

Vanesa  
Cano Lázaro

*Tesis doctoral*

*Transformación genética  
de alcornoque y encina  
con una proteína tipo  
taumatina con actividad  
antifúngica*

Santiago de Compostela 2020





ESCUELA DE DOCTORADO  
INTERNACIONAL EN CIENCIAS  
Y TECNOLOGÍAS DE LA USC

TESIS DE DOCTORADO

**TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE  
ALCORNOCHE Y ENCINA CON UNA  
PROTEÍNA TIPO TAUMATINA CON  
ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA**

Vanesa Cano Lázaro

PROGRAMA DE DOCTORADO EN AVANCES EN BIOLOGÍA  
MICROBIANA E PARASITARIA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

AÑO 2020





## AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR

Transformación genética de alcornoque y encina con una proteína  
tipo taumatina con actividad antifúngica

Dña. Elena Corredoira Castro

INFORMA:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por Dña. **Vanesa Cano Lázaro**, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

*En ....., de ..... de 20.....*

Fdo.....





## AUTORIZACIÓN DEL TUTOR DE LA TESIS

Transformación genética de alcornoque y encina con una proteína  
tipo taumatina con actividad antifúngica

Dña. Alicia Estévez Toranzo

INFORMA:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por Dña. **Vanesa Cano Lázaro**, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como tutor de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

En ..... de ..... de 20.....

Fdo.....





## DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE ALCORNOQUE Y ENCINA CON UNA PROTEÍNA  
TIPO TAUMATINA CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Dña. Vanesa Cano Lázaro

*Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:*

- 1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) *En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) *Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

*En ..... de ..... de 20.....*

Fdo.....





**CSIC**  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Esta tesis ha desarrollado en el laboratorio de Fisiología Forestal, del Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (IIAG-CSIC).



Esta tesis ha sido financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación a través de:

- ✓ Proyecto AGL2013-47400-C4-3-R de la convocatoria de Retos de la Sociedad titulado Biotecnología aplicada a la propagación y mejora de alcornoque y encina.
- ✓ Proyecto AGL2016-76143-C4-4-R de la convocatoria de Retos de la Sociedad titulado Conservación y mejora de alcornoque y encina aplicando técnicas biotecnológicas.
- ✓ Beca predoctoral BES-2014-070572.



A mis padres, a mi hermano, y a Álvaro.

Gracias por estar ahí.





## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido realizada gracias al apoyo, ayuda y confianza de muchas personas a las que me gustaría manifestar mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar, a la Dra. Elena Corredoira, por aceptar ser mi directora de tesis. Gracias por tu confianza, tu inestimable ayuda e infinita paciencia. Gracias por guiarme durante todo el camino, y por todo lo que me has enseñado.

A la Dr. Ana María Vieitez, por darme la oportunidad de incorporarme al grupo de Biotecnología y Mejora Forestal del IIAG.

A la Dra. Isabel Allona, Catedrática de la ETSI Agrómica, Alimentación y Biosistemas de Madrid, por la cesión del gen *CsTL1* utilizado en la tesis.

Al Dr. Mariano Toribio, investigador del IMIDRA por facilitarnos las líneas embriogénicas de alcornoque y las líneas Q8 y E2 de encina utilizadas en la tesis.

Al Dr. José Pedro Mansilla y a la Dra. M<sup>a</sup> del Carmen Salinero, investigadores de la Estación Fitopatológica de Areeiro por prestarme ayuda y soporte para los análisis de expresión del gen *CsTL1* y para la evaluación de la tolerancia/resistencia de las plantas transgénicas a *P. cinnamomi*. A todo el equipo de la EFA, especialmente a Jose Luís Couselo y Elena Varas, por sus consejos, tutela y ayuda, y por haberme enseñado tanto.

Al Dr. Alejandro Solla, Catedrático del Centro Universitario de Plasencia de la Universidad de Extremadura por facilitarnos la cepa de *P. cinnamomi* utilizada en los ensayos de tolerancia a *P. cinnamomi* de las plantas transgénicas.

A todo el equipo del departamento de Fisiología Vegetal del IIAG. Muchas gracias por haberme recibido con los brazos abiertos, y hacerme sentir como en casa. En muchos aspectos, habéis sido como una pequeña familia a la que siempre recordaré. A Mari Carmen, por darme ese gran empujón al final del camino. A Javier, por los buenos

consejos. A Tere, por enseñarme a domar a las encinas y por los buenos momentos en la cámara de flujo. A María José, por escuchar siempre que lo necesitaba y darme otra visión de las cosas. A Noelia, por tu energía, alegría y optimismo.

A todos los compañeros de departamento, Conchi, Nieves, Jesús, Puri y Anxela, por vuestro cariño y amabilidad, y por haberme acogido como una más. A Saleta, mi sufrida compi de despacho, por su inestimable apoyo moral en los buenos y malos momentos. A Ricardo, por las risas consultando los astros a la hora del café.

También quería agradecer al equipo del departamento de Microscopía Electrónica y Confocal de la USC, y en especial a la Dra. Mercedes Rivas, por su asistencia en los análisis de fluorescencia. Gracias por tu buen hacer y tu sentido del humor.

No puedo olvidarme del lugar donde empecé, y del maravilloso grupo del CIB de Madrid, que me dio mi primera oportunidad para entrar en el mundo de la investigación. Gracias Pilar y Mari Carmen, por haberme acogido en vuestro grupo y haberme ayudado tanto. A Mayte, mi primera maestra, por todo lo que me enseñaste. A Ivett, Héctor, Edu y Yolanda, por ser unos compañeros fantásticos.

A mi familia y amigos por todo su apoyo y buenos deseos.

Gracias Marta, mi gran amiga en la distancia, por todo tu apoyo, tus consejos, las llamadas y los abrazos. Gracias por hacerme ver que la distancia no importa. Siempre nos quedará Madrid.

A Álvaro, mi ozi, por estar ahí, incluso en los malos momentos. Gracias por confiar en mí más que yo misma, por cuidarme y quererme. Gracias por hacerme reír y hacerme ver que todo tiene un lado bueno.

A mi hermano, por estar ahí, por las canciones y las películas. Por hacer que nunca pasa el tiempo cuando nos vemos.

Y por último, quiero agradecer a mis padres, por todo su apoyo, su amor y su guía. Gracias por confiar en mí. Gracias por vuestro ejemplo de trabajo y esfuerzo, y por animarme a seguir siempre a delante y terminar lo que se empieza. Gracias por enseñarme que el golpe que no derriba, fortalece.

## RESUMEN

El alcornoque (*Quercus suber* L.) y la encina (*Quercus ilex* L.) son importantes componentes de las dehesas, modelos agrosilvopastorales únicos del sistema agroforestal del suroeste de la Península Ibérica. Ambas tienen una gran importancia económica y ecológica. El alcornoque genera corcho, que es un producto renovable altamente utilizado en la industria del vino, mientras que la encina es apreciada por su madera y la producción de bellotas y trufa negra, obtenida a partir de la simbiosis de sus raíces con el hongo *Tuber melanosporum* Vittad.

Ambas especies se encuentran seriamente afectadas por la enfermedad de “la seca”, causada entre otros factores, por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands. Hasta la fecha, las prácticas agronómicas tradicionales no han sido efectivas para controlar la infección causada por este oomiceto. Por ello, una alternativa para producir árboles tolerantes a la enfermedad podría ser la aplicación de un método biotecnológico como es la transformación genética. Puesto que en estas especies aún no se han identificado los genes específicos relacionados con la defensa al oomiceto, es necesario buscar alternativas con el objetivo de inducir algún tipo de resistencia frente a *P. cinnamomi*. Una posibilidad es la transformación genética con proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR). Estas proteínas son un grupo muy heterogéneo de proteínas que se acumulan en respuesta al ataque de patógenos, al estrés abiótico, en la resistencia sistémica adquirida y en la respuesta hipersensible. Dentro de las proteínas PR, destacan la proteínas tipo taumatina (TLP), que pertenecen a la familia PR-5, y actúan ocasionando poros en la membrana plasmática de los hongos, lo que provoca la ruptura osmótica de las células. Por ese motivo, el objetivo de esta tesis, ha sido la transformación de embriones somáticos (ES) de alcornoque y encina con el gen *CsTL1*, que fue purificado a partir de cotiledones maduros del castaño europeo, y que codifica una TLP de 23 kDa con actividad antifúngica *in vitro* contra *Trichoderma viride* y *Fusarium oxysporum*.

En alcornoque se transformaron tres líneas embriogénicas (ALM6, ALM80 y TGR3) que habían sido inducidas a partir de hojas de árboles centenarios, mientras que la encina, se emplearon tres líneas embriogénicas, que fueron iniciadas a partir de tegumentos de óvulos derivados de árboles adultos (E2 y Q8) o a partir de hojas aisladas de brotes cultivados in vitro y establecidos a partir de una encina centenaria (Q10-16). Los embriones somáticos de ambas especies fueron transformados con la cepa *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 armada con el vector pK7WG2D-TAU, y que incluía, además del gen *CsTLL1*, el gen de selección de la neomicina fosfotransferasa (*NPTII*), que confiere resistencia a la kanamicina (kan), y el gen marcador de la proteína verde fluorescente (*EGFP*).

En estudios previos se determinó que la concentración letal de kan para los embriones de alcornoque era de 125 mg/L, mientras que los embriones de encina no sobrevivían con concentraciones de kan iguales o superiores a 100 mg/L. También se evaluó la toxicidad de los antibióticos bactericidas utilizados para eliminar la bacteria una vez finalizado el período de infección. Los mejores resultados se obtuvieron en ambas especies con carbenicilina (CB) 300 mg/L. Tras 14 semanas de cultivo en medio de selección con kan y CB, se evaluó la eficiencia de transformación, definida como el porcentaje de explantos iniciales que son fluorescentes. En ambas especies, la eficiencia de transformación resultó ser dependiente del genotipo. En alcornoque se obtuvieron embriones transgénicos en los tres genotipos utilizados (TGR3: 17%, ALM80: 4,5% y ALM6: 2%), mientras que en encina la transformación se logró en dos de los tres genotipos evaluados (Q8: 3,33% y Q10-16: 1,66%). En encina, además del genotipo se evaluó el efecto que tenía el tiempo de pre-cultivo sobre la eficiencia de transformación, y los mejores resultados se obtuvieron con una y dos semanas de pre-cultivo (2%).

La presencia de los transgenes se comprobó mediante PCR, y la expresión del gen *CsTLL1* se analizó mediante qPCRrt. En alcornoque se analizó la expresión de 18 líneas transgénicas, de las cuales 15 sobre-expresaron el gen *CsTLL1*, lo que representa el 83,33%. En encina se

analizaron 6 de las 11 líneas transgénicas obtenidas, de las cuales 4 sobre-expresaron el gen *CsTL1*, lo que representa el 66,67%.

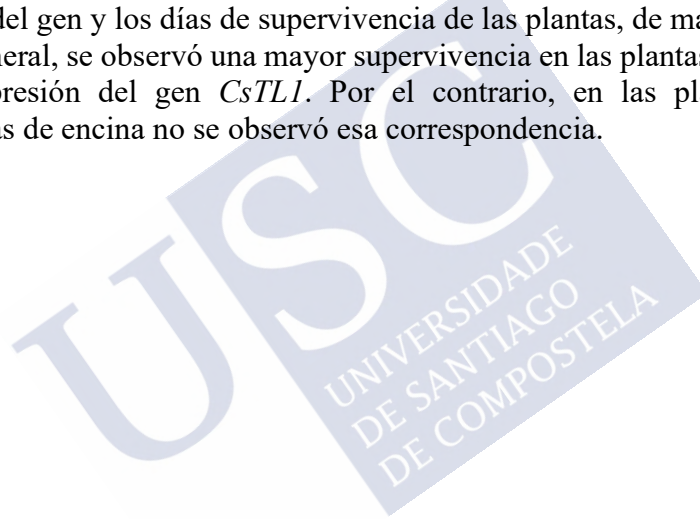
Con el fin de conservar a largo plazo las líneas embriogénicas transgénicas obtenidas en ambas especies, el material fue crioprotegido mediante el método de la vitrificación, y posteriormente almacenado en nitrógeno líquido (NL). En la mayoría de las líneas transgénicas, tanto de alcornoque como de encina, el porcentaje de recuperación embriogénica después su almacenamiento en NL fue superior al porcentaje de recuperación embriogénica de los controles sin transformar. Además, se confirmó la presencia de los tres transgenes en las líneas transformadas que habían sido almacenadas en NL mediante PCR, demostrando que la integridad del transgén no se ha visto afectada por los procesos de crioprotección y el almacenamiento en NL.

Los embriones somáticos, en estado cotiledonar, de alcornoque y encina se sometieron al proceso de maduración y germinación para obtener plantas transgénicas. Los porcentajes de conversión a planta fueron variables, dependiendo del genotipo y la línea, pero en todas las líneas evaluadas se obtuvo la regeneración de las plantas y las plantas derivadas de las líneas transgénicas crecieron con normalidad, no mostrando diferencias morfológicas con respecto a las plantas derivadas de embriones no transformados. Todas las plantas obtenidas de líneas transgénicas de alcornoque y encina mostraron expresión del gen *GFP* tanto en raíces como en tallos y hojas.

Los cultivos de brotes axilares de las líneas transgénicas y sus correspondientes líneas no transformadas fueron establecidos mediante el aislamiento y multiplicación de los brotes obtenidos a partir de la germinación de los ES, con el objetivo de disponer de una producción continua de plantas homogéneas en términos de la longitud del brote y raíz. Posteriormente, dichos brotes fueron enraizados y depositados sobre puentes de papel dentro de tubos de vidrio con medio líquido.

Por último, se evaluó la tolerancia de las plantas de alcornoque y encina transformadas con el gen *CsTL1* frente a la infección con *P. cinnamomi*. Para ello, las plantas enraizadas de alcornoque y encina y cultivadas en medio líquido se infectaron con un inóculo de la cepa de

*P. cinnamomi* A2, denominada UEX-1, que estaba en fase de esporulación. Para la evaluación de la tolerancia se utilizaron dos tipos de ensayos, por un lado se evaluó el porcentaje de reaislamiento del micelio, definido como el porcentaje de raíces, tallos y hojas a partir de los cuales se recuperaba el oomiceto, y por otro lado los días de supervivencia, referidos al tiempo que tardaban las plantas en mostrar necrosis en todos sus órganos. A partir de los resultados obtenidos de estos ensayos se puede afirmar que el parámetro días de supervivencia es el más adecuado para evaluar el nivel de tolerancia in vitro de las plantas transgénicas de alcornoque y encina. En alcornoque, 4 de las 8 líneas transgénicas evaluadas sobrevivieron significativamente más tiempo que sus correspondientes controles, mientras que encina, los datos de supervivencia no fueron tan concluyentes, y sólo una de las cinco líneas infectadas tuvo un tiempo de supervivencia significativamente mayor que el control sin transformar. En las plantas de alcornoque se observó una buena correlación entre el nivel de expresión del gen y los días de supervivencia de las plantas, de manera que, en general, se observó una mayor supervivencia en las plantas con mayor expresión del gen *CsTL1*. Por el contrario, en las plantas transgénicas de encina no se observó esa correspondencia.



## ABREVIATURAS MÁS USADAS

<b>2,4-D</b>	2,4-diclorofenoxiacético
<b>ABA</b>	Ácido abscísico
<b>AIB</b>	Ácido indol-3-butírico
<b>AMPs</b>	Péptidos antimicrobianos
<b>ANA</b>	Ácido naftalenacético
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza
<b>BA</b>	6-benciladenina
<b>CB</b>	Carbenicilina
<b>CF</b>	Cefotaxima
<b>ES</b>	Embriones somáticos
<b>ESS</b>	Embriogénesis somática secundaria
<b>EZ</b>	Embriones zigóticos
<b>G</b>	Medio mineral Gamborg
<b>GD</b>	Medio mineral Gresshoff y Doy
<b>genes R</b>	Genes de resistencia
<b>GFP</b>	Proteína fluorescente verde
<b>GUS</b>	$\beta$ -glucuronidasa
<b>ISR</b>	Resistencia sistémica inducida
<b>JA</b>	Jasmonato

<b>kan</b>	Kanamicina
<b>LB</b>	Medio Luria-Bertani
<b>LTPs</b>	Proteínas de transferencia de lípidos
<b>MS</b>	Medio mineral Murashige y Skoog
<b>NL</b>	Nitrógeno líquido
<b><i>NPTII</i></b>	Neomicina fosfotransferasa II
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PEMs</b>	Masas proembriónicas
<b>PGRs</b>	Reguladores del crecimiento
<b>proteínas PR</b>	Proteínas relacionadas con la patogénesis
<b>qPCRrt</b>	PCR en tiempo real
<b>RH</b>	Respuesta hipersensible
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>SA</b>	Ácido salicílico
<b>SH</b>	Medio mineral Schenk y Hildebrandt
<b>SAR</b>	Resistencia sistémica adquirida
<b>STS</b>	Tiosulfato de plata
<b>TLPs</b>	Proteínas tipo taumatina
<b>wt</b>	Explantos o líneas no transformadas

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	7
1.1. La dehesa.....	9
1.2. El alcornoque.....	10
1.2.1. Características generales.....	10
1.2.2. Reproducción .....	11
1.2.3. Distribución .....	11
1.2.4. Hábitat.....	12
1.2.5. Usos.....	12
1.3. La encina.....	14
1.3.1. Características generales.....	14
1.3.2. Reproducción .....	14
1.3.3. Distribución .....	15
1.3.4. Hábitat.....	15
1.3.5. Usos.....	16
1.4. Enfermedades del alcornoque y la encina .....	17
1.4.1. La seca .....	17
1.4.2. Enfermedades de la madera .....	20
1.5. Mecanismos de defensa de las plantas.....	20
1.5.1. Respuesta pasiva .....	21
1.5.2. Respuesta activa.....	21
1.6. Proteínas relacionadas con la patogénesis .....	25
1.6.1. Proteínas PR-1 .....	26

1.6.2.	Proteínas PR-2 .....	26
1.6.3.	Quitinasas .....	27
1.6.4.	Proteínas PR-5 .....	27
1.6.5.	Proteínas PR-6 .....	28
1.6.6.	Proteínas PR-7 .....	29
1.6.7.	Proteínas PR-9 .....	29
1.6.8.	Proteínas PR-10 .....	30
1.6.9.	Proteínas PR-12 .....	30
1.6.10.	Proteínas PR-13 .....	30
1.6.11.	Proteínas PR-14 .....	31
1.6.12.	Proteínas PR-15 y PR-16 .....	31
1.6.13.	Proteínas PR-17 .....	31
1.7.	Estrategias para combatir enfermedades fúngicas en plantas ....	32
1.7.1.	Control de las enfermedades mediante prácticas agronómicas .....	32
1.7.2.	Métodos de mejora genética para obtener plantas resistentes frente a enfermedades .....	37
1.8.	Transformación genética para generar tolerancia a enfermedades fúngicas.....	41
1.8.1.	Silenciamiento génico.....	41
1.8.2.	Producción de productos génicos .....	42
1.9.	transformación genética en árboles.....	44
1.9.1.	Métodos de transformación.....	45
1.9.2.	Métodos de selección.....	48
1.9.3.	Métodos de regeneración .....	50
1.10.	Embriogénesis somática en encina y alcornoque .....	52
1.10.1.	Inducción de embriogénesis somática en alcornoque .....	52

1.10.2.	Inducción de embriogénesis somática en encina .....	55
1.10.3.	Mantenimiento de la capacidad embriogénica en alcornoque y encina .....	58
1.10.4.	Maduración y germinación en alcornoque y encina.....	58
1.11.	Transformación genética en alcornoque y encina .....	61
1.12.	Crioconservación en alcornoque y encina .....	62
2.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	65
3.	MATERIAL Y MÉTODOS .....	71
3.1.	Material vegetal .....	73
3.2.	Condiciones de cultivo .....	74
3.3.	Genes y plásmido .....	74
3.4.	Determinación de la dosis letal de kanamicina.....	75
3.5.	Cultivos bacterianos .....	76
3.6.	Transformación genética.....	77
3.6.1.	Transformación genética en alcornoque .....	77
3.6.2.	Transformación genética en encina .....	78
3.7.	Selección y multiplicación de las líneas transgénicas de alcornoque y encina .....	79
3.8.	Técnicas moleculares .....	80
3.8.1.	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	80
3.8.2.	Cuantificación relativa de los niveles de transcripción del gen <i>CsTL1</i> mediante RT-PCR en tiempo real .....	81
3.9.	Crioconservación de las líneas transgénicas .....	83
3.9.1.	Equipamiento de crioconservación .....	84
3.9.2.	Material vegetal .....	85
3.9.3.	Procedimiento de crioconservación.....	85
3.10.	Regeneración de plantas.....	87

3.10.1.	Maduración y germinación de los embriones somáticos.....	87
3.10.2.	Establecimiento de cultivos de brotes axilares .....	89
3.10.3.	Enraizamiento de los brotes axilares de alcornoque y encina . .....	90
3.10.4.	Conservación de los cultivos axilares .....	91
3.11.	Ensayos de tolerancia a <i>P. cinnamomi</i> .....	92
3.11.1.	Recuperación y activación de la cepa.....	92
3.11.2.	Producción de esporangios .....	93
3.11.3.	Ensayo de tolerancia <i>in vitro</i> .....	95
3.12.	Análisis estadístico.....	98
3.12.1.	Evaluación de la toxicidad de los antibióticos.....	99
3.12.2.	Transformación genética de los embriones somáticos.....	99
3.12.3.	Expresión del gen <i>CsTL1</i> .....	99
3.12.4.	Evaluación de la germinación y conversión a planta.....	99
3.12.5.	Evaluación del porcentaje de enraizamiento .....	99
3.12.6.	Evaluación de la tolerancia a <i>P. cinnamomi</i> .....	100
4.	RESULTADOS.....	101
4.1.	Evaluación de la toxicidad de los antibióticos.....	103
4.1.1.	Alcornoque .....	103
4.1.2.	Encina .....	106
4.2.	Transformación genética de los embriones somáticos.....	107
4.2.1.	Transformación genética en alcornoque.....	107
4.2.2.	Transformación genética en encina .....	111
4.3.	Confirmación de la presencia de los genes mediante PCR.....	115
4.3.1.	Alcornoque .....	115
4.3.2.	Encina .....	117

4.4.	Determinación de los niveles de expresión del gen <i>CsTL1</i> .....	117
4.4.1.	Alcornoque .....	118
4.4.2.	Encina .....	121
4.5.	Crioconservación de las líneas embriogénicas.....	122
4.5.1.	Alcornoque .....	122
4.5.2.	Encina .....	125
4.6.	Regeneración de plantas.....	127
4.6.1.	Alcornoque .....	127
4.6.2.	Encina .....	133
4.7.	Proliferación de brotes axilares.....	137
4.7.1.	Alcornoque .....	137
4.7.2.	Encina .....	138
4.8.	Enraizamiento de brotes axilares.....	140
4.8.1.	Alcornoque .....	140
4.8.2.	Encina .....	143
4.9.	Evaluación de la tolerancia a <i>P. cinnamomi</i> en plantas cultivadas <i>in vitro</i> .....	144
4.9.1.	Evaluación de la tolerancia en alcornoque .....	145
4.9.2.	Evaluación de la tolerancia en encina .....	157
5.	DISCUSIÓN.....	163
5.1.	Selección de antibióticos.....	165
5.1.1.	Selección de la dosis letal kanamicina .....	165
5.1.2.	Selección de antibióticos bactericidas .....	167
5.2.	Selección mediante <i>GFP</i> .....	169
5.3.	Transformación genética.....	172
5.3.1.	Transformación genética en alcornoque .....	172

VANESA CANO

5.3.2.	Transformación genética en encina .....	174
5.3.3.	Confirmación de la transformación genética .....	176
5.4.	Regeneración de las plantas transgénicas.....	177
5.4.1.	Germinación y conversión de los embriones somáticos ....	177
5.4.2.	Regeneración de plantas mediante la proliferación de brotes axilares.....	178
5.5.	Conservación del material transgénico generado.....	180
5.6.	Evaluación de la tolerancia a <i>P. cinnamomi</i> .....	182
6.	CONCLUSIONES.....	191
7.	BIBLIOGRAFÍA .....	197
ANEXO 1.....		253
ANEXO 2.....		263
ANEXO 3.....		267



## 1. INTRODUCCIÓN





### 1.1. LA DEHESA

Las dehesas son sistemas de explotación ganadera y/o cinegética de carácter multifuncional en el que al menos el 50 % de la superficie está ocupada por pastizal con arbolado adulto disperso, productor de bellotas y con una fracción de cabida cubierta entre el 5 y el 60 % (Pulido y Picardo 2010). Las dehesas presentes en la Península Ibérica muestran como especies arbóreas predominantes aquellas pertenecientes al género *Quercus*, como la encina (*Q. ilex* L.), el alcornoque (*Q. suber* L.), el quejigo (*Q. faginea* Lam.) o el melojo (*Q. pyrenaica* Willd.). Estas coexisten de forma dispersa con cultivos y pastos (Acacio *et al.* 2010; Acosta 2014). La encina es la especie más abundante, seguida del alcornoque. En España, las dehesas representan un área de pastoreo de gran importancia con una extensión 2,3 millones de hectáreas, mientras que en Portugal su extensión es de 0,7 millones de hectáreas ([www.agforward.eu](http://www.agforward.eu)).

Las dehesas son ecosistemas únicos que están consideradas como Sistemas de Alto valor Natural. Constituyen un modelo agrosilvopastoral en el que se compatibiliza en el espacio y en el tiempo las producciones de ganado (cerdos, vacas, ovejas y cabras), cultivos agrícolas, madera, frutos, pastos, apicultura, plantas aromáticas, medicinales y con fibra, hongos, etc. y del que se obtiene, entre otros productos, el jamón ibérico de bellota, el corcho, la miel, el queso, la trufa o la lana merina (MAPA 2008; Pulido y Picardo 2010). A esto, además, se une en los últimos años su aprovechamiento recreativo y cinegenético, especialmente para la caza mayor (Díaz *et al.* 2009).

El origen de la dehesa se remonta a la Edad Media, cuando los órdenes militares de Santiago, Alcántara o Monteso recibieron tierras por su papel en la Reconquista. Igualmente, se cedieron grandes porciones de terreno a los ayuntamientos y comunidades (Linares y Zapata 2003). El término “dehesa” significa “defensa” y “defessar”, y se refiere a los terrenos de uso común que se reservaban para el crecimiento de pastos y la cría de ganado (Pulido y Picardo 2010). Debido a la necesidad de aprovechar este espacio de baja capacidad productiva, con poca fertilidad del suelo y marcada sequía estival (Guadilla-Sáez *et al.* 2017), en las dehesas se aplicaron prácticas como el aclarado y poda del arbolado, y la eliminación del matorral (Linares

2007). Esto permite labrar la tierra, y al recibir una mayor insolación, se incrementa la producción de pasto y cereales. Además, la disposición aislada de los árboles permite una producción de bellotas de hasta diez veces mayor que en las formaciones boscosas (Pulido *et al.* 2001).

A su indudable papel económico, se une el hecho de que las dehesas realizan una función ecológica muy importante al actuar como retardantes de la erosión del suelo y la desertificación, factores considerados problemáticos en el ecosistema mediterráneo (Thornes 2000). Además, el hábitat que conforman las dehesas sirve para albergar una alta diversidad biológica, no sólo vegetal sino también animal (López-Sánchez *et al.* 2016), siendo residencia de especies tan simbólicas como el águila imperial, el buitre negro o el lince ibérico (Berrahmouni *et al.* 2005; Pulido y Picardo 2010; FAO 2013). Por todo esto, las dehesas perennifolias de *Quercus* spp. están incluidas en el anexo I de la Directiva Hábitats 92/43/CEE (Ramírez y Díaz 2008).

Sin embargo, y pese a su gran importancia económica, ecológica y cultural, la viabilidad y sostenibilidad de la dehesa se encuentra seriamente amenazada, corriendo incluso peligro de desaparecer. El principal problema, como se describirá con detalle más adelante, es el síndrome del decaimiento y muerte de las quercíneas denominado “la seca” (Sánchez *et al.* 2000; Pulido y Picardo 2010). A las pérdidas de arbolado por la enfermedad, se une la falta de regeneración de las principales especies de las dehesas, encinas y alcornoques (los árboles viejos que mueren no son reemplazados por otros nuevos) y el abandono de las prácticas de uso tradicional de las dehesas (Pulido *et al.* 2001; Plieninger *et al.* 2003).

## **1.2. EL ALCORNOQUE**

### **1.2.1. Características generales**

El alcornoque está clasificado como una especie prioritaria por la fundación World Wildlife Fund (WWF). Esta clasificación se otorga a las especies, generalmente amenazadas, que tienen amplios requerimientos de hábitat y cuya supervivencia implica también garantizar el futuro del resto de especies con las que comparten el hábitat.

El alcornoque es un árbol de hoja perenne y de crecimiento lento. En buenas condiciones suele alcanzar los 20 m de altura y un diámetro de 1,5 m (Gil *et al.* 2008; Praciak *et al.* 2013). Sin embargo, las poblaciones de alcornoque presentan variaciones en el crecimiento, el tamaño de la bellota, la tolerancia a la sequía, control del agua, resistencia al frío y en su adaptación al ambiente local (Ramírez-Valiente *et al.* 2009a, b, 2010, 2011).

### **1.2.2. Reproducción**

El alcornoque es una especie monoica que se poliniza por el viento. Las flores aparecen a partir de abril y pueden producir bellotas anuales o bianuales. Las flores femeninas pueden reunirse en pequeños grupos de pedúnculos de 2 a 5 flores, o encontrarse aisladas y protegidas por una cúpula escamosa. Las flores masculinas se agrupan en inflorescencias llamadas amentos, que penden de las axilas de las hojas, y de las ramas cortas, y presentan un periantio con cuatro o seis pétalos, e igual o doble número de anteras. Como es una especie monoica, se espera que se produzcan sólo flores masculinas o femeninas, pero es bastante frecuente la aparición de flores hermafroditas (Boavida *et al.* 1999). Las bellotas tienen 2-3 cm de longitud, y poseen forma ovalada (Houston *et al.* 2016). Su número varía de año en año, pudiendo darse un año muy productivo seguido de otro sin apenas producción (Aronson *et al.* 2009).

### **1.2.3. Distribución**

Se dice que la distribución del alcornoque es relictiva, ya que es discontinua y fragmentada. Ocupa una superficie de 1,5 millones de ha en Europa, y 700.000 ha en el norte de África, dándose la mayor extensión de cultivos en la costa atlántica de la Península Ibérica. Se calcula que en Portugal y España crecen el 34% y 27% de la población mundial de alcornoques, respectivamente (Sierra-Pérez *et al.* 2015). Además, el alcornoque ha sido introducido durante el siglo XX en otros países para producción de corcho o como árbol ornamental, como es el caso de Bulgaria, California, Chile, Nueva Zelanda, el sur de Australia y Turquía (Aronson *et al.* 2009; FAO 2013).

#### **1.2.4. Hábitat**

El alcornoque crece formando bosques, o como ya se ha mencionado, en dehesas, siendo la especie principal, o en conjunto con otras especies, como la encina, y el pino marítimo (*Pinus pinaster*). Suele talarse para ampliar el terreno de pasto, habiendo normalmente 30-60 árboles por ha (Bugalho *et al.* 2011).

Puede resistir condiciones adversas de origen natural o humano, ya sean podas intensivas, sequía extrema e incluso incendios, pero necesita una temperatura media de 15°C, y no tolera temperaturas por debajo de -10°C, lo cual limita su distribución latitudinal y altitudinal (Aronson *et al.* 2009; FAO 2013).

El alcornoque puede crecer en cualquier tipo de suelo, aunque prefiere sustratos arenosos y ligeramente estructurados. Para crecer en climas cálidos y secos desarrolla un sistema radicular muy profundo, lo que le permite acceder a fuentes de agua en condiciones de sequía, y puede regular la apertura de los estomas en las hojas para evitar la pérdida de agua durante la respiración (Aronson *et al.* 2009).

#### **1.2.5. Usos**

Los principales usos del alcornoque se refieren a la producción de bellotas y corcho. Las bellotas suelen servir de alimento al ganado que pasta en las dehesas, aunque históricamente se tiene constancia de que también han sido utilizadas para el consumo humano. Mezcladas con las bellotas de encina, pueden tostarse y hervirse para preparar café de bellota, muy consumido en España hasta los años 70 (García-Gómez *et al.* 2017).

Sin embargo, el alcornoque es conocido principalmente por su gruesa corteza externa, compuesta por células muertas suberizadas que forman un tejido compacto, elástico, impermeable y aislante de hasta 30 cm de grosor denominado corcho (Pereira 2007). El corcho se considera una adaptación contra los incendios, muy comunes en el área mediterránea. Esta gruesa corteza protege el tronco del árbol y permite su crecimiento después del daño producido por el fuego. Se conoce otra especie capaz de producir corteza suberizada. Este árbol, denominado *Phellodendron amurense*, o el árbol de corcho de Amur, crece en China,

Manchuria, Corea, y Japón. Se introdujo en EEUU como árbol de interés paisajístico y potencial fuente de corcho industrial, pero sus cultivos no crecieron como era deseado y finalmente se desaconsejó su uso general (Read y Zasada 2008).

Por tanto, el alcornoque es la única especie utilizada para la producción industrial de corcho (EUFORGEN; Pausas 1997). Cada año el árbol produce un nuevo anillo de corcho que no se cae naturalmente, pero puede recolectarse arrancando la corteza del árbol, sin dañar el tronco (Pulido y Picardo 2010; Rives *et al.* 2012; Gil 2014; Sierra-Pérez *et al.* 2015). La primera recolección se realiza cuando el árbol alcanza los 25-30 años, y posteriormente se repite cada 9-12 años.

El corcho es un material ligero, resistente al agua, no perecedero, flexible, estable químicamente y, como ya se ha mencionado, resistente al fuego. También es renovable, reciclable y biodegradable. Ha sido utilizado por los humanos desde hace más de 2.000 años y es el sexto material forestal no leñoso más importante económicamente a nivel mundial. En la Península Ibérica se extrae más del 80% del corcho mundial (Gil 2014; Sierra-Pérez *et al.* 2015). El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA: Avance Estadística Forestal 2017) estima que durante el año 2017 se recolectaron 56.439 toneladas de corcho en toda España, mayoritariamente en Cataluña y Extremadura. En el año 2011 se estimó que el valor medio de las exportaciones mundiales de corcho estuvo en torno a 1,3 millones de €, mientras que el de los productos fabricados a partir de corcho fue de 2 billones de dólares USD (FAO 2013). La mayor aplicación del corcho es la producción de tapones para la industria del vino y champán (Gil 2014). Cada tapón está compuesto de un centro de conglomerado de corcho y dos discos de corcho natural (Rives *et al.* 2012). El corcho también se utiliza como material de construcción, para suelos y aislante térmico (Gil 2014; Sierra-Pérez *et al.* 2015, 2016). Los aglomerados de corcho son el componente ideal de estructuras ligeras, y ha sido utilizado en aplicaciones aeroespaciales (Gil 2009).

Aparte de sus usos industriales, el alcornoque tiene una enorme importancia ecológica, ya que se piensa que los bosques de esta especie pueden mitigar el cambio climático a nivel local, reduciendo las

emisiones de CO<sub>2</sub> y promoviendo su absorción (Gil 2014). Por otro lado, también influyen en el ciclo de agua, ya que limitan la evaporación del agua del suelo, afectan a la recarga de acuíferos y al control de la escorrentía. Además de requerir poca agua para su crecimiento, debido a su longevidad y a la producción de corcho, es una especie que fija una gran cantidad de CO<sub>2</sub>. Por último, los paisajes de alcornocal contienen mosaicos de hábitats que incluyen diferentes tipos de bosques mixtos, donde los niveles de diversidad de plantas pueden alcanzar las 135 especies por 1.000 m<sup>2</sup>.

### **1.3. LA ENCINA**

#### **1.3.1. Características generales**

La encina es considerada una especie ingeniera autogénica para el ecosistema de dehesa, es decir, una especie que modula el entorno fabricando estructuras, modificando su composición y generando de este modo nuevos nichos que puedan ser ocupados por otras especies (Plieninger *et al.* 2003).

Es un árbol muy longevo que puede llegar a vivir más de 1.000 años. Puede crecer hasta los 25 m de altura, su tronco alcanza una media de 2 m de diámetro y tiene la copa ancha y abovedada, con ramas ascendentes, y corteza muy oscura, frecuentemente fracturada en pequeños cuadrados (Praciak *et al.* 2013).

La especie *Q. ilex* se divide en dos subespecies, *Q. ilex* subsp. *rotundifolia* (a veces referida como *Q. ilex* subsp. *ballota* o como *Q. rotundifolia*) y *Q. ilex* subsp. *ilex*. Esta subdivisión se hace según la morfología de las hojas: *Q. ilex* subsp. *rotundifolia* tiene hojas lanceoladas con 6-8 venas, mientras que *Q. ilex* subsp. *ilex* presenta hojas ovaladas con 8-9 venas. En ambas subespecies, las hojas son pequeñas y coriáceas, y presentan el envés cubierto de vellosidades. Estas son características de especies esclerófilas, y le ayudan a reducir la transpiración, mejorando su resistencia a la sequía.

#### **1.3.2. Reproducción**

La encina es una especie monoica, siendo ambos tipos de flores morfológicamente muy diferentes. Las flores masculinas, denominadas

amentos, forman racimos largos y densos de 4-7 cm de largo y de color verde pálido. Cuando maduran se abren y los amentos adquieren un color amarillento. Las flores femeninas son muy pequeñas, aparecen en grupos de 2 o 3 sobre pedúnculos cortos y erectos en las axilas de las hojas (Praciak *et al.* 2013). La aparición de las flores femeninas se produce después de hacerlo las masculinas, quizás para favorecer la polinización cruzada y evitar así la autopolinización. Las bellotas suelen madurar entre noviembre y enero, teniendo una gran producción cada 4-6 años (Terradas 1999).

### **1.3.3. Distribución**

La encina se distribuye en la parte central y occidental de la cuenca mediterránea. Se extiende desde Portugal a Marruecos, incluyendo las islas del Egeo, la parte oeste de Turquía, y el norte de Italia y Francia. Además, algunas poblaciones crecen en algunas localidades de Anatolia o en la costa del Mar Negro (Praciak *et al.* 2013). La distribución altitudinal es variable, ya que *Q. ilex* puede crecer desde zonas costeras hasta los 1.800 m de altitud en el sur de España, o a 2.900 m en la zona oeste del Gran Atlas, en Marruecos (Barbero *et al.* 1992).

### **1.3.4. Hábitat**

La encina tolera una gran variedad de hábitats, dado que es una especie capaz de crecer en un amplio tipo de sustratos y bajo las diferentes condiciones del clima mediterráneo. Además, las encinas están capacitadas para suspender las actividades vegetativas durante los períodos de sequía, y reactivarlas cuando el agua está disponible de nuevo. Crecen en zonas semiáridas, cálidas o con altas precipitaciones, pero también pueden aparecer en zonas muy frías y con mayor altitud, siempre y cuando las precipitaciones sean bajas (Barbero *et al.* 1992). A diferencia del alcornoque, la encina es capaz de resistir períodos de frío intenso, hasta temperaturas de -24°C (de Rigo *et al.* 2016). Sin embargo, la encina está menos adaptada a sequías extremas que otras especies mediterráneas, como el *Quercus suber*, *Ceratonia siliqua* u *Olea oleaster* (Terradas 1999).

### 1.3.5. Usos

Los principales usos de la encina se refieren a su madera y la producción de bellotas y trufa. La madera de encina se ha utilizado para la fabricación de herramientas de carpintería, así como para la producción de carbón, soportes de las vías de los trenes, estacas y pilotes para las obras hidráulicas, debido a su resistencia a la inmersión. Actualmente, el principal uso de esta madera es el combustible, ya que tiene elevada potencia calorífica, lo que la hace muy preciada (Vignote 2014; Praciak *et al.* 2013). La madera de árboles jóvenes puede utilizarse para la extracción de taninos.

Actualmente las bellotas se utilizan fundamentalmente para cebar a los cerdos ibéricos, que se crían en las dehesas de la mitad suroeste de la Península Ibérica, para la producción de embutidos de alta calidad (Rodríguez Estévez *et al.* 2007). Sin embargo, durante mucho tiempo, las bellotas de las encinas se utilizaron como alimento de los seres humanos. Pueden consumirse crudas (después de dejarlas secar como las nueces), hervidas con agua y anís, asadas o tostadas. Las bellotas dulces, una vez secas, pueden molerse para obtener harina, y con ella se puede hacer pan, gachas o incluso diferentes tipos de dulces, turroneos o pasteles. El consumo de pan de bellota en la Península Ibérica ha sido muy frecuente desde la prehistoria hasta el siglo XX, especialmente durante la Guerra Civil y la etapa de post-guerra. Debidamente tostadas y hervidas, las bellotas dulces y amargas también pueden utilizarse para preparar un sustituto del café. Otro producto que puede obtenerse a partir de las bellotas es el aceite, apto para el consumo humano y considerado terapéutico. También pueden prepararse tortillas a partir del triturado de bellotas, migas, tónicos medicinales con propiedades astringentes y licores. La miel obtenida a partir de las flores de la encina también es muy apreciada (García-Gómez *et al.* 2013, 2017).

Las encinas también son muy apreciadas por la producción de la trufa negra, obtenida a partir de la simbiosis de sus raíces con el hongo *Tuber melanosporum* Vittad (Büntgen *et al.* 2015). La trufa se considera un producto gastronómico de alta calidad y tiene una gran importancia desde el punto de vista económico, social y ecológico, siendo muy apreciada en zonas donde es difícil de cultivar (Domínguez

*et al.* 2005). La producción de trufa se desarrolla principalmente en Francia, Italia y España, preferentemente en encinares, coscojares y quejigares de baja espesura, que permiten la insolación directa del suelo (Reyna *et al.* 2002). Además de ser muy apreciada en el ámbito gastronómico, la trufa negra presenta capacidad antioxidante, antiinflamatoria, inmunomoduladora, antitumoral, antimicrobiana y afrodisíaca (Patel *et al.* 2017).

#### **1.4. ENFERMEDADES DEL ALCORNOQUE Y LA ENCINA**

##### **1.4.1. La seca**

Como se ha mencionado anteriormente, el alcornoque y la encina están severamente afectados por el síndrome de “la seca”, que está causada por factores bióticos y abióticos. Su origen parece estar relacionado con el exceso de humedad y con el aumento de las temperaturas, pero también con el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands, microorganismo patógeno muy destructivo, cuya acción se ve potenciada por el estrés hídrico y favorecida por la infección simultánea de hongos e insectos (Camilo-Alves *et al.* 2013; Corcobado *et al.* 2013). Otros factores de estrés, como la contaminación del aire y del suelo y el exceso de nitrógeno, podrían empeorar el efecto de la sequía (Thomas *et al.* 2002).

*P. cinnamomi* es considerado el principal responsable biótico de la enfermedad de la seca (Brasier *et al.* 1996; Thomas *et al.* 2002). Fue descrito por primera vez por Waterhouse en 1963 e inicialmente fue clasificado como un hongo, pero hoy en día se considera un oomiceto perteneciente a la familia *Phythiaceae* (OEPP/EPPO 2004). Se diferencia de los hongos en que la mayor parte de su vida tiene forma diploide, mientras que los hongos son haploides, y que las paredes celulares están recubiertas por celulosa y  $\beta$ -glucanos, en lugar de quitina. También utilizan  $\beta$ -1,3-glucano como carbohidrato de almacenamiento, no sintetizan esteroides, necesitando una fuente externa de  $\beta$ -hidroxi-esteroides. Además, tienen zoosporas biflageladas y son resistentes a antibióticos polienes como la piromicina (Erwin y Ribeiro 1996).

Este oomiceto es uno de los patógenos más comunes de la naturaleza con más de 3.000 hospedadores. Su origen pudo estar en Indonesia, habiéndose distribuido hacia Sudamérica durante el siglo XVIII (Hardam 2005). Actualmente, su distribución es mundial, sin que sea específico de un solo hospedador (CABI 2017). Sin embargo, la encina está considerada como la especie de *Quercus* más susceptible a la infección por *P. cinnamomi* (Ruiz-Gómez *et al.* 2012). *P. cinnamomi* tiene una limitada actividad saprofita, no creciendo ni compitiendo en el terreno con otros microorganismos. Por ello, actúa como invasor primario, afectando a individuos sanos o con heridas recientes que no han sido infectados (García-Benavides y Monte-Vázquez 2005).

Su principal estructura es el micelio, que tiene forma tubular y ramificada, y cada una de sus ramas se llama hifa. Las hifas son continuas y sin tabicar, recubiertas por hinchazones esféricas que le confieren aspecto coraloide. En condiciones óptimas, el micelio es hialino. Visualmente es muy fácil de reconocer, debido a sus característicos hinchamientos hifales y clamidosporas en racimos (Blackwell 1949; Erwin y Ribeiro 1996; García-Benavides y Monte-Vázquez 2005). Es un organismo hemibiotrófico, por lo cual presenta dos fases en su ciclo de vida dentro del huésped, una fase biotrófica y una fase necrotrófica (Oßwald *et al.* 2014).

La reproducción sexual de *P. cinnamomi* es muy poco habitual, ocurriendo sólo cuando se produce el cruce entre estirpes compatibles (OEPP/EPPO 2004). Es una especie heterotálica, con dos tipos de formas de apareamiento conocidas como A1 y A2. La variedad A2 tiene distribución mundial, mientras que la variedad A1 tiene una distribución más limitada (Zentmyer 1980).

Excepto en condiciones muy particulares, la reproducción suele ser asexual, a través de zoosporas, producidas por esporangios. Estos sólo se producen en soluciones acuosas, y son persistentes, no papilados y de forma elipsoide y ovalada, que se desarrollan a partir de esporangióforos, cuyo diámetro es similar al de las hifas (García-Benavides y Monte-Vázquez 2005).

Si las condiciones del suelo no son favorables, *P. cinnamomi* puede sobrevivir en materia muerta y en el suelo, en forma de micelio,

esporangio, zoospora enquistada y oospora (Weste y Vithanage 1979; Shea *et al.* 1980; García-Benavides y Monte-Vázquez 2005; Hein *et al.* 2009).

Cuando las condiciones de humedad son favorables, los esporangios liberan al agua zoosporas biflageladas móviles, que pueden nadar hacia las raíces jóvenes y pequeñas (García-Benavides y Monte-Vázquez 2005). Las zoosporas son atraídas quimotácticamente por zonas específicas de la raíz, como zonas de elongación o heridas recientes, donde hay más concentración de nutrientes (como el glutamato, aspartato, asparagina y glutamina) y menor resistencia por parte del hospedador. Allí se enquistan y germinan. La penetración ocurre durante las 24 horas posteriores, y una vez han penetrado, las zoosporas se enquistan de nuevo, generando después un tubo de germinación que da lugar a las hifas. Estas hifas crecen intercelularmente primero, a lo largo de las paredes celulares, y posteriormente de forma intracelular (García-Benavides y Monte-Vázquez 2005; Ruíz-Gómez *et al.* 2012; Oßwald *et al.* 2014). El oomiceto se extiende por dentro de la raíz, a través del floema (Redondo *et al.* 2015), llegando a alcanzar la base del tallo (Zentmyer 1988).

El primer síntoma de esta infección es la podredumbre, más frecuente en raíces absorbentes (Oßwald *et al.* 2014; Redondo *et al.* 2015), en las que provoca una rápida maceración. A continuación, ataca a las raíces gruesas y al tallo de la planta (García-Benavides y Monte-Vázquez 2005). Los síntomas secundarios son el amarilleamiento de las hojas, aclaramiento de la copa del árbol y pudrición de ramas (Oßwald *et al.* 2014). También se produce la aparición de chancros en la corteza, el decaimiento, la disminución del tamaño de los frutos, producción de exudados, y podredumbre del tallo (García-Benavides y Monte-Vázquez 2005; CABI 2017). Estos síntomas pueden darse lugar incluso años después de la primera infección.

El control químico de *P. cinnamomi*, como se describirá más adelante, es muy difícil, debido a su amplio rango de huéspedes, a su capacidad de sobrevivir en plantas sin producir síntomas (en forma de clamidiosporas) o a la infección de raíces profundas, donde es difícil que actúe la fumigación. El aumento de las temperaturas invernales

causado por el cambio climático podría favorecer la supervivencia de este patógeno, y el aumento de su distribución (Tiberi *et al.* 2016).

#### **1.4.2. Enfermedades de la madera**

Tradicionalmente, el alcornoque y la encina han estado afectados por enfermedades de la madera, frecuentemente relacionadas con el decaimiento del árbol.

El alcornoque y la encina pueden sufrir el chancro del tronco causado por *Botryosphaeria corticola* A.J.L. Phillips, Alves *et* Luque sp. nov. (Alves *et al.* 2004). Las lesiones aparecen a lo largo de la corteza, bordeadas por abultamientos del corcho y grietas longitudinales que pueden dejar al descubierto la casca. Si las lesiones son numerosas pueden llegar a anillar o matar al árbol. El alcornoque y la encina también pueden padecer chancros en las ramas, causados por *B. dothidea*, *B. corticola* o *B. ibérica* (Sánchez *et al.* 2003b). La aparición de estos patógenos está muy relacionada con la presencia de nidos, y se piensa que las heridas en la corteza causada por los pájaros o los propios nidos podrían facilitar la infección (De Vita *et al.* 2010).

El alcornoque y la encina también pueden ser atacados por *Biscogniauxia mediterranea* (De Not.) Kuntze (Jiménez *et al.* 2005; Yangui *et al.* 2019), patógeno responsable del chancro carbonoso y que aparece en los árboles en decaimiento. El principal síntoma es la presencia del estroma carbonoso que se forma a comienzos del otoño, con grietas longitudinales en la corteza, donde se aprecia una capa de color pardo rojizo.

#### **1.5. MECANISMOS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS**

De forma natural, las especies vegetales están en continuo contacto con patógenos y plagas, pues su naturaleza sésil hace inevitable la exposición a virus, bacterias, hongos, nematodos, oomicetos e insectos (Fu y Dong 2013; Ali *et al.* 2018). A pesar de que las plantas no tienen sistema inmune, cuentan con medios para detectar, señalar, responder y mantener una respuesta de defensa a largo plazo frente al ataque de los patógenos. Para ello, las plantas utilizan dos tipos de respuestas, una respuesta pasiva y una respuesta activa. En esta última se incluye la

respuesta hipersensible (RH), la resistencia sistémica inducida (ISR) y la resistencia sistémica adquirida (SAR).

### **1.5.1. Respuesta pasiva**

La respuesta de defensa pasiva, también denominada basal, preformada o constitutiva, es la primera barrera que encuentra un patógeno cuando ataca a una planta, y tiene lugar en los tejidos que rodean al lugar de la infección o del ataque. Está constituida por las barreras estructurales o físicas y las barreras bioquímicas preformadas (Fu y Dong 2013; Dotor y Cabezas 2014). Las barreras estructurales están formadas principalmente por la pared celular y la cutícula, que además de proteger a la planta le confieren rigidez. Otras barreras estructurales adicionales para frenar el avance de los patógenos son modificaciones estructurales de los tricomas y de los estomas o la fortificación de la pared celular mediante el aumento de los niveles de lignina y calosa (Eyles *et al.* 2010; Balasubramanian *et al.* 2012). Las barreras bioquímicas se refieren a metabolitos o productos químicos que pueden resultar tóxicos para los patógenos y que las células vegetales acumulan, como son los compuestos fenólicos, terpenoides, alcaloides, etc (Bednarek y Osbourn 2009; Kovalchuk *et al.* 2013). En árboles se han descrito algunos mecanismos de este tipo, como en el caso de los pinos, que utilizan la oleoresina y compuestos fenólicos como compuestos químicos de defensa (Franceschi *et al.* 2005).

### **1.5.2. Respuesta activa**

Además de la defensa pasiva la mayoría de las células vegetales tienen la capacidad de detectar la presencia de un patógeno y activar la denominada defensa activa o inducible (Gururani *et al.* 2012; Dotor y Cabezas 2014). Esta, se produce cuando los patógenos superan las barreras preformadas, generalmente, gracias a su actividad hidrolítica. Una vez se rompen las barreras estructurales, las células detectan la presencia del patógeno a través de receptores situados en la membrana plasmática. Los receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PRRs) detectan al patógeno mediante el reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) ubicados en la superficie del patógeno (flagelinas,

lipopolisacáridos, quitina, o glucanos) (Bigeard *et al.* 2015). Este reconocimiento desencadena la inmunidad activada por PAMP (PTI) que normalmente detiene al patógeno (Zipfel 2009). Sin embargo, existen patógenos que son capaces de producir una serie de sustancias denominadas elicitores o efectores, que inhiben la PTI o evitan el reconocimiento de los receptores. En respuesta a esto, las plantas han desarrollado una segunda línea de defensa denominada inmunidad inducida por efectores (ETI) (Bigeard *et al.* 2015). La respuesta ETI es conocida como la respuesta mediada por genes de resistencia (genes R) y con frecuencia finaliza con la activación de la respuesta hipersensible (Stael *et al.* 2015).

#### 1.5.2.1. Respuesta hipersensible

La respuesta hipersensible, también se denomina respuesta local, porque tiene lugar en la zona donde se ha producido la herida o la infección. Actúa cuando la respuesta de defensa basal no es capaz de contener el avance del patógeno. Los mecanismos de RH pueden activarse de forma inmediata o días después del comienzo de la infección.

Durante el ataque de un patógeno, su actividad hidrolítica genera un flujo de iones a través de la membrana plasmática y de la pared celular de las células vegetales (Dotor y Cabezas 2014). Esto va asociado a un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de ácido nítrico, lo que desencadena la respuesta hipersensible, provocando la muerte celular programada, seguida de la posterior necrosis de los tejidos en las zonas cercanas al lugar de la infección. Esto impide el avance del patógeno al bloquear su acceso a nutrientes y agua (Mur *et al.* 2008; Ali *et al.* 2018).

Durante la RH también tiene lugar el fortalecimiento de la pared celular debido a la lignificación y formación de papilas, el refuerzo de la pared celular de tejidos circundantes mediante el entrecruzamiento de proteínas o la producción de compuestos antimicrobiales como las fitoalexinas (Gurr y Rushton 2005; Patiño Hoyos 2008; Samaniego-Gómez *et al.* 2017). De forma paralela a la respuesta hipersensible, se produce una acumulación de ácido salicílico (SA), etileno (ET) y

jasmonato (JA) (Dotor y Cabezas 2014; Samaniego-Gómez *et al.* 2017; Ali *et al.* 2018).

La respuesta hipersensible puede detener el crecimiento de los patógenos biotróficos (patógenos cuyo crecimiento se basa en nutrientes obtenidos a partir de células vivas), pero no detiene a patógenos necotróficos (su crecimiento se basa en nutrientes liberados por células muertas) porque son capaces de degradar las especies ROS (Thatcher *et al.* 2005).

#### 1.5.2.2. Resistencia sistémica inducida

La ISR se activa por la acción ciertas rizobacterias del suelo, que son capaces de colonizar las raíces (van Loon *et al.* 1998; Camarena-Gutiérrez y Torre-Almaráz 2007; Patiño Hoyos 2008; Samaniego-Gómez *et al.* 2017). Al ser un sistema de defensa multifuncional y altamente integrado en la planta, puede actuar de forma duradera y extensiva frente a un amplio abanico de plagas y parásitos (Hein *et al.* 2009; Pieterse *et al.* 2009; Eyles *et al.* 2010). Por ello, la ISR es un mecanismo muy importante para plantas que viven muchos años, y comparten ecosistema con ciertas plagas redundantes para ellas, como es el caso de los árboles. La activación de la ISR no está influenciada por el incremento de SA, sino que depende de las rutas reguladas por el etileno y ácido jasmónico (Camarena-Gutiérrez y Torre-Almaráz 2007; Samaniego-Gómez *et al.* 2017). El jasmonato es una fitohormona derivada del ácido linoléico y ácido linolénico que se sintetiza principalmente en las hojas. La señalización por JA es esencial para la expresión de genes de defensa en plantas, y también está ligado a procesos de respuesta a estrés de la planta, inhibición del crecimiento y la promoción de la senescencia (Dotor y Cabezas 2014; Samaniego-Gómez *et al.* 2017).

#### 1.5.2.3. Resistencia sistémica adquirida

La SAR es un mecanismo de inmunidad inducida en plantas por la presencia de elicitores de patógenos, virulentos o avirulentos (Conrath 2006). Es efectiva contra un amplio abanico de patógenos (biotróficos, necotróficos y hemibiotróficos) a largo plazo, duradera en el tiempo y que se produce en lugares alejados de la infección primaria

(Camarena-Gutiérrez y Torre-Almaráz 2007; Patiño Hoyos 2008; Fu y Dong 2013; Vasyukova y Ozeretskovskaya 2017).

La SAR está asociada con la acumulación de ácido salicílico y con una elevada expresión de proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR) sintetizadas por los genes de resistencia (van Loon 1998; Fu y Dong 2013).

El SA es un compuesto fenólico producido por un extenso número de organismos procariotas y eucariotas, incluyendo las plantas (Thaler *et al.* 2012; Samaniego-Gómez *et al.* 2017). Se acumula en los lugares de infección y después se transporta por el floema hasta lugares no infectados de la planta, donde induce el desarrollo de SAR (Vasyukova y Ozeretskovskaya 2017). Tras el inicio de la infección, la mayor parte de SA puede ser transformado en O- $\beta$ -glucosido de SA (SAG) a través de una SA glucosiltransferasa inducible por patógeno (Song 2006). El SAG es inactivo y se almacena en las vacuolas, pero puede hidrolizarse rápidamente cuando tiene lugar la infección para dar lugar al SA activo (Fu y Dong 2013) que se libera e induce la expresión de los genes de resistencia y los de las proteínas PR en tejidos alejados del foco de infección (Thatcher *et al.* 2005).

De todo lo expuesto se deduce que en el sistema de defensa de las plantas es muy importante la interacción agonista/antagonista entre SA y los reguladores JA y ET. La concentración de estos reguladores depende del tipo de patógeno que ataque a la planta (Klessig *et al.* 1994; Pieterse *et al.* 2009; Veluthakkal *et al.* 2010; Ali *et al.* 2018). La planta activaría la ruta mediada por SA cuando son infectadas por patógenos biotróficos, mientras que la ruta mediada por JA/ET se activaría ante la presencia de patógenos necrotrofos o en respuesta al estrés ambiental y la presencia de rizobacterias del suelo (Thaler *et al.* 2012; Fu y Dong 2013; Dotor y Cabezas 2014; Samaniego-Gómez *et al.* 2017). Además del papel del SA, el JA y ET, otros componentes claves en la defensa de las plantas son las proteínas PR y los genes de resistencia.

La mayor parte del conocimiento sobre la respuesta de defensa de plantas se ha obtenido a partir de trabajos en plantas anuales como *Arabidopsis*, pepino, tomate, tabaco, arroz o maíz. Sin embargo, el conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan las

respuestas de defensa en árboles, tanto en especies angiospermas como gimnospermas, es menos conocido (Oßwald *et al.* 2014).

### **1.6. PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA PATOGÉNESIS**

Además del papel del SA, el JA y ET, otros componentes claves en la defensa de las plantas son las ya mencionadas proteínas PR (van Loon 1998). Estudios recientes avalan la importancia de estas proteínas en los mecanismos de defensa en las especies leñosas (Veluthakkal y Dasgupta 2010; Ali *et al.* 2018). Se ha visto que los genes PR suelen mostrar una mayor expresión en los árboles resistentes a las infecciones, al contrario de lo que ocurre en los árboles susceptibles a ser infectados, que muestran una regulación a la baja de estos genes (Oßwald *et al.* 2014).

Las proteínas PR fueron identificadas por primera vez en extractos de hoja de tabaco, que reaccionaban de forma hipersensible frente al virus del mosaico del tabaco (van Loon y van Kammer 1970; Bol *et al.* 1990). Inicialmente, se aislaron 5 familias (PR-1, PR-2, PR-3, PR-4 y PR5) (Bol *et al.* 1990), aunque posteriormente se sugirió una nueva nomenclatura que agrupaba a las familias según sus características bioquímicas, moleculares, serológicas y por actividad biológica y enzimática (Van Loon *et al.* 1998) y se identificaron hasta 11 familias, principalmente en tabaco y tomate (van Baarlen *et al.* 2007). En la actualidad se han identificado 17 familias PR (van Loon *et al.* 2006), que presentan una enorme diversidad, siendo muy diferentes las de una familia con respecto a las de otra (Sels *et al.* 2008; Veluthakkal y Dasgupta 2010). En leñosas estas proteínas fueron identificadas por primera vez en *Populus trichocarpa*, *Eucalyptus grandis*, *Pinus taeda*, *Pinus lambertiana* e híbridos de álamo (Veluthakkal y Dasgupta 2010). Por lo general, las proteínas PR tienen bajo peso molecular (6-43 kDa) y son termoestables y resistentes a las proteasas (Ali *et al.* 2018). Hay dos subgrupos, las proteínas PR ácidas que se secretan al espacio extracelular y las proteínas PR básicas se transportan a la vacuola (Ali *et al.* 2018).

Aunque las propiedades fitoquímicas de alguna de estas familias no han sido completamente estudiadas, las proteínas PR juegan un importante papel en la defensa de las plantas frente a patógenos y

enfermedades, actuando como punto de intersección para varias redes de respuesta, y reaccionando frente a elicitores como el ácido salicílico, el ácido jasmónico, y el etileno (Hernández *et al.* 2005). Por ejemplo, las proteínas correspondientes con las familias PR6, PR12, PR13 y PR14, denominadas péptidos antimicrobianos (AMPs), tienen un importante papel en la actividad de defensa contra un amplio abanico de patógenos microbianos y plagas (Sels *et al.* 2008).

#### **1.6.1. Proteínas PR-1**

En la familia PR-1 se incluyen proteínas de bajo peso molecular (15-17 kDa) que son homólogas de la superfamilia de proteínas ricas en cisteína. Son las proteínas PR que se expresan en mayor concentración como respuesta a estímulos externos, como heridas, luz UV, ataques parasitarios de nematodos, insectos o herbívoros. También se acumulan debido a la presencia de SA y durante la respuesta hipersensible. Aunque las propiedades fitoquímicas de las proteínas PR-1 no son muy conocidas, éstas se utilizan generalmente como un marcador de la SAR (Buchel y Linthorst 1999; Wanderley-Nogueira *et al.* 2012). En leñosas se ha detectado la expresión de proteínas PR-1 en *Populus trichocarpa* y *Fagus sylvatica* cuando son atacados por hongos (Veluthakkal y Dasgupta 2010).

#### **1.6.2. Proteínas PR-2**

En esta familia se incluyen las  $\beta$ -1,3-glucanasas, que catalizan la hidrólisis del  $\beta$ -1,3-glucano (Leubner-Metzger y Meins 1999; Balasubramanian *et al.* 2012). Su actividad patogénica consiste en la liberación de oligosacáridos desde las paredes celulares de los patógenos, los cuales pueden actuar como elicitores de reacciones de defensa por parte de la planta. Por ejemplo, se ha comprobado su efecto patogénico in vivo contra *Fusarium solani*, ya que promueven la lisis de las puntas hifales e inhiben su crecimiento (Leubner-Metzger y Meins 1999; Balasubramanian *et al.* 2012). En leñosas, se han identificado glucanasas con actividad antifúngica en *Castanea sativa* (Schafleitner y Wilhelm 1997), en *Jatropha curcas* (Wei *et al.* 2005) o en haya (Schlink 2009). Por otro lado, las proteínas PR-2 juegan un papel importante en la crioprotección, expresándose a temperaturas de

congelación, y limitando el crecimiento de los cristales de hielo. Además, están presentes en el desarrollo de los gametofitos masculinos y la polinización, en el desarrollo de semillas y su germinación y en la maduración de los frutos (Balasubramanian *et al.* 2012).

### 1.6.3. Quitinasas

Las quitinasas fueron las primeras proteínas PR identificadas (Neuhaus 1999) y están clasificadas en cuatro familias: PR-3, PR-4, PR-8 y PR-11 (Campos *et al.* 2007). Estas proteínas están presentes en bacterias, hongos, animales y plantas. Su función es la degradación de la quitina, que es el principal componente de la pared celular de los hongos y de los exoesqueletos de invertebrados y nematodos. Así, las quitinasas hidrolizan los enlaces  $\beta$ -1, 4 que unen los residuos de N-acetilglucosamina de la quitina (Neuhaus 1999; Veluthakkal y Dasgupta 2010; Souza *et al.* 2017). La inhibición de la formación de quitina evita el crecimiento del hongo. El papel de las quitinasas en la defensa frente a enfermedades ha sido observado *in vitro*, *in planta*, y también expresado en plantas transgénicas (Neuhaus 1999; Veluthakkal y Dasgupta 2010). En plantas, las quitinasas actúan como marcadores en las respuestas de defensa del hospedador, ya que su acumulación tiene lugar tras el ataque de un patógeno o la aparición de heridas. En leñosas, se han identificado quitinasas con actividad fungicida en muchas especies tanto en gimnospermas como en angiospermas (Veluthakkal y Dasgupta 2010). Podemos mencionar, por ejemplo, la quitinasa (*CsCh3*) identificada por Allona *et al.* (1996) en castaño europeo, cuya actividad antifúngica fue comprobada *in vitro* contra *Trichoderma viride* y *Cryphonectria parasitica*.

### 1.6.4. Proteínas PR-5

Esta familia incluye las permatinas, osmotinas, zeamatinas y proteínas tipo taumatina (TLPs). Las TLPs se dividen en dos grupos según su peso molecular. Pueden tener 22-26 kDa (201-119 aminoácidos) o 16 kDa (148-151 aminoácidos) (Velazhahan *et al.* 1999). Aunque las TLPs muestran una homología aminoacídica con la proteína taumatina derivada de las frutas de *Thaumatococcus daniellii* (Liu *et al.* 2010) que confiere sabor dulce, ninguna de las TLPs testadas

tiene ese sabor (Velazhahan *et al.* 1999). Las TLPs son proteínas altamente solubles, que se acumulan en tejidos o compartimentos subcelulares bajo condiciones de estrés (Liu *et al.* 2010; Wanderley-Nogueira *et al.* 2012) tanto biótico (ET, ABA, SA, JA, etc...) como abiótico (patógeno, lesiones, plagas, frío, sequía, etc...) y que pueden ser secretadas al medio o al espacio extracelular (Velazhahan *et al.* 1999).

