatación de plántulas**

La aclimatación de plántulas es esencial para alcanzar los objetivos perseguidos por herramientas biotecnológicas como la ES. Se considera que hasta que no se haya conseguido aclimatar un número elevado de plántulas a las condiciones de campo, la aplicación práctica de la ES no se habrá logrado (Pinto et al., 2013; Martínez et al., 2019). La información disponible sobre la aclimatación de esta especie es todavía muy limitada (Martínez et al., 2019). De hecho, no se conocen trabajos en los que se haya conseguido una aclimatación exitosa en encina.

En nuestros ensayos, la supervivencia de las plántulas fue de alrededor del 50 % tras un mes de iniciada la aclimatación y de un 25 % tras tres meses de la misma, sin embargo, transcurridos cinco meses de la aclimatación, no sobrevivió ninguna plántula en los dos sustratos ensayados: 1 (70 % SeedPro 50 50 + 30 % perlita) y 2 (Turbatruf), al igual que en Barra-Jiménez et al. (2014) donde no se observa supervivencia de las plántulas somáticas transferidas a contenedores forestales con una mezcla de turba y perlita. Martínez et al. (2017b) consiguieron la aclimatación de plántulas somáticas

transfiriéndolas a contenedores con tierra humedecida y perlita en proporción (1:2), pero el porcentaje de supervivencia fue de un 10 %.

Durante la redacción de esta memoria y mediante una colaboración entre nuestro grupo y los grupos de la Dra. Corredoira (IIAG-CSIV) y la Dra. Araceli Barceló (IFAPA, Málaga) se están utilizando túneles con humedad elevada y apertura periódica de los plásticos que están ayudando a conseguir un número de ejemplares de encina aclimatados que posibilitarán ensayos de tolerancia.

### **V.2. Inducción de memoria epigenética para tolerancia a estrés biótico**

En las plantas, la infección previa causada por patógenos, o la alteración provocada por condiciones ambientales adversas causan la inducción de un estado fisiológico único llamado “priming”. Este estado permite a las plantas activar más eficientemente los mecanismos celulares de defensa al ser atacadas nuevamente por patógenos, insectos o en respuesta a un estrés abiótico (Conrath et al., 2006, 2015; Conrath, 2011).

El estado de “priming” también puede ser inducido por elicitores químicos, como el ácido salicílico (AS), el benzotiadiazol (BTH), el metil jasmonato (MeJA), el ácido para-aminobenzoico (PABA), y el ácido beta-amino butírico (BABA), todos ellos son inductores de la activación de la respuesta inmune de la planta ante el ataque de patógenos (Walters et al., 2005; Ebadzad et al., 2015; Llorens et al., 2017; Li et al., 2019). Junto con los elicitores químicos, las elicinas, proteínas secretadas por los patógenos necrotizantes y reconocidas por las membranas celulares de los huéspedes, han sido aplicadas con éxito para la inducción de tolerancia en varias especies con interés agronómico (Keller et al., 1996). Como ejemplo, Starý et al. (2019) indujeron cierta tolerancia a *Pseudoidium neolycopersici* en plantas de tomate mediante la aplicación de la elicina criptogeina demostrando además que esta tolerancia implicaba una activación de la ruta de señalización de jasmonato y etileno.

Además, estudios recientes en castaño y encina sugieren que la tolerancia adquirida por las plantas mediante el estímulo provocado por la infección por patógenos puede ser transferida a la descendencia por medio de mecanismos de memoria epigenética (Camisón et al., 2019; Vivas et al., 2021), por lo que el tratamiento con elicitores también podría inducir memoria epigenética, al igual que los estímulos provocados por el estrés biótico o abiótico.

### V.2.1. Optimización de protocolos de elicitación con extractos de oomiceto y elicitors químicos

Existen numerosos estudios sobre la efectividad de tratamientos exógenos con MeJA y, en algunos casos BABA, para inducir resistencia al ataque de plagas o patógenos en semillas, plántulas, frutos u hojas de diferentes especies (Kozłowski et al., 1999; Thomma et al., 2000; Heijari et al., 2005; Belhadj et al., 2006; Holopainen et al., 2009; Kepczyńska y Król 2012; Zas et al., 2014; Wang et al. 2014, 2015; Jiang et al., 2015). No obstante, la eficacia de estos tratamientos es a menudo dependiente de la familia y del genotipo (Kepczyńska y Król, 2012; Worrall et al., 2012; Król et al., 2015).

En especies leñosas, la aplicación de BTH y BABA a brinzales de *Pinus pinaster* (Vivas y Solla, 2012) indujo cierta resistencia ante el ataque de *Fusarium circinatum*, aunque su efectividad también dependió de la familia ensayada. Asimismo, aplicaciones exógenas de ácido salicílico (AS) y carvacrol en *Ulmus minor* incrementaron la resistencia de los árboles al hongo patógeno *Ophiostoma novo-ulmi* (Martín et al., 2008, 2010). La aplicación foliar de AS o BTH en *Pinus radiata* produjo una disminución significativa de las infecciones provocadas por *Diplodia pinea* (Reglinski et al., 1998) o *Phytophthora cinnamomi* (Ali et al., 2000). En otros estudios se ha observado que la cinamomina, elicitor segregado por *P. cinnamomi*, induce una respuesta de defensa a este oomiceto en plantas de alcornoque y encina (Horta et al., 2010; Ebadzad et al., 2015).

Todos los trabajos referenciados anteriormente muestran los efectos de los elicitors sobre diferentes partes de la planta de numerosas especies vegetales, algunos de ellos sobre semillas de plantas herbáceas, sin embargo, no se tiene conocimiento hasta la fecha de trabajos sobre el uso de elicitorinas o elicitors en semillas de *Quercus* sp. que puedan inducir respuestas de defensa en las plántulas obtenidas de ellas.

El diseño de una estrategia efectiva para inducir tolerancia a *P. cinnamomi* debe considerar el efecto de los tratamientos elicitors sobre el material embriogénico, para evitar un decrecimiento de la proliferación de embriones somáticos que impida la regeneración de plantas. Por ello, el primer paso llevado a cabo en esta tesis doctoral fue el ensayo de diferentes compuestos y metodologías de elicitación que no afectaran negativamente al desarrollo de las líneas embriogénicas y que a su vez mostraran efectividad induciendo tolerancia a *P. cinnamomi*.

### **V.2.1.1. Respuesta de la elicitación en medio de cultivo sólido durante periodos largos de tiempo**

Inicialmente se aplicaron 50  $\mu\text{M}$  de los elicitores MeJA, PABA y BTH durante 60 días en cultivo en medio sólido. Esta concentración se encuentra dentro de los valores ensayados para la obtención de metabolitos de interés en elicitación de cultivos celulares *in vitro* (Giri y Zaheer, 2016). La aplicación de MeJA y PABA en el medio de cultivo durante 60 días no afectó al desarrollo de la línea embriogénica, evaluado mediante la medida del incremento relativo de peso fresco, mientras que el tratamiento con BTH produjo menor crecimiento de la misma y mayores daños en las membranas celulares que el control y que los demás tratamientos. El efecto tóxico del BTH también fue observado en otras líneas embriogénicas de la misma especie (Ruiz-Galea et al., 2017). Lo más destacado de este ensayo es que permitió correlacionar positivamente los daños en los lípidos de las membranas (producción de MDA) con la falta de proliferación de las líneas celulares. La producción de MDA en relación a la peroxidación lipídica alta en las células vegetales ha sido estudiada y descrita por varios autores (Draper y Hadley, 1990; Esterbauer y Cheeseman, 1990; Marnett, 1999; Arbona et al., 2008; Ayala et al., 2014).

La aplicación de elicitores durante periodos prolongados de tiempo, podría inducir cambios de adaptación quizá no relacionados con el concepto de “priming”. Por ello, se procedió a aplicar los tres elicitores durante periodos cortos de tiempo (3 o 5 días) observándose que una elicitación durante 3 días con 50  $\mu\text{M}$  de MeJA incrementaba la proliferación de la línea embriogénica sin dañar las membranas celulares ni producir un excesivo daño oxidativo, que se determinó mediante la medida de producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (ver figs. IV.7 a IV.10). El tratamiento de elicitación durante 3 días con 50  $\mu\text{M}$  de MeJA resultó beneficioso en otras líneas de encina (Ruiz-Galea et al., 2017), ya que produjo una recuperación de la diferenciación de la línea embriogénica, probablemente debido al hecho de que niveles elevados de ácido jasmónico provocan la acumulación de ácido indolacético, y con ello la producción de embriones somáticos (Mira et al., 2016). Estos resultados permitieron seleccionar la elicitación en medio líquido durante 3 días para los futuros experimentos.

### V.2.1.2. Respuesta de las líneas embriogénicas a la elicitación en medio líquido

Una vez seleccionado el método (medio líquido) y el tiempo de aplicación (3 días) del elicitor se procedió a determinar qué elicitor y en qué concentración debía ser aplicado.

La elicitación en medio líquido se realizó secuencialmente en dos líneas embriogénicas de encina. En ambas se ensayó el extracto filtrado del oomiceto (OCF) como fuente de elicinas. Además, se ensayaron los elicitores MeJA, BTH y PABA en línea Ha13 y posteriormente se ampliaron los estudios a la línea E00 con las mismas concentraciones de OCF y 5, 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$  de los elicitores MeJA, BABA y AS. En base a los resultados obtenidos en el apartado anterior, se intentó además establecer una correlación entre el contenido en MDA y el crecimiento de las líneas embriogénicas tras la elicitación.

Estudiando el comportamiento de las dos líneas en condiciones control hay que destacar que la línea E00 presentó una menor capacidad proliferativa, medida como incremento de peso, que la línea Ha13 tras 60 días de cultivo (Figs. IV.11 y IV.14).

En ambas líneas embriogénicas, la aplicación de OCF no alteró el crecimiento y desarrollo de los embriones, aunque la concentración 30 % de OCF (OCF30) produjo un incremento en MDA, lo que implica alteración en los lípidos de las membranas, 7 y 30 días tras la elicitación, en contraste con la aplicación de 50 % OCF50 que no la alteró (Figs. IV.11A, IV.12A, IV.13A, IV.14A, IV.15A y IV.16A). El OCF tampoco indujo una disminución en la proliferación de las líneas embriogénicas de encina ensayadas por Ruiz-Galea et al. (2017), aunque estos autores no presentan datos de MDA.

Los tratamientos con elevadas concentraciones (25 o 50  $\mu\text{M}$ ) de BTH o PABA, aplicados a la línea Ha13, promovieron malformaciones en el desarrollo de los ES (Fig. IV. 12). Estos resultados, junto con el incremento en el contenido de MDA observado en el material elicitado con 25 o 50  $\mu\text{M}$  de PABA o con 50  $\mu\text{M}$  de BTH, sugieren un efecto negativo de estos elicitores en la integridad de las membranas de ES de encina, lo que podría estar relacionado con una menor frecuencia de embriones bien desarrollados observada en promedio en estos tratamientos. El efecto negativo del BTH y PABA en el crecimiento de las plantas ha sido demostrado en *Pinus sylvestris* y *Arabidopsis* (Heijari et al., 2005; Van Hulten et al., 2006). Por el contrario, aplicaciones de BTH en diferentes partes de la planta no provocaron

toxicidad en *Pinus radiata*, *Banksia integrifolia*, *Isopogon cuneatus* y *Pinus pinaster* (Ali et al., 2000; Vivas y Solla, 2012) y la aplicación de PABA fue el mejor tratamiento para inducir SAR contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* en un ensayo de pimiento en invernadero (Song et al., 2013).

La aplicación de MeJA no afectó significativamente al crecimiento de las líneas embriogénicas en comparación con las líneas control. Asimismo, e independientemente de la línea, la concentración de 50  $\mu$ M de este elicitor redujo el porcentaje de embriones bien formados (70 % vs. 50 % para los controles y las líneas elicidadas, respectivamente; figs. IV.12B y IV.15B) que fue solo significativo en la línea E00 en concordancia con el mayor contenido de esta línea en MDA tras 30 días de elicitación. Chong et al. (2005) sugirieron que los daños en las membranas celulares durante los primeros días después de la elicitación con MeJA en cultivos celulares de *Morinda elliptica* desencadenaría la biosíntesis de enzimas antioxidantes, induciendo así una disminución posterior en los niveles de MDA. En otras especies, la aplicación de MeJA también produjo una ralentización o afectación al crecimiento del material vegetal, que posteriormente se vio compensada por el aumento de la tolerancia de las plantas al patógeno o plaga (Heijari et al., 2005; Kepczyńska y Król, 2012; Zas et al., 2014). Estudios realizados en arroz concluyeron que la aplicación de MeJA a semillas generaba tolerancia a *Lissorhoptrus oryzophilus*, pero reducía el crecimiento de las plantas (Kraus y Stout, 2019). Por otro lado, Wang et al. (2014, 2015), concluyeron que la aplicación postcosecha de MeJA en arándanos inducía resistencia frente a *Penicillium citrinum*.

En la línea E00, se ensayó además el efecto del AS y del BABA. Ninguno de los elicitores afectó negativamente al crecimiento y desarrollo de la misma, aunque los tratamientos con 10 y 25  $\mu$ M de BABA produjeron menor número de embriones bien formados. La elicitación con concentraciones elevadas (25 y 50  $\mu$ M) de AS, aplicadas a la línea E00, no produjo alteraciones en las membranas. De hecho, el contenido en MDA fue en general menor que el de las muestras control (Fig. IV.16D). Con este elicitor no se mencionan daños al material vegetal en los trabajos de (Martín et al., 2008, 2010). Asimismo, todos los tratamientos con BABA excepto BABA50 produjeron a largo plazo altos niveles de MDA. Este último tratamiento produjo un buen desarrollo de los embriones somáticos, por lo que se puede establecer una correlación entre ambos resultados. La aplicación del elicitor BABA no produjo toxicidad en el material vegetal en los estudios realizados por Vivas y Solla (2012), Worrall et al. (2012) y Ruiz-Galea et al. (2017).



En conclusión, estos resultados apuntan a que 50  $\mu\text{M}$  MeJA, BABA o AS podrían ser utilizados para la elicitación de las líneas embriogénicas de encina, aunque su efecto tóxico podría variar con la línea embriogénica.

### **V.2.1.3. Evaluación de la efectividad de la elicitación de líneas embriogénicas en la inducción de tolerancia a *Phytophthora cinnamomi***

Para comprobar la efectividad de la elicitación, las líneas embriogénicas se pusieron en contacto con el oomiceto mediante cultivos duales o bien se infectaron con un extracto activo del mismo.

#### ***Cultivos duales***

Los experimentos con cultivos duales establecidos entre el material vegetal y el patógeno objeto de estudio han demostrado que la estimulación o inhibición del crecimiento del micelio en estas condiciones podría proporcionar información útil sobre la susceptibilidad de las plantas (Nawrot-Chorabik, 2013, 2014; Nawrot-Chorabik et al., 2016), y por lo tanto podrían usarse para seleccionar tratamientos de elicitación eficientes (Nawrot-Chorabik, 2013; Ruiz-Galea et al., 2017; Morcillo et al., 2020).

En nuestro estudio (Morcillo et al., 2020), los embriones somáticos de encina elicitados no inhibieron el crecimiento del micelio de *Phytophthora cinnamomi* en los ensayos de cultivo dual, sin embargo, las muestras elicitadas con OCF 50 %, 50  $\mu\text{M}$  BTH, 5, 10 o 50  $\mu\text{M}$  de MeJA y 5  $\mu\text{M}$  de PABA mostraron ratios superiores a 1 (crecimiento hacia el control y crecimiento hacia el material elicitado, obtenido al final del experimento), siendo el tratamiento MeJA50 el que mostró el valor más alto de esta ratio (Figs. IV.17 y IV.18). Estos resultados apuntan a que sería necesario optimizar las condiciones del experimento para inferir una relación entre el crecimiento del oomiceto y la susceptibilidad o resistencia de la línea embriogénica.

En el estudio de Ruiz-Galea et al. (2017) los tratamientos que redujeron el crecimiento del micelio variaron en función del modo de aplicación de los elicitores (largo plazo en medio sólido y corto plazo en medio líquido) y del genotipo del que provenía el material embriogénico, destacando los tratamientos 50 y 100  $\mu\text{M}$  de BABA y 100  $\mu\text{M}$  de MeJA.

Wang et al. (2015) demostraron que la resistencia inducida a *Botrytis cinerea* en los frutos de uva tratados con MeJA estaba estrechamente relacionada con un incremento de la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en este material vegetal. Esta respuesta a estrés biótico fue evaluada en nuestro material embriogénico de encina elicitado y empleado en los ensayos de cultivo dual,

y se encontró un mayor contenido de  $H_2O_2$  en las muestras tratadas con 50  $\mu M$  de MeJA (Morcillo et al., 2020).

En las muestras de la línea Ha13 elicitadas con OCF y posteriormente enfrentadas al micelio de *P. cinnamomi* en el cultivo dual se observó una reducción de la producción de  $H_2O_2$  a medida que aumentaba la concentración del elicitor, posiblemente causado por un incremento de la actividad catalasa (Fig. IV.20).

Aunque no se encontraron diferencias significativas en todos los parámetros ensayados para la línea Ha13, nuestros resultados, en base al crecimiento y desarrollo de SE, producción de MDA, inhibición del crecimiento de micelios y producción de  $H_2O_2$ , sugieren que en nuestras condiciones, 50  $\mu M$  de MeJA parece ser el tratamiento más adecuado para la elicitación de líneas embriogénicas de encina (Morcillo et al., 2020).

### ***Infección de las líneas embriogénicas con extracto activo de *P. cinnamomi* y determinación de ROS***

La respuesta a estrés biótico provocado por la infección con un extracto activo de *P. cinnamomi* se evaluó midiendo la producción de  $H_2O_2$  (Cheeseman, 2007; Wang et al., 2015) en las líneas embriogénicas Ha13 y E00, así como determinando la actividad de la enzima SOD (Wang et al., 2018) en las muestras elicitadas de la línea E00.

En la línea Ha13, los valores de  $H_2O_2$  fueron superiores en las muestras tratadas con MeJA que en las muestras tratadas con el resto de los elicitores, siendo los tratamientos MeJA5 y MeJA50 los que presentaban mayor contenido en este compuesto, con lo que se podría establecer que estas concentraciones del elicitor MeJA provocaban una mayor respuesta a este estrés biótico según Wang et al. (2015). En base a los resultados expuestos se seleccionó la elicitación con 50  $\mu M$  de MeJA para avanzar en el objetivo 2.2 de esta tesis.

En la línea E00 la infección del material elicitado con un extracto activo del oomiceto y el análisis de las muestras en cuanto a su contenido en  $H_2O_2$  y actividad SOD, demostró bajos niveles de peróxido en todos los embriones procedentes de los tratamientos elicitados (excepto en BABA25) que se correlacionaba con una elevada actividad SOD especialmente destacable en OCF30, BABA10, BABA50 y AS50, indicando que los cuatro tratamientos podrían ser adecuados para inducir tolerancia en esa línea embriogénica. El incremento de la actividad enzimática SOD se relaciona con un aumento de

la producción de especies reactivas de oxígeno, que a su vez está relacionado con una mayor respuesta a estrés (Chong et al., 2005; Cervilla et al., 2007; Arbona et al., 2008; Wang et al., 2018).

Tomando todos los datos relativos a esta línea, la elicitación con 50  $\mu\text{M}$  de AS parece ser la más adecuada, ya que no afecta al crecimiento y desarrollo de los embriones, induce bajos niveles de MDA y en respuesta a la infección por el oomiceto, activa las ROS.

## **V.2.2. Determinación de marcadores precoces de tolerancia a estrés en el material elicitado**

### **V.2.2.1. Evaluación de las variaciones en los niveles de expresión de genes de respuesta a estrés**

La medida de la variación en la expresión de ciertos genes es una herramienta muy útil para analizar los cambios funcionales en los mismos. Los niveles de expresión de un determinado gen en muestras sometidas a diferentes condiciones experimentales se denomina perfil de expresión génica (Sanchita y Sharma, 2018) y nos puede dar información sobre el efecto de un determinado tratamiento en el material vegetal estudiado. La resistencia de las plantas a los estreses bióticos es generalmente monogénica (Pérez-Torres et al., 2009), de manera que estudiando el perfil de expresión de los genes relacionados con la respuesta a estrés biótico en muestras vegetales, podemos analizar la efectividad de ciertos tratamientos de elicitación, comparando la respuesta que ciertos estreses provocan en plantas tratadas y no tratadas. Algunos estudios muestran que la inducción de una respuesta potenciada a estrés mediante la estimulación con cepas avirulentas de patógenos o elicitors como AS o BTH únicamente es evidente cuando se produce después la infección con el patógeno activo (Mur et al., 1996; Cameron et al., 1999; van Wees et al., 1999; Kohler et al., 2002). Así, Kohler et al. (2002) demostraron un incremento en el ARNm del gen *PAL* en las muestras infectadas con el patógeno tras la elicitación con BTH.

Los cinco genes empleados en este trabajo están implicados en respuesta a estrés. Cuatro de ellos, *CSQs* (Corismato Sintasa de *Q. suber*), *PALQs* (Fenilamonio Liasa de *Q. suber*), *CAD1Qs* (*CAD*) (Cinamil alcohol Deshidrogenasa de *Q. suber*) y *ChSQs* (Chalcona Sintasa de *Q. suber*), están relacionados con la síntesis de fenilpropanoides; mientras que el gen *CsTL1* codifica una proteína similar a la Taumatina de *Castanea sativa* (Walter et al., 1988; Keith et al., 1991; Dixon y Paiva, 1995; Görlach et al., 1995; Zhao y Last, 1996; Ito et al., 1997; Gläßgen et al., 1998; Brill et al., 1999; Garcia-

Casado et al., 2000; Lynch et al., 2002; Hu et al., 2009; Kim et al., 2010; Jeong et al., 2012; Wang et al., 2013; Dehghan et al., 2014; Oßwald et al. 2014; Misra et al., 2016; Zhang et al., 2017; Filiz et al., 2019; de Jesús-Pires et al., 2019; Cano et al., 2020; Li et al., 2020).

La síntesis de lignina, al igual que la síntesis de ciertas fitoalexinas, se deriva del metabolismo de los fenilpropanoides, en donde la enzima PAL juega un importante papel regulador. Sin embargo, la síntesis de novo de otras enzimas como la cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD) y algunas peroxididasas, también ocurre durante la activación de la defensa contra los patógenos.

Analizando nuestros resultados, se observa, en general, que la expresión de todos los genes fue baja y, con excepción del gen *PALQs*, varió entre las diferentes líneas embriogénicas. Además, no se observó un claro patrón de expresión de los mismos en los cuatro tratamientos contrastados (control, elicitado, control-infectado y elicitado-infectado).

En las muestras control de la línea Q8 la infección con el oomiceto promovió un incremento en la expresión de los genes *CAD1Qs*, *CSQs*, *PALQs* y *CsTL1* indicando la activación de una respuesta a estrés biótico. En esta línea, la elicitación con MeJA50 también provocó un incremento, no significativo, de la expresión de los genes *CAD1Qs* y *ChSQs*. La infección de las muestras elicidadas no incrementó la expresión de ninguno de los genes estudiados cuando se compararon con las muestras control. Un incremento en los niveles de la proteína chalcona sintasa (Simova-Stoilova et al., 2015) ha sido descrita en plántulas de encina sometidas a estrés hídrico.

En la línea E00 también se observó un incremento en la expresión de los genes *CAD1Qs*, *CSQs* y *PALQs* tras la infección, mientras que la elicitación no varió o disminuyó no significativamente (*ChSQs*) la expresión génica. Las muestras de E00 elicidadas e infectadas mostraron un incremento importante, aunque no significativo, en la expresión de los genes *CAD1Qs* y *PALQs*. El gen *CAD* está implicado en la ruta de biosíntesis de suberina y lignina para reforzar las paredes celulares tras la infección, y también se ha propuesto que podría inhibir efectores de virulencia excretados por el patógeno (Oßwald et al., 2014). Este patrón de expresión génica en las muestras elicidadas sometidas a infección se corresponde con el observado en los estudios de Mur et al. (1996), Cameron et al. (1999), van Wees et al. (1999) y Kohler et al. (2002).

Si partimos de la base de que en las líneas Q8 y E00 la infección con el oomiceto incrementa los niveles de expresión de los genes *CAD1Qs*, *CSQs* y *PALQs*, podemos deducir que estos genes son comunes a la respuesta de las líneas sensibles al ataque del oomiceto.