La respuesta de las TLPs frente a la patogénesis se ha documentado en especies herbáceas y leñosas, y se conocen al menos dos TLPs que podrían haber estado presentes en un ancestro común a angiospermas y gimnospermas (Velazhahan *et al.* 1999). La gran diversidad de TLPs podría explicarse por la duplicación genética, incluyendo inserciones, deleciones, mutaciones y yuxtaposiciones de dominios, produciendo TLPs con funciones adaptativas.

Las TLPs actúan causando poros transmembranales en las membranas plasmáticas, lo que provoca la ruptura osmótica de las células (Roberts y Selitrennikoff 1990; Velazhahan *et al.* 1999; Wani 2010; Wally y Punja 2010). La función de permeabilizar las membranas de los patógenos de forma selectiva convierte a esta clase de proteínas en componentes muy activos de la defensa de las plantas, sobre todo para combatir patógenos no controlados por otras proteínas PR (van Loon 1998; Velazhahan *et al.* 1999). La expresión de estas TLPs ante el ataque de un patógeno se ha observado en diversas especies herbáceas como el arroz, el sorgo, la cebada y la vid, y en especies leñosas como en *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus monticola*, y el álamo híbrido, entre otras (Veluthakkal y Dasgupta 2010). En castaño europeo, la TLP denominada *CsTL1*, de 23-kDa, extraída de cotiledones maduros, ha demostrado tener actividad antifúngica contra *Trichoderma viride* y *Fusarium oxysporum*. También ha mostrado fuertes efectos sinérgicos con las endoquitinasas y las endoglucanasas, actuando contra el crecimiento microbiano (García-Casado *et al.* 2000).

#### **1.6.5. Proteínas PR-6**

Las proteínas PR-6 son unos péptidos antimicrobianos, muy estables en plantas. Normalmente son moléculas ricas en cisteína que poseen un amplio rango de actividad antimicrobiana (Ali *et al.* 2018).

Tienen una masa de 10-9 kDa, y actúan como inhibidores de las peptidasas secretadas por insectos y patógenos (Veluthakkal y Dasgupta 2010; Souza *et al.* 2017). La mayoría de los patógenos suelen atacar a las plantas mediante la producción de alguna proteasa (pe. la serina proteasa, cisteína proteasa, aspartil proteasa o metaloproteasa) que produce la proteólisis de las membranas y paredes celulares de la planta hospedadora, causando desorganización celular. En respuesta a ello, las plantas han desarrollado genes que codifican inhibidores específicos de alguna de estas proteasas (Veluthakkal y Dasgupta 2010). En leñosas, se han identificado proteínas tipo PR6 en eucalipto, chopo, *Picea sitchensis* y haya (Veluthakkal y Dasgupta 2010). Además de la función de defensa, las proteínas PR-6 también están implicadas en otras funciones de la planta, como la muerte celular programada, la germinación de semillas y la respuesta al estrés ambiental (Souza *et al.* 2017).

#### **1.6.6. Proteínas PR-7**

Esta familia se corresponde con las endoproteinasas. Estas proteínas hidrolizan enlaces peptídicos de las proteínas y pueden contribuir a la disolución de las paredes celulares de los patógenos (van Loon *et al.* 2006). También están implicadas en la modificación postraduccional de las proteínas implicadas en la defensa de las plantas (Campos *et al.* 2007; Souza *et al.* 2017).

#### **1.6.7. Proteínas PR-9**

Las proteínas de esta familia se corresponden con las peroxidasas (Gurr y Rushton 2005), que son glicoproteínas que catalizan la oxidación de sustratos orgánicos e inorgánicos. Contienen un grupo hemo y usan peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como el receptor de electrones (Campos *et al.* 2007; Veluthakkal y Dasgupta 2010; Souza *et al.* 2017). Su actividad afecta a la pared celular, promoviendo la síntesis de lignina y el fortalecimiento de las paredes celulares durante la RH (Campos *et al.* 2007; Souza *et al.* 2017). Además, ayudan a crear un ambiente adverso para los patógenos debido a su interacción con los ROS (Veluthakkal y Dasgupta 2010; Souza *et al.* 2017). Por ejemplo, se ha detectado un aumento de las peroxidasas de membrana en

presencia de elicitores fúngicos liberados por hongos ectomicorrizas y hongos patogénicos como *Heterobasidion annosum*, *Rhizoctonia sp*, *Ceratbasidium bicorne* y *Pythium dimorphum* (Veluthakkal y Dasgupta 2010; Wanderley-Nogueira *et al.* 2012).

#### **1.6.8. Proteínas PR-10**

En esta familia se incluyen las proteínas intracelulares con actividad ribonucleasa (Campos *et al.* 2007; Souza *et al.* 2017). Esta familia está presente como familia multigén en las semillas de las plantas y están reguladas tanto ambientalmente como por el desarrollo. Se dividen en dos grupos: proteínas intracelulares relacionadas con la patogénesis (IPR) y (S)-norcoclaurinas sintasas (NCS). Su presencia se ha observado en muchas especies dicotiledóneas, y algunas especies leñosas, como en diferentes especies de pino, haya y abedul (Veluthakkal y Dasgupta 2010). Las proteínas de la familia PR-10 incrementan su expresión ante el ataque de un patógeno, uniéndose específicamente a la pared del patógeno (Sels *et al.* 2008). Se ha comprobado su actividad contra hongos, bacterias, virus y nematodos (Campos *et al.* 2007; Souza *et al.* 2017).

#### **1.6.9. Proteínas PR-12**

Esta familia de AMPs se corresponde con las defensinas (Ali *et al.* 2018), que son unas proteínas pequeñas (5 kDa), básicas y ricas en cisteína. Presentan entre 45 y 54 aminoácidos, y están cargadas positivamente (Campos *et al.* 2007; Veluthakkal y Dasgupta 2010; Souza *et al.* 2017). Su mecanismo de acción se basa en el cambio de la permeabilidad de la membrana de los patógenos mediante la formación de poros (Campos *et al.* 2007; Souza *et al.* 2017). En leñosas se han identificado defensinas con actividad antifúngica en pino (Kovalyova y Gout 2008) y chopo (Duplessis *et al.* 2009).

#### **1.6.10. Proteínas PR-13**

Estas AMPs se corresponden con la familia de las tioninas (Ali *et al.* 2018). Son unos polipéptidos de 5kDa ricos en cisteína, que se expresan de forma constitutiva en diferentes tejidos de las plantas. Las tioninas muestran una amplia variación en su secuencia, lo cual les

confiere un amplio rango de actividad antimicrobiana. Su actividad antimicrobiana se basa en la permeabilización de las membranas de los patógenos, causando estrés osmótico (Rayapuram *et al.* 2008; Chandrashekhara *et al.* 2010).

#### **1.6.11. Proteínas PR-14**

Esta familia se corresponde de con proteínas de transferencia de lípidos (LTPs) (Ali *et al.* 2018). Son abundantes, de pequeño tamaño, ricas en cisteína y capaces de intercambiar lípidos a través de membranas *in vitro* (Sels *et al.* 2008). Las dos familias caracterizadas de las proteínas PR-14 están presentes en las semillas y en la pared vegetal. Se sabe que su activación se produce en respuesta al estrés biótico y abiótico, pero su mecanismo de acción aún debe ser estudiado (Campos *et al.* 2007; Wanderley-Nogueira *et al.* 2012; Souza *et al.* 2017). En leñosas se han identificado LTPs en diferentes especies de pinos y en chopo (Veluthakkal y Dasgupta 2010).

#### **1.6.12. Proteínas PR-15 y PR-16**

Estas dos familias se corresponden, respectivamente, con las oxalato oxidasas y las proteínas tipo oxalato oxidasas (Godfrey *et al.* 2007). Estas proteínas PR son glicoproteínas asociadas con la matriz extracelular, y están implicadas en gran variedad de procesos celulares, incluyendo la germinación, el desarrollo de la planta, y la respuesta a estrés biótico y abiótico (Gorjanović 2009). Las proteínas de esta familia se inducen inmediatamente después del inicio de la infección (Çalışkan 2000; Campos *et al.* 2007). Tienen actividad oxidasa, transformando el ácido oxálico en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (Zhou *et al.* 1998) lo cual afecta de dos maneras a los patógenos. En primer lugar, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un ROS con actividad antimicrobiana y, por otro lado, debido a que el ácido oxálico puede actuar como un substrato para los hongos, su degradación afecta negativamente al crecimiento del patógeno (Souza *et al.* 2017).

#### **1.6.13. Proteínas PR-17**

La primera proteína identificada de esta familia fue la NtPR27, que fue aislada a partir de las células de tabaco BT2. Se ha visto que

NtPR27 se acumula en las raíces de las plantas como respuesta ante daños o infecciones sufridos en las hojas, y también en condiciones de sequía (Okushima *et al.* 2000). La actividad de esta familia puede ser proteolítica, antifúngica y antivírica (Ali *et al.* 2018) pero su mecanismo de acción aún se desconoce por completo.

## **1.7. ESTRATEGIAS PARA COMBATIR ENFERMEDADES FÚNGICAS EN PLANTAS**

Las pérdidas económicas causadas por el ataque de hongos y oomicetos a plantas son muy elevadas (Ceasar y Ignacimuthu 2012; Dean *et al.* 2012; Jung *et al.* 2015). Por ese motivo se han diseñado diferentes enfoques y estrategias para combatirlos, que básicamente se pueden agrupar en dos: métodos para prevenir o reducir los efectos de las enfermedades y estrategias para la obtención de plantas tolerantes/resistentes a las mismas.

### **1.7.1. Control de las enfermedades mediante prácticas agronómicas**

Tradicionalmente el esfuerzo para el control de las enfermedades se ha basado en combatir al patógeno en aras a reducir sus poblaciones, ya sea mediante prácticas culturales, el uso de fungicidas, control biológico o mediante la inducción de resistencia con sustancias químicas (Hao *et al.* 2019). En general, estos métodos son preventivos, pero pueden ser de vital importancia si se realizan antes de la aparición de la enfermedad (Montoya *et al.* 2004).

#### **1.7.1.1. Prácticas culturales**

Son prácticas tradicionales que crean un ambiente menos favorable para el crecimiento del hongo, como por ejemplo la selección y cultivo de árboles y semillas sanas o el movimiento repetitivo y continuado de los cultivos de una zona a otra para evitar los suelos infectados.

Una práctica tradicional utilizada para evitar la infección de *Phytophthora* es el desecamiento del suelo para evitar el encharcamiento, que es una condición favorable para la reproducción del oomiceto. En cultivos de frutales, como el *Citrus*, es muy común

que la infección por *Phytophthora* se produzca mediante irrigación y salpicaduras a las hojas y frutos más cercanos al suelo, y estos, al caer al suelo, distribuyan el patógeno, continuando el ciclo de infección (Gray *et al.* 2018). Por ello, el desecado del suelo y la poda selectiva son medidas muy importantes como medio de prevención ante la *Phytophthora*.

Otros usos tradicionales para evitar la *Phytophthora* son la prevención de cargas ganaderas excesivas o el movimiento de suelos por los vehículos, la aplicación de fertilizantes cálcicos, la implantación de cultivos biofumigantes (*Brassica* spp.) o el descarte de cultivos susceptibles, que actúan como reservorios de la enfermedad (Romero *et al.* 2019; Sánchez *et al.* 2019).

Sin embargo, estos métodos son eficaces para cultivos anuales, plantas criadas en viveros o aquellas que son utilizadas para la explotación maderera, pero menos adecuadas para especies muy longevas, que crecen en bosques o dehesas, como los alcornoques y las encinas (Hao *et al.* 2019).

#### 1.7.1.2. Tratamiento con fungicidas

En general, este método es poco eficiente para tratar la infección una vez que se ha iniciado, pero puede usarse de forma preventiva en suelos sanos. Los fungicidas más usados para el control de la *Phytophthora* se dividen en dos tipos: los fenilamidas y los fosfonatos (Andrés-Ares 2015; Hao *et al.* 2019).

##### 1.7.1.2.1. Fenilamidas

Estos fungicidas se aplican en el suelo, y tienen como objetivo reducir la podredumbre de las raíces (Gray *et al.* 2018). Los más utilizados son mefenoxam y metalaxil.

El mefenoxam es un R-enantiómero de metalaxil. Se aplica empapando el suelo, para controlar el crecimiento de muchas especies de *Phytophthora* y de *Phytium* en un gran número de cultivos, incluyendo plantas ornamentales (Hu *et al.* 2010; Hao *et al.* 2019). El mefenoxam inhibe el crecimiento del micelio y la esporulación, mediante la inhibición selectiva de la síntesis de ARN ribosomal,

alterando la actividad de las ARN polimerasas (Hu *et al.* 2010). Sin embargo, debido a su especificidad, el comité de acción de resistencia a fungicidas de EEUU ha considerado que existe un alto riesgo de que los patógenos desarrollen resistencia frente al compuesto. En Europa, dos años después de su implantación, se empezaron a observar cepas resistentes de *P. infestans* y de algunas cepas de *Phytium* (Hao *et al.* 2019).

El metalaxil es un producto que presenta movilidad xilemática, y ayuda a reducir la pudrición de raíz en encinas y alcornoques (Berrocal *et al.* 1998). Sin embargo, no puede ser utilizado en bosques ni en plantaciones debido a que ha de aplicarse en el suelo, con el consiguiente riesgo de contaminación de acuíferos y suelo (González *et al.* 2017).

#### 1.7.1.2.2. Fosfonatos

Los fosfonatos, antes llamados fosfitos, son derivados del ácido fosforoso y se emplean como alternativa a las fenilamidas para el control de protozoos, oomicetos, hongos, bacterias y nematodos (Yáñez-Juárez *et al.* 2018). El fosfonato de potasio fue el primer fosfonato que demostró ser eficaz contra la infección de *Phytophthora* (Gray *et al.* 2018) y el más utilizado mundialmente (Romero *et al.* 2019). Se puede aplicar de formas muy diversas, ya sea mediante fumigación de hojas y semillas, mediante baño de raíz y cuello, por inyección en el tronco o por riego (Gentile *et al.* 2009; Yáñez-Juárez *et al.* 2018). El fosfonato se transporta por el xilema y el floema, y combate la infección mediante la estimulación de los mecanismos de defensa de la planta (Yáñez-Juárez *et al.* 2018; Romero *et al.* 2019; Sánchez *et al.* 2019). En menor manera también puede afectar de forma directa al patógeno, inhibiendo la formación de micelio (González *et al.* 2017; Romero *et al.* 2019). El porcentaje de curación del fosfonato de potasio está inversamente relacionado con el nivel de infección del árbol, de tal forma que el tratamiento no es efectivo en árboles muy afectados. A pesar de su uso mundial en el control de las infecciones por oomicetos, el uso del fosfonato de potasio está prohibido en España (González *et al.* 2017; Romero *et al.* 2019).

El fosetil aluminio (Fos-Al) se ha descrito como alternativa frente al tradicional fosfito de potasio y ha demostrado ser más eficaz en la protección de encinas y alcornoques que cualquier otro fungicida químico (González *et al.* 2017; Romero *et al.* 2019; Sánchez *et al.* 2019). Se aplica en el suelo, y no sólo detiene el avance de la enfermedad, sino que además ha demostrado tener cierto poder curativo, aumentando la frondosidad de los árboles tratados, incluso de aquellos que ya estaban infectados por *Phytophthora* (Romero *et al.* 2019; Sánchez *et al.* 2019).

#### 1.7.1.2.3. Nuevos fungicidas

Para luchar contra las cepas resistentes a los fungicidas tradicionales se han desarrollado nuevos productos que afectan de diversas maneras al crecimiento de los patógenos. Entre estos nuevos productos se encuentran el tiazol carboxamida etaboxam, el fluorpicolide, la mandipropamida (Gray *et al.* 2018; Hao *et al.* 2019) y la oxatiapiprolina (Cohen *et al.* 2018).

El control químico tiene como desventaja que puede producir resultados inesperados desde el punto de vista ecológico, causando la contaminación del suelo y acuíferos, o la eliminación de otras especies (Wally y Punja 2010; Yáñez-Juárez *et al.* 2018). También pueden tener efectos adversos sobre la salud humana, además de un alto coste económico. Por otro lado, el empleo de fungicidas puede resultar ineficaz ante la aparición de lluvias imprevistas o el desarrollo de resistencia por parte del hongo.

#### 1.7.1.3. Control biológico

En este método, un antagonista del patógeno se introduce en un cultivo para controlar la infección. El antagonista coloniza el suelo o partes de la planta y ejerce de competidor contra el patógeno, consumiendo alimento, ocupando espacio, o produciendo sustancias que inhiben el crecimiento del mismo, promueven el desarrollo de la planta o activan sus sistemas de defensa (García-Benavides y Monte-Vázquez 2005). Un ejemplo de organismos antagonistas de *P. cinnamomi* son los hongos del género *Trichoderma* (García-Benavides y Monte-Vázquez 2005).

#### 1.7.1.4. Inducción de la resistencia inducida mediante sustancias químicas

La estimulación de la resistencia inducida es una herramienta que puede ser integrada en los sistemas de manejo de las enfermedades fúngicas de las plantas. Al estimular la SAR artificialmente es posible producir una señal de acondicionamiento “priming” de la planta, incrementando su resistencia ante un nuevo contacto con el patógeno (Conrath *et al.* 2015).

Como ya se ha comentado, el SAR puede iniciarse tras la exposición de las plantas a microorganismos virulentos o no virulentos. Pero también puede intentar inducirse antes de la infección, para prevenir el futuro avance de la enfermedad. Un ejemplo de esto es el olmo americano, al que se le hicieron heridas en el tronco sobre las que se depositó inóculos de las cepas *Ophiostoma ulmi* y *O. novo-ulmi*. Estas inoculaciones controladas ayudaron a activar el SAR y redujeron el índice de infección (Flower *et al.* 2016).

El SAR también puede activarse con sustancias como SA, el ácido 2,6-dicloro-isonicotínico (INA) o el butilhidroxitolueno (BTH). El BTH se ha probado en cultivos de monocotiledóneas, solanáceas y leguminosas, y también se han obtenido resultados positivos en árboles frutales. Sin embargo, todas estas sustancias sólo confieren resistencia si se aplican justo antes de la infección del patógeno (Patiño Hoyos 2008).

El ácido DL- $\beta$ -aminobutírico (BABA) es un aminoácido no proteico que induce resistencia contra un gran número de parásitos en plantas, incluyendo oomicetos, hongos, bacterias y nematodos. Su efecto protector es más duradero que el de otros agentes químicos, e induce defensas físicas y químicas, como la formación de manchas necróticas o la expresión de las proteínas PR (PR-1, PR-2 y PR-5), además de promover la respuesta hipersensible (Cohen 2002; Patiño Hoyos 2008).

El bisulfito sódico de menadiona, que se utilizaba como regulador de crecimiento en plantas, además presenta la capacidad de inducir resistencia frente al “mal de Panamá” causada por *Fusarium oxysporum* en banano, mediante la expresión sistémica de la enzima ascorbato

peroxidasa. De esta forma se aumenta la concentración de ROS, independientemente de la expresión de las proteínas PR. También afecta a la dinámica de acumulación de fitoalexinas en el banano, retardando la expresión de los síntomas de la enfermedad, y reduciendo el avance del daño en el rizoma (Borges *et al.* 2004).

Otros productos similares que han sido utilizados contra las enfermedades fúngicas son los oligosacáridos N-acetilquitino-oligosacáridos y  $\beta$ , 1-3 glucanos, el compuesto sintético Triciclazole o el ión  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **1.7.2. Métodos de mejora genética para obtener plantas resistentes frente a enfermedades**

La mejora vegetal es el conjunto de todas las prácticas que conducen a la mejora de las propiedades genéticas de una planta (FiBL y SEAE 2015). Para obtener plantas con mayor resistencia frente a patógenos se pueden manipular los genes de resistencia, ya sea mediante mejora tradicional o clásica, o mediante métodos biotecnológicos como la transgénesis, las técnicas de cultivo *in vitro*, la hibridación somática, la polinización *in vitro*, la obtención de haploides y doble-haploides, la edición genética o la selección asistida por marcadores moleculares (Gurr y Rushton 2005; Poupin y Arce-Johnson 2005; Gosal *et al.* 2010; Kovalchuk *et al.* 2013; Hartung y Schiemann 2014).

#### **1.7.2.1. Métodos de mejora clásica**

La mejora genética clásica se basa en la existencia de variabilidad genética para los caracteres que se desea mejorar, y la manipulación de la misma mediante reproducción sexual. Los métodos que se usan para explotar este hecho son el cruzamiento y la selección complementados con la mutagénesis artificial y las técnicas citogénicas. El cruzamiento se realiza entre individuos de la misma especie que presentan características de interés (resistencia a enfermedades o a la sequía, mayor producción de madera o frutos, etc...). En las siguientes generaciones se seleccionan aquellas plantas que presentan las mejores características y se cruzan entre ellas. Esta selección permite incorporar en la población genes que codifican rasgos

de interés, y eliminar aquellos que dan lugar a características indeseadas (Breseghello y Coelho 2013; FAO 2019).

Este tipo de mejora se utiliza muy poco en especies forestales, principalmente porque requiere de mucho tiempo y además, los bosques presentan una alta variedad genética, lo que hace que en conjunto resistan mejor el ataque de los patógenos. No obstante, los programas de cruzamiento selectivo pueden considerarse en especies forestales si: hay un alto riesgo de ataque por parte de patógenos exóticos, no hay especies/variedades resistentes o alternativas y si hay pocas opciones silviculturales para paliar las pérdidas (FAO 2019). En los últimos 20 años, tan sólo unas pocas especies forestales han sido mejoradas mediante cruzamiento selectivo para la tolerancia a plagas y enfermedades (FAO 2019). Algunos ejemplos son el eucalipto (Rezende *et al.* 2013), el pino loblolly (*Pinus taeda*) (Resende *et al.* 2012), el pino de Monterey (*Pinus radiata*) (Dungey *et al.* 2014), el abeto noruego (*Picea abies*) (Chen *et al.* 2018), el chopo (Stanton *et al.* 2009) y el pino silvestre (*Pinus sylvestris*) (Rieksts-Riekstiņš *et al.* 2019).

En ocasiones, la variación genética dentro de una especie no es suficiente para lograr la mejora mediante cruzamiento selectivo entre individuos de la misma especie. En estos casos, se pueden realizar cruces entre especies diferentes (hibridación), y retrocruzamientos posteriores intentar obtener descendientes que expresen las características buscadas (Castellanos-Hernández *et al.* 2011; Häggman *et al.* 2016). Un ejemplo de esto lo tenemos en el castaño europeo (*Castanea sativa*) y el castaño americano (*C. dendata*). Las poblaciones de ambas especies han sido devastadas por el ataque de dos enfermedades fúngicas: la tinta, causada principalmente por *P. cinnamomi* y que afecta principalmente al castaño europeo, y el chancro, que es causada por *Cryphonectria parasitica* y afecta a las dos especies de castaño. Desde su aparición se han desarrollado diversos programas de mejora en España (Urquijo 1994; Vieitez *et al.* 1960; Vieitez *et al.* 1996; Santos *et al.* 2016) y en Estados Unidos (Diskin *et al.* 2006; Clark *et al.* 2019; Powell *et al.* 2019) para la búsqueda de híbridos resistentes a ambas enfermedades. Estos programas se han

basado en cruzar estas especies de castaño con dos especies de castaño asiáticas (*C. crenata* y *C. mollissima*) que presentan resistencia natural contra dichos patógenos. De esta forma, se pretendía introducir en las especies susceptibles los genes que confieren resistencia frente a los patógenos. Los árboles híbridos son retrocruzados, propagados e inoculados con el patógeno para evaluar su resistencia. Posteriormente, también son seleccionados por su valor agronómico y forestal. En castaño americano, el programa de mejora iniciado en los años 80 por la Fundación de Castaño Americano utilizó el castaño chino como parental no recurrente. Este fue retrocruzado con diferentes parentales de castaño americano hasta lograr obtener castaños americanos (en el 99% de sus genes) resistentes a la enfermedad (Diskin *et al.* 2006).

El principal problema de estos programas es que se necesitan de muchas generaciones para poder obtener el resultado esperado (Gururani *et al.* 2012). En algunos estudios, incluso después de 50 años de cruzamientos selectivos, los árboles seleccionados, aunque son resistentes frente al patógeno, no llegan a exhibir el nivel de resistencia deseado (Clark *et al.* 2019; Powell *et al.* 2019). Por ello, en los últimos años se apuesta por la identificación de marcadores moleculares que permitan seleccionar a los híbridos más adecuados de forma mucho más rápida (Santos *et al.* 2016). Por otro lado, debido a que se seleccionan unos pocos individuos y se busca la homogeneidad genética de sus descendientes, se corre el riesgo de generar un monocultivo con poca diversidad genética, lo cual podría ser problemático a largo plazo si una cepa patogénica consiguiese superar el sistema de defensa vegetal (Wally y Punja 2010).

Otro método de mejora tradicional en especies forestales es la selección de “individuos elite”, que son aquellos árboles interesantes por sus características (en este caso, la resistencia a enfermedades) para recoger sus semillas. Este es el caso de la encina y alcornoque, dos especies con las que no se han realizado programas convencionales de mejora basados en el cruzamiento (Martínez *et al.* 2019). Recientemente, el MAPA ha iniciado en colaboración con la Empresa de Transformación Agraria (TRAGSA) un programa de mejora basado en la selección de progenies de encina y alcornoque tolerantes a *P. cinnamomi*. Las semillas de ambas especies serán recolectadas de los

progenitores clasificados como tolerantes, y una vez crecidas y sometidas a ensayos de tolerancia al oomiceto se podrán utilizar en programas de reforestación de las zonas afectadas por la enfermedad.

#### 1.7.2.2. Mejora genética mediante transgénesis

Uno de los principales logros de la biotecnología vegetal ha sido la mejora genética mediante transformación genética. Los llamados organismos modificados genéticamente (GMOs) son aquellos cuyo ADN ha sido modificado de formas que no ocurren en la naturaleza por cruzamientos o recombinación natural (Häggman *et al.* 2016). La transformación genética posibilita la manipulación directa de la información contenida en el ADN permitiendo superar las barreras impuestas por la incompatibilidad sexual. La manipulación más frecuente es la introducción en las plantas de genes procedentes de la misma especie, de otras especies vegetales o incluso de otros organismos muy alejados evolutivamente, como hongos, bacterias, virus o animales (Newel 2000; Wani 2010). Los genes introducidos se seleccionan por su potencial utilidad para la especie receptora, ya sea porque aumentan la producción (madera, frutos, etc), porque adelantan la edad de floración o la supriman, provean de resistencia frente factores abióticos (pe. frío, sequía, salinidad, heladas etc.) o bióticos (virus, bacterias, hongos u otros patógenos), mejoren la calidad nutritiva u ornamental de las plantas o las convierta en biofactorías (Rani y Usha 2013). Desde que en 1983 se obtuvo la primera planta transgénica, se ha logrado la transformación de muchas especies vegetales, pero la investigación se ha centrado principalmente en la producción de plantas transgénicas a partir de las especies con interés agronómico, como el maíz, la soja, el algodón, la alfalfa, el tabaco, la patata, o la colza. Por el contrario, los éxitos en especies forestales han sido más limitados, debido fundamentalmente a los problemas para su regeneración *in vitro* y que muchas son recalcitrantes a la transformación (Piqueras *et al.* 2010). A pesar de eso se han obtenido árboles transgénicos tolerantes a herbicidas (Lebedev *et al.* 2016), con capacidad fitorremediadora (van Dillewijn *et al.* 2008), resistentes a insectos (Wang *et al.* 2018), con mayor capacidad de asimilar de nitrógeno (Gallardo *et al.* 1999), con menor contenido en lignina (Verma *et al.* 2014) o estériles (Fritsche *et al.* 2018). Del mismo modo, también se han obtenido árboles

transgénicos resistentes o con mayor tolerancia a enfermedades causadas por bacterias, hongos, o virus. En este apartado, uno de los primeros éxitos fue la obtención de plantas transgénicas de papaya con resistencia al virus de la mancha angular que estuvo a punto de destruir los cultivos de papaya en la isla de Hawái (Gonsalves *et al.* 1998).

### **1.8. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA PARA GENERAR TOLERANCIA A ENFERMEDADES FÚNGICAS**

Puesto que los genes específicos de resistencia a enfermedades fúngicas no han sido identificados en la mayoría de las especies leñosas, es necesario utilizar otras estrategias para inducir, aunque sea de forma genérica, algún tipo de tolerancia. Las estrategias más utilizadas hasta el momento para la obtención de plantas tolerantes a enfermedades causadas por hongos y oomicetes mediante la transformación genética se pueden agrupar básicamente en dos tipos, el silenciamiento génico y producción de productos génicos (Wally y Punja 2010; Wani 2010; Ceasar y Ignacimuthu 2012).

#### **1.8.1. Silenciamiento génico**

El silenciamiento génico se refiere al conjunto de procedimientos capaces de suprimir la expresión de un gen/es en las plantas (Souza *et al.* 2007). Una de las primeras aplicaciones de este procedimiento fue inducir la resistencia frente a virus, sin embargo, actualmente el silenciamiento génico tiene muchas otras aplicaciones en la mejora genética (García-Ruiz *et al.* 2016). En árboles, por ejemplo, el silenciamiento génico se utiliza en investigación básica para el estudio de la función de los genes (Kumar y Fladung 2003), en la reducción del contenido de lignina (Jouanin *et al.* 2000; Valerio *et al.* 2003), en la mejora de la calidad del fruto (Dandekar *et al.* 2004) o en la inducción de autofertilidad (Broothaerts *et al.* 2004). El silenciamiento génico también se ha utilizado para obtener plantas transgénicas resistentes a hongos como por ejemplo a *Fusarium graminearum* (Nakayashiki *et al.* 2005), *Aspergillus nidulans* (Hammond *et al.* 2008) o a oomicetos como *P. infestans* (Eschen-Lippold *et al.* 2012).

### 1.8.2. Producción de productos génicos

En esta estrategia la transformación genética se realiza con genes que básicamente generan productos tóxicos para los hongos o que impiden su infección. De acuerdo con Punja (2001) estos productos génicos se pueden agrupar en cinco categorías:

✓ Productos génicos que son directamente tóxicos para los patógenos o que reducen su crecimiento. En este grupo se incluyen las proteínas PR, como las enzimas hidrolíticas (quitinasas y glucanasas), las proteínas antifúngicas (taumatinas y osmotinas), los péptidos antimicrobianos (tioninas, defensinas y lectinas), o las proteínas inactivadoras de ribosomas. Por ejemplo, en patatas transgénicas se ha demostrado la actividad antifúngica de las proteínas inactivadoras de ribosomas contra *Botrytis cinerea* y *Rhizoctonia solani* (Gonzales-Salazar *et al.* 2017).

✓ Productos que destruyen o neutralizan la pared celular del patógeno o los compuestos que estos usan durante la infección. En esta categoría se introducen genes que codifican enzimas (como son las proteínas inactivadoras de las poligalacturonosas) y metabolitos fitotóxicos, que degradan micotoxinas y ácido oxálico. En castaño americano, la transformación con una oxalato oxidasa aislada en trigo, y que actúa degradando el ácido oxálico producido por *C. parasitica*, provocó un incremento de la resistencia frente al cáncer (Newhouse *et al.* 2014).

✓ Productos génicos que mejoran las defensas estructurales de la planta. En este caso, se introducen genes que provocan el incremento de los niveles de lignina y peroxidases asociadas a la pared celular. Por ejemplo, Zhang *et al.* (2019) incrementaron la resistencia del algodón frente a *Verticillium* mediante la sobreexpresión de un gen que promovía la acumulación de lignina.

✓ Productos génicos que participan en las vías de señalización que regulan las defensas como la producción de elicitors específicos, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ácido salicílico o etileno. La sobre-expresión de SA en tabaco induce la síntesis de proteínas PR lo que proporciona un aumento de su resistencia a patógenos fúngicos (Verberne *et al.* 2000).

✓ Genes de resistencia (genes R) que participan en la respuesta hipersensible y en la interacción con los factores de avirulencia del

patógeno. Por ejemplo, la transformación de cultivares de patata con el gen R RPI-BLB2 aislado en patata salvaje incrementa su tolerancia a *P. infestans* (van der Vossen *et al.* 2005).

De todos esos procedimientos, la transformación con genes que codifican proteínas PR es el método más utilizado para obtener plantas transgénicas con tolerancia a hongos u oomicetos (Wally y Punja 2010; Ali *et al.* 2018). Como ya se ha mencionado, estas proteínas tienen un papel clave en la defensa frente a patógenos y se ha observado que su sobre-expresión mediante transformación genética puede conferir resistencia a diferentes tipos de hongos en muchas especies diferentes, aunque en muchos casos se ha logrado en plantas herbáceas. Dentro de las proteínas PR, las más empleadas en la transformación genética con objetivo antifúngico son las proteínas PR-1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-5 y PR-12, es decir, con genes que codifican quitinasas, glucanasas, proteínas tipo taumatinas, tioninas o defensinas (Ceasar y Ignacimuthu 2012; Sudisha *et al.* 2012; Ali *et al.* 2018).

Las glucanasas (PR-2) y la quitinasas (PR-3, PR-4, PR-8) actúan degradando los polisacáridos de la pared celular de los hongos. La sobre-expresión de quitinasas solas o combinadas con otras proteínas antifúngicas ha incrementado la tolerancia de diferentes plantas herbáceas a hongos como *Botrytis cinerea* (Takatsu *et al.* 1999; Vellice *et al.* 2006; Núñez de Cáceres *et al.* 2015), *Fusarium graminearum* (Shin *et al.* 2008) o *Rhizoctonia solani* (Bezirganoglu *et al.* 2013). En leñosas, también se han logrado plantas tolerantes a enfermedades fúngicas mediante la transformación con quitinasas en abedul (Pasonen *et al.* 2004) o chopo (Jia *et al.* 2010).

Otro tipo de proteína PR cuya sobre-expresión ha ofrecido buenos resultados para inducir la tolerancia a hongos y oomicetos es la transformación con genes que codifican proteínas tipo taumatina (proteínas PR-5) (Wally y Punja 2010; Sudisha *et al.* 2012). Por ejemplo, la transformación con TLP retrasa el desarrollo de las enfermedades causadas por *Fusarium* (Mackintosh *et al.* 2007; Mahdavi *et al.* 2012), *Botrytis cinerea* (Chen y Punja 2002), *P. citrophthora* (Fagoaga *et al.* 2001) o *Alternaria alternata* (Safavi *et al.* 2011). Estas proteínas, como ya se ha mencionado, actúan induciendo

la apertura de poros transmembranales en las membranas plasmáticas de los patógenos, provocando la ruptura osmótica y finalmente, la muerte (Wani 2010; Wally y Punja 2010). En el Anexo 1 se resumen las principales publicaciones sobre la transformación con genes que codifican TLP y los principales resultados obtenidos en ellas. La mayoría de las especies en las que se ha logrado la transformación con este tipo de proteínas PR son herbáceas (Anexo 1). En leñosas se ha obtenido la transformación genética en especies como la vid (Dhekney *et al.* 2011; He *et al.* 2017), banana (Mahdavi *et al.* 2012), mandioca (Odeny Ojola *et al.* 2018), naranjo (Fagoaga *et al.* 2001), castaño europeo (Corredoira *et al.* 2012) y roble común (Mallón *et al.* 2014).

Por último, también se ha inducido tolerancia a enfermedades causadas por los hongos *Alternaria*, *Fusarium* y *Plasmodiophora* mediante la sobre-expresión de defensinas y tioninas (Gao *et al.* 2000; Ali *et al.* 2018). Las defensinas son los péptidos antifúngicos más importantes de las plantas. Como se ha descrito con anterioridad, estos péptidos provocan la permeabilización de la membrana fúngica e inhiben el crecimiento de las hifas. La sobre-expresión de defensinas ha incrementado la tolerancia a *Fusarium* en banana (Ghag *et al.* 2012) y a *Phytophthora parasitica* en tabaco (Wang *et al.* 2011). Las tioninas a su vez actúan abriendo poros en las membranas celulares de los patógenos y provocando la salida de calcio y potasio. En patata, la sobre-expresión de tionina incrementó la tolerancia contra *Ceratocystis fimbriata* (Muramoto *et al.* 2012) y contra *Botrytis cinerea* (Hoshikawa *et al.* 2012).

### 1.9. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA EN ÁRBOLES

Para lograr la transformación genética de una planta, árboles incluidos, se deben cumplir una serie de premisas:

- ✓ Se necesita disponer de un sistema eficaz de introducción del gen o genes de interés.
- ✓ Generalmente, es necesario diseñar un vector de transformación que incluya al gen de interés acompañado de un promotor, de un terminador y otras secuencias regulatorias necesarias para su expresión.

Además, normalmente se introduce un gen de selección y un gen de detección que facilita discriminar los tejidos/células transformados.

✓ Es necesario un sistema de regeneración eficiente que permita la obtención de una planta a partir de células transformadas.

✓ Tras la obtención de las plantas transgénicas, estas se deben analizar con el fin de comprobar la presencia del gen insertado, su estabilidad y su nivel de expresión.

De todos estos factores, los más importantes son el método de transformación, el método de selección y el sistema de regeneración.

### 1.9.1. Métodos de transformación

Una vez que los genes de interés han sido identificados y aislados, pueden introducirse en la especie receptora mediante diferentes técnicas. Los métodos que se utilizan en la transformación de plantas se agrupan en dos tipos, bien mediante vectores biológicos como *Agrobacterium* y virus, o bien directamente, mediante bombardeo con partículas (biobalística), microinyección, mediada por polietilenglicol (PEG), liposomas o con nanopartículas (Ganeshan y Chibbar 2010). De estos métodos, los más utilizados en árboles son la transformación mediante *Agrobacterium* o mediante biobalística (Poupin y Arce-Johnson 2005).

#### 1.9.1.1. Transformación mediada por *Agrobacterium*

*Agrobacterium tumefaciens* (actualmente *Rhizobium radiobacter*) y otras especies relacionadas, como *A. rhizogenes*, son patógenos de plantas capaces de infectar de modo natural a un gran número de especies dicotiledóneas y unas pocas monocotiledóneas (Levee *et al.* 1999). *A. tumefaciens* presenta un componente genético extracromosómico llamado plásmido Ti (inductor tumoral), mientras que *A. rhizogenes* presenta el plásmido Ri (inductor de raíz). Durante la infección, *A. tumefaciens* inserta una región del plásmido denominada ADN-T en las células de la planta. Este ADN-T contiene genes que inducen, por un lado, la síntesis de opinas, que la bacteria utiliza como fuente de nitrógeno y carbono y, por otro, genes que inducen la síntesis de reguladores del crecimiento que causan un crecimiento aberrante de las células vegetales, lo que da lugar a un tumor conocido como agalla

de corona o tumor del cuello. En la infección con *A. rhizogenes* se induce la producción de raíces mediante un mecanismo semejante al de *A. tumefaciens*. Mediante la ingeniería genética, estos genes tumorales o los genes inductores de raíz han sido sustituidos por el gen/genes de interés que se quiere transferir a la planta (Gelvin 2003).

Para que la transferencia de ADN-T sea efectiva, se necesitan tres factores. El primer factor son las secuencias de los extremos, que están constituidos por repeticiones directas imperfectas de 24-25 pb que flanquean y definen el ADN-T (van Haaren *et al.* 1988) Estas secuencias de los extremos son las únicas secuencias que se necesitan en *cis* para la transferencia de ADN-T (Zambryski *et al.* 1983). El segundo factor son los genes de virulencia o genes *vir*, (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF*, *virG*, y *virH*), situados en el plásmido Ti pero fuera de la región T-ADN, y que son los responsables de coordinar el proceso de transferencia del ADN-T al genoma de la planta (Ganeshan y Chibbar 2010). El tercer factor importante son los genes que permiten la unión de la bacteria a la célula de la planta (Sheng y Citovsky 1996).

La transformación mediada por *Agrobacterium* fue el primer método utilizado en árboles, concretamente para conferir resistencia a un herbicida en un híbrido de *Populus* (Fillatti *et al.* 1987), y actualmente, es el método más empleado en la transformación de especies leñosas, especialmente en angiospermas leñosas (Sharma *et al.* 2005; Nehra *et al.* 2005). Por ejemplo, se ha utilizado en la transformación genética del nogal (Escobar *et al.* 2000), el chopo (Couselo *et al.* 2010), o el castaño americano (Zhang *et al.* 2011), mientras que en gimnospermas se pueden mencionar ejemplos como el de *Pinus strobus* (Levee *et al.* 1999), *Picea glauca* (Klimaszewska *et al.* 2001), y *Pinus pinaster* (Trontin *et al.* 2002, 2007).

Durante el procedimiento general empleado en la transformación genética con *A. tumefaciens*, el explanto diana se co-cultiva junto con la bacteria a 25 °C durante un período de tiempo suficiente (1-5 días) para garantizar la transferencia del ADN-T a las células del explanto. Después del co-cultivo, la bacteria se elimina con un antibiótico bactericida y el explanto se cultiva en un medio de regeneración (vía embriogénesis o vía organogénesis) en presencia de

un agente de selección (por ejemplo, un antibiótico) para permitir el desarrollo de sólo los tejidos transformados.

Existen diferentes factores que afectan a la eficiencia de la transformación mediante *Agrobacterium*. Por un lado, son importantes la especie vegetal, la edad de la planta, el tipo de explanto y el estado de desarrollo del mismo. También es primordial la cepa de *Agrobacterium* utilizada. Estas difieren fundamentalmente en su capacidad de infección y virulencia, que depende de la organización y estructura de su región T-DNA y de los genes *vir*. En leñosas, se han empleado diferentes cepas para la transformación como la LBA4404 (Ooms *et al.* 1981), la EHA105 (Hood *et al.* 1993), la AGL1 (Lazo *et al.* 1991) o la C58C1 (Koncz y Schell 1986). La elección de una u otra depende de la especie y del genotipo, aunque una de las más utilizadas es la cepa EHA105. Para la transformación se utilizan cultivos bacterianos de con una densidad óptica comprendida entre 0,3 y 0,9, donde las bacterias están en la fase exponencial del crecimiento y están más activas. La temperatura y el pH durante el co-cultivo también afectan a la capacidad de activación de los genes *vir*, se prefieren pH bajos y temperaturas comprendidas entre 19-25°C (Gelvin 2003).

Por último, cabe destacar la importancia que tiene para mejorar la efectividad de la transformación la inclusión de un período de pre-cultivo del explanto y la reducción de la necrosis del mismo en presencia de la bacteria (Chakrabarty *et al.* 2002; Ko *et al.* 2003; Gelvin 2003; Davey *et al.* 2010). En relación con esto último, en ocasiones, para promover la transformación es necesario añadir compuestos con actividad antioxidante y que actúan reduciendo la necrosis, como por ejemplo el tiosulfato de sodio, la L-cisteína o el glutatión (Dan *et al.* 2008). Por otro lado, cuando la transformación es difícil, es frecuente añadir productos que inducen la expresión de los genes *vir*, como la glucosa, acetosiringona y azacitidina (Subramoni *et al.* 2014). Por último, la adición de inhibidores del etileno como el tiosulfato de plata (STS) o el nitrato de plata también puede mejorar la eficiencia de la transformación (Nonaka *et al.* 2008).

#### 1.9.1.2. Transformación mediada por mediante biobalística

Este método consiste en bombardear las células diana con microproyectiles de oro o tungsteno (0,4-1,2  $\mu\text{m}$ ) recubiertos de ADN (Meilan *et al.* 2010). Estas partículas son aceleradas a alta velocidad mediante una pistola de partículas. Este ADN exógeno puede integrarse en las células receptoras si las condiciones son adecuadas (Khattak *et al.* 2012), pero la eficiencia de transformación es bastante baja en comparación con otros métodos. Además, hay muchas posibilidades de insertar muchas copias del transgén en el genoma, y requiere del uso de una instrumentación especial (Castellanos-Hernández *et al.* 2011). Aunque puede utilizarse en material en diversas etapas de desarrollo, es preferible la utilización de embriones o callos (Newel 2000). La biobalística se ha utilizado fundamentalmente en aquellas especies que no se pueden transformar con *Agrobacterium*, como es el caso de muchas monocotiledóneas y en coníferas (Poupin y Arce-Johnson 2005; Meilan *et al.* 2010).

#### 1.9.2. Métodos de selección

Una vez que se ha realizado la transformación y se ha integrado el ADN exógeno en la planta, es muy importante poder discriminar y favorecer el crecimiento de las células que expresan el gen insertado, en detrimento de las que no lo hacen. En ausencia de selección es poco probable que se produzca diferencia de crecimiento entre las células transgénicas y no transgénicas, y a veces, incluso con la presencia de agentes de selección, puede ocurrir que el tejido no transformado se vea protegido de forma indirecta por el transformado, dando lugar a escapes o quimeras (Park *et al.* 1998). Los marcadores de selección más utilizados son genes que confieren resistencia a antibióticos como la kanamicina, cloranfenicol e higromicina o a herbicidas como el glifosato y la fosfotricina (Sharma *et al.* 2005). El gen de la neomicina fosfotransferasa (*NPT* o *NEO*), que confiere resistencia a la kanamicina, es uno de los métodos de selección más utilizados en la transformación genética (Newel 2000). Durante estos años se han empleado tres tipos de genes de la neomicina fosfotransferasa (I, II, y III) como marcadores de selección en la transformación genética. Entre estos el más empleado es el gen *NPTII* de *Escherichia coli* (Liang *et al.* 2010).

Además de un gen de selección, generalmente se utilizan genes reporteros (también denominados delatores o chivatos) para confirmar el éxito de dicha transformación. De forma general, los genes marcadores codifican enzimas que tienen actividad en sustratos que generalmente no están presentes en la planta. Uno de los genes marcadores más utilizados es el gen que codifica la  $\beta$ -glucuronidasa (*GUS*), proveniente de *E. coli*, fue utilizado por primera vez por Jefferson *et al.* (1987). El gen *GUS* está codificado por el locus uidA, y se caracteriza porque la enzima se mantiene estable a altas temperaturas, resiste la fijación histoquímica y su expresión se detecta fácilmente en el tejido, mediante el color azul que adquieren las células transformadas debido a la hidrólisis de sustratos colorigénicos, como el p-nitrofenil-glucurónido (PNPG, X-gluc), el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D- glucurónido (Xgluc) o fluorogénicos como el 4 metilumbeliferilglucurónido (MUG), entre otros (Naleway 1992; Chi *et al.* 1998). Aunque la presencia de este gen es estable en plantas, y no afecta a su crecimiento, presenta como inconveniente que el material analizado es destruido por el proceso de evaluación.

Recientemente, el gen *GUS* ha sido sustituido por el gen de la proteína fluorescente verde (*GFP*). Este gen marcador fue aislado por primera vez en la medusa *Aequorea victoria*, aunque posteriormente también ha sido aislado de *Aequorea coerulescens* (Gursakaya *et al.* 2006) o producido de forma sintética (Liang *et al.* 2010). En la actualidad existen un amplio abanico de proteínas fluorescentes, que pueden ser customizadas según su aplicación (Stewart 2006).

El *GFP* se usa como método de selección en plantas transgénicas debido a su alta sensibilidad, y a que no daña al organismo en el que se expresa (Liang *et al.* 2010) y además permite visualizar en vivo las células transformadas con la ayuda de una luz UV, sin necesidad de añadir sustratos (Sheen *et al.* 1995; Newel 2000). El *GFP* también es más eficiente que otros métodos de señalización a la hora de evaluar eventos de transformación, expresión de genes y localización de proteínas (Stewart 2006). Por ejemplo, el *GFP* sintético y optimizado para evaluar la expresión genética en las plantas es mejor marcador que el *GUS* a la hora de monitorizar la actividad temporal de genes que tienen una ventana de expresión muy estrecha, debido a que el tiempo

de expresión de *GFP* es menor que el del *GUS*, y esto lo hace más fiable Liang *et al.* 2010). Por otro lado, la expresión del *GFP* también puede resultar útil para saber si una planta transgénica es homocigótica o heterocigótica, ya que en el segundo caso, el nivel de fluorescencia de la planta se ve reducido a la mitad, en comparación con las plantas homocigóticas (Halfhill *et al.* 2003).

### 1.9.3. Métodos de regeneración

El cultivo *in vitro* es fundamental para obtener una planta transgénica. Con excepción de *Arabidopsis*, los métodos utilizados para la regeneración de plantas a partir de células transformadas implican la aplicación de técnicas de cultivo *in vitro*. Las dos vías de regeneración empleadas en los protocolos de transformación genética son la inducción de yemas adventicias o caulogénesis y la embriogénesis somática (Piqueras y Debergh 1999). En la caulogénesis se produce la inducción de la formación *de novo* de meristemos adventicios en el explanto inicial (Ruiz *et al.* 2019). Este proceso se diferencia de la multiplicación mediante la proliferación de yemas axilares en que en este caso el meristemo ya está presente en el explanto inicial, mientras que en la caulogénesis el meristemo es inducido *de novo*. Las yemas inducidas están conectadas mediante haces vasculares de nueva formación con el sistema vascular del tejido materno (Yeung *et al.* 1996; El Kbiach *et al.* 2017). Por ello, se obtiene una estructura unipolar que posteriormente debe ser enraizada para la obtención de una planta completa. La caulogénesis puede ser directa (no se produce una etapa intermedia de callo) o indirecta (implica una fase de callo previa a la formación de los meristemoides). Los explantos utilizados generalmente en la transformación con este tipo de regeneración son hojas, entrenudos, hipocotilos, cotiledones y raíces (Piqueras *et al.* 2010). Esta vía de regeneración es la más utilizada para la transformación genética de leñosas como el chopo, eucalipto o de frutales como el peral o los cítricos. Un factor muy importante en la transformación por vía organogénica es la edad de la planta donante del explanto diana, ya que generalmente la transformación es más difícil en explantos derivados de árboles adultos. Por ejemplo, en cítricos,

Cervera *et al.* (1998) tuvieron el triple de transformantes a partir de material juvenil, que a partir de material adulto.

La embriogénesis somática es un proceso mediante el cual las células somáticas producen embriones somáticos (ES), que son estructuras semejantes a embriones zigóticos (EZ), a través de los estados embriológicos característicos, sin que haya fusión de gametos (Merkle *et al.* 1995; Corredoira *et al.* 2019). Estas estructuras adquieren la bipolaridad de forma temprana, es decir, tienen un polo apical y otro radicular unidos por un sistema vascular cerrado, sin conexión con el tejido parental. El proceso de embriogénesis somática también puede ser directo o indirecto, dependiendo de si el explanto pasa o no por una fase de callo antes de la formación del ES. La embriogénesis somática, además de permitir la propagación en masa, es el método más adecuado para la transformación genética y la crioconservación, especialmente en especies leñosas (Raemakers *et al.* 1999; Sutton 2002; Guan *et al.* 2016). Además de su mayor capacidad de transformación genética, el riesgo de escapes es menor utilizando embriones somáticos que usando la regeneración mediante yemas adventicias (Nonaka y Ezura 2015).

A diferencia de la caulogénesis, la capacidad de transformación de los ES no depende, generalmente, de la edad de la planta de la que derivan los cultivos embriogénicos. El principal inconveniente de la aplicación de la embriogénesis somática en la transformación genética de especies leñosas es la dificultad para inducir embriones somáticos, especialmente a partir de material maduro (Ballester *et al.* 2016). Esto es debido a que la capacidad embriogénica se reduce considerablemente a medida que aumenta la edad del árbol, debido al envejecimiento ontogénico y al proceso de maduración que experimentan los árboles (Bonga *et al.* 2010). La maduración se define como la transición progresiva del estado juvenil a adulto, y está caracterizada por la reducción del crecimiento, el inicio de la floración y la reducción de la capacidad organogénica y embriogénica (Díaz-Sala 2016).

Sin embargo, en los últimos años el número de protocolos para la inducción de ES en especies leñosas a partir de explantos derivados de árboles adultos se ha incrementado considerablemente (Corredoira *et al.* 2019). Para tratar de solventar los problemas mencionados

anteriormente, se debe seleccionar en cada especie el tipo de explanto con mayor competencia embriogénica. Entre este tipo de explantos están los tejidos florales, pues se cree que en los tejidos cercanos a los órganos sexuales es más factible inducir la embriogénesis somática ya que mantienen algunos caracteres juveniles, facilitando la regresión al estado embriogénico (Merkle *et al.* 1995). Otra alternativa que ha ofrecido buenos resultados para la inducción de ES en árboles adultos es la utilización de ápices y hojas aislados de cultivos de brotes establecidos a partir de árboles adultos (Corredoira *et al.* 2019). Esta vía permite disponer de explantos en un estado fisiológico más uniforme y controlado, favoreciendo la inducción de ES. Un buen ejemplo de esta última alternativa es el género *Quercus* donde se ha logrado la inducción de ES a partir de árboles adultos en muchas especies del género como *Q. suber*, *Q. robur*, *Q. alba*, *Q. bicolor* y *Q. ilex* (Corredoira *et al.* 2014; Martínez *et al.* 2017a).

#### **1.10. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN ENCINA Y ALCORNOQUE**

En alcornoque y en encina se han definido protocolos para la inducción de la embriogénesis somática, tanto a partir de material juvenil como de explantos derivados de árboles adultos, incluso centenarios. Muchos de estos protocolos constituyen la base del programa de mejora genética iniciado por el MAPA para la clonación de árboles de “escape”, es decir, aquellos que sobreviven al ataque de *P. cinnamomi*.

##### **1.10.1. Inducción de embriogénesis somática en alcornoque**

###### **1.10.1.1. Embriogénesis somática a partir de EZ**

En muchas especies leñosas y en casi todas las gimnospermas, los EZ son los únicos explantos a partir de los cuales se puede obtener la inducción de la embriogénesis somática (Corredoira *et al.* 2019). En este tipo de explanto, el estado del desarrollo del embrión zigótico es un factor clave, ya que existe un periodo del mismo durante el cual es más fácil inducir embriogénesis somática (Merkle *et al.* 1995). Este periodo se corresponde con un corto espacio de tiempo, generalmente desde el inicio de la histodiferenciación hasta que comienza la maduración del EZ (Trigiano *et al.* 1999; Corredoira *et al.*

2019). A ese período se le denomina “ventana de inducción” y puede definirse mediante la longitud, el peso fresco o el estado de desarrollo de los EZ o mediante parámetros climáticos como días o semanas post-antesis (Corredoira *et al.* 2002). Aunque el proceso de embriogénesis somática es mucho más fácil de conseguir a partir de EZ que otro explantos, tiene como inconveniente que se desconoce el genotipo que se está clonando.

En alcornoque, para inducción de ES a partir de EZ, las bellotas inmaduras se recogen durante los meses de agosto y septiembre y se utiliza el peso de la bellota como criterio de selección pues éste guarda relación directa con el estado de desarrollo del EZ (López-Vela *et al.* 2008). Las bellotas se esterilizan con hipoclorito y etanol, y se abren para aislar el embrión. Una vez aislados, los EZ se cultivan en medio MS (Muraskige y Skoog 1962) suplementado con 0,5 mg/L de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Los primeros ES comienzan a aparecer tras un mes de cultivo a 25°C y la frecuencia de inducción oscila entre el 1,4 y el 30,2% (Bueno *et al.* 1992; Manzanera *et al.* 1993; Toribio *et al.* 2005; Testillano *et al.* 2018; Pintos *et al.* 2010).

#### 1.10.1.2. Embriogénesis somática a partir de hojas

A diferencia de los ES originados a partir de EZ, la inducción a partir de hojas o ápices nos permite clonar el genotipo deseado. Sin embargo, como ya se ha mencionado, la inducción de la embriogénesis es más difícil a partir de este tipo de explantos, sobre todo a medida que aumenta la edad del árbol. Dentro de las leñosas, el alcornoque se considera una especie modelo, de tal forma que la embriogénesis somática se ha obtenido tanto en hojas derivadas de plántulas (Fernández-Guijarro *et al.* 1995) como en hojas obtenidas a partir de árboles adultos (Pinto *et al.* 2002; Hernández *et al.* 2001, 2003a, 2007, 2011; Toribio *et al.* 2004, 2005), siendo un sistema altamente eficaz para la clonación de individuos adultos incluso centenarios. En esta especie, Hernández *et al.* (2001) fueron los primeros en inducir la embriogénesis somática, para ello usaron hojas (1-1,5 cm) obtenidas a partir de brotes epicórmicos, que fueron cultivadas en cuatro medios de forma secuencial como sigue. En primer lugar, las hojas fueron inoculadas en medio G (Gamborg 1968) con

sacarosa al 10%, donde permanecieron 10 días. Después, las hojas fueron cultivadas durante 4 semanas en el medio de inducción (M1) compuesto por medio basal Schenk and Hildebrandt (1972, SH) suplementado con 1,9 mg/L de ácido naftalenacético (ANA) y 2,2 mg/L de benciladenina (BA). Tras el cultivo en medio de inducción, los explantos fueron transferidos al medio de expresión (M2) que tiene la misma composición que el medio de inducción, pero con concentraciones de los reguladores del crecimiento (PGRs) reducidas a 0,95 mg/L de ANA y 1,1 mg/L de BA. Tras 4 semanas de cultivo, finalmente las hojas fueron transferidas a un tercer medio (M3), de igual composición que el medio M1 pero sin PGRs y donde fueron cultivadas durante 5 meses. Con este procedimiento se obtuvo la inducción de ES en hojas de 12 de los 19 genotipos evaluados, con porcentajes de inducción del 1,3%-28,5%.

Posteriormente, Pinto *et al.* (2002) también lograron la inducción de embriones somáticos a partir de hojas apicales provenientes de un árbol adulto de 60 años utilizando como tratamiento de inducción 2,4-D y zeatina. Por último, Hernández *et al.* (2003a, b) mejoraron el protocolo previo y consiguieron la inducción de embriogénesis somática a partir de hojas de árboles centenarios, de tal forma que, en teoría, podría clonarse cualquier genotipo. Para ello se incrementó la concentración de ANA en el M1 de 1,9 mg/L a 9,5 mg/L. Las frecuencias de inducción en este caso fueron de 10%-26% (Corredoira *et al.* 2014). Además de la concentración de auxinas, otro factor crítico fue el tamaño de las hojas, ya que sólo se obtuvieron ES con hojas menores de 1,5 cm (Hernández *et al.* 2003a). Asimismo, es importante señalar que la inducción de la embriogénesis somática en *Q. suber* a partir de hojas también está influenciada por la época en la que se recolectan las ramas (Hernández *et al.* 2003a) o la posición que estas ocupan en el árbol (Hernández *et al.* 2008).

#### 1.10.1.3. Androgénesis y ginogénesis

El alcornoque fue una de las primeras especies leñosas en las que se obtuvo embriogénesis somática a partir de microsporas (Gómez-Garay *et al.* 2014). Para ello, las anteras se cultivaron a 33°C durante 5 días en medio semisólido suplementado con carbón activo

(Pintos *et al.* 2010). La embriogénesis se induce debido al estrés por calor, aunque también es potenciada por el déficit de nutrientes y sacarosa que sufren las microsporas. La embriogénesis sólo ocurre cuando las microsporas se encuentran en estado vacuolado, y por ello es muy importante seleccionar correctamente las anteras. Afortunadamente, hay correlación entre el tamaño y color de las anteras de alcornoque y el estadio de las microsporas, lo cual facilita la selección (Testillano *et al.* 2018).

En óvulos, Bueno y Manzanera (1992) fueron los primeros en inducir embriones somáticos. Estos autores cultivaron óvulos inmaduros en medio MS semisólido suplementado con 0,5 mg/L de 2,4-D. Sin embargo, el porcentaje de inducción fue muy bajo en comparación con el obtenido a partir de EZ.

### **1.10.2. Inducción de embriogénesis somática en encina**

A diferencia de alcornoque, la encina se considera una especie altamente recalcitrante a la regeneración *in vitro*. A pesar de ello, en los últimos años se ha logrado la inducción de embriogénesis somática a partir de diferentes explantos como embriones zigóticos (Mauri y Manzanera 2003, 2005), hojas y ápices (Féraud-Keller y Espagnac 1989; Féraud-Keller *et al.* 1989; Martínez *et al.* 2017b, 2019), amentos (Blasco *et al.* 2013) y tegumentos de óvulos (Barra-Jiménez *et al.* 2014).

#### **1.10.2.1. Embriogénesis somática a partir de EZ**

Al igual que ocurre en alcornoque, la embriogénesis somática a partir de embriones zigóticos de encina está limitada por la ventana de inducción (Trigiano *et al.* 1999). En encina, la embriogénesis somática se obtuvo a partir de bellotas recogidas en agosto (Mauri y Manzanera 2003, 2005). Los EZ fueron cultivados en tres medios de forma secuencial como sigue. En primer lugar, los EZ estuvieron durante un mes en el medio de inducción M1, compuesto por medio basal G suplementado con 1,9 mg/L de ANA y 2,2 mg/L de BA. Posteriormente, los embriones fueron transferidos al medio M2 compuesto por medio G suplementado con concentraciones reducidas de PGRs (1,1 mg/L de BA y 0,95 mg/L de ANA) donde permanecieron

durante 30 días. Finalmente, los EZ se transfirieron al medio M3, que consistió en medio G sin PGRs, donde fueron cultivados durante otro mes. La respuesta embriogénica a partir de este tipo de explanto en encina es baja (4,3%) (Mauri y Manzanera 2005), especialmente si se compara con las frecuencias de inducción relativamente altas obtenidas a partir de EZ de otras especies del género *Quercus* (Corredoira *et al.* 2014).

#### 1.10.2.2. Embriogénesis somática a partir de hojas y ápices

La inducción de ES en encina a partir de hojas fue descrita por primera vez por Féraud-Keller y Espagnac (1989) y Féraud-Keller *et al.* (1989). Estos autores utilizaron para la inducción hojas recogidas directamente de un árbol de unos 50 años, que fueron cultivadas en medio MS con 4 mg/L de BA y 0,5 mg/L de ANA. Aunque se logró la inducción de ES, dichos embriones no fueron capaces de regenerar plantas completas. Posteriormente, Martínez *et al.* (2017a, 2019) obtuvieron la inducción de ES a partir de hojas y ápices y la regeneración de plantas a partir de los ES inducidos. Para ello, ápices (2-2,5 mm de longitud) y las 2 primeras hojas fueron aislados a partir de brotes axilares cultivados *in vitro* y establecidos a partir árboles centenarios. La inducción se llevó a cabo en un proceso de tres pasos. Los explantos seleccionados fueron cultivados durante 8 semanas, en oscuridad y a 25°C en un medio de inducción (M1). Este medio está compuesto por medio basal MS suplementado con 4 mg/L de ANA o 4 mg/L de AIA combinados con 0,5 mg/L de BA. Tras ese tiempo, los explantos fueron transferidos a un segundo medio que consistió en medio de inducción, pero con las concentraciones de los PGRs reducidos a 0,1 mg/L (M2). Después de 4 semanas en medio M2 y luz, los explantos fueron transferidos a un tercer medio (M3) que consistió en medio M1 sin PGRs, y donde permanecieron 24 semanas más. La inducción se observó tanto en hojas como en ápices, pero los mejores resultados (11%) se obtuvieron a partir de ápices (Martínez *et al.* 2017a).

#### 1.10.2.3. Embriogénesis somática a partir de tejidos florales

En encina se han obtenido ES a partir de tejidos florales como son los tegumentos de óvulos (Barra-Jiménez *et al.* 2014) y los amentos (Blasco *et al.* 2013).

Para la inducción en óvulos, Barra-Jiménez *et al.* (2014) utilizaron un procedimiento en tres pasos similar al que se ha descrito en la inducción de ES a partir de embriones zigóticos (Mauri y Manzanera 2003) o de hojas y ápices (Martínez *et al.* 2017b). Los óvulos fueron aislados cuando se encontraban en un estadio avanzado del desarrollo (3-4 mm de ancho) y el resto de los óvulos habían abortado. Después del aislamiento y esterilización, los óvulos se cultivaron durante 30 días en oscuridad en medio basal SH (Schenk y Hildebrandt 1972) o G, suplementado con 1,9 mg/L de ANA y 2,2 mg/L BA. Tras ese tiempo se transfirieron al mismo medio, pero con la concentración de reguladores reducida a la mitad, donde permanecieron otros 30 días en luz. Por último, los óvulos se transfirieron al mismo medio, pero sin PGRs, y se dejaron durante 30 días más en condiciones de luz. Los ES también fueron inducidos en óvulos mantenidos todo el tiempo en un medio sin PGRs. La frecuencia de inducción fue baja, oscilado entre el 1,2% y el 3,2%.

La inducción de embriogénesis somática a partir de amentos de encina fue descrita por Blasco *et al.* (2013). Los amentos (1-2 cm) se recogieron a finales de primavera y se almacenaron durante tres días en oscuridad y a 4°C antes de ser esterilizados y cultivados de forma sucesiva en tres medios de cultivo. El medio de inducción (M1) consistió en un medio basal MS suplementado con 1,9-9,5 mg/L de ANA y 2,2 mg/L de BA. Tras 30 días de cultivo en oscuridad, los explantos fueron transferidos al medio M2 compuesto por medio basal SH suplementado con 1,1 mg/L de BA y 0,95 mg/L de ANA y posteriormente a medio MS o SH sin PGRs. El porcentaje de inducción varió dependiendo del genotipo, obteniéndose un máximo del 3,3%.

#### 1.10.2.4. Androgénesis

En encina, también se ha estudiado la inducción de ES en microsporas y anteras (Gómez *et al.* 2009; Blasco *et al.* 2013). Por lo general, la androgénesis en encina es más efectiva cuando se aplica un

pre-tratamiento con frío seguido de estrés por calor (Pintos *et al.* 2013), ya que los pre-tratamientos con frío suelen frenar la degradación del tejido, y aseguran una mayor supervivencia de las esporas y los granos de polen, al contrario de lo que ocurre con los tratamientos en los que sólo se aplica calor (Duncan y Herbele 1976). También se ha observado que en encina la aplicación de frío favorece la duplicación espontánea e indirecta del genoma, necesaria para la obtención de material doble haploide (Pintos *et al.* 2013). Algunos autores aplican frío durante 1-4 días antes de someter las anteras de encina al tratamiento de calor (33°C durante 3-4 días) (Gómez-Garay *et al.* 2014). El mayor porcentaje de inducción se produce cuando las microsporas se encuentran en el estadio de vacuoladas. Afortunadamente, hay una correlación entre el grado de maduración de los amentos, la fenología de las anteras y el estadio en el que se encuentran las microsporas, lo que facilita la selección (Pintos *et al.* 2013; Gómez-Garay *et al.* 2015).