La elicitación de ambas líneas con MeJA50 no altera los niveles de expresión de los genes *CSQs* y *PALQs* en relación con los controles no elicitados al igual que en los estudios de Kauss et al. (1992) y Thulke y Conrath (1998), en los que tratamientos de cultivos en suspensión de perejil con bajas dosis de *Phytophthora sojae* o ácido salicílico no indujeron un aumento en la expresión del gen *PAL*, sin embargo, cuando las células de perejil tratadas con AS se pusieron en contacto con bajas dosis del patógeno *P. sojae*, los niveles de ARNm del gen *PAL* alcanzaron niveles considerablemente altos. Esta respuesta sólo se produjo en la línea E00 con respecto al gen *PALQs*, mientras que los niveles de expresión del gen *CSQs* se mantuvieron estables tras la infección en estas muestras elicitadas.

Es relevante señalar que el material control de la línea VA5 11f generada a partir de un árbol escape presentó niveles superiores a las otras dos en la expresión de 4 de los 5 genes ensayados (*CAD1Qs*, *ChSQs*, *PALQs* y *CsTL1*). La infección de la línea con el oomiceto no afectó (*CAD1Qs*, *PALQs*) o disminuyó (*ChSQs*, *CSQs*, *CsTL1*) la expresión de los citados genes, aunque el descenso en los niveles de expresión sólo fue significativo en el caso del gen *ChSQs*. La elicitación y posterior infección de esta línea disminuyó (*CAD1Qs*, *ChSQs*, *CsTL1*), sólo significativamente en el gen *ChSQs*, y no varió (*CSQs* y *PALQs*) la expresión de los genes. Estos datos apoyan el modelo de respuesta a oomiceto planteada para *Quercus suber* por Oßwald et al. (2014). Este comportamiento puede deberse al hecho de que las muestras control de esta línea ya mostraban una expresión elevada de los genes estudiados, quizá por estar en cierto grado imprimada, al provenir de un genotipo considerado escape.

#### **V.2.2.2. Evaluación de las variaciones en el perfil proteico**

La carencia de estudios relacionados con las variaciones del perfil proteico de embriones somáticos elicitados y sometidos a estrés biótico dificulta la discusión de este apartado. No obstante, nuestros resultados confirman que la elicitación y la posterior infección modifica el perfil proteico del material embriogénico de encina.

Una revisión reciente en especies del género *Quercus* sometidas a estrés biótico concluye que, a nivel proteómico, la respuesta de la encina a

la inoculación del oomiceto es muy similar a la producida bajo estrés hídrico (Escandón et al., 2021). Estas variaciones fisiológicas se observaron en diferentes especies de *Quercus* que habían sido inoculadas con *P. cinnamomi* (Maurel et al., 2001; Robin et al., 2001; Turco et al., 2004; Echevarría-Zomeño et al., 2009; Peguero-Pina et al., 2009; Vaz et al., 2010; Sghaier-Hammami et al., 2013; Escandón et al. 2021). Entre estas variaciones destacan la reducción en la expresión de las proteínas relacionadas con la fotosíntesis que se ha asociado a la susceptibilidad de la especie al ataque del patógeno (Sghaier-Hammami et al., 2013; Meyer et al., 2016). De hecho, Sghaier-Hammami et al. (2013) demostraron que los pies de *Quercus ilex* procedentes de las zonas con mayor susceptibilidad a *P. cinnamomi* mostraban una reducción más marcada en la eficiencia del fotosistema PSII, la conductancia estomática y el consumo neto de CO<sub>2</sub> cuando fueron inoculados con el patógeno. En el mismo sentido, Dempsey et al. (2012) demostraron que en las especies de eucalipto resistentes al oomiceto como *Eucalyptus sideroxylon*, el daño en la eficiencia fotosintética fue menos severo. En ausencia de estrés hídrico, la reducción de la fotosíntesis puede deberse a la acción de las elicinas del oomiceto (Manter et al., 2007; Medeira et al., 2012).

En el trabajo de Sghaier-Hammami et al. (2013), realizado con material proveniente de hojas de plántulas de *Quercus ilex*, estos cambios a nivel fisiológico se tradujeron además en un decrecimiento de las proteínas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos y algunas implicadas en el estrés/ defensa, y en un aumento de las relacionadas con la biosíntesis de almidón, glucólisis y respuesta a estrés como las peroxirredoxinas, cuando las plantas fueron inoculadas con el patógeno. Sin embargo, otros trabajos muestran decrecimientos de las proteínas implicadas en la glucólisis (Plomion et al., 2006; Castillejo et al., 2008), estas diferencias de comportamiento se pueden explicar por la influencia de la especie de planta estudiada, del tejido u órgano empleado para el ensayo, y del nivel (más o menos severo) y modo de aplicación del estrés (gradual o rápido), así como del momento de muestreo (respuestas tempranas o tardías) (Leone et al., 1994; Abbasi y Komatsu, 2004; Castillejo et al., 2008; Echevarría-Zomeño et al., 2009).

El material de nuestro estudio provenía de embriones somáticos de *Quercus ilex*, por tanto, no se detectaron proteínas relacionadas con la fotosíntesis. En este ensayo se esperaba que la infección alterara el perfil proteico de forma diferencial entre el material no elicitado y el elicitado. La discusión de estos resultados se aborda desde varias perspectivas; por un

lado, destacaremos aquellas proteínas relacionadas con el estrés biótico que se sobreexpresan tras la infección y en mayor medida en las muestras previamente elicidadas, lo que implicaría la activación de un potente mecanismo de defensa; por otro lado, también destacaremos aquellas proteínas cuyos niveles se ven alterados (aumentados o disminuidos) tras la infección en las muestras control, pero no en las elicidadas. Por último se comentarán aquellas proteínas que permanecen estables en todos los tratamientos.

La infección con el oomiceto, incrementó, aunque no significativamente, la expresión de las proteínas GBLPA, APG2 y HGD siendo este incremento significativo en algunos casos en las muestras elicidadas.

La proteína GBLPA es un receptor quinasa componente del complejo RACK1 en *Arabidopsis* (Ullah et al., 2008). Se ha descrito que esta proteína está implicada en la respuesta inmune de las plantas regulando positivamente la producción de ROS siendo inducida por auxinas, ABA y ácido jasmónico (Nakashima et al., 2008), lo que podría explicar su elevada expresión en las muestras elicidadas. APG2 tiene actividad esterasa/lipasa y se ha asociado con una MPK4 dependiente de etileno implicada en respuestas a estrés biótico (Brodersen et al., 2006). Puesto que se ha descrito que algunas cinamominas podrían activar transportadores de esteroides que activarían la virulencia del oomiceto, podríamos sugerir que estas lipasas disminuirían la virulencia del oomiceto (Hardham y Blackman, 2018). Por último, la proteína HGD es una homogentisato dioxigenasa implicada en el metabolismo de la fenilalanina. Esta proteína disminuye los niveles de homogentisato y su mutación ha sido asociada con una mayor sensibilidad al ataque de patógenos (Stacey et al., 2006), con lo que los resultados obtenidos en las muestras elicidadas son contrarios a lo esperado.

Un segundo grupo de proteínas engloba a aquellas cuya expresión incrementó tras la infección en el material no elicitado, mientras que en el elicitado se mantuvo en niveles semejantes al control no infectado. Este hecho podría explicarse si asumimos que la elicitación ayuda a que la infección sea más leve y que los mecanismos de defensa actúen antes de que estas proteínas deban ser activadas. Entre estas proteínas están RUK, CS120, PGIP, HIPL1 y PERN1.

RUK (Runkel) es una serina/treonina kinasa implicada en la división celular regulando la organización de los microtúbulos para la formación del fragmoplasto. Además, es requerida para la celularización del endospermo

(Krupnova et al., 2009). Los niveles de esta proteína incrementaron significativamente tras la infección en los controles, pero no en las muestras elicítadas e infectadas con MeJA50.

También se produjo un incremento de proteínas relacionadas con la respuesta a estrés en general; CS120 es una proteína expresada en respuesta a frío, su aumento en las muestras control corrobora la teoría de que el estrés provocado por la infección induce una respuesta similar al estrés hídrico (Sghaier-Hammami et al., 2013; Meyer et al., 2016). Ensayos realizados en trigo mostraron que un “priming” por frío no incrementaba la expresión de esta proteína, aunque sí los niveles de ácido salicílico (Wang et al., 2021). PGP es una proteína inhibidora de las poligalacturonidasas bacterianas sintetizadas por las plantas en respuesta a los efectores del oomiceto (Hardham y Blackman, 2018), en nuestro caso, la disminución de su expresión en el material elicitado puede ser debido al efecto del MeJA impidiendo la acción de los efectores. PERN1 es una proteína con actividad peroxidasa que incrementó, no significativamente, tras la infección. Castillejo et al. (2012), Simova-Stoilova et al. (2015) y Echevarría-Zomeño et al. (2009) también determinaron un incremento de esta proteína en plántulas de *Pisum sativum* sometidas al ataque de plantas parásitas como *Orobanche crenata*, en el primer caso, y plántulas de *Quercus ilex* sometidas a condiciones de estrés hídrico en los dos últimos casos. Nuestros resultados en las muestras infectadas que previamente habían sido elicítadas concuerdan con los obtenidos por Echevarría-Zomeño et al. (2009) en los que las plántulas de encina recuperadas del estrés hídrico mostraron niveles de esta proteína similares al control, lo que podría entenderse como un indicio de la tolerancia inducida por la elicitación. En nuestro experimento podríamos asumir que la elicitación impidió la infección o quizá esos niveles bajos de proteína se deban a que el jasmonato reprime la expresión del gen, como ha sido descrito en hojas de tabaco (Hiraga et al., 2000). La última proteína de este grupo es la HILP1, que es una enzima de membrana con función oxido/reductasa, aunque la posible relación de estas proteínas con el estrés no ha sido descrita por el momento.

Un tercer grupo de proteínas engloba a aquellas que disminuyen su expresión, aunque no siempre significativamente, tras la infección en las muestras control, pero incrementa en las muestras elicítadas e infectadas (USF, HEXP, GDL15, Y5957, TOM92, UFOG3, KPRS4).

Algunas de estas proteínas están implicadas en la unión a ARNm, regulando la transducción de otras proteínas (Y5957), o a DNA (HEXP) sin



función conocida, o en el metabolismo de ácidos grasos (USF con actividad hidrolasa). La proteína GDL15, con actividad lipasa e implicada en la biosíntesis de lisina, podría estar relacionada con la disminución de la virulencia del patógeno que requiere transportadores específicos de ácidos grasos (esteroles) para la infección (Hardham y Blackman, 2018). TOM92 facilita la translocación de proteínas a la mitocondria formando parte del complejo TOM (Parvin et al., 2017); se ha demostrado que alteraciones en las proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial incrementan la susceptibilidad de las plantas a patógenos necrótrofos (Breen et al., 2017). KPRS4 está implicada en el metabolismo de nucleótidos. En trigo estas proteínas pertenecen al grupo de proteínas Rboh (NADPH oxidasa, son proteínas de membrana también llamadas respiratory burst oxidases homologous) de unión a cadmodulina e implicadas en la producción de ROS (Navathe et al., 2019). UFOG3 es una flavonol-O-glucosil que convierte la cianidina en cianidina-3-glucósido (Petruzza et al., 2013). Los flavonoides son una de las líneas de defensa contra los radicales libres, la radiación ultravioleta y la invasión de patógenos (Mouradov y Spangenberg, 2014). Estas dos proteínas se expresan diferencialmente tras la infección en las muestras control y en las elicidadas por lo que podrían ser marcadores de tolerancia del material embriogénico.

Por último, hay otras proteínas cuyos patrones de expresión no se encuentran en los grupos anteriormente citados. Entre ellas además de la proteína BSP, hay otras que están directamente implicadas en la respuesta a estrés (P21, DHAR2 y GGT2). La proteína BSP-BOSSE es una proteína proteolítica secretora descrita en *Boswellia* en respuesta a herbívoros (Herrmann et al., 2012). P21 pertenece al grupo de las taumatinas, que son proteínas PR (relacionadas con la patógenesis). En nuestros ensayos, la expresión se redujo en las muestras tras la infección, siendo esta reducción más evidente en las muestras elicidadas e infectadas, al contrario de lo esperado. Sin embargo, en otros trabajos comentados (Sghaier-Hammami et al., 2013), también se observaron decrecimientos en ciertas proteínas de respuesta a estrés. Por el contrario, la sobreexpresión del gen *CsTL1*, una taumatina de castaño, en líneas embriogénicas de alcornoque y encina, promovió cierto grado de tolerancia al oomiceto (Cano, 2020). La proteína DHAR2, una glutatión-S-transferasa, está directamente implicada en la detoxificación de las ROS. En nuestros ensayos los niveles de esta proteína fueron más elevados en las muestras elicidadas con MeJA50 e infectadas que en el control infectado, aunque este incremento no fue significativo. Sería

interesante estudiar estos cambios en las plántulas derivadas de la germinación de estos embriones.

GGT2 y NDKB también son proteínas relacionadas con la respuesta a estrés. GGT2 es una glutamato-glioxilato aminotransferasa (Liepman y Olsen, 2003) implicada en el metabolismo del azufre (Destro et al., 2011). Esta proteína quizá debería incrementar su expresión según Scharte et al. (2005), sin embargo, la expresión de la misma alcanzó niveles del material control no inoculado en las muestras infectadas que previamente habían sido elicitadas. Similar comportamiento se encontró en la proteína NDKB que disminuyó significativamente tras la infección en los controles y en las muestras elicitadas con MeJA25, pero no en las tratadas con MeJA50. Esta proteína regula la homeostasis de los nucleósidos de adenina entre los diferentes orgánulos de la célula y se ha descrito que la enzima es sensible al estrés abiótico.

### **V.2.2.3. Evaluación de las variaciones en el perfil fenólico**

Las plantas liberan una gran diversidad de compuestos fenólicos relacionados con la defensa a estrés, como respuesta de resistencia sistémica inducida (Rashad et al., 2020), muchos de ellos son producidos en la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides. Estos metabolitos secundarios incluyen flavonoides, monolignoles, ácidos fenólicos, estilbenos y cumarinas, y juegan un papel esencial en el desarrollo vital de las plantas por ser componentes esenciales de las paredes celulares, de las fitoalexinas contra herbívoros y patógenos, así como protectores frente a la luz intensa y las radiaciones UV (Dixon, 2001; Deng y Lu, 2017; Ghosh et al., 2017; Sharma et al., 2019; Wallis y Galarneau, 2020).

En nuestro estudio se ha analizado la variación en el perfil fenólico de 3 líneas embriogénicas Q8, E00 y VA5 11f en función del tratamiento aplicado (elicitación y/o infección), determinando el contenido de 4 ácidos fenólicos (sinápico, elágico, ferúlico y cafeico), 1 flavonol y 2 proantocianina (quercetina y prodelfinidina B3 respectivamente).

El perfil fenólico varió entre los distintos compuestos analizados, no siguiendo un patrón claro acorde a los tratamientos. Además, la línea VA5 11f, que como se ha comentado anteriormente provenía de un árbol escape, presentó un perfil fenólico muy diferente a las otras dos líneas generadas a partir de genotipos susceptibles. Cabe destacar el elevado contenido en ácido cafeico observado en esta línea (Fig. IV.36), lo cual puede considerarse un marcador de defensa. Este ácido y sus derivados se consideran

metabolitos secundarios de gran importancia por participar activamente en el mecanismo de defensa de las plantas frente a estrés biótico (Riaz et al., 2018); el ácido cafeico está involucrado en la síntesis de lignina, lo que permite un reforzamiento de la pared celular, además, inhibe la acción de los agentes patógenos por la acción de los enzimas segregados en respuesta al incremento de este compuesto, y también se ha comprobado que inhibe la síntesis de proteínas en las células patógenas (Osbourn, 1996; Davidson, 1997; Riaz et al., 2018). En estudios recientes realizados en encina (Gallardo et al., 2019) se determinó la interacción entre la defoliación mecánica (considerado un estrés abiótico) y la infección por *Phytophthora cinnamomi* sobre la biosíntesis de taninos. Estos ensayos concluyeron que la defoliación producía un incremento en los transcritos de genes relacionados con la síntesis de taninos, mientras que la infección con el oomiceto inhibiría su expresión siendo en parte responsable del “síndrome de la seca”.

En las líneas Q8 y E00 la elicitación con 50  $\mu\text{M}$  de MeJA provocó incrementos significativos en el contenido de los ácidos sinápico, ferúlico y cafeico y únicamente en la línea E00 en la quercetina (Figs. IV.33, IV.35-IV.37). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Chung et al. (2016), donde la elicitación de las raicillas absorbentes de melón amargo con AJ y AS provocó incrementos de compuestos fenólicos como los ácidos hidroxibenzoico, gentísico, salicílico, gálico, protocatéquico, vanílico y siríngico. Asimismo, González-Chavira et al. (2018) demostraron que la aplicación exógena de elicitors en plantas de estevia aumentaba la concentración de los ácidos ferúlico y clorogénico, así como de flavonoides y taninos. En tomillo, la aplicación de estrés por sequía incrementó la producción de fenoles y una posterior aplicación de AS en las partes aéreas promovió un posterior incremento en estos compuestos (Khalil et al., 2018). Finalmente, filtrados estériles de *Verticillium nonalfalfae* incrementaron significativamente la actividad PAL en líneas celulares de lúpulo (Lawton y Lamb, 1987; Trevisan et al., 1997; Kunej et al., 2020).

Por todo ello, cabría sugerir que el aumento en estos fenoles en las líneas elicidadas podría suponer un mecanismo de defensa a posteriores infecciones.

Los compuestos fenólicos suelen acumularse en los tejidos de la planta cuando esta es infectada por el patógeno, como respuesta inicial (Mayer et al., 2001), este hecho se ha demostrado en maíz, donde se observó un incremento de los dos ésteres de ácido cafeico después de infectar con *Glomerella graminicola* o *Cochliobolus heterostrophus* (Pusztahelyi et al.,

2017), en nuestro estudio la infección indujo un aumento del contenido de ácido elálgico en las líneas Q8 y E00, aunque en la última, únicamente en las muestras previamente elicidadas. En la línea VA5 11f el incremento tras la infección se dio en los ácidos sinápico, elálgico y ferúlico.

Otros estudios han demostrado un aumento en la producción de fitoalexinas, flavonoides y conjugados fenólicos en tejidos vegetales tratados con compuestos inductores de tolerancia a *Phytophthora parasitica* o *Xanthomonas campestris* cuando estos tejidos son infectados por estos patógenos (Fuster et al., 1995; Ortuño et al., 1997; Newman et al., 2002), por tanto, el incremento de ácido elálgico tras la infección en muestras elicidadas se puede considerar como un marcador de respuesta a estrés, al ser común en las tres líneas.

### **V.2.2.4. Evaluación de las variaciones en el perfil hormonal**

El grado de resistencia frente a estrés que muestran las plantas está influenciado por señales sistémicas mediadas por fitohormonas, la señalización mediada por el AS desencadena resistencia contra patógenos biótrofos y hemibiótrofos, mientras que la señal mediada por la combinación de AJ y ET activa la resistencia a patógenos necrótrofos, siendo antagonistas estas dos rutas (Thomma et al., 1998; Glazebrook, 2005; Spoel y Dong, 2008; Bari y Jones, 2009; Van der Does et al., 2013), aunque otros estudios muestran que las defensas mediadas por el AJ son eficaces también frente a patógenos biótrofos o hemibiótrofos (Thaler et al., 2004; Riemann et al., 2013; Han y Kahmann, 2019). La fitohormona ácido abscísico (ABA) interviene en la iniciación de respuestas adaptativas ante diversas condiciones ambientales, aunque en relación a la resistencia a enfermedad se ha considerado que su efecto es negativo (Mauch-Mani y Mauch, 2005). En nuestro estudio se determinó el contenido de las fitohormonas ácido abscísico (ABA), jasmonato (JA) y salicilato (SA) en las tres líneas embriogénicas Q8, E00 y VA511f, analizando las variaciones del mismo según los tratamientos aplicados (elicitación y/o infección).

La elicitación provocó un aumento generalizado de la concentración de ABA, excepto en la línea Q8, que partía con unos niveles muy superiores a las otras dos líneas, mientras que la infección indujo un descenso, sólo significativo en las muestras que habían sido elicidadas previamente. Niveles de ABA inhibidos frente al control indican un aumento de la resistencia a ciertos patógenos en muchos estudios (Henfling et al., 1980; Edwards et al., 1983; Salt et al., 1986; Ward et al., 1989; Li y Heath, 1990; Cahill et al., 1993;

Kettner y Dörfling, 1995; McDonald y Cahill, 1999; Audenaert et al., 2002; Mohr et al., 2003; Koga et al., 2004; Thaler y Bostock, 2004; Mauch-Mani y Mauch, 2005; Asselbergh et al., 2008; Fan et al., 2009; Mialoundama et al., 2009; Lievens et al., 2017), ya que la acumulación de ABA reduce la síntesis de fitoalexinas e inhibe la actividad y acumulación de transcriptos de la PAL (Henfling et al., 1980; Ward et al., 1989; McDonald y Cahill, 1999), además de que es utilizada por los patógenos como una molécula efectora (Schmidt et al., 2008; Lievens et al., 2017). También hay evidencias de que esta hormona interfiere a diferentes niveles con las rutas de respuesta a estrés biótico mediadas por el AS y AJ/ET (Audenaert et al., 2002; Anderson et al., 2004; Mauch-Mani y Mauch, 2005; Asselbergh et al., 2008; De Torres Zabala et al., 2009). Sin embargo, hay trabajos que muestran un efecto positivo de la acumulación de ABA en cuanto a la resistencia a enfermedades causadas por virus, debido a su capacidad de inhibir la transcripción de una  $\beta$ -1,3-glucanasa que puede degradar la  $\beta$ -1,3-glucano calosa, formando una barrera física contra la propagación del virus (Whenham et al., 1986; Beffa et al., 1996; Rezzonico et al., 1998), pero en su interacción con patógenos fúngicos y oomicetos su acumulación compromete la resistencia de los huéspedes (Mauch-Mani y Mauch, 2005).

La variación en el contenido en JA según los tratamientos siguió el mismo patrón en las tres líneas, la elicitación provocó un aumento no significativo de la concentración de JA, manteniéndose la idea de que la tolerancia o resistencia aumentada inducida por la elicitación se manifiesta una vez que la planta es sometida a estrés (Conrath et al., 2006). La infección indujo un fuerte incremento del contenido de esta hormona, pero sólo en las muestras que habían sido elicidadas previamente; las muestras control, tras la infección mostraron niveles de JA similares al control no infectado. Normalmente, como hemos comentado, la ruta de defensa mediada por el AJ es activada por la infección de patógenos necrótrofos (Thomma et al., 1998; Glazebrook, 2005), que promueven la biosíntesis de esta hormona, la cual desencadena la respuesta a estrés (Ramirez-Estrada et al., 2016), por lo que los niveles de JA quizá deberían estar incrementados con respecto al control, mostrando una primera respuesta a estrés, sin embargo, es posible que la infección del material susceptible haya impedido esta respuesta. La infección sí provocó un fuerte aumento del contenido en JA en las muestras elicidadas, este incremento puede considerarse como un marcador de tolerancia al patógeno, al ser común en las tres líneas ensayadas.

El contenido de la hormona SA varió entre las diferentes líneas, siendo superior en la Q8, además, el perfil hormonal observado según los tratamientos también difirió según la línea. En la línea Q8 la elicitación provocó un aumento no significativo, pero notable de la concentración de SA, mientras que la infección provocó descensos en el contenido de esta hormona, tanto en las muestras control como en las elicitadas. En la línea E00 la elicitación no provocó variaciones significativas, y la infección incrementó los niveles de esta hormona en relación al control, de igual manera en las muestras no tratadas que en las previamente elicitadas. En la línea VA5 11f no se observaron cambios dependientes de los tratamientos. Esta irregularidad en la respuesta puede deberse al hecho comentado de que ante la infección de un patógeno necrótrofo, normalmente se activa la ruta de señalización mediada por el JA (Thomma et al., 1998; Glazebrook, 2005; Bari y Jones, 2009), de manera que el SA no intervendría en la activación de defensa, ya que estas dos rutas son generalmente antagonistas (Spoel y Dong, 2008; Van der Does et al., 2013), aunque en ocasiones se haya visto cierto comportamiento sinérgico (Robert-Seilaniantz et al., 2011), observándose en nuestro caso que la concentración de SA es similar en muestras infectadas elicitadas o no, y en otros casos similar en los cuatro tratamientos.

### **V.2.2.5. Evaluación de la actividad ROS**

Las plantas responden al estrés biótico o abiótico mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS); para mitigar los daños producidos por estas moléculas, la planta activa una serie de mecanismos antioxidantes como la producción de enzimas (CAT, SOD, POX, APX) (Lee y Lee, 2000; Han y Lee, 2005; Kim et al., 2005), sin embargo, este fenómeno tiene una duración corta normalmente, de manera que los patógenos, microbios o estreses abióticos pueden acabar produciendo daños en la planta (Singh et al., 2013; García-Cristobal et al., 2015). La elicitación o “priming” con ciertas rizobacterias beneficiosas u otros inductores químicos puede favorecer la actividad antioxidante aumentando y prolongando su efecto si se compara con la de plantas no tratadas (Ruiz-Lozano et al., 2001; Han y Lee, 2005; Kang et al., 2012; Wang et al., 2012; Singh et al., 2013; García-Cristobal et al., 2015; Hanaka et al., 2018; Hasanuzzaman et al., 2019).