### **1.10.3. Mantenimiento de la capacidad embriónica en alcornoque y encina**

Una vez inducidos los embriones somáticos, la capacidad embriónica se mantiene en ambas especies mediante embriogénesis secundaria (Toribio *et al.* 2005; Martínez *et al.* 2019). Una característica de los ES es que una vez inducidos, los embriones entran en un proceso cíclico de autoclonación, es decir, se produce la formación de nuevos ES a partir de los embriones somáticos primarios. Este proceso se denomina embriogénesis adventicia, secundaria o repetitiva (Corredoira *et al.* 2019). En el caso del alcornoque, para su proliferación se cultivan grupos de 2 o 3 ES en medio SH sin PGRs (Toribio *et al.* 2005), mientras que en encina se aíslan masas proembriónicas (PEMs) que también se cultivan en medio SH (Martínez *et al.* 2019).

### **1.10.4. Maduración y germinación en alcornoque y encina**

La regeneración de plantas es un paso limitante en muchas especies leñosas para la aplicación de la embriogénesis somática, debido a los bajos porcentajes de regeneración de planta a partir de los embriones somáticos y a las dificultades de aclimatación de las plantas.

Esto se debe fundamentalmente a la baja calidad de los embriones somáticos y/o una deficiente maduración de los mismos (Ballester *et al.* 2016).

La maduración es el proceso mediante el cual los embriones somáticos cesan la embriogénesis secundaria e inician la acumulación de sustancias de reserva (generalmente lípidos y proteínas), y aumentan la tolerancia a la desecación (Yeung *et al.* 1996; von Arnold *et al.* 2008). Para ello, al alcanzar el estado cotiledonar, el embrión se somete a una serie de tratamientos que tratan de imitar la maduración de los EZ (Merkle *et al.* 1995). Los tratamientos de maduración más habituales implican la adición al medio de maduración de ácido abscísico (ABA) o de agentes osmóticos (Corredoira *et al.* 2019). Se cree que la presencia de ABA provoca la inhibición de la embriogénesis secundaria y de la germinación precoz, a la vez que induce la síntesis de sustancias de reserva y aumenta la tolerancia a la desecación (Jiménez 2013). La maduración con ABA se ha utilizado fundamentalmente con sistemas embriogénicos de gimnospermas (Stasolla *et al.* 2002; von Arnold 2008).

El cultivo con agentes osmóticos tiene como objetivo reducir la disponibilidad de agua en el medio de cultivo para de inducir la síntesis de sustancias de reserva (Klimaszewska *et al.* 2001; Corredoira *et al.* 2019). Esta reducción se obtiene mediante el incremento de la concentración de la fuente de carbono, utilizando azúcares-alcohol como el manitol y el sorbitol, o añadiendo compuestos inertes como el polietilenglicol o los dextranos (Raemakers *et al.* 1999; Corredoira *et al.* 2019).

En muchas especies, para lograr la regeneración de plantas, además de la etapa de maduración se aplican una serie de tratamientos denominados de pre-germinación. El propósito de estos tratamientos es romper la dormición impuesta por el ABA o por los agentes osmóticos, inducir la germinación y sincronizar el desarrollo de la raíz y del brote (Merkle *et al.* 1995). Los principales tratamientos de pre-germinación son: la desecación, el almacenamiento en frío y la adición al medio de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) (Merkle *et al.* 1995).

#### 1.10.4.1. Alcornoque

En alcornoque, se ha estudiado el efecto que tiene sobre la maduración de los ES el uso de medios de cultivo con alta osmolaridad o la aplicación de ABA (García-Martín *et al.* 2005; Toribio *et al.* 2005). Aunque de forma natural la concentración endógena de ABA aumenta en los embriones según progresa la maduración (García-Martín *et al.* 2005) el efecto que tiene la aplicación del ABA exógeno sobre la maduración de los embriones es contradictorio. En algunos casos, ABA favorece la embriogénesis secundaria (Fernández-Guijarro 1997), mientras que en otros, la presencia de ABA en bajas concentraciones junto con ácido indol-3-butírico (AIB) promueve la maduración de los embriones (García-Martín *et al.* 2005; Pintos *et al.* 2010; Pérez *et al.* 2015; Testillano *et al.* 2018).

En general, el tratamiento más utilizado y efectivo para la maduración de los ES de alcornoque es el almacenamiento en frío de los mismos (Bueno *et al.* 1992; Manzanera *et al.* 1993; Fernández-Guijarro *et al.* 1995; Hernández *et al.* 2003b, 2011; Pintos *et al.* 2010; Pérez *et al.* 2015). Para ello, embriones cotiledonares opacos y de color blanco (aproximadamente 25 mm de longitud y 1,3 g de peso fresco) son almacenados a 4°C durante 2 meses en medio SH (Hernández *et al.* 2011). Tras este período de frío, los embriones son transferidos a un medio germinación, generalmente medio SH sin PGRs (Hernández *et al.* 2003b) o suplementado con BA y AIB (Toribio *et al.* 2005; Hernández *et al.* 2011). En estas condiciones se han mencionado porcentajes de regeneración a planta del 40%-70% (Toribio *et al.* 2005; Hernández *et al.* 2011).

La aclimatación de las plantas de alcornoque se ha conseguido mediante el cultivo de las plántulas en un medio compuesto por turba, perlita y vermiculita (1:1:1), con humedad gradualmente reducida, y posterior transferencia a un medio con turba y vermiculita (3:1). En estas condiciones se ha logrado un porcentaje de aclimatación del 77,96 % (Pintos *et al.* 2009, 2010).

#### 1.10.4.2. Encina

En encina, también se ha estudiado el efecto que tiene sobre la maduración de los ES el uso de medios con altas concentraciones de azúcar o la aplicación de ABA (Mauri y Manzanera 2004, 2005). La encina es la única especie del género *Quercus* en la que se ha observado que el ABA tiene un efecto positivo en la regeneración de plantas, reduciendo la embriogénesis secundaria (Mauri y Manzanera 2004). Sin embargo, en esta especie el método más utilizado para la maduración de los ES también es el aislamiento de ES cotiledonares y su posterior almacenamiento a 4°C en medio SH (Mauri y Manzanera 2005; Barra-Jiménez *et al.* 2014) o en placas Petri vacías (Martínez *et al.* 2017b). Después del almacenamiento en frío se han utilizado diferentes medios de germinación y regeneración de planta completa. Los ES se pueden cultivar en medio SH sin PGRs, pero la adición de 0,05 mg/L de BA y 0,05 mg/L de AIB al medio de germinación mejora el porcentaje de conversión a planta del 25% al 36% (Barra-Jiménez *et al.* 2014). Por otro lado, Martínez *et al.* (2017a) obtuvieron frecuencias de conversión del 21-50% con ES cultivados en medio GD (Gresshoff y Doy 1972) suplementado con 0,1 mg/L de BA y 20 µM STS.

Por último, la aclimatación de las plantas de encina es muy difícil y los porcentajes publicados hasta ahora son muy bajos. En estudios recientes, se ha obtenido un porcentaje de aclimatación de menos del 10% utilizando una mezcla de turba y perlita en una proporción 1:2 (Martínez *et al.* 2017b).

#### 1.11. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA EN ALCORNOQUE Y ENCINA

Como ya se ha mencionado, la transformación genética es una aplicación muy importante de la embriogénesis somática. En el caso de las especies estudiadas en la presente tesis, hasta la fecha se han publicado varios trabajos sobre la transformación genética de alcornoque (Álvarez *et al.* 2004, 2007, 2009; Sánchez *et al.* 2005), sin embargo, no existe en la bibliografía ningún trabajo acerca de la transformación genética en encina.

En alcornoque, la transformación se ha logrado en todos los casos utilizando *Agrobacterium* como método de transformación y cultivos embriogénicos como explanto diana, aunque en unos trabajos los

cultivos embriogénicos habían sido establecidos a partir de árboles adultos (Álvarez *et al.* 2004, 2007, 2009) y en otros a partir de material juvenil (Sánchez *et al.* 2005). En el primer trabajo publicado de transformación genética de alcornoque, Álvarez *et al.* (2004) evaluaron efecto del tipo de cepa de *Agrobacterium* (AGL1, LBA 4404 y EHA105 transformadas con el vector pBINUbiGUSint) en la transformación de grupos de embriones o embriones somáticos individualizados, aislados de una única línea embriogénica. Aunque se consiguieron embriones transgénicos, los porcentajes de transformación fueron bajos (4%). De forma paralela, Sánchez *et al.* (2005) transformaron PEMs obtenidas a partir de EZ con la cepa de *Agrobacterium* LBA4404 pCAMBIA 1301, la cual expresaba el gen *HPTII*, que confiere resistencia frente al antibiótico higromicina, consiguiendo porcentajes de transformación del 5,8%.

Posteriormente, Álvarez y Ordás (2007), con el objetivo de mejorar los porcentajes de transformación, estudiaron el efecto del genotipo, del pre-cultivo de los ES, la densidad óptica del cultivo bacteriano y el tipo de explanto utilizado. La aplicación de 20 días de pre-cultivo y el incremento de la densidad óptica mejoraron la frecuencia de transformación, pero sólo se logró la transformación de 3 de las 6 líneas evaluadas. Más tarde, Álvarez *et al.* (2009) consiguieron la transformación genética de embriones somáticos de alcornoque con el gen *BAR*, que confiere resistencia a un amplio rango de herbicidas, aunque no se menciona la regeneración de plantas transgénicas.

#### **1.12. CRIOCONSERVACIÓN EN ALCORNOQUE Y ENCINA**

La crioconservación consiste en el almacenamiento de germoplasma vegetal en nitrógeno líquido (NL) (Benson 2008). En esas condiciones, el metabolismo y la actividad de las células está paralizado totalmente, con lo que se garantiza la conservación del material durante tiempo indefinido (Kaviani 2011). La aplicación combinada de embriogénesis somática y crioconservación facilita el manejo de las líneas embriogénicas, reduciendo costes en medios de cultivo y personal, y limitando el riesgo de aparición de variación somaclonal y de contaminación (Engelmann 2004; Valladares *et al.* 2010).

En teoría, la criopreservación se puede aplicar a cualquier tipo de material vegetal con capacidad de regeneración, como semillas, ápices, callos, polen, y embriones somáticos, pero factores como el estado fisiológico del explanto y su tamaño son determinantes para garantizar la conservación en NL. Además del explanto, otro aspecto crítico para conseguir la criopreservación es la reducción de la presencia de agua en las células, con el fin de evitar la formación de cristales en los tejidos, ya que éstos pueden romper las estructuras celulares durante los procesos de congelación y descongelación que acompañan al proceso de criopreservación. Con el objetivo de reducir al mínimo el contenido de humedad de los tejidos vegetales y crioprotgerlos para su inmersión en NL se han desarrollado diferentes metodologías. Básicamente, las técnicas aplicadas en leñosas son el enfriamiento lento, la desecación y la vitrificación (Corredoira *et al.* 2017a). Con excepción de las gimnospermas, probablemente, la vitrificación es la técnica más utilizada en la criopreservación de especies leñosas. Conceptualmente, la vitrificación consiste en la conversión de un líquido en un sólido amorfo, no cristalino, mediante el aumento de su viscosidad, lo cual evita la formación y posterior crecimiento de cristales de hielo (Sakai y Engelmann 2007). Para ello, los explantos son tratados con soluciones vitrificantes, que son mezclas concentradas de sustancias como etilenglicol, dimetilsulfóxido (DMSO) y glicerol, generalmente combinadas también con una alta concentración de sacarosa. La solución PSV2 (Plant Vitrification Solution 2) definida por Sakai *et al.* (1990) es una de las más utilizadas en leñosas. El tipo de explanto y su estado fisiológico o de desarrollo, y el tiempo y temperatura de aplicación de la PVS2 son los factores más importantes para definir un protocolo eficiente de criopreservación (Engelmann 2004). Los tiempos prolongados de incubación en PVS2 pueden resultar tóxicos para los embriones somáticos, mientras que aplicaciones muy cortas podrían no lograr la crioprotección de los explantos (Corredoira *et al.* 2017a).

En el caso del alcornoque y la encina, la vitrificación es procedimiento que se ha utilizado para la criopreservación de los embriones somáticos. En alcornoque, Valladares *et al.* (2004) lograron la criopreservación de ES somáticos de tres líneas embriogénicas, obteniendo porcentajes de recuperación embriogénica superiores al 90%

después del almacenamiento en NL. Una aplicación práctica de ese protocolo fue la creación de un banco de germoplasma para crioconservar de manera indefinida 51 líneas embriogénicas inducidas partir de genotipos seleccionados de alcornoque (Vidal *et al.* 2010).

En encina, el protocolo desarrollado por Barra-Jiménez *et al.* (2015) permitió la crioconservación de ES solo cuando estos eran almacenados en NL durante 24h, pero si los ES se mantenían un mes en NL solo se observaba la formación de callo a partir de los embriones crioconservados. Posteriormente, Martínez *et al.* (2019) definieron un protocolo de crioconservación que permitía el almacenamiento en NL durante al menos 6 meses de los cultivos embriogénicos, utilizando masas proembriogénicas (PEMs) como explanto y aplicando 15 minutos en PVS2.



## **2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**





La enfermedad de “la seca”, que afecta a alcornoque y encina, es un proceso muy complejo, y por ello no es fácil encontrar soluciones que permitan su control. Hasta la fecha, no se conocen métodos químicos eficaces para controlar la enfermedad. Además, los programas tradicionales de mejora para obtener encinas y alcornoques resistentes/tolerantes a la enfermedad, mediante cruzamientos selectivos, no se han hecho y probablemente nunca se intenten, ya que estas especies requieren de largos períodos de tiempo para completar un ciclo de mejora convencional (Martínez *et al.* 2019). Una alternativa a estos programas tradicionales podría ser el uso de la biotecnología, mediante la transformación genética, ya que de esta manera se requieren períodos de tiempo más cortos, siempre y cuando se hayan identificado los genes relacionados con el sistema de defensa de las plantas, y se haya establecido un sistema de regeneración *in vitro* adecuado que permita obtener plantas a partir de las células transformadas genéticamente.

En los últimos años, la investigación sobre la genética de las especies leñosas se ha incrementado de forma considerable (<http://www.hardwoodgenomics.com>). En el caso de los robles, se ha publicado numerosa información entre la que se incluye la construcción de mapas de linajes genéticos (Durand *et al.* 2010; Bódènes *et al.* 2016), la identificación de marcadores microsatélites (Mariette *et al.* 2002; Sullivan *et al.* 2013), el análisis del transcriptoma (Pereira-Leal *et al.* 2014; Guerrero-Sanchez *et al.* 2017), del proteoma (Valero-Galván *et al.* 2011, 2012; Sghaier-Hammami *et al.* 2016) y del metaboloma (Kersten *et al.* 2013), o la evaluación de la expresión diferencial de los genes relacionados con la adaptación a las variaciones ambientales (Ueno *et al.* 2013; Homolka *et al.* 2013; Lesur *et al.* 2015). Estos resultados, junto con la reciente publicación de la secuencia del genoma del roble común (Plomion *et al.* 2018) serán de gran interés a la hora de detectar encinas y alcornoques que muestren resistencia o tolerancia a las enfermedades que les afectan o identificar genes implicados en la defensa frente a patógenos. Mientras eso no ocurre una alternativa puede ser la sobre-expresión de las proteínas PR. La taumatina es un tipo de proteína PR cuya sobre-expresión ha incrementado la tolerancia

a enfermedades en naranjo (Fagoaga *et al.* 2001), zanahoria (Chen y Punja 2002), trigo (Mackintosh *et al.* 2007), vid (Dhekney *et al.* 2011), o plátano (Mahdavi *et al.* 2012). Por lo tanto, la transformación genética de la encina y el alcornoque con el gen *CsTLL1* que codifica una proteína tipo taumatina, permitiría obtener plantas con tolerancia a la enfermedad de “la seca”. Este gen ha sido identificado en embriones zigóticos de castaño europeo por lo que estaríamos sobre-expresando un gen de la misma familia, y en consecuencia las plantas obtenidas no serán estrictamente transgénicas denominándose cisgénicas. Aunque la transformación genética en plantas es una técnica muy extendida, su aplicación en árboles es problemática. En el caso de la encina no se han encontrado referencias bibliográficas en las bases de datos internacionales sobre su transformación genética, mientras que en alcornoque el protocolo definido hasta el momento muestra una elevada dependencia del genotipo de las líneas embriogénicas utilizadas para transformar (Álvarez *et al.* 2004, 2007).

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente mencionado, el objetivo del trabajo de esta tesis es definir un protocolo de transformación más eficiente para alcornoque y por primera vez para encina con el gen *CsTLL1*, con el objetivo de estudiar si la sobre-expresión de este gen puede mejorar la tolerancia de estas especies a *P. cinnamomi*, principal causante de “la seca”. Para ello se han definido los siguientes objetivos parciales:

1. Definir un protocolo eficiente de transformación genética en encina y alcornoque mediante co-cultivo con *Agrobacterium tumefaciens* portando el gen *CsTLL1*.
2. Establecimiento y proliferación de las líneas embriogénicas transgénicas de alcornoque y encina.
3. Análisis de los niveles de expresión para el gen *CsTLL1* en embriones somáticos de alcornoque y encina.
4. Crioconservación de líneas embriogénicas transgénicas de encina y alcornoque transformadas con el gen *CsTLL1*.

5. Determinar si la sobre-expresión del gen *CsTL1* puede inducir la tolerancia/resistencia a *P. cinnamomi* en plantas de alcornoque y encina cultivadas *in vitro*.





### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**





### 3.1. MATERIAL VEGETAL

Para la transformación genética de alcornoque, se han utilizado tres líneas embriogénicas (ALM6, ALM80 y TGR3) que habían sido inducidas a partir de hojas de árboles centenarios (Hernández *et al.* 2003a, b). En el caso de la encina, se han empleado también tres líneas embriogénicas: E2, Q8 y Q10-16. Las líneas E2 y Q8 fueron iniciadas a partir de tegumentos de óvulos derivados de árboles adultos (Barra-Jiménez *et al.* 2014), mientras que la línea Q10-16 fue inducida a partir de hojas aisladas de brotes cultivados *in vitro* y establecidos a partir de una encina centenaria (Martínez *et al.* 2017a). Las líneas ALM6, ALM80, TGR3, E2 y Q8 fueron suministradas por el Dr. Mariano Toribio. Los cultivos embriogénicos se han mantenido mediante embriogénesis secundaria, con subcultivos cada 6 semanas, en medio de proliferación que consistió en medio mineral SH (Schenk y Hildebrandt 1972), vitaminas MS (Murashige y Skoog 1962), 30 g/L de sacarosa y 6 g/L de agar Vitro (Pronadisa, España) (Tabla 1).

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo utilizados en la proliferación y transformación de las líneas embriogénicas de alcornoque y encina.

Componentes	Proliferación ES	Aislamiento ES	Infección ES	Selección ES
Medio basal	SH	½ MS	MS	SH
Sacarosa (g/L)	30	30	50	30
Agar Vitro (g/L)	6	6	-	6
Kanamicina (mg/L)	-	-	-	125A/100E
Carbenicilina (mg/L)	-	-	-	300
pH	5,6-5,7	5,6-5,7	5,6-5,7	5,6-5,7

SH: medio mineral Schenk y Hildebrandt (1972); ½MS: medio mineral Murashige y Skoog (1962) con los macronutrientes reducidos a la mitad. A: alcornoque; E: encina; ES: embriones somáticos.

El pH se ajustó a 5,6 antes de la esterilización en autoclave a 115°C durante 20 min. El medio se dispensó en placas Petri desechables (90 cm de diámetro) y en cada placa se cultivaron 8-10 explantos. En alcornoque, los explantos que se utilizan para la proliferación consistieron en grupos de 2 o 3 embriones en estado globular-cotiledonar temprano (Figura 1A), mientras que en encina se cultivaron masas proembriogénicas (PEMs) individualizadas (Figura 1B).

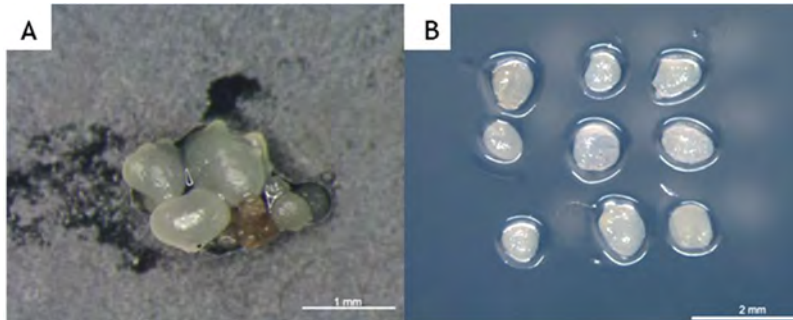


Figura 1. Aspecto del explanto utilizado para la proliferación de las líneas embriogénicas. A: Embriones somáticos de alcornoque en estado globular-cotiledonar temprano. B: Masas proembriogénicas (PEMs) de encina.

### 3.2. CONDICIONES DE CULTIVO

Los cultivos embriogénicos transferidos a los diferentes medios de cultivo se mantuvieron, en función del experimento, en cámaras de crecimiento climatizadas bajo unas determinadas condiciones de luz y temperatura. Se ha utilizado una cámara de oscuridad continua con una temperatura constante de 25°C, y otra con luz fotoperiódica (condiciones estándar) con un fotoperiodo 16h luz y 8h de oscuridad. En la cámara de luz fotoperiódica, la luz fue suministrada por tubos fluorescentes de luz blanca (Mazdafluor 7D TF 36 w/LJ) con una densidad de flujo fotónico de 50-60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . La temperatura de cultivo en cámara fue de 25°C con luz y de 20°C en oscuridad.

En las experiencias de almacenamiento en frío se utilizaron armarios frigoríficos Sanyo Medicoool Mod. MPR311d de 347 litros de capacidad, que proporcionan una temperatura de 4°C, y mantenidos únicamente con la iluminación externa continua que suministró una densidad de flujo radiante de 8-10  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  a nivel de los cultivos.

### 3.3. GENES Y PLÁSMIDO

Para la transformación se ha utilizado el gen *CsTLL1*, que codifica una proteína tipo taumatina, y que ha sido identificado en cotiledones de castaño europeo (Casado-García *et al.* 2000). Este gen fue clonado en el vector pK7WG2D (Karimi *et al.* 2002) bajo el promotor CaMV35S (Figura 2) (ver Anexo 2), utilizando el sistema Gateway (Invitrogen,

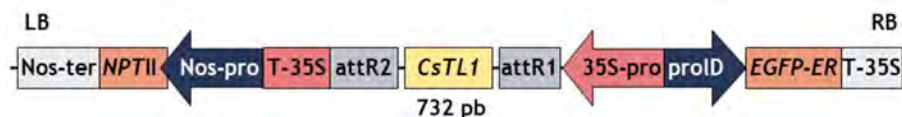


Figura 2. Representación esquemática del vector pK7WG2D-TAU. LB borde izquierdo; *Nos-ter* y *Nos-pro* terminador y promotor del gen de la nopalina sintasa (*Nos*), respectivamente; RB borde derecho; *NPTII* gen de la resistencia a la kanamicina; *35S-pro* y *T-35S* promotor y terminador del gen *CaMV35S*, respectivamente; *EGFP* gen de la proteína fluorescente verde; *CsTL1* gen codificador de una proteína tipo taumatina; *rolD* promotor del gen *rol root loci D*. Modificado de Corredoira *et al.* 2015.

USA), tal y como describen Corredoira *et al.* (2015). El plásmido también incluye el gen de selección de la neomicina fosfotransferasa (*NPTII*), y el gen indicador de la proteína verde fluorescente (*EGFP*). El gen *NPTII* confiere resistencia a la kanamicina (*kan*) y está regulado por el promotor del gen de la nopalina sintetasa (*Nos*). El gen *EGFP* se usa como indicador de la transformación porque los explantos transformados con él emiten fluorescencia cuando son expuestos a luz UV, y está regulado por el promotor del gen *rol root loci D* (*rolD*). El vector con los tres genes se denominó pK7WG2D-TAU (Figura 2) y se transfirió a la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 (Hood *et al.* 1993), mediante el método de congelación-descongelación definido por Xu y Li (2008).

La cepa resultante, denominada EHA105pK7WG2D-TAU, se utilizó en todos los experimentos de transformación realizados en este trabajo de tesis.

### 3.4. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL DE KANAMICINA

El antibiótico kanamicina fue usado como agente de selección en los experimentos de transformación, dado que el vector contiene el gen *NPTII*, que como ya se ha mencionado, confiere resistencia frente a este antibiótico. Para determinar la sensibilidad de los embriones de alcornoque a *kan*, se aislaron grupos de 2 o 3 embriones somáticos en estado globular-torpedo (4-7 mg) de las líneas ALM80 y TGR3 que se cultivaron en medio de proliferación suplementado con diferentes concentraciones de *kan* (0, 25, 50, 75, 100, 125 y 150 mg/L). También se evaluó el efecto de la carbenicilina (CB) y cefotaxima (CF),

antibióticos utilizados para eliminar *Agrobacterium* de los explantos una vez infectados. Para esto se estudió el efecto por separado de la CB (300 mg/L) y la CF (200 mg/L o 300 mg/L) o de diferentes combinaciones de ambos (CF 200 mg/L + CB 200 mg/L y CF 200 mg/L + CB 300 mg/L).

En el caso de la encina, se aislaron 2 o 3 PEMs de la línea Q8 que se cultivaron en medio de proliferación suplementado con diferentes concentraciones de kan (0, 25, 50, 75, 100, 125, 150 y 175 mg/L). En esta especie, también se evaluó el efecto en la proliferación del antibiótico bactericida CB en una concentración de 300 mg/L.

Todos los antibióticos se disolvieron en agua ultrapura y se esterilizaron mediante filtración con filtros de 0,22 µm antes de ser incorporados al medio de proliferación esterilizado. Para cada concentración, se evaluaron cuatro placas Petri con ocho explantos cada una, y el experimento se repitió dos veces. Tras 8 semanas de cultivo, el efecto de los diferentes antibióticos sobre la proliferación de los embriones somáticos de las dos especies se determinó mediante la evaluación de dos parámetros: el porcentaje de explantos con embriogénesis somática secundaria, y el número de embriones somáticos bipolares por explanto inicial.

### **3.5. CULTIVOS BACTERIANOS**

Los cultivos de la cepa EHA105pK7WG2D-TAU fueron iniciados a partir de un stock de glicerol almacenado a -80°C, y se dejaron crecer toda la noche a 28°C, con agitación (180-200 rpm), en medio Luria-Bertani líquido (LB: 10 g/L de triptona, 0,5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de NaCl, pH 7,0 (Sambrook *et al.* 1989)) y suplementado con 50 mg/L de kan. A partir de esa suspensión bacteriana se sembró una placa Petri con LB sólido (agar 1,5%) y la placa se incubó a 28°C en oscuridad. Después de 3 días de cultivo, una colonia de esa placa fue inoculada en 2 ml de medio LB líquido suplementado con 50 mg/L de kan. El cultivo se dejó crecer toda la noche a 28°C, con agitación (180-200 rpm), y en oscuridad. Un ml de esta suspensión bacteriana se usó para inocular 600 ml de medio LB líquido con 50 mg/L de kan, y de nuevo se incubó toda la noche a 28°C y con agitación (100 rpm) en

oscuridad hasta que se alcanzó una  $DO_{600} = 0,6$ . A continuación, el cultivo bacteriano se centrifugó a 6.500 rpm durante 10 min a 10°C, y el pellet obtenido se resuspendió en 200 ml de medio infección que consistió en medio mineral MS líquido suplementado 5 g/L de sacarosa (Tabla 1).

### **3.6. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA**

#### **3.6.1. Transformación genética en alcornoque**

En la transformación genética de alcornoque se evaluó el efecto del genotipo. Para ello, grupos de 2 o 3 embriones somáticos (4-7 mg) en estado globular o torpedo de las líneas embriogénicas ALM6, ALM80 y TGR3, se aislaron 4 semanas después del último subcultivo y se cultivaron en placas Petri desechables (90 cm de diámetro) con medio de aislamiento. El medio de aislamiento consistió en medio MS con los macronutrientes reducidos a la mitad suplementado con 30 g/L de sacarosa y 6 g/L de agar Vitro (Pronadisa, España) (Tabla 1). Los embriones somáticos fueron pre-cultivados en condiciones estándar durante un día en el medio de aislamiento.

Los explantos pre-cultivados se sumergieron en el medio de infección durante 30 min con agitación suave. Transcurrido ese tiempo, el medio de infección se eliminó por filtración y los explantos se transfirieron a medio de aislamiento. Tras un período de 5 días de co-cultivo en oscuridad a 25°C, se eliminó la bacteria mediante la inmersión de los explantos durante 30 min en una solución de lavado que consistió en agua estéril con CB (300 mg/L). Después del lavado, la solución de lavado se eliminó por filtración y los explantos fueron transferidos a medio selección de alcornoque que consistió en medio de proliferación suplementado con 300 mg/L de CB y 125 mg/L de kan (Tabla 1). Los embriones se mantuvieron en condiciones estándar, con subcultivos periódicos cada dos semanas a este medio de selección, durante 10 semanas.

En la transformación de cada línea se emplearon 100 explantos (10 placas Petri con 10 explantos) resultando un total de 300 explantos. Cada placa se consideró como una repetición en un diseño completamente aleatorizado (DCA). Adicionalmente, para cada línea

embriogénica se aislaron 20 explantos que no fueron infectados y que fueron cultivados en medio de proliferación sin antibióticos (control positivo) y con antibióticos (control negativo).

### **3.6.2. Transformación genética en encina**

Para la transformación genética de encina, se utilizaron explantos formados por 2 o 3 PEMs individualizadas y aisladas de cultivos de 6 semanas después del último subcultivo. En el primer experimento, se evaluó el efecto del pre-cultivo en la transformación genética. Para ello los explantos de la línea Q8 fueron pre-cultivados en medio de proliferación durante 1 día, 1 semana y 2 semanas. Los explantos pre-cultivados fueron transformados siguiendo el mismo protocolo descrito para el alcornoque, pero después del lavado, los explantos fueron transferidos al medio de proliferación suplementado con 300 mg/L de CB y 75 mg/L de kan. Tras dos semanas de cultivo en condiciones estándar en ese medio, los explantos se transfirieron al medio de selección de encina consistente en medio de proliferación suplementado con 300 mg/L de CB y 100 mg/L de kan (Tabla 1), con subcultivos cada dos semanas a ese medio hasta completar 10 semanas desde el inicio del experimento.

En este experimento se infectaron 120 explantos por cada tiempo de precultivo (12 placas Petri con 10 explantos) resultando un total de 360 explantos. Cada placa se consideró como una repetición en un DCA. Adicionalmente, para cada tiempo de precultivo se aislaron 20 explantos que no fueron infectados y que fueron cultivados en medio de proliferación sin antibióticos (control positivo) y con antibióticos (control negativo).

En el segundo experimento se evaluó el efecto del genotipo. Para ello se aislaron 2 o 3 PEMs individualizadas de tres líneas embriogénicas de encina (E2, Q8 y Q10-16). Los explantos, pre-cultivados durante una semana, fueron transformados utilizando el procedimiento previamente descrito para alcornoque.

Para cada línea embriogénica de encina se utilizaron 60 explantos (6 placas Petri con 10 explantos) resultando un total de 180 explantos. Cada placa se consideró como una repetición en un DCA.

Adicionalmente, para cada línea embriogénica se aislaron 20 explantos que no fueron infectados y que fueron cultivados en medio de proliferación sin antibióticos (control positivo) y con antibióticos (control negativo).

### **3.7. SELECCIÓN Y MULTIPLICACIÓN DE LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE ALCORNOQUE Y ENCINA**

En ambas especies, después de 10 semanas de cultivo desde inicio de la transformación se aislaron los explantos que mostraban señales de crecimiento, y se calculó el porcentaje de resistencia a la kanamicina, definido como el porcentaje de explantos iniciales que muestran la formación de nuevos embriones somáticos y/o estructuras embriogénicas en medio de selección.

Los embriones kan-resistentes se transfirieron a medio de proliferación suplementado con una mayor concentración de kan que el medio de selección (150 mg/L para alcornoque y 125 mg/L para encina) y se cultivaron durante 4 semanas más, con el objeto de incrementar la presión selectiva y confirmar su resistencia a kan. Después de 14 semanas desde el inicio de la transformación se midió la eficiencia de transformación, definida como el porcentaje de explantos iniciales que mostraban fluorescencia (GFP+). La fluorescencia se observó utilizando una lupa Leica M205 FA (Alemania), equipada con una bombilla de 200-W, y un filtro específico para fluorescencia, con 470/40x nm de excitación y 525/50 nm de emisión. Las imágenes se tomaron con una cámara Leica DSC7000T (Alemania).

A partir de cada explanto GFP+, se aisló un único embrión somático en estado cotiledonar, que fue subcultivado en medio de selección durante al menos cuatro transferencias (100 mg/L kan en encina y 125 mg/L kan en alcornoque) y multiplicado para establecer las putativas líneas embriogénicas transgénicas. Durante ese tiempo también se revisó la expresión de *GFP* de forma periódica, para descartar la aparición de quimeras. Tras este tiempo, las líneas putativamente transformadas se transfirieron a medio sin antibiótico, para eliminar la presión selectiva y favorecer el crecimiento y multiplicación de las líneas. Estas líneas transgénicas se mantuvieron

mediante embriogénesis secundaria, con subcultivos cada 6 semanas, siguiendo las condiciones previamente descritas en el apartado 3.1 de Material y Métodos.

### **3.8. TÉCNICAS MOLECULARES**

Una vez establecidas las líneas transgénicas, se realizaron diferentes pruebas moleculares para confirmar la presencia, transcripción y expresión del gen de la taumatina en las líneas transgénicas de alcornoque y encina.

#### **3.8.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La presencia de los transgenes (*NPTII*, *GFP* y *CsT1I*) se confirmó mediante la amplificación de su secuencia mediante PCR. La extracción de ADN de los embriones somáticos transformados y no transformados (wt) de ambas especies se llevó a cabo mediante el Kit REALPURE (Durviz, España) siguiendo las instrucciones del fabricante y previa homogenización del material vegetal (100 mg) en morteros con nitrógeno líquido. El ADN, una vez extraído, fue resuspendido en 50 µl de agua estéril y su concentración se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific, EEUU). Posteriormente se almacenó a -20°C hasta su utilización. Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador MJ Mini (BioRad), utilizando un volumen de reacción de 50 µl. La reacción está compuesta de 250-500 ng de ADN genómico, 1 µl de Cl<sub>2</sub>Mg, 0,2 µl de Taq ADN Polimerasa (Qiagen, Alemania), 2,5 mM de dNTPs y 15 µM de los cebadores. Los programas de amplificación usados, la secuencia de los cebadores, así como el tamaño del fragmento generado están especificados en la Tabla 2. Los productos de la amplificación de la PCR se resolvieron en geles de 1,5% de agarosa (Ultra Pure Agarose, Invitrogen, EEUU), en TBE 1X (Duchefa, Holanda) y 1% de RedSafe (iNtRON Biotechnology, Corea). A cada uno de los productos de amplificación se le añadió 2 µl de tampón de carga (Thermo Fisher Scientific, EEUU). El tamaño de la

Tabla 2. Cebadores, condiciones para su amplificación y tamaño del fragmento generado empleados en la confirmación de la presencia de los transgenes en los embriones somáticos transformados de alcornoque y encina.

Gen	Nombre	Secuencia de los cebadores (5'-3')	Programa PCR	Tamaño del fragmento (pb)
<i>NPTII</i>	<i>NPTII-F</i>	GTCATCTCACCTTGCTCCTGCC	35 ciclos: 94°C x 30s 60°C x 30s 72°C x 42s	472
	<i>NPTII-R</i>	AAGAAGGCGATAGAAGCGA		
<i>EGFP</i>	<i>EGFP-F</i>	CACCGGGGTGGTGCCCAT	40 ciclos: 94°C x 15s 60°C x 30s 72°C x 1min	740
	<i>EGFP-R</i>	CTAGTGGATCCCCGGGC		
<i>CsTL1-Directo</i> <sup>1</sup>	<i>CsTL1-F-F</i>	AGGTCACTGGATTTTGGT	40 ciclos: 94°C x 15s 60°C x 30s 72°C x 1min	981
	<i>CsTL1-F-R</i>	CACCATGATGAAAACCTG		
<i>CsTL1-Reverso</i> <sup>2</sup>	<i>CsTL1-R-F</i>	GGTAAGGCCGTAGAGT	40 ciclos: 94°C x 15s 60°C x 30s 72°C x 1min	658
	<i>CsTL1-R-R</i>	GATCTAACAGAACTCGCC		

La presencia del gen *CsTL1* se confirmó mediante PCR en ambos sentidos transcripcionales usando los cebadores específicos *CsTL1-Directo* y *CsTL1-Reverso*. <sup>1</sup>Este fragmento incluye la región T-35S. <sup>2</sup>Este fragmento incluye la región p35S. F: directo; R: reverso.

banda se estimó con la ayuda de un marcador de peso molecular de 100 pb ADN (Invitrogen, EEUU). Una vez completada la electroforesis, los geles se visualizaron con un transiluminador, con la ayuda de un programa de obtención de imágenes (Quantity One 1-D Analysis Software, BioRad, EEUU).

### 3.8.2. Cuantificación relativa de los niveles de transcripción del gen *CsTL1* mediante RT-PCR en tiempo real

La expresión del gen *CsTL1* se determinó en las líneas putativamente transformadas de alcornoque y encina mediante una RT-PCR en dos pasos.

El ARN total se extrajo de las líneas embriogénicas no transformadas (wt) y las putativamente transformadas a partir de embriones somáticos en estado cotiledonar temprano utilizando el Kit Qiagen RNeasy Plant Mini (Qiagen, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Una vez extraído el ARN, se realizó un tratamiento con el RNase-free DNase Set (Qiagen, Alemania) con el objeto de eliminar la posible contaminación con ADN. La estabilidad del ARN extraído se comprobó observando una doble banda en geles de 1,2% de agarosa con formaldehído, y la concentración se cuantificó con un espectrofotómetro Nanodrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific, EEUU). La pureza del ARN en cada muestra se determinó por medio de las relaciones de absorbancia A260/A280 y A260/A230. Posteriormente se almacenó a -80°C hasta su utilización.

El ADNc se sintetizó a partir de 1 µg de ARN total utilizando la retrotranscriptasa Quanta cDNA synthesis kit (Quanta Biosciences, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante y obteniendo una concentración final de 50 µg/µl. Para determinar la eficiencia de la curva de cada par de cebadores se utilizaron diluciones seriadas de ADNc como se detalla en Costa *et al.* (2013).

A partir del ADNc se analizó cuantitativamente la transcripción del gen *CsTLL1* mediante PCR en tiempo real (qPCRrt), en una placa de 48 pocillos utilizando el Eco Real-Time PCR System (Illumina, EEUU). El volumen final de cada reacción fue de 15 µl y se utilizó 1 µl de la reacción de síntesis del ADNc. Para las líneas de alcornoque se utilizó SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, EEUU) y 200 nM de cebadores específicos (Roche, Suiza), mientras que para las líneas de encina se usó FastStart Universal SYBR Green Master (ROX, Roche Diagnostics, Suiza), y 400 nM de cebadores específicos (Tabla 3). Para ambas especies se utilizaron 40 ciclos con 15 segundos de desnaturalización a 95°C y 1 minuto de anillamiento a 60°C. Al final de cada ciclo se generaron curvas de melting para asegurar la uniformidad del producto: 95°C (15 s), 55°C (15 s) y 95°C (15 s).

Los cebadores para el gen *CsTLL1* (Tabla 3) se diseñaron con el software Primer3. En ambas especies, se utilizaron genes de referencia internos para normalizar los valores de transcripción entre las líneas.

Estos genes fueron la tubulina (*TUB*) (Porth *et al.* 2005), la actina (*ACT*) y el factor de elongación de la polimerasa (*EF*) (Soler *et al.* 2008) (Tabla 3). Fueron seleccionados debido a su estabilidad durante el desarrollo embrionario y utilizando el software geNorm (Vandesompele *et al.* 2002). La eficiencia de las reacciones se estimó para cada especie a partir de la curva estándar de cada amplicón. Se evaluaron tres replicados biológicos por cada línea, y cada muestra fue evaluada por triplicado.

Tabla 3. Cebadores utilizados en la qPCRrt para evaluar la expresión del gen *CsTL1* en las líneas transformadas de alcornoque y encina.

Gen	Nombre	Cebadores (5'-3')
<i>CsTL1</i>	<i>CsTL1</i> -Fq	GTTC AAGCTCCATGGAAAGG
	<i>CsTL1</i> -Rq	ACCTGACCGGTGCTACAATC
<i>TUB</i>	Qp <i>TUB</i> qF	CTCGTGCTGTTCTCATGGATCT
	Qp <i>TUB</i> qR	TGGCCGAAAACGAAGTTGTC
<i>ACT</i>	Qs <i>ACT</i> -F	GCCCCACGAGCTGTGTTTC
	Qs <i>ACT</i> -R	TCTGGCCCATTCCAACCA
<i>EF</i>	Qs <i>EF</i> -F	TTGTGCCGTCTCATTATTGACT
	Qs <i>EF</i> -R	TCACGGGTCTGACCATCCTT

*TUB*: Tubulina; *ACT*: Actina; *EF*: Factor de elongación de la polimerasa.

La transcripción del gen *CsTL1* se cuantificó de forma relativa, utilizando el método comparativo Ct (Schmittgen y Livak 2008) asignando a las líneas wt el valor 1, y comparando con ellas el nivel de expresión de las líneas putativamente transformadas. Los diferentes genotipos de cada especie se evaluaron por separado, y en relación a su propia línea wt. Todos los cálculos y normalizaciones de realizaron con el software EcoStudy™ v5.0.4890 (Illumina, EEUU).

### 3.9. CRIOCONSERVACIÓN DE LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS

Las líneas embriogénicas wt y las líneas transformadas de alcornoque y encina fueron crioconservadas o almacenadas en NL, con el objeto de preservarlas al mínimo coste y para evitar el riesgo de pérdida por contaminación mientras se realizaban los análisis de tolerancia al oomiceto.

### 3.9.1. Equipamiento de criopreservación

Para criopreservación se ha utilizado nitrógeno líquido almacenado en una unidad criogénica modelo Thermo Forma 131-8038 (Thermo Fisher Scientific, EEUU) de aproximadamente 48 litros de capacidad (Figura 3A).

La unidad está revestida de material aislante y con un cierre específico que reduce la evaporación del NL. En el orificio de entrada de la unidad criogénica se encuentran 6 orificios marcados del 1 al 6 en los cuales van encajadas unas varillas metálicas que portan un sistema organizador para 5 cajas (Figura 3B). En las cajas se almacenan los criotubos o viales criogénicos estériles (Nalgene, EEUU) de 2 ml de capacidad (Figura 3C). Estos viales son de material plástico y por su naturaleza son capaces de resistir temperaturas tan bajas como las de  $-196^{\circ}\text{C}$  del NL.

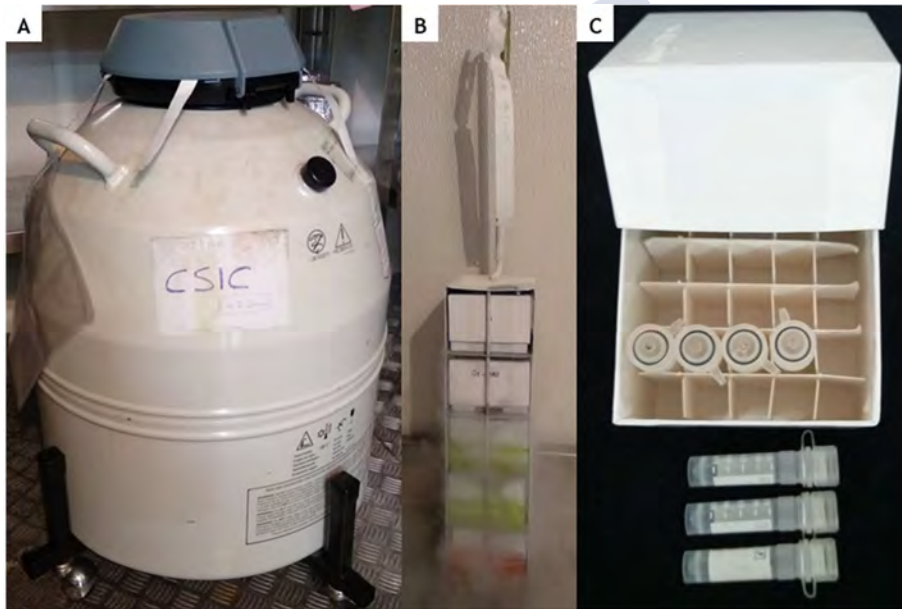


Figura 3. Equipamiento técnico utilizado en la criopreservación de las líneas embriónicas transgénicas de alcornoco y avellana. A: Unidad criogénica de criopreservación. B: Varilla con el sistema de organización de cajas. C: Crioviales y caja de almacenamiento de los mismos.

### 3.9.2. Material vegetal

Las líneas wt y transformadas de encina y alcornoque cuya expresión para el gen *CsTLL1* fue analizada fueron crioconservadas. Los explantos utilizados para la crioconservación consistieron en 2 o 3 embriones en estado globular o torpedo en el alcornoque, mientras que en encina se utilizaron 2 o 3 PEMs individualizadas. En ambas especies, los explantos se aislaron del cultivo embriogénico stock mantenido según se indica en el apartado 3.1 de Material y Métodos y después de 5 semanas del último subcultivo.

### 3.9.3. Procedimiento de crioconservación

Para la crioconservación de los embriones somáticos, se aplicó el método de vitrificación previamente descrito para los embriones somáticos de alcornoque (Valladares *et al.* 2004) y encina (Martínez *et al.* 2019). Los explantos se cultivaron durante tres días en condiciones estándar en placas Petri desechables (90 cm de diámetro) con 25 ml de medio de pre-cultivo que consistió en medio SH suplementado con sacarosa 0,3 M (Tabla 4). Los explantos pre-cultivados fueron introducidos en los crioviales junto con 1,8 ml de solución crioprotectora PVS2 consistente en glicerol 30%, etilenglicol 15% y dimetilsulfóxido (DMSO) 15% en medio SH líquido suplementado con sacarosa 0,4 M (Sakai *et al.* 1990) (Tabla 4). Los embriones de alcornoque fueron incubados en esa solución durante 60 minutos a 0°C, mientras que los embriones de encina se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se sustituyó la solución PVS2 por 0,6 ml de la misma solución fresca. Los crioviales se introdujeron en las cajas dentro de la unidad criogénica con NL previamente descrita (apartado 3.9.1 de Material y Métodos).

Tras 48 horas sumergidos en NL, los crioviales se extrajeron y fueron descongelados por inmersión durante dos minutos en un baño de agua estéril a 42°C. Seguidamente, se retiró la solución de PVS2 y los explantos fueron lavados dos veces durante 10 minutos con 1,8 ml de solución de lavado, que está compuesta por medio mineral SH suplementado con sacarosa 1,2 M (Tabla 4).

**Tabla 4. Composición de los medios de cultivo utilizados para la crioconservación de los embriones somáticos de alcornoque y encina.**

Componentes	Medio pre-cultivo	Solución PVS2	Solución lavado	Medio postcultivo
Medio basal	SH	SH	SH	SH
Sacarosa (g/L)	102,7	137	411	30
Agar Vitro (g/L)	6	-	-	5
Glicerol (ml/L)	-	238	-	-
Etilenglicol (ml/L)	-	136	-	-
DMSO (%)	-	136	-	-
pH	5,6-5,7	5,6-5,7	5,6-5,7	5,6-5,7

SH: medio mineral Schenk y Hildebrandt (1972); DMSO: dimetilsulfóxido.

Los embriones descongelados y lavados se sembraron sobre papeles de filtro colocados en placas Petri desechables (90 cm de diámetro) con medio de postcultivo (Tabla 4) que consistió en medio SH suplementado con 5 g/L de agar Vitro (Pronadisa, España). Tras 24 horas en condiciones estándar, los explantos se transfirieron a placas Petri desechables (90 cm de diámetro) con medio de proliferación (Tabla 1).

Después de 6 semanas de crecimiento en condiciones estándar, se evaluaron los siguientes parámetros: el porcentaje de supervivencia, definido como el número de explantos que muestran algún tipo de crecimiento, y el porcentaje de recuperación embriogénica, definido como el número de explantos que forman nuevos embriones somáticos. Para cada línea wt y transgénica, tanto de alcornoque como de encina, se crioconservaron 30 explantos (3 placas con 10 explantos). Cada placa se consideró como una repetición en un DCA.

Una vez se comprobó que era posible la crioconservación de las líneas transformadas de alcornoque y encina, se repitió el experimento, con el objetivo de conservar los embriones somáticos de las líneas transformadas en la unidad criogénica mientras se llevaban a cabo los ensayos de tolerancia de dichas líneas frente al oomiceto.

### 3.10. REGENERACIÓN DE PLANTAS

#### 3.10.1. Maduración y germinación de los embriones somáticos

##### 3.10.1.1. Maduración y germinación en alcornoque

Para la maduración y germinación de los embriones somáticos de alcornoque se ha utilizado el protocolo definido previamente por Toribio *et al.* (2005). Embriones somáticos, en estado cotiledonar ( $\geq 5$  mm), aislados de cultivos de 6 semanas de las líneas de alcornoque wt y sus respectivas líneas transformadas, se transfirieron a botes de vidrio de 100 ml con tapa de plástico (Figura 4A), con 30 ml de medio de proliferación (Tabla 1) y se almacenaron a 4°C en oscuridad. Después de dos meses, los embriones fueron transferidos a jarras de vidrio de 500 ml (Figura 4B) con 70 ml de medio de germinación consistente en medio mineral SH suplementado con 0,025 mg/L de 6-benciladenina (BA) y 0,05 mg/L de ácido indol-3-butírico (AIB) (Tabla 5). En cada línea wt y sus respectivas líneas transgénicas se cultivaron 36 embriones somáticos procedentes del tratamiento de maduración, dispuestos en 6 jarras con 6 embriones cada una, y cada

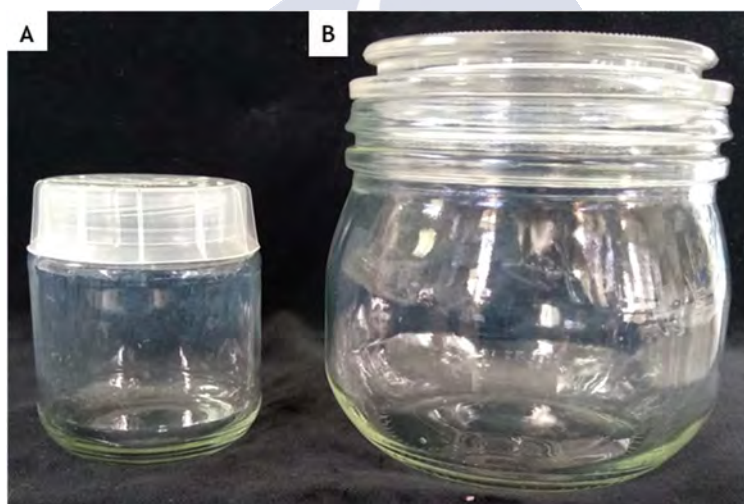


Figura 4. Recipientes utilizados para la maduración y germinación de los embriones somáticos. A: Botes de vidrio de 100 ml con tapa de plástico usados para el almacenamiento en frío de los embriones somáticos de alcornoque. B: Jarras de vidrio de 500 ml usadas en la germinación de los embriones somáticos de alcornoque y encina.

jarra se consideró una repetición en un DCA. Después de ocho semanas de cultivo en condiciones estándar, se determinó: el porcentaje de embriones que forman sólo raíz  $\geq 5$ mm, el porcentaje de embriones que forma sólo brote  $\geq 5$ mm y el porcentaje de embriones que desarrollan una planta completa, así como las longitudes de la raíz (mm) y del brote (mm) y el número de hojas por planta.

### 3.10.1.2. Maduración y germinación en encina

Para la maduración y germinación de los embriones somáticos de encina se siguió el procedimiento descrito por Martínez *et al.* (2017a). Embriones somáticos, en estado cotiledonar ( $\geq 5$  mm), se aislaron de cultivos de 6 semanas de las líneas de encina wt y sus respectivas líneas transformadas y se transfirieron a placas Petri desechables (90 cm de diámetro) vacías, donde permanecieron en condiciones de semioscuridad durante dos meses a 4°C. Trascurrido este tiempo, los embriones somáticos se cultivaron en jarras de vidrio de 500 ml (Figura 4B) con 70 ml de medio de germinación de encina (Tabla 5). Este medio consistió en medio mineral GD (Gresshoff y Doy 1972) suplementado con 0,1 mg/L de BA y 20  $\mu$ M de STS. Por cada línea wt y transgénica se cultivaron 36 embriones somáticos procedentes del tratamiento de maduración, dispuestos en 6 jarras con 6 embriones cada una, y cada jarra se consideró una repetición en un DCA.

Tabla 5. Composición de los medios utilizados en la germinación de embriones somáticos de alcornoque y encina.

Componentes	Germinación alcornoque	Germinación encina
Medio basal	SH	GD
BA (mg/L)	0,025	0,1
AIB (mg/L)	0,05	-
Sacarosa (g/L)	30	30
Agar Vitro (g/L)	6,5	-
Agar Sigma (g/L)	-	7
STS ( $\mu$ M)	-	20
pH	5,6-5,7	5,6-5,7

AIB: indol-3-butírico; BA: 6-benciladenina; GD: medio mineral Gresshoff y Doy (1972); SH: medio mineral Schenk y Hildebrandt (1972); STS: tiosulfato de plata.

Después de ocho semanas de cultivo en condiciones estándar, se determinó: el porcentaje de embriones que sólo forma raíz  $\geq 5$ mm, el porcentaje de embriones que forma sólo brote  $\geq 5$ mm y el porcentaje de embriones que desarrollan una planta completa, así como las longitudes de la raíz (mm) y del brote (mm) y el número de hojas por planta.

### 3.10.2. Establecimiento de cultivos de brotes axilares

Como alternativa a la germinación de los embriones somáticos también se ha establecido un sistema de proliferación de brotes axilares a partir de los brotes derivados de la germinación de los embriones somáticos, que permita disponer de plantas de una forma más rápida y continua.

#### 3.10.2.1. Establecimiento de cultivos de brotes axilares en alcornoque

Para el establecimiento de las diferentes líneas de brotes axilares de alcornoque se ha aislado un brote de un embrión somático con conversión completa a planta de cada línea wt y transgénica. La proliferación de los brotes se obtuvo mediante el cultivo en condiciones estándar de segmentos nodales y apicales (1 cm aproximadamente) en posición vertical en tubos de 20 x 150 mm tapados con Kap-uts (Sigma, EEUU), que contenían 16,5 ml de medio GD, 30 g/L sacarosa, 7 g/L agar Bacto (Dickinson and Company, Francia) y en un ciclo de cultivo de 6 semanas con transferencias cada tres semanas a medio fresco,

Tabla 6. Composición de los medios de cultivo utilizados para la proliferación de los brotes axilares de alcornoque y encina.

Componentes	Alcornoque		Encina		
	Medio 1	Medio 2	Medio 1	Medio 2	Medio 3
Medio basal	GD	GD	GD	GD	GD
Sacarosa (g/L)	30	30	30	30	30
Agar Sigma (g/L)	-	-	7	7	7
Agar Bacto (g/L)	7	7	-	-	-
BA (mg/L)	0,2	0,1	0,1	0,05	0,05
STS ( $\mu$ M)	-	-	20	20	20

GD: medio mineral Gresshoff y Doy (1972); BA: 6-benciladenina; STS: tiosulfato de plata.

como sigue: 0,2 mg/L de BA las 3 primeras semanas (Medio 1) y 0,1 mg/L de BA las 3 últimas semanas (Medio 2) (Tabla 6).

### 3.10.2.2. Establecimiento de cultivos de brotes axilares en encina

De igual modo, en encina se aisló un brote de un embrión somático con conversión a planta de cada línea wt y transgénica con el objetivo de establecer las diferentes líneas de brotes axilares. La proliferación de los brotes se obtuvo mediante el cultivo en condiciones estándar de segmentos apicales (1 cm) en posición vertical en jarras de vidrio de 500 ml (Figura 4B) con 70 ml de medio mineral GD, 30 g/L sacarosa, 7 g/L agar Sigma (Sigma-Aldrich, Alemania), 20  $\mu$ M de STS y en un ciclo de cultivo de 6 semanas con transferencias cada dos semanas a medio fresco, como sigue: 0,1 mg/L de BA las 2 primeras semanas (Medio 1), 0,05 mg/L de BA las 2 semanas siguientes (Medio 2), y 0,05 mg/L de BA las últimas 2 semanas (Medio 3) (Tabla 6).

### 3.10.3. Enraizamiento de los brotes axilares de alcornoque y encina

Todas las líneas de encina, y aquellas líneas de alcornoque que mostraron una mayor expresión del gen *CsTLL1* fueron enraizadas. Brotes apicales, en crecimiento activo, de 1,5-2 cm se cultivaron en botes de vidrio de 100 ml (Figura 4A) con 30 ml de medio de enraizamiento que consistió medio mineral GD con los macronutrientes reducidos un tercio, micronutrientes y vitaminas GD completos, 30 g/L de sacarosa y 25 mg/L de AIB (Tabla 7). A las 24 horas (alcornoque) o

Tabla 7. Composición de los medios de cultivo utilizados en el enraizamiento de los brotes axilares de alcornoque y encina.

Componentes	Medio enraizamiento	Medio expresión	Medio pre-infección
Medio basal	1/3 GD	1/3 GD	1/3 GD
Sacarosa (g/L)	30	30	30
Agar Bacto (g/L)	6	7	0
AIB (mg/L)	25	0	0

1/3 GD: medio mineral Gresshoff y Doy (1972) con los macronutrientes reducidos a la tercera parte; GD: medio mineral Gresshoff y Doy (1972); AIB: ácido indol-3-butírico.

48 horas (encina) de cultivo en condiciones estándar, los brotes se transfirieron a botes vidrio de 100 ml con 30 ml de medio de expresión consistente en medio de enraizamiento sin AIB (Tabla 7).

Después de seis semanas de cultivo en condiciones estándar se contabilizó el porcentaje de brotes enraizados y el número medio de raíces por brote enraizado. Para cada línea wt y transgénica de alcornoque y encina se enraizaron 30 explantos (6 explantos por bote) y el experimento se repitió dos veces (60 explantos en total). Cada bote se consideró una repetición DCA.

Las plantas enraizadas destinadas al ensayo de infección *in vitro* fueron transferidas a puentes de papel dentro de tubos de vidrio de 20 x 150 mm cerrados con Kap-uts (Sigma, EEUU) (Figura 5) con 16,5 ml de medio de pre-infección (Tabla 7).



Figura 5. Tubos de vidrio y puentes de papel utilizados en el ensayo de tolerancia frente al oomiceto.

### 3.10.4. Conservación de los cultivos axilares

Una vez obtenidas las plantas enraizadas para los ensayos de tolerancia al oomiceto, los cultivos de brotes axilares de ambas especies fueron conservados mediante el almacenamiento en frío. En

alcornoque, brotes (1-1,5 cm) se pre-cultivaron durante 12 días en condiciones estándar y en tubos de 20 x 150 mm tapados con Kap-uts (Sigma, EEUU), que contenían 16,5 ml de medio GD, 30 g/L sacarosa, 7 g/L agar Bacto (Dickinson and Company, Francia) y 0,2 mg/L de BA (Medio 1, Tabla 6), antes de ser almacenados a 4°C en oscuridad durante un año. En encina, grupos de 2-3 brotes (1-1,5 cm) se pre-cultivaron durante 15 días en condiciones estándar y en jarras de vidrio de 500 ml (Figura 4B) con 70 ml de medio mineral GD, 30 g/L sacarosa, 7 g/L agar Sigma (Sigma-Aldrich, Alemania), 20 µM STS y 0,1 mg/L de BA (Medio 1, Tabla 6), antes de ser almacenados a 4°C en condiciones de semioscuridad durante un año.

### 3.11. ENSAYOS DE TOLERANCIA A *P. CINNAMOMI*

#### 3.11.1. Recuperación y activación de la cepa

La cepa de *Phytophthora cinnamomi* A2, denominada UEX-1, utilizada en los experimentos de tolerancia del presente trabajo de tesis fue aislada a partir de las raíces infectadas de árboles de encina procedentes de Valverde de Mérida (Badajoz) (Corcobado *et al.* 2016). La cepa se mantuvo en medio V8-Agar (Tabla 8) con replicados periódicos cada 1-2 semanas.

Tabla 8. Composición de los medios utilizados para la reactivación del oomiceto, crecimiento del micelio, y para la producción de esporangios de la cepa UEX-1 de *P. cinnamomi*.

Componentes	Medio V8	Solución de sales de Chen y Zentmyer	Solución de hierro
Carbonato Cálcico (g/L)	3	-	-
Zumo V8 clarificado (ml/L)	200	-	-
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O (g/L)	-	2,36	-
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/L)	-	0,986	-
KNO <sub>3</sub> (g/L)	-	0,51	-
Solución de hierro (ml/L)	-	1	-
EDTA (g/L)	-	-	0,13
KOH (g/L)	-	-	0,075
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/L)	-	-	0,049

Solución de sales de Chen y Zentmyer (1970).

Debido a que la cepa puede perder su capacidad de infección con el tiempo, antes de cada experimento de infección se procedió a su reactivación, utilizando una modificación del protocolo establecido por Rial *et al.* (2008). Para ello hojas jóvenes de aguacate se desinfectaron superficialmente con una dilución de hipoclorito 1:10, seguidamente se lavaron con agua estéril, y se cortaron en trozos regulares de 1 cm<sup>2</sup>. Los trozos de hoja se inoculan en una placa Petri desechable (90 cm de diámetro) con 25 ml de agua estéril y con secciones de medio V8 sin antibióticos sobre el que había crecido el micelio del oomiceto.

Las placas se dejaron en oscuridad a 24°C hasta que aparecieron signos de necrosis en los bordes de las hojas. Las hojas con signos de necrosis se observaron al microscopio óptico para confirmar el crecimiento del oomiceto y realizar la identificación morfológica de la cepa. Las hojas, sobre las que había crecido el micelio y con identificación positiva, se aislaron y se colocaron en placas Petri desechables (90 cm de diámetro) con medio V8 (Tabla 8) suplementado esta vez con antibióticos (piramicina (5 µg/ml), rifampicina (25 µg/ml), benomilo (10 µg/ml) y hymexazol (7,4 µg/ml)) para evitar el crecimiento de otros oomicetos, hongos o bacterias. Las placas se incubaron en oscuridad a 24°C hasta que se observó la formación del micelio en el agar alrededor de los trozos de hoja de aguacate. Con la ayuda de un bisturí o un sacabocados se aislaron trozos de 0,5 cm<sup>2</sup> del agar donde se observaba crecimiento y se sembraron en nuevas placas de medio V8 sin antibióticos, donde se dejó crecer al oomiceto hasta la infección.

### 3.11.2. Producción de esporangios

Una vez reactivada la cepa UEX-1, ésta se dejó crecer durante una semana en placas Petri desechables (90 cm de diámetro) con medio V8 sin antibióticos (Tabla 8) en oscuridad a 24°C. De la zona más externa de la placa, donde el crecimiento era más activo, se extrajeron discos de agar de 5 mm con ayuda de un sacabocados

y se pusieron en una placa Petri desechable (90 cm de diámetro) con 25 ml de jugo V8 clarificado (Tabla 8). Tras una incubación durante 24 h en oscuridad a 24°C, el jugo V8 se sustituyó por 25 ml de solución

de sales de Chen y Zentmyer (1970) (Tabla 8) (Rial *et al.* 2008). Seguidamente, se realizaron 4 lavados con la solución de sales cada 30 minutos.

Tras el último lavado, los discos de micelio permanecieron en la placa Petri desechable (90 cm de diámetro), bañados con la solución salina, bajo luz negra a 24°C durante 24 h. La esporulación comenzó aproximadamente 8 h después del último lavado, y alcanzó su cota máxima entre 24 y 36 h del inicio (Figura 6). Tras este período de incubación, se comprobó con la ayuda de una lupa que los esporangios se hubiesen formado correctamente en todos los discos de agar donde crecía el micelio. En ocasiones también se observó la presencia de

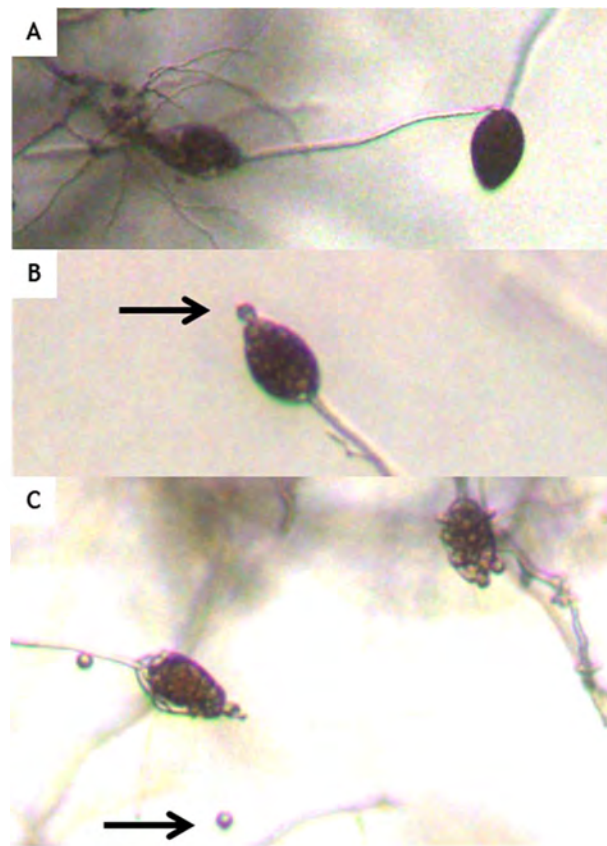


Figura 6. Esporangios de *P. cinnamomi* antes (A) y durante la esporulación (B, C). Las flechas señalan las zoosporas liberadas.

zoosporas vivas (Figura 6). Sin embargo, como el objetivo de este tratamiento era la liberación simultánea de las zoosporas en los tubos de ensayo, cada placa Petri se incubó durante 15-30 min a 4°C, antes de la infección, para inducir la sincronía en la esporulación.

### 3.11.3. Ensayo de tolerancia *in vitro*

#### 3.11.2.1. Ensayo de tolerancia *in vitro* en alcornoque

Tal y como se explicó en el punto 3.10.3 de Material y Métodos, se enraizaron brotes de aproximadamente 2 cm de longitud de las líneas ALM80-wt, ALM6-wt y TGR3-wt de alcornoque y las líneas transformadas con mayor expresión del gen *CsTLL1* (ALM6-tau 1, ALM6-tau 6, ALM80-tau 19, ALM80-tau 20, TGR3-tau 5, TGR3-tau 6, TGR3-tau 18 y TGR3-tau 21). Estos brotes enraizados se cultivaron sobre un puente de papel dentro de tubos de vidrio (Figura 7), y sus raíces se mantuvieron en oscuridad para facilitar su elongación y evitar su oscurecimiento. Después de dos semanas se introdujo en el fondo de cada tubo un disco de micelio con crecimiento de esporangios (Rial *et al.* 2008; Cuenca *et al.* 2010), obtenidos tal y como se describe

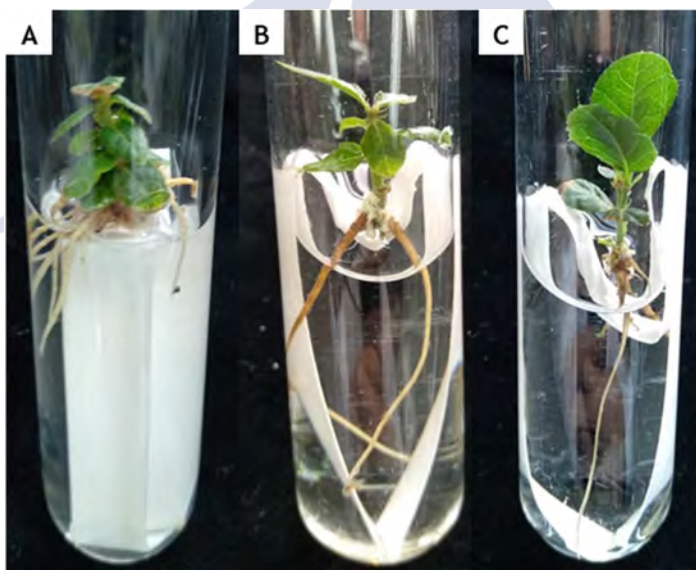


Figura 7. Aspecto de los brotes enraizados de alcornoque antes de la infección. A: Línea ALM6-wt; B: Línea ALM80-wt; C: Línea TGR3-wt.

en el apartado anterior. Cada disco se inoculó con la ayuda de una pinza larga, intentando no tocar las paredes, el papel o el propio brote. Los tubos infectados se mantuvieron en una cámara de cultivo bajo condiciones de temperatura y luz estándar.

En el primer experimento el objetivo fue determinar el grado de incidencia de la enfermedad en los órganos (raíz, tallo y hojas) de las líneas wt y transgénicas de alcornoque con mayor expresión del gen *CsTL1*. La evaluación de la incidencia de la infección se realizó a los 7 y 15 días siguientes de la inoculación, mediante el reaislamiento del patógeno a partir de los órganos de la planta. Para ello, se recuperaron los distintos órganos y se inocularon en placas Petri con medio V8-agar sin antibióticos. Para cada línea, se determinó el porcentaje de reaislamiento en cada uno de los órganos a los 7 y 15 días, calculando el porcentaje de colonias de *P. cinnamomi* que crecían en relación al número de trozos de raíz, tallo y hojas de la planta. Por cada línea wt y transformada de alcornoque se infectaron 6 brotes, y se añadieron tres controles negativos a los que se inoculó agar sin micelio. Cada experimento de infección se realizó tres veces (18 brotes en total por cada línea evaluada).

En un segundo experimento, las mismas líneas fueron infectadas con el objetivo de determinar los días de supervivencia de cada línea frente al patógeno. Este experimento se desarrolló durante un período de 31 días. Se consideraba que una planta estaba muerta cuando órganos se necrosaban al 100%. En ese momento, esas plantas se retiraban del ensayo, siendo sus órganos aislados e inoculados en medio V8 para comprobar que la necrosis se debía a la presencia del patógeno y descartar la muerte por senescencia u otros factores. En este caso, debido a la dificultad de limpiar el micelio, que había crecido por toda la superficie del callo y la parte basal del tallo, sólo se recuperaron las dos hojas más apicales, la porción más apical del tallo, y la zona en crecimiento de la raíz, para comprobar la presencia del oomiceto. Por cada línea wt y transformada de alcornoque se infectaron 6 brotes, y se añadieron tres controles negativos a los que se inoculó agar sin micelio. El experimento de supervivencia se realizó tres veces (18 brotes en total por cada línea evaluada). Las plantas que sobrevivieron 31 días y

mostraban aspecto saludable fueron esterilizadas con una dilución de hipoclorito 1:10 y lavadas con agua estéril antes de proceder al aislamiento de la parte más apical del brote. Para comprobar que preservaban la capacidad de crecimiento se transfirieron al Medio 1 (Tabla 6) descrito en el apartado 3.10.2 de Material y Métodos y utilizado en la proliferación de brotes axilares de alcornoque.

#### 3.11.2.2. Ensayo de la tolerancia *in vitro* en encina

En encina se comparó la capacidad de tolerancia al oomiceto de las líneas Q8-wt, Q8-tau 4, Q8-tau 7, Q8-tau 14, Q8-tau 35 y Q8-tau 36. Las plantas fueron obtenidas mediante el procedimiento de enraizamiento descrito en el apartado 3.10.3 de Material y Métodos. Los brotes obtenidos mediante enraizamiento se depositaron sobre un puente de papel dentro de tubos de vidrio, y sus raíces se mantuvieron en oscuridad para facilitar su elongación y evitar su oscurecimiento (Figura 8).

En el primer experimento el objetivo fue determinar el grado de incidencia de la enfermedad en los órganos (raíz, tallo y hojas) de las líneas wt y transgénicas de encina. Para ello se infectaron plántulas previamente enraizadas de aproximadamente 1,5-2 cm de longitud. La infección se realizó siguiendo la misma metodología descrita para alcornoque (apartado 3.11.3.1. de Material y Métodos).

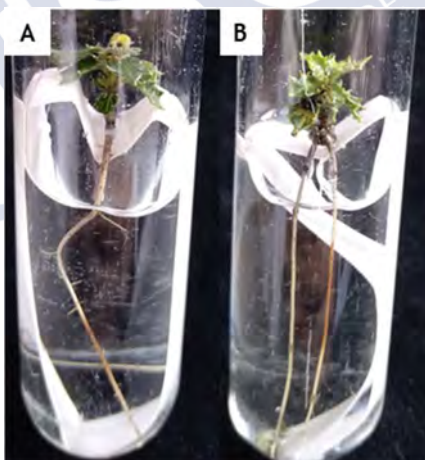


Figura 8. Aspecto de los brotes enraizados de encina antes de la infección. A: Línea Q8-wt; B: Línea Q8-tau 36.

La evaluación de la incidencia de la infección se realizó a los 7 y 15 días siguientes de la inoculación, mediante el reaislamiento del patógeno a partir de los órganos de la planta. Para ello, se recuperaron los órganos y se inocularon en placas Petri con medio V8-agar sin antibióticos. Para cada línea, se calculó el porcentaje de reaislamiento en cada uno de los órganos a los 7 y 15 días, calculando el porcentaje de colonias de *P. cinnamomi* que crecían en relación al número de trozos de raíz, tallo y hojas de la planta. Por cada línea wt y transformada de encina se infectaron 6 brotes, y se añadieron tres controles negativos a los que se inoculó agar sin micelio. Cada experimento de infección se realizó tres veces (18 brotes en total por cada línea evaluada).

En un segundo experimento, las mismas líneas fueron infectadas con el objetivo de determinar los días de supervivencia de cada línea frente al patógeno siguiendo la misma metodología descrita para alcornoque (apartado 3.11.3.1. de Material y Métodos). Por cada línea wt y transformada de encina se infectaron 6 brotes, y se añadieron tres controles negativos a los que se inoculó agar sin micelio. Cada experimento de infección se realizó tres veces (18 brotes en total por cada línea evaluada). Este experimento se desarrolló durante un período de 31 días.

### **3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS Statistics 24 (IBM, EEUU). Cuando los datos se analizaron con un análisis de la varianza (ANOVA) y estos datos son porcentajes, antes del análisis deben de ser transformados mediante la función  $\arcsen\sqrt{x}$  para hacerlos normales. Previamente a la aplicación del ANOVA se determinó la homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene. En los casos en los que el test de homogeneidad de varianza no se cumplió, los datos fueron analizados con el test del Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) o mediante el análisis de Kruskal-Wallis, tal y como se especificará en el apartado correspondiente.

### **3.12.1. Evaluación de la toxicidad de los antibióticos**

El efecto de los diferentes tratamientos de antibióticos bactericidas sobre el porcentaje de explantos con embriogénesis secundaria, y el número de embriones somáticos bipolares por explanto inicial se analizaron mediante ANOVA I.

### **3.12.2. Transformación genética de los embriones somáticos**

En alcornoque, el efecto del genotipo sobre el porcentaje de embriones resistentes a kanamicina y la eficiencia de transformación fueron evaluados mediante el análisis Chi cuadrado con un nivel de significación menor de 0,05 ( $p \leq 0,05$ ). Este tipo de análisis estadístico también se utilizó en encina para estudiar el efecto del tiempo de pre-cultivo y del genotipo sobre el porcentaje de embriones resistentes a kanamicina y la eficiencia de transformación.

### **3.12.3. Expresión del gen *CsTLL1***

En las dos especies, las diferencias en los niveles de expresión del gen *CsTLL1* entre las líneas transgénicas y las líneas no transformadas se evaluaron mediante un ANOVA I. Las diferencias entre las medias se determinaron mediante el test de Duncan para comparaciones múltiples con un nivel de significación menor de 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).

### **3.12.4. Evaluación de la germinación y conversión a planta**

Debido a que no se cumplían las condiciones de homogeneidad de varianzas, los resultados obtenidos en la germinación y conversión a planta en ambas especies se analizaron con el análisis de Kruskal-Wallis con un nivel de significación menor de 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).

### **3.12.5. Evaluación del porcentaje de enraizamiento**

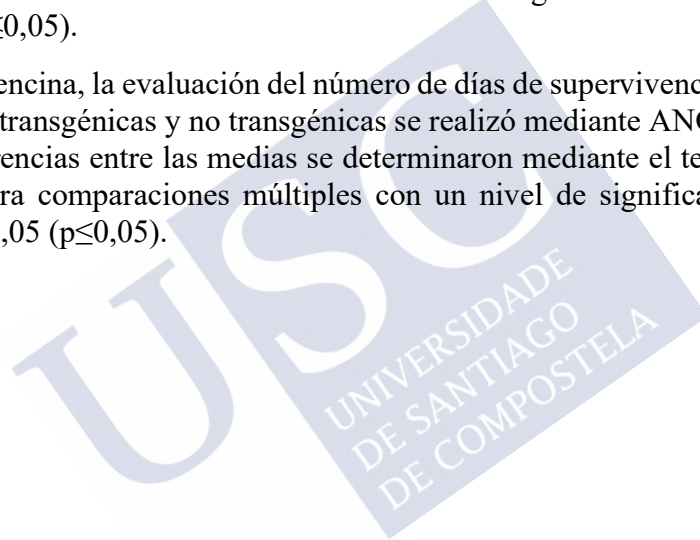
Las diferencias entre los porcentajes de enraizamientos y del número de raíces obtenidas por las líneas de alcornoque y encina transformadas y sin transformar se evaluaron mediante ANOVA I.

### **3.12.6. Evaluación de la tolerancia a *P. cinnamomi***

En ambas especies, la evaluación del grado de incidencia del oomiceto en los diferentes órganos aislados de las plantas transgénicas y no transgénicas infectados y recolectados a los 7 y 15 días de la infección se realizó mediante ANOVA I.

En alcornoque, la evaluación del número de días de supervivencia de las líneas ALM6, ALM80 y TGR3 se realizó comparando las líneas transformadas con sus controles sin transformar mediante ANOVA I. Las diferencias entre las medias se determinaron mediante el test de Duncan para comparaciones múltiples con un nivel de significación menor de 0,05 ( $p \leq 0,05$ ). Posteriormente, todas las líneas transformadas y no transformadas de alcornoque (ALM6, ALM80 y TGR3) se compararon entre sí. Debido a que no se cumplían las condiciones de homogeneidad de varianzas, este análisis se realizó mediante el test de Kruskal-Wallis con un nivel de significación menor de 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).

En encina, la evaluación del número de días de supervivencia de las plantas transgénicas y no transgénicas se realizó mediante ANOVA I. Las diferencias entre las medias se determinaron mediante el test de Duncan para comparaciones múltiples con un nivel de significación menor de 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).



## 4. RESULTADOS





**4.1. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS ANTIBIÓTICOS**

**4.1.1. Alcornoque**

Como paso previo a los experimentos de transformación, se evaluó el grado de toxicidad que la kanamicina tenía sobre los embriones somáticos de las líneas ALM80 y TGR3 con el objetivo de determinar la dosis letal de kan necesaria para seleccionar los eventos transformados (Figura 9 y 10). Después de ocho semanas de cultivo con diferentes concentraciones de kan, se observó que la toxicidad a la kan varió en función del genotipo (Figura 9 y 10). La concentración de kan afectó al porcentaje de embriones que desarrollaban embriogénesis secundaria, pero especialmente en la línea ALM80. Los embriones de esta línea mostraron ser más sensibles a kan, ya que con concentraciones de 25-50 mg/L el porcentaje de embriogénesis somática secundaria se redujo por debajo del 40%, y concentraciones de kan superiores a 75 mg/L resultaron ser tóxicas, inhibiendo la proliferación mediante embriogénesis secundaria de los embriones (Figura 9). El número de embriones bipolares por placa se redujo

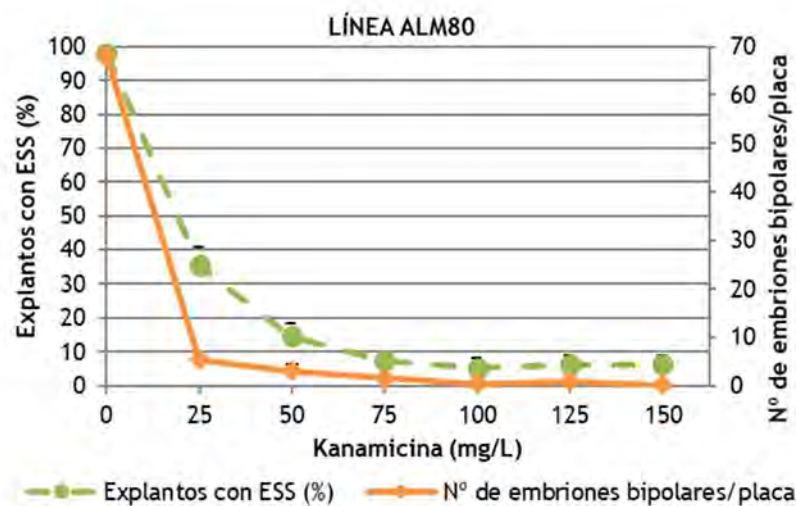


Figura 9. Evaluación del efecto causado por diferentes concentraciones de kanamicina sobre el porcentaje de embriogénesis somática secundaria (ESS) y sobre el número de embriones bipolares por placa en la línea ALM80. Cada valor representa la media  $\pm$  error estándar de 8 repeticiones. Las semibarras representan el error estándar.

drásticamente ya con concentraciones muy bajas de kan (25 mg/L), y es 0 con concentraciones iguales o superiores a 100 mg/L (Figura 9).

La línea TGR3 resultó ser menos sensible a kan que la línea ALM80. El porcentaje de ESS se redujo por debajo del 50% con concentraciones de kan iguales o superiores a 75 mg/L, alcanzándose la concentración letal de kan a partir de 125 mg/L (Figura 10). Sin embargo, en esta línea el número de embriones bipolares por placa, que de por sí era mucho más bajo que en la línea ALM80 se redujo a cero con la concentración más baja de kan (25 mg/L) (Figura 10).

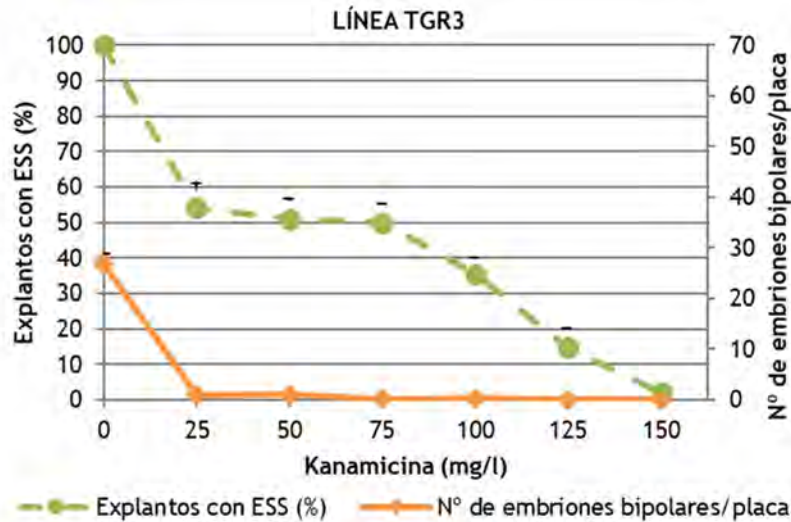


Figura 10. Evaluación del efecto causado por diferentes concentraciones de kanamicina sobre el porcentaje de embriogénesis somática secundaria (ESS) y sobre el número de embriones bipolares por placa en la línea TGR3. Cada valor representa la media  $\pm$  error estándar de 8 repeticiones. Las semibarras representan el error estándar.

En ambas líneas, al alcanzarse las concentraciones tóxicas de kan, los embriones se necrosaban y morían, o bien adquirían un color blanquecino y no había signos de proliferación. De acuerdo con estos resultados, para los experimentos de transformación de las líneas embriogénicas de alcorcho, se utilizaron medios suplementados con kan en concentraciones de 125 mg/L.

En el segundo experimento se evaluó la toxicidad que podrían ejercer sobre la proliferación de los embriones somáticos de alcorcho

dos antibióticos bactericidas, carbenicilina y cefotaxima, utilizados para inhibir el crecimiento de *Agrobacterium* en el medio de cultivo tras la transformación genética. Se testaron diferentes concentraciones y combinaciones de ambos antibióticos (Tabla 9), y se evaluó igualmente su efecto sobre el porcentaje de embriogénesis secundaria y el número de embriones bipolares por placa.

En primer lugar, se observó que el porcentaje de explantos con ESS en las líneas embriogénicas ALM80 y TGR3 no estaba afectado, ni por la combinación de antibióticos bactericidas, ni por su concentración (Tabla 9). Sin embargo, se apreciaron diferencias al contabilizar el número de embriones bipolares por placa. En la línea TGR3, que de por sí mostraba menor número de embriones bipolares que la línea ALM80 el número de embriones se redujo ligeramente en todas las combinaciones, excepto cuando el medio se suplementó con 300 mg/L de carbenicilina, aunque sin que se observen diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Tabla 9).

**Tabla 9. Efecto de diferentes combinaciones de antibióticos bactericidas sobre la proliferación de embriones somáticos de las líneas embriogénicas TGR3 y ALM80.**

Bactericida (mg/L)	Explantos con ESS (%)		Nº explantos bipolares/placa	
	TGR3	ALM80	TGR3	ALM80
0	100,0±0,0	98,4±1,5	20,5±0,7	71,3±3,3
CF 200	100,0±0,0	98,4±1,5	19,6±0,5	55,5±3,7
CF 300	100,0±0,0	100,0±0,0	18,5±1,0	48,5±2,6
CB 300	100,0±0,0	98,4±1,5	20,5±0,4	85,0±9,7
CF 200 + CB 200	100,0±0,0	100,0±0,0	18,0±0,8	68,3±6,4
CF 200 + CB 300	100,0±0,0	90,6±2,9	18,3±0,8	46,4±3,2
F-test	ns	ns	ns	p≤0,05

Cada valor representa la media ± el error estándar de 8 repeticiones. ESS: embriogénesis somática secundaria; CF: cefotaxima; CB: carbenicilina; ns: no significativo.

En la línea ALM80 el tipo de antibiótico bactericida afectó significativamente ( $p \leq 0,05$ ) al número de embriones bipolares. Los mejores resultados se obtuvieron con medio de cultivo suplementado con 300 mg/L de carbenicilina. En este tratamiento el número de embriones bipolares por placa aumentaba significativamente, incluso

por encima de los valores obtenidos en medio control sin antibiótico (Tabla 9).

En ambas líneas, los embriones presentaban un aspecto más vigoroso y saludable cuando se cultivaban en presencia de 300 mg/L de carbenicilina que cuando se dejaban crecer en medio con otras concentraciones de este antibiótico. Por el contrario, la cefotaxima mostró un efecto adverso sobre la proliferación de los embriones, ya que estos amarilleaban y reducían su capacidad de proliferación. Esto también ocurría cuando los dos bactericidas estaban presentes en el medio de cultivo, incluso cuando se evaluaron diferentes concentraciones de los mismos. Por ello, el uso de la cefotaxima se descartó en los siguientes experimentos en detrimento de 300 mg/L de carbenicilina

#### **4.1.2. Encina**

Para evaluar la toxicidad de la kan en la proliferación de ES de encina, y determinar su dosis letal, PEMs de la línea Q8 se cultivaron con diferentes concentraciones de kan (Figura 11). A las 8 semanas de cultivo, se observó que el porcentaje de explantos con ESS se reducía gradualmente a medida que aumentaba la concentración de kan. Concentraciones de kan iguales o superiores a 100 mg/L reducían el porcentaje de ESS por debajo del 50% (Figura 11). Al igual que sucedió en alcornoque, en concentraciones tóxicas de kan, los embriones de encina adquirían color marrón o permanecían de color blanquecino y dejaban de proliferar. El número de embriones bipolares por placa también disminuyó con el aumento de la concentración del antibiótico, siendo cero con concentraciones de kan iguales y superiores a 100 mg/L. Por ello, esta concentración se seleccionó como dosis de selección en los experimentos de transformación de encina.

Por otro lado, al igual que sucedió con los ES de alcornoque, la presencia de carbenicilina (300 mg/L) tuvo efectos beneficiosos sobre

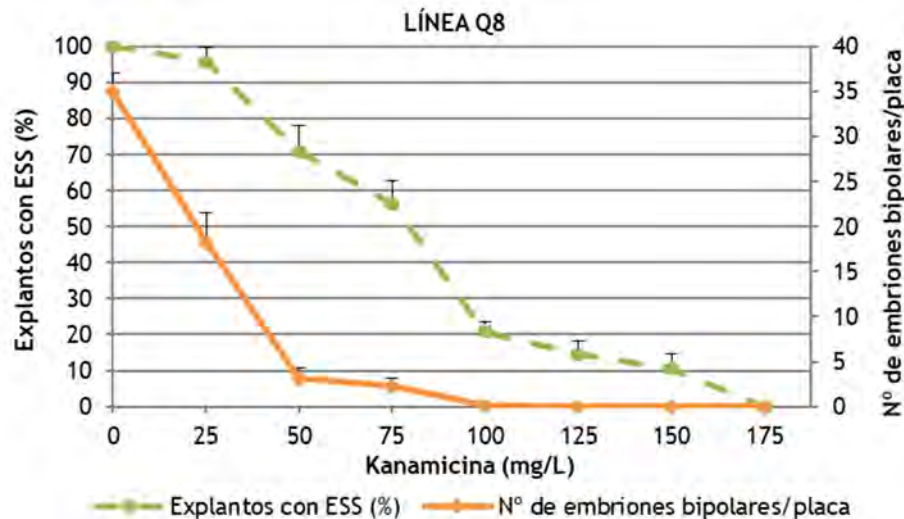


Figura 11. Evaluación del efecto causado por diferentes concentraciones de kanamicina sobre el porcentaje de embriogénesis somática secundaria (ESS) y sobre el número de embriones bipolares por placa en la línea Q8. Cada valor representa la media  $\pm$  error estándar de 8 repeticiones. Las semibarras representan el error estándar.

el crecimiento de los embriones somáticos de encina, y su presencia aumentó el número de embriones bipolares en comparación con el medio control sin carbenicilina (48,38 ES/placa *versus* 35 ES/placa). Por el contrario, la misma concentración de cefotaxima resultó ser tóxica para los embriones somáticos de encina, y su presencia en el medio provocó la necrosis y muerte de los mismos (datos no mostrados).

## 4.2. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS

### 4.2.1. Transformación genética en alcornoque

En experimentos preliminares en los que se utilizó medio SH para el aislamiento de los embriones somáticos y co-cultivo con *Agrobacterium*, se observó que la bacteria crecía lentamente, y como consecuencia, con esas condiciones no se logró la transformación de los embriones somáticos de alcornoque. Por eso, en los siguientes experimentos se utilizó el medio MS con los macronutrientes reducidos a la mitad para el aislamiento y co-cultivo (Tabla 1). Este medio ya había ofrecido buenos resultados para el crecimiento de *Agrobacterium*

en la transformación genética de roble y castaño. Los ES se pre-cultivaron un día en ese medio y se co-cultivaron 5 días con la bacteria.

En esas condiciones, se obtuvo la transformación genética en las tres líneas de alcornoque evaluadas. Los dos parámetros evaluados están afectados significativamente ( $p \leq 0,05$ ) por el genotipo (Figura 12).

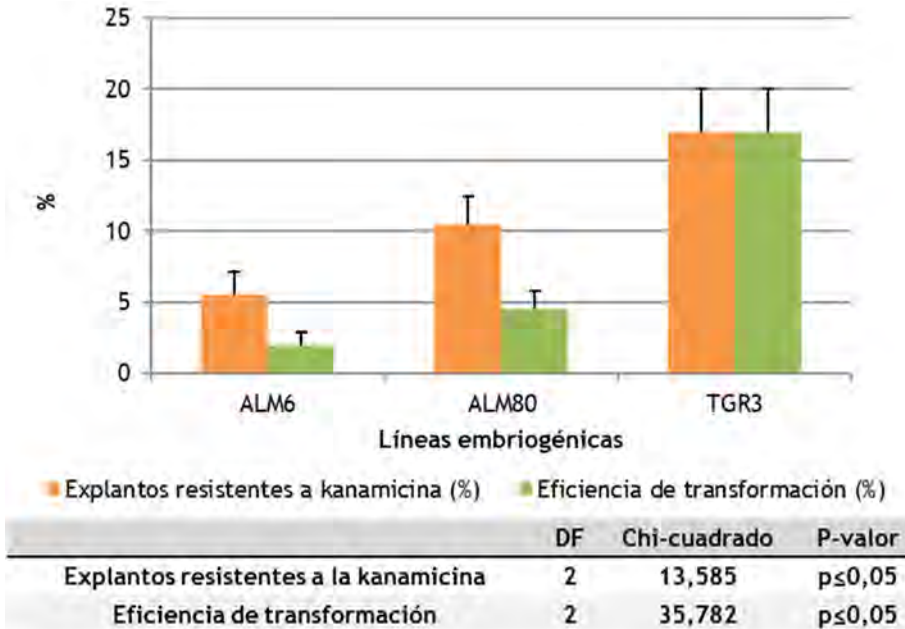


Figura 12. Efecto del genotipo en el porcentaje de explantos kan-resistentes y en la eficiencia de la transformación de embriones somáticos de alcornoque transformados con la cepa EHA105pK7WG2D-TAU. Cada columna representa la media  $\pm$  error estándar de 10 repeticiones. Las semibarras representan el error estándar.

En las tres líneas se obtuvieron explantos resistentes a la kanamicina, pero la línea con mayor porcentaje fue TGR3 (17%). Los embriones resistentes de este genotipo aparecían tras 4 semanas de cultivo en medio selectivo, y en general el explanto diana presentó mejor aspecto y menor nivel de necrosis que los explantos iniciales de ALM6 y ALM80 (Figura 13). En la línea ALM80 se obtuvo un 10,5% de explantos resistentes a kan, mientras que en ALM6 se obtuvo un porcentaje del 5,5% (Figura 12). En las líneas ALM6 y ALM80 la aparición de ES resistentes a la kan era más lenta que en la línea TGR3,

y los primeros eventos se observaron tras 8 semanas de cultivo en medio de selección, y normalmente en menor número que en TGR3. Los controles negativos (explantos no transformados pero cultivados en medio de selección) se necrosaron y murieron sin formar callo o embriones somáticos.

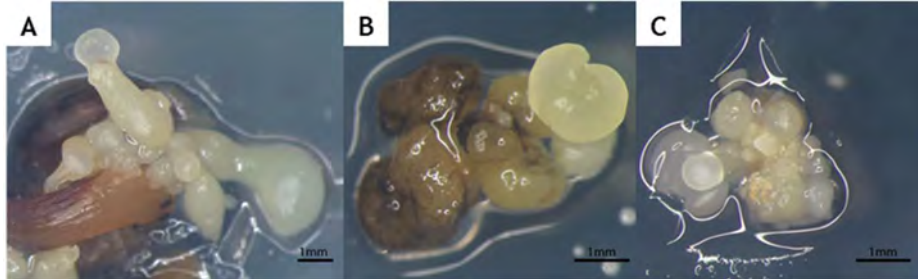


Figura 13. Aspecto del explanto diana y de los embriones somáticos resistentes a kan de las líneas ALM6 (A), ALM80 (B) y TGR3 (C) desarrollados en medio de selección de alcornoque 10 semanas después de la transformación.

Tras diez semanas en medio de selección con 125 mg/L de kan, los explantos resistentes a kan (Figura 13) se aislaron y se transfirieron a medio de selección, pero suplementado con 150 mg/L de kan para aumentar la presión de selección. Tras cuatro semanas de cultivo en esas condiciones, se determinó la eficiencia de transformación en base a la fluorescencia de los embriones. Así, la eficiencia de transformación se definió como el porcentaje de explantos iniciales que mostraban expresión de *GFP* (Figura 14). De modo similar a lo observado con el porcentaje de explantos resistentes a la kan, también se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en la eficiencia de transformación debidas al genotipo (Figura 12). La línea TGR3 mostró el mismo porcentaje de eficiencia de transformación que se había obtenido para la resistencia frente a kan (17%). Sin embargo, en las líneas ALM80 y ALM6 se obtuvieron menores porcentajes de eficiencia de transformación que de porcentaje de explantos resistentes a la kan (4,5% y 2%, respectivamente) (Figura 12).

Para establecer las líneas embriogénicas putativamente transformadas, se aisló un embrión en estado cotiledonar que mostrase expresión *GFP* en toda su superficie (véanse explantos *GFP+* en la

Figura 14 A-C), descartándose los embriones que no eran totalmente fluorescentes (Figura 14 D).

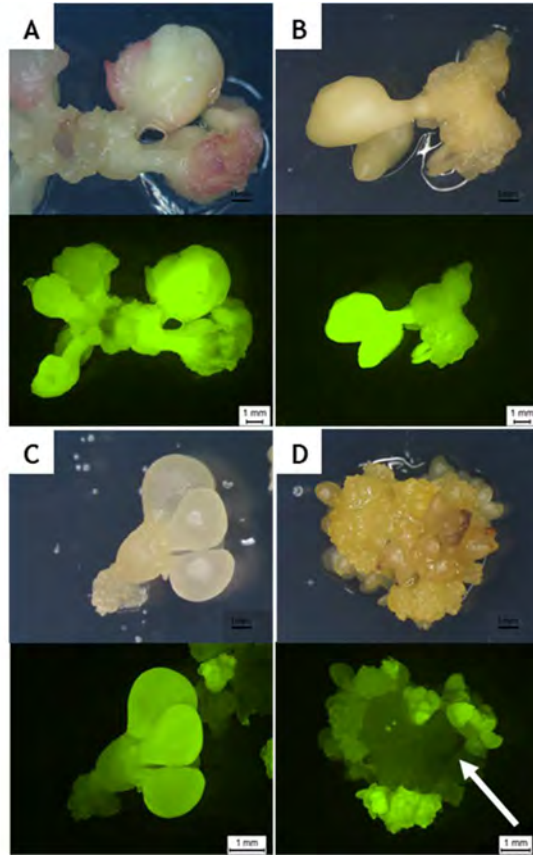


Figura 14. Expresión *GFP* en embriones somáticos de alcornoque transformados. A, B, C: Embriones somáticos observados con luz blanca (fila superior) y los mismos embriones observados con luz ultravioleta (fila inferior). A: Línea ALM6; B: Línea ALM80; C: Línea TGR3. D: Embrión quimera, en el que se observa tejido sin transformar (flecha).

Los embriones seleccionados se proliferaron de forma independiente en medio de selección, para establecer las diferentes líneas transgénicas. En total se obtuvieron 30 líneas transgénicas, 4

líneas a partir de ALM6, 7 líneas a partir de ALM80 y 19 líneas a partir de TGR3, que se mantuvieron mediante embriogénesis secundaria.

#### 4.2.2. Transformación genética en encina

En los primeros experimentos de transformación, PEMs aisladas de la línea Q8 de encina fueron pre-cultivadas durante un día antes de ser co-cultivadas durante 5 días con la cepa EHA105pK7WG2D-TAU, para transferirse posteriormente a un medio de selección suplementado con 100 mg/L de kan. Sin embargo, todos los explantos se necrosaron y ninguno sobrevivió en este experimento.

Por ello, en los siguientes experimentos de transformación se modificó la concentración de kan en el medio, optando por un gradiente creciente de antibiótico hasta alcanzar la concentración letal previamente determinada y se evaluó el efecto del pre-cultivo sobre las PEMs. Así, se redujo la concentración de kan a 75 mg/L durante las dos primeras semanas de cultivo en medio de selección, y se evaluaron tres periodos de pre-cultivo (un día, una semana y dos semanas) (Figura 15).

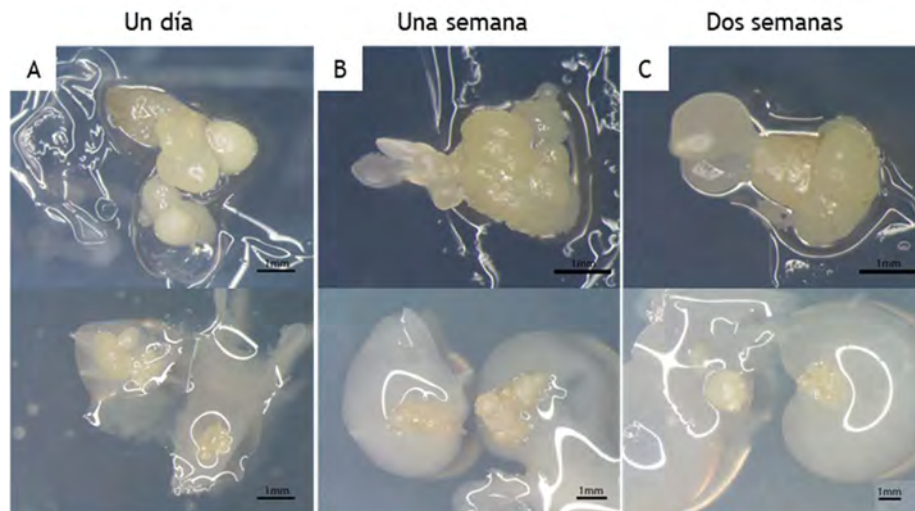


Figura 15. Aspecto de los explantos de encina pre-cultivados durante un día (A), una semana (B) y dos semanas (C) (fila superior) y después de 5 días de co-cultivo con *Agrobacterium* (fila inferior).

Tras diez semanas de cultivo, se observaron explantos resistentes a kan en todos los tiempos de pre-cultivo (Figura 16). Los mayores

porcentajes de explantos kan-resistentes (8,5%) se obtuvieron con una semana de pre-cultivo, aunque sin diferencias significativas (Figura 16). Los controles negativos (explantos no transformados pero cultivados en medio de selección) se necrosaron y murieron sin formar callo o embriones somáticos, al igual que ocurrió en la transformación de alcornoque.

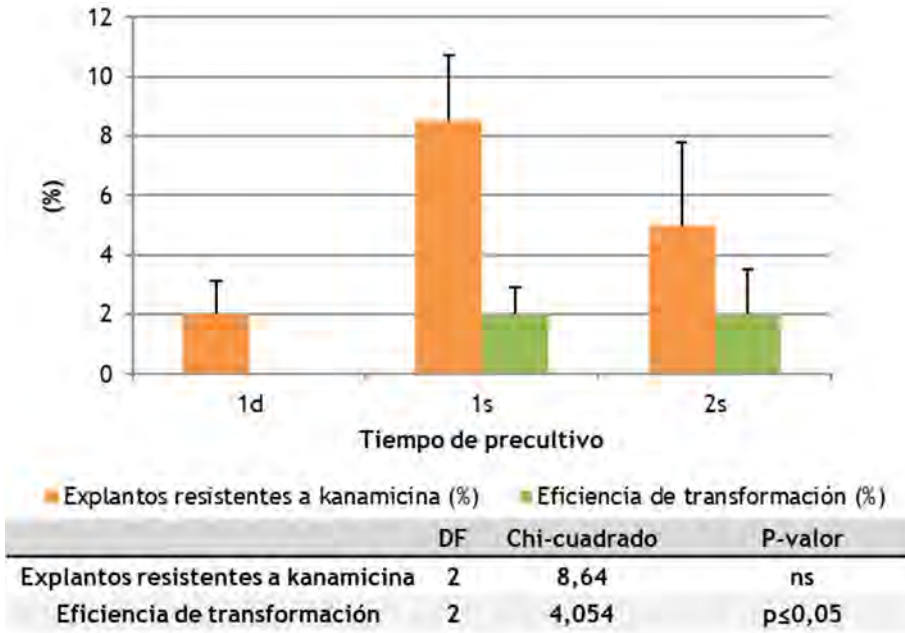


Figura 16. Efecto del tiempo de pre-cultivo en el porcentaje de explantos kan-resistentes y en la eficiencia de la transformación de embriones somáticos de la línea Q8 de encina transformados con la cepa EHA105pK7WG2D-TAU. Cada columna representa la media ± error estándar de 12 repeticiones. Las semibarras representan el error estándar.

Los explantos resistentes a kanamicina se aislaron y se subcultivaron durante 4 semanas en medio de selección para continuar con su crecimiento. La concentración de kan del medio de selección se aumentó de 100 mg/L a 125 mg/L semanas para aumentar la presión selectiva.

## RESULTADOS

Tras cuatro semanas de cultivo (14 semanas en total) se calculó la eficiencia de transformación, definida como el porcentaje de explantos iniciales que mostraban expresión de *GFP*. La eficiencia de transformación estuvo afectada significativamente ( $p \leq 0,05$ ) por el tiempo de pre-cultivo (Figura 16). En encina sólo aquellos explantos que habían tenido una o dos semanas de pre-cultivo mostraron expresión de *GFP* (Figura 17), y la eficiencia de transformación fue de 2% en ambos casos (Figura 16). No hubo eventos positivos de transformación en los explantos con un día de pre-cultivo. Aunque los tiempos de pre-cultivo de una y dos semanas mostraron idénticos porcentajes de eficiencia de transformación, el protocolo de transformación era más rápido si se utilizaba sólo una semana de pre-cultivo, por lo tanto, este tiempo de pre-cultivo se estableció para evaluar el efecto del genotipo en la transformación genética de encina.

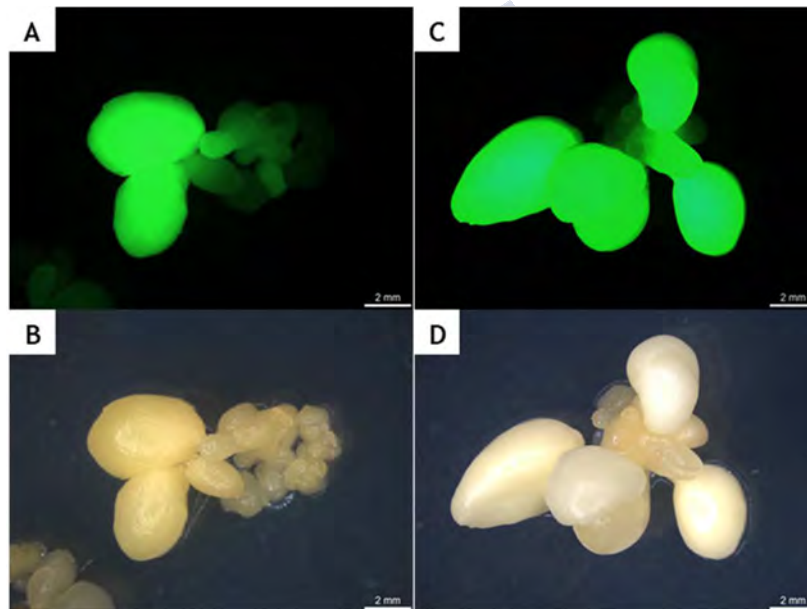
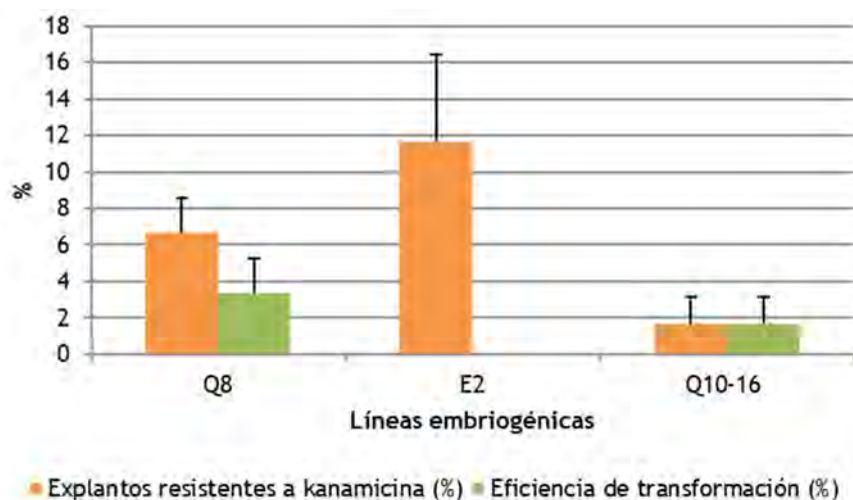


Figura 17. Expresión *GFP* en embriones somáticos transformados de encina, observados bajo luz ultravioleta (A, C) y los mismos embriones observados con luz blanca (B, D). A, B: Línea Q8-tau 7; C, D: Línea Q8-tau 35.

Para la evaluación del efecto del genotipo se aislaron PEMs de tres líneas embriogénicas diferentes (Q8, Q10-16 y E2) y se pre-cultivaron durante una semana antes de co-cultivarlas durante 5 días con EHA105pK7WG2D-TAU. Tras 10 semanas de cultivo en medio de selección, el mayor porcentaje de explantos kan-resistentes se obtuvo en la línea E2 (11,67%) (Figura 16). Sin embargo, todos los explantos aislados de la línea E2 necrosaron gradualmente en las siguientes 4 semanas de cultivo, y finalmente murieron sin mostrar nuevo crecimiento. Por el contrario, los explantos kan-resistentes de las líneas Q8 (6,67%) y Q10-16 (1,66%) continuaron creciendo con buenas tasas de proliferación (Figura 18).



	DF	Chi-cuadrado	P-valor
Explantos resistentes a kanamicina	2	4,821	ns
Eficiencia de transformación	2	2,034	ns

Figura 18. Efecto del genotipo en el porcentaje de explantos kan-resistentes y en la eficiencia de transformación de tres líneas embriogénicas de encina. Cada columna representa la media  $\pm$  error estándar de 6 repeticiones. Las semibarras representan el error estándar.

La eficiencia de transformación también estuvo afectada por el genotipo, aunque sin diferencias significativas (Figura 18). Los mejores porcentajes de transformación se obtuvieron con la línea Q8 (3,33%),

mientras que en la línea Q10-16 la eficiencia de transformación fue de 1,66%.

Un embrión en estado cotiledonar se aisló de cada explanto con expresión *GFP* (Figura 17), y se proliferó de forma independiente en medio de selección, para establecer las diferentes líneas transgénicas de encina. Se obtuvieron 11 líneas transgénicas, 10 líneas a partir de la línea Q8 y una línea a partir de la línea Q10-16, que se mantuvieron mediante embriogénesis secundaria.

La multiplicación mediante embriogénesis secundaria fue exitosa en todas las líneas transgénicas establecidas a partir de embriones somáticos de alcornoque y encina, y estas presentaron buenas tasas de proliferación (datos no mostrados). Si se comparan los resultados de las dos especies, se observa que la eficiencia de transformación en alcornoque fue mayor que en encina, y además se consiguieron transformar genéticamente todas las líneas embriogénicas de alcornoque testadas, mientras que en encina sólo se logró en dos de las tres líneas testadas.

### **4.3. CONFIRMACIÓN DE LA PRESENCIA DE LOS GENES MEDIANTE PCR**

#### **4.3.1. Alcornoque**

Para confirmar la presencia de los transgenes en las líneas putativamente transformadas de alcornoque, estas fueron analizadas mediante PCR (Figura 19). La presencia de los tres transgenes (*NPTII*, *GFP* y *CsTLI*) se corroboró en todas las líneas de alcornoque evaluadas y también en el plásmido (control positivo), pero no en las líneas sin transformar (wt). La presencia del gen *CsTLI* se confirmó en los dos sentidos transcripcionales.

En total se han analizado 18 líneas transgénicas de las 30 obtenidas, lo que representa un 60% de las líneas obtenidas. En el genotipo ALM6 se analizaron 3 de las 4 líneas obtenidas, es decir se analizó el 75% de las líneas transgénicas obtenidas: ALM6-tau 1, ALM6-tau 6 y ALM6-tau 12 (Figura 19 A). En el genotipo ALM80 se analizaron 3 de las 7 líneas obtenidas, es decir se analizó el 43% de las líneas transgénicas obtenidas: ALM80-tau 13, ALM80-tau 19 y ALM80-tau 20 (Figura 19

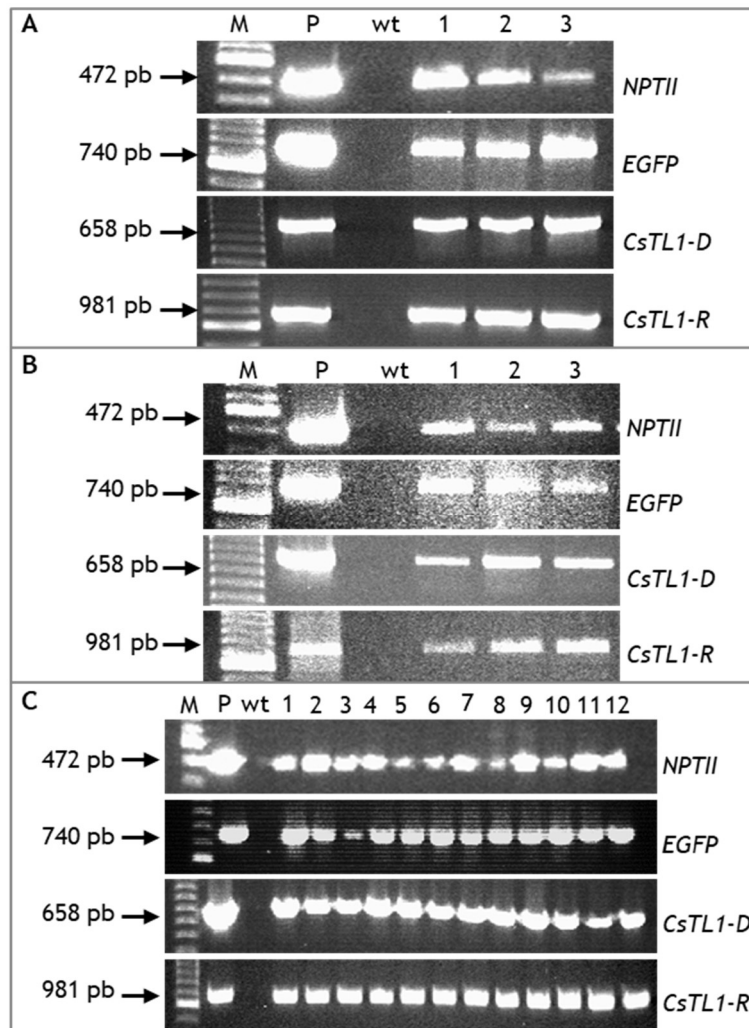


Figura 19. Confirmación mediante amplificación por PCR de la presencia de los genes *NPTII*, *EGFP*, *CsTL1-D* y *CsTL1-R* en las líneas de alcornoque transformadas. A: Amplificación de los transgenes en las líneas ALM6. B: Amplificación de los transgenes en las líneas ALM80. C: Amplificación de los transgenes en las líneas TGR3. M: marcador de peso molecular de 100 pb; P: plásmido; wt: línea no transformada; calles 1-12: líneas transformadas.

B). Por último, en el genotipo TGR3 se analizaron 12 de las 19 líneas obtenidas, es decir se analizó el 63% de las líneas transgénicas generadas: TGR3-tau 2, TGR3-tau 4, TGR3-tau 5, TGR3-tau 6, TGR3-

tau 9, TGR3-tau18, TGR3-tau 21, TGR3-tau 23, TGR3-tau 34, TGR3-tau 36, TGR3-tau 42 y TGR3-tau 45 (Figura 19 C).

#### 4.3.2. Encina

En encina se analizaron por PCR todas las líneas transgénicas obtenidas, dado que su número fue menor que en alcornoque (Figura 20). De forma similar al alcornoque, la presencia de los tres transgenes (*NPTII*, *GFP* y *CsTL1*) se confirmó en todas las líneas transgénicas analizadas y en el plásmido (control positivo), pero no en las líneas sin transformar (wt). La presencia del gen *CsTL1* se confirmó en los dos sentidos transcripcionales (Figura 20).

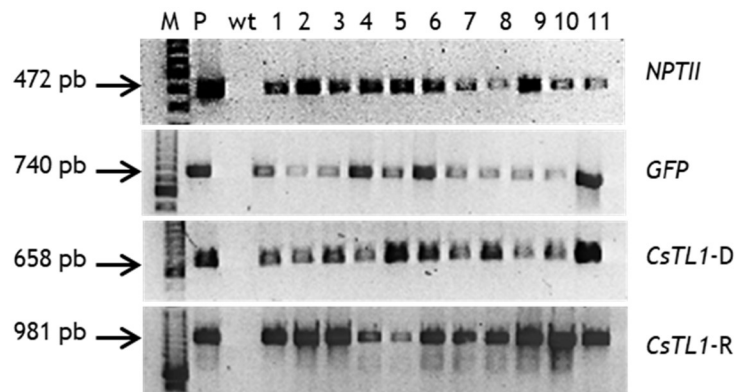


Figura 20. Confirmación mediante amplificación por PCR de la presencia de los genes *NPTII*, *EGFP*, *CsTL1-D* y *CsTL1-R* en las líneas de encina transformadas. M: marcador de peso molecular de 100 pb; P: plásmido; wt: línea no transformada; calles 1-10: amplificación de las líneas transformadas de Q8; calle 11: amplificación de la línea transformada de Q10-16.

En Q8, se analizaron 10 líneas transgénicas (Q8-tau 4, Q8-tau 5, Q8-tau 7, Q8-tau 14, Q8-tau 17, Q8-tau 25, Q8-tau 26, Q8-tau 35, Q8-tau 36 y Q8-tau 38), mientras que en la línea Q10-16 se analizó la única línea transformada obtenida, Q10-16-tau 1.

#### 4.4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DEL GEN *CsTL1*

La expresión del gen *CsTL1* en las líneas embriogénicas transgénicas de alcornoque y encina se realizó mediante qPCRrt. En el análisis se utilizaron tres genes (actina, tubulina y factor de elongación) como controles endógenos.

#### 4.4.1. Alcornoque

En alcornoque, se analizaron por qPCRrt las 18 líneas transgénicas que previamente habían sido analizadas mediante PCR y que además, de forma paralela, habían sido regeneradas con éxito. Debido a que en alcornoque se usaron tres genotipos diferentes, cada uno se analizó por separado, tomando como control la línea correspondiente sin transformar.

En el genotipo ALM6 se analizaron tres líneas transgénicas (ALM6-tau 1, ALM6-tau 6, ALM6-tau 12) junto con la línea no transformada (ALM6-wt). Se comprobó la sobre-expresión de *CsTL1* en todas las líneas putativamente transformadas, aunque sus niveles de expresión variaron en función de la línea (Figura 21). Los niveles de expresión de la línea ALM6-tau 6 fueron significativamente ( $p \leq 0,05$ ) mayores (29,2) que los de las líneas ALM6-tau 1 (14,02) y ALM6-tau 12 (13,37) (Figura 21). Alm6-tau 1 y tau12 no mostraron diferencias significativas entre sus niveles de expresión.

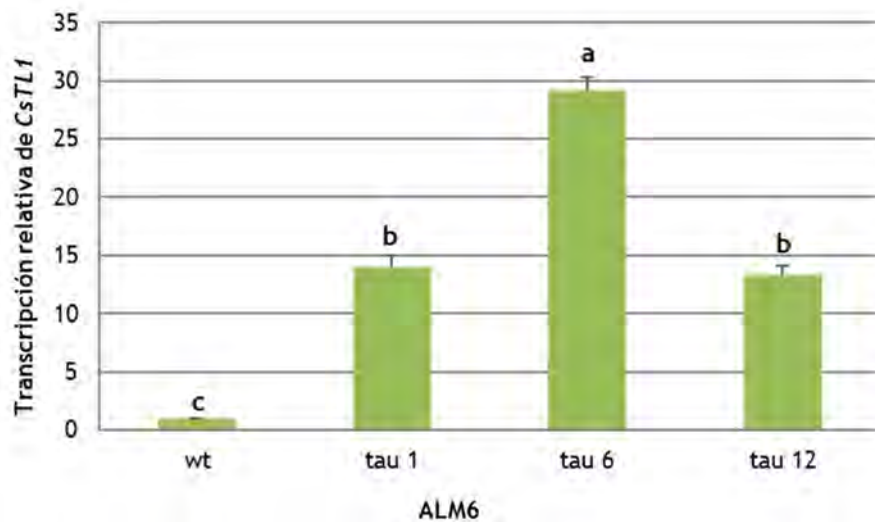


Figura 21. Expresión relativa del gen *CsTL1* en las líneas transgénicas derivadas de la línea ALM6 de alcornoque. Los datos corresponden a medias  $\pm$  error estándar de tres repeticiones. Las semibarras representan el error estándar. Las columnas con la misma letra no difieren significativamente para una  $p=0,05$  (test Duncan).

En el genotipo ALM80 se analizaron tres líneas transgénicas (ALM80-tau 13, ALM80-tau 19 y ALM80-tau 20) junto con la línea no transformada (ALM80-wt). Se confirmó la sobre-expresión de *CsTL1* en todas las líneas putativamente transformadas, aunque sus niveles de expresión fueron variables (Figura 22). Estos fueron significativamente ( $p \leq 0,05$ ) mayores en las líneas ALM80-tau 19 (24,9) y ALM80-tau 20 (22,9), que en la línea ALM80-tau 13 (12,42) (Figura 22).

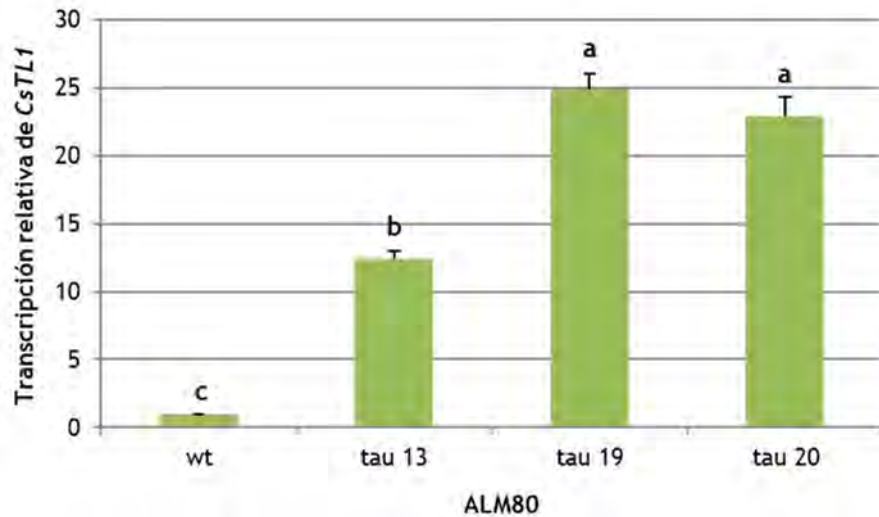


Figura 22. Expresión relativa del gen *CsTL1* en las líneas transgénicas derivadas de la línea ALM80 de alcornoque. Los datos corresponden a medias  $\pm$  error estándar de 3 repeticiones. Las semibarras representan el error estándar. Las columnas con la misma letra no difieren significativamente para una  $p=0,05$  (test Duncan).

En el genotipo TGR3 se analizaron 12 líneas transformadas (TGR3-tau 2, tau 4, tau 5, tau 6, tau 9, tau 18, tau 21, tau 23, tau 34, tau 36, tau 42, y tau 45) junto con la línea control no transformada (TGR3-wt). La sobre-expresión del gen *CsTL1* fue confirmada en todas las líneas transgénicas, aunque los niveles de expresión variaron en función de la línea (Figura 23). Las líneas que mostraron significativamente ( $p \leq 0,05$ ) mayor nivel de expresión del gen fueron TGR3-tau 21 (5,43), TGR3-tau 5 (2,66), TGR3-tau 6 (2,47) y TGR3-tau 18 (2,4). En siguiente lugar, aunque sin diferencias significativas, también mostraron sobre-expresión las líneas TGR3-tau 34 (1,99), TGR3-tau 45 (1,72), TGR3-tau 23 (1,65) y TGR3-tau 2 (1,37) y TGR3-tau 9 (1,35).

Por último, tres líneas mostraron un nivel de expresión igual o ligeramente mayor que la línea control: TGR3-tau 4 (1,31), TGR3-tau 36 (1,23) y TGR3-tau 42 (1,17).

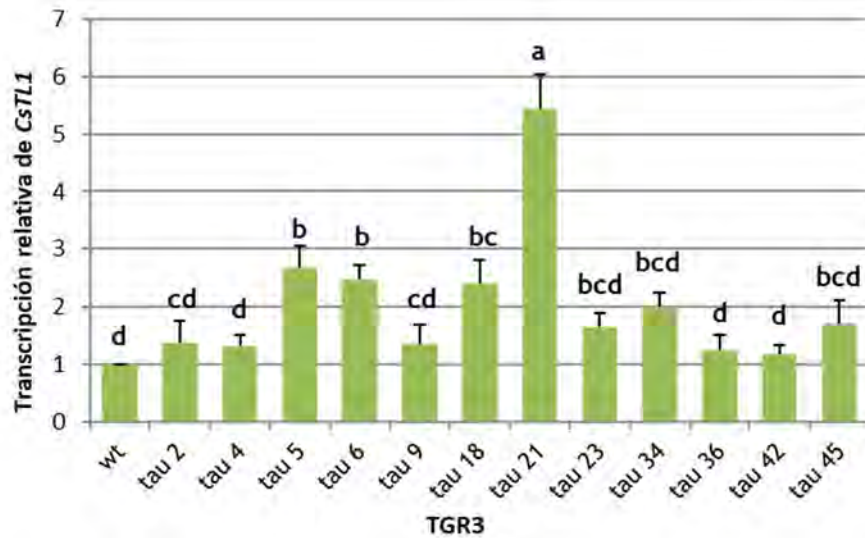


Figura 23. Análisis de la expresión del gen *CsTL1* en las líneas transgénicas derivadas de la línea TGR3 de alcornoque. Los datos corresponden a medias  $\pm$  error estándar de 3 repeticiones. Las semibarras representan el error estándar. Las columnas con la misma letra no difieren significativamente para una  $p=0,05$  (test Duncan).

En total se ha analizado la expresión de 18 líneas transgénicas en alcornoque de las cuales 15 sobre-expresan el gen *CsTL1*, lo que representa el 83,33% de total de líneas obtenidas. Se han observado importantes diferencias entre los niveles de expresión del gen *CsTL1* entre los diferentes genotipos. Esto podría ser debido a las diferencias en la expresión de la taumatina endógena de cada una de las líneas wt. En concreto, la línea TGR3-wt muestra una expresión basal de taumatina mayor que ALM6-wt y ALM80-wt, y casi tan alta como las líneas transformadas de esos genotipos (datos no mostrados). Curiosamente, el lugar de procedencia de estos dos últimos genotipos es distinto al de TGR3. Esto explicaría por qué las líneas transformadas de TGR3 tienen una expresión relativa del gen *CsTL1* más baja (1,35-5,43) con relación a su wt, que las líneas transformadas de ALM6 (13,37-29,2) y ALM80 (12,42-24,9), ya que en estas últimas hay mayor

diferencia entre los niveles de expresión de las líneas transformadas y sin transformar.

#### 4.4.2. Encina

Debido a que en encina se usaron dos genotipos diferentes, cada uno se analizó por separado, tomando como control la línea correspondiente sin transformar.

En el genotipo Q8 se realizó el análisis de qPCRrt a partir del ARN de 5 líneas transgénicas: Q8-tau 4, Q8-tau 7, Q8-tau 14, Q8-tau 35, Q8-tau 36, y de su control sin transformar (Q8-wt). Después del análisis se comprobó la sobre-expresión de *CsTL1* en todas las líneas transformadas, aunque sus niveles de expresión, al igual que sucedió en alcornoque, fueron variables (Figura 24).

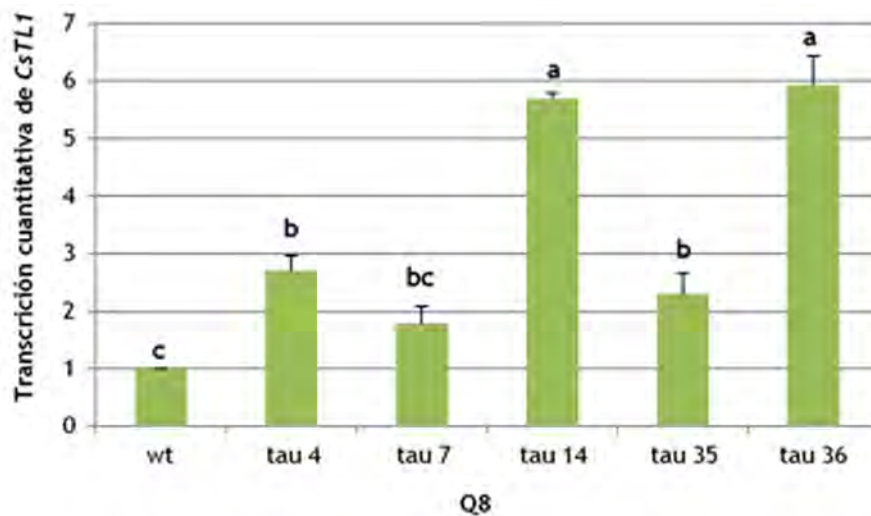


Figura 24. Análisis de la expresión del gen *CsTL1* en las líneas transgénicas de encina derivadas del genotipo Q8. Los datos corresponden a medias  $\pm$  error estándar de 3 repeticiones. Las semibarras representan el error estándar. Las columnas con la misma letra no difieren significativamente para una  $p=0,05$  (test Duncan).

La expresión de *CsTL1* fue significativamente mayor ( $p \leq 0,05$ ) en las líneas Q8-tau 36 (5,93) y Q8-tau 14 (5,7), seguidas por las líneas Q8-tau 4 (2,64) y Q8-tau 35 (2,29) (Figura 24). La expresión de *CsTL1*

fue significativamente ( $p \leq 0,05$ ) menor en la línea Q8-tau 7 (1,79), con una expresión similar a Q8-wt.

Del genotipo Q10-16 se analizó la línea Q10-16-tau 1, y su control sin transformar. La única línea transgénica obtenida del genotipo Q10-16 mostró unos niveles de expresión del gen *CsTL1* muy similares (1,03) a los de la línea no transformada (Q10-16-wt) (Figura 25).

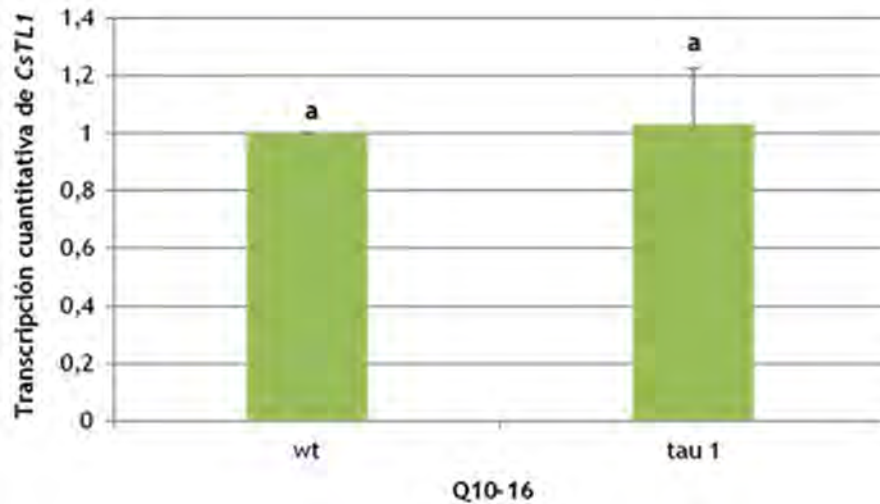


Figura 25. Análisis de la expresión del gen *CsTL1* en la línea transgénica de encina derivada del genotipo Q10-16. Los datos corresponden a medias  $\pm$  error estándar de 3 repeticiones. Las semibarras representan el error estándar.

En total se ha analizado la expresión de 6 de las 11 líneas transgénicas obtenidas en encina. De esas seis líneas 4 sobre-expresan el gen *CsTL1*, lo que representa el 66,67% de total de líneas obtenidas.

#### 4.5. CRIOCONSERVACIÓN DE LAS LÍNEAS EMBRIOGÉNICAS

Para la conservación de las líneas embriogénicas transgénicas de alcornoque y encina a largo plazo se utilizó el almacenamiento en NL o crioconservación.

##### 4.5.1. Alcornoque

El tratamiento para la crioconservación de las líneas transgénicas de alcornoque consistió en el pre-cultivo de los embriones

somáticos con sacarosa 0,3M durante tres días y un tratamiento posterior de 60 minutos en PVS2 a 0°C. Empleando este procedimiento se criopreservaron satisfactoriamente todas las líneas embriogénicas de alcornoque que fueron analizadas mediante qPCRrt (Tabla 10).

Tabla 10. Porcentajes de supervivencia y recuperación embriogénica a partir de embriones somáticos de alcornoque transformados y no transformados, después de pre-cultivo en medio suplementado con sacarosa 0,3M, tratamiento con la solución vitrificadora PVS2 durante 60 min a 0°C e inmersión en NL.