En nuestro estudio se midieron las actividades de las enzimas catalasa, peroxidasa y el glutatión total en las líneas embriogénicas Q8, E00 y VA5 11f, tras la elicitación y/o infección.

La actividad catalasa no sufrió variaciones en las líneas Q8 y E00, observándose valores similares en los 4 tratamientos aplicados, sin embargo, en la línea VA5 11f, tanto la elicitación como la infección provocaron decrecimientos de esta actividad enzimática. Las muestras elicidadas e infectadas mostraron los valores más bajos de actividad catalasa, estos resultados no parecen demostrar un aumento de la tolerancia a estrés en las muestras elicidadas, ya que otros estudios relacionan el aumento de las actividades enzimáticas con una mejor tolerancia o resistencia a estrés, como el de Bor et al., (2003), donde la variedad silvestre de remolacha, que es más tolerante a la salinidad que la remolacha azucarera, mostraba niveles más altos en las actividades enzimáticas catalasa (CAT), peroxidasa (POX), ascorbato peroxidasa (APX), superóxido dismutasa (SOD) o glutatión reductasa (GRd), cuando ambas variedades eran sometidas a condiciones de estrés por salinidad. Moradi e Ismail (2007) también demostraron que ciertos genotipos de arroz tolerantes a estrés salino reflejaban una mayor actividad enzimática que otros genotipos no tolerantes, cuando ambos eran sometidos a condiciones desfavorables de salinidad.

La actividad peroxidasa difirió según las líneas y no según los tratamientos, la interacción entre ambos factores no mostró efectos significativos en la línea Q8. En la línea E00 la infección redujo la actividad peroxidasa significativamente en las muestras no tratadas y aumentó esta actividad en las muestras previamente elicidadas. La elicitación también produjo un aumento de esta actividad peroxidasa; estos resultados concuerdan con los de García-Cristobal et al. (2015) y Singh et al. (2013), donde se describen aumentos de la actividad ascorbato peroxidasa (APX) en plántulas de arroz y de garbanzo tratadas con rizobacterias beneficiosas, cuando son sometidas a estrés abiótico (salinidad) y biótico (infección con *Xanthomonas campestris* y *Sclerotium rolfsii*). En la línea VA5 11f no se observó este patrón, la elicitación no produjo cambios en la actividad POX, mientras que la infección provocó un aumento de la actividad enzimática que fue mayor en las muestras no tratadas que en las elicidadas previamente.

El contenido en glutatión dependió de los tratamientos, aunque no se observó un patrón claro común a las tres líneas. En la línea Q8 la elicitación no provocó cambios en la producción de GSH, la infección indujo descensos significativos de la misma, tanto en las muestras control como en las elicidadas. En la línea E00, sin embargo, la elicitación sí promovió un descenso significativo del contenido en glutatión, mientras que la infección no influyó significativamente en el mismo, ya que las muestras infectadas, elicidadas o

no, mostraron valores muy similares al control. Por último, en la línea VA5 11f, la elicitación también indujo un descenso del GSH, aunque no fue significativo y la infección provocó aumentos muy notables del mismo, tanto en muestras control como en las elicidadas, aunque los análisis no permitieron establecer que fuesen significativos. Estos resultados no se corresponden con aquellos en que la elicitación promueve aumentos significativos en la actividad glutatión reductasa cuando el material vegetal es sometido a un estrés abiótico o biótico, como el de García-Cristobal et al. (2015), con plantas de arroz frente a la infección con *Xanthomonas campestris*, o el de Han y Lee (2005) con plantas de lechuga sometidas a estrés salino. Hasanuzzaman et al. (2019) relacionan la sobreexpresión de los enzimas implicados en la ruta asorbato-glutatión con una mayor tolerancia de las plantas al estrés abiótico, reduciendo la concentración de las ROS.

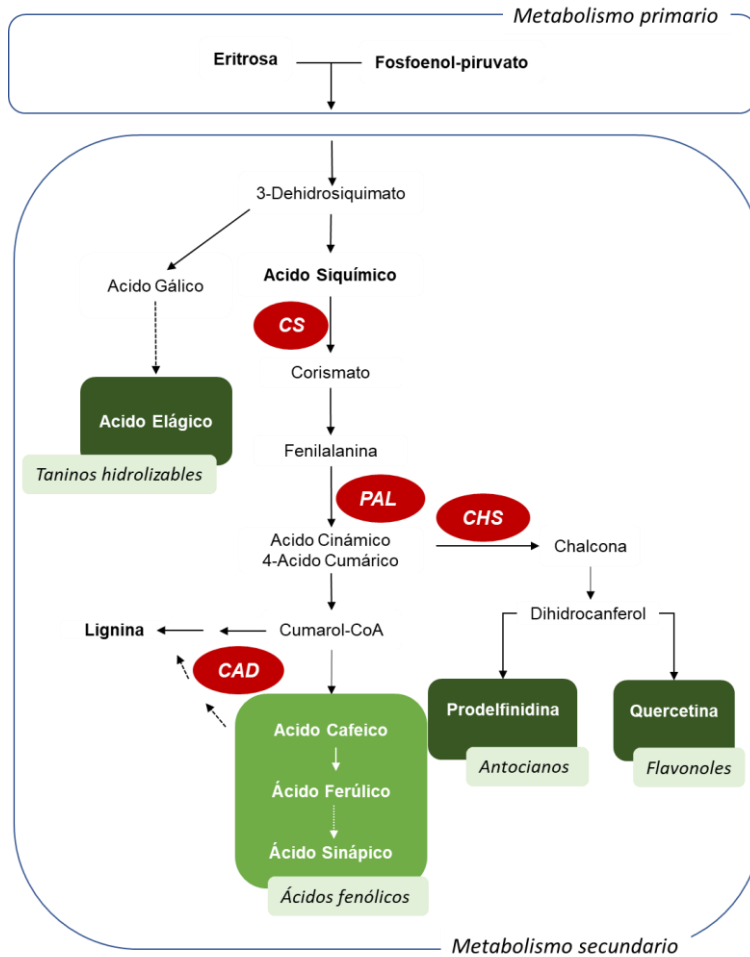
Todo lo anteriormente expuesto demuestra que la elicitación provoca cambios en los niveles de expresión de genes implicados en la síntesis de fenoles, y en los perfiles proteicos, fenólicos y hormonales de las líneas embriogénicas antes y después de la infección con el oomiceto. Es de destacar el efecto del material utilizado, ya que las diferentes líneas embriogénicas presentaban diferente capacidad proliferativa y provenían de diferentes genotipos con distinto nivel de susceptibilidad al oomiceto.

El comportamiento de la línea VA5 11f ha permitido sugerir marcadores de tolerancia que han de ser comprobados. Entre ellos está un elevado nivel basal de expresión de los genes *CSQs* (Corismato Sintasa de *Q. suber*), *ChSQs* (Chalcona Sintasa de *Q. suber*) y *CsTL1* (codifica una proteína similar a la Taumatina de *Castanea sativa*). También debe ser objeto de estudio su elevado contenido en ácido cafeico.

Por último, este trabajo demuestra que la elicitación de líneas embriogénicas de encina de árboles susceptibles a la infección por *Phytophthora cinnamomi* con 50  $\mu$ M de MeJA incrementa la síntesis de compuestos fenólicos principalmente derivados del ácido cinámico (ácidos sinápico, cafeico y ferúlico) y flavonoides (quercetina), y del contenido en ABA y JA. La posterior infección de estas líneas con el oomiceto incrementa la expresión de los genes *PAL* y *CAD*; ambos genes codifican enzimas que catalizan los primeros pasos de las rutas de síntesis de compuestos fenólicos (fenilpropanoides y monómeros de lignina respectivamente (Fig. V.1), lo que indicaría un reforzamiento de las respuestas a la infección. La infección del material elicitado también incrementa la expresión de proteínas implicadas



en la detoxificación de ROS (GBLPA y KPRS4) y en la síntesis de antocianos, así como un incremento en la actividad peroxidasa.



**Figura V.1.** Esquema básico de los genes y de los fenoles estudiados en este trabajo. En rojo los genes *CS* (Corismato Sintasa), *PAL* (Fenilamonió Liasa), *CHS* (Chalcona Sintasa) y *CAD* (Cinamil Alcohol Deshidrogenasa). En recuadro verde los compuestos detectados en las muestras analizadas en este estudio.

La mayoría de estos rasgos también se observaron en la línea Q8, aunque el perfil proteico no fue ensayado en esta línea y el perfil hormonal presentaba un nivel basal de ABA muy elevado y un incremento en SA tras la elicitación. Todos estos resultados apuntan a que la elicitación con MeJA es un tratamiento adecuado para incrementar las defensas en las líneas

embriogénicas de encina. Estos datos deben ser corroborados en un futuro en las plantas generadas a partir de estos embriones.

## **VI. CONCLUSIONES**

---



## VI. CONCLUSIONES

En este trabajo se desarrollan dos estrategias para obtener genotipos de encina tolerantes a *Phytophthora cinnamomi* utilizando como herramienta básica la embriogénesis somática. La primera estrategia aborda la clonación de genotipos escape; la segunda, la inducción de tolerancia mediante la técnica de “priming”. Las principales conclusiones se enumeran a continuación.

### VI.1. Clonación de genotipos escape de encina

1. Se ha determinado la capacidad embriogénica de 33 genotipos de encina, 6 considerados escape y 27 sensibles a la infección por el oomiceto. Esta capacidad depende, en gran medida, del genotipo ensayado.
2. Se han establecido 5 líneas embriogénicas, 4 de ellas provienen de 2 genotipos escape (VA5 y H5).
3. Es necesario optimizar las fases de germinación y aclimatación en encina para la consecución de este primer objetivo de la tesis. Actualmente los esfuerzos de nuestro grupo de investigación se están aplicando en este sentido.

### VI.2. Inducción de memoria epigenética para tolerancia a estrés biótico

4. La elicitación durante periodos cortos de tiempo en medio líquido resultó menos lesiva que la elicitación durante periodos largos en medio sólido.
5. En la línea Ha13 los resultados obtenidos, en base a la inhibición del crecimiento del micelio y producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sugieren que 50 µM de MeJA durante 3 días en medio líquido es el tratamiento más efectivo para mejorar la respuesta a estrés. No obstante, otros elicitors como BABA y AS resultaron efectivos en la línea E00.
6. A pesar de la variabilidad observada en los diferentes análisis, debida, fundamentalmente, al efecto línea, se puede concluir que la elicitación provoca cambios en los niveles de expresión de genes implicados en la síntesis de fenoles, y en los perfiles proteicos, fenólicos y hormonales de las líneas embriogénicas antes y/o después de la infección con el oomiceto.

7. La línea VA5 11f, generada a partir de un árbol escape, presentó, antes de la infección, niveles de expresión de *CAD1Qs*, *ChSQs*, *PALQs* y *CsTL1* superiores a los de las otras dos líneas (Q8 y E00), generadas a partir de genotipos susceptibles. En Q8 y E00 se observaron incrementos en la expresión de *CSQs*, *CAD1Qs* y *PALQs* tras la infección con el oomiceto, corroborando la implicación de estos genes en la respuesta a estrés.
8. La línea escape VA5 11f presentó un perfil fenólico muy diferente a las otras dos líneas, con un elevado contenido en ácido cafeico. Aunque la elicitación con MeJA50 no incrementó la expresión de los genes estudiados en las líneas Q8 y E00, sí se observó un incremento en los niveles de ácidos fenólicos (fundamentalmente ácido cafeico), así como del flavonol quercetina. Sugerimos que el ácido cafeico es un marcador de tolerancia ante estrés inducido por la elicitación.
9. La infección del material elicitado incrementó la expresión de los genes *PALQs* y *CAD1Qs* que codifican enzimas que catalizan los primeros pasos de las rutas de síntesis de compuestos fenólicos, indicando un reforzamiento de las respuestas a la infección debido a la elicitación.
10. La elicitación aumentó la concentración de JA, y la posterior infección indujo un fuerte incremento del contenido de esta hormona en las muestras elicitadas. Esto demuestra que la elicitación potencia las rutas de señalización ante una posterior exposición al estrés.
11. En el análisis del perfil proteico de la línea E00 se demostró que la infección del material elicitado también incrementa la expresión de proteínas implicadas en la detoxificación de ROS y en la síntesis de antocianos, así como la actividad peroxidasa.
12. Estos resultados indican que la elicitación con MeJA es un tratamiento adecuado para incrementar las defensas en las líneas embriogénicas de encina generadas a partir de genotipos susceptibles. Esta información ha de ser corroborada *ex vitro* mediante la infección de las plantas generadas y aclimatadas.
13. El comportamiento de la línea VA5 11f en cuanto a su expresión génica, contenido en fenoles y actividad ROS propone marcadores de tolerancia que se han de comprobar testando la respuesta al oomiceto en raíces de plántulas generadas a partir de este material embriogénico.

**Publicaciones y comunicaciones a congresos derivados de esta memoria**

- Morcillo, M., Sales, E., Ponce, L., Guillén, A., Segura, J., Arrillaga, I., 2020. Effect of elicitors on holm oak somatic embryo development and efficacy inducing tolerance to *Phytophthora cinnamomi*. *Sci. Rep.* 10, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71985-w>
- Morcillo, M., Sánchez-Lucas, R., Alborch, A., Carvalho, K., Martínez, A.P., Guillén, A., Sales, E., Jorrín-Novo, J.V., Segura, J., Arrillaga, I., 2019. Estudio de las variaciones en el perfil hormonal, proteómico y fenólico en embriones somáticos de encina (*Quercus ilex* L.) elicitados y sometidos a estrés biótico. XIII Reunión de la SECIVTV. 11-13 septiembre, Vitoria-Gasteiz. Libro de resúmenes pág. 47 <http://secivtv2019.com/>
- Morcillo, M., Sánchez-Lucas, R., Alborch, A., Carvalho, K., Martínez, A.P., Jorrín-Novo, J.V., Segura, J., Arrillaga, I., 2018. Proteome changes in elicited and infected holm oak somatic embryos. 5th International Conference of the IUFRO Working Party 2.09.02. 10-15 septiembre, Coimbra, Portugal. Book of Abstracts, pp. 140. <https://www.iufro.org/science/divisions/2/20000/20900/20902/publications/>
- Morcillo, M., Ponce, L., Cano, M., Orlando, L., Alborch, A., Cañizares, E., Peris, J.B., Segura, J., Toribio, M., Arrillaga, I., 2017. Estimación de la eficacia de tratamientos elicitores para la inducción de tolerancia a estrés biótico en *Quercus ilex* L. XII Reunión de la SECIVTV. 13-15 septiembre, Madrid. Libro de resúmenes pág. 56. <https://congresos.alcala.fgua.es/secivtv2017>
- Morcillo, M., Ponce, L., Cano, M., Orlando, L., Guillén, A., Alborch, A., Peris, J.B., Segura, J., Arrillaga, I., 2016. Evaluation of induced tolerance to *Phytophthora cinnamomi* in holm oak somatic embryos. En: Park, Y.S., Trontin, J.F. (Eds.). *Development and Application of Vegetative Propagation Technologies in Plantation Forestry to Cope with a Changing Climate and Environment*, 301-307. <https://www.iufro.org/science/divisions/2/20000/20900/20902/publications/>
- Morcillo, M., Cano, M., Peris J.B., Segura, J., Arrillaga, I., 2015. Influencia de la aplicación de exudados de *Phytophthora cinnamomi* y elicitores sobre la proliferación de embriones de encina (*Quercus ilex* L.). XI

Reunión de la SECIVTV. 3-4 septiembre, Valencia. Libro de resúmenes  
pág. 96.

### Colaboración en otras publicaciones

Martínez, M.T., San-José, M. del C., Arrillaga, I., Cano, V., Morcillo, M., Cernadas, M.J., Corredoira, E., 2019. Holm oak somatic embryogenesis: Current status and future perspectives. *Front. Plant Sci.* 10, 239 <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00239>

Corredoira, E., Hernández, I., Morcillo, M., Martínez, M., Ruiz-Galea, M., Cernadas, M., Ramírez- Martín, N., San José, M., Arrillaga, I., Toribio, M., 2018. Holm Oak *Quercus ilex* L. En: Jain, S.M., Gupta, P. (Eds.). *Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis in Important Woody Plants*. For. Sci. Vol. 84, 181–194. Springer, Suiza. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-89483-6>

Jorrín-Novo, J.V., Valledor-González, L., Castillejo-Sánchez, M.A., Sánchez-Lucas, R., Gómez-Gálvez, I.M., López-Hidalgo, C., Guerrero-Sánchez, V.M., Molina-Gómez, M.C., Márquez-Martín, I.C., Carvalho, K., Martínez-González, A.P., Morcillo, M., Papa, M.E., Vargas-Pérez, J.F., 2018. Proteomics Analysis of Plant Tissues Based on Two-Dimensional Gel Electrophoresis. En: Sánchez-Moreiras, A., Reigosa, M. (Eds.). *Advances in Plant Ecophysiology Techniques*, 309-322. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-93233-0\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-319-93233-0_19)

Cano, V., Corredoira, E., Martínez, M.T., Cernadas, M.J., Montenegro, R., Nisa, M., Ramírez, N., Hernández, I., Ruiz Galea, M., Alegre, J., Morcillo, M., Peris, J.B., Segura, J., Ballester, A., Arrillaga, I., San José, M.C., Toribio, M., 2016. Biotechnological approaches to increase tolerance to *Phytophthora* in cork oak and holm oak. *Biolberoamérica (Biotecnología integrando continentes)*. 5-8 junio, Salamanca. Libro de resúmenes pág. 255. <https://www.bioiberoamerica2016.com/>



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

---



**VII. BIBLIOGRAFÍA**

- Abbasi, F.M., Komatsu, S., 2004. A proteomic approach to analyze salt-responsive proteins in rice leaf sheath. *Proteomics* 4, 2072–2081. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300741>
- Ali, S., Ganai, B.A., Kamili, A.N., Bhat, A.A., Mir, Z.A., Bhat, J.A., Tyagi, A., Islam, S.T., Mushtaq, M., Yadav, P., Rawat, S., Grover, A., 2018. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiol. Res.* 212–213, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.008>
- Ali, Z., Smith, I., Guest, D.I., 2000. Combinations of potassium phosphonate and Bion (acibenzolar-S-methyl) reduce root infection and dieback of *Pinus radiata*, *Banksia integrifolia* and *Isopogon cuneatus* caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Australas. Plant Pathol.* 29, 59–63. <https://doi.org/10.1071/AP00009>
- Anderson, J.P., Badruzsaufari, E., Schenk, P.M., Manners, J.M., Desmond, O.J., Ehler, C., Maclean, D.J., Ebert, P.R., Kazan, K., 2004. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in arabidopsis. *Plant Cell* 16, 3460–3479. <https://doi.org/10.1105/tpc.04.025833>
- Arbona, V., Hossain, Z., López-Climent, M.F., Pérez-Clemente, R.M., Gómez-Cadenas, A., 2008. Antioxidant enzymatic activity is linked to waterlogging stress tolerance in citrus. *Physiol. Plant.* 132, 452–466. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01029.x>
- Arentz, F., Simpson, J.A., 1986. Distribution of *Phytophthora cinnamomi* in Papua New Guinea and notes on its origin. *Transactions of the British Mycological Society*, 87, 289–295. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(86\)80032-8](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(86)80032-8)
- Arrillaga, I., Tobolski, J.J., Merkle, S.A., 1994. Advances in somatic embryogenesis and plant production of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). *Plant Cell Rep.* 13, 171–175. <https://doi.org/10.1007/BF00239886>
- Asselbergh, B., Achuo, A.E., Höfte, M., Van Gijsegem, F., 2008. Abscisic acid deficiency leads to rapid activation of tomato defence responses upon infection with *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant Pathol.* 9, 11–24. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00437.x>
- Audenaert, K., De Meyer, G.B., Höfte, M.M., 2002. Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiol.* 128, 491–

501. <https://doi.org/10.1104/pp.010605>
- Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S., 2014. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. Hindawi Publ. Corp. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 360438, 31 pp. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Balci, Y., Balci, S., Eggers, J., MacDonald, W.L., Juzwik, J., Long, R.P., Gottschalk, K.W., 2007. *Phytophthora* spp. associated with forest soils in eastern and north-central U.S. oak ecosystems. *Plant Dis.* 91, 705–710. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-6-0705>
- Ballester, A., Corredoira, E., Vieitez, A. M., 2016. Limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. En: Park, Y.S., Bonga, J.M., Moon, H.K. (Eds.). *Vegetative propagation of forest trees*. (Seoul: National Institute of Forest Science (Nifos)), 56–74. <https://doi.org/10.1080/07352689.2018.1551122>
- Bari, R., Jones, J.D.G., 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* 69, 473–488. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9435-0>
- Barra-Jiménez, A., Blasco, M., Ruiz-Galea, M., Celestino, C., Alegre, J., Arrillaga, I., Toribio, M., 2014. Cloning mature holm oak trees by somatic embryogenesis. *Trees - Struct. Funct.* 28, 657–667. <https://doi.org/10.1007/s00468-014-0979-0>
- Barra-Jiménez, A., 2015. Development of somatic embryogenesis for cloning and conservation of mature holm oak trees. Tesis doctoral Universidad Politécnica de Madrid.
- Baxter, A., Mittler, R., Suzuki, N., 2014. ROS as key players in plant stress signalling. *J. Exp. Bot.* 65, 1229–1240. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert375>
- Beakes, G.W., Glockling, S.L., Sekimoto, S., 2012. The evolutionary phylogeny of the oomycete “fungi.” *Protoplasma* 249, 3–19. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0269-2>
- Beakes, G.W., Honda, T., Thines, M., 2014. Systematics of the Stramenipila: Labyrinthulomycota, Hyphochytridiomycota, and Oomycota. En: McLaughlin, D.J., Spatafora, J. (Eds.). *Systematics and evolution*, 39–97. Springer, New York.
- Beffa, R.S., Hofer, R.M., Thomas, M., Meins, F., 1996. Decreased susceptibility to viral disease of  $\beta$ -1,3-glucanase-deficient plants generated by antisense transformation. *Plant Cell* 8, 1001–1011. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.6.1001>
- Bektas, Y., Eulgem, T., 2015. Synthetic plant defense elicitors. *Front. Plant Sci.* 5, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00804>

- Belhadj, A., Saigne, C., Telef, N., Cluzet, S., Bouscaut, J., Corio-Costet, M.F., Mérillon, J.M., 2006. Methyl jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against *Erysiphe necator*. J. Agric. Food Chem. 54, 9119–9125. <https://doi.org/10.1021/jf0618022>
- Bercetche, J., Pâques, M., 1995. Somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*). En: Jain, S., Gupta, P.K., Newton, R.J. (Eds.). *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, vol 3 (Gymnosperms), 269-285. Kluwer, Dordrecht, Netherlands.
- Blackwell, E., 1949. Terminology in *Phytophthora*. CAB Mycolog. Pap. 30, 1-24
- Blanco, E., Casado, M. A., Costa, M., Escribano, R., García, M., Génova, M., Gómez, A., Gómez, F., Moreno, J.C., Morla, C., Regato, P., Sainz, H., 2005. *Los bosques ibéricos, una interpretación geobotánica*. Planeta S.A., España, 598 p.
- Blasco, M., 2013. Aplicaciones de la embriogénesis somática para la propagación y mejora de *Quercus ilex* L. y *Pinus* spp. Tesis doctoral Universidad de Valencia.
- Blasco, M., Barra, A., Brisa, C., Corredoira, E., Segura, J., Toribio, M., Arrillaga, I., 2013. Somatic embryogenesis in holm oak male catkins. Plant Growth Regul. 71, 261–270. <https://doi.org/10.1007/s10725-013-9826-3>
- Bonga, J.M., Klimaszewska, K.K., Von Aderkas, P., 2010. Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. Plant Cell. Tissue Organ Cult. 100, 241–254. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9647-2>
- Bonga, J.M., Von Aderkas, P., 1992. Clonal propagation. En: Bonga, J.M., Von Aderkas, P. (Eds.). *In vitro Culture of Trees*, 107– 108. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Bor, M., Özdemir, F., Türkan, I., 2003. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. Plant Sci. 164, 77–84. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00338-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00338-2)
- Boyko, A., Kovalchuk, I., 2011. Genome instability and epigenetic modification-heritable responses to environmental stress? Curr. Opin. Plant Biol. 14, 260–266. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.003>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brasier, C.M., 1999. *Phytophthora* Pathogens of Trees : Their Rising Profile in Europe. For. Commision Inf. Note 30, 1–6.