LÍNEA EMBRIOGÉNICA	SUPERVIVENCIA (%)	RECUPERACIÓN EMBRIOGÉNICA (%)
ALM6-wt	63,3 ± 7,0	60,0 ± 5,8
ALM6-tau 1	86,7 ± 1,9	80,0 ± 0,0
ALM6-tau 6	96,7 ± 1,9	90,0 ± 0,0
ALM6-tau 12	93,3 ± 1,9	86,7 ± 5,1
ALM80-wt	90,0 ± 5,8	83,3 ± 3,9
ALM80-tau 13	96,7 ± 1,9	76,7 ± 1,9
ALM80-tau 19	96,7 ± 1,9	93,3 ± 1,9
ALM80-tau 20	80,0 ± 0,0	76,7 ± 1,9
TGR3-wt	66,7 ± 5,1	66,7 ± 5,1
TGR3-tau 2	83,3 ± 4,7	80,0 ± 8,2
TGR3-tau 4	63,3 ± 18,9	53,3 ± 12,5
TGR3-tau 5	90,0 ± 3,4	90,0 ± 3,4
TGR3-tau 6	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
TGR3-tau 9	90,0 ± 8,2	80,0 ± 0,0
TGR3-tau18	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
TGR3-tau21	93,3 ± 1,9	93,3 ± 1,9
TGR3-tau 23	93,3 ± 4,7	83,3 ± 4,7
TGR3-tau 34	76,7 ± 17,0	66,7 ± 9,4
TGR3-tau 36	90,0 ± 10,0	75,0 ± 25,0
TGR3-tau 42	90,0 ± 14,1	86,7 ± 18,9
TGR3-tau 45	96,7 ± 4,7	70,0 ± 8,2

Cada valor representa la media ± el error estándar de 3 replicados, con 10 explantos cada uno.

El porcentaje de supervivencia de los ES observado después su almacenamiento en NL fue muy alto, oscilando entre el 63 y el 100% (Tabla 10). Por línea, los porcentajes de supervivencia fueron del

63,3%-96,7% en ALM6, 80,0%-96,7% en ALM80 y 63,3%-100% en TGR3 (Tabla 10). El porcentaje de recuperación embriogénica superó el 50% en todas las líneas, llegando a alcanzar el 90-100% en algunas líneas (Tabla 10). En la mayoría de las líneas transgénicas (en 14 de las 18) el porcentaje de recuperación embriogénica fue superior al porcentaje de recuperación embriogénica de los controles sin transformar.

La presencia de los tres transgenes se confirmó mediante un análisis PCR a partir de ADN extraído de los embriones somáticos de las líneas transformadas que habían sido criopreservadas y recuperadas del tanque de NL (Figura 26). Estos resultados demuestran que la integridad del transgén no se ha visto afectada por los procesos de crioprotección y el almacenamiento en NL.

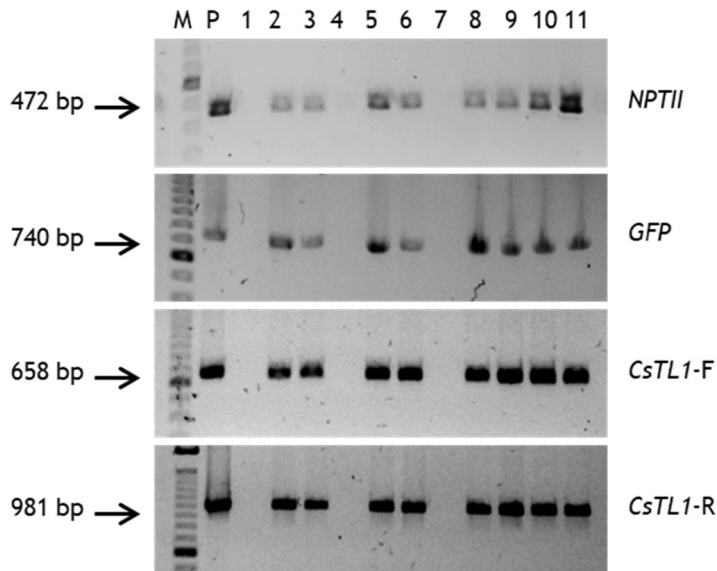


Figura 26. Confirmación mediante amplificación por PCR de la presencia de los genes *NPTII*, *EGFP*, *CsTL1-D* y *CsTL1-R* en las líneas transformadas y criopreservadas en NL de alcornoque. M: marcador de peso molecular; P: plásmido; calles 1-3: Líneas de ALM6 no transformada (1) y transformadas (2, 3); calles 4-6: Líneas de ALM80 no transformada (4) y transformadas (5, 6); calles 7-11: Líneas de TGR3 no transformada (7) y transformadas (8-11).

Los embriones recuperados del NL mostraron morfología normal, no evidenciando diferencias con respecto a los controles sin

crioconservar (Figura 27). El crecimiento y proliferación de los embriones tampoco se vio afectado por el proceso de crioconservación. Una vez confirmada la efectividad del protocolo, todas las líneas transgénicas de alcornoque (Tabla 10) fueron almacenadas en el tanque de NL para su conservación a largo plazo.



Figura 27. Aspecto de los embriones somáticos de alcornoque de líneas transgénicas recuperados del NL, tras seis semanas de crecimiento en medio de proliferación y en condiciones de crecimiento estándar. A: ALM6; B: ALM80; C: TGR3.

#### 4.5.2. Encina

El tratamiento para la crioconservación de las líneas transgénicas de encina consistió en el pre-cultivo de las PEMs con sacarosa 0,3M durante tres días, seguido de un tratamiento con PVS2

Tabla 11. Porcentajes de supervivencia y recuperación embriogénica a partir de embriones somáticos de encina transformados y no transformados, después de pre-cultivo en medio suplementado con sacarosa 0,3M, tratamiento con la solución vitrificadora PVS2 durante 15 min e inmersión en NL.

LÍNEA EMBRIOGÉNICA	SUPERVIVENCIA (%)	RECUPERACIÓN EMBRIOGÉNICA (%)
Q8-wt	63,3±6,4	56,7±6,4
Q8-tau 4	80,0±5,6	66,7±6,2
Q8-tau 7	86,7±8,5	53,3±8,5
Q8-tau 14	96,7±3,2	76,7±3,2
Q8-tau 26	96,7±3,2	70,0±0,0
Q8-tau 35	80,0±9,6	70,0±5,6
Q8-tau 36	96,7±3,2	66,7±3,2
Q8-tau 38	86,7±8,5	70,0±5,6
Q10-16-wt	50,0±9,6	43,3±6,4
Q10-16-tau 1	53,3±3,2	43,3±3,2

Cada valor representa la media ± el error estándar de 3 replicados, con 10 explantos cada uno.

durante 15 minutos a temperatura ambiente. En esas condiciones, todas las líneas embriogénicas transgénicas de las líneas Q8 y Q10-16 de encina se crioconservaron satisfactoriamente (Tabla 11).

Los porcentajes de supervivencia de las líneas transformadas de Q8 superaron el 80%, siendo valores superiores a los obtenidos a partir de la línea Q8 sin transformar (63,3%). Sin embargo, en el genotipo Q10-16 los porcentajes de supervivencia de la línea transformada y sin transformar fueron muy similares (53,3% *versus* 50,0%), e inferiores a los obtenidos en las líneas Q8 (Tabla 11).

Los porcentajes de recuperación embriogénica oscilaron entre el 43,3 y el 76,7% (Tabla 11). En el genotipo Q8 los porcentajes de recuperación embriogénica de todas las líneas transformadas fueron mayores a los observados en la línea sin transformar, con excepción de la línea Q8-tau 7. Las líneas Q8-tau 7 y Q8-wt mostraron los porcentajes de recuperación más bajos (53,3% y 56,7%, respectivamente), mientras que los mayores valores de recuperación se obtuvieron en la línea Q8-

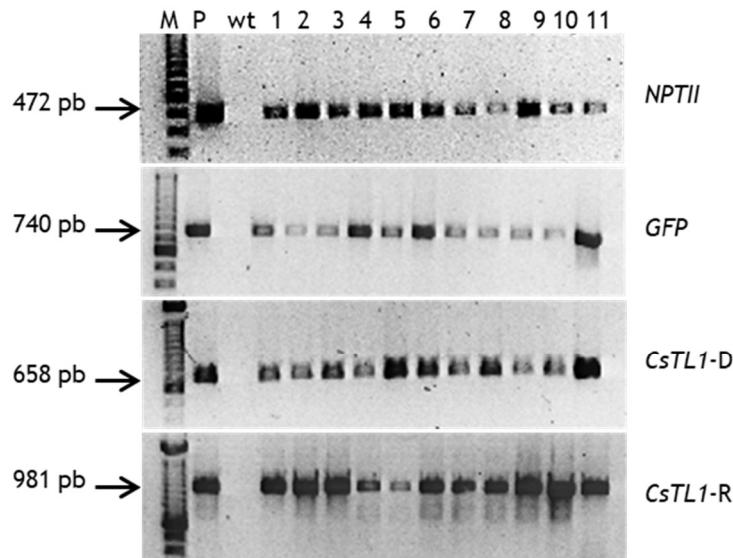


Figura 28. Confirmación mediante amplificación por PCR de la presencia de los genes *NPTII*, *EGFP*, *CsTL1-D* y *CsTL1-R* en las líneas de encina transformadas y crioconservadas en NL. M: marcador de peso molecular; P: plásmido; wt: línea no transformada; calles 1-10: Líneas Q8 transformadas; calle 11: Línea Q10-16 transformada.

tau 14 (76,7%) (Tabla 11). Los porcentajes de recuperación de la línea transformada y sin transformar de Q10-16-wt fueron similares (43,3%), y menores a los observados en las líneas de Q8 (Tabla 11).

Al igual que en alcornoque, la presencia de los tres transgenes se confirmó mediante PCR a partir de ADN extraído de los embriones somáticos de líneas transformadas recuperados del NL (Figura 28). Estos resultados confirman que la integridad del transgén no se vio afectada ni por el tratamiento de crioprotección ni por el almacenamiento en NL.

Los embriones recuperados del NL mostraron morfología normal, no evidenciando diferencias con respecto a los controles sin criopreservar (Figura 29). El crecimiento y proliferación de los embriones tampoco se vio afectado por el proceso de criopreservación. Una vez confirmada la efectividad del protocolo, las 11 líneas transgénicas (Tabla 11) de encina fueron almacenadas en el tanque de NL para su conservación a largo plazo.

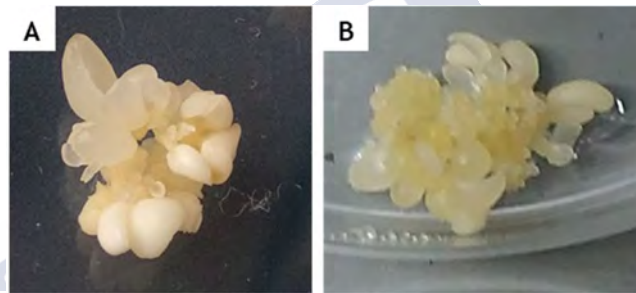


Figura 29. Aspecto de los embriones somáticos de encina recuperados del NL, tras seis semanas de crecimiento en medio de proliferación y en condiciones de crecimiento estándar. A: Línea Q8-wt; B: Línea Q8 transformada.

#### 4.6. REGENERACIÓN DE PLANTAS

Una vez confirmada la integración y expresión del gen *CsTL1* se procedió a la germinación y conversión a planta de los embriones somáticos transgénicos de alcornoque y encina.

##### 4.6.1. Alcornoque

Los embriones somáticos de alcornoque en estado cotiledonar de las líneas transgénicas cuya expresión para el gen *CsTL1* fue

analizada mediante qPCRrt y sus correspondientes no transformados, ALM6-wt, ALM80-wt y TGR3-wt, fueron almacenados durante dos meses a 4°C en condiciones de oscuridad antes de ser transferidos al medio de germinación. La regeneración fue evaluada como la conversión completa a planta, o como el desarrollo de sólo brote o sólo raíz. Después de 8 semanas en el medio de germinación, se obtuvo el desarrollo de plantas en todas las líneas transgénicas de alcornoque, aunque las diferencias en los porcentajes de todos los parámetros evaluados fueron elevadas (Tablas 12-14). En los genotipos ALM6 y ALM80, los porcentajes de conversión a planta de las líneas transgénicas fueron inferiores a los obtenidos de sus correspondientes controles no transformados (Tablas 12 y 13). En TGR3 se observa lo mismo en todas las líneas transgénicas, menos en las líneas TGR3-tau 21 y tau 36, donde los porcentajes de conversión a planta fueron superiores a los observados en el control sin transformar (Tabla 14).

En el genotipo ALM6 no se observaron diferencias significativas entre las líneas en la formación de sólo raíces, aunque la línea ALM6-tau 12 mostró mayores porcentajes de generación de sólo raíz. Sí se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en el desarrollo de sólo brote, aunque únicamente en la línea ALM6-tau 12 (Tabla 12) se obtuvo la formación de sólo brote. También se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en los porcentajes de conversión a

**Tabla 12. Germinación y conversión a planta de embriones somáticos de las líneas ALM6 de alcornoque, tras 2 meses de almacenamiento en frío y 8 semanas en medio de germinación.**

Línea embriogénica	Sólo raíz (%)	Sólo brote (%)	Conversión (raíz+brote)			
			(%)	LR (mm)	LB (mm)	NH
ALM6-wt	29,2±10,9	0,0±0,0	41,7±7,6	85,2±14,7	21,9±4,7	4,1±0,9
ALM6-tau 1	25,0±8,6	0,0±0,0	19,4±2,5	59,9±18,0	18,5±2,5	4,9±1,6
ALM6-tau 6	41,7±12,9	0,0±0,0	33,3±11,2	57,9±12,6	19,2±3,0	5,7±1,0
ALM6-tau 12	55,6±9,4	8,3±3,4	13,9±4,7	51,5±8,0	30,6±2,9	5,5±0,2
	ns	$p \leq 0,05$	$p \leq 0,05$	ns	ns	ns

Cada valor representa la media  $\pm$  el error estándar de 6 replicados con 6 embriones por repetición. Los datos fueron analizados mediante un análisis Kruskal-Wallis ( $p \leq 0,05$ ). ns: no significativo; LR: longitud de raíz; LB: longitud de brote; NH: número de hojas.

planta completa. Las líneas ALM6-wt y ALM6-tau 6 fueron las que obtuvieron un mayor porcentaje de conversión (41,7% y 33,3%, respectivamente). La longitud de las raíces de las plantas de las líneas transformadas fue menor que la observada en las plantas de la línea wt. Tampoco se observaron diferencias significativas en la longitud del tallo y en el número de hojas. La mayor longitud de tallo se observó en la línea ALM6-tau 12 (Tabla 12). Sin embargo, esta línea mostró una alta tasa de mortalidad cuando se intentó mantener *in vitro* mediante la proliferación de brotes axilares.

En el genotipo ALM80 no se observaron diferencias significativas entre las diferentes líneas, para ninguno de los parámetros analizados (Tabla 13). Los porcentajes de formación de sólo raíz fueron similares en las líneas transgénicas y la línea wt, sin embargo, sí se observaron diferencias en los porcentajes de conversión a planta. La línea ALM80-wt mostró mayores porcentajes de conversión que las líneas transformadas (16,7% frente a 2,8%, 5,6% y 8,3%). Por otro lado, se observó que las plantas de las líneas ALM80-tau 19 y ALM80-tau 20 presentaban mayor longitud en las raíces que la línea wt, mientras que la línea ALM80-tau 13 desarrolló raíces más cortas que el resto de las líneas. No se observó la misma tendencia en la longitud de tallo y el número de hojas, ya que todas las líneas transformadas desarrollaron un

Tabla 13. Germinación de embriones somáticos de las líneas ALM80 de alcornoque, tras 2 meses de almacenamiento en frío y 8 semanas en medio de germinación.

Línea embriogénica	Sólo raíz (%)	Sólo brote (%)	Conversión (raíz+brote)			
			(%)	LR (mm)	LB (mm)	NH
ALM80-wt	47,2±7,3	2,8±2,6	16,7±3,9	93,2±22,9	27,0±14,0	6,2±2,5
ALM80-tau 13	47,2±14,4	0,0±0,0	2,8±2,5	58,0±0,0	7,0±0,0	3,0±0,0
ALM80-tau 19	47,2±7,3	0,0±0,0	5,6±5,1	105,0±0,0	15,0±0,0	4,0±0,0
ALM80-tau 20	44,4±10,2	0,0±0,0	8,3±5,2	149,3±33,1	7,5±1,0	6,0±0,4
	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Cada valor representa la media ± el error estándar de 6 replicados con 6 embriones por repetición. Los datos fueron analizados mediante un análisis Kruskal-Wallis ( $p \leq 0,05$ ). ns: no significativo; LR: longitud de raíz; LB: longitud de brote; NH: número de hojas.

tallo más corto que la línea sin transformar (Tabla 13). La línea ALM80-tau 13 fue la línea con peores resultados en cuanto a longitud de raíz, brote y número de hojas, y también sufrió altas tasas de mortalidad cuando se intentó mantener *in vitro* mediante la proliferación de brotes axilares.

En el genotipo TGR3 no se observaron diferencias significativas entre las líneas, para ninguno de los parámetros analizados (Tabla 14). El desarrollo de sólo raíz se observó en todas las líneas evaluadas, aunque los porcentajes de desarrollo de raíz mostraron una elevada variación, oscilando entre 8,3 y 56,9% (Tabla 14). La formación de sólo brote no se observó en 4 (TGR3-tau 4, TGR3-tau 9, TGR3-tau 36 y TGR3-tau 45) de las 12 líneas transgénicas evaluadas. En todas las líneas se obtuvo la conversión a planta con porcentajes que oscilaron

Tabla 14. Germinación de embriones somáticos de las líneas TGR3 de alcornoque, tras 2 meses de almacenamiento en frío y 8 semanas en medio de germinación.

Línea embriogénica	Sólo raíz (%)	Sólo brote (%)	Conversión (raíz+brote)			
			(%)	LR (mm)	LB (mm)	NH
TGR3-wt	22,2±9,4	5,6±3,2	18,1±9,7	34,75±9,26	21,5±2,5	6,7±1,1
TGR3-tau 2	27,8±6,4	2,8±2,5	13,9±8,3	75,0±12,3	28,2±4,2	5,2±0,5
TGR3-tau 4	56,9±10,9	0,0±0,0	16,7±7,9	60,6±10,5	22,8±5,1	9,2±1,1
TGR3-tau 5	38,9±9,3	2,8±0,0	16,7±7,5	47,0±24,4	8,7±3,1	2,6±1,0
TGR3-tau 6	47,2±10,4	2,8±2,6	11,1±7,6	54,3±3,4	16,3±1,5	5,5±0,2
TGR3-tau 9	43,1±11,6	0,0±0,0	5,6±3,2	55,0±8,2	5,0±0,0	6,5±1,0
TGR3-tau 18	37,5±8,1	2,8±2,6	5,6±5,1	110,0±0,0	22,0±0,0	5,0±0,0
TGR3-tau 21	23,6±6,4	5,6±3,2	34,7±10,1	58,7±23,2	12,2±2,8	5,7±0,8
TGR3-tau 23	8,3±5,2	4,2±3,8	15,3±6,4	22,3±3,0	19,2±1,8	3,3±0,5
TGR3-tau 34	41,7±5,2	2,8±2,5	16,7±5,6	57,5±13,0	11,9±2,2	5,8±0,5
TGR3-tau 36	38,9±14,7	0,0±0,0	36,1±6,7	83,6±15,1	8,6±0,4	3,5±0,4
TGR3-tau 42	36,1±14,4	5,6±3,2	11,1±5,1	77,0±10,6	13,3±2,6	3,5±0,2
TGR3-tau 45	34,7±9,3	0,0±0,0	11,1±7,6	27,8±1,1	19,3±2,6	6,5±1,0
	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Cada valor representa la media ± el error estándar de 6 replicados con 6 embriones por repetición. Los datos fueron analizados mediante un análisis Kruskal-Wallis ( $p \leq 0,05$ ). ns: no significativo; LR: longitud de raíz; LB: longitud de brote; NH: número de hojas.

entre 5,6% y 36,1% (Tabla 14). Como ya se ha mencionado, en la mayoría de las líneas transgénicas el porcentaje de conversión es inferior al obtenido en la línea TGR3 sin transformar.

En las plantas obtenidas, se observó que las raíces de las plantas de todas las líneas transgénicas eran más largas que las de las plantas de la línea sin transformar, a excepción de TGR3-tau 23 y TGR3-tau 45 (Tabla 14). La longitud del brote fue menor en la mayoría de las líneas transgénicas que en la línea wt. Únicamente en las líneas TGR3-tau 2, tau 4 y tau 18 el brote fue ligeramente mayor. Por último, el número de hojas fue muy variable oscilando entre 2,6 y 9,2 (Tabla 14).

En todos los casos, las plantas derivadas de las líneas transgénicas crecieron con normalidad, y no mostraron diferencias morfológicas con respecto a las plantas derivadas de embriones no transformados (Figura 30). Los datos previamente descritos en lo referente a la longitud de brote y el número de hojas corroboran que, en general, que la calidad de las plantas transgénicas desarrolladas es buena.

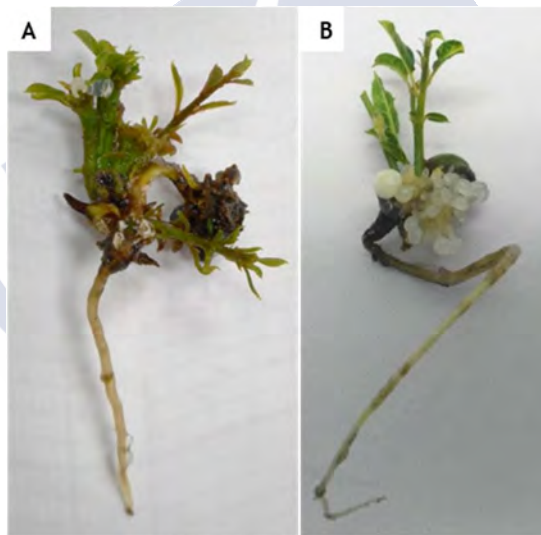


Figura 30. Plantas obtenidas a partir de la germinación de embriones somáticos de alcornoque A: Planta derivada de la germinación de un embrión somático de una línea sin transformar; B: Planta derivada de la germinación de un embrión somático de una línea transformada con el gen *CstL1*.

Una vez obtenidas las plantas a partir de la germinación de los embriones transgénicos, se comprobó que la expresión *GFP* también se producía en raíces, tallos y hojas aislados de esas plantas (Figura 31). No se encontraron diferencias fenotípicas con respecto a las plantas control sin transformar, sugiriendo la ausencia de potenciales efectos deletéreos del gen *GFP* sobre las células de alcornoque. La fluorescencia fue más intensa en las hojas más pequeñas y jóvenes que en las maduras de mayor tamaño, y también fue más fácil de observar en el nervio principal, nervios secundarios y en el peciolo de las hojas (Figura 31 B y C). Esas diferencias en los niveles de expresión *GFP* no se detectaron en las raíces donde la expresión fue siempre uniforme

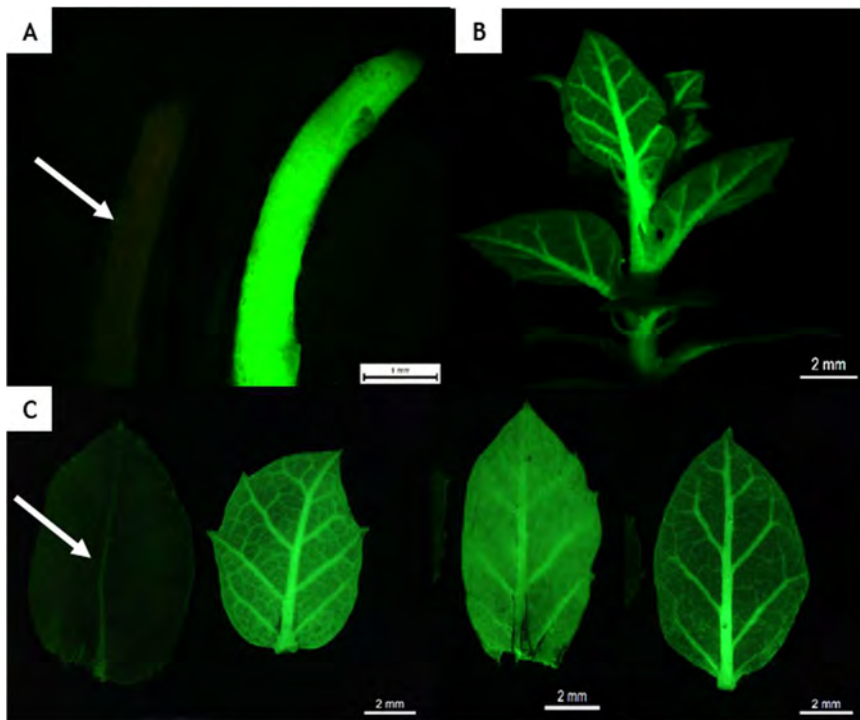


Figura 31. Expresión de *GFP* en plantas obtenidas a partir de la conversión de embriones somáticos de alcornoque. A: Expresión *GFP* en una raíz procedente de una planta no transgénica (izquierda (flecha)) y de una planta transgénica (derecha). B: Expresión *GFP* en un brote de una planta transgénica. C: Expresión de *GFP* en hojas procedentes de una planta no transgénica (izquierda (flecha)) y de plantas transgénicas (derecha).

(Figura 31 A). No se detectó expresión de *GFP* en raíces, tallos ni hojas de las plantas no transformadas usadas como control negativo.

#### 4.6.2. Encina

En encina, para la germinación y regeneración de plantas, embriones somáticos en estado cotiledonar de las líneas transgénicas y sus correspondientes no transformados, Q8-wt y Q10-16-wt, fueron transferidos a placas de Petri sin medio de cultivo, almacenados a 4°C en condiciones de semioscuridad durante dos meses, y cultivados en medio de germinación durante ocho semanas.

Al igual que sucedió en alcornoque, en encina se ha obtenido la conversión a planta completa en todas líneas transgénicas en las que se evaluó la germinación, pero los porcentajes variaron considerablemente entre las diferentes líneas (Tablas 15 y 16). En este caso, también los porcentajes de conversión fueron mayores en los embriones de las líneas no transgénicas que en los embriones derivados de las líneas transgénicas (Tablas 15 y 16).

En las líneas Q8, se observó el desarrollo de raíz, sólo brote y planta completa en todas las líneas evaluadas excepto en Q8-tau 4, que no mostró desarrollo de sólo raíz, y en la línea Q8-wt, que no tuvo desarrollo de sólo brote, probablemente por el elevado porcentaje de conversión (Tabla 15). El porcentaje de sólo raíz y sólo brote no estuvieron afectados significativamente por el genotipo de las líneas, aunque los valores variaron entre las diferentes líneas. Por lo contrario, si se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre las líneas en lo que se refiere al porcentaje de conversión.

Los mejores resultados de conversión se obtuvieron en las líneas Q8-tau 38 y Q8-wt (66,7 y 75,0%, respectivamente), mientras que las líneas Q8-tau 4 y tau 36 fueron las que obtuvieron los valores más bajos (2,9 y 2,8%, respectivamente), aunque en línea Q8-tau 4 se observó un elevado porcentaje de sólo brote (Tabla 15).

En cuanto a la longitud de las raíces y de los brotes de las plantas, no se observaron diferencias significativas entre líneas, aunque hay una elevada variabilidad entre las diferentes líneas para ambos parámetros

Tabla 15. Germinación de embriones somáticos de la línea Q8 de encina, tras 2 meses de almacenamiento en frío y 8 semanas en medio de germinación.

Línea embriogénica	Sólo raíz (%)	Sólo brote (%)	Conversión (raíz+ brote)			
			(%)	LR (mm)	LB (mm)	NH
<b>Genotipo Q8</b>						
Q8-wt	25,0±10,3	0,0±0,0	75,0±10,3	94,1±10,6	17,8±2,0	9,7±0,8
Q8-tau 4	0,0±0,0	25,0±8,6	2,9±2,6	10,0±0,0	6,0±0,0	5,0±0,0
Q8-tau 7	13,9±8,3	11,1±7,6	25,0±17,1	59,8±5,8	20,2±0,6	11,7±1,9
Q8-tau 14	13,9±12,7	19,4±8,3	27,8±5,1	98,9±26,9	11,8±1,5	7,8±0,9
Q8-tau 26	11,1±7,6	11,1±3,2	11,1±7,6	65,0±6,1	8,8±1,1	8,3±1,8
Q8-tau 35	5,6±5,1	11,1±6,4	25,0±5,2	68,9±19,4	13,3±2,3	12,2±1,9
Q8-tau 36	16,7±9,7	5,6±5,1	2,8±2,6	130,0±0,0	15,0±0,0	25,0±0,0
Q8-tau 38	16,7±7,9	2,8±2,6	66,7±7,9	131,8±16,2	12,1±1,7	8,8±0,4
	ns	ns	p≤0,05	ns	ns	ns

Cada valor representa la media ± el error estándar de 6 replicados con 6 explantos por repetición. Los datos fueron analizados mediante un análisis Kruskal-Wallis (p≤0,05). LR: longitud de raíz; LB: longitud de brote; NH: número de hojas. ns: no significativo.

(Tabla 15). La longitud de las raíces fue elevada en todas las líneas (valores comprendidos entre 60 y 131 mm) con excepción de la línea Q8-tau 4, en la que la longitud fue muy baja (10 mm). La longitud de los brotes estuvo por encima de los 10 mm en todas las líneas menos en las líneas Q8-tau 4 y Q8-tau 26. En el número de hojas tampoco se observaron diferencias significativas y los peores valores de nuevo se observaron en la línea Q8-tau 4. En el resto de las líneas, incluida la línea no transformada, el número de hojas fue relativamente alto, oscilando entre 8 y 25, lo que es indicativo de una buena calidad de las plantas.

En la línea Q10-16-wt no se observaron diferencias significativas entre la línea transgénica y no transgénica ni en los parámetros de desarrollo de sólo raíz y de sólo brote, ni en el de conversión a planta (Tabla 16). Los porcentajes de raíz y de conversión a planta completa fueron mayores en la línea no transformada (53,3% y 26,7%, respectivamente) que en la línea transformada (43,3% y 16,7 %, respectivamente). En las plantas, la longitud de la raíz y del brote fue

significativamente mayor ( $p \leq 0,05$ ) en las plantas no transformadas. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el número de hojas, obteniéndose valores similares en ambas líneas (Tabla 16).

Tabla 16. Germinación de embriones somáticos de la línea Q10-16 de encina, tras 2 meses de almacenamiento en frío y 8 semanas en medio de germinación.

Línea embriogénica	Sólo raíz (%)	Sólo brote (%)	Conversión (raíz+ brote)			
			(%)	LR (mm)	LB (mm)	NH
<b>Genotipo Q10-16</b>						
Q10-16-wt	53,3±9,1	0,0±0,0	26,7±12,7	84,7±7,4	12,1±1,0	4,4±1,1
Q10-16-tau 1	43,3±3,3	3,3±2,7	16,7±4,3	40,6±9,6	6,8±0,8	4,8±0,9
	ns	ns	ns	$p \leq 0,05$	$p \leq 0,05$	ns

Cada valor representa la media  $\pm$  el error estándar de 6 replicados con 6 explantos por repetición. Los datos fueron analizados mediante un análisis Kruskal-Wallis ( $p \leq 0,05$ ). LR: longitud de raíz; LB: longitud de brote; NH: número de hojas. ns: no significativo.

La morfología de las plantas fue similar en las plantas transgénicas y no transgénicas, tanto en las líneas transgénicas derivadas de Q8 como de las líneas transgénicas derivadas de Q10-16 (Figura 32). Los datos de los parámetros longitud de raíz y brote y el número de hojas indican que la calidad de las plantas transgénicas es buena. Por norma general, también se aprecia que las encinas germinadas tenían un aspecto más vigoroso que los alcornoques (Figura 29 *versus* Figura 32), aunque esta tendencia se invertía una vez que dichos brotes se establecían *in vitro* mediante la multiplicación de brotes axilares.



Figura 32. Plantas obtenidas a partir de la germinación de embriones somáticos de encina. A: Planta derivada de la germinación de un embrión somático de la línea Q8-wt. B: Planta derivada de la germinación de un embrión somático de la línea Q8-tau 36 transformada con el gen *CsTL1*.

Por último, también se comprobó la expresión *GFP* en las plantas transgénicas obtenidas de la germinación de los embriones. La fluorescencia se observó en las raíces, brotes y hojas de las plantas transgénicas germinadas (Figura 33). Al igual que sucedió en alcornoque, la fluorescencia fue más intensa en las hojas más pequeñas y jóvenes que en las de mayor tamaño y maduras. De igual manera, el gen *GFP* se expresa más en el nervio principal, nervios secundarios y en el peciolo de las hojas (Figura 33 C). Tampoco se detectó expresión de *GFP* en raíces, tallos ni hojas de las plantas usadas como control negativo. No se encontraron diferencias fenotípicas en comparación con las plantas control, sugiriéndose la ausencia de potenciales efectos negativos del gen *GFP* sobre las células de encina.

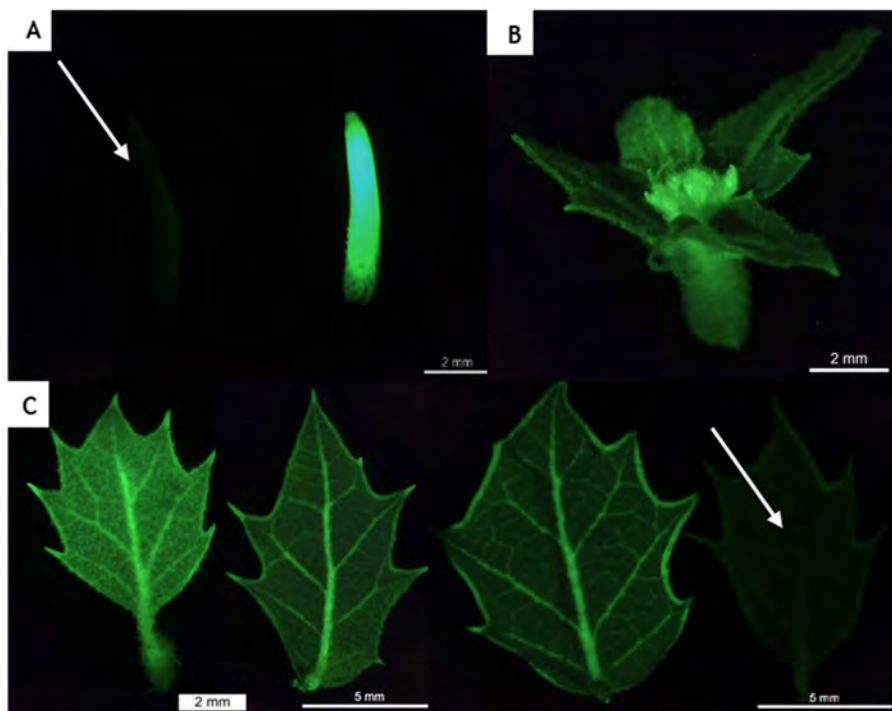


Figura 33. Expresión de GFP en plantas obtenidas a partir de la conversión de embriones somáticos de encina. A: Expresión *GFP* en una raíz procedente de una planta no transgénica (izquierda (flecha)) y de una planta transgénica (derecha). B: Expresión *GFP* en un brote de una planta transgénica. C: Expresión *GFP* en hojas procedentes de plantas transgénicas (izquierda) y de una planta no transgénica (derecha (flecha)).

#### **4.7. PROLIFERACIÓN DE BROTES AXILARES**

Los datos obtenidos de la germinación de los embriones somáticos de las diferentes líneas transgénicas de encina y alcornoque indicaban una gran variabilidad con respecto a la longitud de la raíz y de los brotes de las plantas. Con el objeto de disponer de un suministro de plantas continuo y con mayor homogeneidad en términos de la longitud del brote y la raíz, se procedió al establecimiento de cultivos axilares de esas líneas transgénicas y sus correspondientes líneas no transformadas. Para ello, un brote derivado de la germinación de un ES de cada una de las líneas transgénicas y no transgénicas fue aislado y transferido a medio de cultivo para ser multiplicado.

##### **4.7.1. Alcornoque**

En el genotipo ALM6 se establecieron todas las líneas transgénicas generadas (ALM6-wt, ALM6-tau 1, ALM6-tau 6, y ALM6-tau 12) y su correspondiente no transformada, pero la línea ALM6-tau 12 no proliferó bien, y los brotes que estaban en medio de proliferación se secaron y murieron. Esta línea se conserva mediante embriones somáticos crioconservados en NL. En ALM80 se trató de establecer las líneas ALM80-wt, ALM80-tau 19, ALM80-tau 20 y ALM80-tau 13, pero la línea ALM80-tau 13 no proliferó bien, y los brotes que estaban en medio de proliferación se secaron y murieron. Esta línea se conserva mediante embriones somáticos crioconservados en NL. Para la línea TGR3 se establecieron TGR3-wt, TGR3-tau 2, TGR3-tau 4, TGR3-tau 5, TGR3-tau 6, TGR3-tau 9, TGR3-tau 18, TGR3-tau 21, TGR3-tau 23, TGR3-tau 34, TGR3-tau 36, TGR3-tau 42 y TGR3-tau 45. Todas estas líneas se establecieron sin problemas.

En total, se logró establecer mediante la vía de proliferación de yemas axilares 16 líneas transgénicas y 3 líneas no transformadas. Los brotes axilares se proliferaron mediante el subcultivo de segmentos nodales y apicales de acuerdo a lo descrito en el apartado 3.10.2.1. de Material y Métodos. Las tasas de proliferación fueron similares en las líneas transgénicas y no transgénicas (datos no mostrados) y el aspecto de los brotes fue vigoroso en todas las líneas en las que se logró el establecimiento (Figura 34).

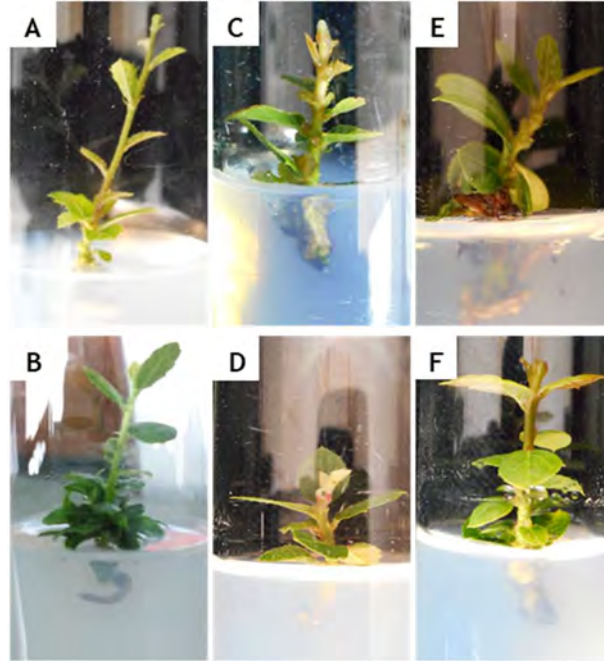


Figura 34. Aspecto de los brotes axilares de alcornoque establecidos a partir de un brote obtenido de un embrión con conversión a planta completa. A, B: Brote derivado de ALM6-wt (A) y una línea de ALM6 transformada (B). C, D: Brote derivado de ALM80-wt (C) y de una línea ALM80 transformada (D). E, F: Brote derivado de TGR3-wt (E) y de una línea TGR3 transformada (F). El diámetro del tubo es 15mm.

Las líneas de brotes axilares de alcornoque que no fueron utilizadas en los experimentos de tolerancia al oomiceto fueron conservadas sin problemas mediante el almacenamiento en frío de los brotes axilares. Cada año, los brotes se cultivaban en medio fresco y condiciones estándar durante 6 semanas para volver a ser almacenadas en frío durante otro año. Este procedimiento supuso un ahorro considerable de tiempo y medios de cultivo.

#### 4.7.2. Encina

Igualmente, en encina con el objetivo de obtener un número constante de plantas y más uniformes para utilizar en los ensayos de tolerancia, se establecieron cultivos axilares de las 7 líneas transgénicas del genotipo Q8 evaluadas en el experimento de germinación y de la correspondiente línea Q8-wt sin transformar. Un brote de cada línea se

aisló de un embrión con conversión a planta y se cultivaron en medio de proliferación de encina tal y como se describe en el apartado 3.10.2.2. de Material y Métodos para multiplicarlos mediante la proliferación de yemas axilares. El procedimiento utilizado permitió establecer *in vitro* de las 8 líneas de encina de manera satisfactoria. Los brotes una vez estabilizados proliferaron rápidamente (Figura 35), lo que permitió obtener material suficiente para ser utilizado en los ensayos de tolerancia. Las tasas de proliferación fueron similares en los cultivos derivados de líneas transgénicas y no transgénicas (datos no mostrados).



**Figura 35. Aspecto de un cultivo de brotes axilares de encina derivados de un brote obtenido a partir de la germinación de un embrión somático transformado.**

Las líneas de axilares de encina que no fueron utilizadas en los experimentos de tolerancia al oomiceto se conservaron sin problemas mediante el almacenamiento en frío de los brotes axilares. Cada año, los brotes se cultivaban en medio fresco y condiciones estándar durante 6 semanas para volver a ser almacenadas en frío durante otro año. Como ya se mencionó en alcornoque, este procedimiento supuso un ahorro considerable de tiempo y medios de cultivo. No se establecieron cultivos de brotes axilares de la línea Q10-16-tau 1 y su correspondiente

línea sin transformar porque sus niveles de expresión del gen *CsTL1* eran similares al control sin transformar.

#### **4.8. ENRAIZAMIENTO DE BROTES AXILARES**

Una vez establecidos los brotes y optimizada su proliferación se procedió al enraizamiento de los mismos. El enraizamiento se realizó en los brotes de las líneas con los valores de expresión del gen *CsTL1* más elevados y de sus respectivos controles sin transformar.

##### **4.8.1. Alcornoque**

Los brotes de alcornoque fueron enraizados mediante un tratamiento de 24h en medio GD con los macronutrientes reducidos a un 1/3, suplementado con 25 mg/L AIB, y posterior transferencia a un medio GD 1/3 sin auxinas. Tras seis semanas de cultivo, se observó el desarrollo de raíz en todas las líneas transgénicas y no transformadas evaluadas, obteniéndose un porcentaje de enraizamiento que oscilo entre el 51,7 y el 98,3% (Tabla 17).

En el genotipo ALM6, se enraizaron dos de las tres líneas transformadas, ALM6-tau 1 y ALM6-tau 6, puesto que estas líneas mostraban sobre-expresión del gen *CsTL1*. El porcentaje de enraizamiento está afectado significativamente ( $p \leq 0,05$ ) por la línea, obteniéndose los mejores resultados en la línea ALM6-tau 6 (93,3%) y en el control sin transformar (86,7%). El número de raíces también está afectado significativamente ( $p \leq 0,05$ ) por la línea, observándose también un mayor número en la línea ALM6-tau 6 (4,6) (Tabla 17).

En el genotipo ALM80, se enraizaron dos de las tres líneas transformadas: ALM80-tau19 y ALM80-tau 20. Estas líneas mostraban mayor sobre-expresión del gen *CsTL1*. El porcentaje de enraizamiento está afectado significativamente ( $p \leq 0,05$ ) por la línea, obteniéndose los mejores resultados en la línea ALM80-tau 20 (86,7%) y en el control sin transformar (75,0%). El número de raíces también está afectado significativamente ( $p \leq 0,05$ ) por la línea, observándose un mayor número en la línea ALM80-tau 20 (2,4) (Tabla 17).

Tabla 17. Porcentaje de enraizamiento y número de raíces por brote de las líneas transformadas y no transformadas de alcornoque.

LÍNEA	ENRAIZAMIENTO (%)	NÚMERO DE RAÍCES
ALM6-wt	86,7±5,2	2,8±0,3
ALM6-tau 1	65,0±6,9	2,3±0,3
ALM6-tau 6	93,3±3,5	4,6±0,6
F-test	p≤0,05	p≤0,05
ALM80-wt	75,0±4,3	1,9±0,1
ALM80-tau 19	51,7±3,7	1,6±0,2
ALM80-tau 20	86,7±4,6	2,4±0,2
F-test	p≤0,05	p≤0,05
TGR3-wt	76,7±5,9	5,1±0,5
TGR3-tau 5	81,7±5,0	5,6±0,6
TGR3-tau 6	91,7±3,5	5,2±0,5
TGR3-tau 18	80,0±5,7	4,7±0,5
TGR3-tau 21	98,3±1,6	5,0±0,2
F-test	p≤0,05	ns

Cada valor representa la media ± el error estándar de tres repeticiones con 10 explantos cada una. Los datos fueron analizados mediante ANOVA (p≤0,05). ns: no significativo.

En el genotipo TGR3, se enraizaron las cuatro líneas que mostraban mayor expresión del gen *CsTLL1*, de las doce líneas transformadas: TGR3-tau 5, TGR3-tau 6, TGR3-tau 18 y TGR3-tau 21. En este genotipo, el porcentaje de enraizamiento también estuvo influenciado significativamente (p≤0,05) por la línea, observándose los mayores valores en las líneas TGR3-tau 21 y TGR3-tau 6 (98,3% y 91,7%, respectivamente), mientras que la línea sin transformar presentó el menor porcentaje de enraizamiento (76,7%) (Tabla 17). Sin embargo, el número de raíces no se vio afectado significativamente por la línea, oscilando entre 4,7 y 5,6 (Tabla 17).

Comparando los tres genotipos se observa que las frecuencias de enraizamiento de las plantas transgénicas fueron mayores en el genotipo TGR3 (80,0-98,3%) frente a ALM6 (65,0-93,3%) y ALM80 (51,7-86,7%). El número de raíces por brote varió entre genotipos, aunque fue mayor en las líneas transformadas de TGR3 (4,7-5,6%) que en las líneas transformadas de ALM6 (2,3-4,6%) y ALM80 (1,6-2,4%) (Tabla 17). No se observaron diferencias fenotípicas entre las líneas transformadas y sin transformar (Figura 36).

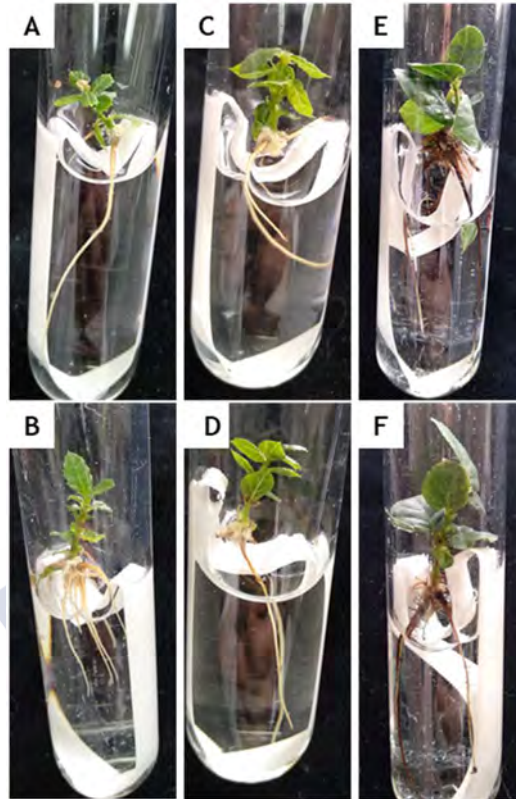


Figura 36. Plantas enraizadas de alcornoque, sobre puente de papel, preparadas para ser usadas en los ensayos de tolerancia al oomiceto *P. cinnamomi*. A, B: Plantas de la línea ALM6 sin transformar (A) y una línea transformada (B). C, D: Plantas de la línea ALM80 sin transformar (C) y una línea transformada (D). E, F: Plantas de la línea TGR3 sin transformar (E) y una línea transformada (F).

#### 4.8.2. Encina

Los brotes de encina de las líneas transformadas y no transformada del genotipo Q8 una vez estabilizados *in vitro* fueron enraizados mediante un tratamiento de 48h en medio GD con los macronutrientes reducidos a 1/3 suplementado con 25 mg/L AIB, y posterior transferencia a un medio GD 1/3 sin auxinas. Tras seis semanas, se logró el enraizamiento de los brotes de todas las líneas evaluadas, aunque el porcentaje de enraizamiento se vio afectado significativamente ( $p \leq 0,05$ ) por la línea (Tabla 18).

Tabla 18. Porcentaje de enraizamiento y número de raíces por brote de las líneas transformadas y no transformadas de encina (genotipo Q8).

LÍNEA	ENRAIZAMIENTO (%)	NÚMERO DE RAÍCES
Q8-wt	66,7±16,7	1,7±1,3
Q8-tau 4	81,7±15,7	2,5±1,8
Q8-tau 7	68,3±31,4	1,6±0,8
Q8-tau 14	88,3±14,5	2,4±1,7
Q8-tau 35	45,0±13,1	2,2±1,4
Q8-tau 36	31,7±17,4	1,9±1,1
F-test	$p \leq 0,05$	$p \leq 0,05$

Cada valor representa la media  $\pm$  el error estándar de tres repeticiones con 10 explantos por cada una. Los datos fueron analizados mediante ANOVA I ( $p \leq 0,05$ ). ns: no significativo.

En el genotipo Q8, los mejores porcentajes de enraizamiento se obtuvieron en las líneas Q8-tau 4 (81,7%) y Q8-tau 14 (88,3%), mientras que las líneas Q8-tau 35 y Q8-tau 36 son las que muestran los menores porcentajes de enraizamiento, siendo incluso inferiores al control sin transformar (Tabla 18). El número de raíces también está afectado significativamente ( $p \leq 0,05$ ) por la línea, observándose un mayor número en las líneas Q8-tau 4, Q8-tau 14 y Q8-tau 35 (Tabla 18).

En cuanto al aspecto morfológico, no se observaron diferencias entre la línea Q8-wt y las líneas transformadas (Figura 37).



**Figura 37. Aspecto de brotes axilares de encina enraizados. A: Brote enraizado de la línea Q8-wt. B, C: Brotes enraizados de líneas transformadas.**

Si se comparan los resultados obtenidos en las dos especies, se puede ver que, generalmente, las líneas de alcornoque muestran mayor porcentaje de enraizamiento que las líneas de encina (Tablas 17 y 18). Con respecto al número de raíces generadas, en las líneas de encina los números son semejantes (1,6-2,5) a los obtenidos en el genotipo ALM80 de alcornoque (entre 1,6 y 2,4 raíces), pero inferiores al número de raíces generados por las líneas ALM6 (2,3-4,6) y TGR3 (4,7-5,6).

#### **4.9. EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA A *P. CINNAMOMI* EN PLANTAS CULTIVADAS *IN VITRO***

Para evaluar la tolerancia a *P. cinnamomi* de las plantas transformadas con el gen *CsTLL1* se utilizaron plantas de alcornoque y encina procedentes del enraizamiento de brotes axilares y dispuestas sobre un puente de papel en tubos con medio líquido, tal y como se muestra en la Figura 36. Las plantas de alcornoque y encina así cultivadas fueron infectadas con zoosporas del oomiceto. Las zoosporas fueron obtenidas de acuerdo con el método descrito por Cuenca *et al.* (2010) (apartados 3.11.1. y 3.11.2. de Material y Métodos). Brevemente, la cepa de *P.cinnamomi*, que había sido aislada a partir de las raíces infectadas de encinas procedentes de Valverde de Mérida (Badajoz) (Corcobado *et al.* 2016), fue reactivada y las zoosporas se obtuvieron tras 24h de incubación en la solución de sales de Chen y Zentmyer (1970) bajo luz negra, se comprobó que los inóculos de micelio habían producido esporangios, y que estos estaban lo suficientemente maduros como para inducir la esporulación (ver Figura 6 de Material y Métodos). Se eligió este método de inoculación porque de esta manera la infección se realizaría mediante el enquistamiento de las zoosporas en las raíces, tal y como ocurre en la naturaleza (Ruíz-Gómez *et al.* 2012). También era

un proceso fácil y rápido que permitía infectar a un gran número de plantas a la vez.

Una vez infectadas las plantas de alcornoque y encina se realizaron dos tipos de experimentos para evaluar su grado de tolerancia al oomiceto, por un lado, se estudió la incidencia del oomiceto en diferentes órganos de las plantas infectadas, y por otro lado se cuantificaron los días de supervivencia de las plantas infectadas.

#### 4.9.1. Evaluación de la tolerancia en alcornoque

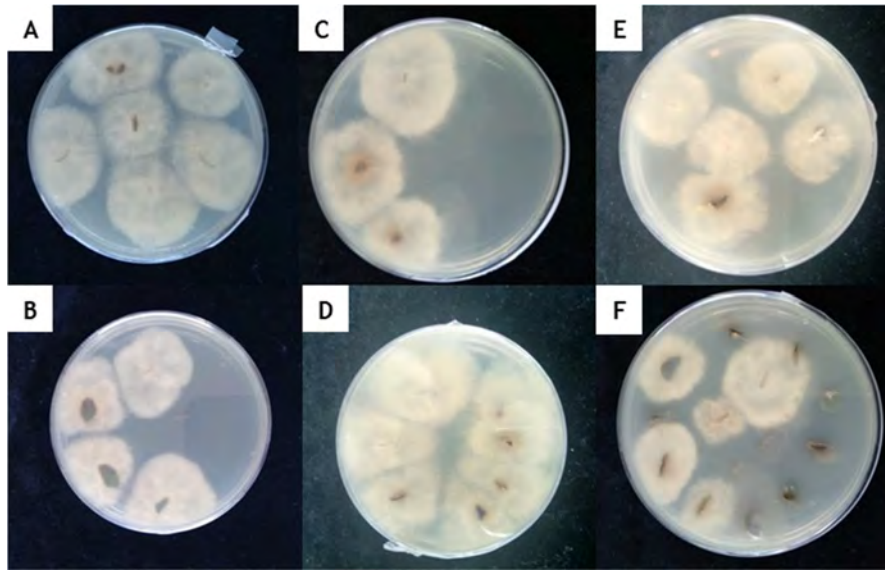
En los ensayos de tolerancia en alcornoque se utilizaron plantas derivadas de las líneas que tenían los mayores niveles de expresión del gen *CsTL1*. En la Tabla 19, se resumen las líneas utilizadas en la evaluación de la tolerancia al oomiceto junto con sus correspondientes niveles de expresión para el gen *CsTL1*.

En el primer experimento se evaluó la incidencia del oomiceto en raíz, tallo y hojas de las plantas infectadas y aislados a los 7 y 15 días desde el inicio de la infección. Estos resultados podrían ayudar a comprender cómo se comportan las plantas frente a la infección del oomiceto. Tras el correspondiente tiempo de infección, se recuperaron los órganos, con independencia de si mostraban síntomas de necrosis o

Tabla 19. Líneas de alcornoque utilizadas en los ensayos de tolerancia *in vitro* y sus niveles de expresión para el gen *CsTL1*.

LÍNEAS	NIVEL DE EXPRESIÓN
ALM6-wt	1,0 ± 0,0
ALM6-tau 1	14,0 ± 1,0
ALM6-tau 6	29,2 ± 1,7
ALM80-wt	1,0 ± 0,0
ALM80-tau 19	24,9 ± 1,1
ALM80-tau 20	22,9 ± 1,4
TGR3-wt	1,0 ± 0,0
TGR3-tau 5	2,7 ± 0,4
TGR3-tau 6	2,5 ± 0,2
TGR3-tau 18	2,4 ± 0,4
TGR3-tau 21	5,4 ± 0,6

no, y se inocularon en medio V8-agar, para recuperar el oomiceto (Figura 38).



**Figura 38.** Recuperación del oomiceto a partir de los órganos de las plantas infectadas. A: ALM6-wt; B: ALM6 transformada. C: ALM80-wt; D: ALM80 transformada. E: TGR3-wt; F: TGR3 transformada. El halo blanco indica el crecimiento del micelio a partir del órgano aislado.

En general, se observó que el primer síntoma de la infección aparecía en las raíces. Dependiendo de la planta, las raíces podían adquirir una tonalidad más amarilla, dorada o marrón, en toda su superficie o en la sección de la raíz cercana al tallo de la planta. Los siguientes síntomas se observaban en el tallo, con la aparición de una mancha marrón oscura o negra que ascendía gradualmente por el tallo (Figuras 39, 40 y 41). Esta mancha podía penetrar en las hojas a través del peciolo. Los síntomas de infección en las hojas eran muy diversos. En muchos casos, tan sólo se percibía un leve amarilleamiento de la superficie de la hoja, en especial si estas se encontraban en la parte más apical del tallo y no habían sido alcanzadas por la necrosis principal. En los casos de infección más severa, las hojas mostraban manchas marrones o negras que crecían desde el peciolo y que podían colonizar tan sólo una parte de la hoja (la parte basal o la superficie cercana a la nervadura), o en los casos de infección más severa, toda su superficie.

Se consideraba que una planta estaba muerta cuando el 100% de sus órganos estaban afectados por la necrosis y no se observaban signos de crecimiento en la planta.

En las plantas ALM6, tras aislar sus órganos 7 días después de la infección (Tabla 20), se obtuvieron porcentajes de reaislamiento muy similares entre las plantas transgénicas y no transgénicas en tallos y hojas. Sin embargo, las raíces de ALM6-tau 6 presentan un porcentaje significativamente menor ( $p \leq 0,05$ ) de reaislamiento (65,8%) que la línea ALM6-tau 1 (91,6%) y la línea sin transformar (90,0%) (Tabla 20). No se obtuvieron diferencias significativas entre el porcentaje de reaislamiento en tallo y en hojas, siendo estos porcentajes superiores al 90% en todos los casos, aunque de nuevo la línea ALM6-tau 6 mostró un porcentaje de reaislamiento ligeramente menor que las otras líneas evaluadas (Tabla 20).

Tabla 20. Porcentaje de recuperación del oomiceto *P. cinnamomi* en los órganos (raíz, tallo y hojas) de las plantas infectadas del genotipo ALM6.

TIEMPO DE INFECCIÓN	LÍNEAS	% REAISLAMIENTO		
		RAIZ	TALLO	HOJAS
7 DÍAS	ALM6-wt	90,0±25,4	100,0±0,0	96,3±15,3
	ALM6-tau 1	91,6±17,9	100,0±0,0	97,2±11,5
	ALM6-tau 6	65,8±34,3	95,0±14,2	91,1±16,8
	F-test	$p \leq 0,05$	ns	ns
15 DÍAS	ALM6-wt	99,2±3,2	88,6±26,1	98,6±5,7
	ALM6-tau 1	90,1±25,3	76,4±37,4	94,8±15,3
	ALM6-tau 6	83,3±33,3	68,2±38,2	89,9±24,9
	F-test	ns	ns	ns

Cada valor representa la media ± el error estándar de 3 repeticiones con 6 explantos cada una. Los datos fueron analizados mediante ANOVA I ( $p \leq 0,05$ ). ns: no significativo.

En los órganos aislados a los 15 días (Figura 38 A y B; Tabla 20), se obtuvieron porcentajes de reaislamiento más bajos en los órganos de todas las líneas, especialmente en el tallo. El porcentaje de reaislamiento del oomiceto en las líneas transformadas fue menor que en la línea sin transformar, pero sin diferencias significativas.

De las dos líneas transgénicas de ALM6 evaluadas, la línea ALM6-tau 6, que mostraba mayor expresión del gen *CsTLL1* (Tabla 19), obtuvo un menor porcentaje de reaslamiento del oomiceto, lo que podría indicar que la expresión de la taumatina podría estar frenando el avance de la infección. En la Figura 39 se muestran plantas transgénicas y no

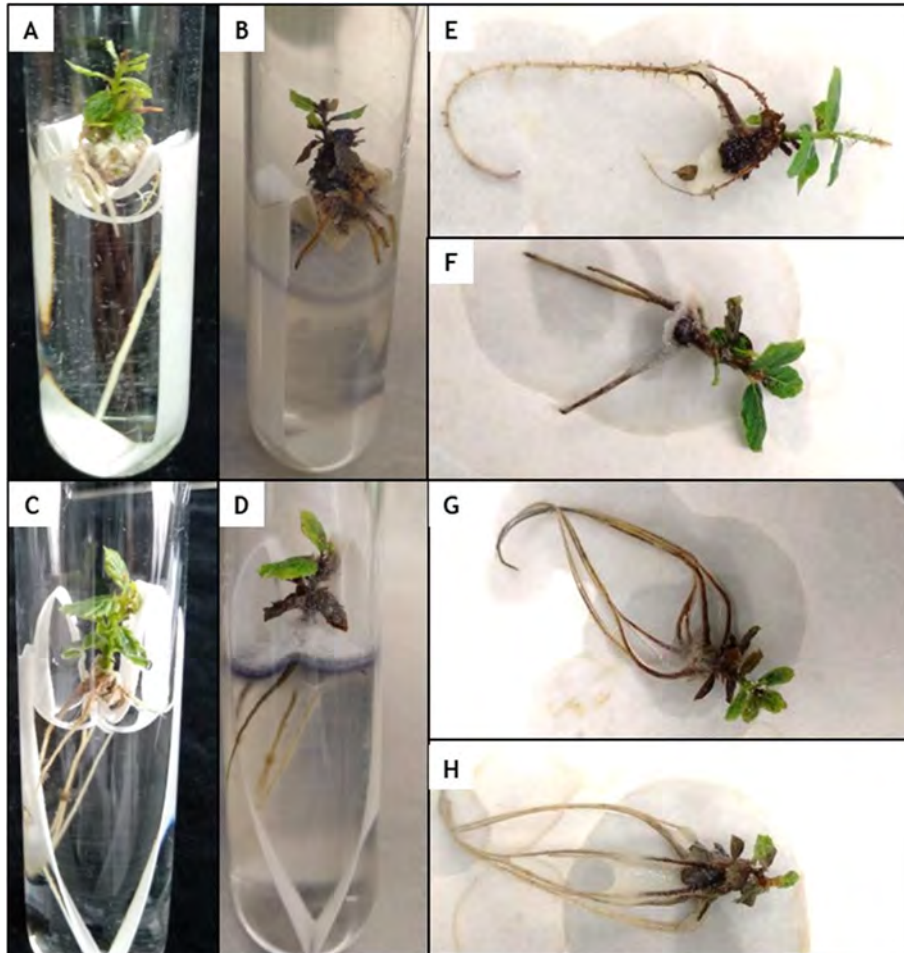


Figura 39. Evolución en el tiempo de la infección en plantas del genotipo ALM6 de alcornoque. A, B: Aspecto de una planta ALM6-wt el día de la infección (t0, A) y 15 días después de la infección (B). C, D: Aspecto de una planta de una línea transformada en el día de la infección (t0, C) y 15 días después de la infección (D). E-H: Diferencias en la resistencia frente a *P. cinnamomi* 15 días después de la infección. Sólo raíces y tallo afectados (E); Raíces, tallos y hojas basales infectadas (F, G); Planta totalmente infectada (H).

transgénicas con diferentes grados de infección después de 15 días de infección.

En los órganos de las plantas de ALM80 aislados después de 7 días de infección se observó en todas las líneas que los porcentajes de reaislamiento eran menores en las raíces, en comparación con los valores de reaislamiento obtenidos en el tallo o las hojas (Tabla 21). En las raíces, las plantas de la línea ALM80-tau 19 presentaron menor porcentaje de reaislamiento que las otras líneas (56,7%), pero sin diferencias significativas. En tallo y hojas no se apreciaron diferencias significativas entre las líneas transformadas y sin transformar, y los valores obtenidos son similares para todas las líneas (Tabla 21).

Tabla 21. Porcentaje de recuperación del oomiceto *P. cinnamomi* en los órganos (raíz, tallo y hojas) de las plantas infectadas del genotipo ALM80.

TIEMPO DE INFECCIÓN	LÍNEAS	% REAISLAMIENTO		
		RAIZ	TALLO	HOJAS
7 DÍAS	ALM80-wt	86,1±32,5	100,0±0,0	96,3±15,3
	ALM80-tau 19	56,7±44,9	97,2±11,4	97,2±11,5
	ALM80-tau 20	83,0±31,6	100,0±0,0	91,1±16,8
	F-test	ns	ns	ns
15 DÍAS	ALM80-wt	90,3±22,3	100,0±0,0	100,0±0,0
	ALM80-tau 19	84,2±35,4	100,0±0,0	94,8±15,3
	ALM80-tau 20	75,2±33,9	68,2±38,2	89,9±24,9
	F-test	ns	ns	ns

Cada valor representa la media ± el error estándar de 3 repeticiones con 6 explantos cada una. Los datos fueron analizados mediante ANOVA I ( $p \leq 0,05$ ). ns: no significativo.

En los órganos aislados a los 15 días, no se hallaron diferencias significativas entre las líneas transformadas y sin transformar, aunque se puede apreciar que el porcentaje de reaislamiento es ligeramente menor en las líneas transformadas que en la línea control (Tabla 21). Los porcentajes más bajos de recuperación del oomiceto se obtuvieron con la línea ALM80-tau 20, especialmente en tallo (68,2%).

En ALM80, aunque era más frecuente recuperar el oomiceto de los órganos necrosados, también podía obtenerse a partir de órganos que aparentaban estar sanos (Figura 38 C, D). En la Figura 40, pueden

observarse plantas transgénicas y no transgénicas con diferentes grados de infección del genotipo ALM80.

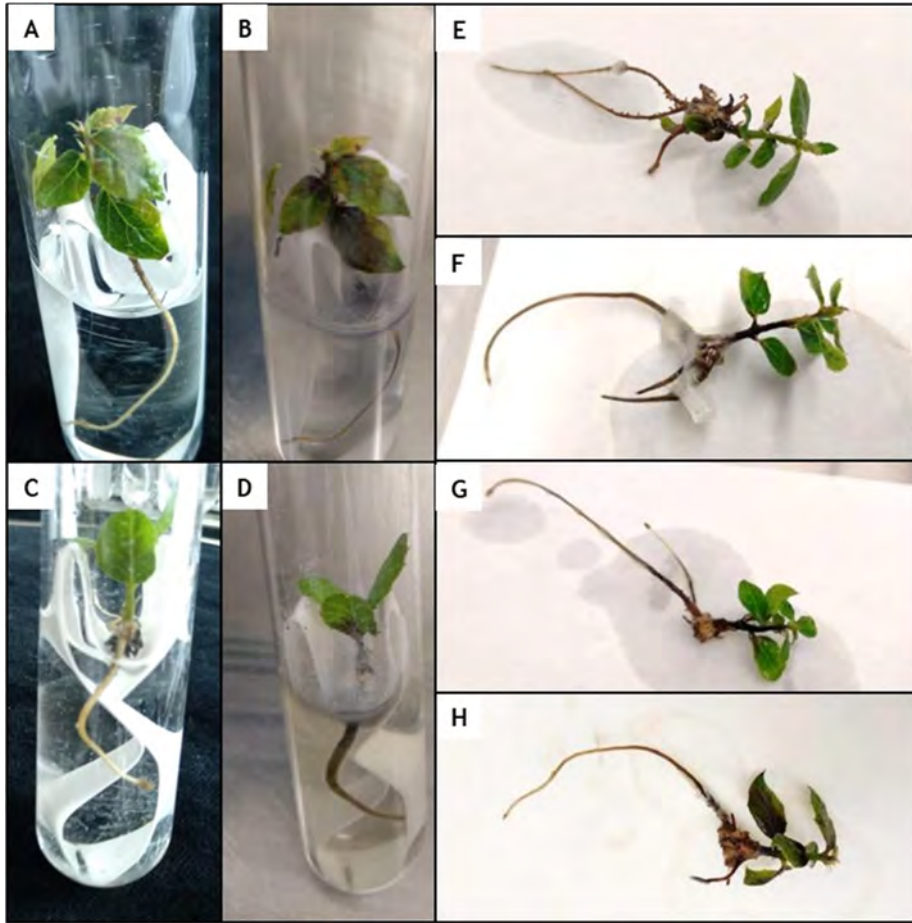


Figura 40. Evolución en el tiempo de la infección en plantas del genotipo ALM80 de alcornoque. A, B: Aspecto de una planta ALM80-wt el día de la infección (t0, A) y 15 días después de la infección (B). C, D: Aspecto de una planta de una línea transformada en el día de la infección (t0, C) y 15 días después de la infección (D). E-H: Diferencias en la resistencia frente a *P. cinnamomi* 15 días después de la infección. Sólo raíces y tallo afectados (E); Raíces, tallos y hojas basales infectadas (F, G); Planta totalmente infectada (H).