- Brasier, C.M., 1996. *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Ann. des Sci. For.* 53, 347–358. <https://doi.org/10.1051/forest:19960217>
- Brasier, C. M., Robredo, F., Ferraz, J. F. P., 1993. Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. *Plant. Pathol.* 42, 140–145. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1993.tb01482.x>
- Breen, S., Williams, S.J., Outram, M., Kobe, B., Solomon, P.S., 2017. Emerging Insights into the Functions of Pathogenesis-Related Protein 1. *Trends Plant Sci.* 22, 871–879. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.06.013>
- Brill, E.M., Abrahams, S., Hayes, C.M., Jenkins, C.L.D., Watson, J.M., 1999. Molecular characterisation and expression of a wound-inducible cDNA encoding a novel cinnamyl-alcohol dehydrogenase enzyme in lucerne (*Medicago sativa* L.). *Plant Mol. Biol.* 41, 279–291. <https://doi.org/10.1023/A:1006381630494>
- Brodersen, P., Petersen, M., Nielsen, H.B., Zhu, S., Newman, M.A., Shokat, K.M., Rietz, S., Parker, J., Mundy, J., 2006. Arabidopsis MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *Plant J.* 47, 532–546. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02806.x>
- Burgess, T.I., Scott, J.K., Mcdougall, K.L., Stukely, M.J.C., Crane, C., Dunstan, W.A., Brigg, F., Andjic, V., White, D., Rudman, T., Arentz, F., Ota, N., Hardy, G.E.S.J., 2017. Current and projected global distribution of *Phytophthora cinnamomi*, one of the world's worst plant pathogens. *Glob. Chang. Biol.* 23, 1661–1674. <https://doi.org/10.1111/gcb.13492>
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Cahill, D.M., Rookes, J.E., Wilson, B.A., Gibson, L., McDougall, K.L., 2008. Turner review no. 17. *Phytophthora cinnamomi* and Australia's biodiversity: Impacts, predictions and progress towards control. *Aust. J. Bot.* 56, 279–310. <https://doi.org/10.1071/BT07159>
- Cahill, D.M., Morris, P.F., Ward, E.W.B., 1993. Influence on abscisic acid levels in soybean hypocotyls infected with *Phytophthora sojae*. *Physiol Mol Plant Pathol*, 42, 109-121.
- Camarero, J.J., Lloret, F., Corcuera, L., Peñuelas, J., Gil-pelegrín, E., 2004. Cambio global y decaimiento del bosque. *Ecología del bosque Mediterráneo en un mundo cambiante*. Valladares F. (ed), pp. 397-423. Organismo Autónomo de Parques Nacionales, Ministerio de Medio

Ambiente.

- Cameron, R.K., Paiva, N.L., Lamb, C.J., Dixon, R.A., 1999. Accumulation of salicylic acid and PR-1 gene transcripts in relation to the systemic acquired resistance (SAR) response induced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato in Arabidopsis. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55, 121–130. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1999.0214>
- Camilo-Alves, C. de S. e P., da Clara, M.I.E., de Almeida Ribeiro, N.M.C., 2013. Decline of Mediterranean oak trees and its association with *Phytophthora cinnamomi*: A review. *Eur. J. For. Res.* 132, 411–432. <https://doi.org/10.1007/s10342-013-0688-z>
- Camisón, Á., Martín, M.Á., Oliva, J., Elfstrand, M., Solla, A., 2019. Increased tolerance to *Phytophthora cinnamomi* in offspring of ink-diseased chestnut (*Castanea sativa* Miller) trees. *Ann. For. Sci.* 76. <https://doi.org/10.1007/s13595-019-0898-8>
- Campos, P., Huntsinger, L., Oviedo, J.L., Díaz, M., Starrs, P., Standiford, R.B., Montero, G. (Eds.). 2013. Mediterranean Oak Woodland Working Landscapes: Dehesas of Spain and Ranchlands of California. Springer, Nueva York, Estados Unidos. 497 p.
- Cano, V., Martínez, M.T., Couselo, J.L., Varas, E., Vieitez F.J., Corredoira, E., 2021. Efficient Transformation of Somatic Embryos and Regeneration of Cork Oak Plantlets with a Gene (*CsTL1*) Encoding a Chestnut Thaumatin-Like Protein. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1757. <https://doi.org/10.3390/ijms22041757>
- Cano, V., 2020. Transformación genética de alcornoque y encina con una proteína tipo taumatina con actividad antifúngica. Tesis doctoral Universidad de Santiago de Compostela.
- Cano, V., Martínez, M.T., San José, M.C., Couselo, J.L., Varas, E., Bouza-Morcillo, L., Toribio, M., Corredoira, E., 2020. Regeneration of transgenic plants by Agrobacterium-mediated transformation of *Quercus ilex* L. somatic embryos with the gene *CsTL1*. *New For.* 51, 1003–1021. <https://doi.org/10.1007/s11056-020-09771-9>
- Castillejo, M.Á., Fernández-Aparicio, M., Rubiales, D., 2012. Proteomic analysis by two-dimensional differential in gel electrophoresis (2D DIGE) of the early response of *Pisum sativum* to *Orobanche crenata*. *J. Exp. Bot.* 63, 107–119. <https://doi.org/10.1093/jxb/err246>
- Castillejo, M.A., Maldonado, A.M., Ogueta, S., Jorriin, J. V., 2008. Proteomic Analysis of Responses to Drought Stress in Sunflower (*Helianthus annuus*) Leaves by 2DE Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. *Open Proteomics J.* 1, 59–71. <https://doi.org/10.2174/1875039700801010059>

- Castro-Díez, P., Villar-Salvador, P., Pérez-Rontomé, C., Maestro-Martínez, M., Montserrat-Martí, G., 1997. Leaf morphology and leaf chemical composition in three *Quercus* (Fagaceae) species along a rainfall gradient in NE Spain. *Trees - Struct. Funct.* 11, 127–134. <https://doi.org/10.1007/s004680050068>
- Cavalier-Smith, T., Chao, E.E.Y., 2006. Phylogeny and megasystematics of phagotrophic heterokonts (kingdom Chromista). *J. Mol. Evol.* 62, 388–420. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0353-8>
- Celestino, C., Hernandez, I., Carneros, E., Lopez-Vela, D., Toribio, M., 2005. Somatic embryogenesis as a main tool in forest biotechnology. *Investig. Agrar. Sist. y Recur. For.* 14, 345. <https://doi.org/10.5424/srf/2005143-00925>
- Cernadas, M.J., Martínez, M.T., Corredoira, E., Del Carmen San José, M., 2018. Conservation of holm oak (*Quercus ilex*) by in vitro culture. *Mediterr. Bot.* 39, 97–104. <https://doi.org/10.5209/MBOT.60779>
- Cervilla, L.M., Blasco, B., Ríos, J.J., Romero, L., Ruiz, J.M., 2007. Oxidative stress and antioxidants in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants subjected to boron toxicity. *Ann. Bot.* 100, 747–756. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm156>
- Chaves, I., Passarinho, J.A., Capitão, C., Chaves, M.M., Fevereiro, P., Ricardo, C.P., 2011. Temperature stress effects in *Quercus suber* leaf metabolism. *J. Plant Physiol.* 168, 1729–1734. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.05.013>
- Cheeseman, J., 2007. Hydrogen peroxide and plant stress: a challenging relationship. *Plant Stress* 1, 4–15.
- Chong, T.M., Abdullah, M.A., Fadzillah, N.M., Lai, O.M., Lajis, N.H., 2005. Jasmonic acid elicitation of anthraquinones with some associated enzymic and non-enzymic antioxidant responses in *Morinda elliptica*. *Enzyme Microb. Technol.* 36, 469–477. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.11.002>
- Choudhury, H., Kumaria, S., Tandon, P., 2008. Induction and maturation of somatic embryos from intact megagametophyte explants in Khasi pine (*Pinus kesiya* Royle ex. Gord.). *Curr. Sci.* 95, 1433–1438.
- Chung, I.-M., Thiruvengadam, M., Rekha, K., Rajakumar, G., 2016. Elicitation Enhanced the Production of Phenolic Compounds and Biological Activities in Hairy Root Cultures of Bitter melon (*Momordica charantia* L.). *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 59, 1–10. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016160393>
- Coke, J.E., 1996. Basal nutrient medium for *in vitro* cultures of loblolly pine. Patent #5, 534, 443.



- Conrath, U., 2011. Molecular aspects of defence priming. *Trends Plant Sci.* 16, 524–531. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.06.004>
- Conrath, U., Beckers, G.J.M., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M.A., Pieterse, C.M.J., Poinssot, B., Pozo, M.J., Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L., Mauch-Mani, B., 2006. Priming: Getting ready for battle. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19, 1062–1071. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1062>
- Conrath, U., Beckers, G.J.M., Langenbach, C.J.G., Jaskiewicz, M.R., 2015. Priming for Enhanced Defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53, 97–119. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120132>
- Corcobado, T., Cubera, E., Juárez, E., Moreno, G., Solla, A., 2014. Drought events determine performance of *Quercus ilex* seedlings and increase their susceptibility to *Phytophthora cinnamomi*. *Agric. For. Meteorol.* 192–193, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2014.02.007>
- Corcobado, T., Cubera, E., Moreno, G., Solla, A., 2013. *Quercus ilex* forests are influenced by annual variations in water table, soil water deficit and fine root loss caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Agric. For. Meteorol.* 169, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2012.09.017>
- Corral, M., Fidalgo, C., Peco, B., 2018. Factores ambientales en la distribución de la seca en la encina. *Espacio Tiempo y Forma. Serie VI, Geografía* 11, 107–120. <https://doi.org/10.5944/etfvi.11.2018.21777>
- Corredoira, E., Merkle, S.A., Martínez, M.T., Toribio, M., Canhoto, J.M., Correia, S.I., Ballester, A., Vieitez, A.M., 2019. Non-Zygotic Embryogenesis in Hardwood Species. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 38, 29–97. <https://doi.org/10.1080/07352689.2018.1551122>
- Corredoira, E., Hernández, I., Morcillo, M., Martínez, M., Ruiz-Galea, M., Cernadas, M., Ramírez-Martín, N., San José, M., Arrillaga, I., Toribio, M., 2018. Holm Oak *Quercus ilex* L. En: Jain, S.M., Gupta, P. (Eds.). *Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants*. For. Sci. Vol. 84, 181–194. Springer, Suiza. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-89483-6>
- Corredoira, E., Toribio, M., Vieitez, A. M., 2014. Clonal propagation via somatic embryogenesis in *Quercus* spp. En: Ramawat, K.G, Mérillon, J.M., Ahuja, M.R. (Eds.). *Tree biotechnology*, 262-302. Boca Raton: CRC Press. <http://dx.doi.org/10.1201/b16714-4>
- Corredoira, E., San José, M. C., Vieitez, A. M., 2012. Induction of somatic embryogenesis from different explants of shoot cultures derived from young *Quercus alba* trees. *Trees* 26, 881–891. <https://doi.org/10.1007/s00468-011-0662-7>

- Crandall, B. S., 1950. The distribution and significance of the chestnut root rot *Phytophthora*, *P. cinnamomi* and *P. cambivora*. Plant Dis. Rep. 34, 194–196.
- Crespo, M., 1988. Atlas de botànica. Flora i vegetació. Edibook S.A., Barcelona, España.
- Cuenca, B., Rodriguez, L., Gragera, J., Berdon, L., Luquero, L., Ocaña, L., Solla, A., 2017. Mejora de alcornoques y encinas de Extremadura ante *Phytophthora cinnamomi*: selección de genotipos resistentes. 7º Congreso For. Español.
- Cuenca, B., San-José, M.C., Martínez, M.T., Ballester, A., Vieitez, A.M., 1999. Somatic embryogenesis from stem and leaf explants of *Quercus robur* L. Plant Cell Rep. 18, 538–543. <https://doi.org/10.1007/s002990050618>
- Cunniffe, N.J., Cobb, R.C., Meentemeyer, R.K., Rizzo, D.M., Gilligan, C.A., 2016. Modeling when, where, and how to manage a forest epidemic, motivated by sudden oak death in California. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 113, 5640–5645. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602153113>
- de Jesús-Pires, C., Ferreira-Neto, J.R.C., Pacifico Bezerra-Neto, J., Kido, E.A., de Oliveira Silva, R.L., Pandolfi, V., Wanderley-Nogueira, A.C., Binneck, E., da Costa, A.F., Pio-Ribeiro, G., Pereira-Andrade, G., Sittolin, I.M., Freire-Filho, F., Benko-Iseppon, A.M., 2019. Plant Thaumatin-like Proteins: Function, Evolution and Biotechnological Applications. Curr. Protein Pept. Sci. 21, 36–51. <https://doi.org/10.2174/1389203720666190318164905>
- de Torres Zabala, M., Bennett, M.H., Truman, W.H., Grant, M.R., 2009. Antagonism between salicylic and abscisic acid reflects early host-pathogen conflict and moulds plant defence responses. Plant J. 59, 375–386. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03875.x>
- Dempsey, D.A., Klessig, D.F., 2012. SOS - too many signals for systemic acquired resistance? Trends Plant Sci. 17, 538–545. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.05.011>
- Dempsey, R.W., Merchant, A., Tausz, M., 2012. Differences in ascorbate and glutathione levels as indicators of resistance and susceptibility in Eucalyptus trees infected with *Phytophthora cinnamomi*. Tree Physiol. 32, 1148–1160. <https://doi.org/10.1093/treephys/tps076>
- Deng, Y., Lu, S., 2017. Biosynthesis and Regulation of Phenylpropanoids in Plants. CRC. Crit. Rev. Plant Sci. 36, 257–290. <https://doi.org/10.1080/07352689.2017.1402852>
- Destro, T., Prasad, D., Martignago, D., Lliso Bernet, I., Trentin, A.R., Renu, I.K., Ferretti, M., Masi, A., 2011. Compensatory expression and substrate inducibility of  $\gamma$ -glutamyl transferase GGT2 isoform in *Arabidopsis*

- thaliana*. J. Exp. Bot. 62, 805–814. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq316>
- Díaz, M., Pulido, F. J., 2009. 6310 Dehesas perennifolias de *Quercus* spp. VV.AA, *Bases ecológicas preliminares para la conservación de los tipos de hábitat de interés comunitario en España*. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (ed). Madrid, España, 69 p.
- Dixon, R.A., 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411, 843–847. <https://doi.org/10.1038/35081178>
- Dixon, R.A., Paiva, N.L., 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7, 1085–1097. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1085>
- Dodds, P.N., Rathjen, J.P., 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* 11, 539–548. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>
- Dotor, M.Y., Cabezas, M., 2014. Mecanismos De Resistencia Sistémica En Plantas. *Acta Iguazu* 3, 1–19. <https://doi.org/10.48075/actaiguaz.v3i2.10277>
- Drenth, A., Guest, D.I., 2004. *Phytophthora* in the tropics. En: Drenth, A., Guest, D.I. (Eds.). *Diversity and Management of Phytophthora in Southeast Asia*. Australian Centre for International Agricultural Research, Monograph No 114, 30–41, Canberra, Australia.
- Duque-Lazo, J., Navarro-Cerrillo, R.M., van Gils, H., Groen, T.A., 2018. Forecasting oak decline caused by *Phytophthora cinnamomi* in Andalusia: Identification of priority areas for intervention. *For. Ecol. Manage.* 417, 122–136. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.02.045>
- Duque-Lazo, J., van Gils, H., Groen, T.A., Navarro-Cerrillo, R.M., 2016. Transferability of species distribution models: The case of *Phytophthora cinnamomi* in Southwest Spain and Southwest Australia. *Ecol. Modell.* 320, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2015.09.019>
- Durrant, W.E., Dong, X., 2004. Systemic Acquired Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 185–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>
- Ebadzad, G., Medeira, C., Maia, I., Martins, J., Cravador, A., 2015. Induction of defence responses by cinnamomins against *Phytophthora cinnamomi* in *Quercus suber* and *Quercus ilex* subs. *rotundifolia*. *Eur. J. Plant Pathol.* 143, 705–723. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0721-9>
- Echevarría-Zomeño, S., Ariza, D., Jorge, I., Lenz, C., Del Campo, A., Jorrín, J. V., Navarro, R.M., 2009. Changes in the protein profile of *Quercus ilex* leaves in response to drought stress and recovery. *J. Plant Physiol.* 166, 233–245. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.05.008>

- Edwards, H.H. 1983. Effect of kinetin, abscisic acid and cations on host-parasite relation of barley inoculated with *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. J Phytopath., 107, 22-30. <https://doi.org/10.1111/jph.1983.107.1.22>
- Erwin, D. C., Ribeiro, O. K., 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. *Experimental Agriculture*, 34, 125-130. American Phytopathological Society Press, St Paul, Minnesota, 562 p. <https://doi.org/10.1017/S001447979825109X>
- Escandón, M., Jorrín-Novo, J. V., Castillejo, M.Á., 2021. Application and optimization of label-free shotgun approaches in the study of *Quercus ilex*. J. Proteomics 233. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.104082>
- Fan, J., Hill, L., Crooks, C., Doerner, P., Lamb, C., 2009. Abscisic acid has a key role in modulating diverse plant-pathogen interactions. *Plant Physiol.* 150, 1750–1761. <https://doi.org/10.1104/pp.109.137943>
- Fawke, S., Doumane, M., Schornack, S., 2015. Oomycete Interactions with Plants: Infection Strategies and Resistance Principles. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79, 263–280. <https://doi.org/10.1128/membr.00010-15>
- Fehér, A., Pasternak, T., Dudits, D., 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 74, 201–228. <https://doi.org/10.1023/A:1024033216561>
- Fernández-Guijarro, B., Celestino, C., Toribio, M., 1995. Influence of external factors on secondary embryogenesis and germination in somatic embryos from leaves of *Quercus suber*. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 41, 99–106. <https://doi.org/10.1007/BF00051578>
- Fisher, R., Beck, W., Calatayud, V., Cools, N., De Vos, B., Dobbertin, M., Fleco, S., Giordani, P., Granke, O., Kindermann, G., Lorenz, M., Meesenburg, H., Meining, S., Ángel, H.-D., Neumann, M., Scheuschner, T., Stofer, S., 2011. The condition of forests in Europe. Technical Report of ICP Forests and European Commission. 21 p.
- Fu, Z.Q., Dong, X., 2013. Systemic acquired resistance: Turning local infection into global defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 839–863. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105606>
- Fuster, M. D., García-Puig, D., Ortuño, A., Botía, J. M., Sabater, F., Porras, I., García-Lidón, A., Del Río, J. A., 1995. Selection of Citrus highly productive in secondary metabolites of industrial interest. Modulation of synthesis and/or accumulation processes. En: García-Viguera, C., Castañer, M., Gil, M.I., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F.A. (Eds.). *Current Trends in Fruit and Vegetable Phytochemistry*, 81-85. CSIC, Madrid.
- Gaj, M.D., 2004. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.)

- Heynh. *Plant Growth Regul.* 43, 27–47. <https://doi.org/10.1023/B:GROW.0000038275.29262.fb>
- Gallardo, A., Morcuende, D., Solla, A., Moreno, G., Pulido, F., Quesada, A., 2019. Regulation by biotic stress of tannins biosynthesis in *Quercus ilex*: Crosstalk between defoliation and *Phytophthora cinnamomi* infection. *Physiol. Plant.* 165, 319–329. <https://doi.org/10.1111/ppl.12848>
- Gallego, F.J., Perez De Algaba, A., Fernandez-Escobar, R., 1999. Etiology of oak decline in Spain. *Eur. J. For. Pathol.* 29, 17–27. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0329.1999.00128.x>
- García-Casado, G., Collada, C., Allona, I., Soto, A., Casado, R., Rodríguez-Cerezo, E., Gomez, L., Aragoncillo, C., 2000. Characterization of an apoplastic basic thaumatin-like protein from recalcitrant chestnut seeds. *Physiol. Plant.* 110, 172–180. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.110205.x>
- García-Cristobal, J., García-Villaraco, A., Ramos, B., Gutierrez-Mañero, J., Lucas, J.A., 2015. Priming of pathogenesis related-proteins and enzymes related to oxidative stress by plant growth promoting rhizobacteria on rice plants upon abiotic and biotic stress challenge. *J. Plant Physiol.* 188, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.09.011>
- García-Martín, G., González-Benito, M., Manzanera, J., 2001. *Quercus suber* L. somatic embryo germination and plant conversion: pretreatments and germination conditions. *Vitr. Cellu.Dev. Biol. - Plant* 37, 190–198.
- Gea-Izquierdo, G., Cañellas, I., Montero, G., 2006. Acorn production in Spanish holm oak woodlands. *Investig. Agrar. Sist. y Recur. For.* 15, 339–354. <https://doi.org/10.5424/srf/2006153-00976>
- Gea-Izquierdo, G., Fernández-de-Uña, L., Cañellas, I., 2013. Growth projections reveal local vulnerability of Mediterranean oaks with rising temperatures. *For. Ecol. Manage.* 305, 282–293. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2013.05.058>
- George, E., Hall, M., De Klerk, J., 2008. Morphogenesis and haploid plants. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Vol. 1. The background. Springer, Dordrecht.
- Ghosh, P., Bhattacharya, A., Char, B., 2017. Manipulating disease and pest resistance pathways in plants for enhanced crop improvement. *Biosci. Biotechnol. Res. Commun.* 10, 631–644. <https://doi.org/10.21786/bbrc/10.4/5>
- Gianinazzi, S., Kassanis, B., 1974. Virus resistance induced in plants by polyacrylic acid. *J. Gen. Virol.* 23, 1–9. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-23-1-1>

- Giorgi, F., 2006. Climate change hot-spots. *Geophys. Res. Lett.* 33, 1–4. <https://doi.org/10.1029/2006GL025734>
- Giri, C.C., Zaheer, M., 2016. Chemical elicitors versus secondary metabolite production in vitro using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 126, 1–18. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-0985-6>
- Gläßgen, W.E., Rose, A., Madlung, J., Koch, W., Gleitz, J., Seitz, H.U., 1998. Regulation of enzymes involved in anthocyanin biosynthesis in carrot cell cultures in response to treatment with ultraviolet light and fungal elicitors. *Planta* 204, 490–498. <https://doi.org/10.1007/s004250050283>
- Glazebrook, J., 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 205–227. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923>
- González-Benito, M.E., García-Martín, G., Manzanera, J.A., 2002. Shoot development in *Quercus suber* L. Somatic embryos. *Vitr. Cell. Dev. Biol. Plant* 38, 477–480. <https://doi.org/10.1079/IVP2002318>
- González-Chavira, M.M., Estefanía-Ojeda, S., Pons-Hernández, J.L., Guevara-González, R.G., Guzmán Maldonado, S.H., 2018. Cambios en el contenido de compuestos fenólicos, esteviosidos y nivel de metilación en *Stevia rebaudiana* elicitada. *Rev. Mex. Ciencias Agrícolas* 9, 1435–1446. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i7.1314>
- González-Rodríguez, V., Navarro-Cerrillo, R.M., Villar, R., 2011. Artificial regeneration with *Quercus ilex* L. and *Quercus suber* L. by direct seeding and planting in southern Spain. *Ann. For. Sci.* 68, 637–646. <https://doi.org/10.1007/s13595-011-0057-3>
- Gozzo, F., Faoro, F., 2013. Systemic acquired resistance (50 years after discovery): Moving from the lab to the field. *J. Agric. Food Chem.* 61, 12473–12491. <https://doi.org/10.1021/jf404156x>
- Gresshoff, P.M., Doy, C.H., 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum*. *Planta* 107, 161–170. <https://doi.org/10.1007/BF00387721>
- Halperin, W., 1966. Alternative morphogenetic events in cell suspensions. *Am. J. Bot.* 53, 443–453
- Han, H.S., Lee, K.D., 2005. Plant Growth Promoting Rhizobacteria Effect on Antioxidant Status, Photosynthesis, Mineral Uptake and Growth of Lettuce under Soil Salinity. *Res. J. Agric. & Biol. Sci.* 1, 210–215.
- Han, X., Kahmann, R., 2019. Manipulation of phytohormone pathways by effectors of filamentous plant pathogens. *Front. Plant Sci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00822>