En los órganos aislados de las plantas de TGR3 después de 7 días de infección, se comprobó que no existían diferencias significativas en los porcentajes de reaislamiento del patógeno a partir de las raíces y

tallos (Tabla 22). En las raíces, las líneas TGR3-tau 5 (84,8%) y TGR3-tau 18 (86,1%) presentaban porcentajes de reislamiento menores que la línea sin transformar (89,8%), mientras que las líneas TGR3-tau 6 (91,0%) y TGR3-tau 21 (97,7%) mostraron mayor porcentaje de reislamiento que el control (Tabla 22). En el tallo, las líneas TGR3-tau 6 y TGR3-tau 21 presentaron menor porcentaje de reislamiento que la línea sin transformar. En hojas sí se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ), obteniéndose los menores porcentajes de reislamiento en la línea TGR3-tau 6 (77,7%).

Tabla 22. Porcentaje de recuperación del oomiceto *P. cinnamomi* en los órganos (raíz, tallo y hojas) de las plantas infectadas del genotipo TGR3.

TIEMPO DE INFECCIÓN	LÍNEAS	% REAISLAMIENTO		
		RAÍZ	TALLO	HOJAS
7 DÍAS	TGR3-wt	89,8±19,6	97,2±11,5	95,3±14,6
	TGR3-tau 5	84,8±27,2	97,2±11,5	95,9±9,5
	TGR3-tau 6	91,0±25,6	95,8±17,2	77,7±24,8
	TGR3-tau 18	86,1±29,4	100,0±0,0	99,1±3,8
	TGR3-tau 21	97,7±6,7	94,4±22,9	90,4±16,0
	F-test	ns	ns	$p \leq 0,05$
15 DÍAS	TGR3-wt	85,4±27,0	91,7±25,0	87,5±22,9
	TGR3-tau 5	74,1±37,2	93,1±20,1	95,8±12,5
	TGR3-tau 6	79,2±29,7	91,4±17,0	76,8±22,0
	TGR3-tau 18	77,7±27,6	100,0±0,0	90,0±23,1
	TGR3-tau 21	88,6±23,1	88,9±20,8	72,8±37,0
	F-test	ns	ns	$p \leq 0,05$

Cada valor representa la media  $\pm$  el error estándar de 3 repeticiones con 6 explantos cada una. Los datos fueron analizados mediante ANOVA I ( $p \leq 0,05$ ). ns: no significativo.

En los órganos aislados a los 15 días (Figura 38 E, F), no se hallaron diferencias significativas entre las líneas transformadas y sin transformar, en los porcentajes de reislamiento medidos en raíz (Tabla 22). Sólo la línea TGR3-tau 21 presentó mayor porcentaje de reislamiento del micelio a partir de raíz (88,6%) que la línea sin transformar. En los porcentajes de reislamiento medidos en tallo, tampoco se hallaron diferencias significativas entre las líneas, aunque en este caso fue la línea TGR3-tau 21 la que menor porcentaje de

reaislamiento presentó (88,9%), mientras que la línea TGR3-tau 18 tuvo una infección del 100%. Sí se apreciaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre las líneas al comparar los porcentajes de reaislamiento a partir de hojas (Tabla 22). En este órgano, las líneas TGR3-tau 21 (72,8%) y TGR3-tau 6 (76,8%) mostraron porcentajes de reaislamiento más bajos que la línea sin transformar (87,5%), mientras que en TGR3-tau 18 (90,0%) y TGR3-tau 5 (95,8%) los porcentajes de reaislamiento fueron más altos (Tabla 22). En las hojas los porcentajes de reaislamiento más bajos se obtuvieron en la línea transformada que tenía mayor expresión del gen *CsTL1* lo que podría indicar que la expresión de la taumatina podría intervenir en el avance de la infección. En la Figura 41, se muestran plantas transformadas y no transformadas del genotipo TGR3 con diferentes grados de infección.

En un segundo experimento, las líneas transformadas de alcornoque y sus correspondientes no transformadas fueron infectadas con el objetivo de determinar si la sobre-expresión de la taumatina podría afectar a la supervivencia de las líneas transgénicas y no transformadas. El tiempo de supervivencia se evaluó desde el momento de la infección hasta que la planta mostraba signos de infección en todos sus órganos (necrosis en raíces, tallo y hojas, y pérdida de hojas). Se tomaron datos todos los días hasta alcanzar 31 días, momento en el que se dio por finalizado el experimento.

En todas las plantas se observó primero un ligero oscurecimiento de las raíces, seguido por necrosamiento del tallo y de las hojas inferiores. Se observó que las hojas más bajas tendían a necrosarse en cuanto el micelio crecía y colonizaba el puente de papel. Sin embargo, la infección avanzaba más despacio en la parte superior del tallo, en especial en las plantas transformadas. El avance de la infección en las hojas se observó mediante el crecimiento de las manchas de necrosis desde el pedúnculo de la hoja hasta la punta. Sólo se necrosaron aquellas hojas que estaban en contacto con la sección de tallo infectado.

En el genotipo ALM6, las líneas ALM6-tau 6 y tau 1 sobrevivieron significativamente ( $p \leq 0,05$ ) más tiempo (19,9 y 19,2 días,

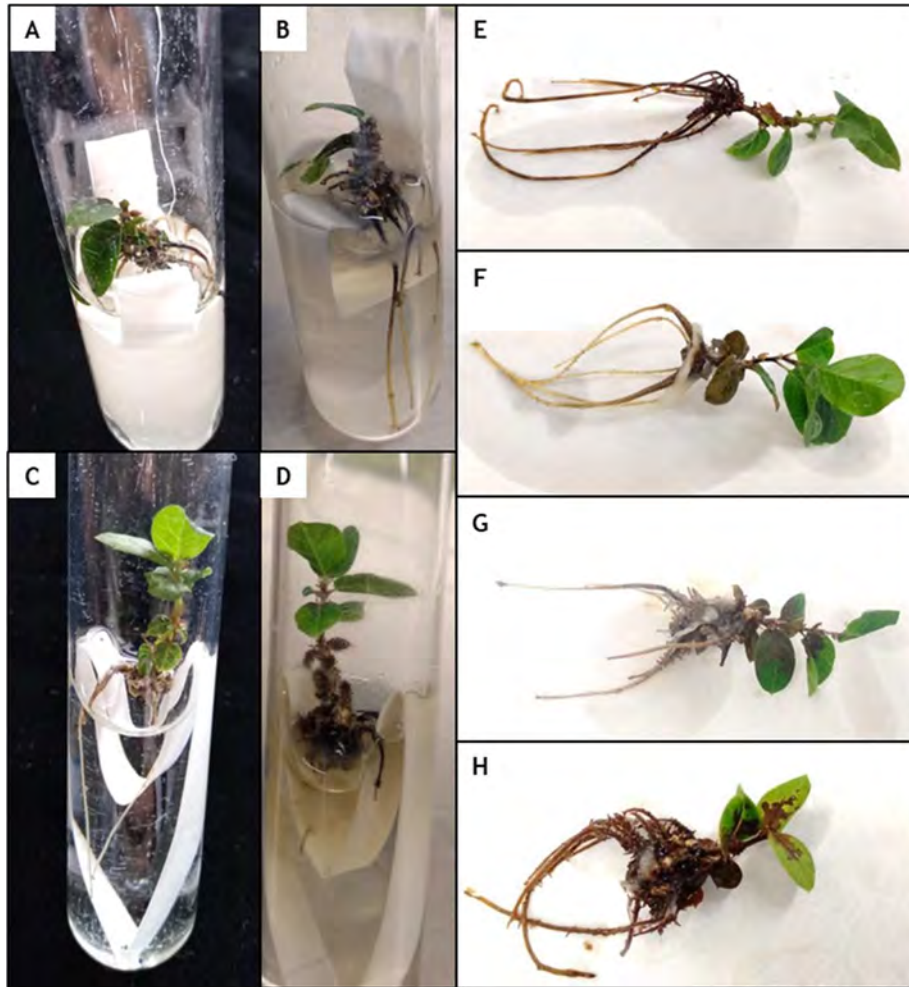


Figura 41. Evolución en el tiempo de la infección en plantas del genotipo TGR3 de alcornoque. A, B: Aspecto de una planta TGR3-wt el día de la infección (t0, A) y 15 días después de la infección (B). C, D: Aspecto de una planta de una línea transformada en el día de la infección (t0, C) y 15 días después de la infección (D). E-H: Diferencias en la resistencia frente a *P. cinnamomi* 15 días después de la infección. Sólo raíces y tallo afectados (E); Raíces, tallos y hojas basales infectadas (F, G); Planta totalmente infectada (H).

respectivamente) que la línea ALM6-wt (11,1 días) (Figura 42). La infección tardó más en avanzar en las líneas transformadas, y las plantas wt mostraban mayor grado de necrosis y decaimiento que las transformadas (Figura 39 B y D, respectivamente). Estos resultados se

corresponden con los datos de expresión del gen *CsTLL1* observados en estas líneas (Tabla 19), de tal forma que las líneas transgénicas con mayor expresión del gen de la taumatina son también las que sobreviven más días frente a la infección del patógeno, en comparación con la línea control.

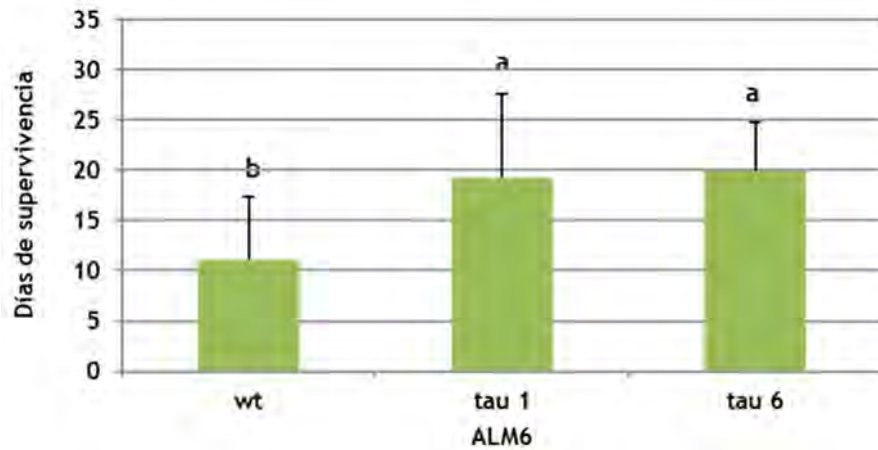


Figura 42. Supervivencia de las líneas ALM6 de alcornoque infectadas con *P. cinnamomi* durante un periodo de 31 días. Por cada línea se evaluaron 18 plantas en total. Datos analizados mediante ANOVA I ( $p \leq 0,05$ ). Cada valor representa la media  $\pm$  error estándar de 3 repeticiones. Las semibarras representan el error estándar. Las columnas con la misma letra no difieren significativamente para una  $p=0,05$  (test Duncan).

En el genotipo ALM80, ambas líneas transformadas sobrevivieron de forma significativa ( $p \leq 0,05$ ) más días frente a la infección del oomiceto (23,2 días en ALM80-tau 20 y 18,1 días en ALM80-tau 19) que la línea sin transformar (11,5 días) (Figura 43).

El avance de los signos de la infección era mucho más evidente y rápido en las plantas sin transformar que en las transformadas (Figura 40 B y D, respectivamente). Esto se corresponde con los niveles de expresión de *CsTLL1* observados en estas líneas (Tabla 19), de tal forma que las líneas transgénicas en las que la expresión del gen *CsTLL1* es

mayor son las que sobreviven más días frente a la infección del patógeno, en comparación con la línea control.

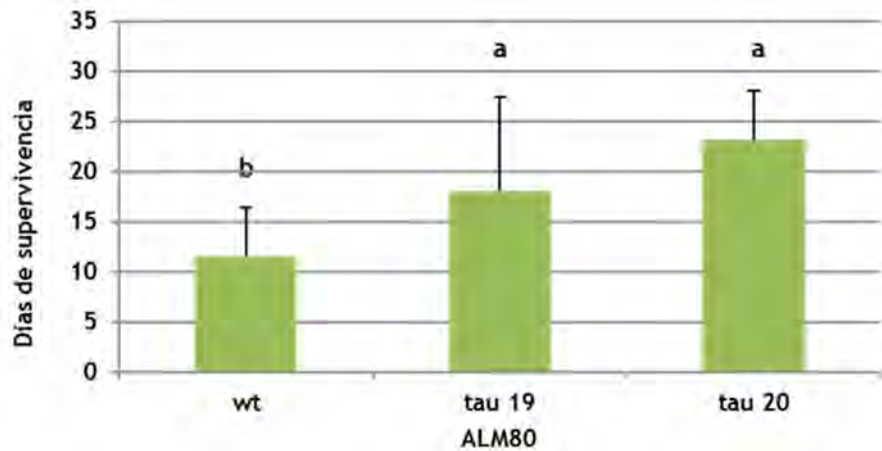


Figura 43. Supervivencia de las líneas ALM80 de alcornoque infectadas con *P. cinnamomi* durante un período de 31 días. Por cada línea se evaluaron 18 plantas en total. Datos analizados mediante ANOVA I ( $p \leq 0,05$ ). Cada valor representa la media  $\pm$  error estándar de 3 repeticiones. Las semibarras representan el error estándar. Las columnas con la misma letra no difieren significativamente para una  $p=0,05$  (test Duncan).

En el genotipo TGR3, las plantas de la línea TGR3-tau 18 sobrevivieron menos tiempo frente a la infección (10,2 días) que la línea control (13,1 días) (Figura 44). Las otras tres líneas transgénicas evaluadas mostraron significativamente ( $p \leq 0,05$ ) mayor capacidad de supervivencia (22,3, 25,2 y 29,5 días en las líneas TGR3-tau 5, tau 6 y tau 21, respectivamente) que la línea control (Figura 44).

Los datos obtenidos en la línea TGR3-tau 21 se correlacionan claramente con una mayor sobre-expresión del gen *CsTL1*. Por otro lado, aunque las líneas TGR3-tau 5, tau 6 y tau 18 muestran niveles de expresión del gen de la taumatina similares, los días de supervivencia son significativamente mayores en las líneas TGR3-tau 5 y tau 6.

Si se comparan las líneas ALM6, ALM80 y TGR3 entre sí, se puede apreciar que los días de supervivencia están afectados de forma

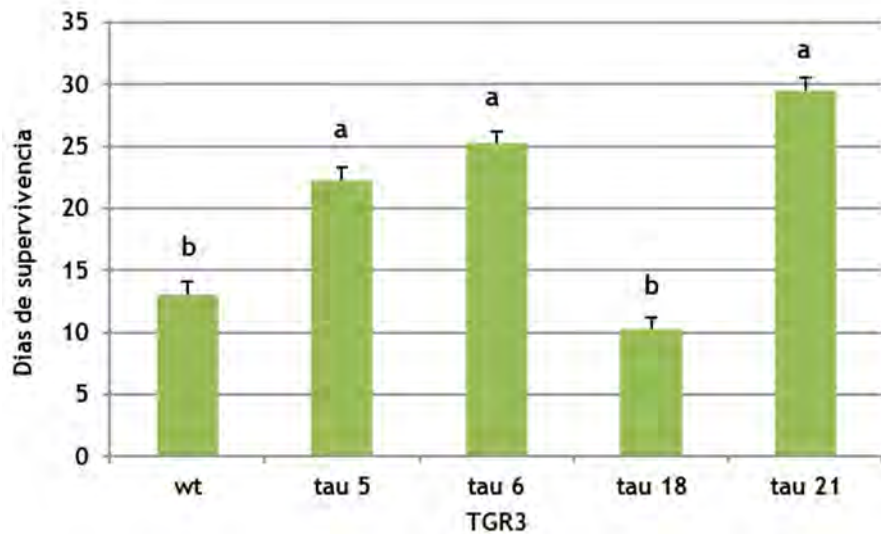


Figura 44. Supervivencia de las líneas TGR3 de alcornoque infectadas con *P. cinnamomi* durante un periodo de 31 días. Por cada línea se evaluaron 18 plantas en total. Datos analizados mediante ANOVA I ( $p \leq 0,05$ ). Cada valor representa la media  $\pm$  error estándar de 3 repeticiones. Las semibarras representan el error estándar. Las columnas con la misma letra no difieren significativamente para una  $p=0,05$  (test Duncan).

significativa ( $p \leq 0,05$ ) por la línea (Figura 45). Los controles sin transformar muestran periodos de supervivencia similares (ALM6-wt 11,05 días, ALM80-wt 11,5 días y TGR3-wt 13,1 días respectivamente). De los tres genotipos, las líneas transgénicas TGR3-tau 21, tau 6 y tau 5, y la línea ALM80-tau 20 son las que significativamente ( $p \leq 0,05$ ) sobreviven más días (Figura 45). En medio de cultivo líquido se observó un menor crecimiento del micelio en el medio de los tubos en los que estaban incubadas las plantas con mayor expresión de taumatina. Se observó todo lo contrario en los tubos de las plantas wt, en los cuales el micelio creció con mayor virulencia.

Al finalizar los 31 días del experimento, se recuperaron con vida el 11,1% (2 de 18 plantas infectadas) de las plantas de la línea ALM6-tau 6, y el 22,2% (4 de 18 plantas infectadas) de las plantas de la línea ALM6-tau 1, pero todas las plantas sin transformar murieron antes de finalizar el experimento. En el genotipo ALM80, se rescataron con vida el 22,2% (4 de 18 plantas infectadas) de las plantas de la línea ALM80-

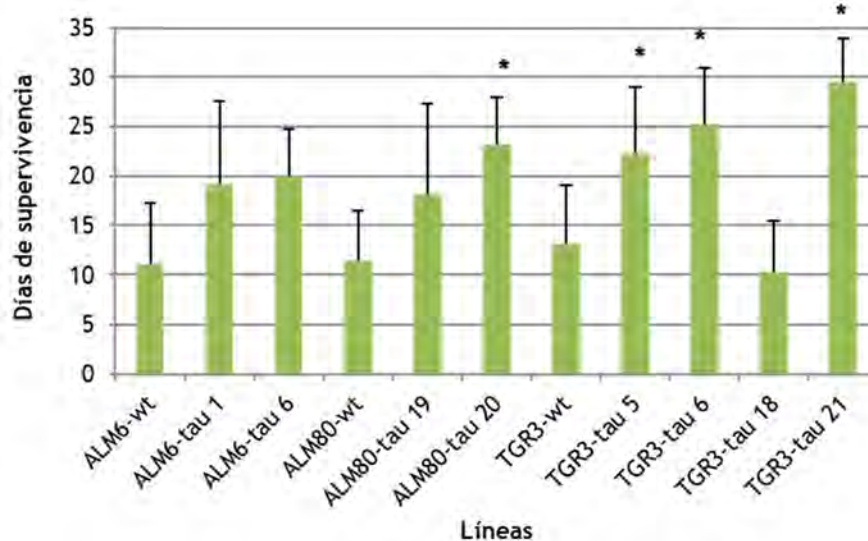


Figura 45. Días de supervivencia de las líneas de alcornoque infectadas con *P. cinnamomi* durante un período de 31 días. Por cada línea se evaluaron 18 plantas en total. Datos analizados mediante el análisis de Kruskal-Wallis ( $p \leq 0,05$ ). Las semibarras representan el error estándar. Los asteriscos representan las líneas que mostraron significativamente ( $p \leq 0,05$ ) más días de supervivencia.

tau 19, y el 11,1% (2 de 18 plantas infectadas) de las plantas de la línea ALM80-tau 20, pero ninguna planta de la línea ALM80-wt sobrevivió hasta el final del experimento. Para el genotipo TGR3 tampoco se recuperó ninguna planta de las líneas TGR3-wt y TGR3-tau 18 al finalizar el experimento, pero se consiguió recuperar el 33,3% (6 de 18 plantas infectadas) de las plantas de la línea TGR3-tau 5, 44,4% (8 de 18 plantas infectadas) de TGR3-tau 6, y 88,8% (16 de 18 plantas infectadas) de TGR3-tau 21. Las plantas supervivientes se recuperaron y se proliferaron normalmente (datos no mostrados).

#### 4.9.2. Evaluación de la tolerancia en encina

En general, la calidad de las plantas de encina en términos de longitud de brote fue peor que en alcornoque. Los brotes eran de por sí más pequeños en longitud, por lo que la infección avanzaba más rápidamente. En la Tabla 23, se resumen las líneas utilizadas en el ensayo de infección y sus correspondientes niveles de expresión para el gen *CsTLL1*.

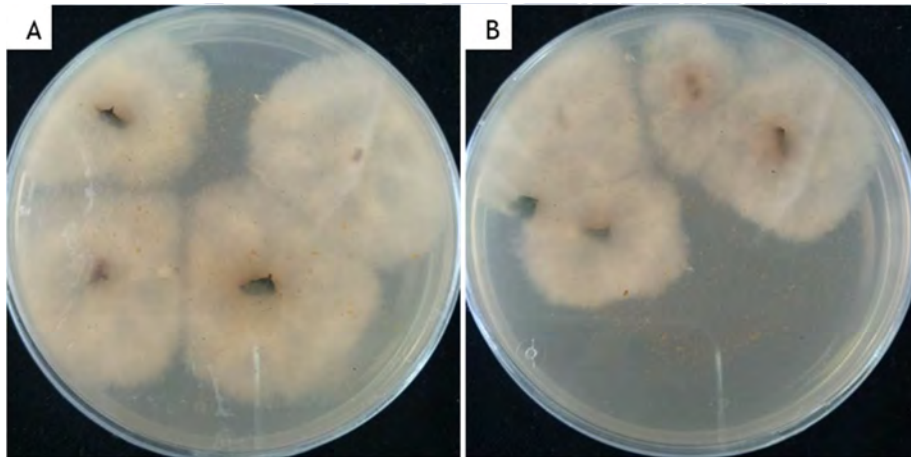
Tabla 23. Nivel de expresión del gen *CsTL1* en cada una de las líneas transformadas y no transformadas de encina usadas en los ensayos de tolerancia.

LÍNEAS	NIVEL DE EXPRESIÓN
Q8-wt	1,0 ± 0,0
Q8-tau 4	2,6 ± 0,3
Q8-tau 7	1,8 ± 0,3
Q8-tau 14	5,7 ± 0,1
Q8-tau 35	2,3 ± 0,4
Q8-tau 36	6,0 ± 0,5

Al igual que en el alcornoque, en el primer experimento se evaluó la incidencia del oomiceto en los órganos (raíz, tallo y hojas). Para ello se aislaron dichos órganos después de 7 y 15 días de infección.

Al aislar los órganos de las plantas Q8 infectadas durante 7 días se observó que el porcentaje de reisolamiento del oomiceto era ligeramente menor en raíces que en tallos o en hojas (Tabla 23). Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas. Si se comparan las líneas entre sí, se puede apreciar que las líneas con menor porcentaje de reisolamiento son Q8-tau 7 y Q8-tau 14 (Tabla 24). La menor incidencia de la infección en la raíz podría explicarse por la colocación de la planta

Figura 46. Recuperación del oomiceto a partir de los órganos de las plantas infectadas tras 15 días de infección. A: Q8-wt; B: Q8-tau 36. El halo blanco indica el crecimiento del micelio a partir del órgano aislado.



en el experimento. El bloque de agar sobre el que crece el micelio tendía a flotar, situándose debajo del puente de papel, ocasionando el crecimiento del micelio sobre el papel, y pudiendo facilitar la infección a través del callo o del tallo, en lugar de por la parte apical de la raíz. Estas diferencias desaparecían según aumentaba el tiempo de infección, ya que la infección avanzaba igualmente por todos los órganos de la planta (Tabla 24).

En los órganos aislados a los 15 días, se obtuvieron porcentajes de reaislamiento del 100% en los órganos de todas las líneas (Tabla 24, Figura 46).

**Tabla 24. Porcentajes de infección en raíces, tallos y hojas obtenidos a partir de plantas enraizadas de encina.**

TIEMPO DE INFECCIÓN	LÍNEAS	% REAISLAMIENTO		
		RAIZ	TALLO	HOJAS
7 DÍAS	Q8-wt	97,2±11,5	100,0±0,0	95,1±20,0
	Q8-tau 4	92,3±21,7	100,0±0,0	100,0±0,0
	Q8-tau 7	83,5±30,1	100,0±0,0	100,0±0,0
	Q8-tau 14	77,6±37,1	100,0±0,0	100,0±0,0
	Q8-tau 35	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
	Q8-tau 36	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
	F-test	ns	ns	ns
15 DÍAS	Q8-wt	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
	Q8-tau 4	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
	Q8-tau 7	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
	Q8-tau 14	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
	Q8-tau 35	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
	Q8-tau 36	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
	F-test	ns	ns	ns

Cada valor representa la media ± el error estándar de tres repeticiones con 18 explantos cada una. Los datos fueron analizados mediante ANOVA I ( $p \leq 0,05$ ). ns, no significativo.

En un segundo experimento, las mismas líneas fueron infectadas con el objetivo de determinar los días de supervivencia de cada línea frente al patógeno. Este experimento se desarrolló durante un período de 31 días. Se observó que el número de días de supervivencia frente al

patógeno está afectado significativamente ( $p \leq 0,05$ ) por la línea. Las líneas que mostraron un mayor número de días de supervivencia fueron Q8-tau 4, Q8-tau 14 y Q8-tau 7, las cuales tenían unos niveles intermedios de expresión del gen *CsTL1*. Por el contrario, Q8-tau 36, que era la línea con mayor expresión del gen, sobrevivió menos días que la línea sin transformar y que la línea Q8-tau 35, que era la línea transformada con menor expresión (Figura 47). Con la excepción de la línea Q8-tau 14, no hay relación directa entre los días de supervivencia frente a *P. cinnamomi* y el nivel de expresión del gen *CsTL1* por parte de las líneas transgénicas de encina (Tabla 23).

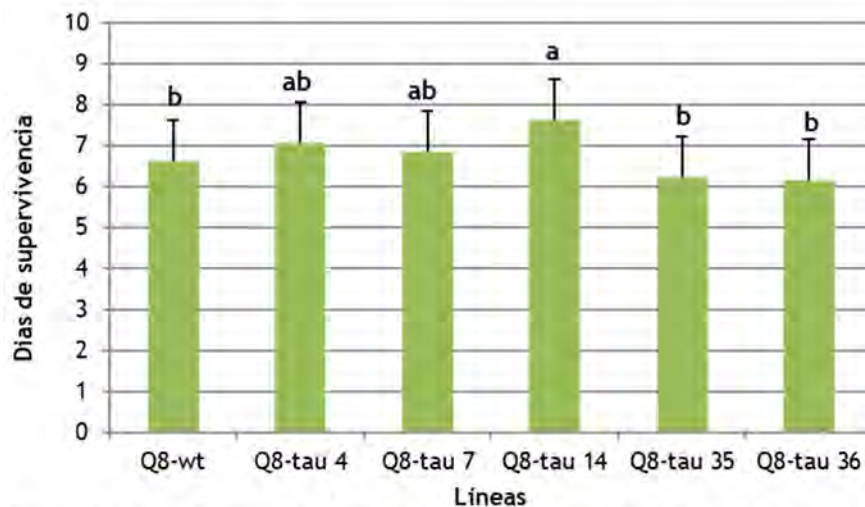


Figura 47. Días de supervivencia de las líneas enraizadas de encina, infectadas con *P. cinnamomi* durante un período de 31 días. Por cada línea se evaluaron 18 plantas en total. Datos analizados mediante ANOVA I ( $p \leq 0,05$ ). Las semibarras representan el error estándar. Las columnas con la misma letra no difieren significativamente para una  $p=0,05$  (test de Duncan).

El avance de la infección en encina fue muy rápido, tanto en plantas transformadas como en los controles sin transformar (Figura 48). Las raíces de las plantas se volvieron totalmente negras en menos de una semana, y la infección pasó rápidamente al tallo. Debido a su escaso tamaño, los tallos fueron rápidamente infectados, adquiriendo un color marrón oscuro o negro. Las hojas, debido a su gran número y cercanía, también fueron infectadas con la misma rapidez. En general, una planta

de encina podía estar totalmente infectada dos días después de que el tallo mostrase los primeros síntomas de necrosis, sin encontrarse diferencias entre las líneas transformadas y sin transformar, probablemente debido a las características intrínsecas de las plantas de encina, con raíces y brotes de menor longitud que en alcornoque. El micelio creció con igual virulencia en los tubos de todas las plantas, tanto transformadas como controles, colonizando rápidamente el medio líquido y los puentes de papel.

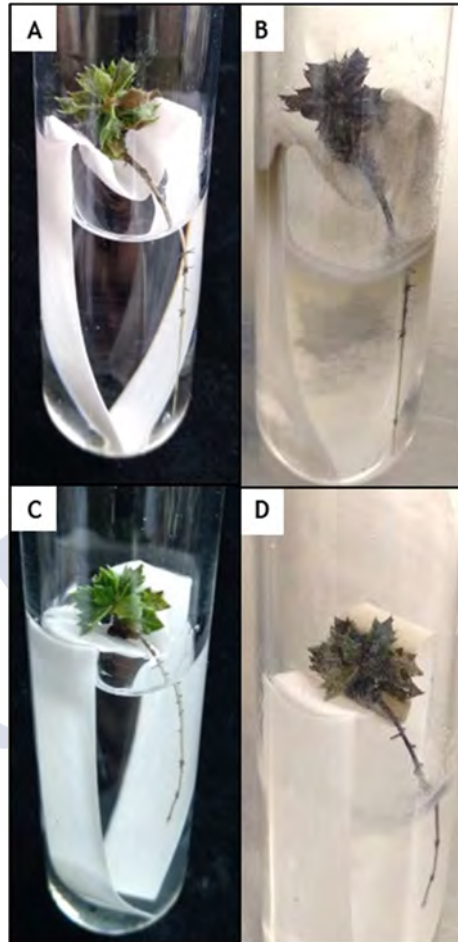


Figura 48. Evolución de la infección en plantas del genotipo Q8 de encina. A, B: plantas de Q8-wt en el día de la infección (A) y 7 días después de la infección (B). C, D: Planta de una línea transformada en el día de la infección (C) y 7 días después de la infección (D).

En conclusión, los resultados obtenidos a partir de los dos test utilizados para estudiar la tolerancia de las plantas transformadas indican que el número de días que sobreviven las plantas puede ser un buen indicador de la tolerancia al oomiceto. En alcornoque, los datos obtenidos a partir de este experimento son coherentes con los datos de expresión del gen *CsTL1*, de manera que, en general, las plantas con mayor expresión sobreviven más días que los controles. En encina, los datos de supervivencia no son tan concluyentes, aunque probablemente se deba a la calidad de las plantas usadas en el ensayo. La evaluación mediante la incidencia del oomiceto en diferentes órganos ofreció resultados menos concluyentes en ambas especies. Únicamente en las líneas ALM6 se observa claramente una mayor tolerancia en las plantas transgénicas que no transgénicas.



## 5. DISCUSIÓN





Los estudios realizados en esta tesis tuvieron como principal objetivo determinar si la sobre-expresión del gen *CsTL1*, que codifica una proteína tipo taumatina, puede inducir la tolerancia/resistencia a *P. cinnamomi* en plantas transgénicas de alcornoque y encina. En otras especies, se ha comprobado que la sobre-expresión de genes que codifican proteínas de este tipo aumentan la resistencia frente a enfermedades causadas por hongos y oomicetos, como por ejemplo contra *P. cinnamomi* en naranjo (Fagoaga *et al.* 2001), *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia homoeocarpa* en *Agrostis* (Fu *et al.* 2005), *Fusarium graminearum* en trigo (Mackintosh *et al.* 2007), *Verticillium dahliae* en tabaco (Munis *et al.* 2010), *Erysiphe necator* en vid (Dhekney *et al.* 2011), *Fusarium oxysporum* en plátano (Mahdavi *et al.* 2012) o contra *C. gloeosporioides* f. sp. *manihotis* en yuca (Odeny Ojola *et al.* 2018).

El paso previo a evaluar el efecto de la sobre-expresión del gen *CsTL1* fue definir por primera vez un protocolo de transformación genética en encina, mientras que en alcornoque el objetivo fue obtener un protocolo eficiente de transformación, puesto que los protocolos previamente descritos en la bibliografía para esta especie eran altamente dependientes del genotipo de las líneas embriogénicas. Para ello ha sido clave disponer de sistemas eficientes de embriogénesis somática en ambas especies (Hernández *et al.* 2003a, b; Toribio *et al.* 2005; Martínez *et al.* 2017a), dado que el principal problema de la aplicación de la transformación genética u otros métodos biotecnológicos a la mejora de especies leñosas es la ausencia, en muchos casos, de métodos de regeneración *in vitro* adecuados. En este sentido, se considera que el sistema ideal para abordar la transformación genética en leñosas, especialmente en especies altamente recalcitrantes como la encina, es mediante embriogénesis somática (Ellis 1995; Giri *et al.* 2004; Hazubska-Przybył *et al.* 2016).

## **5.1. SELECCIÓN DE ANTIBIÓTICOS**

### **5.1.1. Selección de la dosis letal kanamicina**

La transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el principal método utilizado para obtener plantas transgénicas. En la mayoría de los casos, además del gen de interés,

también se insertan uno o varios genes con resistencia a antibióticos o herbicidas para facilitar la identificación del material transgénico, ya que no todo el explanto diana es transformado. Uno de los genes más utilizados por razones históricas es el gen de la neomicina fosfotransferasa (*NPTII*), que confiere resistencia al antibiótico kanamicina (Miki y McHugh 2004; Hwang *et al.* 2017).

La kanamicina se ha utilizado como agente de selección en la transformación de cultivos embriogénicos de especies leñosas como el castaño (Corredoira *et al.* 2004), nogal (Leslie *et al.* 2006) olivo (Torreblanca *et al.* 2010), vid (Dhekney *et al.* 2011) o castaño chino (Sun *et al.* 2020). En el género *Quercus*, hasta el momento, se ha descrito únicamente la transformación de cultivos embriogénicos de alcornoque (Álvarez *et al.* 2004, 2008; Álvarez y Ordás 2012) y roble pedunculado (Vidal *et al.* 2010), y en ambas especies el antibiótico más utilizado es la kanamicina.

La tolerancia al antibiótico elegido varía ampliamente (Srinivasan y Scorza 1999), y depende de la especie, del genotipo, del tipo de explanto y de la concentración del mismo (Padilla y Burgos 2010). Por ello, el primer paso cuando se define un protocolo de transformación genética es determinar la dosis letal del antibiótico utilizado para la selección del material transformado. En el caso de la kanamicina, en la bibliografía se aplica un rango de concentraciones muy amplio, y que generalmente oscila entre 25 y 200 mg/L. Existen especies con una elevada tolerancia a la kanamicina, como por ejemplo el nogal (Leslie *et al.* 2006) o el olivo (Pérez-Barranco *et al.* 2009) donde concentraciones de 200 mg/L son necesarias para inhibir el crecimiento de los cultivos embriogénicos. Estos valores elevados contrastan con las bajas concentraciones utilizadas, por ejemplo, en la transformación de cultivos embriogénicos de aguacate, donde la dosis letal se sitúa en 50 mg/L (Palomo-Ríos *et al.* 2012) o en el té, donde una concentración de kanamicina de 75 mg/L es tóxica para los embriones somáticos (Mondal *et al.* 2001).

En nuestro caso, la prueba de toxicidad mostró que el alcornoque y la encina tienen una tolerancia moderada a la kanamicina, siendo mayor en el primero. Así, la proliferación de los embriones

somáticos de alcornoque se inhibe con concentraciones de kanamicina superiores a 125 mg/L, mientras que en encina concentraciones de 100 mg/L son suficientes para suprimir la proliferación de las PEMs. Trabajos previos en alcornoque utilizaron en la transformación una concentración de kan ligeramente inferior (100 mg/L) a la seleccionada en la presente tesis (Álvarez *et al.* 2004). Igualmente, Vidal *et al.* (2010) comprobaron que esa concentración de kanamicina inhibe la proliferación de embriones somáticos de roble común. Sin embargo, en otras especies de la familia de las Fagáceas la concentración de kanamicina utilizada en la transformación de embriones somáticos es incluso superior, así para castaño europeo se utilizan medios de selección con concentraciones de kan de 150 mg/L (Corredoira *et al.* 2014), mientras que en el castaño chino la selección se realiza con kan 180 mg/L (Sun *et al.* 2020).

Todos estos datos nos permiten afirmar que la tolerancia a la kanamicina de las especies de la familia de las Fagáceas, en general, es elevada.

### **5.1.2. Selección de antibióticos bactericidas**

Los antibióticos bactericidas seleccionados para eliminar el crecimiento de *Agrobacterium* después del cocultivo no deben afectar negativamente al crecimiento, organogénesis o embriogénesis somática del explanto diana (Nauerby *et al.* 1997). Además, estos antibióticos deben ser estables, solubles, baratos y no deben ser alterados por el pH o los componentes del medio.

Los antibióticos bactericidas  $\beta$ -lactanos son los más utilizados para erradicar el crecimiento de *Agrobacterium* en el medio de cultivo tras la infección (Bernal *et al.* 2013). Los más populares son la carbenicilina y la cefotaxima, pertenecientes al grupo de la penicilina y cefalosporina, respectivamente (Tang *et al.* 2000; Wiebke *et al.* 2006; Bernal *et al.* 2013). Al igual que sucede con la kanamicina, es necesario evaluar si tienen un efecto negativo sobre la proliferación de los cultivos embriogénicos. Este efecto depende fundamentalmente del tipo y concentración del agente bactericida, de la especie y del tipo de explanto (Haddadi *et al.* 2015).

En esta tesis, los experimentos realizados para evaluar el efecto de la CB y CF, bien solas o combinadas, en la proliferación de los embriones somáticos de alcornoque y encina indicaron que 300 mg/L de carbenicilina era la concentración y el tipo de bactericida más adecuados, mejorando incluso los porcentajes de multiplicación obtenidos en medio de proliferación sin antibióticos. Sin embargo, se descartó el uso de la cefotaxima, pues afectaba negativamente al crecimiento de los embriones de ambas especies. La presencia de este antibiótico bactericida en el medio de proliferación provocaba que los embriones adquiriesen color amarillento o/y marrón, y se redujera su proliferación. Nuestros resultados contrastan con los obtenidos en alcornoque en trabajos previos, que emplean 500 mg/L de CF para eliminar *Agrobacterium*, aunque estos autores no realizaron una evaluación del efecto de diferentes bactericidas (Álvarez *et al.* 2004; Álvarez y Ordás 2007).

La bibliografía indica que el efecto positivo o negativo de la cefotaxima en la proliferación de los explantos depende de la especie. Elevadas concentraciones de cefotaxima causan necrosis en arroz (Priya *et al.* 2012; Bernal *et al.* 2013) y papaya (Yu *et al.* 2001), mientras que en tomate (Gerszberg y Grzegorzczuk-Karolak 2019), en crisantemo (Silva y Fukai 2001; Naing *et al.* 2014) o en aguacate (Palomo-Ríos *et al.* 2012) reducen la regeneración. En contraste, 200 mg/L de cefotaxima combinada con 300 mg/L de carbenicilina inhiben el crecimiento de *Agrobacterium* después de la transformación genética y mejora la proliferación de los embriones somáticos de roble común (Vidal *et al.* 2010, Mallón *et al.* 2013, 2014) y de castaño europeo (Corredoira *et al.* 2004, 2012, 2015 y 2016). En otras especies, como el castaño chino, se utiliza CF, pero en bajas concentraciones (50 mg/L), y combinada con otros antibióticos, como la timetina (Sun *et al.* 2020). Además de la variabilidad entre especies, otro inconveniente que presenta la cefotaxima es que es termolábil y fotolábil, siendo conveniente mantener los cultivos en oscuridad para evitar su degradación (Álvarez y Ordás 2007, 2008), lo que perjudica el crecimiento normal de los embriones somáticos.

El uso de carbenicilina también muestra efectos dispares dependiendo de la especie y del material utilizado como explanto diana (Nauerby *et al.* 1997; Naing *et al.* 2014). En tabaco, Lin *et al.* (1995) describen que la presencia de CB en el medio inhibe el crecimiento de los embriones y aumenta la proporción de embriones con morfología anómala. Sin embargo, otros estudios reflejan un efecto beneficioso de la carbenicilina. En papaya (Yu *et al.* 2001) y en crisantemo (Naing *et al.* 2014) se observó una mayor proliferación de los embriones en medios suplementados con CB en comparación con los suplementados con CF. En soja, la presencia de CB incrementó la proliferación de los embriones, mientras que CF causaba su muerte (Wiebke *et al.* 2006).

Se cree que el efecto positivo de la carbenicilina en la regeneración embriogénica de algunas especies se debe a que su estructura es análoga a la de auxinas, como el 2,4-D o el ANA (Lin *et al.* 1995; Wiebke *et al.* 2006; Bernal *et al.* 2013). Esa actividad auxínica podría estar favoreciendo el crecimiento y proliferación de los explantos (Nauerby *et al.* 1997; Tang *et al.* 2004; Priya *et al.* 2012). Esto coincide con lo observado en los experimentos de esta tesis, ya que como ya se ha mencionado anteriormente, la presencia de carbenicilina en el medio incrementó la proliferación de los ES, tanto en alcornoque como en encina.

En conclusión, cuando se define un protocolo de transformación, es importante, no solo determinar la concentración tóxica del antibiótico de selección (en este caso kan), sino también evaluar el efecto que ejercen diferentes bactericidas sobre el explanto diana.

## **5.2. SELECCIÓN MEDIANTE *GFP***

En la transformación genética de plantas, es muy importante utilizar, además de un gen marcador de selección que confiera resistencia a un antibiótico/herbicida, un gen marcador delator o chivato, pues esto aumenta la eficiencia de transformación, reduciendo a la vez el tiempo invertido y el material utilizado y permitiendo el diseño de protocolos más rápidos, sencillos y reproducibles (Malabadi *et al.* 2008). En los primeros estudios de transformación en especies forestales, el método utilizado para eliminar el material no transformado era el subcultivo de

los embriones en sucesivos medios selectivos con dosis tóxicas de antibióticos (Merkle 1990). Sin embargo, la doble selección realizada mediante la resistencia a un antibiótico/herbicida y la expresión de un gen delator han mejorado el proceso de selección, disminuyendo el número de escapes, el tiempo de selección y la concentración del agente de selección (Yancheva *et al.* 2006). El gen delator más utilizado históricamente es el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa (*GUS*), aunque en los últimos años está siendo sustituido por genes que confieren fluorescencia a los tejidos, como el gen de la proteína verde fluorescente (*GFP*) (Hwang *et al.* 2017). Esto es debido a que expresión de *GFP* simplifica y mejora la evaluación de los eventos de transformación (Hraška *et al.* 2006).

En primer lugar, la visualización de la actividad *GUS* requiere de la adición de sustratos exógenos (Malabadi *et al.* 2008) y no permite monitorizar la expresión transgénica en tejidos vivos (Hraška *et al.* 2006), ya que los explantos evaluados deben sacrificarse. Sin embargo, la *GFP* no requiere de la adición de sustratos exógenos o enzimas para su expresión, ni la fijación o tinción de los tejidos para su visualización (Hwang *et al.* 2017), permitiendo la monitorización de la expresión transgénica desde las primeras etapas de la transformación hasta la fase de plantas (Malabadi *et al.* 2008; Sun *et al.* 2020), con la misma eficacia que el *GUS* (Álvarez y Ordás 2008; Corredoira *et al.* 2012; Mallón *et al.* 2014).

En segundo lugar, en la evaluación la expresión de *GUS* en plantas transgénicas es frecuente observar interferencias debido a la presencia de clorofila o de tejidos necrosados, haciendo necesario para su visualización la utilización de mayores períodos de incubación, el mantenimiento de las plantas en oscuridad para evitar que desarrollen color verde o la aplicación de tratamientos de eliminación de la clorofila, como en hipoclorito o etanol, problemas que no se presentan con la evaluación mediante *GFP*. Además, las plantas y brotes fluorescentes también pueden observarse en condiciones estériles dentro del contenedor donde crecen.

En la transformación de encina y alcornoque con el gen *CsTL1* el uso del gen *GFP* permitió la observación de los embriones resistentes a

la kanamicina directamente dentro de la placa Petri donde estaban creciendo, evitando así su contaminación y/o su pérdida durante la evaluación. Además, como es necesario obtener cada línea putativamente transformada a partir de un único evento de transformación, la evaluación mediante *GFP* permite aislar embriones totalmente transformados, pudiéndose incluso seleccionar tejidos transformados dentro de una quimera. Las líneas transgénicas obtenidas en esta tesis se establecieron a partir de embriones cotiledonares que eran totalmente fluorescentes. La fluorescencia de dichas líneas se comprobó varias veces para comprobar que la selección se había hecho de forma correcta y descartar los posibles escapes.

Las plantas de las líneas transformadas generadas tanto en alcornoque como en encina en la presente tesis también mostraron expresión *GFP* tanto en raíces y tallo como en hojas. Sin embargo, se observó que la intensidad de la fluorescencia podía verse atenuada en algunas zonas de los tejidos más maduros. Este hecho también ha sido mencionado en otras especies, siendo la presencia de pigmentos florales, el cambio en la densidad citoplasmática de los tejidos maduros y el aumento de tamaño de las vacuolas posibles explicaciones a esa reducción expresión de *GFP* (Hraška *et al.* 2006).

Existe en la bibliografía algún caso en que la expresión del gen *GFP* puede causar un efecto citotóxico en las células vegetales (Haseloff y Amos 1995), pero los datos obtenidos en la proliferación de los embriones y regeneración de plantas, así como la apariencia visual de las plantas transgénicas y las no transgénicas, sugiere que el gen *GFP* no es tóxico para el material de alcornoque y encina. Igualmente, tampoco se observaron esos efectos negativos en la transformación genética con *GFP* de embriones somáticos de nogal (Escobar *et al.* 2000), de caucho (Leclercq *et al.* 2010), de castaño europeo (Corredoira *et al.* 2012, 2016), de roble (Mallón *et al.* 2014), de varios cultivares de cítricos (Dutt y Grosser 2010), de aguacate (Palomo-Ríos *et al.* 2017), o de castaño chino (Sun *et al.* 2020).

### 5.3. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

La transformación genética de muchas especies leñosas es difícil, debido sobre todo a que muchas son recalcitrantes a la regeneración *in vitro* (Nehra *et al.* 2005; Piqueras *et al.* 2010). A pesar de ello, en la presente tesis se ha logrado definir protocolos para transformación genética de dos especies forestales como son el alcornoque y la encina.

#### 5.3.1. Transformación genética en alcornoque

Aunque en alcornoque la transformación genética de embriones somáticos ya había sido descrita en la bibliografía (Álvarez *et al.* 2004; Sánchez *et al.* 2005; Álvarez y Ordás 2007, 2009), en esta tesis se ha aplicado el protocolo de transformación definido para la transformación de ES de castaño con el gen *CsTL1* (Corredoira *et al.* 2012, 2015) pues la efectividad de los protocolos previamente definidos en alcornoque dependía del genotipo de la línea embriogénica. En primer término, Álvarez *et al.* (2004) propusieron un método en el que grupos de ES o ES individuales de la línea embriogénica M10 eran pinchados con un bisturí y, sin pre-cultivo, eran co-cultivados durante 2 días para luego ser transferidos a medio de selección con CF 500 mg/L. En esas condiciones obtuvieron un porcentaje de transformación del 4%. Posteriormente, Álvarez y Ordás (2007) optimizaron este protocolo aplicando un periodo de pre-cultivo de 20 días e incrementando la densidad óptica del cultivo bacteriano. Para la transformación utilizaron ES de seis líneas embriogénicas (M10, ALM1, ALM3, ALM5, ALM6, y ALM80), aunque transformación solo fue posible en 3 de las 6 líneas evaluadas. La mayor frecuencia de transformación se obtuvo en la línea M10 (43%), pero las líneas ALM6 y ALM80, las mismas que se han utilizado en esta tesis, no fueron transformadas.

En nuestro caso, la aplicación del protocolo de transformación de castaño con la cepa EHA105pK7WG2D-TAU, un día de pre-cultivo, 5 días de co-cultivo con la bacteria y un medio de selección con 125 mg/L de kan y 300 mg/L de CB permitió la transformación genética de las tres líneas embriogénicas de alcornoque utilizadas. Probablemente, el incremento en el periodo de co-cultivo sea la causa de la transformación de las líneas ALM6 y ALM80, además del uso de carbenicilina en lugar de cefotaxima, que como hemos mencionado, afectaba negativamente

al crecimiento de los ES de alcornoque. Estos resultados concuerdan con lo mencionado por Chaugan *et al.* (2015), que afirman que el tipo de antibiótico bactericida utilizado en la transformación afecta a la eficiencia de misma. Por otro lado, el tiempo de co-cultivo es un factor que afecta significativamente a la frecuencia de transformación (Khan *et al.* 2012). Generalmente, un incremento en el tiempo en que los explantos están en contacto con la bacteria mejora la eficiencia de transformación (Petri y Burgos 2005). En camelia, Mondal *et al.* (2001) también recomiendan la aplicación de un periodo de co-cultivo de 5 días en la transformación de ES. El mismo tiempo de co-cultivo ha sido utilizado con éxito en la transformación genética de arroz (Shri *et al.* 2012), castaño europeo (Corredoira *et al.* 2016), eucalipto (Oliveira-Cauduro *et al.* 2017) y soja (Li *et al.* 2017).

Aunque se logró la transformación de las tres líneas evaluadas, la eficiencia de transformación se vio afectada por el genotipo, siendo esta mayor en la línea TGR3 (17%) que en las líneas ALM80 (4,5%) y ALM6 (2%). En la bibliografía hay diversos ejemplos acerca del efecto del genotipo en transformación genética. En *Q. robur* se consiguió transformar genéticamente con genes marcadores ES de 5 líneas embriogénicas pero los porcentajes de transformación oscilaron en función de la línea embriogénica entre el 2-6%. En esta misma especie y con la misma construcción utilizada en esta tesis, Mallón *et al.* (2014) también observaron un efecto del genotipo en la transformación genética de 4 líneas embriogénicas, obteniendo eficiencias de transformación que varían entre 1,4-9,6% en función de la línea. En castaño europeo, los porcentajes de transformación también estuvieron afectados por el genotipo cuando ES de tres líneas embriogénicas fueron transformados con el gen *CsTLL1*, observándose que eficiencia de transformación osciló entre el 7,1-32,5% (Corredoira *et al.* 2012). Fuera de la familia de las Fagáceas también se han mencionado diferencias en los porcentajes de transformación debidas al genotipo como en pino (Álvarez y Ordás 2013), chopo (Fladung *et al.* 1997), arroz (Lin y Zhang 2005), o *Prunus salicina* (Tian *et al.* 2007).

Teniendo en cuenta estas variaciones, para compensar el efecto que el genotipo tiene en la transformación genética es recomendable usar el

mayor número de líneas embriogénicas posible en los experimentos de transformación.

### **5.3.2. Transformación genética en encina**

En encina, a diferencia de alcornoque, no existen hasta la fecha referencias bibliográficas sobre su transformación genética. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que es posible la transformación de embriones somáticos de esta especie mediante *Agrobacterium tumefaciens*.

Del mismo modo que en la transformación genética de alcornoque, en encina se aplicó inicialmente el protocolo de transformación definido para embriones somáticos de castaño (Corredoira *et al.* 2012, 2015), debido a su simplicidad y efectividad, pero en este caso los resultados fueron negativos.

Con el objetivo de lograr la transformación genética en encina se evaluó el efecto del régimen de selección en kan y la inclusión de un periodo de pre-cultivo del explanto más largo, puesto que ambos elementos han sido mencionados en la bibliografía como factores importantes para optimización de la transformación genética en especies leñosas (Petri y Burgos 2005; Urtubia *et al.* 2008). Existen numerosas observaciones que indican que la selección con altas concentraciones del antibiótico inhibe la regeneración de las células transformadas (Miguel y Oliveira 1999; Motioike *et al.* 2002; Szankowski *et al.* 2003). Es por ello frecuente que, para incrementar la frecuencia de transformación, los explantos se cultiven en un medio de selección suplementado con una baja concentración de kan durante las primeras semanas de cultivo, con el objeto de que la presión selectiva del antibiótico no sea tan fuerte, y posteriormente, se aumenta la concentración de los antibióticos hasta alcanzar la dosis tóxica, para evitar los escapes (Álvarez y Ordás 2008). En caso de la encina, los explantos se cultivaron las dos primeras semanas en 75 mg/L de kan, para posteriormente ser cultivados durante 8 semanas más en kan 100 mg/L. Este procedimiento también se utilizó en roble común, donde la concentración de kan se incrementó desde 75 mg/L a 150 mg/L (Vidal *et al.* 2010). Asimismo, se ha aplicado un procedimiento similar, de

selección en dos pasos, con una reducción inicial de la kan, en otras especies leñosas, como son el té (Mondal *et al.* 2001) y el caucho (Leclercq *et al.* 2010).

Otro factor que se utiliza para mejorar la eficiencia de transformación es la aplicación de un periodo de pre-cultivo a los explantos diana antes de ser infectados con *Agrobacterium*. En alcornoque, las mejores frecuencias de transformación fueron obtenidas con ES que habían experimentado 20 días de pre-cultivo (Álvarez y Ordás 2007). Igualmente, en *Prunus dulcis* el pre-cultivo de las hojas durante 3-4 días incrementa el porcentaje de explantos *GUS* positivos (Miguel y Oliveira 1999). En encina, la transformación sólo se observó en los explantos que habían sido pre-cultivados una o dos semanas. Estos resultados parecen estar relacionados con el estado fisiológico del explanto diana. En la transformación de embriones somáticos es preferible utilizar embriones en estados iniciales del desarrollo embriogénico (globular-torpedo) que embriones en estado cotiledonar, porque en estos estados más avanzados del desarrollo embriogénico la división celular se reduce considerablemente (Yeung *et al.* 1996), y la transformación es más difícil (Corredoira *et al.* 2007; Álvarez y Ordás 2007; Vidal *et al.* 2010). En encina, se utilizaron PEMs como explanto inicial puesto que es el tipo explanto más adecuado para mantener la capacidad embriogénica en esta especie (Martínez *et al.* 2017a). Estudios histológicos realizados en otras especies del género *Quercus* mostraron que durante el cultivo de las PEMs en medio de proliferación las células de sus capas superficiales se dividen activamente (Corredoira *et al.* 2014; Martínez *et al.* 2015; Corredoira *et al.* 2017b), produciéndose la duplicación del ADN, lo que facilita la infección bacteriana y la transferencia del ADN-T (Han *et al.* 1996; Peña *et al.* 2004; Sharma *et al.* 2005). De acuerdo con Sangwan *et al.* (1992) las células en división activa son más susceptibles de ser infectadas por *Agrobacterium*.

Los resultados obtenidos indican que la reducción de la concentración de kan durante las dos primeras semanas de cultivo y pre-cultivo de explantos durante una o dos semanas son pasos necesarios para la transformación de cultivos embriogénicos de encina.

Al igual que sucedió con la transformación de alcornoque, la eficiencia de transformación en encina estuvo afectada por el genotipo de las líneas. En encina, el protocolo definido permitió la transformación de 2 de las 3 líneas embriogénicas evaluadas, corroborando, como ya se ha discutido en el apartado anterior, el importante papel del genotipo en la transformación genética.

Los porcentajes de transformación en encina (1,66-3,33%) son inferiores a los obtenidos en alcornoque (2-17%) en la presente tesis. Si bien las frecuencias de transformación obtenidas en encina son inferiores a las descritas para otras especies del género *Quercus*, éstas no difieren de las mencionadas para otras especies leñosas. En la transformación de un cultivar recalcitrante de peral la frecuencia de transformación osciló entre el 0,3-4% en función del plásmido empleado en la transformación (Yancheva *et al.* 2006). En aguacate, otra especie considerada recalcitrante a la transformación, Palomo-Ríos *et al.* (2017) obtuvieron un porcentaje de transformación del 10%.

### **5.3.3. Confirmación de la transformación genética**

La presencia de los tres transgenes fue confirmada mediante PCR en todas las líneas alcornoque (18 líneas) y de encina (11 líneas) evaluadas, lo que indica que el sistema de dos genes marcadores y la dosis letal de kan utilizados fueron adecuados para evitar los escapes. La sobre-expresión del gen *CsTLL1* fue confirmada mediante qPCRrt en 15 de las 18 líneas analizadas de alcornoque y 4 de las 6 líneas analizadas de encina. Es importante resaltar el alto número de líneas analizadas en ambas especies, y el uso de tres genes de referencia (Actina, Tubulina y el Factor de Elongación), ya que habitualmente suele usarse sólo uno.

Se encontraron diferencias en los niveles de expresión del gen entre las diferentes líneas transgénicas evaluadas, a pesar de que la transcripción del gen está regulada por el promotor constitutivo CaMV35S y de utilizar siempre embriones cotiledonares en el mismo estado de desarrollo para el análisis. En general, es frecuente observar diferencias de expresión entre las líneas transgénicas. Al igual que en nuestro caso, Mallón *et al.* (2014) observaron variaciones tras

evaluarlos niveles de expresión del gen *CsTL1* en líneas embriogénicas transgénicas de roble común. En castaño americano, Zhang *et al.* (2013) también encontraron notables diferencias en la expresión del gen que codifica para una oxalato oxidasa entre las diferentes líneas transgénicas generadas a partir de la transformación de ES. Se piensa que estas diferencias de expresión entre las líneas transgénicas pueden ser debidas a la posición que el transgén ocupa en el genoma de la planta (Bandopadhyay *et al.* 2010), al tamaño y organización del transgén (Amoah *et al.* 2001), a la presencia de copias invertidas o a la incorporación de copias incompletas del ADN-T (Meyer 1995; Cervera *et al.* 2000; Fu *et al.* 2005; Raveendar *et al.* 2007), o incluso por la inactivación de la expresión del transgén (Odeny Ojola *et al.* 2018).

Estos resultados nos permiten concluir que es necesario evaluar los niveles de expresión de los genes que se introducen en las plantas a fin de seleccionar las líneas con mayor expresión para los ensayos de tolerancia al oomiceto.

#### **5.4. REGENERACIÓN DE LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS**

##### **5.4.1. Germinación y conversión de los embriones somáticos**

La regeneración de plantas a través de los procesos de maduración y germinación de los embriones somáticos es un paso limitante en muchas especies leñosas en la aplicación de la embriogénesis somática para su propagación a gran escala (Corredoira *et al.* 2019). Es frecuente que los porcentajes de conversión sean bajos o que se obtenga una germinación precoz, desarrollándose la raíz sin la correspondiente formación de brote (Ballester *et al.* 2016). Esto se debe fundamentalmente a anomalías morfológicas de los embriones somáticos o a que los tratamientos de maduración no son los apropiados, lo que provoca una maduración incompleta de los mismos (Mallón *et al.* 2012).

En el caso de los embriones transgénicos la regeneración de plantas suele ser aún más difícil (Raharjo *et al.* 2008; Urtubia *et al.* 2008; Palomo-Ríos *et al.* 2012; Chetty *et al.* 2013), generalmente debido a su cultivo continuado en un medio con antibióticos (Maynard *et al.* 2008). Sin embargo, en los embriones somáticos de encina y alcornoque

transformados con el gen *CsTLL1* se obtuvo el desarrollo de planta completa en todas las líneas transgénicas evaluadas. Es importante resaltar el elevado número de líneas evaluadas en los experimentos de germinación, 18 líneas en alcornoque y 8 líneas en encina. Para ello los embriones transgénicos se sometieron a los protocolos previamente descritos para embriones somáticos no transformados genéticamente de alcornoque (Toribio *et al.* 2005) y de encina (Martínez *et al.* 2017b). En ambas especies, los embriones transgénicos fueron almacenados a 4°C durante 2 meses para posteriormente ser transferidos al medio de germinación. La frecuencia de conversión varió considerablemente en función del genotipo de las líneas embriogénicas tanto en alcornoque (ALM6: 13,9-41,7%; ALM80: 2,8-16,7%; TGR3: 5,6-36,1%) como en encina (Q8: 2,8-75%; Q10-16: 16,7-26,7%), lo que indica que la conversión en embriones transgénicos también está afectada por genotipo. El efecto del genotipo en la regeneración de plantas ha sido mencionado en la bibliografía tanto en la germinación de embriones no transformados (Sánchez *et al.* 2003a; Hernández *et al.* 2003b; Corredoira *et al.* 2004, 2008; Andrade y Merkle 2005; Martínez *et al.* 2017b) como en embriones transgénicos (Corredoira *et al.* 2012; Mallón *et al.* 2014; Palomo-Ríos *et al.* 2017). Además del genotipo, durante la transformación genética mediante *A. tumefaciens* no es posible controlar ni el número de copias que se inserta y ni su posición en el genoma de la planta (De Buck *et al.* 2000). Esto explicaría las diferencias observadas en la conversión de las diferentes líneas transgénicas obtenidas, incluso dentro del mismo genotipo.

Las plantas transgénicas no mostraron diferencias morfológicas con respecto a las plantas no transgénicas de ambas especies. Por otro lado, la calidad de las plantas en términos de longitud de la raíz y el brote y número de hojas, en general, fue elevada, aunque se encontraron diferencias importantes en esos parámetros entre las distintas líneas transgénicas tanto en encina como en alcornoque.

#### **5.4.2. Regeneración de plantas mediante la proliferación de brotes axilares**

Debido a las bajas frecuencias de conversión que presentaban algunas líneas transgénicas y a las variaciones en la longitud de la raíz

y/o los brotes, tanto en encina como en alcornoque, se decidió establecer cultivos de brotes axilares a partir de un brote de un ES germinado de cada una de las líneas transformadas y sin transformar utilizadas. Ballester *et al.* (2016) señalan que esta estrategia puede ser un método complementario a la germinación y regeneración de plantas a partir de embriones somáticos, permitiendo de la obtención de un modo más rápido de una mayor cantidad de plantas y con una mayor uniformidad en términos de longitud de la raíz y del brote. Esta uniformidad es necesaria a la hora de afrontar los ensayos de tolerancia a *P. cinnamomi*, puesto que de esta forma se evitan las desviaciones de los resultados debido a diferencias en el estado fisiológico y morfológico de las plantas.

En total, se establecieron 16 líneas de brotes axilares de alcornoque y 7 líneas de brotes axilares de encina a partir de sus correspondientes líneas embriogénicas transgénicas, además de sus correspondientes controles sin transformar. Una vez se logró la estabilización de los cultivos axilares se procedió al enraizamiento de los mismos para la obtención de plantas para ser utilizadas en los ensayos de tolerancia al oomiceto. Para inducir el enraizamiento de los brotes axilares de encina y alcornoque, brotes de la misma longitud se cultivaron en un medio GD con los macronutrientes reducidos un tercio y 25 mg/L de AIB. El AIB es la auxina más utilizada para inducir el enraizamiento de brotes axilares en el género *Quercus*, ya sea mediante el cultivo de los brotes en medios suplementados con ella o mediante “dipping” (Vieitez *et al.* 2012). El porcentaje de enraizamiento de los brotes axilares de alcornoque estuvo por encima del 50% en todas las líneas axilares sometidas a enraizamiento (ALM6: 65-93,3%; ALM80: 51,7-86,7%; TGR3: 76,7-98,3%). Estos porcentajes fueron similares a los obtenidos en el enraizamiento de brotes axilares no transformados de alcornoque (60-100%) (Romano *et al.* 1992, 1995).

En el caso de la encina, el establecimiento de cultivos de brotes axilares transgénicos es por sí mismo un resultado, dado que el establecimiento *in vitro* y la proliferación de brotes axilares es difícil, prueba de ello es el reducido número de trabajos en la bibliografía sobre esta vía de la regeneración en encina (Martínez *et al.* 2019). Liñán *et al.*

(2011) y Cernadas *et al.* (2018) definieron protocolos para establecer cultivos *in vitro* a partir de brotes aislados de bellotas germinadas, mientras que Martínez *et al.* (2017b) establecieron cultivos axilares a partir de árboles adultos. Además de las dificultades para el establecimiento *in vitro*, estos autores también señalan que el enraizamiento de los brotes es difícil debido a que la encina es considerada una especie altamente recalcitrante. En la presente tesis, el porcentaje de enraizamiento de los brotes axilares transgénicos de la línea Q8 y su control sin transformar mostró una mayor variabilidad que en alcornoque (31,7%-88,3%), pero los resultados obtenidos fueron similares a los mencionados previamente en la bibliografía a partir de material no transformado de origen juvenil, (18%-40%) (Liñán *et al.* 2011), (20,8%-62,5%) (Cernadas *et al.* 2018) y mejores que los obtenidos a partir de material adulto (17,8%-18,8%) (Martínez *et al.* 2017a) de encina.

Estos resultados avalan la efectividad de este procedimiento para la obtención de plantas a partir de embriones transgénicos de alcornoque y encina. Esta estrategia también ha sido aplicada con éxito en la regeneración de plantas transgénicas en otras especies leñosas como castaño europeo (Corredoira *et al.* 2004, 2012) y roble común (Mallón *et al.* 2013, 2014).