- Hanaka, A., Lechowski, L., Mroczek-Zdyrska, M., Strubińska, J., 2018. Oxidative enzymes activity during abiotic and biotic stresses in *Zea mays* leaves and roots exposed to Cu, methyl jasmonate and *Trigonotylus caelestialium*. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 24, 1–5. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0479-y>
- Hardham, A.R., Blackman, L.M., 2018. *Phytophthora cinnamomi*. *Mol. Plant Pathol.* 19, 260–285. <https://doi.org/10.1111/mpp.12568>
- Hasanuzzaman, M., Borhannuddin Bhuyan, M.H.M., Anee, T.I., Parvin, K., Nahar, K., Al Mahmud, J., Fujita, M., 2019. Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress. *Antioxidants* 8. <https://doi.org/10.3390/antiox8090384>
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Anee, T.I., Fujita, M., 2017. Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 23, 249–268. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0422-2>
- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 125, 189–198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Heijari, J., Nerg, A.M., Kainulainen, P., Viiri, H., Vuorinen, M., Holopainen, J.K., 2005. Application of methyl jasmonate reduces growth but increases chemical defence and resistance against *Hyllobius abietis* in Scots pine seedlings. *Entomol. Exp. Appl.* 115, 117–124. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2005.00263.x>
- Henfling, J., Bostock, R., Kuc, J., 1980. Effect of Abscisic Acid on Rishitin and Lubimin Accumulation and Resistance to *Phytophthora infestans* and *Cladosporium cucumerinum* in Potato Tuber Tissue Slices. *Phytopathology* 70, 1074-1078. <https://doi.org/10.1094/phyto-70-1074>
- Henry, E., Yadeta, K.A., Coaker, G., 2013. Recognition of bacterial plant pathogens: Local, systemic and transgenerational immunity. *New Phytol.* 199, 908–915. <https://doi.org/10.1111/nph.12214>
- Hernandez, I., 2007. Regeneración clonal de alcornoques adultos (*Quercus suber* L.) mediante embriogénesis somática. Tesis doctoral. Universidad de Alcalá de Henares. Madrid.
- Hernández, I, Celestino, C., Alegre, J., Toribio, M., 2003. Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis. II. Plant regeneration from selected cork oak trees. *Plant Cell Rep.* 21, 765–770. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0604-y>
- Hernández, I., Celestino, C., Toribio, M., 2003. Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis: I. Factors affecting the

- induction in leaves from mature cork oak trees. *Plant Cell Rep.* 21, 759–764. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0605-x>
- Herrmann, A., König, S., Lechtenberg, M., Sehlbach, M., Vakhrushev, S.Y., Peter-Katalinic, J., Hensel, A., 2012. Proteoglycans from *boswellia serrata* roxb. and *B. carteri* Birdw. and identification of a proteolytic plant basic secretory protein. *Glycobiology* 22, 1429–1439. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws107>
- Hickman, C. J., 1958. *Phytophthora* – plant destroyer. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 41, 1–13.
- Hiraga, S., Ito, H., Sasaki, K., Yamakawa, H., Mitsuhara, I., Toshima, H., Matsui, H., Honma, M., Ohashi, Y., 2000. Wound-induced expression of a tobacco peroxidase is not enhanced by ethephon and suppressed by methyl jasmonate and coronatine. *Plant Cell Physiol.* 41, 165–170. <https://doi.org/10.1093/pcp/41.2.165>
- Holeski, L.M., Jander, G., Agrawal, A.A., 2012. Transgenerational defense induction and epigenetic inheritance in plants. *Trends Ecol. Evol.* 27, 618–626. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.07.011>
- Holopainen, J.K., Heijari, J., Nerg, A.-M., Vuorinen, M., Kainulainen, P., 2009. Potential for the Use of Exogenous Chemical Elicitors in Disease and Insect Pest Management of Conifer Seedling Production. *Open For. Sci. J.* 2, 17–24. <https://doi.org/10.2174/1874398600902010017>
- Horta, M., Caetano, P., Medeira, C., Maia, I., Cravador, A., 2010. Involvement of the  $\beta$ -cinnamomin elicitor in infection and colonisation of cork oak roots by *Phytophthora cinnamomi*. *Eur. J. Plant Pathol.* 127, 427–436. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9609-x>
- Horta, M., Sousa, N., Coelho, A.C., Neves, D., Cravador, A., 2008. In vitro and in vivo quantification of elicitor expression in *Phytophthora cinnamomi*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 73, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2009.02.003>
- Höxtermann, E., 1997. Cellular “elementary organisms” in vitro. The early vision of Gottlieb Haberlandt and its realization. *Physiol. Plant.* 100, 716–728. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1997.1000336.x>
- Ito, M., Ichinose, Y., Kato, H., Shiraishi, T., Yamada, T., 1997. Molecular evolution and functional relevance of the chalcone synthase genes of pea. *Mol. Gen. Genet.* 255, 28–37. <https://doi.org/10.1007/s004380050471>
- Jaiti, F., Verdeil, J.L., El Hadrami, I., 2009. Effect of jasmonic acid on the induction of polyphenoloxidase and peroxidase activities in relation to date palm resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. albedinis. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 74, 84–90. <https://doi.org/10.1016/>



- j.pmpp.2009.09.005
- Jaskiewicz, M., Conrath, U., Peterhänsel, C., 2011. Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response. *EMBO Rep.* 12, 50–55. <https://doi.org/10.1038/embor.2010.186>
- Jiang, L., Jin, P., Wang, L., Yu, X., Wang, H., Zheng, Y., 2015. Methyl jasmonate primes defense responses against *Botrytis cinerea* and reduces disease development in harvested table grapes. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 192, 218–223. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.06.015>
- Jones, J.D.G., Dangl, J.L., 2006. The plant immune system. *Nature* 444, 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Jung, T., Blaschke, H., Neumann, P., 1996. Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. *Eur. J. For. Pathol.* 26, 253–272. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.1996.tb00846.x>
- Jung, T., Chang, T.T., Bakonyi, J., Seress, D., Pérez-Sierra, A., Yang, X., Hong, C., Scanu, B., Fu, C.H., Hsueh, K.L., Maia, C., Abad-Campos, P., León, M., Horta Jung, M., 2017. Diversity of *Phytophthora* species in natural ecosystems of Taiwan and association with disease symptoms. *Plant Pathol.* 66, 194–211. <https://doi.org/10.1111/ppa.12564>
- Jung, T., Colquhoun, I.J., Hardy, G.E.S.J., 2013. New insights into the survival strategy of the invasive soilborne pathogen *Phytophthora cinnamomi* in different natural ecosystems in Western Australia. *For. Pathol.* 43, 266–288. <https://doi.org/10.1111/efp.12025>
- Jung, T., Cooke, D.E.L., Blaschke, H., Duncan, J.M., Oßwald, W., 1999. *Phytophthora quercina* sp. nov., causing root rot of European oaks. *Mycol. Res.* 103, 785–798. <https://doi.org/10.1017/S0953756298007734>
- Jung, T., Dobler, G., 2002. First Report of Littleleaf Disease Caused by *Phytophthora cinnamomi* on *Pinus occidentalis* in the Dominican Republic. *Plant Dis.* 86, 1275. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.11.1275C>
- Jung, T., Pérez-Sierra, A., Durán, A., Jung, M.H., Balci, Y., Scanu, B., 2018. Canker and decline diseases caused by soil- and airborne *Phytophthora* species in forests and woodlands. *Persoonia Mol. Phylogeny Evol. Fungi* 40, 182–220. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.40.08>
- Kang, G., Li, G., Xu, W., Peng, X., Han, Q., Zhu, Y., Guo, T., 2012. Proteomics reveals the effects of salicylic acid on growth and tolerance to subsequent drought stress in wheat. *J. Proteome Res.* 11, 6066–6079. <https://doi.org/10.1021/pr300728y>

- Kassanis, B., White, R.F., 1975. Polyacrylic acid-induced resistance to tobacco mosaic virus in tobacco cv. Xanthi. *Ann. Appl. Biol.* 79, 215–220. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1975.tb01535.x>
- Kauss, H., Theisinger-Hinkel, E., Mindermann, R., Conrath, U., 1992. Dichloroisonicotinic and salicylic acid, inducers of systemic acquired resistance, enhance fungal elicitor responses in parsley cells. *Plant J.* 2, 655–660. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1992.tb00134.x>
- Keller, H., Blein, J.P., Bonnet, P., Ricci, P., 1996. Physiological and molecular characteristics of elicitor-induced systemic acquired resistance in tobacco. *Plant Physiol.* 110, 365–376. <https://doi.org/10.1104/pp.110.2.365>
- Kepczyńska, E., Król, P., 2012. The phytohormone methyl jasmonate as an activator of induced resistance against the necrotroph *Alternaria porri* f. sp. solani in tomato plants. *J. Plant Interact.* 7, 307–315. <https://doi.org/10.1080/17429145.2011.645169>
- Kettner, J., Dörfling, K., 1995. Biosynthesis and metabolism of abscisic acid in tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*. *Planta* 196, 627–634.
- Khalil, N., Fekry, M., Bishr, M., El-Zalabani, S., Salama, O., 2018. Foliar spraying of salicylic acid induced accumulation of phenolics, increased radical scavenging activity and modified the composition of the essential oil of water stressed *Thymus vulgaris* L. *Plant Physiol. Biochem.* 123, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.12.007>
- Kim, S.Y., Lim, J.H., Park, M.R., Kim, Y.J., Park, T. II, Seo, Y.W., Choi, K.G., Yun, S.J., 2005. Enhanced antioxidant enzymes are associated with reduced hydrogen peroxide in barley roots under saline stress. *J. Biochem. Mol. Biol.* 38, 218–224. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2005.38.2.218>
- Kim, Y.H., Bae, J.M., Huh, G.H., 2010. Transcriptional regulation of the cinnamyl alcohol dehydrogenase gene from sweetpotato in response to plant developmental stage and environmental stress. *Plant Cell Rep.* 29, 779–791. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0864-2>
- Klimaszewska, K., Trontin, J.-F., Becwar, M., Devillard, C., Park, Y.-S., Lelu-Walter, M.-A., 2007. Recent progress in somatic embryogenesis of four *Pinus* spp. *Tree For. Sci. Biotechnol.* 1, 11–25.
- Ko, W.H., Chang, H.S., Su, H.J., 1978. Isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Taiwan as evidence for an Asian origin of the species. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 71, 496–499. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(78\)80080-1](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(78)80080-1)
- Kobayashi, M., Ohura, I., Kawakita, K., Yokota, N., Fujiwara, M., Shimamoto, K., Doke, N., Yoshioka, H., 2007. Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH

- oxidase. *Plant Cell* 19, 1065–1080. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048884>
- Koga, H., Dohi, K., Mori, M., 2004. Abscisic acid and low temperatures suppress the whole plant-specific resistance reaction of rice plants to the infection with *Magnaporthe grisea*. *Physiol Mol Plant Pathol* 65, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2004.11.002>
- Kohler, A., Schwindling, S., Conrath, U., 2002. Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the NPR1/NIM1 gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 128, 1046–1056. <https://doi.org/10.1104/pp.010744>
- Kovacs, K., Václavík, T., Haight, R.G., Pang, A., Cunniffe, N.J., Gilligan, C.A., Meentemeyer, R.K., 2011. Predicting the economic costs and property value losses attributed to sudden oak death damage in California (2010–2020). *J. Environ. Manage.* 92, 1292–1302. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.12.018>
- Kovalchuk, A., Keriö, S., Oghenekaro, A.O., Jaber, E., Raffaello, T., Asiegbu, F.O., 2013. Antimicrobial defenses and resistance in forest trees: Challenges and perspectives in a genomic era. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51, 221–244. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102307>
- Kozai, T., Zobayed, S., 2000. Acclimatization. *Encyclopaedia of cell technology*. Spier R.E. (ed). pp 1–12. Wiley, New York.
- Kozłowski, G., Buchala, A., Métraux, J.P., 1999. Methyl jasmonate protects Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] seedlings against *Pythium ultimum* trow. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55, 53–58. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1999.0205>
- Kraska, T., Schönbeck, F., 1993. About Changes in the Chromatin Structure after Resistance Induction in *Hordeum vulgare* L. *J. Phytopathol.* 137, 10–14. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1993.tb01320.x>
- Kraus, E.C., Stout, M.J., 2019. Seed treatment using methyl jasmonate induces resistance to rice water weevil but reduces plant growth in rice. *PLoS One* 14, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222800>
- Król, P., Igielski, R., Pollmann, S., Kepczyńska, E., 2015. Priming of seeds with methyl jasmonate induced resistance to hemi-biotroph *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* in tomato via 12-oxo-phytodienoic acid, salicylic acid, and flavonol accumulation. *J. Plant Physiol.* 179, 122–132. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.01.018>
- Krupnova, T., Sasabe, M., Ghebreghiorghis, L., Gruber, C.W., Hamada, T., Dehmel, V., Strompen, G., Stierhof, Y.D., Lukowitz, W., Kemmerling, B., Machida, Y., Hashimoto, T., Mayer, U., Jürgens, G., 2009. Microtubule-

- Associated Kinase-like Protein RUNKEL Needed for Cell Plate Expansion in Arabidopsis Cytokinesis. *Curr. Biol.* 19, 518–523. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.02.021>
- Kulbat, K., 2016. Biotechnology and Food Sciences The role of phenolic compounds in plant resistance. *Biotechnol Food Sci* 80, 97–108.
- Kunej, U., Mikulič-Petkovšek, M., Radišek, S., Štajner, N., 2020. Changes in the phenolic compounds of hop (*Humulus lupulus* L.) induced by infection with *Verticillium nonalfalfae*, the causal agent of hop verticillium wilt. *Plants* 9, 1–16. <https://doi.org/10.3390/plants9070841>
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Langcake, P., Wickins, S., 1975. Studies on the Mode of Action of the Dichlorocyclopropane Fungicides: Effects of 2,2-Dichloro-3,3-dimethyl Cyclopropane Carboxylic Acid on the Growth of *Piricularia oryzae* Cav. *Microbiology-sgm* 88, 295–306. <https://doi.org/10.1099/00221287-88-2-295>
- Lawton, M.A., Lamb, C.J., 1987. Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding, and infection. *Mol. Cell. Biol.* 7, 335–341. <https://doi.org/10.1128/mcb.7.1.335>
- Lee, D.H., Lee, C.B., 2000. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: In gel enzyme activity assays. *Plant Sci.* 159, 75–85. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00326-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00326-5)
- Lelu, M.A., Bastien, C., Drugeault, A., Gouez, M.L., Klimaszewska, K., 1999. Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without growth regulators. *Physiol. Plant.* 105, 719–728. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.105417.x>
- Leone, A., Costa, A., Tucci, M., Grillo, S., 1994. Comparative analysis of short- and long-term changes in gene expression caused by low water potential in potato (*Solanum tuberosum*) cell-suspension culture. *Plant Physiol.* 106, 703–712. <https://doi.org/10.1104/pp.106.2.703>
- Levine, M., 1947. Differentiation of carrot root tissue grown in vitro. *Bull. Torrey Bot. Club*, 74, 321–328. <https://doi.org/10.2307/2482366>
- Li, A., Heath, M.C., 1990. Effect of plant growth regulators on the interactions between bean plants and rust fungi non-pathogenic on beans. *Physiol Mol Plant Pathol* 37, 245–254. [https://doi.org/10.1016/0885-5765\(90\)90074-8](https://doi.org/10.1016/0885-5765(90)90074-8)
- Li, T., Huang, Y., Xu, Z.S., Wang, F., Xiong, A.S., 2019. Salicylic acid-induced

- differential resistance to the Tomato yellow leaf curl virus among resistant and susceptible tomato cultivars. *BMC Plant Biol.* 19, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1784-0>
- Li, Z., Wang, X., Cui, Y., Qiao, K., Zhu, L., Fan, S., Ma, Q., 2020. Comprehensive Genome-Wide Analysis of Thaumatin-Like Gene Family in Four Cotton Species and Functional Identification of GhTLP19 Involved in Regulating Tolerance to *Verticillium dahlia* and Drought. *Front. Plant Sci.* 11, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.575015>
- Liepman, A.H., Olsen, L.J., 2003. Alanine aminotransferase homologs catalyze the glutamate:Glyoxylate aminotransferase reaction in peroxisomes of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 131, 215–227. <https://doi.org/10.1104/pp.011460>
- Lievens, L., Pollier, J., Goossens, A., Beyaert, R., Staal, J., 2017. Abscisic acid as pathogen effector and immune regulator. *Front. Plant Sci.* 8, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00587>
- Litvay, J.D., Verma, D.C., Johnson, M.A., 1985. Influence of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Rep* 4, 325–328. <https://doi.org/10.1007/BF00269890>
- Llorens, E., García-Agustín, P., Lapeña, L., Sentelhas, P.C., 2017. Scientia Agricola Advances in induced resistance by natural compounds: towards new options for woody crop protection. *Sci. Agric.* 74, 90–100.
- Lloyd, G.B., McCown, B.H., 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. *Proc Int Plant Propagators Soc* 30, 421–437.
- López- González, G., 2001. Los árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares. Mundi-Prensa, Madrid, España. 1731 p.
- Luna, E., Bruce, T.J.A., Roberts, M.R., Flors, V., Ton, J., 2012. Next-generation systemic acquired resistance. *Plant Physiol.* 158, 844–853. <https://doi.org/10.1104/pp.111.187468>
- Luque, J., Parladé, J., Pera, J., 2000. Pathogenicity of fungi isolated from *Quercus suber* in Catalonia (NE Spain). *For. Pathol.* 30, 247–263.
- Lynch, D., Lidgett, A., McInnes, R., Huxley, H., Jones, E., Mahoney, N., Spangenberg, G., 2002. Isolation and characterisation of three cinnamyl alcohol dehydrogenase homologue cDNAs from perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *J. Plant Physiol.* 159, 653–660. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-0776>
- MacKay, J.J., Becwar, M.R., Park, Y.S., Corderro, J.P., Pullman, G.S., 2006. Genetic control of somatic embryogenesis initiation in loblolly pine and implications for breeding. *Tree Genet. Genomes* 2, 1–9.

- <https://doi.org/10.1007/s11295-005-0020-2>
- Mallón, R., Martínez, M. T., Corredoira, E., Vieitez, A. M., 2013. The positive effect of arabinogalactan on induction of somatic embryogenesis in *Quercus bicolor* followed by embryo maturation and plant regeneration. *Trees* 27, 1285–1296. <https://doi.org/10.1007/s00468-013-0877-x>
- Mallón, R., Covelo, P., Vieitez, A.M., 2012. Improving secondary embryogenesis in *Quercus robur*: Application of temporary immersion for mass propagation. *Trees - Struct. Funct.* 26, 731–741. <https://doi.org/10.1007/s00468-011-0639-6>
- Manter, D.K., Kelsey, R.G., Karchesy, J.J., 2007. Photosynthetic declines in *Phytophthora ramorum*-infected plants develop prior to water stress and in response to exogenous application of elicitors. *Phytopathology* 97, 850–856. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-7-0850>
- Marañón, T., Ibáñez, B., Anaya-Romero, M., Muñoz-Rojas, M., Pérez-Ramos, I. M., 2012. Oak trees and woodlands providing ecosystem services in southern Spain. En: Roterham, I. D., Handley, C., Agnoletti, M., Samojliket, T. (Eds.). *Trees Beyond the Wood. An exploration of concepts of woods, forests and trees*, 369-378. Wildtrack Publishing, Venture House, Sheffield, Reino Unido.
- Marks, G. C., Smith, I. W., 1991. The Cinnamon Fungus in Victorian forests. History, Distribution, Management and Control. *Lands and Forests Bulletin No. 31*, 33 pp. Department of Conservation and Environment. Melbourne, Australia.
- Martin, F.N., Coffey, M.D., 2012. Mitochondrial Haplotype Analysis for Differentiation of Isolates of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 102, 229–239. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-11-0115>
- Martín, J.A., Solla, A., Witzell, J., Gil, L., García-Vallejo, M.C., 2010. Antifungal effect and reduction of *Ulmus minor* symptoms to *Ophiostoma novo-ulmi* by carvacrol and salicylic acid. *Eur. J. Plant Pathol.* 127, 21–32. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9567-3>
- Martín, J.A., Solla, A., Coimbra, M.A., Gil, L., 2008. Metabolic fingerprinting allows discrimination between *Ulmus pumila* and *U. minor*, and between *U. minor* clones of different susceptibility to Dutch elm disease. *For. Pathol.* 38, 244–256. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2007.00542.x>
- Martínez, M.T., Vieitez, F.J., Solla, A., Tapias, R., Ramírez-Martín, N., Corredoira, E., 2020. Vegetative propagation of *Phytophthora cinnamomi*-tolerant holm oak genotypes by axillary budding and somatic embryogenesis. *Forests* 11. <https://doi.org/10.3390/F11080>

841

- Martínez, M.T., San-José, M. del C., Arrillaga, I., Cano, V., Morcillo, M., Cernadas, M.J., Corredoira, E., 2019. Holm oak somatic embryogenesis: Current status and future perspectives. *Front. Plant Sci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00239>
- Martínez, M.T., Corredoira, E., Vieitez, A.M., Cernadas, M.J., Montenegro, R., Ballester, A., Vieitez, F.J., San José, M.C., 2017a. Micropropagation of mature *Quercus ilex* L. trees by axillary budding. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 131, 499–512. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1300-x>
- Martínez, M.T., San José, M.C., Vieitez, A.M., Cernadas, M.J., Ballester, A., Corredoira, E., 2017b. Propagation of mature *Quercus ilex* L. (holm oak) trees by somatic embryogenesis. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 131, 321–333. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1286-4>
- Martínez, M.T., Vieitez, A.M., Corredoira, E., 2015. Improved secondary embryo production in *Quercus alba* and *Q. rubra* by activated charcoal, silver thiosulphate and sucrose: influence of embryogenic explant used for subculture. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 121, 531–546. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0722-6>
- Maruri-López, I., Aviles-Baltazar, N.Y., Buchala, A., Serrano, M., 2019. Intra and extracellular journey of the phytohormone salicylic acid. *Front. Plant Sci.* 10, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00423>
- Masuelli, R.W., Marfil, C.F., 2011. Variabilidad epigenética en plantas y evolución. *BAG - J. Basic Appl. Genet.* 22, 1–8.
- Mathesius, U., Keijzers, G., Natera, S.H.A., Weinman, J.J., Djordjevic, M.A., Rolfe, B.G., 2001. Establishment of a root proteome reference map for the model legume *Medicago truncatula* using the expressed sequence tag database for peptide mass fingerprinting. *Proteomics* 1, 1424–1440. [https://doi.org/10.1002/1615-9861\(200111\)1:11<1424::AID-PROT1424>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/1615-9861(200111)1:11<1424::AID-PROT1424>3.0.CO;2-J)
- Mauch-Mani, B., Mauch, F., 2005. The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 409–414. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.05.015>
- Maurel, M., Robin, C., Capron, G., Desprez-Loustau, M.L., 2001. Effects of root damage associated with *Phytophthora cinnamomi* on water relations, biomass accumulation, mineral nutrition and vulnerability to water deficit of five oak and chestnut species. *For. Pathol.* 31, 353–369. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0329.2001.00258.x>
- Mauri, P. V., Manzanera, J.A., 2004. Effect of abscisic acid and stratification on somatic embryo maturation and germination of holm oak (*Quercus ilex* L.). *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* 40, 495–498. <https://doi.org/10.>

- 1079/IVP2004557
- Mauri, P. V., Manzanera, J.A., 2003. Induction, maturation and germination of holm oak (*Quercus ilex* L.) somatic embryos. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 74, 229–235. <https://doi.org/10.1023/A:1024072913021>
- Mayer, A.M., Staples, R.C., Gil-ad, N.L., 2001. Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response. *Phytochemistry* 58, 33–41. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00187-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00187-X)
- McClintock, B., 1984. The significance of responses of the genome to challenge. *Science* 226, 792-801. <https://doi.org/10.1126/science.15739260>
- McDonald, K.L., Cahill, D.M., 1999. Influence of abscisic acid and the abscisic acid biosynthesis inhibitor, norflurazon, on interactions between *Phytophthora sojae* and soybean (*Glycine max*). *Eur. J. Plant Pathol.* 105, 651–658. <https://doi.org/10.1023/A:1008705321113>
- Medeira, C., Quartin, V., Maia, I., Diniz, I., Matos, M.C., Semedo, J.N., Scotti-Campos, P., Ramalho, J.C., Pais, I.P., Ramos, P., Melo, E., Leitão, A.E., Cravador, A., 2012. Cryptogein and capsicein promote defence responses in *Quercus suber* against *Phytophthora cinnamomi* infection. *Eur. J. Plant Pathol.* 134, 145–159. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-9972-x>
- Merkle, S.A., Dean, J.F.D., 2000. Forest tree biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 298–302. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00099-9](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00099-9)
- Merkle, S.A., 1995. Strategies for the dealing with limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. *Plant Tiss Cult Biotech* 1, 112-121.
- Merkle, S.A., Parrot, W.A., Flinn, B.S., 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: Thorpe, T.A. (Ed.). *In vitro embryogenesis in plant*, 155-203. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-0485-2\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-011-0485-2_5)
- Meyer, F.E., Shuey, L.S., Naidoo, Sitha, Mamni, T., Berger, D.K., Myburg, A.A., van den Berg, N., Naidoo, Sanushka, 2016. Dual RNA-sequencing of *Eucalyptus nitens* during *Phytophthora cinnamomi* challenge reveals pathogen and host factors influencing compatibility. *Front. Plant Sci.* 7, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00191>
- Mialoundama, A.S., Heintz, D., Debayle, D., Rahier, A., Camara, B., Bouvier, F., 2009. Abscisic acid negatively regulates elicitor-induced synthesis of capsidiol in wild tobacco. *Plant Physiol.* 150, 1556–1566. <https://doi.org/10.1104/pp.109.138420>
- Mira, M.M., Wally, O.S.D., Elhiti, M., El-Shanshory, A., Reddy, D.S., Hill, R.D.,



- Stasolla, C., 2016. Jasmonic acid is a downstream component in the modulation of somatic embryogenesis by Arabidopsis Class 2 phytochrome. *J. Exp. Bot.* 67, 2231–2246. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw022>
- Misra, R.C., Sandeep, Kamthan, M., Kumar, S., Ghosh, S., 2016. A thaumatin-like protein of *Ocimum basilicum* confers tolerance to fungal pathogen and abiotic stress in transgenic Arabidopsis. *Sci. Rep.* 6, 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep25340>
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9, 490–498. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.009>
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., Van Breusegem, F., 2011. ROS signaling: The new wave? *Trends Plant Sci.* 16, 300–309. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.03.007>
- Mohr, P.G., Cahill, D.M., 2003. Abscisic acid influences the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *Peronospora parasitica*. *Funct Plant Biol.* 30, 461–469. <https://doi.org/10.1071/FP02231>. PMID: 32689031
- Molina, D.M., Aponte, M.E., Cortina, H., Moreno, G., 2002. The effect of genotype and explant age on somatic embryogenesis of coffee. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 71, 117–123. <https://doi.org/10.1023/A:1019965621041>
- Mora-Sala, B., Gramaje, D., Abad-Campos, P., Berbegal, M., 2019. Diversity of *Phytophthora* species associated with *Quercus ilex* L. in three Spanish regions evaluated by NGS. *Forests* 10, 35–37. <https://doi.org/10.3390/f10110979>
- Moradi, F., Ismail, A.M., 2007. Responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and ROS-scavenging systems to salt stress during seedling and reproductive stages in rice. *Ann. Bot.* 99, 1161–1173. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm052>
- Morcillo, M., Sales, E., Ponce, L., Guillén, A., Segura, J., Arrillaga, I., 2020. Effect of elicitors on holm oak somatic embryo development and efficacy inducing tolerance to *Phytophthora cinnamomi*. *Sci. Rep.* 10, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71985-w>
- Moreira, A.C., Martins, J.M.S., 2005. Influence of site factors on the impact of *Phytophthora cinnamomi* in cork oak stands in Portugal. *For. Pathol.* 35, 145–162. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2005.00397.x>
- Mouradov, A., Spangenberg, G., 2014. Flavonoids: A metabolic network mediating plants adaptation to their real estate. *Front. Plant Sci.* 5, 1–

16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00620>
- Mur, L.A.J., Kenton, P., Lloyd, A.J., Ougham, H., Prats, E., 2008. The hypersensitive response; The centenary is upon us but how much do we know? *J. Exp. Bot.* 59, 501–520. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm239>
- Mur, L.A.J., Naylor, G., Warner, S.A.J., Sugars, J.M., White, R.F., Draper, J., 1996. Salicylic acid potentiates defence gene expression in tissue exhibiting acquired resistance to pathogen attack. *Plant J.* 9, 559–571. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.09040559.x>
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 15, 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nakashima, A., Chen, L., Nguyen, P.T., Fujiwara, M., Hann, L.W., Kuwano, M., Umemura, K., Shirasu, K., Kawasaki, T., Shimamoto, K., 2008. RACK1 functions in rice innate immunity by interacting with the Rac1 immune complex. *Plant Cell* 20, 2265–2279. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.054395>
- Navarro Cerrillo, R.M., Ariza-Mateos, D., Porrás Tejero, C., Jorge, I., Jorrín-Novo, J., 2009. Evaluación de la resistencia aparente de individuos de encina a *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Boletín Sanid. Veg. Plagas* (1), 89-97
- Navathe, S., Singh, S., Singh, V.K., Chand, R., Mishra, V.K., Joshi, A.K., 2019. Genome-wide mining of respiratory burst homologs and its expression in response to biotic and abiotic stresses in *Triticum aestivum*. *Genes and Genomics* 41, 1027–1043. <https://doi.org/10.1007/s13258-019-00821-x>
- Nawrot-Chorabik, K., 2014. Interactions between embryogenic callus of *Abies alba* and *Heterobasidion* spp. in dual cultures. *Biol. Plant.* 58, 363–369. <https://doi.org/10.1007/s10535-014-0405-x>
- Nawrot-Chorabik, K., 2013. The Use of Interactions in Dual Cultures in vitro to Evaluate the Pathogenicity of Fungi and Susceptibility of Host Plant Genotypes. En: Petre, M., Rijeka (Eds.). *Environmental Biotechnology – New Approaches and Prospective Applications*, 287-301. InTech open science Publisher. <https://doi.org/10.5772/53214>
- Nawrot-Chorabik, K., Grad, B., Kowalski, T., 2016. Interactions between callus cultures of *Pinus sylvestris* and pine fungi with different trophic properties. *For. Pathol.* 46, 179–186. <https://doi.org/10.1111/efp.12240>
- Nehra, N.S., Becwar, M.R., Rottmann, W.H., Pearson, L., Chowdhury, K., Chang, S., Wilde, H.D., Kodrzycki, R.J., Zhang, C., Gause, K.C., Parks,

- D.W., Hinchey, M.A., 2005. Forest biotechnology: Innovative methods, emerging opportunities. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* 41, 701–717. <https://doi.org/10.1079/IVP2005691>
- Newman, M.A., Von Roepenack-Lahaye, E., Parr, A., Daniels, M.J., Dow, J.M., 2002. Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria. *Plant J.* 29, 487–495. <https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2001.00233.x>
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G., Foyer, C.H., 2012. Glutathione in plants: An integrated overview. *Plant, Cell Environ.* 35, 454–484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02400.x>
- Ortuño, A., Botía, J.M., Fuster, M.D., Porras, I., García-Lidón, A., Del Río, J.A., 1997. Effect of Scoparone (6,7-Dimethoxycoumarin) Biosynthesis on the Resistance of Tangelo Nova, *Citrus parodisi*, and *Citrus aurantium* Fruits against *Phytophthora parasitica*. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2740–2743. <https://doi.org/10.1021/jf9609542>
- Osborn, A.E., 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* 8, 1821–1831. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1821>
- Oßwald, W., Fleischmann, F., Rigling, D., Coelho, A.C., Cravador, A., Diez, J., Dalio, R.J., Horta Jung, M., Pfanz, H., Robin, C., Sipos, G., Solla, A., Cech, T., Chambery, A., Diamandis, S., Hansen, E., Jung, T., Orlikowski, L.B., Parke, J., Prospero, S., Werres, S., 2014. Strategies of attack and defence in woody plant-*Phytophthora* interactions. *For. Pathol.* 44, 169–190. <https://doi.org/10.1111/efp.12096>
- Pandey, V.P., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S., Dwivedi, U.N., 2017. A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases. *Biochem. Anal. Biochem.* 06, 1–16. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000308>
- Park, Y.S., 2014. Conifer Somatic Embryogenesis and Multi Varietal Forestry. *Challenges and Opportunities for the World's Forests in the 21st Century*. Fenning T.(ed). *For. Sci.* Vol. 81 425-439 Springer, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-7076-8>
- Park, Y.S., 2002. Implementation of conifer embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Ann. For. Sci.* 59, 651–656. <https://doi.org/10.1051/forest>
- Park, Y.S., Barrett, J.D., Bonga, J.M., 1998. Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: Deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* 34, 231–239. <https://doi.org/10.1007/BF02822713>

- Park, Y.S., Pond, S.E., Bonga, J.M., 1994. Somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): genetic control in somatic embryos exposed to storage, maturation treatments, germination, and cryopreservation. *Theor. Appl. Genet.* 89, 742–750. <https://doi.org/10.1007/BF00223714>
- Park, Y.S., Pond, S.E., Bonga, J.M., 1993. Initiation of somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): genetic control, culture treatment effects, and implications for tree breeding. *Theor. Appl. Genet.* 86, 427–436. <https://doi.org/10.1007/BF00838557>
- Parrott, W.A., 1991. Auxin-stimulated somatic embryogenesis from immature cotyledons of white clover. *Plant Cell Rep.* 10, 17–21. <https://doi.org/10.1007/BF00233025>
- Parvin, N., Carrie, C., Pabst, I., Läßler, A., Laha, D., Paul, M. V., Geigenberger, P., Heermann, R., Jung, K., Vothknecht, U.C., Chigri, F., 2017. TOM9.2 Is a Calmodulin-Binding Protein Critical for TOM Complex Assembly but Not for Mitochondrial Protein Import in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* 10, 575–589. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.12.012>
- Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D., Morales, F., Flexas, J., Gil-Pelegrín, E., 2009. Differential photosynthetic performance and photoprotection mechanisms of three Mediterranean evergreen oaks under severe drought stress. *Funct. Plant Biol.* 36, 453–462. <https://doi.org/10.1071/FP08297>
- Pérez-Jiménez, M., López-Pérez, A.J., Otálora-Alcón, G., Marín-Nicolás, D., Piñero, M.C., del Amor, F.M., 2015. A regime of high CO<sub>2</sub> concentration improves the acclimatization process and increases plant quality and survival. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 121, 547–557. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0724-4>
- Pérez-Torres, E., Paredes C, M., Polanco, V., Becerra B, V., 2009. Gene Expression Analysis: A Way to Study Tolerance to Abiotic Stresses in Crops Species. *Chil. J. Agric. Res.* 69, 260–269. <https://doi.org/10.4067/s0718-58392009000200016>
- Petrussa, E., Braidot, E., Zancani, M., Peresson, C., Bertolini, A., Patui, S., Vianello, A., 2013. Plant flavonoids-biosynthesis, transport and involvement in stress responses. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 14950–14973. <https://doi.org/10.3390/ijms140714950>
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pierik, R.L.M., 1997. *In vitro* culture of higher plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. 311 p.
- Pijut, P.M., Lawson, S.S., Michler, C.H., 2011. Biotechnological efforts for

- preserving and enhancing temperate hardwood tree biodiversity, health, and productivity. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* 47, 123–147. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9332-5>
- Pinto-Correia, T., Ribeiro, N., Sá-Sousa, P., 2011. Introducing the montado, the cork and holm oak agroforestry system of Southern Portugal. *Agrofor. Syst.* 82, 99–104. <https://doi.org/10.1007/s10457-011-9388-1>
- Pinto, G., Araújo, C., Santos, C., Neves, L., 2013. Plant regeneration by somatic embryogenesis in *Eucalyptus* spp.: Current status and future perspectives. *South. For.* 75, 59–69. <https://doi.org/10.2989/20702620.2013.785115>
- Plomion, C., Lalanne, C., Claverol, S., Meddour, H., Kohler, A., Bogeat-Triboulot, M.B., Barre, A., Le Provost, G., Dumazet, H., Jacob, D., Bastien, C., Dreyer, E., De Daruvar, A., Guehl, J.M., Schmitter, J.M., Martin, F., Bonneau, M., 2006. Mapping the proteome of poplar and application to the discovery of drought-stress responsive proteins. *Proteomics* 6, 6509–6527. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600362>
- Puigdejarrols, P., Fernández-Guijarro, B., Toribio, M., Molinas, M., 1996. Origin and early development of secondary embryos in *Quercus suber* L. *Int. J. Plant Sci.* 157, 674–684.
- Pusztahelyi, T., Holb, I.J., Pócsi, I., 2017. Plant-fungal interactions: special secondary metabolites of the biotrophic, necrotrophic, and other specific interactions. En: Mérillon, J.M., Ramawat, K.G. (Eds.). *Fungal metabolites*, 1-58. Reference series in Phytochemistry. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-19456-1\\_39-2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-19456-1_39-2)
- Pusztahelyi, T., Holb, I.J., Pócsi, I., 2015. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Front. Plant Sci.* 6, 1–23. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00573>
- Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, R.M., Palazon, J., 2016. Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules* 21. <https://doi.org/10.3390/molecules21020182>
- Rands, R.D., 1922. Stripe canker of Cinnamon caused by *Phytophthora cinnamomi* n. sp. *Mededelingen van het Instituut voor Plantenziekten*, 54, 53.
- Rashad, Y., Aseel, D., Hammad, S., 2020. Phenolic Compounds Against Fungal and Viral Plant Diseases. En: Lone, R., Shuab, R., Kamili, A. (Eds.). *Plant Phenolics in Sustainable Agriculture*, 201-209. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-4890-1\\_9](https://doi.org/10.1007/978-981-15-4890-1_9)
- Rasmann, S., Vos, M. De, Casteel, C.L., Tian, D., Halitschke, R., Sun, J.Y.,

- Agrawal, A.A., Felton, G.W., Jander, G., 2012. Herbivory in the Previous Generation Primes Plants for Enhanced Insect Resistance. *Plant Physiol.* 158, 854–863. <https://doi.org/10.1104/pp.111.187831>
- Reglinski, T., Stavely, F.J.L., Taylor, J.T., 1998. Induction of phenylalanine ammonia lyase activity and control of *Sphaeropsis sapinea* infection in *Pinus radiata* by 5-chlorosalicylic acid. *Eur. J. For. Pathol.* 28, 153–158. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.1998.tb01245.x>
- Reinert, J., 1958. Untersuchungen über die Morphogenese an Gewebekulturen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 71, 15.
- Rezzonico, E., Flury, N., Meins, F., Beffa, R., 1998. Transcriptional down-regulation by abscisic acid of pathogenesis-related  $\beta$ -1,3-glucanase genes in tobacco cell cultures. *Plant Physiol.* 117, 585–592. <https://doi.org/10.1104/pp.117.2.585>
- Riaz, U., Kharal, M.A., Murtaza, G., Zaman, Q. uz, Javaid, S., Malik, H.A., Aziz, H., Abbas, Z., 2018. Prospective Roles and Mechanisms of Caffeic Acid in Counter Plant Stress: A Mini Review. *Pakistan J. Agric. Res.* 32. <https://doi.org/10.17582/journal.pjar/2019/32.1.8.19>
- Richards, E.J., 2006. Inherited epigenetic variation — revisiting soft inheritance. *Nat. Rev. Genet.* 7, 395–401. <https://doi.org/10.1038/nrg1834>
- Riemann, M., Haga, K., Shimizu, T., Okada, K., Ando, S., Mochizuki, S., Nishizawa, Y., Yamanouchi, U., Nick, P., Yano, M., Minami, E., Takano, M., Yamane, H., Iino, M., 2013. Identification of rice Allene Oxide Cyclase mutants and the function of jasmonate for defence against *Magnaporthe oryzae*. *Plant J.* 74, 226–238. <https://doi.org/10.1111/tpj.12115>
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., Jones, J.D.G., 2011. Hormone crosstalk in plant disease and defense: More than just JASMONATE-SALICYLATE antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49, 317–343. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114447>
- Robin, C., Capron, G., Desprez-Loustau, M.L., 2001. Root infection by *Phytophthora cinnamomi* in seedlings of three oak species. *Plant Pathol.* 50, 708–716. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00643.x>
- Robin, C., Desprez-Loustau, M.L., Capron, G., Delatour, C., 1998. First record of *Phytophthora cinnamomi* on cork and holm oaks in France and evidence of pathogenicity. *Ann. des Sci. For.* 55, 869–883. <https://doi.org/10.1051/forest:19980801>
- Rodà, F., Vayreda, J., Ninyerola, M., 2009. 9340 Encinares de *Quercus ilex* y *Quercus rotundifolia*. VV. AA., Bases ecológicas preliminares para la

- conservación de los tipos de hábitat de interés comunitario en España. Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino. Madrid. 94 p
- Rodríguez-Molina, M.C., Torres-Vila, L.M., Blanco-Santos, A., Palo Núñez, E.J., Torres-Álvarez, E., 2002. Viability of holm and cork oak seedlings from acorns sown in soils naturally infected with *Phytophthora cinnamomi*. For. Pathol. 32, 365–372. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0329.2002.00297.x>
- Rodriguez, R., Aragon, C.E., Escalona, M., Gonzalez-Olmedo, J.L., Desjardins, Y., 2008. Carbon Metabolism in Leaves of Micropropagated Sugarcane during Acclimatization Phase. Vit. Cell. Dev. Biol. Plant 44, 533–539. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9142-1>
- Romano, A., Martins-Loução, M.A., 2003. Strategies to improve rooting and acclimatization of cork oak. Acta Hort. 616, 275–278. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.616.38>
- Romero-Rodríguez, M.C., Jorrín-Novo, J. V., Castillejo, M.A., 2019. Toward characterizing germination and early growth in the non-orthodox forest tree species *Quercus ilex* through complementary gel and gel-free proteomic analysis of embryo and seedlings. J. Proteomics 197, 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.11.003>
- Ruiz-Galea, M., Celestino Mur, C., Toribio Iglesias, M., 2017. Evaluación de la inducción de respuestas de defensa a *Phytophthora cinnamomi* Rands. en embriones somáticos de encina. 7º Congreso Forestal español.
- Ruiz-Gómez, F.J., Pérez-de-Luque, A., Sánchez-Cuesta, R., Quero, J.L., Cerrillo, R.M.N., 2018. Differences in the response to acute drought and *Phytophthora cinnamomi* Rands infection in *Quercus ilex* L. seedlings. Forests 9, 1–16. <https://doi.org/10.3390/f9100634>
- Ruiz-Lozano, J.M., Collados, C., Barea, J.M., Azcón, R., 2001. Arbuscular mycorrhizal symbiosis can alleviate drought-induced nodule senescence in soybean plants. New Phytol. 151, 493–502. <https://doi.org/10.1046/j.0028-646X.2001.00196.x>
- Salla, T.D., Astarita, L. V., Santarém, E.R., 2016. Defense responses in plants of Eucalyptus elicited by *Streptomyces* and challenged with *Botrytis cinerea*. Planta 243, 1055–1070. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2460-8>
- Salt, S.D., Tuzun, S., Kuc, J. 1986. Effects of b-ionone and abscisic acid on the growth of tobacco and resistance to blue mold: mimicry of effects of stem infection by *Peronospora tabacina* Adam. Physiol Mol Plant Biol 28, 287–297. <https://doi.org/10.1007/BF02979546>
- Sánchez, M.C., Martínez, M.T., Valladares, S., Ferro, E., Viéitez, A.M., 2003. Maturation and germination of oak somatic embryos originated from

- leaf and stem explants: RAPD markers for genetic analysis of regenerants. *J. Plant Physiol.* 160, 699–707. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00754>
- Sánchez, M.E., Caetano, P., Ferraz, J., Trapero, A., 2000. El decaimiento y muerte de encinas en tres dehesas de la provincia de Huelva. *Boletín Sanidad Vegetal. Plagas* 26, 447–464.
- Sanchita, A.S., 2018. Gene Expression Analysis in Medicinal Plants Under Abiotic Stress Conditions. En: Ahmad, P., Ahanger, M.A., Singh, V.P., Tripathi, D.K., Alam, P., Alyemini, M.N. (Eds.). *Plant Metabolites and Regulation under Environmental Stress*, 407-414. Elsevier Inc. Londres, Reino Unido. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812689-9.00023-6>
- Scanu, B., Linaldeddu, B.T., Franceschini, A., Anselmi, N., Vannini, A., Vettraino, A.M., 2013. Occurrence of *Phytophthora cinnamomi* in cork oak forests in Italy. *For. Pathol.* 43, 340–343. <https://doi.org/10.1111/efp.12039>
- Scharte, J., Schön, H., Weis, E., 2005. Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*. *Plant, Cell Environ.* 28, 1421–1435. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01380.x>
- Schenk, R.H., Hildebrandt, A.C., 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50, 199-204. <https://doi.org/10.1139/b72-026>
- Schmidt, K., Pflugmacher, M., Klages, S., Mäser, A., Mock, A., Stahl, D.J., 2008. Accumulation of the hormone abscisic acid (ABA) at the infection site of the fungus *Cercospora beticola* supports the role of ABA as a repressor of plant defence in sugar beet. *Mol. Plant Pathol.* 9, 661–673. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00491.x>
- Schumann, G., Ryschika, U., Schulze, J., Klocke, E., 1995. Anatomy of somatic embryogenesis. *Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed*. Bajaj Y.P.S. (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry* Vol 30 1, 71-86. Springer, Berlin.
- Seo, M., Jikumar, Y., Kamiya, Y., 2011. Profiling of Hormones and Related Metabolites in Seed Dormancy and Germination Studies. *Seed Dormancy*. Kermod A.R. (ed), pp. 99-111. Methods Mol. Biol. Humana Press, Totowa, Nueva Jersey. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-231-1\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-231-1_7)
- Serrada, R., San Miguel, A., 2008. Selvicultura en dehesa. En: Serrada, R., Montero, G., Reque, J. (Eds.). *Compendio de Selvicultura Aplicada en España*, 861–876. INIA-Fundación Conde del Valle de Salazar. Madrid.
- Sghaier-Hammami, B., Valero-Galván, J., Romero-Rodríguez, M.C., Navarro-



- Cerrillo, R.M., Abdelly, C., Jorrín-Novo, J., 2013. Physiological and proteomics analyses of Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota* [Desf.] Samp.) responses to *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Physiol. Biochem.* 71, 191–202. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.06.030>
- Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., Zheng, B., 2019. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules* 24, 1–22. <https://doi.org/10.3390/molecules24132452>
- Shearer, B.L., Crane, C.E., Dunne, C.P., 2012. Variation in vegetation cover between shrubland, woodland and forest biomes invaded by *Phytophthora cinnamomi*. *Australas. Plant Pathol.* 41, 413–424. <https://doi.org/10.1007/s13313-012-0121-y>
- Shearer, B.L., Crane, C.E., Barrett, S., Cochrane, A., 2007. *Phytophthora cinnamomi* invasion, a major threatening process to conservation of flora diversity in the Southwest Botanical Province of Western Australia. *Aust. J. Bot.* 55, 225–238. <https://doi.org/10.1071/BT06019>
- Shearer, B.L., Crane, C.E., Cochrane, A., 2004. Quantification of the susceptibility of the native flora of the South-West Botanical Province, Western Australia, to *Phytophthora cinnamomi*. *Aust. J. Bot.* 52, 435–443. <https://doi.org/10.1071/BT03131>
- Shearer, B. L., Dillon, M., 1996. Susceptibility of plant species in Banksia woodlands on the Swan Coastal Plain, Western Australia, to infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Aust. J. Bot.* 44, 433–445. <https://doi.org/10.1071/BT9960433c>
- Shearer, B. L., Dillon, M., 1995. Susceptibility of plant species in *Eucalyptus marginata* forest to infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Aust. J. Bot.* 43, 113–134. <https://doi.org/10.1071/BT9950113>
- Shearer, B. L., Tippett, J. T., 1989. Jarrah Dieback: The Dynamics and Management of *Phytophthora cinnamomi* in the Jarrah *Eucalyptus marginata* forest of South-Western Australia. Como, Western Australia: Department of Conservation and Land Management, Research Bulletin 3, 76 pp.
- Simova-Stoilova, L.P., Romero-Rodríguez, M.C., Sánchez-Lucas, R., Navarro-Cerrillo, R.M., Alberto Medina-Aunon, J., Jorrín-Novo, J. V., 2015. 2-DE proteomics analysis of drought treated seedlings of *Quercus ilex* supports a root active strategy for metabolic adaptation in response to water shortage. *Front. Plant Sci.* 6, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00627>
- Singh, A., Sarma, B.K., Upadhyay, R.S., Singh, H.B., 2013. Compatible rhizosphere microbes mediated alleviation of biotic stress in chickpea

- through enhanced antioxidant and phenylpropanoid activities. *Microbiol. Res.* 168, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.07.001>
- Slaughter, A., Daniel, X., Flors, V., Luna, E., Hohn, B., Mauch-Mani, B., 2012. Descendants of primed *Arabidopsis* plants exhibit resistance to biotic stress. *Plant Physiol.* 158, 835–843. <https://doi.org/10.1104/pp.111.191593>
- Smit, C., Díaz, M., Jansen, P., 2009. Establishment limitation of holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota* (Desf.) Samp.) in a Mediterranean savanna Forest ecosystem. *Ann. For. Sci.* 66. <https://doi.org/10.1051/forest/2009028>
- Soler, M., Serra, O., Molinas, M., García-Berthou, E., Caritat, A., Figueras, M., 2008. Seasonal variation in transcript abundance in cork tissue analysed by real time RT-PCR. *Tree Physiol.* 28, 743–751.
- Song, G.C., Choi, H.K., Ryu, C.M., 2013. The folate precursor para-aminobenzoic acid elicits induced resistance against Cucumber mosaic virus and *Xanthomonas axonopodis*. *Ann. Bot.* 111, 925–934. <https://doi.org/10.1093/aob/mct049>
- Spoel, S.H., Dong, X., 2012. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 89–100. <https://doi.org/10.1038/nri3141>
- Spoel, S.H., Dong, X., 2008. Making Sense of Hormone Crosstalk during Plant Immune Responses. *Cell Host Microbe* 3, 348–351. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.05.009>
- Stacey, G., McAlvin, C.B., Kim, S.Y., Olivares, J., Soto, M.J., 2006. Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 141, 1473–1481. <https://doi.org/10.1104/pp.106.080986>
- Starý, T., Satková, P., Piterková, J., Mieslerová, B., Luhová, L., Mikulík, J., Kašparovský, T., Petřivalský, M., Lochman, J., 2019. The elicitor cryptogein's activity in tomato is mediated by jasmonic acid and ethylene signalling pathways independently of elicitor-sterol interactions. *Planta* 249, 739–749. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-3036-1>
- Steward, F.C., Mapes, M.O., Hears, K., 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Growth and division of freely suspended cells. *Am. J. Bot.* 45, 705–708. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1958.tb10599.x>
- Sutton, B., 2002. Commercial delivery of genetic improvement to conifer plantations using somatic embryogenesis. *Ann. For. Sci.* 59, 657–661.