#### **5.5. CONSERVACIÓN DEL MATERIAL TRANSGÉNICO GENERADO**

Dado el elevado número de líneas embriogénicas y de cultivos de brotes axilares establecidos, fue necesario definir estrategias para la conservación del material transgénico generado en esta tesis. Para ello se han utilizado dos procedimientos, la reducción del crecimiento mediante almacenamiento en frío y el almacenamiento en NL (crioconservación).

El almacenamiento en frío se aplicó para la conservación a medio plazo de los cultivos de brotes axilares transgénicos de alcornoque y encina. Los brotes se pre-cultivaron durante 12-15 días antes de ser almacenados a 4°C en oscuridad (alcornoque) o semioscuridad (encina). Bajo estas condiciones es posible mantener los cultivos transgénicos de ambas especies durante al menos un año sin que sea necesario su

transferencia a medio fresco. Se considera que el almacenamiento en frío es un método muy simple que permite reducir la mano de obra, los costes en medios de cultivo y la inducción de variación somaclonal (Lambardi y De Carlo 2003). Este método de conservación se ha utilizado ampliamente en el mantenimiento a medio plazo de muchas especies forestales (Corredoira *et al.* 2017a). Por ejemplo, cultivos axilares de aliso (Corredoira *et al.* 2015) o de haya (Vieitez *et al.* 2003) pueden ser conservados, sin pérdida de viabilidad, durante más de 18 meses en frío.

El almacenamiento en NL se ha utilizado para conservación a largo plazo de las líneas embriogénicas transgénicas de alcornoque y encina obtenidas. El desarrollo de protocolos robustos de crioconservación para material transformado ha sido esencial pues nos han permitido el almacenamiento a largo plazo de las líneas transgénicas mientras se llevan a cabo los ensayos de tolerancia al oomiceto. Esto supone un ahorro considerable en mano de obra y medios de cultivo y reduce las posibilidades de pérdidas de las líneas transgénicas por contaminación (Corredoira *et al.* 2007).

Para la crioconservación de ES en especies leñosas el método más utilizado es el de la vitrificación (Corredoira *et al.* 2017a). Los protocolos de vitrificación básicamente consisten en el pre-cultivo de los explantos en medios con elevadas concentraciones de azúcares y el posterior tratamiento con soluciones vitrificadoras, generalmente la solución PVS2 (Sakai *et al.* 1990), como paso previo a una rápida congelación en nitrógeno líquido (Sakai 2000). En alcornoque se aplicó el protocolo previamente definido por Valladares *et al.* (2004). Los embriones en estado globular-torpedo fueron pre-cultivados en un medio con sacarosa 0,3M durante tres días y tratados con la solución PVS2 a 0°C durante 60 min. Los resultados obtenidos fueron similares a los mencionados inicialmente por Valladares *et al.* (2004) y el proceso de crioconservación no afectó negativamente al porcentaje de supervivencia y recuperación de las líneas transformadas. En la mayoría de las líneas de alcornoque el porcentaje de supervivencia y el de recuperación embriogénica fue superior a los controles sin transformar.

En encina, también, se crioconservaron con éxito todas las líneas transgénicas utilizando el protocolo definido por Martínez *et al.* (2019), en el cual las PEMs eran pre-cultivadas en un medio con sacarosa 0,3M durante tres días y tratadas con la solución PVS2 a 25°C durante 15 min antes de ser almacenadas en NL. Este método es preferido al definido por Barra-Jiménez *et al.* (2015), en el cual se aislaban embriones en fase globular y se sometían a una incubación de 30 min con PVS2. Con este protocolo se conseguían recuperar embriones tras 24 horas de almacenamiento en NL, pero cuando éstos se almacenaban durante un mes sólo se observaba el crecimiento de callo después del almacenamiento en NL.

Estos resultados confirman la efectividad de la crioconservación como herramienta de almacenamiento de líneas transgénicas de alcornoque y de encina. Sin embargo, y a pesar de las ventajas que ofrece la crioconservación para el almacenamiento de material transgénico, en la bibliografía son escasos los trabajos en los que se apliquen protocolos de crioconservación de este tipo de material. Se pueden mencionar los métodos descritos para crioconservación de yemas aisladas de brotes transgénicos de abedul (Ryyänen *et al.* 2002), de chopo (Jokippi *et al.* 2004), papaya (Tsai *et al.* 2009), o los aplicados a la crioconservación de ES transgénicos de castaño europeo (Corredoira *et al.* 2007, 2012, 2016) o de roble común (Mallón *et al.* 2013).

#### **5.6. EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA A *P. CINNAMOMI***

Resulta difícil comparar los resultados de tolerancia a *P. cinnamomi* obtenidos con las plantas transgénicas de alcornoque y encina con los resultados publicados en la bibliografía debido a las importantes diferencias en los procedimientos experimentales empleados (Anexo 1). Estos procedimientos difieren en las especies, los patógenos, la edad de la planta, o en el tipo de ensayo (*in vitro* o *ex vitro*, en órganos escindidos de la planta o en la planta entera). No obstante, en la mayoría de esas publicaciones en las que se ha sobre-expresado proteínas tipo taumatina se ha observado una mejora sustancial en la tolerancia a los patógenos que las atacan (Anexo 1). Por ejemplo, en zanahoria, Chen y Punja (2002) observaron que las plantas que sobre-expresaban una

proteína tipo taumatina aislada en arroz tenían mayor tolerancia a *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*. El ensayo de tolerancia se realizó con hojas de las plantas transformadas en las que se depositó en la base del peciolo un inóculo de los patógenos. Las lesiones producidas por ambos patógenos fueron de menor tamaño en las hojas aisladas de plantas transformadas que sin transformar. Una TLP identificada en arroz también se utilizó en la transformación genética de plátano para inducir mayor tolerancia frente a *Fusarium oxysporum* sp. *cubensec* (Mahdavi *et al.* 2012). En este estudio se bañaron durante una hora las raíces de plantas de 60 días con una suspensión de esporas, y posteriormente las plantas se trasplantaron a un contenedor con vermiculita. Adicionalmente, las plantas fueron regadas con 1 ml de la misma suspensión. El avance de la infección se evaluó durante 4 semanas, mediante el número de hojas que mostraban clorosis. Después de 28 días desde la infección, las plantas transformadas mostraron un porcentaje de incidencia de la enfermedad significativamente más bajo (29,4%) que las plantas sin transformar (89,1%).

En tabaco, Munis *et al.* (2010) sobre-expresaron un gen que codifica una TLP aislada en algodón y llevaron a cabo dos tipos de ensayos de resistencia. Por un lado, se seleccionaron hojas de plantas transformadas y, tras realizarles una incisión, se les inoculó 30  $\mu$ L de una solución de esporas de *Verticillium dahliae* y *Fusarium oxysporum*. Tras 7 días, el área necrosada de las líneas transgénicas fue significativamente menor que en las plantas sin transformar, para los dos hongos evaluados. En un segundo ensayo, plantas aclimatadas en suelo, fueron regadas semanalmente con 100 mL de la misma solución de esporas mencionada antes. Tras 6 semanas se analizó el número de hojas infectadas por planta, y se observó un menor porcentaje de enfermedad en las líneas transformadas que en las no transformadas.

Específicamente, la transformación con genes que codifican TLPs también se han empleado para inducir tolerancia frente a diferentes especies *Phytophthora*. Por ejemplo, plantas de naranja dulce (*Citrus sinensis* L. Osb. cv. Pineapple) transformadas con el gen PR5, que codifica una proteína tipo taumatina identificada en tomate, mostraron una mayor tolerancia frente a *Phytophthora citrophthora*, en

comparación con las plantas control (Fagoaga *et al.* 2001). Para el ensayo de tolerancia las plantas de naranja dulce de 9-12 meses fueron inoculadas con un disco de micelio sobre una herida realizada en el tallo de la planta. Después del experimento se observó que una de las líneas transformadas mostraba significativamente mayor tolerancia frente al patógeno, incluso cuando el ensayo alargó durante un año. En patata, Acharya *et al.* (2013) transformaron diferentes cepas de esta especie con una TLP aislada en *Camellia sinensis* para inducir tolerancia frente a *Macrophomina phaseolina* y *Phytophthora infestans*. La infección se realizó en hojas y tubérculos, y después de 3 semanas de la infección se observó que las líneas transformadas mostraban una menor incidencia de esos patógenos que las líneas control tanto en tubérculos como en hojas. En tabaco, Liu *et al.* (2012) sobre-expresaron una TLP, aislada en *Pyrus pyrifolia* Nakai cv Huobali, y posteriormente, con extracciones de proteína pura obtenidas a partir de las hojas del tabaco transgénicas, inhibieron el crecimiento de las hifas de *Phytophthora parasitica* var. *Nicotianae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phomopsis* sp., y *Alternaria* sp. La transformación con proteínas tipo taumatina también se ha utilizado para promover tolerancia frente a otros oomicetos como por ejemplo en vid frente a *Plasmopara viticola* (He *et al.* 2017). En este caso, se evaluó la resistencia de las líneas transgénicas contra el patógeno mediante la inoculación de discos de hojas y de plantas enteras. En ambos ensayos se observó que las plantas transformadas inhibían el crecimiento de las hifas y la reproducción asexual de *P. viticola*.

Los resultados de esta tesis coinciden con esas observaciones, ya que las plantas de alcornoque, y en menor medida, las de encina transformadas con el gen *CsTLL1*, que codifica una proteína tipo taumatina, mostraron mayor tolerancia a la infección con *P. cinnamomi*. En los estudios de tolerancia de en esta tesis se emplearon dos metodologías distintas, por un lado, se evaluó la incidencia a lo largo del tiempo del oomiceto en diferentes órganos aislados de las plantas infectadas (Rial *et al.* 2008), y por otro lado se contabilizó el número de días que las plantas sobreviven después de la infección (Cuenca *et al.* 2010). De los dos, el número de días de supervivencia frente al patógeno ha sido el parámetro que ha resultado más adecuado para

estudiar la posible tolerancia de las plantas transformadas obtenidas en esta tesis. Este método también fue utilizado por García-Martínez (2016) para evaluar la tolerancia a *P. cinnamomi*, en plantas no transformadas de alcornoque, observando que había diferencias en el número de días que sobrevivían los diferentes genotipos testados. Igualmente, en estudios realizados en castaño para identificar híbridos resistentes a *P. cinnamomi*, se utilizó como parámetro de control el número de días de supervivencia de plantas cultivadas en medio líquido y que fueron infectadas con el oomiceto, considerándose resistentes aquellas plantas que sobrevivían más de 50 días frente al ataque del oomiceto (Cuenca *et al.* 2010). En abeto de Douglas, Almaraz-Sánchez (2016) también evaluó la tolerancia frente a diferentes cepas de *P. cinnamomi* recogidas de diferentes huéspedes, en función del número de días que tardaban en detectarse los primeros síntomas de infección, y los días de supervivencia de las plantas. Estos autores inocularon árboles de tres años de edad mediante la aplicación de un disco de micelio en el tallo. Tras 8 meses se vieron diferencias significativas en la variación de la patogenicidad por parte de las diferentes cepas del oomiceto. El parámetro días de supervivencia también se ha utilizado para evaluar la tolerancia en plantas transformadas con proteínas tipo taumatina a enfermedades causadas por oomicetos (Dhekney *et al.* 2011).

De las 8 líneas transgénicas de alcornoque analizadas, 7 sobrevivieron más días después de la infección que los controles, 4 de ellas de forma significativa. Las plantas transformadas de los genotipos ALM6 y ALM80 sobrevivieron como mínimo una semana más que sus homólogas no transformadas. En el genotipo TGR3 las plantas transgénicas de las líneas tau 5, 6 y 21 sobrevivieron el doble de días que las plantas control sin transformar. De todas las líneas transgénicas analizadas, solo la línea TRG3-tau 18 mostró una supervivencia similar o inferior a los controles sin transformar. Algunas plantas transgénicas fueron incluso capaces de sobrevivir una vez finalizado el experimento (es decir por encima de los 31 días), de tal manera que la parte apical del brote pudo ser recuperada y cultivada de nuevo sin que se produjese reaislamiento del oomiceto.

Ninguna de las plantas de las líneas sin transformar utilizadas como control (ALM6-wt, ALM80-wt, TGR3-wt) sobrevivió más de 13 días. Estos resultados coinciden con las observaciones de García-Martínez (2016) en su evaluación de resistencia en plantas de alcornoque aclimatadas sin transformar, que observaron que ninguna de las plantas infectadas sobrevivía más de 15 días a la infección.

En encina, los resultados de tolerancia obtenidos no fueron tan buenos como los de las líneas transgénicas de alcornoque. En esta especie se evaluó la tolerancia de 5 líneas transformadas, de las cuales 3 (Q8-tau 4, tau 7 y tau 14) sobrevivieron sólo unos días más que el control. Además, la línea que mostró los mayores niveles de expresión de *CsTL1* (Q8-tau 36) fue la que tenía menos tolerancia frente al patógeno. Estos resultados pueden ser debidos a las características propias de las plantas de encina, ya que su menor altura y el pequeño tamaño de sus hojas propiciaba que la infección avanzase con rapidez, incluso en las líneas más tolerantes. De esta manera, era difícil discernir si las plantas sucumbían debido a sus propias características fisiológicas o porque la expresión de la taumatina no era suficiente para combatir la infección. Sin embargo, los resultados presentados en esta tesis abren la puerta a la posibilidad de obtener plantas de encina tolerantes frente a la infección de *P. cinnamomi*. Quizás en el futuro se consigan optimizar los protocolos para obtener plantas de encina con mayor tamaño, o la aclimatación de las mismas, para así obtener *plantas ex vitro* y realizar análisis de tolerancia que permitan validar la actividad antifúngica de forma más fiable.

Las plantas sin transformar de ambas especies mostraron, sin lugar a dudas, todos los síntomas típicos de una infección causada por *P. cinnamomi* y descritos por diferentes autores, como es la pérdida del color de las hojas, detención del crecimiento, marchitamiento, defoliación y muerte (Tuset *et al.* 2001; López *et al.* 2007; Rial *et al.* 2008; Almaraz-Sánchez *et al.* 2016). Por el contrario, las líneas transformadas no mostraban signos de decaimiento en la parte apical del tallo, especialmente las líneas TGR3-tau 5, tau 6 y tau 21, que continuaron creciendo a pesar de la infección. Sí se observaron signos de necrosis en la parte basal del tallo y en el callo, pero se sospecha que

esos síntomas eran provocados por el contacto directo con el micelio que crecía en la superficie del medio líquido o el puente de papel, y no por la infección en sí.

La selección de las líneas transgénicas para los ensayos de tolerancia se realizó en función de los niveles de expresión del gen *CsTL1*, de tal manera que se seleccionaron aquellas líneas con mayores niveles de expresión del mismo. En los experimentos de tolerancia con plantas de alcornoque transformadas con el gen *CsTL1* se ha visto que, en general, hay correlación entre el nivel de expresión de la proteína tipo taumatina y la tolerancia frente a *P. cinnamomi*. Por el contrario, la línea de encina Q8-tau 36 que es la que tenía mayor expresión y la línea TGR3-tau 18 que tenía una expresión similar a las líneas TGR3-tau 5 y 6 fueron las que significativamente sobrevivieron menos días. Ambos resultados han sido mencionados en la bibliografía. Algunos trabajos coinciden en que la selección de las líneas transgénicas con mayor expresión de las proteínas aumenta la probabilidad de obtener un fenotipo tolerante frente al patógeno (Chen y Punja 2002; Mahdavi *et al.* 2012; Acharya *et al.* 2012). Sin embargo, otros autores no observaron dicha correlación entre la tolerancia y los niveles de expresión de la taumatina (Fagoaga *et al.* 2001; Dhekney *et al.* 2011).

En la bibliografía y a lo largo de la discusión se han descrito métodos muy diversos a la hora de afrontar los ensayos de infección, tanto en plantas transformadas con proteínas tipo taumatina como con otros tipos de proteínas PR. El material para los ensayos de tolerancia es muy variado desde plantas (Munis *et al.* 2010; Naseri *et al.* 2012), a hojas (Dhekney *et al.* 2011; Oden y Ojola 2018), espigas (Chen *et al.* 1999; Anand *et al.* 2003), o bulbos (Acharga *et al.* 2013).

A menudo, el factor limitante en especies leñosas es el material vegetal, debido, como ya se ha mencionado, a las dificultades que entraña la maduración, germinación y aclimatación de las plantas a partir de los embriones somáticos. De forma ideal, los ensayos de tolerancia deberían imitar en todo lo posible las condiciones que se dan en la naturaleza. Esto conllevaría obtener plantas aclimatadas de varios meses o años de edad antes de realizar la infección. Sin embargo, esto es muy complicado de conseguir en leñosas y requiere de mucho tiempo

para la obtención de un buen número de plantas. La obtención de plantas aclimatadas es particularmente dificultoso en el caso de la encina, pues este proceso, tanto a partir de plantas derivadas de brotes axilares enraizados como a partir de embriones somáticos convertidos en plantas, es extremadamente difícil, mencionándose en la bibliografía porcentajes de aclimatación inferiores al 10% (Martinez *et al.* 2019). En este sentido, las técnicas de testado *in vitro* tienen un gran interés en la búsqueda o selección de cultivares tolerantes o resistentes a la presencia de un determinado patógeno, porque es un método más rápido y económico que si esos ensayos se realizaran directamente en campo (Cuenca *et al.* 2010; García-Martínez 2016). El testado *in vitro* se ha utilizado con éxito, por ejemplo, para determinar la tolerancia de portainjertos de aguacate a *P. cinnamomi* (López *et al.* 2007).

A la hora de abordar un ensayo de tolerancia *in vitro* hay que tener en cuenta el medio en el que se establecen los cultivos de la especie vegetal para ser infectados, la metodología a seguir para la correcta infección de las plantas con el patógeno, la selección de los parámetros adecuados que reflejen las diferencias en las respuestas de los distintos genotipos de la especie vegetal frente al patógeno, y la reproducibilidad de los resultados una vez que los genotipos seleccionados son cultivados en condiciones *ex vitro* (García-Martínez 2016). Para la evaluación de la tolerancia de las plantas de alcornoque y encina de esta tesis se adaptó el método de cultivo líquido propuesto por Cuenca *et al.* (2010) para evaluar la tolerancia de castaño a *P. cinnamomi*. Los ensayos en vermiculita o en tierra fueron descartados, como ya se ha mencionado, debido a la dificultad que supuso la aclimatación de plantas de ambas especies, de tal forma que no se pudo tener un número de plantas significativo de plantas aclimatadas en el marco de la tesis para poder llevar a cabo la infección *ex vitro*.

Entre las ventajas de este sistema se encuentran que es un protocolo mucho más rápido que requiere tan sólo del enraizamiento de las plantas y permite realizar varias repeticiones del ensayo en un período más corto de tiempo. También se asegura que todas las plantas tengan la misma edad, sean fisiológicamente más homogéneas y se evitan las diferencias ambientales. Es posible adaptar el volumen del medio

líquido al tamaño de la planta y sus raíces, facilitando la adición de medio fresco, si fuese necesario, y permite monitorizar en todo momento el avance de la infección en las raíces. En el caso de alcornoque y encina, ninguna de las plantas utilizadas durante la evaluación de resistencia, ni sus controles, se vieron afectados negativamente por las condiciones de cultivo. La infección en medio líquido podría solventar las diferencias de sensibilidad a la infección mencionadas por Tuset *et al.* (2001). Este autor describe una serie de factores que pueden alterar la infección *ex vitro* en sustrato: primero posibles interferencias producidas entre las zoosporas enquistadas, debido a que las zoosporas se acumulan masivamente en zonas puntuales de la corteza radical y entorpecen o impiden a los tubos germinativos alcanzar los tejidos superficiales. En segundo lugar, problemas de sensibilidad a la infección, que pueden ser originadas por la escasa atracción que los tejidos radicales de algunas especies de *Quercus* ejercen sobre las zoosporas. Por último, también puede producirse la formación precoz de tejido suberígeno en las raíces absorbentes, lo cual obstaculizaría la penetración de los tubos germinativos. Estos problemas pueden solventarse mediante la infección en medio líquido dentro de tubos de vidrio ya que, siendo un espacio tan reducido, se facilitaría la atracción de las zoosporas por toda la superficie de la raíz. Para retrasar la suberificación de las raíces, se cubrió la parte inferior de cada tubo con papel de aluminio, desde el inicio del enraizamiento, hasta que se produjo la infección. Además, este protocolo de infección permite sellar los tubos de vidrio, solucionando de esta manera el riesgo de escapes del oomiceto, permitiendo mantener los cultivos en cámaras de cultivo de nivel 1 y 2 de contención biológica, y facilitando la posterior esterilización de todo el material.

Se puede concluir que el método de infección en medio líquido resulta muy útil en el caso de querer evaluar diferentes líneas transformadas de forma rápida, permitiendo realizar una primera selección de aquellas líneas que presenten mayor tolerancia frente al patógeno. En el futuro, sólo las líneas transgénicas con mejores resultados podrán multiplicarse y ser aclimatadas, reduciendo de esta manera el tiempo y material utilizado.

VANESA CANO

Podemos concluir que, los resultados obtenidos en la presente investigación y en las anteriormente mencionadas (ver Anexo 1) avalan la estrategia de incrementar la tolerancia de las plantas, incluso en leñosas, a hongos y oomicetos mediante la transformación genética con proteínas tipo taumatina.



## 6. CONCLUSIONES





## ALCORNOCUE

1. El antibiótico kanamicina, en una concentración de 125 mg/L, resultó ser el agente selectivo adecuado para discriminar los embriones transformados genéticamente, mientras que el antibiótico bactericida carbenicilina, en una concentración de 300 mg/L, fue efectivo para inhibir el crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens* tras los ensayos de transformación.

2. La transformación genética de alcornoque con el gen *CsTLL1*, que codifica una taumatina, se logró con embriones somáticos en estado globular-torpedo pre-cultivados durante un día y co-cultivados con la bacteria durante 5 días. Aplicando esas condiciones, se obtuvo la transformación genética de las tres líneas evaluadas, aunque la eficiencia de la transformación está afectada significativamente por el genotipo, con frecuencias que oscilaron entre el 2% y el 17%. Con ese protocolo se han establecido de 30 líneas transformadas, 19 líneas a partir del genotipo TGR3, 7 líneas a partir del genotipo ALM80 y 4 líneas a partir del genotipo ALM6.

3. El gen marcador *GFP* es un método de evaluación de la transformación genética no destructivo, que simplificó el proceso de transformación, permitiendo la evaluación de los eventos de transformación en tiempo real y una discriminación más eficiente de las quimeras.

4. La presencia del gen *CsTLL1* fue confirmada en todas las líneas transgénicas obtenidas mediante PCR, mientras que la expresión del gen fue analizada mediante qPCRrt. Dicho análisis demostró la expresión del gen de la taumatina, si bien los niveles de expresión del mismo variaron notablemente entre las diferentes líneas transformadas obtenidas. Se observó que en las tres líneas transgénicas analizadas de los genotipos ALM6 y en ALM80, el gen de la taumatina se sobre-expresaba de manera significativa. En el genotipo TGR3 la expresión fue significativamente mayor en 4 de las 12 líneas analizadas.

5. La crioconservación mediante la aplicación de un tratamiento de vitrificación permitió el almacenamiento a largo plazo de todas las líneas embriogénicas transgénicas de alcornoque, con porcentajes de recuperación embriogénica después del almacenamiento en NL por encima del 50% en todas las líneas, y llegando a alcanzar el 90-100% en algunas líneas.

6. Durante el proceso de germinación de los embriones transgénicos se obtuvo el desarrollo de plantas completas en todas las líneas transgénicas evaluadas, aunque los porcentajes de regeneración variaron en función de la línea (ALM6: 13,9-41,7%; ALM80: 2,8-16,7%; TGR3: 5,6-36,1%). Brotes derivados de la conversión de los embriones somáticos fueron micropropagados mediante la proliferación de yemas axilares y posteriormente enraizados; de esta forma se puede incrementar el número total de plantas y generar plantas con morfología más uniforme para los ensayos de tolerancia al oomiceto *P. cinnamomi*.

7. En los estudios de tolerancia al oomiceto realizados *in vitro* se observó que en plantas de 7 de las 8 líneas transgénicas estudiadas el número de días de supervivencia tras la infección era mayor que en los controles sin transformar, en 4 de ellas de manera significativa. Asimismo, en la mayoría de las líneas estudiadas se encontró una correlación entre los niveles de expresión del gen de la taumatina en las plantas transgénicas y su tolerancia al ataque del oomiceto.

## ENCINA

1. Se ha obtenido por primera vez la transformación genética de encina, utilizando para ello cultivos embriogénicos y la cepa EHA105pK7WG2D-TAU de *Agrobacterium tumefaciens*.

2. Al igual que en la transformación de alcornoque, los antibióticos seleccionados para la transformación fueron la carbenicilina (300 mg/L) como antibiótico bactericida y la kanamicina como agente selectivo, pero en una concentración de 100 mg/L.

3. La inclusión de un periodo de pre-cultivo de 1 o 2 semanas y la modificación del régimen de aplicación de kanamicina fueron esenciales para lograr la transformación de las masas proembriónicas utilizadas como explanto diana. El genotipo de las líneas embriónicas de encina también afectó a la eficiencia de transformación, obteniéndose la transformación de 2 de las 3 líneas evaluadas (Q8: 3,33% y Q10-16:1,66%). Con el protocolo definido, se han obtenido 11 líneas transgénicas: 10 líneas a partir del genotipo Q8 y una a partir del genotipo Q10-16.

4. Se comprobó que los niveles de expresión del gen *CsTL1* en embriones somáticos de encina variaban entre las diferentes líneas transgénicas obtenidas y que el gen se sobre-expresa significativamente más en 4 de las 6 líneas transgénicas evaluadas.

5. La crioconservación de los embriones somáticos, previamente crioprotectados con un tratamiento de vitrificación, demostró ser un método eficiente para la conservación a largo plazo de las líneas transgénicas de encina, obteniéndose porcentajes de recuperación embriónica después del almacenamiento en NL del 43,3%-76,7%.

6. El desarrollo de plantas completas se obtuvo a partir de todas las líneas transgénicas evaluadas, aunque el porcentaje de conversión también depende de la línea transgénica (2,8%-75%). Adicionalmente, la micropropagación mediante proliferación de yemas axilares de los brotes aislados de embriones con conversión completa y su posterior enraizamiento, permitió la obtención de plantas más uniformes en términos de raíz y brote y de una forma continuada.

7. En el ensayo de tolerancia al oomiceto el número de días de supervivencia fue inferior al obtenido con las plantas de transgénicas de alcornoque y la correlación entre la tolerancia y los niveles de expresión del gen no es evidente.



## 7. BIBLIOGRAFÍA





Acacio V, Holmgren M, Moreira F, Mohren GMJ (2010) Oak persistence in Mediterranean landscapes: the combined role of management, topography, and wildfires. *Ecol Soc* 15:40.

Acharya K, Pal AK, Gulati A, Kumar S, Singh AK, Ahuja PS (2013). Overexpression of *Camellia sinensis* Thaumatin-Like Protein, CsTLP in Potato Confers Enhanced Resistance to *Macrophomina phaseolina* and *Phytophthora infestans* Infection. *Mol Biotechnol* 54:609-622. doi: 10.1007/s12033-012-9603-y.

Acosta R (2014) Dehesa de Tentudía. Inventario Español de los Conocimientos Tradicionales relativos a la Biodiversidad. 305-318.

Ali S, Ganai BA, Kamili AN, Bhat AA, Mir ZA, Bhat JA, Tyagi A, Islam ST, Mushtaq M, Yadav P, Rawat S, Grover A (2018). Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools forengineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiol Res* 212:29-37.

Allona I, Collada C, Casado R, Paz-Ares J, Aragoncillo C (1996) Bacterial expression of an active class Ib chitinase from *Castanea sativa* cotyledons. *Plant Mol Biol.* 32:1171-1176. doi: 10.1007/bf00041402.

Almaraz-Sánchez A, Alvarado-Rosales D, Leyva-Mir G, Equihua-Martínez A, Aranda-Ocampo S, Hernández-Morales J (2016) *Phytophthora cinnamomi* Rands. pathogenicity tests in *Pseudotsuga menziesii*. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 34:142-157. doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1509-2.

Álvarez R, Ordás RJ (2008) Sensibilidad a la kanamicina y transformación genética de embriones somáticos de alcornoque (*Quercus suber* L.). *Cuad Soc Esp Cienc For.* 24:101-106. ISSN: 1575-2410.

Álvarez R, Ordás RJ (2007) Improved genetic transformation protocol for cork oak (*Quercus suber* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 91:45-52. doi: 10.1007/s11240-007-9276-6.

Álvarez R, Ordás RJ (2012) Improved genetic transformation of cork oak (*Quercus suber* L.). *Meth Mol Biol.* 385-399. doi: 10.1007/978-1-61779-818-4\_28.

Álvarez R, Toribio M, Ordás RJ (2006) Cork oak trees (*Quercus suber* L.). *Methods Mol Biol.* 344:113-123. doi: 10.1385/1-59745-131-2:113.

Álvarez R, Alonso P, Cortizo M, Celestino C, Hernández I, Toribio M, Ordás RJ (2004) Genetic transformation of selected mature cork oak (*Quercus suber* L.) trees. *Plant Cell Rep.* 23:218-223. doi: 10.1007/s00299-004-0810-2.

Álvarez R, Álvarez JM, Humara JM, Revilla A, Ordás RJ (2009) Genetic transformation of cork oak (*Quercus suber* L.) for herbicide resistance. *Biotechnol Lett.* 31:1477-1483. doi: 10.1007/s10529-009-0033-2.

Alves A, Correia A, Luque J, Phillips A (2004) *Botryosphaeria corticola*, sp. nov. on *Quercus* Species, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph, *Diplodia mutila*. *Mycologia.* 96:598-613. doi: 10.2307/3762177.

Amoah BK, Wu H, Sparks C, Jones HD (2001) Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of uidA in wheat inflorescence tissue. *J Experimental Bot.* 52:1135-1142. doi: 10.1093/jexbot/52.358.1135.

Anand A, Zhou T, Trick HN, Gill BS, Bockus WW, Muthukrishnan S (2003) Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum*. *J Exp Bot.* 54:1101-1111. doi: 10.1093/jxb/erg110.

Andrade GM, Merkle SA (2005) Enhancement of American chestnut somatic seedling production. *Plant Cell Rep.* 24:326-334. doi: 10.1007/s00299-005-0941-0.

Andrés-Ares JL (2015) Plantas Leñosas Ornamentales: control de enfermedades producidas por hongos y cromistas. Ediciones Mundi-Prensa. ISBN: 978-84-8476-649-0.

Aranda I, Castro L, Alia R, Pardos JA, Gil L (2005) Low temperature during winter elicits differential responses among populations of the Mediterranean evergreen cork oak (*Quercus suber*). *Tree Physiol* 25:1085-1090. doi: 10.1093/treephys/25.8.1085.

Aronson J, Pereira JS, Pausas JG (2009) Cork oak woodlands on the edge: ecology, adaptive management and restoration. Island Press. ISBN: 1-59726478-4-978-1-59726478-5.

Balasubramanian V, Vashisht D, Cletus J, Sakthivel N (2012) Plant  $\beta$ -1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. *Biotechnol Lett.* 34:1983-1990. doi: 10.1007/s10529-012-1012-6.

Ballester A, Corredoira E, Vieitez AM (2016) Limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. In *Vegetative Propagation of Forest Trees*. 56-74. ISBN: 978-89-8176-064-9.

Bandopadhyay R, Haque I, Singh D, Mukhopadhyay (2010) Levels and stability of expression of transgenes. In: Kole C, Michler C, Abbott AG, Hall TC (eds). *Transgenic Crop Plants*. Volume 1: Principles and Development. 145-186. ISBN: 978-3-642-04809-8.

Barbero M, Loisel R, Quézel P (1992) *Quercus ilex* L. ecosystems. In: Romane F, Terradas J. (eds). *Quercus ilex* L. ecosystems: function, dynamics and management. *Advances in vegetation science*. 13:19-34. ISBN 978-94-017-2836-2.

Barra-Jiménez A (2015) Development of somatic embryogenesis for cloning and conservation of mature holm oak trees (*Quercus ilex* L.). Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid.

Barra-Jiménez A, Blasco M, Ruíz-Galea M, Celestino C, Alegre J, Arrillaga I, Toribio M (2014) Cloning mature holm oak trees by somatic embryogenesis. *Trees* 28:657-667. doi: 10.1007/s00468-014-0979-0.

Bednarek P, Osbourn A (2009) Plant-Microbe interactions: chemical diversity in plant defense. *Science*. 324:746-748. doi: 10.1126/science.1171661.

Benson EE (2008) Cryopreservation Theory. In: Reed BM (eds). *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Springer, New York, NY. doi: 10.1007/978-0-387-72276-4\_2.

Bernal MP, Remedios DA, Pérez OV, Rigo MD, Ramos RA (2013) Effective  $\beta$ -lactam antibiotics for *Agrobacterium tumefaciens* suppression in indica rice calli. *Rev Colomb Biotecnol*. 2:89-96. doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v15n2.41267.

Berrahmouni N, Gómez R, Escuté X, Regato P (2005) WWF-Programa para la conservación de Alcornocales. *Ecosistemas*. 14:82-85.

Berrocal M, Gallardo JF, Cardeñoso JM (1998) *El castaño*. Ed Mundi-Prensa. ISBN: 84-7114-722-X.

Bezirganoglu I, Hwang SY, Fang TJ, Shaw JF (2013) Transgenic lines of melon (*Cucumis melo* L. var. *makuwa* cv. 'Silver Light') expressing antifungal protein and chitinase genes exhibit enhanced resistance to fungal pathogens. *PCTOC*. 112:227-237. doi: 10.1007/s11240-012-0227-5.

Bigeard J, Colcombet J, Hirt H (2015) Signaling mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). *Mol Plant*. 8:521-539. doi: 10.1016/j.molp.2014.12.022.

Blackwell EM (1949) *Terminology in Phytophthora*. Mycological Papers 30. Kew, Surrey, England: CAB International Mycological Institute.

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. doi: 10.1007/s10725-013-9826-3.

Boavida LC, Varela MC, Feijoo JA (1999) Sexual reproduction in the cork oak (*Quercus suber* L.) I. The progamic phase. *Sex Plant Reprod.* 11:347-353. doi: 10.1007/s004970050162.

Bol BJC, Linthorst JF, Cornelissen HJM (1990) Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annu Rev Phytopathol.* 28:113-138. doi: 10.1146/annurev.py.28.090190.000553.

Bonga JM, Klimaszewska KK, von Aderkas P (2010) Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *PCTOC.* 100:241-254. doi: 10.1007/s11240-009-9647-2.

Borges AA, Borges-Pérez A, Fernández-Falcón M (2004) Induced resistance to Fusarial wilt of banana by menadione sodium bisulphite treatments. *Crop Protect.* 12:1245-1247. doi: 10.1016/j.cropro.2004.05.010.

Brasier C (1996) *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Ann Sci For.* 53:347-358. doi :10.1051/forest:19960217.

Breseghele F, Coelho ASG (2013). Traditional and modern plant breeding methods with examples in rice (*Oryza sativa* L.). *J Agr Food Chem.* 61:8277-8286. doi: 10.1021/jf305531j.

Broothaerts W, Keulemans J, Van Nerum I (2003) Self-fertile apple resulting from S-RNase gene silencing. *Plant Cell Rep.* 22:497-501. doi: 10.1007/s00299-003-0716-4.

Buchel AS, Linthorst HJM (1999) PR-1: A group of plant proteins induced upon pathogen infection. In: *Pathogenesis-Related Proteins in Plants* (Datta SK and Muthukrishnan S, eds). Boca Raton: CRC Press. 21-47. doi: 10.1201/9781420049299.

Bugalho MN, Caldeira MC, Pereira JS, Aronson J, Pausas JG (2011) Mediterranean cork oak savannas require human use to sustain biodiversity and ecosystem services. *Front Ecol Environ.* 9:278-86. doi: 10.1890/100084

Bueno MA, Manzanera JA (1992) Primeros ensayos de inducción de embriones somáticos de *Quercus suber* L. *Scientia Gerundensis* 18:29-37.

Bueno MA, Astorga R, Manzanera JA (1992) Plant regeneration through somatic embryogenesis in *Quercus suber*. *Physiol Plant*. 85:30-34. doi: 10.1111/j.1399-3054.1992.tb05259.x.

Büntgen U, Egli S, Schneider L, von Arx G, Rigling A, Camarero JJ, Sangüesa-Barreda G, Fischer CR, Oliach D, Bonet JA, Colinas C, Teje W, Ruiz Barbarin JJ, Martínez-Peña F (2015) Long-term irrigation effects on Spanish holm oak growth and its black truffle symbionts. *New Phytol*. 202:148-159. doi: 10.1016/j.agee.2014.12.016.

CABI (2017) Invasive species convenium. *Phytophthora cinnamomi* (*Phytophthora dieback*) <https://www.cabi.org/isc/datasheet/40957>.

Çalışkan M (2000) Germin, an oxalate oxidase, has a function in many aspects of plant life. *Turk J Biol*. 24:717-724. ISSN: 1010-7576.

Camarena-Gutiérrez G, de la Torre-Almaráz R (2007) Resistencia sistémica adquirida en plantas: estado actual. *Rev Chapingo Ser Cienc For Ambient*. 13:157-162. ISSN: 2007-4018.

Camilo-Alves CSP, da Clara MIE, Almeida Ribeiro NMC (2013) Decline of Mediterranean oak trees and its association with *Phytophthora cinnamomi*: a review. *Eur J Forest Res*. 132:411-432. doi: 10.1007/s10342-013-0688-z.

Campos MA, Rosa DD, Teixeira JEC, Targon MLPN, Souza AA, Paiva LV, Stach-Machado DR, Machado MA (2007) PR gene families of citrus: their organ specific-biotic and abiotic inducible expression profiles based on ESTs approach. *Genet Mol Biol*. 30: 917-930. doi: 10.1590/s1415-47572007000500020.

Caro LA, Santecchia N, Marinangeli PA, Curvetto NR, Hernández LF (2003). *Agrobacterium rhizogenes* vs auxinic induction for *in vitro* rhizogenesis of *Prosopis chilensis* and *Nothofagus alpina*. *Biocell*. 27:311-318. ISSN: 0327-9545.

Castellanos-Hernández OA, Rodríguez-Sahagún A, Acevedo-Hernández GJ, Herrera-Estrella LH (2011) Genetic transformation of forest trees. *Genetic transformation*. 191-214. doi: 10.5772/24354.

Chakrabarty R, Viswakarma N, Bhat SR, Kirti PB, Singh BD, Chopra VL (2002) *Agrobacterium*-mediated transformation of cauliflower: Optimization of protocol and development of Bt-transgenic cauliflower. *J Biosci*. 27:495-502. doi: 10.1007/bf02705046.

Chandrashekhara S, Niranjan-Raj S, Deepak S, Manjunath G, Shekar Shetty H (2010) Thionins (PR protein-13) mediate pearl millet downy mildew disease resistance. *Arch Phytopathol PFL*. 43:1356-1366. doi: 10.1080/03235400802476393.

Chauhan RD, Veale A, Cathleen M, Strauss SH, Myburg AA (2015) Genetic transformation of eucalyptus- challenges and future prospects. In: Ramawat KG, Mérillon JM, Ahuja MR (eds). *Tree Biotechnology*. CRC Press. 392-425.

Chen W, Punja Z (2002) Transgenic herbicide- and disease-tolerant carrot (*Daucus carota* L.) plants obtained through *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep*. 20:929-935. doi: 10.1007/s00299-001-0419-7.

Chen W, Chen P, Liu D, Kynast R, Friebe B, Velazhahan R, Muthukrishnan S, Gill BS (1999) Development of wheat scab symptoms is delayed in transgenic wheat plants that constitutively express a rice thaumatin-like protein gene. *Theor Appl Genet*. 99:755-760. doi: 10.1007/s001220051294.

Chen Z, Lundén K, Karlsson B, Vos I, Olson A, Lundqvist SO, Stenlid J, Wu HX, García Gil MR, Elfstrand M (2018) Early selection for resistance to *Heterobasidion parviporum* in Norway spruce is not likely to adversely affect growth and wood quality traits in late-age performance. *Eur J Forest Res*. 137:517-525. doi: 10.1007/s10342-018-1120-5.

Chetty V, Ceballos N, Garcia D, Narváez-Vásquez J, Lopez W, Orozco-Cárdenas M (2013) Evaluation of four *Agrobacterium tumefaciens* strains for the genetic transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tom. *Plant Cell Rep.* 32:239-247. doi: 10.1007/s00299-012-1358-1.

Chi GL, Goh HKL, Hoo KY, Legavre T, Drew WRA (1998) Gus gene expression in *Anthurium andreanum*, *Onbidium Gower Ramsey* and *Brassolaeliocattleya Orange Glory Empress* after particle bombardment. *Acta Hort.* 461:379-383. doi: 10.17660/ActaHortic.1998.461.43.

Clark SL, Schlarbaum SE, Saxton AM, Baird R (2019) Eight-year blight (*Cryphonectria parasitica*) resistance of backcross-generation American chestnuts (*Castanea dentata*) planted in the southeastern United States. *Forest Ecol Manag.* 433:153-61. doi: 10.1016/j.foreco.2018.10.060.

Cesar AS, Ignacimuthu S (2012) Genetic engineering of crop plants for fungal resistance: role of antifungal genes. *Biotechnol Lett.* 34: 995-1002. doi: 10.1007/s10529-012-0871-1.

Cernadas MJ, Martínez MT, Corredoira E, San-José MC (2018) Conservation of holm oak (*Quercus ilex*) by in vitro culture. *Mediterranean Botany.* 39:97-104. doi: 10.5209/mbot.60779.

Cervera M, Juárez J, Navarro A, Pina JA, Duran-Vila N, Navarro L, Peña L (1998) Genetic transformation and regeneration of mature tissues of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. *Transgenic Res.* 7:51-59. doi: 10.1023/A:1008855922283.

Cervera M, Piña JA, Juárez J, Navarro L, Peña LA (2000) A broad exploration of a transgenic population of citrus: stability of gene expression and phenotype. *Theor Appl Genet.* 100:670-677. doi: 10.1007/s001220051338.

Cohen YR (2002)  $\beta$ -Aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens. *Plant Dis.* 86:448-457. doi: 10.1094/PDIS.2002.86.5.448.

Cohen Y, Rubin AE, Galperin M (2018) Oxathiapiprolin-based fungicides provide enhanced control of tomato late blight induced by mefenoxam-insensitive *Phytophthora infestans*. PLoS ONE 13: e0204523. doi: 10.1371/journal.pone.0204523.

Conrath U (2006) Systemic Acquired Resistance. Plant Signal Behav. 1:179-184. doi: 10.4161/psb.1.4.3221.

Conrath U, Beckers GJM, Langenbach CJG, Jaskiewicz MR (2015) Priming for enhanced defense. Annu Rev Phytopathol. 53:97-119. doi: 10.1146/annurev-phyto-080614-120132.

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*. Agr Forest Meteorol. 169: 92-99. doi: 10.1016/j.agrformet.2012.09.017.

Corcobado T, Miranda-Torres J.J, Martín-García J, Jung T, Solla A (2016) Early survival of *Quercus ilex* subspecies from different populations after infections and co-infections by multiple *Phytophthora* species. Plant Pathol. 66:792-804. doi: 10.1111/ppa.12627.

Corredoira E, Vieitez AM, Ballester A (2002) Somatic embryogenesis in elm. Ann Bot. 89:637-644. doi: 10.1093/aob/mcf080.

Corredoira E, Ballester A, Vieitez AM (2003) Proliferation, maturation and germination of *Castanea sativa* Mill. somatic embryos originated from leaf explants. Ann Bot. 92:129-136. doi: 10.1093/aob/mcg107.

Corredoira E, San-José MC, Vieitez AM (2012) Induction of somatic embryogenesis from different explants of shoot cultures derived from young *Quercus alba* trees. Trees 26:881-891. doi: 10.1007/s00468-011-0662-7.

Corredoira E, Toribio M, Vieitez AM (2014) Clonal propagation via somatic embryogenesis in *Quercus* spp. In: Ramawat KG, Mérillon JM, Ahuja MR (eds). Tree biotechnology (chapter 10). CRC Press, Boca Raton, FL. 262-302. doi: 10.1201/b16714-13.

Corredoira E, Montenegro D, San-José MC, Vieitez AM, Ballester A (2004a) *Agrobacterium*-mediated transformation of European chestnut embryogenic cultures. *Plant Cell Rep.* 23:311-318. doi: 10.1007/s00299-004-0804-0.

Corredoira E, San-José MC, Ballester A, Vieitez AM (2004b) Cryopreservation of zygotic embryo axes and somatic embryos of European chestnut. *Cryo Letters.* 25:33-42.

Corredoira E, San-José MC, Vieitez AM, Ballester A (2007) Improving genetic transformation of European chestnut and cryopreservation of transgenic lines. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 91:281-288. doi: 10.1007/s11240-007-9295-3.

Corredoira E, Valladares S, Vieitez AM, Ballester A (2008) Improved germination of somatic embryos and plant recovery of European chestnut. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 44:307-315. doi: 10.1007/s11627-008-9105-6.

Corredoira E, Valladares S, Vieitez AM, Ballester A (2015) Chestnut, European (*Castanea sativa*). In: Wang K (ed). *Methods in molecular biology Agrobacterium* protocols. Springer, New York. 163-176. doi: 10.1007/978-1-4939-1658-0\_14.

Corredoira E, San-José MC, Vieitez AM, Allona I, Aragoncillo C, Ballester A (2016). *Agrobacterium*-mediated transformation of European chestnut somatic embryos with a *Castanea sativa* (Mill.) endochitinase gene. *New Forests.* 47:669-684. doi: 10.1007/s11056-016-9537-5.

Corredoira E, Martínez MT, San-José MC, Ballester A (2017a) Conservation of hardwood forest species. In: Ahuja MR, Jain SM (eds). *Biodiversity and Conservation of Woody Plants. Sustainable Development and Biodiversity* (chapter 17). Springer International Publishing, Switzerland. 422-453. doi: 10.1007/978-3-319-66426-2\_14.

Corredoira E, Cano V, Bárány I, Solís MT, Rodríguez H, Vieitez AM, Risueño MC, Testillano PS (2017b) Initiation of leaf somatic

embryogenesis involves high pectin esterification, auxin accumulation and DNA demethylation in *Quercus alba*. *J Plant Physiol.* 213:42-54. doi: 10.1016/j.jplph.2017.02.012.

Corredoira E, Hernández I, Morcillo M, Martínez MT, Ruiz-Galea M, Cernadas MJ, Ramírez-Martín N, San José MC, Arrillaga I, Toribio M (2018) Holm Oak *Quercus ilex* L. In: Jain SM, Gupta P (eds). *Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants*. Vol I. Second Ed. Forestry Sciences, Springer. 181-195. doi: 10.1007/978-3-319-89483-6\_14.

Corredoira E, Merkle SA, Martínez MT, Toribio M, Canhoto JM, Correia SI, Ballester A, Vieitez AM (2019) Non-zygotic embryogenesis in hardwood species. *Crit Rev Plant Sci.* 38:29-97. doi: 10.1080/07352689.2018.1551122.

Couselo JL (2015) Sobreexposición de fitoquelatina sintasas y de enzimas con actividad nitroreductasa en "*Populus tremula x tremuloides*" para la descontaminación de suelos. Tesis doctoral. USC Departamento de Fisiología Vegetal.

Couselo JL, Navarro-Aviñó J, Ballester A (2010) Expression of the phytochelatin synthase TaPCS1 in transgenic aspen, insight into the problems and qualities in phytoremediation of Pb. *Int J Phytol.* 12:358-370. doi: 10.1080/15226510902968134.

Cuenca B, Ocaña L, Salinero MC, Pintos C, Mansilla JP, Rial C (2010) Selection of *Castanea sativa* Mill., for resistance to *Phytophthora cinnamomi*: micropropagation and testing of selected clones. *Acta Hortic.* 866:111-119. doi: 10.17660/ActaHortic.2010.866.11.

Dan Y (2008) Biological functions of antioxidants in plant transformation. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 44:149.161. doi: 10.1007/s11627-008-9110-9.

Dandekar AM, Teo G, Defilippi BG, Uratsu SL, Passey AJ, Kader AA, Stow JR, Colgan RJ, James DJ (2004) Effect of down-regulation of ethylene biosynthesis on fruit flavor complex in apple fruit.

Transgenic Res. 13:373-384. doi:  
10.1023/B:TRAG.0000040037.90435.45.

Datta K, Velazhahan R, Oliva N, Ona I, Mew T, Khush GS, Muthukrishnan S, Datta KS (1999) Over-expression of the cloned rice thaumatin-like protein (PR-5) gene in transgenic rice plants enhances environmental friendly resistance to *Rhizoctonia solani* causing sheath blight disease. *Theor Appl Genet* 98:1138-1145. doi: 10.1007/s001220051178.

Davey MR, Soneji JR, Rao MN, Kourmpetli S, Bhattacharya A, Kole C (2010) Generation and deployment of transgenic crop plants: an overview. In: Kole C, Michler CH, Abbott AG, Hall TC (eds). *Transgenic Crop Plants*. Springer, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-04809-8\_1.

De Buck S, De Wilde C, Van Montagu M, Depicker A (2000) T-DNA vector backbone sequences are frequently integrated into the genome of transgenic plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mol Breeding* 6:459-468. doi: 10.1023/A:1026575524345.

de Rigo D, Caudullo G (2016) *Quercus ilex* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: San-Miguel-Ayán J, de Rigo D, Caudullo G, Houston Durrant T, Mauri A (eds). *European Atlas of Forest Tree Species*. Publ. Off. EU, Luxembourg, pp. e014bcd 152-153.

De Vita P, Callier P, Serrano MS, Ramo C, García LV, Aponte C, Trapero A, Sánchez Hernández ME (2010) Cork oak diseases at Doñana National Park (SW Spain). II Symposium The oak: Ecology, History, Management and Planning. Suleyman Demirel University, Isparta, Turquía. 102-105.

Dean R, van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, Foster GD (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*. 13:414-430. doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x.

Develey-Rivière MP, Galiana E (2007) Resistance to pathogens and host developmental stage: a multifaceted relationship within the plant kingdom. *New Phytol.* 175:405-416.

Dhekney SA, Li ZJT, Gray DJ (2011) Grapevines engineered to express cisgenic *Vitis vinifera* thaumatin-like protein exhibit fungal disease resistance. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 47:458-466. doi: 10.1007/s11627-011-9358-3.

Díaz M, Campos P, Pulido FJ (2009) Importancia de la caza en el desarrollo sustentable y en la conservación de la biodiversidad. En: Sáez de Buruaga M y Carranza J (coords.). *Gestión Cinegética en Ecosistemas Mediterráneos*, 21-23. Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, Sevilla.

Díaz-Sala C (2016) Physiological, cellular, molecular and genomic analysis of the effect of maturation on propagation capacity. In: Park YS, Bonga JM, Moon HK (eds). *Vegetative Propagation of Forest Trees*. National Institute of Forest Science, Seoul. 75-96.

Diskin M, Steiner KC, Hebard FV (2006) Recovery of American chestnut characteristics following hybridization and backcross breeding to restore blight-ravaged *Castanea dentata*. *For Ecol Manag.* 223:439-447. doi: 10.1016/j.foreco.2005.12.022.

Dixon MS, Jones DA, Keddie JS, Thomas CM, Harrison K, Jones JD (1996) The tomato Cf-2 disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. *Cell.* 84:451-459. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81290-8.

Domínguez Núñez JA, Rodríguez Barreal JA, Saiz De Omeña JA (2005) Ectomycorrhizae occurring in evergreen oak (*Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp.) in two cultivated truffle bed in Castellón (Spain). *Bol San Veg Plagas* 31:147-157. ISSN: 0213-6910.

Dotor MY, Cabezas M (2014) Mecanismos de resistencia sistémica en plantas. *Acta Iguazu, Cascavel.* 3:1-19. ISSN: 2316-4093.

Drenth A, Sendall B (2001) Practical guide to detection and identification of *Phytophthora*. CRC for Tropical Plant Protection Brisbane Australia.

Duncan EJ, Heberle E (1976) Effects of temperature shock on nuclear phenomena in microspores of *Nicotiana tabacum* and consequently on plantlet production. *Protoplasma* 90:173-177. doi: 10.1007/BF01276486.

Dungey HS, Williams NM, Low CB, Stovold GT (2014) First evidence of genetic-based tolerance to red needle cast caused by *Phytophthora pluvialis* in radiata pine. *NZ J For Sci.* 44:31. doi: 10.1186/s40490-014-0028-1.

Duplessis S, Ian M, Francis M, Armand S (2009) Poplar and pathogen interactions: insights from *Populus* genome-wide analyses of resistance and defense gene families and gene expression profiling. *Crit Rev Plant Sci.* 28:30-334. doi: 10.1080/07352680903241063.

Dutt M, Grosser JW (2010) An embryogenic suspension cell culture system for *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus. *Plant Cell Rep.* 29:1251-1260. doi: 10.1007/s00299-010-0910-0.

El Kbiach M, El Bouzdoudi B, Saïdi R, Nejjar El Ansari Z, Rahmouni S, Lamarti A (2017) Callogenesis of cork oak (*Quercus suber* L.) through in vitro culture of nodes and internodes. *Am J Plant Sci.* 8:1801-1819. doi: 10.4236/ajps.2017.88123.

Ellis D (1995) Genetic transformation of somatic embryos. In: Bajaj YPS (ed). *Somatic embryogenesis and synthetic seed I. Biotechnology in agriculture and forestry.* vol 30. Springer, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-662-03091-2\_14.

Engelmann F (2004) Plant Cryopreservation: Progress and Prospects. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 40:427-433. doi: 10.1079/IVP2004541.

European Forest Genetic Resources Programme (EUFORGEN)  
[www.euforgen.org](http://www.euforgen.org).

Erwin DC, Ribeiro OK (1996) *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press. doi: 10.1046/j.1365-3059.1998.0179a.x.

Eschen-Lippold L, Landgraf R, Smolka U, Schulze S, Heilmann M, Heilmann I, Hause G, Rosahl S (2012) Activation of defense against *Phytophthora infestans* in potato by down-regulation of syntaxin gene expression. *New Phytol.* 193:985-996. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.04024.x.

Escobar MA, Park J, Polito VS, Leslie CA, Uratsu SL, McGranahan GH, Dandekar AM (2000) Using GFP as a scorable marker in walnut somatic embryo transformation. *Ann Bot* 85:831-835. doi:10.1006/anbo.2000.1143.

Eyles A, Bonello P, Ganley R, Mohammed C (2010) Induced resistance to pests and pathogens in trees. *New Phytol* 185:893-908. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03127.x.

Fagoaga C, Rodrigo I, Conejero V, Hinarejos C, Tuset JJ, Arnau J, Pina JA, Navarro L, Peña L (2001) Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. *Mol Breed.* 7:175-185. doi: 10.1023/a:1011358005054.

Féraud-Keller C, Espagnac H (1989) Conditions d'apparition d'une embryogénèse somatique sur des cals issus de la culture de tissus foliaires du chêne vert (*Quercus ilex*). *Can J Bot.* 67:1066-1070. doi: 10.1139/b89-139.

Feraud-Keller C, El Maataoui M, Gouin O, Espagnac H (1989) Somatic embryogenesis in three species of Mediterranean oaks. *Ann For Sci.* 46:130-132.

Fernández-Guijarro B (1997) Embriogénesis somática en alcornoque (*Quercus suber* L.). Tesis Doctoral. E.T.S. Ingenieros de Montes. Universidad Politécnica de Madrid.

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*. *PCTOC.* 41:99-106.

Fillatti J, Sellmer J, McCown B, Haissih B, Comai L (1987) *Agrobacterium* transformation and regeneration of *Populus*. Mol Gen Genet. 206:192-199. doi: 10.1007/BF00333574.

Fladung M, Kumar S, Raj Ahuja M (1997). Genetic transformation of *Populus* genotypes with different chimaeric gene constructs: transformation efficiency and molecular análisis. Transgenic Res. 6:111-121. doi: 10.1023/a:1018421620040.

Flower CE, Slavicek JM, Lesser D, Eshita S, Pinchot CC (2016) Canopy decline assessments in American elm after inoculation with different doses of *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi*. Proceedings of the American elm restoration workshop 2016, Elm Pathogens. 24-29.

Franceschi VR, Krokene P, Krekling T (2005). Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. New Phytologist. 167:353-376. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01436.x.

Fritsche S, Klocko AL, Boron A, Brunner AM, Thorlby G (2018) Strategies for engineering reproductive sterility in plantation forests. Front Plant Sci. 9:1671. doi: 10.3389/fpls.2018.01671.

Fu D, Tisserat NA, Xiao Y, Settle D, Muthukrishnan S, Liang GH (2005) Overexpression of rice TLPD34 enhances dollar-spot resistance in transgenic bentgrass. Plant Sci. 168:671-680. doi:10.1016/j.plantsci.2004.09.032.

Fu ZQ, Dong X (2013). Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. Annu Rev Plant Biol. 64:839-863. doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105606.

Gallardo F, Fu J, Cantón FR, Garcá-Gutiérrez A, Cánovas FM, Kirby EG (1999) Expression of a conifer glutamine synthetase gene in transgenic poplar. Planta 210:19-26. doi: 10.1007/s004250050649.

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res. 50:151-158. doi: 10.1016/0014-4827(68)90403-5.

Ganeshan S, Chibbar RN (2010) Gene Transfer Methods. *Transgenic Crop Plants*. 57-83. doi: 10.1007/978-3-642-04809-8\_3.

Gao F, Wu Y, Wang M (2014) Identification and antifungal activity of an actinomycete strain against *Alternaria* spp. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). *Span J Agric Res*. 12:1158-1165. doi: 10.5424/sjar/2014124-5547.

García-Benavides P, Monte-Vázquez E (2005) Fitopatología del castaño: el chancro y la tinta en la provincia de Salamanca. *Naturaleza y Medio Ambiente* 3.

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. doi: 10.1034/j.1399-3054.2000.110205.x.

García-Gómez E, Pereira J (2013) El uso medicinal de la bellota. *Med Natur*. 7:44-52. ISSN: 1576-3080.

García-Gómez E, Pérez-Badia R, Pereira J, Puri RK (2017) The consumption of acorns (from *Quercus* spp.) in the central west of the Iberian Peninsula in the 20th century. *Econ Bot*. 71:256-268. doi: 10.1007/s12231-017-9391-1

García-Martín G, Manzanera JA, González-Benito ME (2005) Effect of exogenous ABA on embryo maturation and quantification of endogenous levels of ABA and IAA in *Quercus suber* somatic embryos. *PCTOC*. 80:171-177. doi: 10.1007/s11240-004-1056-y.

García-Martínez JJ (2016). Micropropagación de *Quercus suber* L. y resistencia/tolerancia in vitro al patógeno *Phytophthora cinnamomi* Rands. fases iniciales de la micropropagación de *Q. ilex* L. Tesis doctoral. Departamento de Ciencias Agroforestales. Universidad de Huelva.

García-Ruiz H, García Ruiz MT, Gabriel Peralta SM, Miravel Gabriel CE, El-Mounadi K (2016) Mecanismos, aplicaciones y

perspectivas del silenciamiento génico de virus en plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 34:3. doi: 10.18781/r.mex.fit.1606-8.

Gelvin SB (2003) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiol Mol Biol R* 67:16-37. doi: 10.1128/MMBR.67.1.16-37.2003.

Gentile S, Valentino D, Tamietti G (2009) Control of ink disease by trunk injection of potassium phosphite. *J Plant Pathol*. 91:565-571. doi: 10.4454/jpp.v91i3.547.

Gerszberg A, Grzegorzcyk-Karolak I (2019) Influence of selected antibiotics on the tomato regeneration in in vitro cultures. *Not Bot Horti Agrobo*. 47:558-564. doi: 10.15835/nbha47311401.

Ghag SB, Shekhawat UKS, Ganapathi TR (2012) Petunia floral defensins with unique prodomains as novel candidates for development of Fusarium wilt resistance in transgenic banana plants. *PLoS ONE*. e39557. doi: 10.1371/journal.pone.0039557.

Gil L (2009) Cork composites: a review. *Materials*. 2:776-789. doi: 10.3390/ma2030776.

Gil L (2014) Cork: a strategic material. *Front Chem*. 2:1-2. doi: 10.3389/fchem.2014.00016.

Gil L, Varela MC (2008) EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for cork oak (*Quercus suber*) Bioersity International.

Giri CC, Shyamkumar B, Anjaneyulu C (2004) Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. *Trees*. 18:115-135. doi: 10.1007/s00468-003-0287-6.

Gleba YY, Tusé D, Giritch A (2014) Plant viral vectors for delivery by *Agrobacterium*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 375:155-192.

Girijashankar V (2011) Genetic transformation of eucaliptus. *Physiol Mol Biol Plants*. 17:9-23.

Godfrey D, Able AJ, Dry IB (2007) Induction of a grapevine germin-like protein (VvGLP3) gene is closely linked to the site of *Erysiphe necator* infection: a possible role in defense? Mol Plant Microbe In. 20:1112-1125. doi: 10.1094/MPMI-20-9-1112.

Gómez A, López JA, Pintos B, Camafeita E, Bueno MA (2009) Proteomic analysis from haploid and diploid embryos of *Quercus suber* L. identifies qualitative and quantitative differential expression patterns. Proteomics 9:4355-4367. doi: 10.1002/pmic.200900179.

Gómez-Garay A, Manzanera JA, Pintos B (2014) Embryogenesis in Oak species. A review. For Syst. 23:191-198. ISSN 2171-5068.

Gómez-Garay A, Manzanera JA, Testillano PS, Pintos B (2015) *Quercus ilex* L. in: Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants. Vol I. Second Ed. 135-147.

Gonzales-Salazar R, Cecere B, Ruocco M, Rao R, Corrado G (2017) A comparison between constitutive and inducible transgenic expression of the PhRIP I gene for broad-spectrum resistance against phytopathogens in potato. Biotechnol Lett. 39:1049-1058. doi: 10.1007/s10529-017-2335-0.

Gonsalves D, Ferreira S, Manshardt R, Fitch M, Slightom J (1998) Transgenic virus resistant papaya: New hope for control of papaya ringspot virus in Hawaii. APSnet Feature, American Pythopathological Society. doi: 10.1094/PHP-2000-0621-01-RV.

González M, Caetano P, Sánchez ME (2017) Testing systemic fungicides for control of *Phytophthora* oak root disease. Forest Pathol 47:e12343. doi: 10.1111/efp.12343.

Gorjanović S (2009) A Review: Biological and Technological Functions of Barley Seed Pathogenesis-Related Proteins (PRs). J I Brewing. 115:334-360. doi: 10.1002/j.2050-0416.2009.tb00389.x.

Gosal SS, Wani SH, Kang MS (2010) Biotechnology and Crop Improvement. J Crop Improv. 24:153-217. doi: 10.1080/15427520903584555.

Gray MA, Hao W, Förster H, Adaskaveg JE (2018). Baseline sensitivities of new fungicides and their toxicity to selected life stages of *Phytophthora* species from *Citrus* in California. *Plant Dis.* 102:734-742. doi: 10.1094/PDIS-08-17-1155-RE.

Guadilla-Sáez S, Pardo de Santayana M, Reyes-García V (2017) Las prácticas tradicionales en el manejo de los bosques de castaño y las dehesas de quercíneas. Una visión histórica. Conferencia: 7º Congreso Forestal Español. 26-30 junio 2017. Plasencia, España.

Guan Y, Li SG, Fan XF, Su ZH (2016) Application of somatic embryogenesis in woody plants. *Front Plant Sci.* 7:938. doi: 10.3389/fpls.2016.00938.

Guerrero-Sanchez VM, Maldonado-Alconada AM, Amil-Ruiz F, Jorriñ-Novó JV (2017) Holm Oak (*Quercus ilex*) Transcriptome. De novo sequencing and assembly analysis. *Front Mol Biosci.* 4:70. doi: 10.3389/fmolb.2017.00070.

Gurr SJ, Rushton PJ (2005) Engineering plants with increased disease resistance: what are we going to express?. *Trends Biotechnol.* 23:275-282. doi: 10.1016/j.tibtech.2005.04.007.

Gurskaya NG, Verkhusha VV, Shcheglov AS, Staroverov DB, Chepurnykh TV, Fradkov AF, Lukyanov S, Lukyanov KA (2006) Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light. *Nat Biotechnol.* 24:461-465. doi: 10.1038/nbt1191.

Gururani MA, Venkatesh J, Upadhyaya CP, Nookaraju A, Pandey SK, Park SW (2012) Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiol Mol Plant Pathol.* 78:51-65. doi: 10.1016/j.pmpp.2012.01.002.

Haddadi A, Mirmostafa SM, Shavandi M (2015) Determination of antimicrobial resistance pattern and detection of blaTEM gene among clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Med Bacteriol.* 4:8-14. ISSN: 2322-2581.

Häggman H, Sutela S, Fladung M (2016) Genetic engineering contribution to forest tree breeding efforts. In: Vettori C, Gallardo F, Häggman H, Kazana V, Migliacci F, Pilate G, Fladung M (eds). Biosafety of Forest Transgenic Trees, Springer Science+Business Media, Dordrecht, Netherlands. 11-30. ISBN: 978-94-017-7531-1.

Halfhill MD, Millwood RJ, Weissinger AK, Warwick SI, Stewart CN (2003) Additive transgene expression and genetic introgression in multiple *GFP* transgenic crop x weed hybrid generations. *Theor Appl Genet.* 107:1533-1540. doi: 10.1007/s00122-003-1397-7.

Hammond TM, Bok JW, Andrews MD, Reyes-Domínguez Y, Scazzocchio C, Keller NP (2008) RNA silencing gene truncation in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell.* 7:339-349. doi: 10.1128/ec.00355-07.

Han KH, Gordon MP, Strauss SH (1996) Cellular and molecular biology of *Agrobacterium*-mediated transformation of plants and its application to genetic transformation of *Populus*. In: Bradshaw HD Jr, Stettler RF, Heilman PE, Hinckley TM (eds). Biology of *Populus* and its implication for management and conservation. National Research Council, Ottawa, Ont., Canada. 201-222.

Hardham AR (2005) *Phytophthora cinnamomi*. *Mol Plant Pathol.* 6:589-604. doi: 10.1111/j.1364-3703.2005.00308.x.

Haseloff J, Amos B (1995) GFP in plants. *Trends Genet.* 11:328-329. doi: 10.1016/0168-9525(95)90186-8.

Hao W, Gray MA, Förster H, Adaskaveg JE (2019) Evaluation of New Oomycota Fungicides for Management of *Phytophthora* Root Rot of *Citrus* in California. *Plant Dis.* 103:619-628. doi: 10.1094/PDIS-07-18-1152-RE.