- <https://doi.org/10.1051/forest:2002052>
- Suz, L.M., Martín, M.P., Oliach, D., Fischer, C.R., Colinas, C., 2008. Mycelial abundance and other factors related to truffle productivity in *Tuber melanosporum-Quercus ilex* orchards. FEMS Microbiol. Lett. 285, 72–78. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01213.x>
- Švábová, L., Lebeda, A., 2005. In vitro selection for improved plant resistance to toxin-producing pathogens. J. Phytopathol. 153, 52–64. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2004.00928.x>
- Tainter, F.H., O'Brien, J.G., Hernández, A., Orozco, F., Rebolledo, O., 2000. *Phytophthora cinnamomi* as a cause of oak mortality in the state of Colima, Mexico. Plant Dis. 84, 394–398. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.4.394>
- Tainter, F. H., Baker, F. A., 1996. Principles of Forest Pathology. John Wiley & Sons, Inc., New York. 805 p.
- Tang, W., Newton, R.J., 2005. Loblolly pine (*Pinus taeda*). En: Jain, S.M., Gupta, P.K. (Eds.). *Protocols for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. For. Sci. Vol. 77, 95-106. Springer-Verlag, New York.
- Tapias, R., Fernández, M., Moreira, A., Sánchez, E., Cravador, A., 2006. Posibilidades de la variación genética de encinas y alcornoques en la conservación y recuperación de bosques amenazados por la “seca.” Bol. Inf. CIDEU 1, 45–51.
- Thakur, M., Sohal, B.S., 2013. Role of Elicitors in Inducing Resistance in Plants against Pathogen Infection: A Review. ISRN Biochem. 1–10. <https://doi.org/10.1155/2013/762412>
- Thaler, J.S., Bostock, R.M., 2004. Interactions between abscisic-acid-mediated responses and plant resistance to pathogens and insects. Ecology 85, 48–58. <https://doi.org/10.1890/02-0710>
- Thaler, J.S., Humphrey, P.T., Whiteman, N.K., 2012. Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. Trends Plant Sci. 17, 260–270. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.02.010>
- Thaler, J.S., Owen, B., Higgins, V.J., 2004. The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. Plant Physiol. 135, 530–538. <https://doi.org/10.1104/pp.104.041566>
- Thatcher, L.F., Anderson, J.P., Singh, K.B., 2005. Plant defence responses: What have we learnt from Arabidopsis? Funct. Plant Biol. 32, 1–19. <https://doi.org/10.1071/FP04135>
- Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L.A., Rhee, S.Y., Stitt, M., 2004. MAPMAN: A user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. Plant J. 37, 914–939. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113.2004.02848.x>

- 1111/j.1365-313X.2004.02016.x
- Thomas, T.L., 1993. Gene expression during plant embryogenesis and germination: An overview. *Plant Cell* 5, 1401–1410. <https://doi.org/10.1105/tpc.5.10.1401>
- Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Broekaert, W.F., Cammue, B.P.A., 2000. Disease development of several fungi on *Arabidopsis* can be reduced by treatment with methyl jasmonate. *Plant Physiol. Biochem.* 38, 421–427. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)00756-7](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)00756-7)
- Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Penninckx, I.A.M.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P.A., Broekaert, W.F., 1998. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15107–15111. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.15107>
- Thulke, O., Conrath, U., 1998. Salicylic acid has a dual role in the activation of defence-related genes in parsley. *Plant J.* 14, 35–42. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00093.x>
- Toribio, M., Celestino, C., Molinas, M., 2005. Cork Oak, *Quercus suber* L. En: Jain, S.M., Gupta, P.K. (Eds.). *Protocols for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. For. Sci. Vol. 77, 445-457. Springer-Verlag, New York [https://doi.org/10.1007/1-4020-2985-3\\_35](https://doi.org/10.1007/1-4020-2985-3_35)
- Toribio, M., Fernández, C., Celestino, C., Martínez, M.T., San-José, M.C., Vieitez, A.M., 2004. Somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* trees. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 76, 283–287. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000009245.92828.26>
- Torres-Álvarez, E., Rodríguez-Molina, M.C., Torres-Vila, L.M., Suárez-de-La-Cámara, M. a, 2006. ¿Qué papel juega el hongo *Phytophthora cinnamomi* en el desarrollo de la regeneración natural y las repoblaciones de encina y alcornoque? *Bol. Inf. CIDEU* 1, 53–63.
- Torres, M.A., Jones, J.D.G., Dangl, J.L., 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol.* 141, 373–378. <https://doi.org/10.1104/pp.106.079467>
- Trevisan, M.T.S., Ramos Valdivia, A.C., Scheffer, J.J.C., Verpoorte, R., 1997. Enzyme activities in cell suspension cultures of two hop cultivars after elicitation by a fungal culture filtrate. *Biotechnol. Lett.* 19, 207–212. <https://doi.org/10.1023/A:1018389120271>
- Tukey, J.W., 1953. Some selected quick and easy methods of statistical analysis. *Trans NY Acad Sci.* 16, 88-97. <https://doi.org/10.1111/j.2164-0947.1953.tb01326.x>

- Turco, E., Close, T.J., Fenton, R.D., Ragazzi, A., 2004. Synthesis of dehydrin-like proteins in *Quercus ilex* L. and *Quercus cerris* L. seedlings subjected to water stress and infection with *Phytophthora cinnamomi*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 65, 137-144. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2004.11.010>
- Turkensteen, L.J., Flier, W.G., Wannigen, R., Mulder, A., 2000. Production, survival and infectivity of oospores of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathol.* 49, 688–696. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00515.x>
- Tuset, J.J., Hinarejos, C., Mira, J.L., 2006. La causa parasitaria de La “Seca” de los Quercus. *Bol. Inf. CIDEU* 1, 15-23.
- Tuset, J.J., Hinarejos, C., Mira, J.L., Cobos, J.M., 1996. Implicación de *Phytophthora cinnamomi* Rands en la enfermedad de la “seca” de encinas y alcornoques. *Boletín Sanidad Vegetal. Plagas* 22, 491–499.
- Ullah, H., Scappini, E.L., Moon, A.F., Williams, L.V., Armstrong, D.L., Pedersen, L.E., 2008. Structure of a signal transduction regulator, RACK1, from *Arabidopsis thaliana*. *Protein Sci.* 17, 1771-1780. <https://doi.org/10.1110/ps.035121.108.4>
- Valero-Galván, J., González-Fernández, R., Valledor, L., Navarro-Cerrillo, R.M., Jorrin-Novo, J. V., 2014. Proteotyping of Holm Oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota*) Provenances Through Proteomic Analysis of Acorn Flour. En: Jorrin-Novo, J. V., Komatsu, S., Weckwerth, W., Wienkoop, S. (Eds.). *Plant Proteomics: Methods and Protocols*, 709-723. Humana Press, Totowa, Nueva Jersey. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-631-3\\_49](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-631-3_49)
- Valero-Galván, J., Jorrin-Novo, J.V., Gómez-Cabrera, A., Ariza, D., García-Olmo, J., Navarro-Cerrillo, R.M., 2012. Population variability based on the morphometry and chemical composition of the acorn in Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota* [Desf.] Samp.). *Eur. J. For. Res.* 131, 893–904. <https://doi.org/10.1007/s10342-011-0563-8>
- Valladares, S., Sánchez, C., Martínez, M.T., Ballester, A., Vieitez, A.M., 2006. Plant regeneration through somatic embryogenesis from tissues of mature oak trees: True-to-type conformity of plantlets by RAPD analysis. *Plant Cell Rep.* 25, 879–886. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0108-z>
- Valledor, L., Weckwerth, W., 2014. An Improved Detergent-Compatible Gel-Fractionation LC-LTQ-Orbitrap-MS Workflow for Plant and Microbial Proteomics. En: Jorrin-Novo, J. V., Komatsu, S., Weckwerth, W., Wienkoop, S. (Eds.). *Plant Proteomics: Methods and Protocols*, 347-358. Humana Press, Totowa, Nueva Jersey. <https://doi.org/10.1007/978-1->

- 62703-631-3\_25
- Van der Does, D., Leon-Reyes, A., Koornneef, A., Van Verk, M.C., Rodenburg, N., Pauwels, L., Goossens, A., Körbes, A.P., Memelink, J., Ritsema, T., Van Wees, S.C.M., Pieterse, C.M.J., 2013. Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCFCO11-JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor ORA59. *Plant Cell* 25, 744–761. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.108548>
- Van Hulten, M., Pelsler, M., Van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J., Ton, J., 2006. Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 5602–5607. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510213103>
- Van Wees, S.C.M., Luijendijk, M., Smoorenburg, I., Van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J., 1999. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but. *Plant Mol. Biol.* 41, 537–549. <https://doi.org/10.1023/A:1006319216982>
- Vaz, M., Pereira, J.S., Gazarini, L.C., David, T.S., David, J.S., Rodrigues, A., Maroco, J., Chaves, M.M., 2010. Drought-induced photosynthetic inhibition and autumn recovery in two Mediterranean oak species (*Quercus ilex* and *Quercus suber*). *Tree Physiol.* 30, 946–956. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq044>
- Vettraiño, A., Barzanti, G., Bianco, M., Ragazzi, A., Capretti, P., Paoletti, E., Luisi, N., Anselmi, N., Vannini, A., 2002. Occurrence of *Phytophthora* species in oak stands in Italy. *For. Pathol.* 32, 19–28. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0329.2002.00264.x>
- Vettraiño, A.M., Morel, O., Perlerou, C., Robin, C., Diamandis, S., Vannini, A., 2005. Occurrence and distribution of *Phytophthora* species in European chestnut stands, and their association with Ink Disease and crown decline. *Eur. J. Plant Pathol.* 111, 169–180. <https://doi.org/10.1007/s10658-004-1882-0>
- Vieitez, A.M., Corredoira, E., Martínez, M.T., San-José, M.C., Sánchez, C., Valladares, S., Vidal, N., Ballester, A., 2012. Application of biotechnological tools to *Quercus* improvement. *Eur. J. For. Res.* 131, 519–539. <https://doi.org/10.1007/s10342-011-0526-0>
- Villar-Salvador, P., Peregán, J.L., Uscola, M., 2013. *Quercus ilex* L. *Producción y manejo de semillas y plantas forestales*. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, pp. 226-249
- Vivas, M., Hernández, J., Corcobado, T., Cubera, E., Solla, A., 2021. Transgenerational Induction of Resistance to *Phytophthora cinnamomi* in Holm Oak. *Forests* 13, 1-13. <https://doi.org/10.3390/f12010100>

- Vivas, M., Solla, A., 2012. Aplicaciones de BABA y BTH en brinzales de *Pinus pinaster* para la inducción de resistencia ante *Fusarium circinatum*. Cuad. la Soc. Española Ciencias For. 60, 55–60.
- Vivas, M., Zas, R., Sampedro, L., Solla, A., 2013. Environmental Maternal Effects Mediate the Resistance of Maritime Pine to Biotic Stress. PLoS One 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070148>
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., Filonova, L., 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. Plant Cell. Tissue Organ Cult. 69, 233–249. <https://doi.org/10.1023/A:1015673200621>
- Von Broembsen, S.L., Kruger, F., 1985. *Phytophthora cinnamomi* Associated with Mortality of Native Vegetation in South Africa. Plant Dis. 69, 215–217. <https://doi.org/10.1094/pd-69-715>
- Wallis, C.M., Galarneau, E.R.A., 2020. Phenolic Compound Induction in Plant-Microbe and Plant-Insect Interactions: A Meta-Analysis. Front. Plant Sci. 11, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.580753>
- Walter, M.H., Grima-Pettenatit, J., Grand, C., Boudett, A.M., Lamb, C.J., 1988. Cinnamyl-alcohol dehydrogenase, a molecular marker specific for lignin synthesis: cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor. Proc Natl Acad Sci USA 85, 5546–50. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.15.5546>
- Walters, D., Walsh, D., Newton, A., Lyon, G., 2005. Induced resistance for plant disease control: Maximizing the efficacy of resistance elicitors. Phytopathology 95, 1368–1373. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1368>
- Wang, C.J., Yang, W., Wang, C., Gu, C., Niu, D.D., Liu, H.X., Wang, Y.P., Guo, J.H., 2012. Induction of Drought Tolerance in Cucumber Plants by a Consortium of Three Plant Growth-Promoting Rhizobacterium Strains. PLoS One 7, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052565>
- Wang, K., Jin, P., Han, L., Shang, H., Tang, S., Rui, H., Duan, Y., Kong, F., Kai, X., Zheng, Y., 2014. Methyl jasmonate induces resistance against *Penicillium citrinum* in Chinese bayberry by priming of defense responses. Postharvest Biol. Technol. 98, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.07.009>
- Wang, K., Liao, Y., Kan, J., Han, L., Zheng, Y., 2015. Response of direct or priming defense against *Botrytis cinerea* to methyl jasmonate treatment at different concentrations in grape berries. Int. J. Food Microbiol. 194, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.006>
- Wang, L., Yang, L., Zhang, J., Dong, J., Yu, J., Zhou, J., Zhuge, Q., 2013. Cloning and characterization of a thaumatin-like protein gene PeTLP in *Populus*

- deltoides* × *P. euramericana* cv. “Nanlin895.” *Acta Physiol. Plant.* 35, 2985–2998. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1330-x>
- Wang, W., Wang, X., Zhang, X., Wang, Y., Huo, Z., Huang, M., Cai, J., Zhou, Q., Jiang, D., 2021. Involvement of salicylic acid in cold priming-induced freezing tolerance in wheat plants. *Plant Growth Regul.* 93, 117–130. <https://doi.org/10.1007/s10725-020-00671-8>
- Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., Hekimi, S., 2018. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J. Cell Biol.* 217, 1915–1928. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708007>
- Wang, Yan, Tyler, B.M., Wang, Yuanchao, 2019. Defense and Counterdefense During Plant-Pathogenic Oomycete Infection. *Annu. Rev. Microbiol.* 73, 667–696. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-120022>
- Ward, E.W.B., Cahill, D.M., Bhattacharyya, M.K., 1989. Abscisic acid suppression of phenylalanine ammonia-lyase activity and mRNA, and resistance of soybeans to *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. *Plant Physiol.* 91, 23–27. <https://doi.org/10.1104/pp.91.1.23>
- Weste, G., 2003. The dieback cycle in Victorian forests: A 30-year study of changes caused by *Phytophthora cinnamomi* in Victorian open forests, woodlands and heathlands. *Australas. Plant Pathol.* 32, 247–256. <https://doi.org/10.1071/AP03013>
- Weste, G., Marks, G. C., 1987. The biology of *Phytophthora cinnamomi* in Australasian forests. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25, 207–229. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.25.090187.001231>
- Whenham, R.J., Fraser, R.S.S., Brown, L.P., Payne, J.A., 1986. Tobacco-mosaic-virus-induced increase in abscisic-acid concentration in tobacco leaves. *Planta* 168, 592–598. <https://doi.org/10.1007/BF00392281>
- White, R.F., 1979. Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* 99, 410–412. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(79\)90019-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(79)90019-9)
- Wi, S.J., Ji, N.R., Park, K.Y., 2012. Synergistic biosynthesis of biphasic ethylene and reactive oxygen species in response to hemibiotrophic *Phytophthora parasitica* in tobacco plants. *Plant Physiol.* 159, 251–265. <https://doi.org/10.1104/pp.112.194654>
- Williams, E.G., Maheswaran, G., 1986. Somatic Embryogenesis: Factors Influencing Coordinated Behaviour of Cells as an Embryogenic Group. *Ann. Bot.* 57, 443–462. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087127>
- Worrall, D., Holroyd, G.H., Moore, J.P., Glowacz, M., Croft, P., Taylor, J.E., Paul, N.D., Roberts, M.R., 2012. Treating seeds with activators of plant defence generates long-lasting priming of resistance to pests and



- pathogens. *New Phytol.* 193, 770–778. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03987.x>
- Zas, R., Björklund, N., Nordlander, G., Cendán, C., Hellqvist, C., Sampedro, L., 2014. Exploiting jasmonate-induced responses for field protection of conifer seedlings against a major forest pest, *Hylobius abietis*. *For. Ecol. Manage.* 313, 212–223. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2013.11.014>
- Zentmyer, G.A., 1988. Origin and distribution of four species of *Phytophthora*. *Trans. British Mycol. Soc.* 91, 367–378. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(88\)80111-6](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(88)80111-6)
- Zentmyer, G. A., 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the Diseases it Causes. *Phytopathological Monograph* 10, 96 pp. Am. Phytopathol. Soc., St. Paul, Minnesota.
- Zhao, J., Hu, Q., Guo, Y.Q., Zhu, W.H., 2001. Elicitor-induced indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cell cultures is related to Ca<sup>2+</sup> influx and the oxidative burst. *Plant Sci.* 161, 423–431. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00422-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00422-8)
- Zobel, B., Talbert, J., 1984. *Applied forestry improvement*. John Wiley & Sons, New York, Estados Unidos 505 p
- Zoglauer, K., Behrendt, U., Rahmat, A., Ross, H., Taryono, 2003. Somatic embryogenesis - the gate to biotechnology in conifers. En: Laimer, M., Rücker, W. (Eds.). *Plant Tissue Culture: 100 years since Gottlieb Haberlandt*, 175-202. Springer-Verlag, Viena. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6040-4\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6040-4_11)



## **VIII. ANEXOS**

---



## VIII. ANEXOS

**Tabla A.1.** Efecto del tratamiento de elicitación en medio sólido durante 60 días sobre el crecimiento y la producción de MDA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de la línea embriogénica Ha13.

Factores	gl	Crecimiento	MDA	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
		Cuadrados medios		
Tratamiento	3	8.13NS	1.63NS	0.47NS
Error	8	5.83	1.68	0.41

NS: No significativo.

**Tabla A.2.** Efecto del tratamiento de elicitación con MeJA 50 µM en medio líquido durante 3 y 5 días sobre el crecimiento y producción de MDA de la línea embriogénica Ha13.

Factores	gl	Crecimiento	MDA	
		Cuadrados medios	gl	Cuadrados medios
Tratamiento (A)	1	0.28NS	1	7.48**
Tiempo (B)	1	0.63NS	1	8.12**
A x B	1	48.68*	1	7.3**
Error	8	2.99	20	0.836

NS: No significativo. \*: Significativo para  $p \leq 0.05$ . \*\*: Significativo para  $p \leq 0.01$ .**Tabla A.3.** Efecto del tratamiento de elicitación con MeJA 50 µM en medio líquido sobre el crecimiento y producción de MDA de la línea Ha13 separando el análisis para cada tiempo de elicitación (3 y 5 días).

Factores	gl	Crecimiento	MDA
		Cuadrados medios	
Tratamiento (3 días)	1	28.21*	$2.67 \times 10^{-4}$ NS
Error	4	0.62NS	1.41
Tratamiento (5 días)	1	20.76NS	7.39*
Error	4	5.36	0.678

NS: No significativo. \*: Significativo para  $p \leq 0.05$ .

## VIII. Anexos

**Tabla A.4.** Efecto del tratamiento de elicitación con MeJA 50  $\mu\text{M}$  en medio líquido durante 3 y 5 días sobre la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el material embriogénico. Prueba U de Mann-Whitney.

Factores	Estadístico de prueba
Concentración	84NS
Tiempo	116**
Error	17.27

NS: No significativo. \*\*: Significativo para  $p \leq 0.01$ .

**Tabla A.5.** Efecto del tratamiento de elicitación con OCF, MeJA, BTH y PABA en medio líquido ESM durante 3 días sobre el crecimiento del material embriogénico de la línea Ha13, medido como incremento relativo de peso fresco ( $\Delta\text{PF}$  (g)), a los 60 días de la elicitación.

Factores	OCF		MeJA		BTH		PABA	
	gl	Cuadrados medios	gl	Cuadrados medios	gl	Cuadrados medios	gl	Cuadrados medios
Concentración	2	0.151NS	4	0.462NS	4	0.867NS	4	0.413NS
Error	6	0.589	10	0.443	10	0.678	10	0.399

NS: No significativo.

**Tabla A.6.** Efecto del tratamiento de elicitación con OCF, MeJA, BTH y PABA en medio líquido ESM durante 3 días sobre el desarrollo del material embriogénico de la línea Ha13, medido como porcentaje de embriones bien formados, a los 60 días de la elicitación.

Factores	OCF		MeJA		BTH		PABA	
	gl	Cuadrados medios	gl	Cuadrados medios	gl	Cuadrados medios	gl	Cuadrados medios
Concentración	2	84.51NS	4	156.81NS	4	349.15NS	4	454.92*
Error	6	75.7	10	115.49	10	288.21	10	107.75

NS: No significativo. \*: Significativo para  $p \leq 0.05$ .

**Tabla A.7.** Efecto de los elicitores químicos y la concentración de los mismos, aplicados durante 3 días en medio líquido ESM, sobre el crecimiento del material embriogénico, medido como incremento relativo de peso fresco ( $\Delta$ PF (g)) y sobre el desarrollo del material embriogénico, medido como % de embriones bien formados, a los 60 días de la elicitación en la línea Ha13. Prueba de Kruskal-Wallis para desarrollo del material embriogénico.

Factores	gl	Crecimiento	Desarrollo
		Cuadrados medios	Estadístico de prueba
Elicitor (A)	2	1.741*	0.590NS
Concentración (B)	4	0.633NS	16.911**
AxB	8	0.555NS	
Error	30	0.507	

NS: No significativo. \*: Significativo para  $p \leq 0.05$ . \*\*: Significativo para  $p \leq 0.01$ .

**Tabla A.8.** Efecto del tratamiento de elicitación con OCF, MeJA, BTH y PABA en medio líquido ESM durante 3 días sobre los niveles de MDA (nmol/ g PF) en el material embriogénico de la línea Ha13, medidos a los 7, 15 y 30 días de la elicitación. Prueba de Kruskal-Wallis para el elicitador PABA.

Factores	gl	OCF		MeJA		BTH		Estadístico de prueba
		Cuadrados medios	gl	Cuadrados medios	gl	Cuadrados medios	gl	
Concentración (A)	2	0.015***	4	0.14***	4	0.014***	4	14.207**
Tiempo (B)	2	0.046***	2	0.008NS	2	0.019***	2	3.5NS
A x B	4	0.003NS	8	0.10***	8	0.008***		
Error	18	0.001	30	0.002	30	0		

NS: No significativo. \*\*: Significativo para  $p \leq 0.01$ . \*\*\*: Significativo para  $p \leq 0.001$ .

**Tabla A.9.** Efecto de los elicitores químicos, la concentración de los mismos y el momento de medida, aplicados durante 3 días en medio líquido ESM sobre los niveles de MDA (nmol/ g PF) en el material embriogénico de la línea Ha13. Prueba de Kruskal-Wallis.

Factores	gl	Estadístico de prueba
Elicitor	2	4.385NS
Concentración	4	31.007***
Tiempo	2	14.535***

NS: No significativo. \*\*\*: Significativo para  $p \leq 0.001$ .

VIII. Anexos

**Tabla A.10.** Efecto del tratamiento de elicitación con MeJA, BTH y PABA en medio líquido sobre los niveles de MDA (nmol/g PF) en el material embriogénico de la línea Ha13, para cada tiempo de medida por separado (7,15 y 30 días). Prueba de Kruskal-Wallis para el elicitor PABA a los 7 y 30 días.

Factores	gl	MeJA	BTH	PABA
		Cuadrados medios		
Concentración (7 días)	4	0.008*	0.015***	11.300*
Error	10	0.002	0.001	
Concentración (15 días)	4	0.004NS	0.008NS	0.004*
Error	10	0.001	0.002	0.001
Concentración (30 días)	4	0.022**	0.008***	13.233**
Error	10	0.003	0.00039	

NS: No significativo. \*: Significativo para  $p \leq 0.05$ . \*\*: Significativo para  $p \leq 0.01$ . \*\*\*: Significativo para  $p \leq 0.001$ .

**Tabla A.11.** Efecto del tratamiento de elicitación con OCF, MeJA, BABA y AS en medio líquido ESM durante 3 días sobre el crecimiento del material embriogénico de la línea E00, medido como incremento relativo de peso fresco ( $\Delta$ PF (g)), a los 60 días de la elicitación. Prueba de Kruskal-Wallis para los elicitores OCF y AS.

Factores	gl	OCF	MeJA	BABA	AS			
		Estadístico de prueba	gl	Cuadrados medios	gl	Cuadrados medios	gl	Estadístico de prueba
Concentración	2	5.468NS	4	0.010NS	4	0.006NS	4	7.900NS
Error			10	0.008	10	0.06	10	

NS: No significativo.



**Tabla A.12.** Efecto de los elicitores químicos y la concentración de los mismos, aplicados durante 3 días en medio líquido ESM, sobre el crecimiento del material embriogénico, medido como incremento relativo de peso fresco ( $\Delta$ PF (g)) y sobre el desarrollo del material embriogénico, medido como % de embriones bien formados, a los 60 días de la elicitación, en la línea E00. Prueba de Kruskal-Wallis para el crecimiento de la línea.

Factores	gl	Crecimiento	Desarrollo
		Estadístico de prueba	Cuadrados medios
Elicitor (A)	2	4.181NS	1292.17***
Concentración (B)	4	2.391NS	511.35***
A x B	8		200.92**
Error	30		46.9

NS: No significativo. \*\*: Significativo para  $p \leq 0.01$ . \*\*\*: Significativo para  $p \leq 0.001$ .

**Tabla A.13.** Efecto del tratamiento de elicitación con OCF, MeJA, BABA y AS en medio líquido ESM durante 3 días sobre el desarrollo del material embriogénico de la línea E00, medido como porcentaje de embriones bien formados, a los 60 días de la elicitación.

Factores	gl	OCF		MeJA		BABA		AS	
		gl	Cuadrados medios	gl	Cuadrados medios	gl	Cuadrados medios	gl	Cuadrados medios
Concentración	2	2	13.17NS	4	393.27***	4	484.43**	4	35.49NS
Error	6	6	32.2	10	13.84	10	50.41	10	76.47

NS: No significativo. \*\*: Significativo para  $p \leq 0.01$ . \*\*\*: Significativo para  $p \leq 0.001$ .

**Tabla A.14.** Efecto del tratamiento de elicitación con OCF, MeJA, BABA y AS en medio líquido ESM durante 3 días sobre los niveles de MDA (nmol/ g PF) en el material embriogénico de la línea E00, medidos a los 7, 15 y 30 días de la elicitación.

Factores	gl	OCF		MeJA		BABA		AS	
		gl	Cuadrados medios	gl	Cuadrados medios	gl	Cuadrados medios	gl	Cuadrados medios
Concentración (A)	2	2	0.034***	4	0.107***	4	0.029***	4	0.030***
Tiempo (B)	2	2	0.017*	2	0.052***	2	0.017**	2	0.014*
A x B	4	4	0.014**	8	0.023***	8	0.042***	8	0.022***
Error	18	18	0.003	30	0.003	30	0.003	30	0.003

\*: Significativo para  $p \leq 0.05$ . \*\*: Significativo para  $p \leq 0.01$ . \*\*\*: Significativo para  $p \leq 0.001$ .

VIII. Anexos

**Tabla A.15.** Efecto del tratamiento de elicitación con OCF, MeJA, BABA y AS en medio líquido sobre los niveles de MDA (nmol/g PF) en el material embriogénico de la línea E00, para cada tiempo de medida por separado (7,15 y 30 días). Prueba de Kruskal-Wallis para el elicitor MeJA a los 15 días.

Factores	OCF		MeJA		BABA		AS	
	gl	Cuadrados medios	gl	Cuadrados medios/ Estadístico de prueba	gl	Cuadrados medios	gl	Cuadrados medios
Concentración (7 días)	2	0.019NS	4	0.061***	4	0.030**	4	0.004NS
Error	6	0.004	10	0.005	10	0.005	10	0.005
Concentración (15 días)	2	0.005NS	4	9.123NS	4	0.05***	4	0.008**
Error	6	0.002			10	0.001	10	0.001
Concentración (30 días)	2	0.039**	4	0.080***	4	0.033***	4	0.062***
Error	6	0.002	10	0.002	10	0.002	10	0.003

NS: No significativo. \*\*: Significativo para  $p \leq 0.01$ . \*\*\*: Significativo para  $p \leq 0.001$ .

**Tabla A.16.** Efecto de los elicitors químicos, la concentración de los mismos y el tiempo de medida tras la elicitación sobre la concentración de MDA (nmol/g PF) en el material embriogénico de la línea E00. Prueba factorial de Kruskal-Wallis.

Factores	gl	Estadístico de prueba
Elicitor	2	23.533***
Concentración	4	5.912NS
Tiempo	2	7.288*

NS: No significativo. \*: Significativo para  $p \leq 0.05$ . \*\*\*: Significativo para  $p \leq 0.001$ .

**Tabla A.17.** Efecto del tratamiento de la línea Ha13 con los elicitors OCF, MeJA, BTH y PABA sobre la ratio de crecimiento del micelio en los ensayos de cultivo dual. Prueba de Kruskal-Wallis para los elicitors MeJA y BTH.

Factores	OCF		MeJA		BTH		PABA	
	gl	Cuadrados medios	gl	Estadístico de prueba	gl	Estadístico de prueba	gl	Cuadrados medios
Concentración(A)	1	0.001NS	3	5.967NS	3	5.651NS	3	0.04*
Tiempo (B)	2	0.002NS	2	1.991NS	2	3.514NS	2	0.015NS
AxB	2	0.047**					6	0.004NS
Error	12	0.005					24	0.009

NS: No significativo. \*: Significativo para  $p \leq 0.05$ . \*\*: Significativo para  $p \leq 0.01$ .

**Tabla A.18.** Efecto de los factores elicitor, concentración y tiempo sobre la ratio de crecimiento del micelio en los cultivos duales establecidos con las muestras de la línea embriogénica Ha13. Análisis factorial de Kruskal-Wallis.

Factores	gl	Estadístico de prueba
Elicitor	2	8.427*
Concentración	3	9.701*
Tiempo	2	1.602NS

NS: No significativo. \*: Significativo para  $p \leq 0.05$ .

**Tabla A.19.** Efecto de la concentración del elicitor sobre la producción de  $H_2O_2$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) en el material embriogénico de la línea Ha13 elicitado previamente con OCF, MeJA, BTH y PABA tras haber sido puesto en contacto con el micelio de *P. cinnamomi* en el cultivo dual.

Factores	gl	OCF		MeJA		BTH		PABA	
		Cuadrados medios	gl	Cuadrados medios	gl	Cuadrados medios	gl	Cuadrados medios	
Concentración	2	3.55NS	4	11.67***	4	3.87**	4	16.05**	
Error	6	1.17	10	0.314	10	0.391	10	1.87	

NS: No significativo. \*\*: Significativo para  $p \leq 0.01$ . \*\*\*: Significativo para  $p \leq 0.001$ .

**Tabla A.20.** Efecto de los elicitores químicos y la concentración de los mismos aplicados a la línea Ha13, sobre la respuesta a estrés, medida a través de la determinación de  $H_2O_2$  producido en las muestras tras el cultivo dual.

Factores	gl	Cuadrados medios
Elicitor (A)	2	2.32NS
Concentración (B)	4	17.39***
A x B	8	7.10***
Error	30	0.86

NS: No significativo. \*\*\*: Significativo para  $p \leq 0.001$ .

**Tabla A.21.** Efecto de la concentración del elicitor sobre la producción de  $H_2O_2$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) en el material embriogénico de la línea Ha13 elicitado previamente con OCF, MeJA, BTH y PABA, tras haber sido infectado con un extracto activo de *P. cinnamomi* al 20% (v/v). Prueba de Kruskal-Wallis para el elicitor BTH.

Factores	gl	OCF		MeJA		BTH		PABA	
		Cuadrados medios	gl	Cuadrados medios	gl	Estadístico de prueba	gl	Cuadrados medios	
Concentración	2	0.158NS	4	8.96***	4	12.533*	4	1.92***	
Error	6	0	10	0.32			10	0	

NS: No significativo. \*: Significativo para  $p \leq 0.05$ . \*\*\*: Significativo para  $p \leq 0.001$ .

## VIII. Anexos

**Tabla A.22.** Efecto de los elicitores químicos y la concentración de los mismos aplicados a la línea Ha13, sobre la respuesta a estrés de la misma, medida a través de la determinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido en las muestras tras la infección con un extracto activo de *P. cinnamomi* al 20% (v/v). Análisis factorial de Kruskal-Wallis.

Factores	gl	Estadístico de prueba
Elicitor	2	3.340NS
Concentración	4	22.840***

NS: No significativo. \*\*\*: Significativo para  $p \leq 0.001$ .

**Tabla A.23.** Efecto del tratamiento sobre la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (µg/mL) en el material embriogénico de la línea E00 elicitado previamente con OCF, MeJA, BABA y AS, tras haber sido infectado con un extracto activo de *P. cinnamomi* al 20% (v/v). Prueba de Kruskal-Wallis.

Factores	gl	Estadístico de prueba
Tratamiento	8	24.473**

\*\* : Significativo para  $p \leq 0.01$ .

**Tabla A.24.** Efecto del tratamiento sobre la actividad SOD (%) en el material embriogénico de la línea E00 elicitado con OCF, MeJA, BABA y AS, tras haber sido infectado con un extracto activo de *P. cinnamomi* al 20% (v/v). Prueba de Kruskal-Wallis.

Factores	gl	Estadístico de prueba
Tratamiento	8	25.322***

\*\*\*: Significativo para  $p \leq 0.001$ .

**Tabla A.25.** Efecto de la línea y el tratamiento de elicitación e infección sobre el incremento en la expresión de los genes *CSQs*, *ChSQs*, *CsTL1*, *PALQs* y *CADQs*, en las muestras de las líneas embriogénicas Q8, E00 y VA5 11f. Prueba de Kruskal-Wallis para los genes *CSQs*, *ChSQs* y *CsTL1*.

Factores	gl	<i>CSQs</i>	<i>ChSQs</i>	<i>CsTL1</i>	<i>PALQs</i>	<i>CADQs</i>
		Estadístico de prueba			Cuadrados medios	
Línea (A)	2	23.869***	5.992*	11.171**	0.003NS	0.087*
Tratamiento (B)	3	2.485NS	12.421**	8.350*	0.008*	0.004NS
A×B	6				0.104NS	0.010NS
Error	24				0.002	0.02

NS: No significativo. \* Significativo para  $p \leq 0.05$ . \*\* Significativo para  $p \leq 0.01$ . \*\*\* Significativo para  $p \leq 0.001$ .

**Tabla A.26.** Efecto del tratamiento de elicitación e infección sobre el incremento en la expresión de los genes *CSQs*, *PALQs*, *ChSQs* y *CsTL1* en las muestras de la línea embriogénica Q8.

		<i>CSQs</i>	<i>PALQs</i>	<i>ChSQs</i>	<i>CsTL1</i>
Factores	gl	Cuadrados medios			
Tratamiento	3	$3.34 \times 10^{-4}$ *	0.003NS	$5.68 \times 10^{-5}$ *	1.265*
Error	8	$7.943 \times 10^{-5}$	0	$1.38 \times 10^{-5}$	0.23

NS: no significativo. \*: Significativo para  $p \leq 0.05$ .

**Tabla A.27.** Efecto del tratamiento de elicitación e infección sobre el incremento en la expresión de los genes *CSQs*, *PALQs*, *ChSQs* y *CsTL1* en las muestras de la línea embriogénica E00.

		<i>CSQs</i>	<i>PALQs</i>	<i>ChSQs</i>	<i>CsTL1</i>
Factores	gl	Cuadrados medios			
Tratamiento	3	$1.92 \times 10^{-5}$ NS	0.005*	$1.30 \times 10^{-5}$ NS	0.008NS
Error	8	$4.75 \times 10^{-6}$	0.00	$2.10 \times 10^{-5}$	0.04

NS: no significativo. \*: Significativo para  $p \leq 0.05$ .

**Tabla A.28.** Efecto del tratamiento de elicitación e infección sobre el incremento en la expresión de los genes *CSQs*, *PALQs*, *CsTL1* y *ChSQs* en las muestras de la línea embriogénica VA5 11f. Prueba de Kruskal-Wallis para el gen *ChSQs*.

		<i>CSQs</i>	<i>PALQs</i>	<i>CsTL1</i>	<i>ChSQs</i>
Factores	gl	Cuadrados medios			Estadístico de prueba
Tratamiento	3	$4.24 \times 10^{-4}$ *	0.008NS	1.80*	8.658*
Error	8	$6.02 \times 10^{-5}$	0.004	0.4	

NS: no significativo. \*: Significativo para  $p \leq 0.05$ .

**Tabla A.29.** Efecto del tratamiento sobre la expresión de las proteínas O24456 P46209 USF\_AQUPY, GBLPA\_ARATH, Q66PF3 UFOG3\_FRAAN, Q9C7N4 GDL15\_ARATH, Q9FNC9 TOM92\_ARATH, Q9FRL8 DHAR2\_ARATH, Q9LU14 APG2\_ARATH, Q9S7E9 GGT2\_ARATH, Q04832 HEXP\_LEIMA, Q680A5 KPRS4\_ARATH, Q9FKA5 Y5957\_ARATH y Q9ZRA2 HGD\_ARATH en las muestras de la línea embriogénica E00. Prueba de Kruskal-Wallis para las proteínas Q04832 HEXP\_LEIMA, Q680A5 KPRS4\_ARATH, Q9FKA5 Y5957\_ARATH y Q9ZRA2 HGD\_ARATH.

		USF	GBLPA	UFOG3	GDL15	TOM92	DHAR2	APG2	GGT2	HEXP	KPRS4	Y5957	HGD
Fact.	gl	Cuadrados medios										Estadístico de prueba	
Tto.	3	1.96×10 <sup>14</sup> *	2.84×10 <sup>14</sup> ***	1.49×10 <sup>13</sup> *	6.67×10 <sup>12</sup> **	7.87×10 <sup>13</sup> ***	4.29×10 <sup>14</sup> *	8.83×10 <sup>13</sup> ***	4.77×10 <sup>12</sup>	9.412*	9.974*	10.385*	9.43*
Error	8	3×10 <sup>13</sup>	1.79×10 <sup>13</sup>	2.86×10 <sup>12</sup>	6.69×10 <sup>11</sup>	5.02×10 <sup>12</sup>	9.71×10 <sup>13</sup>	5.44×10 <sup>12</sup>	1.91×10 <sup>12</sup>				

\*: Significativo para  $p \leq 0.05$ . \*\*: Significativo para  $p \leq 0.01$ . \*\*\*: Significativo para  $p \leq 0.001$ .

**Tabla A.30.** Efecto del tratamiento sobre la expresión de las proteínas F4JY37 RUK\_ARATH, P25096 P21\_SOYBN, P46525 CS120\_WHEAT, P47920 NDKB\_FLABI, P81748 MIFH\_TRITR, Q00874 DR100\_ARATH, Q05091 PGIP\_PYRGO, Q9SSG3 HIPL1\_ARATH y Q9XIV8 PERN1\_TOBAC en las muestras de la línea embriogénica E00. Prueba de Kruskal-Wallis para las proteínas P25096 P21\_SOYBN, P46525 CS120\_WHEAT, P47920 NDKB\_FLABI, P81748 MIFH\_TRITR y Q9XIV8 PERN1\_TOBAC.

		<b>P21</b>	<b>CS120</b>	<b>NDKB</b>	<b>MIFH</b>	<b>PERN1</b>	<b>RUK</b>	<b>DR100</b>	<b>PGIP</b>	<b>HIPL1</b>	
Factores	gl	Estadístico de prueba					Cuadrados medios				
Tratamiento	3	9.97*	9.154*	9.386*	10.385*	7.27NS	9.42×10 <sup>13</sup> *	1.04×10 <sup>14</sup> *	3.10×10 <sup>15</sup> **	8.96×10 <sup>13</sup> ***	
Error	8						1.57×10 <sup>13</sup>	1.86×10 <sup>13</sup>	3.02×10 <sup>14</sup>	4.06×10 <sup>12</sup>	

NS: No significativo. \*: Significativo para  $p \leq 0.05$ . \*\*: Significativo para  $p \leq 0.01$ . \*\*\*: Significativo para  $p \leq 0.001$ .

**Tabla A.31.** Efecto de la línea y el tratamiento sobre la producción de compuestos fenólicos (ác. sinápico, ácido elálgico, ácido ferúlico, ácido cafeico, quercetina y prodelfinidina B3 (ppb)) en el material embriogénico de las líneas Q8, E00 y VA5 11f. Prueba de Kruskal-Wallis.

		Ác. sinápico	Ác. elálgico	Ác. ferúlico	Ác. cafeico	Quercetina	Prodelfinidina B3
Fact.	gl	Estadístico de prueba					
Línea	2	25.389***	19.681***	9.500**	1.533NS	0.920NS	3.084NS
Tto.	3	2.532NS	6.380NS	2.776NS	20.690***	15.985***	2.248NS

NS: no significativo. \*\*: Significativo para  $p \leq 0.01$ . \*\*\*: Significativo para  $p \leq 0.001$ .

**Tabla A.32.** Efecto del tratamiento sobre la producción de ácido sinápico, ácido elálgico, ácido ferúlico, ácido cafeico, prodelfinidina B3 y quercetina (ppb) en el material embriogénico de la línea Q8. Prueba de Kruskal-Wallis para la quercetina.

		Ác. sinápico	Ác. elálgico	Ác. ferúlico	Ác. cafeico	Prodelfinidina B3	Quercetina
Fact.	gl	Cuadrados medios					Estadístico de prueba
Tto.	3	$7.49 \times 10^7$ ***	$1.04 \times 10^8$ **	$1.43 \times 10^7$ *	$5.45 \times 10^7$ **	$1.71 \times 10^8$ ***	6.478NS
Error	8	$1.84 \times 10^6$	$9.67 \times 10^6$	$2.64 \times 10^6$	$3.98 \times 10^6$	$4.33 \times 10^6$	

NS: No significativo. \*: Significativo para  $p \leq 0.05$ . \*\*: Significativo para  $p \leq 0.01$ .

\*\*\*: Significativo para  $p \leq 0.001$ .

**Tabla A.33.** Efecto del tratamiento sobre la producción de ácido sinápico, ácido elálgico, ácido ferúlico, ácido cafeico, quercetina y Prodelfinidina B3 (ppb) en el material embriogénico de la línea E00. Prueba de Kruskal-Wallis para todos los ácidos y la quercetina.

		Ác. sinápico	Ác. elálgico	Ác. ferúlico	Ác. cafeico	Quercetina	Prodelfinidina B3
Fact.	gl	Estadístico de prueba					Cuadrados medios
Tto.	3	8.231*	8.744*	10.385*	8.077*	9.462*	$1.29 \times 10^7$ NS
Error	8						$6.74 \times 10^6$

NS: No significativo. \*: Significativo para  $p \leq 0.05$ .

**Tabla A.34.** Efecto del tratamiento sobre la producción de ácido sinápico, ácido elálgico, prodelfinidina B3, ácido ferúlico, ácido cafeico y quercetina (ppb) en el material embriogénico de la línea VA5 11f. Prueba de Kruskal-Wallis para ácido ferúlico, ácido cafeico y quercetina.

		Ác. sinápico	Ác. elálgico	Prodelfinidina B3	Ác. ferúlico	Ác. cafeico	Quercetina
Fact.	gl	Cuadrados medios			Estadístico de prueba		
Tto.	3	$1.23 \times 10^6$ **	$1.40 \times 10^9$ **	$4.28 \times 10^7$ NS	10.385*	9.154*	9.974*
Error	8	$1.13 \times 10^5$	$1.19 \times 10^8$	$1.07 \times 10^7$			

NS: No significativo. \*: Significativo para  $p \leq 0.05$ . \*\*: Significativo para  $p \leq 0.01$ .



**Tabla A.35.** Efecto de la línea y el tratamiento sobre la producción de ABA, JA y SA (ng/g PS) en el material embriogénico de las líneas Q8, E00 y VA5 11f. Prueba de Kruskal-Wallis.

		ABA	JA	SA
Factores	gl	Estadístico de prueba		
Línea	2	1.866NS	1.029NS	17.336***
Tratamiento	3	25.349***	35.172***	2.496NS

NS: No significativo. \*\*\*: Significativo para  $p \leq 0.001$ .

**Tabla A.36.** Efecto del tratamiento sobre la producción de ABA, JA y SA (ng/g PS) en el material embriogénico de la línea Q8. Prueba de Kruskal-Wallis.

		ABA	JA	SA
Factores	gl	Estadístico de prueba		
Tratamiento	3	9.667*	11.293**	9.462*

\*: Significativo para  $p \leq 0.05$ . \*\*: Significativo para  $p \leq 0.01$ .

**Tabla A.37.** Efecto del tratamiento sobre la producción de ABA, JA y SA (ng/g PS) en el material embriogénico de la línea E00. Prueba de Kruskal-Wallis para las hormonas ABA y JA.

		ABA	JA	SA
Factores	gl	Estadístico de prueba		Cuadrados medios
Tratamiento	3	10.458*	12.086**	574.190**
Error	8			53.77

\*: Significativo para  $p \leq 0.05$ . \*\*: Significativo para  $p \leq 0.01$ .

**Tabla A.38.** Efecto del tratamiento sobre la producción de ABA, JA y SA (ng/g PS) en el material embriogénico de la línea VA5 11f. Prueba de Kruskal-Wallis.

		ABA	JA	SA
Factores	gl	Estadístico de prueba		
Tratamiento	3	9.462*	12.086**	1.974NS

NS: No significativo. \*: Significativo para  $p \leq 0.05$ . \*\*: Significativo para  $p \leq 0.01$ .

## VIII. Anexos

**Tabla A.39.** Efecto de la línea y el tratamiento sobre la actividad de las enzimas catalasa (mU/g), peroxidasa (nmol/min/g) y el glutatión total ( $\mu\text{M}$ ) en el material embriogénico de las líneas Q8, E00 y VA5 11f. Prueba de Kruskal-Wallis.

Factores	gl	CAT	POX	GSH
		Estadístico de prueba		
Línea	2	2.284NS	7.592*	1.947NS
Tratamiento	3	9.380*	1.318NS	12.277**

NS: no significativo. \*: significativo para  $p \leq 0.05$ . \*\*: significativo para  $p \leq 0.01$ .

**Tabla A.40.** Efecto del tratamiento de elicitación e infección sobre la actividad de las enzimas catalasa (mU/g), peroxidasa (nmol/min/g) y el glutatión total ( $\mu\text{M}$ ) en las muestras de la línea embriogénica Q8.

Factores	gl	CAT	POX	GSH
		Cuadrados medios		
Tratamiento	3	0.002NS	0.471NS	$3.52 \times 10^{-4}$ ***
Error	8	0.001	0.345	$8.31 \times 10^{-6}$

NS: no significativo. \*\*\*: significativo para  $p \leq 0.001$ .

**Tabla A.41.** Efecto del tratamiento de elicitación e infección sobre la actividad de las enzimas catalasa (mU/g), peroxidasa (nmol/min/g) y el glutatión total ( $\mu\text{M}$ ) en las muestras de la línea embriogénica E00. Prueba Kruskal-Wallis para el contenido en glutatión.

Factores	gl	CAT	POX	GSH
		Cuadrados medios		Estadístico de prueba
Tratamiento	3	$4.61 \times 10^{-4}$ NS	18.391*	8.436*
Error	8	$1.92 \times 10^{-4}$	2.487	

NS: No significativo. \*: Significativo para  $p \leq 0.05$ .

**Tabla A.42.** Efecto del tratamiento de elicitación e infección sobre la actividad de las enzimas catalasa, (mU/g), peroxidasa (nmol/min/g) y el glutatión total ( $\mu\text{M}$ ) en las muestras de la línea embriogénica VA511f. Prueba Kruskal-Wallis.

Factores	gl	CAT	POX	GSH
		Estadístico de prueba		
Tratamiento	3	10.385*	10.385*	9.804*

\*: Significativo para  $p \leq 0.05$ .