Hartung F, Schiemann J (2014) Precise plant breeding using new genome editing techniques: opportunities, safety and regulation in the EU. *Plant J.* 78:742-752. doi: 10.1111/tpj.12413.

Hazubska-Przybył T, Kalemba EM, Ratajczak E, Bojarczuk K (2016) Effects of abscisic acid and an osmoticum on the maturation,

starch accumulation and germination of *Picea* spp. somatic embryos. *Acta Physiol Plant.* 38:59. doi: 10.1007/s11738-016-2078-x.

He R, Wu J, Zhang Y, Agüero CB, Li X, Liu S, Wang C, Walker A, Lu J (2016) Overexpression of a thaumatin-like protein gene from *Vitis amurensis* improves downy mildew resistance in *Vitis vinifera* grapevine. *Protoplasma.* 254:1579-1589. doi: 10.1007/s00709-016-1047-y.

Hein I, Gilroy EM, Armstrong MR, Birch PRJ (2009) The zig-zag-zig in oomycete-plant interactions. *Mol Plant Pathol.* 10:547-562. doi: 10.1111/j.1364-3703.2009.00547.x.

Hernández I (2007) Regeneración clonal de alcornoques adultos (*Quercus suber* L.) mediante embriogénesis somática. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Alcalá. Madrid.

Hernández I, Celestino C, Martínez I, Manjón JL, Díez J, Fernández-Guijarro B, Toribio M (2001) Cloning mature cork oak (*Quercus suber* L.) trees by somatic embryogenesis. *Melhoramento.* 37:50-57. ISSN 0368-9433.

Hernández I, Celestino C, Toribio M (2003a) 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. doi: 10.1007/s00299-003-0605-x.

Hernández I, Celestino C, Alegre J, Toribio M (2003b) Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis. II. Plant regeneration from selected cork oak trees. *Plant Cell Rep.* 21: 765-70. doi: 10.1007/s00299-003-0604-y.

Hernández I, Portieles R, Chacón O, Borrás-Hidalgo O (2005) Proteins and peptides for the control of phytopathogenic fungi. *Biotecnología Aplicada.* 22:256-260.

Hernández I, Celestino C, López VD, Carneros E, Jiménez García J, Alegre J, Gil Sanchez LA, Toribio M (2008) Plant regeneration from an endangered valuable cork oak tree by somatic embryogenesis. 205-211. In: Vaquez-Piqué J, Pereira H, González Pérez A (eds).

Suberwood. New challenges for the integration of cork oak forest and products. Chapter: Plant regeneration from an endangered valuable cork oak tree by somatic Embryogenesis. University of Huelva.

Hernández I, Cuenca B, Carneros E, Alonso-Blázquez N, Ruiz M, Celestino C, Ocaña L, Alegre J, Toribio M (2011) Application of plant regeneration of selected cork oak trees by somatic embryogenesis to implement multivarietal forestry for cork production. *Tree For Sci Biotechnol.* 5:19-26.

Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS, Hoekema A (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res.* 2:208-218. doi: 10.1007/BF01977351.

Hoshikawa K, Ishihara G, Takahashi H, Nakamura I (2012) Enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*) in transgenic potato plants expressing thionin genes isolated from Brassicaceae species. *Plant Biotechnol.* 29:87-93. doi: 10.5511/plantbiotechnology.12.0125a.

Houston DT, de Rigo D, Caudullo G (2016) *Quercus suber* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. *European Atlas of Forest Tree Species.* 164-165.

Hraška M, Rakousky S, Curn V (2006) Green fluorescent protein as a vital marker for non-destructive detection of transformation events in transgenic plant. *PCTOC.* 86:303-318. doi: 10.1007/s11240-006-9131-1.

Hu J, Hong C, Stromberg EL, Moorman GW (2010) Mefenoxam sensitivity in *Phytophthora cinnamomi* isolates. *Plant Dis.* 94:39-44. doi: 10.1094/PDIS-94-1-0039.

Hwang HH, Yu M, Lai EM (2017) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: biology and applications. *The Arabidopsis Book.* 15. doi: 10.1199/tab.0186.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal.* 6:3901-7. PMID: 3327686.

Jia Z, Sun Y, Yuan L, Tian Q, Luo K (2010) The chitinase gene (Bbchit1) from *Beauveria bassiana* enhances resistance to *Cytospora chrysosperma* in *Populus tomentosa* Carr. Biotechnol Lett. 32:1325-1332. doi: 10.1007/s10529-010-0297-6.

Jiménez J (2013) Obtención de clones de alcornoque (*Quercus suber* L.) mediante embriogénesis somática: aplicación de medios líquidos y biorreactores en la sincronización de los procesos de desarrollo y maduración de los embriones. Tesis doctoral. UPM.

Jiménez JJ, Sánchez ME, Trapero A (2005) El Chancro carbonoso de *Quercus* II: Patogenicidad de *Biscogniauxia mediterránea*. Bol San Veg Plagas. 31:563-575. ISSN: 0213-6910.

Jouanin L, Goujon T, de Nadaï V, Martin MT, Mila I, Vallet C, Pollet B, Yoshinaga A, Chabbert B, Petit-Conil M, Lapierre C (2000) Lignification in transgenic poplars with extremely reduced caffeic acid *O*-methyltransferase activity. Plant Physiol. 123:1363-1374. doi: 10.1104/pp.123.4.1363.

Jung T, Orlikowski L, Henricot B, Abad-Campos P, Aday AG, Aguín Casal O, *et al.* (2015) Widespread *Phytophthora* infestations in European nurseries put forest, semi-natural and horticultural ecosystems at high risk of *Phytophthora* diseases. For Pathol. 46:134-163. doi: 10.1111/efp.12239.

Kaviani B (2011) Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. Aust J Crop Sci. 5:778-800. SSN: 1835-2707.

Khan EU, Fu XZ, Liu JH (2012) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and regeneration of transgenic plants using leaf segments as explants in Valencia sweet orange. PCTO. 109:383-390. doi: 10.1007/s11240-011-0092-7.

Khattak JZK, Rauf S, Anwar Z, Wahedi HM, Jamil T (2012) Recent advances in genetic engineering- a review. Curr Res J Biol Sci. 4:82-89. ISSN: 2041-0778.

Klessig DF, Malamy J (1994) The salicylic acid signal in plants. Plant Mol Biol. 26:1439-1458. doi: 10.1007/bf00016484.

Klimaszewska K, Lachance D, Pelletier G, Lelu MA, Seguin A (2001) Regeneration of transgenic *Picea glauca*, *P. mariana*, and *P. abies* after cocultivation of embryogenic tissue with *Agrobacterium tumefaciens*. In *Vitro Cell Dev Biol Plant*. 37:748-755. doi: 10.1007/s11627-001-0124-9.

Ko TS, Lee S, Krasnyanski S, Korban S (2003) Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explant. *Theor Appl Genet*. 107:439-447. doi: 10.1007/s00122-003-1264-6.

Koncz C, Schell J (1986) *Mol Gen Genet*. 204:383-396. doi: 10.1007/BF00331014.

Kovalchuk A, Keriö S, Oghenekaro AO, Jaber E, Raffaello T, Asiegbu FO (2013) Antimicrobial defenses and resistance in forest trees: challenges and perspectives in a genomic era. *Annu Rev Phytopathol*. 51:221-244. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102307.

Kovalyova VA, Gout RT (2008) Molecular cloning and characterization of scotch pine defensin. *Cytol Genetics*. 42:408-412. doi: 10.3103/S0095452708060091.

Kumar S, Fladung M (2003) Somatic mobility of the maize element Ac and its utility for gene tagging in aspen. *Plant Mol Biol*. 51:643-650. doi: 10.1023/a:1022505808929.

Lambardi M, De Carlo A (2003) Application of tissue culture to germplasm conservation of temperate broad-leaf trees. In: Jain SM, Ishii K (eds). *Micropropagation of woody trees and fruits*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 815-840. doi: 10.1007/978-94-010-0125-0\_28.

Lazo G, Stein P, Ludwig RA (1991) DNA Transformation-competent arabidopsis genomic library in *Agrobacterium*. *Nat Biotechnol*. 9:963-967. doi: 10.1038/nbt1091-963.

Leclercq J, Lardet L, Martin F, Chapuset T, Oliver G, Montoro P (2010) The green fluorescent protein as an efficient selection marker for

*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg). Plant Cell Rep. 29:513-522. doi: 10.1007/s00299-010-0840-x.

Lebedev VG, Faskhiev VN, Kovalenko NP, Shestibratov KA, Miroshnikov AI (2016) Testing transgenic aspen plants with bar gene for herbicide resistance under semi-natural conditions. Acta Naturae 8:92-106. PMID: PMC4947992.

Leslie CA, Uratsu SL, McGranahan AM, Dandekar GH (2006) Walnut (*Juglans*). Methods Mol Biol. In: Wang K (ed). *Agrobacterium* protocols 2nd ed. Vol. 2. Humana Press. Vol. 344: 297 -312.

Lesur I, Bechade A, Lalanne C, Klopp C, Noirot C, Leplé JC *et al.* (2015) A unigene set for European beech (*Fagus sylvatica* L.) and its use to decipher the molecular mechanisms involved in dormancy regulation. Mol Ecol Resour. 15:1192-1204. doi: 10.1111/1755-0998.12373.

Leubner-Metzger G, Meins F (1999) Function and regulation of plant  $\beta$ -1,3-glucanases (PR-2). In: Datta SK and Muthukrishnan S Eds, Pathogenesis-Related Proteins in Plants. Boca Raton. 49-76. doi: 10.1201/9781420049299.ch3.

Levee V, Garin E, Klimaszewska K, Seguin A (1999) Stable genetic transformation of white pine (*Pinus strobus* L.) after cocultivation of embryogenic tissues with *Agrobacterium tumefaciens*. Mol Breed. 5:429-440. doi: 10.1023/A:1009683605841.

Li S, Cong Y, Liu Y, Wang T, Shuai Q, Chen N, Gai J, Li Y (2017). Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean. Front Plant Sci. 8:246. doi: 10.3389/fpls.2017.00246.

Liang H, Kumar PA, Nain V, Powell WA, Carlson JE (2010) Selection and screening strategies. In: Kole C, Michler CH, Abbott AG, Hall TC (eds). Principles and Development. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1:85-143. doi: 10.1007/978-3-642-04809-8\_4.

Lin YJ, Zhang Q (2005). Optimising the tissue culture conditions for high efficiency transformation of indica rice. *Plant Cell Rep.* 23:540-547. doi: 10.1007/s00299-004-0843-6.

Lin JJ, Assad-Garcia N, Kuo J (1995) Plant hormone effect of antibiotics on the transformation efficiency of plant tissues by *Agrobacterium tumefaciens* cells. *Plant Sci.* 109:171-177. doi: 10.1016/0168-9452(95)04168-T.

Linares AM (2007) Forest planning and traditional knowledge in collective woodlands of Spain: The dehesa system. *For Ecol Manag* 249:71-79. doi: 10.1016/j.foreco.2007.03.059.

Linares AM, Zapata S (2003) Una visión panorámica de ocho siglos. *La Gestión Forestal de las Dehesas*. Mérida, Junta de Extremadura. Instituto del Corcho, la Madera y el Carbón. 13-25.

Liñán J, Cantos M, Troncoso J, García J, Fernández A, Troncoso A (2011) Some propagation methods for cloning holm oak (*Quercus ilex* L.) plants. *Cent. Eur. J Biol.* 6:359-364. doi: 10.2478/s11535-011-0007-y.

Liu JJ, Sturrock R, Ekramoddoullah AKM (2010) The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. *Plant Cell Rep.* 29:419-436. doi: 10.1007/s00299-010-0826-8.

Liu D, He X, Li W, Chen C, Ge F (2012) Molecular cloning of a thaumatin-like protein gene from *Pyrus pyrifolia* and overexpression of this gene in tobacco increased resistance to pathogenic fungi. *PCTOC.* 111:29-39. doi: 10.1007/s11240-012-0167-0.

López R, Cortés MA, Herbert PC, Sánchez J, Vidales I, Fernández S, García A, Salgado R (2007). Micropropagación y pruebas de resistencia in vitro a *Phytophthora cinnamomi* de materiales de aguacate raza mexicana. *Proceedings VI World Avocado Congress (Actas VI Congreso Mundial del Aguacate) 2007*. Viña Del Mar, Chile. 12-16.

López-Sánchez A, Perea R, Dirzo R, Roig S (2016) Livestock vs. wild ungulate management in the conservation of Mediterranean dehesas: Implications for oak regeneration. *For Ecol Manag* 362:99-106. doi: 10.1016/j.foreco.2015.12.002.

López-Vela, Celestino C, Carneros García E, Toribio M, Alegre J (2008) SUBERWOOD: new challenges for the integration of cork. Anatomical characterization of the *Quercus suber* zygotic embryo development. 17-26.

Mackintosh CA, Lewis J, Radmer LE, Shin S, Heinen SJ, Smith LA, Wyckoff MN, Dill-Macky R, Evans CK, Kravchenko S, Baldridge GD, Zeyen RJ, Muehlbauer GJ (2007) Overexpression of defense response genes in transgenic wheat enhances resistance to *Fusarium* head blight. *Plant Cell Rep.* 26:479-488. doi: 10.1007/s00299-006-0265-8.

Mahdavi F, Sariah M, Maziah M (2012) Expression of rice thaumatin-like protein gene in transgenic banana plants enhances resistance to *Fusarium* wilt. *Appl Biochem Biotechnol.* 166:1008-1019. doi: 10.1007/s12010-011-9489-3.

Malabadi RB, Silva JAT, Nataraja K (2008) Stable and consistent *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Pinus roxburghii* (Chir Pine). *Tree For Sci Biotech.* 2:7-13.

Mallón R, Covelo P, Vieitez AM (2012) Improving secondary embryogenesis in *Quercus robur*: application of temporary immersion for mass propagation. *Trees.* 26:731-741. doi: 10.1007/s00468-011-0639-6.

Mallón R, Vieitez AM, Vidal N (2013) High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation in *Quercus robur*: Selection by use of a temporary immersion system and assessment by quantitative PCR. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 114:171-185. doi 10.1007/s11240-013-0313-3.

Mallón R, Valladares S, Corredoira E, Vieitez AM, Vidal N (2014) Overexpression of the chestnut CsTL1 gene coding for a thaumatin-like

protein in somatic embryos of *Quercus robur*. Plant Cell Tiss Organ Cult. 116:141-151. doi: 10.1007/s11240-013-0390-3.

Manzanera J, Astorga R, Bueno M (1993) Somatic embryo induction and germination in *Quercus suber* L. Silv Genet. 42:90-93.

Martínez MT, Corredoira E, Vieitez AM, Cernadas MJ, Montenegro R, Ballester A, Vieitez FJ, San José MC (2017a) Micropropagation of mature *Quercus ilex* L. trees by axillary budding. Plant Cell Tiss Org Cult. 131:499-512. doi: 10.1007/s11240-017-1300-x.

Martínez MT, San-José MC, Vieitez AM, Cernadas MJ, 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. doi: 10.1007/s11240-017-1286-4.

Martínez MT, San-José MC, Arrillaga I, Cano V, Morcillo M, Cernadas MJ, Corredoira E (2019) Holm oak somatic embryogenesis: current status and future perspectives. Front Plant Sci. 10:239. doi: 10.3389/fpls.2019.00239.

Mauri PV, Manzanera JA (2003) Induction, maturation, and germination of holm oak (*Quercus ilex* L.) somatic embryos. Plant Cell Tiss Org Cult. 74:229-235. doi: 10.1023/A:1024072913021.

Mauri PV, Manzanera JA (2004) Effect of abscisic acid and stratification on somatic embryo maturation and germination of Holm oak (*Quercus ilex* L.) In Vitro Cell Dev Biol Plant. 40:495-498. doi: 10.1079/IVP2004557.

Mauri PV, Manzanera JA (2005) Protocol of somatic embryogenesis: Holm oak (*Quercus ilex* L.). In: Jain M, Gupta PK (eds). Protocol for somatic embryogenesis in woody plants, Springer. 469-482. doi: 10.1007/1-4020-2985-3\_37.

Maynard CA, Powell WA, Polin-McGuigan LD, Vieitez AM, Ballester A, Corredoira E, Merkle SA, Andrade GM (2008) Chestnut. In: Kole C, Hall TC (eds.) Compendium of Transgenic Crop Plants: Transgenic Forest Tree Species. Blackwell Publishing. 169-192.

Meilan R, Huang Z, Pilate G (2010) Biotechnology Techniques. In: El-Kassaby YA, Prado JA (eds). Forests and Genetically Modified Trees. FAO, Rome. 19-34.

Merkle SA, Parrot WA, Williams EG (1990) Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning. In: Bhojwani SS (ed). Plant tissue culture: applications and limitations. Elsevier, Amsterdam. 67-101. doi: 10.1016/B978-0-444-88883-9.50008-X.

Merkle SA, Parrot WA, Flinn BS (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In vitro embryogenesis in plants. 155-203. doi: 10.1007/978-94-011-0485-2\_5.

Meyer AD, Takanari I, Meins F (1995) Horizontal gene transfer: regulated expression of a tobacco homologue of the *Agrobacterium rhizogenes* rolC gene. Mol Gen Genet. 249:265-273. doi: 10.1007/BF00290526.

Miguel CM, Oliveira MM (1999) Transgenic almond (*Prunus dulcis* Mill.) plants obtained by *Agrobacterium* mediated transformation of leaf explants. Plant Cell Rep.18:387-393. doi: 10.1007/s002990050591.

Miki B, McHugh S (2004) Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. J Biotechnol. 107:193-232. doi: 10.1016/j.jbiotec.2003.10.011.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2008) Diagnóstico de las Dehesas Ibéricas Mediterráneas. Tragsatec.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2017) Avance Estadística Forestal.

Mondal TK, Bhattacharya A, Ahuja PS, Chand PK (2001) Transgenic tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze cv. Kangra Jat) plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos. Plant Cell Rep 20:712-720. doi: 10.1007/s002990100382.

Montoya Oliver JM, Mesón García ML (2004) Selvicultura: manejo y explotación de las masas de Quercus. In La seca: decaimiento

de encinas, alcornoques y otros *Quercus* en España. Tusét JJ, Sánchez G (Coord). Ministerio de Medio Ambiente. Organismo autónomo de Parques Nacionales. 125-149. ISBN: 9788480145626.

Motioike SY, Skirvin RM, Norton MA, Otterbacher AG (2002) Development of methods to genetically transform American grape (*Vitis × labruscana* L. H. Bailey). *J. Hort. Sci. Biotech.* 77:691-696. ISSN: 1462-0316.

Munis MFH, Tu L, Deng F, Tan J, Xu L, Xu S, Long L, Zhang X (2010) A thaumatin-like protein gene involved in cotton fiber secondary cell wall development enhances resistance against *Verticillium dahliae* and other stresses in transgenic tobacco. *Biochem Biophys Res Commun.* 393:38-44. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.01.069.

Mur LAJ, Kenton P, Lloyd AJ, 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. doi: 10.1093/jxb/erm239.

Muramoto N, Tanaka T, Shimamura T, Mitsukawa N, Hori E, Koda K, Otani M, Hirai M, Nakamura K, Imaeda T (2012) Transgenic sweet potato expressing thionin from barley gives resistance to black rot disease caused by *Ceratocystis fimbriata* in leaves and storage roots. *Plant Cell Rep.* 31:987-997. doi: 10.1007/s00299-011-1217-5.

Naing AH, Park KI, Lim SH, Kim CK (2014). Appropriate choice of antibiotics for plant regeneration and optimization of selective agents to be used in genetic transformation of chrysanthemum. *POJ.* 7:237-243. ISSN:1836-3644.

Nakayashiki H, Hanada S, Quoc NB, Kadotani N, Tosa Y, Mayama S (2005) RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi. *Fungal Genet Biol.* 42:275-283. doi: 10.1016/j.fgb.2005.01.002.

Naleway JJ (1992) Histochemical, spectrophotometric, and fluorometric *GUS* substrate. In: Gallagher SR (ed). *GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gen Expression*. Ed. Academic Press Inc. San Diego, California, USA. 61-76.

Naseri G, Sohani MM, Pourmassalehgou A, Allahi S (2012). In planta transformation of rice (*Oryza sativa*) using thaumatin-like protein gene for enhancing resistance to sheath blight. *Afr J Biotechnol.* 11: 7885-7893. doi: 10.5897/ajb11.3331.

Nauerby B, Billing K, Wyndaele R (1997) Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentration suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci.* 123:169177. doi: 10.1016/S0168-9452(96)04569-4.

Nehra NS, Becwar MR, Rottmann WH, Pearson L, Chowdhury K, Chang S, Wilde HD, Kodrzycki RJ, Zhang C, Gause KC, Parks DW, Hinchee MA (2005) Forest biotechnology: Innovative methods, emerging opportunities. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 41:701-717. doi: 10.1079/IVP2005691.

Neuhaus JM (1999) Plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). In SK Datta, S Muthukrishnan, eds, *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. CRC Press. Boca Raton. 77-105.

Newel CA (2000) Plant transformation technology: developments and applications. *Mol Biotechnol.* 16:53-65. doi: 10.1385/MB:16:1:53.

Newhouse AE, Polin-McGuigan LD, Baier KA, Valletta KER, Rottmann WH, Tschaplinski TJ, Maynard CA, Powell WA (2014) Transgenic American chestnuts show enhanced blight resistance and transmit the trait to T1 progeny. *Plant Science.* 228:88-97. doi: 10.1016/j.plantsci.2014.04.004.

Nonaka S, Ezura H (2014) Plant-*Agrobacterium* interaction mediated by ethylene and super-*Agrobacterium* conferring efficient gene transfer. *Front Plant Sci.* 5:681. doi: 10.3389/fpls.2014.00681.

Nonaka S, Ezura H (2015) Melon (*Cucumis melo*). In: Kan Wang (ed). *Agrobacterium* Protocols: Volume 2, Methods Mol Biol. 1224:195-203. doi: 10.1007/978-1-4939-1658-0\_16.

Nonaka S, Yuhashi KI, Takada K, Sugaware M, Minamisawa K, Ezura H (2008) Ethylene production in plants during transformation

suppresses vir gene expression in *Agrobacterium tumefaciens*. New Phytol. 178. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02400.x.

Núñez de Cáceres FF, Davey MR, Cancho Sanchez E, Wilson ZA (2015) Conferred resistance to *Botrytis cinerea* in *Lilium* by overexpression of the RCH10 chitinase gene. Plant Cell Rep. 34:1201-1209. doi: 10.1007/s00299-015-1778-9.

Odeny Ojola P, Nyaboga EN, Njiru PN, Orinda G (2018) Overexpression of rice thaumatin-like protein (*Ostlp*) gene in transgenic cassava results in enhanced tolerance to *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *manihotis*. J Genet Eng Biotechnol. 16:125-131. doi: 10.1016/j.jgeb.2017.12.002.

OEPP/EPPO (2004) European and Mediterranean Plant Protection Organization: Diagnostic Protocols for Regulated Pests 34:201-207.

Okushima Y, Koizumi N, Kusano T, Sano H (2000) Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related protein. Plant Mol Biol. 42:479-488. doi: 10.1023/A:1006393326985.

Oliveira-Cauduro Y, Adamuchio LG, Bessalhok-Filho JC, Rodrigues-Gerhardt I, Juliana Degenhardt-Goldbach J, Marianne Bernardes M, Quoirin M (2017) Optimization of factors affecting the *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Eucalyptus saligna*. Revista Árvore. 41:e410315

Oßwald W, Fleischmann F, Rigling D, Coelho AC, Cravador A, Diez J, Dalio RJ, Horta Jung M, Pfanz H, Robin C, Sipos G, Solla A, Cech T, Chambery A, Diamandis S, Hansen E, Jung T, Orlikowski LB, Parke J, Prospero S, Werres S (2014) Strategies of attack and defence in woody plant-*Phytophthora* interactions. For Path. 44:169-190. doi: 10.1111/efp.12096.

Ooms G, Hooykaas PJJ, Moolenaar G, Schilperoort RA (1981) Crown gall plant tumors of abnormal morphology, induced by *Agrobacterium tumefaciens* carrying mutated octopine Ti plasmids;

analysis of T-DNA functions. *Gene*. 14:33-50. doi: 10.1016/0378-1119(81)90146-3.

Padilla IMG, Burgos L (2010) Aminoglycoside antibiotics: structure, functions and effects on in vitro plant culture and genetic transformation protocols. *Plant Cell Rep* 29:1203-1213. doi:10.1007/s00299-010-0900-2.

Palomo-Ríos E, Barceló-Muñoz A, Mercado JA, Pliego-Alfaro F (2012) Evaluation of key factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos of avocado (*Persea americana* Mill.). *PCTOC*. 109:201-211. doi: 10.1007/s11240-011-0086-5.

Palomo-Ríos E, Cerezo S, Mercado JA, Pliego-Alfaro F (2017) *Agrobacterium*-mediated transformation of avocado (*Persea americana* Mill.) somatic embryos with fluorescent marker genes and optimization of transgenic plant recovery. *PCTOC*. 128:447-455. doi: 10.1007/s11240-016-1122.

Park SH, Rose SC, Zapata C, Srivatanakul M, Smith RH (1998) Cross-protection and selectable marker genes in plant transformation. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 34:117-121. doi: 10.1007/bf02822775.

Pasonen HL, Seppänen SK, Degefu Y, Rytönen A, von Weissenberg K, Pappinen A (2004) Field performance of chitinase transgenic silver birches (*Betula pendula*): resistance to fungal diseases. *Theo Appl Genet*. 109:562-570. doi: 10.1007/s00122-004-1650-8.

Patel S, Rauf A, Khan H, Mubarak MS (2017) Potential health benefits of natural products derived from truffles: A review. *Trends Food Sci Technol*. 70:1-8. doi: 10.1016/j.tifs.2017.09.009.

Patiño Hoyos LF (2008) Resistencia inducida mediante sustancias químicas a enfermedades en plantas causadas por hongos. *Politécnica* 7:103-115. doi: 10.33571/rpolitec.

Pausas JG (1997) Resprouting of *Quercus suber* in NE Spain after fire. *J Veg Sci*. 8:703-706. doi: 10.2307/3237375.

Peña L, Pérez RM, Cervera M, Juárez JA, Navarro L (2004) Early events in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of citrus explants. *Ann Bot.* 94:67-74. doi: 10.1093/aob/mch117.

Pereira H (2007) Cork: biology, production and uses. Amsterdam, Netherlands, Elsevier. ISBN: 9780444529671.

Pereira-Leal JB, Abreu IA, Alabaça, CS, Almeida MH, Almeida P, Almeida T *et al.* (2014) A comprehensive assessment of the transcriptome of cork oak (*Quercus suber*) through EST sequencing. *BMC Genomics* 15:371. doi: 10.1186/1471-2164-15-371.

Pérez-Barranco G, Torreblanca R, Padilla IMG, Sánchez-Romero C, Pliego-Alfaro F, Mercado JA (2009) Studies on genetic transformation of olive (*Olea europaea* L.) somatic embryos: I. Evaluation of different aminoglycoside antibiotics for nptII selection; II. Transient transformation via particle bombardment. *PCTOC.* 97:243-251. doi: 10.1007/s11240-009-9520-3.

Pérez M, Viejo M, La Cuesta M, Toorop P, Cañal MJ (2015) Epigenetic and hormonal profile during maturation of *Quercus Suber* L. somatic embryos. *J Plant Physiol.* 173:51-61. doi: 10.1016/j.jplph.2014.07.028.

Petri C, Burgos L (2005) Transformation of fruit trees. Useful breeding tool or continued future prospect? *Transgenic Res.* 14:15-26. doi: 10.1007/s11248-004-2770-2.

Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SCM (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Bio.* 15:308-316. doi: 10.1038/nchembio.164.

Pinto G, Valentim H, Costa A, Santos C (2002) Somatic embryogenesis in leaf plant calluses of mature *Quercus suber*. *In Vitro Cell Div Biol Plant.* 38: 569- 572. doi: 10.1079/IVP2002352.

Pintos B, Sánchez N, Bueno MA, Navarro R, Jorrín J, Manzanera JA, Gómez-Garay A (2013) Induction of *Quercus ilex* L. haploid and double-haploid embryos from anther cultures by temperature-stress. *Silvae Genet.* 62:210-218. doi: 10.1515/sg-2013-0026.

Pintos B, Manzanera JA, Bueno MA (2010) Oak somatic and gametic embryos maturation is affected by charcoal and specific aminoacids mixture. *Ann For Sci.* 67:205. doi: [10.1051/forest/2009098f](https://doi.org/10.1051/forest/2009098f).

Pintos B, Manzanera JA, Bueno MA, Cremades A, González-Adrados JR (2009) Acclimation and establishment of cork oak (*Quercus suber*) somatic embryo-derived plantlets and post-acclimation cork quality test. *Acta Hort.* 812:431-436. doi: [10.17660/ActaHortic.2009.812.61](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.812.61).

Piqueras A, Debergh P (1999) Morphogenesis in plant tissue cultures. In: Soh WY, Bhojwani SS (eds). *Kluwer Academic Publishers*. 443-462. ISBN 978-94-015-9253-6.

Piqueras A, Alburquerque N, Folta KM (2010) Explants used for the generation of transgenic plants. In: Kole C *et al.* (eds). *Transgenic Crop Plants*. 31-56. doi: [10.1007/978-3-642-04809-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-04809-8_2).

Plieninger T, Pulido J, Konold W (2003) Effects of land use history on size structure of holm oak stands in Spanish dehesas: implications for conservation and restoration. *Environ Conserv* 30:61-70. doi: [10.1017/S0376892903000055](https://doi.org/10.1017/S0376892903000055).

Popowich EA, Firsov AP, Mitiouchkina TY, Filipenya VL, Dolgov SV, Reshetnikov VN (2007) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Hyacinthus orientalis* with thaumatin II gene to control fungal diseases. *PCTOC*. 90:237-244. doi: [10.1007/s11240-007-9254-z](https://doi.org/10.1007/s11240-007-9254-z).

Poupin MJ, Arce-Johnson P (2005) Transgenic trees for a new era. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 41:91-101. doi: [10.1079/ivp2004587](https://doi.org/10.1079/ivp2004587).

Powell WA, Newhouse A, Coffey V (2019) Developing blight-tolerant American chestnut trees. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. doi: [10.1101/cshperspect.a034587](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034587).

Praciak A, Pasiecznik N, Sheil D, van Heist M, Sassen M, Correia CS, Dixon C, Fyson G, Rushford K, Teeling C (2013) *The CABI encyclopedia of forest trees*, CABI, Oxfordshire, UK. ISBN: 9781780642369.

Priya AM, Pandian SK, Manikandan R (2012) The effect of different antibiotics on the elimination of *Agrobacterium* and high frequency *Agrobacterium*-mediated transformation of Indica rice (*Oryza sativa* L.). Czech J Genet Plant Breed. 48:120-130. doi: 10.17221/77/2011-CJGPB.

Pulido F, Picardo A (Coords.) (2010) Libro Verde de la Dehesa. Documento para el debate hacia una estrategia Ibérica de gestión. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Castilla y León. Valladolid, España.

Pulido FJ, Díaz M, Hidalgo de Trucios SJ (2001) Size structure and regeneration of Spanish holm oak *Quercus ilex* forests and dehesas: effects of agroforestry use in their long-term sustainability. For Ecol Manag. 146:1-13. doi: 10.1016/S0378-1127(00)00443-6.

Punja ZK (2001) Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens-a review of progress and future prospects. Can J Plant Pathol. 23:216-235. doi: 10.1080/07060660109506935.

Punja ZK (2005) Transgenic carrots expressing a thaumatin-like protein display enhanced resistance to several fungal pathogens. Can J Plant Pathol. 27:291-296. doi: 10.1080/07060660509507227.

Raemakers K, Jacobsen E, Visser R (1999) Proliferative somatic embryogenesis in woody species. In Somatic Embryogenesis in Woody Plants. 4:29- 59.

Raharjo SHT, Witjaksono Gomez-Lim MA, Padilla G, Litz RE (2008) Recovery of avocado (*Persea americana* Mill.) plants transformed with the antifungal plant defensin gene PDF1.2. In Vitro Cell Devl Biol Plant. 44:254-262. doi: 10.1007/s11627-008-9117-2.

Ramírez JA, Díaz M (2008) The role of temporal shrub encroachment for the maintenance of Spanish holm oak *Quercus ilex* dehesas. For Ecol Manage. 255:1976-1983. doi: 10.1016/j.foreco.2007.12.019.

Ramírez-Valiente JA, Valladares F, Gil L, Aranda I (2009a) Population differences in juvenile survival under increasing drought are mediated by seed size in cork oak (*Quercus suber* L.). *For Ecol Manage.* 257:1676-1683. doi: 10.1016/j.foreco.2009.01.024.

Ramírez-Valiente JA, Lorenzo Z, Soto A, Valladares F, Gil L, Aranda I (2009b) Elucidating the role of genetic drift and natural selection in cork oak differentiation regarding drought tolerance. *Mol Ecol.* 18:3803-3815. doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04317.x.

Ramírez-Valiente JA, Sánchez-Gómez D, Aranda I, Valladares F (2010) Phenotypic plasticity and local adaptation in leaf ecophysiological traits of 13 contrasting cork oak populations under different water availabilities. *Tree Physiol.* 30:618-627. doi: 10.1093/treephys/tpq013.

Ramírez-Valiente JA, Valladares F, Delgado A, Granados S, Aranda I (2011) Factors affecting cork oak growth under dry conditions: local adaptation and contrasting additive genetic variance within populations. *Tree Genet Genomes.* 7:285-295. doi: 10.1007/s11295-010-0331-9.

Rani SJ, Usha R. (2013) Transgenic plants: Types, benefits, public concerns and future. *J Pharm Res.* 6:879-883. doi: 10.1016/j.jopr.2013.08.008.

Rayapuram C, Wu J, Haas C, Baldwin IT (2008) PR-13/Thionin but NotPR-1 mediates bacterial resistance in *Nicotiana attenuata* in nature, and neither influences herbivore resistance. *Molecul Plant Microbe Interact.* 21:988-1000. doi: 10.1094/mpmi-21-7-0988.

Raveendar S, Premkumar A, Sasikumar S, Ignacimuthu S, Agastian P (2007) Transgene and its expression in transgenic plants: A review. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology.* 8:105-112.

Read RA, Zasada JC (2008) *Phellodendron amurense* Rupr.: Amur corktree. *The Woody Plant Seed Manual. Agric. Handbook No. 727.* Forest Service. 783-785.

Redondo MÁ, Pérez-Sierra A, Abad-Campos P, Torres L, Solla A, Reig-Armiñana J, García-Breijo F (2015) Histology of *Quercus ilex* roots during infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Trees*. 29:1943-1957. doi: 10.1007/s00468-015-1275-3.

Resende MFR, Munoz P, Resende MDV, Garrick DJ, Fernando RL, Davis JM, Jokela EJ, Martin TA, Peter GF, Kirst M (2012) Accuracy of genomic selection methods in a standard data set of Loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Genetics*. 190:1503-1510. doi: 10.1534/genetics.111.137026.

Reyna S, Folch L, Jiménez E, de Vicente J (2002) La selvicultura trufera en encinares y quejigares: compatibilidad y limitaciones. *Cuad Soc Esp Cien For*. 14:103-108. ISSN: 1575-2410.

Rezende GDSP, de Resende MDV, de Assis TF (2013) *Eucalyptus* breeding for clonal forestry. *Forest Sci*. 393-424. doi: 10.1007/978-94-007-7076-8\_16.

Rial C, Barros A, Salinero C, Mansilla JP, Pintos C, Cuenca B (2008). Variaciones en la susceptibilidad a *Phytophthora cinnamomi* de diferentes clones de castaño: comparación de dos métodos de inoculación. *Cuadernos De La Sociedad Española De Ciencias Forestales*. 26. doi: [10.31167/csef.v0i26.9744](https://doi.org/10.31167/csef.v0i26.9744).

Rieksts-Riekstiņš R, Zeltiņš P, Baliuckas V, Brūna L, Zaļuma A, Kāpostiņš R (2019) *Pinus sylvestris* breeding for resistance against natural infection of the fungus *Heterobasidion annosum*. *Forests*. 11: 23. doi: 10.3390/f11010023.

Rives J, Fernández-Rodríguez I, Rieradevall J, Gabarrell X (2012) Environmental analysis of the production of champagne cork stoppers. *J Clean Prod*. 25:1-13. doi: 10.1016/j.jclepro.2011.12.001.

Roberts WK, Selitrennikoff CP (1990) Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *J Gen Microbiol*. 136:1771-1778. doi: 10.1099/00221287-136-9-1771.

Robin C, Capron G, Desprez-Loustau ML (2001) Root infection by *Phytophthora cinnamomi* in seedlings of three oak species. *Plant Pathol.* 50:708-716. doi: 10.1046/j.1365-3059.2001.00643.x.

Rodríguez Estévez V, Avilez JP, Félix E, Perea J, García A, Gómez G (2007) Eficiencia del cerdo ibérico en el decortinado de la bellota. *Archivos de Zootecnia.* 5:535-539. ISSN: 0004-0592.

Romano A, Noronha C, Martins-Loução MA (1992) Influence of growth regulators on shoot proliferation in *Quercus suber* L. *Ann Bot.* 70:53-536. doi: 10.1093/oxfordjournals.aob.a088513.

Romano A, Noronha C, Martins-Loução MA (1995) Role of carbohydrates in micropropagation of cork oak. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 40:159-167. doi: 10.1007/bf00037670.

Romero MA, González M, Serrano MS, Sánchez ME (2019) Trunk injection of fosetyl-aluminium controls the root disease caused by *Phytophthora cinnamomi* on *Quercus ilex* woodlands. *Ann Appl Biol.* 174:313-318. doi: 10.1111/aab.12503.

Ruiz YA, Maldonado JCP, Cardenal LYR (2019) Organogenesis in meristems and cauline disc of *Aloe vera* L. *Ciencia en Desarrollo.* 10:2. ISSN: 0121-7488.

Ruiz-Gómez FJ, Sánchez-Cuesta R, Navarro-Cerrillo RM, Pérez-de-Luque A (2012) A method to quantify infection and colonization of holm oak (*Quercus ilex*) roots by *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Methods.* 8:39. doi: 10.1186/1746-4811-8-39.

Ryyänen L, Sillanpää M, Kontunen-Soppela S, Timonen H, Kangasjärvi J, Vapaavuori E, Häggman H (2002) Preservation of transgenic silver birch (*Betula pendula* Roth) lines by means of cryopreservation. *Mol Breeding.* 10:143-152. doi: 10.1023/A:1020302301380.

Safavi K, Zareie R, Tabatabaei BES (2012) Constitutive expression of thaumatin-like protein (TLP-3) in transgenic tobacco plants leads to enhance resistance to *Alternaria alternata*. *Arch Phytopathology Plant Protect.* 45:161-169. doi: 10.1080/03235408.2010.507947.

Sakai A, Engelmann F (2007) Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: A review. *Cryo Letters*. 28:151-172.

Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1990) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep* 9: 30–33. doi: 10.1007/BF00232130.

Samaniego-Gómez BY, Reyes-Ramírez A, Moreno-Valenzuela OA, Tun-Suárez JM (2017) Resistencia sistémica inducida contra virus fitopatógenos mediada por la inoculación con la rizobacteria *Bacillus* spp. *Rev Protección Veg*. 32:10-22. ISSN: 2224-4697.

Sánchez ME (2019) Fosetil-Aluminio, un fosfonato efectivo contra la enfermedad de la 'seca de la encina'. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*. 311:46-48. ISSN: 1131-8988.

Sánchez ME, Navarro RM, Trapero A, Fernández P (2000) La "seca" de encinas y alcornoques: una visión histórica. *Montes*. 62:29-40.

Sánchez MC, Martínez MT, Valladares S, Ferro E, Vieitez AM (2003a) 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. doi: 10.1078/0176-1617-00754.

Sánchez ME, Venegas J, Romero MA, Phillips AJL, Trapero A (2003b) *Botryosphaeria* and related taxa causing oak canker in southwestern Spain. *Plant Dis*. 87:1515-1521. doi: 10.1094/pdis.2003.87.12.1515.

Sánchez N, Manzanera JA, Pintos B, Bueno MA (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation of cork oak (*Quercus suber* L.) somatic embryos. *New Forests*. 29:169-176. doi: 10.1007/s11056-005-0208-1.

Sangwan R, Bourgeois Y, Brown S, Vasseur G, Sangwan-Norreel B (1992) Characterization of competent cells and early events of

*Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 188:439-456. doi: 10.1007/bf00192812

Santos C, Machado H, Serrazina S, Gomes F, Gomes-Laranjo J, Correia I, Zhebentyayeva T, Duarte S, Bragança H, Fevereiro P, Nelson CD, Costa R (2016) Comprehension of resistance to diseases in chestnut. *Revista de Ciências Agrárias*. 39:189-193. doi: 10.19084/RCA15145.

Schestibratov KA, Dolgov SV (2005) Transgenic strawberry plants expressing a thaumatin II gene demonstrate enhanced resistance to *Botrytis cinerea*. *Sci Hort*. 106:177189. doi: 10.1016/j.scienta.2005.03.016.

Sels J, Mathys J, De Coninck BMA, Cammue BPA, De Bolle MFC (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiol Biochem*. 46:941-950. doi: 10.1016/j.plaphy.2008.06.011.

Sharma KK, Bhatnagar-Mathur P, Thorpe TA (2005) Genetic transformation technology: Status and problems. *In Vitro Cel Dev Biol Plant*. 41:102-112. doi:10.1079/ivp2004618.

Schafleitner R, Wilhelm E (1997) Effect of virulent and hypovirulent *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr on the intercellular pathogen related proteins and on total protein pattern of chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Physiol Mol Plant P*. 51:323-332. doi: 10.1006/pmpp.1997.0118.

Schlink K (2009) Identification and characterization of differentially expressed genes from *Fagus sylvatica* roots after infection with *Phytophthora citricola*. *Plant Cell Rep*. 28:873-882. doi: 10.1007/s00299-009-0694-2.

Shea SR, Gillen KJ, Leppard WI (1980) Seasonal variation in population levels of *Phytophthora cinnamomi* Rands in soil in diseased, freely-drained *Eucalyptus marginata* Sm. sites in the northern jarrah forests of south-western Australia. *Prot Ecol* 2:135-156.

Sheen J, Hwang S, Niwa Y, Kobayashi H, Galbraith DW (1995) Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *Plant J.* 8:777-784. doi: 10.1046/j.1365-313x.1995.08050777.x.

Sheng JS, Citovsky V (1996) *Agrobacterium* plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. *Plant Cell.* 8:1699-1710. doi: 10.1105/tpc.8.10.1699.

Shin S, Mackintosh CA, Lewis J, Heinen SJ, Radmer L, Dill-Macky R, Baldrige GD, Zeyen RJ, Muehlbauer GJ (2008) Transgenic wheat expressing a barley class II chitinase gene has enhanced resistance against *Fusarium graminearum*. *J Exp Bot.* 59:2371-2378. doi: 10.1093/jxb/ern103.

Shri M, Rai A, Verma PK, Misra P, Dubey S, Kumar S, Verma S, Gautam N, Tripathi RD, Trivedi PK, Chakrabarty D (2012) An improved *Agrobacterium*-mediated transformation of recalcitrant indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Protoplasma.* 250:631-6. doi: 10.1007/s00709-012-0439-x.

Sierra-Pérez J, Boschmonart-Rives J, Gabarrell X (2015) Production and trade analysis in the Iberian cork sector: Economic characterization of a forest industry. *Resour Conserv Recy.* 98:55-66. doi: 10.1016/j.resconrec.2015.02.011.

Sierra-Pérez J, Boschmonart-Rives J, Días AC, Gabarrell X (2016) Environmental implications of the use of agglomerated cork asthermal insulation in buildings. *J Clean Prod.* 126:7-107. doi: 10.1016/j.jclepro.2016.02.146.

Silva JAT, Fukai S (2001) The impact of carbenicillin, cefotaxime and vancomycin on chrysanthemum and tobacco TCL morphogenesis and *Agrobacterium* growth. *J. Appl. Hort.* 3:3-12.

Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by comparative CT method. *Nat Protoc.* 3: 1101-1108. doi: 10.1038/nprot.2008.73.

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. doi: 10.1093/treephys/28.5.743.

Song JT (2006) Induction of a salicylic acid glucosyltransferase, AtSGT1, is an early disease response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cells.* 22:233-8.

Souza AJ, de Mendes BMJ, Mourão Filho FAA (2007) Gene silencing: concepts, applications, and perspectives in woody plants. *Sci Agric.* 64:645-656. doi: 10.1590/s0103-90162007000600014.

Souza TP, Dias RO, Silva-Filho MC (2017) Defense-related proteins involved in sugarcane responses to biotic stress. *Genet Mol Biol.* 40:360-372. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2016-0057.

Srinivasan C, Scorza R (1999) Transformation of somatic embryos of fruit trees and grapevine. In: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds). *Somatic embryogenesis in woody plants*. For Sci. Springer, Dordrecht. 59:313-330. doi: 10.1007/978-94-011-4774-3\_18.

Stael S, Kmiecik P, Willems P, Van Der Kelen K, Coll NS, Teige M, Van Breusegem F (2015) Plant innate immunity – sunny side up? *Trends Plant Sci.* 20:3-11. doi: 10.1016/j.tplants.2014.10.002.

Stanton BJ, Neale DB, Li S (2009) *Populus* breeding: from the classical to the genomic approach. *Genetics and Genomics of Populus.* 309-348. doi: 10.1007/978-1-4419-1541-2\_14.

Stasolla C, Kong L, Yeung EC, Thorpe TA (2002) Maturation of somatic embryos in conifers: Morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 38:93-105. doi: 10.1079/IVP2001262.

Stewart CN (2006) Go with the glow: fluorescent proteins to light transgenic organisms. *Trends Biotechnol.* 24:155-162. doi: 10.1016/j.tibtech.2006.02.002.

Subramoni S, Nathoo N, Klimov E, Yuan ZC (2014) *Agrobacterium tumefaciens* responses to plant-derived signaling molecules. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2014.00322.

Sudisha J, Sharathchandra RG, Amruthesh KN, Kumar A, Shetty HS (2012) Pathogenesis related proteins in plant defense response. *Plant Defence: Biological Control*. 379-403. doi: 10.1007/978-94-007-1933-0\_17.

Sun Z, Li X, Zhou W *et al.* (2020) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of Chinese chestnut (*Castanea mollissima* Blume). *PCTOC*. 140:95-103. doi: 10.1007/s11240-019-01713-4.

Sunilkumar G, Mohr LA, Lopata-Finch E, Emani Ch, Rathore KS (2002) Developmental and tissue specific expression of CaMV35S promoter in cotton as revealed by GFP. *Plant Mol Biol*. 50:463-474. doi: 10.1023/A:1019832-123444.

Sutton B (2002) Commercial delivery of genetic improvement to conifer plantations using somatic embryogenesis. *Ann For Sci*. 59:657-661. doi: 10.1051/forest:2002052.

Szankowski I, Bribiva K, Fleschhut J, Schoenherr J, Jacobsen HJ, Kiesecker H (2003) Transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.) with the stilbene synthase gene from grapevine (*Vitis vinifera* L.) and a PGIP gene from kiwi (*Actinidia deliciosa*). *Plant Cell Rep*. 22:141-149. doi: 10.1007/s00299-003-0668-8.

Takatsu Y, Nishizawa Y, Hibi T, Akutsu K (1999) Transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) expressing a rice chitinase gene shows enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Sci Hort*. 82:113-123. doi: 10.1016/s0304-4238(99)00034-5.

Tang H, Ren Z, Krczal G (2000) An evaluation of antibiotics for the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from walnut somatic embryos and for the effects on the proliferation of somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep*. 19:881-887. doi: 10.1007/s002990000201.

Tang W, Luo H, Newton R. (2004). Effects of antibiotics on the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from loblolly pine (*Pinus*

*taeda*) zygotic embryo explants and on transgenic plant regeneration. PCTOC. 70:71-81. doi: 10.1007/s11240-004-4657-6.

Tapias R, Fernández M, Sáenz A, Alcuña MM, José V, Inchusa A, Moreira AC, Cravador A (2004) Variability of tolerance/resistance of *Quercus suber* L. seedlings to *Phytophthora cinnamomi* Rands. Evaluation of survival. Universidad de Huelva. Vol. 500:237-246.

Tapias R, Fernández M, Salvador L, Santana R, García J, Alcuña MM, José V, Inchusa A, Vázquez J, Torres E, Cravador A (2008) "Physiological effect of *Phytophthora cinnamomi* infestations in *Quercus suber* seedlings". In: SUBERWOOD 2005 Conference. New challenges for integration of cork oak forest and products. 267-277. ISBN: 978-84-96826.

Terradas J (1999) Holm oak and holm oak forests: an introduction. In: Rodà F, Retana J, Gracia CA, Bellot J (eds). Ecology of Mediterranean evergreen oak forests. Ecol Stud. 137:3-14. doi: 10.1007/978-3-642-58618-7\_1.

Testillano PS, Gómez-Garay A, Pintos B, Risueño MC (2018) Somatic embryogenesis of *Quercus suber* L. from immature zygotic embryos. Methods Mol Biol. Plant Cell Culture Protocols. 1815:247-256. doi: 10.1007/978-1-4939-8594-4\_16.

Thaler JS, Humphrey PT, Whiteman NK (2012) Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. Trends Plant Sci. 17:260-270. doi: 10.1016/j.tplants.2012.02.010.

Thatcher LF, Anderson JP, Singh KB (2005). Plant defense responses: what have we learnt from *Arabidopsis*?. Funct Plant Biol. 32:1-19. doi: 10.1071/FP04135.

Thomas FM, Blank R, Hartmann G (2002) Abiotic and biotic factors and their interactions as causes of oak decline in Central Europe. For Path. 32:277-307. doi: 10.1046/j.1439-0329.2002.00291.x.

Thornes J (2000) Environmental crises in the Mediterranean. In: Geography, Environment and Development in the Mediterranean, ed.

R. King, P. De Mas & J. Mansvelt Beck. 261-281. Brighton, UK: Sussex University Press.

Tian L, Wen Y, Sibbald S, Subramanian J (2007) Regeneration of *Prunus salicina* Lindl from hypocotyls of mature seeds. In *Vitro Cell Dev Pl.* 43:335-342.

Tiberi R, Branco M, Bracalini M, Croci F, Panzavolta T (2016) Cork oak pests: a review of insect damage and management. *Ann Forest Sci.* 73:219-232. doi: 10.1007/s13595-015-0534-1.

Toribio M, Fernández C, Celestino C, Martínez MT, San-José MC, Vieitez AM (2004) Somatic Embryogenesis in mature *Quercus robur* trees. *PCTOC.* 76:283-287. doi: 10.1023/B:TICU.0000009245.92828.26.

Toribio M, Celestino C, Molinas M (2005) Cork oak, *Quercus suber* L. In: Jain SM, Gupta PK. (eds). Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. *For Sci.* 77:445-457. doi: 10.1007/1-4020-2985-3\_35.

Torreblanca R, Cerezo S, Palomo-Ríos E, Mercado JA, Pliego-Alfaro F (2010) Development of a high throughput system for genetic transformation of olive (*Olea europaea* L.) plants. 103:61-69. doi: 10.1007/s11240-010-9754-0.

Trigiano RN, Buckley LG, Merkle SA (1999) Somatic embryogenesis in woody legumes. In: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ, (eds). Somatic embryogenesis in woody plants Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 189-208.

Trontin JF, Arancio L, Canlet F, Garin E, Harvengt L, Hoebeke J, Lopez-Vernaza M, Paques M (2002) Towards genetic engineering of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Ann For Sci.* 59:687-697. doi: 10.1051/forest:2002057.

Trontin JF, Walter C, Klimaszewska K, Park YS, Lelu-Walter MA (2007) Recent progress in genetic transformation of four *Pinus* spp. *Transgenic Plant J.* 1:314-329.

Tsai S, Yeh S, Chan C, Liaw SI (2009) High-efficiency vitrification protocols for cryopreservation of in vitro grown shoot tips of transgenic papaya lines. PCTOC. 98:157-164. doi: 10.1007/s11240-009-9548-4.

Tuset JJ, Cots F, Hinarejos C, Mira JL (2001) Suspensiones de zoosporas de *Phytophthora cinnamomi* que causan la "seca" en cinco especies de *Quercus* mediterráneos. Bol San Veg Plagas. 27:103-115.

Ueno S, Klopp C, Leplé JC, Derory J, Noirot C, Léger V *et al.* (2013) Transcriptional profiling of bud dormancy induction and release in oak by next-generation sequencing. BMC Genomics. 14:236. doi: 10.1186/1471-2164-14-236.

Urquijo P (1944) Aspectos de la obtención de híbridos resistentes a la enfermedad del castaño. Bol Pat Veg Entomol Agric. 13:447-462.

Urtubia C, Devia J, Castro A, Zamora P, Aguirre C, Tapia E, Barba P, Dell Orto P, Moynihan MR, Petri C, Scorza R, Prieto H (2008) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Prunus salicina*. Plant Cell Rep. 27:1333-1340. doi: 10.1007/s00299-008-0559-0.

Valladares S, Martínez T, San José MC, Corredoira E, Vieitez AM (2010) Conservación a largo plazo de germoplasma de Fagáceas mediante crioconservación de embriones somáticos. Revista de la Sociedad de Ciencias de Galicia. 10:85-86.

van Baarlen P, van Belkum A, Summerbell RC, Crous PW, Thomma BPHJ (2007) Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps? FEMS Microbiology Reviews. 31:239-277. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00065.x.

van der Vossen EAG, Gros J, Sikkema A, Muskens M, Wouters D, Wolters P, Pereira A, Allefs S (2005) The Rpi-blb2 gene from *Solanum bulbocastanum* is an Mi-1 gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato. The Plant Journal. 44:208-222. doi: 10.1111/j.1365-313x.2005.02527.x.

van Dillewijn P, Couselo JL, Corredoira E, Delgado A, Wittich R-M, Ballester A, Ramos JL (2008) Bioremediation of 2,4,6-

trinitrotoluene by bacterial nitroreductase expressing transgenic aspen. *Environ Sci Technol.* 42:7405-7410. doi: 10.1021/es801231w.

van Haaren MJJ, Sedee NJA, de Boer HA, Schilperoort RA, Hooykaas PJJ (1988) Bidirectional transfer from a 24 bp border repeat of *Agrobacterium tumefaciens*. *Nucleic Acids Res.* 16:10225-10236. doi: 10.1093/nar/16.21.10225.

van Loon LC, van Kammen A (1970) Polyacrylamide disk electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology.* 40:199-211. doi: 10.1016/0042-6822(70)90395-8.

van Loon LC, Bakker PA, Pieterse CM (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol.* 36:453-483. doi: 10.1146/annurev.phyto.36.1.453.

van Loon LC, Rep M, Pieterse CM (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol.* 44:135-162. doi: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 18:3 doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.

Valério L, Carter D, Rodrigues JC, Tournier V, Gominho J, Marque C, Boudet AM, Maunders M, Pereira H, Teulière C (2003) Down regulation of Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase, a lignification enzyme, in *Eucalyptus camaldulensis*. *Mol Breed.* 12:157-167. doi: 10.1023/a:1026070725107.

Valladares S, Toribio M, Celestino C, Vieitez AM (2004) Cryopreservation of embryogenic cultures from mature *Quercus suber* trees using vitrification. *Cryo Letters.* 25:177-86. ISSN: 0143-2044.

Vasyukova NI, Ozeretskoykaya OL (2017) Induced plant resistance and salicylic acid: a review. *Appl Biochem Micro.* 43:367-373. doi: 10.1134/S0003683807040011.

Velazhahan R, Muthukrishnan S (2003) Transgenic tobacco plants constitutively overexpressing a rice Thaumatin-like protein (PR-5) show enhanced resistance to *Alternaria alternata*. *Biol Plant.* 47:347-354. doi: 10.1023/b:biop.0000023876.55053.5e.

Velazhahan R, Datta SK, Muthukrishnan S (1999) The PR-5 family; Thaumatin-like proteins, in: Datta SK and Muthukrishnan S [Eds.] CRC Press. Boca Raton. 107-129.

Vellicce GR, Ricci JCD, Hernández L, Castagnaro AP (2006) Enhanced resistance to *Botrytis cinerea* mediated by the transgenic expression of the chitinase gene ch5b in strawberry. *Transgenic Res.* 15:57-68. doi: 10.1007/s11248-005-2543-6.

Veluthakkal R, Dasgupta MG (2010) Pathogenesis-related genes and proteins in forest tree species. *Trees.* 24:993-1006. doi: 10.1007/s00468-010-0489-7.

Verberne MC, Verpoorte R, Bol JF, Mercado-Blanco J, Linthorst HJM (2000) Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nat Biotechnol.* 18:779-783. doi: 10.1038/77347.

Verma SR, Dwivedi UN (2014) Lignin genetic engineering for improvement of wood quality: Applications in paper and textile industries, fodder and bioenergy production. *S Afr J Bot.* 91:107-125.

Vidal N, Mallón R, Valladares S, Meijomín AM, Viéitez AM (2010). Regeneration of transgenic plants by *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos of juvenile and mature *Quercus robur*. *Plant Cell Rep.* 29:1411-1422. doi 10.1007/s00299-010-0931-8.

Vieitez E (1960) Obtención de castaños resistentes a la enfermedad de la tinta. En C.R. Estudios, Investigaciones y Experiencias Forestales de Lourizán, Pontevedra. Suc. Rivadeneyra SA, Madrid. 1-31.

Vieitez E, Vieitez ML, Vieitez FJ (1996) El castaño. Edilesa, León, Spain.

Vieitez AM, San José MC, Sánchez MC, Ballester A (2003) Micropropagation of *Fagus* spp. In: Jain SM, Ishii K (eds). Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 181-215.

Vieitez AM, Corredoira E, Martínez MT, San-José MC, Sánchez C, Valladares S, Vidal N, Ballester A (2012) Application of biotechnological tools to *Quercus* improvement. Eur J Forest Res. 131:519-539. doi: 10.1007/s10342-011-0526-0.

Vignote S (2014) Principales maderas frondosas de España. Características, tecnología y aplicaciones. Monografía (Informe Técnico). Universidad Politécnica de Madrid.

Wally O, Punja ZK (2010). Genetic engineering for increasing fungal and bacterial disease resistance in crop plants. GM Crops. 1:199-206. doi: 10.4161/gmcr.1.4.13225.

Wanderley-Nogueira AC, Belarmino LC, Soares-Cavalcanti NM, Bezerra-Neto JP, Kido EA, Pandolfi V, Abdelnoor RV, Binneck E, Carazzole MF, Benko-Iseppon AM (2012) An overall evaluation of the Resistance (R) and Pathogenesis-Related (PR) superfamilies in soybean, as compared with *Medicago* and *Arabidopsis*. Genet Mol Biol. 35:260-271. doi: 10.1590/S1415-47572012000200007.

Wang B, Yu J, Zhu D, Zhao Q (2011) Maize defensin ZmDEF1 is involved in plant response to fungal phytopathogens. African J. Biotech. 10:16128-16137.

Wang G, Dong Y, Liu X, Yao G, Yu X, Yang M (2018) The current status and development of insect-resistant genetically engineered poplar in China. Front Plant Sci. 9:1408. doi: 10.3389/fpls.

Wani SH (2010) Inducing fungus-resistance into plants through biotechnology. Not Sci Biol 2:14-21. doi: 10.15835/nsb.2.2.4594.

Waterhouse GM (1963) Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Myc Papers. 92:1-22. doi: 10.1016/S0007-1536(64)80070-X.

Wei Q, Liao Y, Chen Y, Wang SH, Xu Y, Tang L, Wei F (2005) Isolation, characterisation and antifungal activity of  $\beta$ -1,3-glucanase from seeds of *Jatropha curcas*. S African J Bot. 71:95-99. doi: 10.1016/s0254-6299(15)30155-1.

Weste G, Vithanage K (1979) Survival of chlamydospores of *Phytophthora cinnamomi* in several non-sterile, host-free forest soils and gravels at different soil water potentials. Aust J Bot. 27:1-9.

Wiebke B, Ferreira F, Pasquali G, Bodanese-Zanettini ME, Droste A (2006) Influence of antibiotics on embryogenic tissue and *Agrobacterium tumefaciens* suppression in soybean genetic transformation. Bragantia. 65:543-55. doi: 10.1590/S0006-87052006000400002.

World-Wildlife-Fund

(WWF):

[http://wwf.panda.org/what\\_we\\_do/endangered\\_species/cork\\_oak/](http://wwf.panda.org/what_we_do/endangered_species/cork_oak/)

Yancheva SD, Shlizerman LA, Golubowicz S, Yabloviz Z, Perl A, Hanania U, Flaishman MA (2006) The use of green fluorescent protein (GFP) improves *Agrobacterium*-mediated transformation of “Spadona” pear (*Pyrus communis* L.). Plant Cell Rep. 25:183-189. doi: 10.1007/s00299-005-0025-1.

Yangui I, Zouaoui Boutiti M, Vettrano AM, Bruni N, Vannini A, Ben Jamaâ ML, Boussaid M, Messaoud C (2019) *Biscogniauxia mediterranea* associated with cork oak (*Quercus suber*) in Tunisia: Relationships between phenotypic variation, genetic diversity and ecological factors. Fungal Ecol. 41:224-233. doi: 10.1016/j.funeco.2019.07.001.

Yáñez-Juárez MG, López-Orona CA, Ayala-Tafoya F, Partida-Ruvalcaba L, Velázquez-Alcaraz TJ, Medina-López R (2018) Phosphites as alternative for the management of phytopathological problems. Revista Mexicana de Fitopatología. 36:79-94. doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1710-7.

Yeung EC, Rahman MH, Thorpe TA (1996) Comparative development of zygotic and microspore-derived embryos in *Brassica napus* L. CV Topas. I. Histodifferentiation. *Int J Plant Sci.* 157:27-39. doi: 10.1086/297317.

Yu TA, Yeh SD, Yang JS (2001) Effects of carbenicillin and cefotaxime on callus growth and somatic embryogenesis from adventitious roots of papaya. *Bot Bull Acad Sin.* 42:281-286.

Zambryski P, Depicker A, Kruger K, Goodman HM (1982) Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens* analysis of the boundaries of transferred DNA. *J Mol Appl Genet.* 1:361-370. ISSN: 0271-6801.

Zhang B, Newhouse A, McGuigan L, Maynard C, Powell W (2011). *Agrobacterium*-mediated co-transformation of American Chestnut (*Castanea dentata*) somatic embryos with a wheat oxalate oxidase gene. *BMC Proceedings.* 5:O43. doi: 10.1186/1753-6561-5-S7-O43.

Zhang B, Oakes AD, Newhouse AE, Baier KM, Maynard CA, Powell WA (2013) A threshold level of oxalate oxidase transgene expression reduces *Cryphonectria parasitica*-induced necrosis in a transgenic American chestnut (*Castanea dentata*) leaf bioassay. *Transgenic Res.* 22:973-982. doi: 10.1007/s11248-013-9708-5.

Zhang Z, Wang P, Luo X, Yang C, Tang Y, Wang Z, Hu G, Ge X, Xia G, Wu J (2019) Cotton plant defence against a fungal pathogen is enhanced by expanding BLADE-ON-PETIOLE1 expression beyond lateral-organ boundaries. *Commun Biol.* 2:238. doi: 10.1038/s42003-019-0468-5.

Zentmyer GA (1988) Origin and distribution of four species of *Phytophthora*. *Transactions of the British Mycological Society.* 91:367-378. doi: 10.1016/S0007-1536(88)80111-6.

Zhou F, Zhang Z, Gregersen PL, Mikkelsen JD, Neergaard E, Collinge DB, Thordal-Christensen H (1998) Molecular characterization of the oxalate oxidase involved in the response of barley to the powdery mildew fungus. *Plant Physiol.* 117:33-41. doi: 10.1104/pp.117.1.33.

VANESA CANO

Zipfel C (2009) Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol.* 12:414-420. doi: 10.1016/j.pbi.2009.06.003.



## ANEXO 1





Anexo 1. Relación de trabajos publicados en los últimos años en los que se han obtenido plantas transgénicas con genes que codifican una proteína tipo taumatina.

Especie huésped	Origen del gen	Patógeno	Tipo de ensayo de tolerancia	Resultado	Referencia
<b>Herbáceas</b>					
Trigo	Arroz	<i>Fusarium graminearum</i>	Infección: Inoculación de las espiguillas en antesis con esporas del hongo en suspensión Parámetro: Evaluación del número de espiguillas necrosadas tras 7 y 10 días	La aparición y desarrollo de la infección es significativamente menor en plantas TR que en CT durante tres generaciones	Chen <i>et al.</i> 1999
Arroz	Arroz	<i>Rhizoctonia solani</i>	Infección: Inoculación de las plantas con sustrato de cáscara de arroz infectado con micelio Parámetro: Evaluación semanal del avance de los síntomas por la vaina	El tamaño de las lesiones es significativamente menor en líneas TR que en las CT	Datta <i>et al.</i> 1999
Zanahoria	Arroz	<i>Botrytis cinerea</i> ; <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Infección: Inoculación del peciolo de las hojas con un disco de agar con micelio Parámetro: Evaluación del tamaño de la lesión a los 5 y 8 días	Las lesiones necróticas fueron significativamente más pequeñas en las hojas TR que en las CT	Chen y Punja 2002
Trigo	Trigo	<i>Fusarium graminearum</i>	Infección: Inoculación de las espiguillas en antesis con suspensión de esporas Parámetro: Evaluación del número de espiguillas necrosadas tras 7, 10 y 14 días	Se observa retraso en la aparición y desarrollo de los síntomas de necrosis de las líneas TR durante 3 generaciones	Anand <i>et al.</i> 2003
CT: plantas control; TR: plantas transgénicas; -: no se realizó análisis tolerancia					

Anexo 1. continua...

Anexo 1. continuación.

Especie huésped	Origen del gen	Patógeno	Tipo de ensayo de tolerancia	Resultado	Referencia
<b>Herbáceas</b>					
Tabaco	Arroz	<i>Alternaria alternata</i>	Infección: Esporas en 4 hojas de cada planta Parámetro: Evaluación del grado de necrosis y clorosis diariamente durante 15 días	El número de lesiones necróticas y clorosis es menor en las plantas TR que en la planta CT, pero de forma no significativa	Velazhahan y Muthukrishnan 2003
Agrostis	Arroz	<i>Sclerotinia homoeocarpa</i>	Infección: Inóculo aplicado en el sustrato húmedo. Plantas infectadas en invernadero y en campo Parámetro: Evaluación del porcentaje de necrosis en las hojas	En invernadero, las plantas TR mostraron mayor resistencia que CT, pero no de forma significativa. En campo, las plantas TR mostraron porcentajes de infección significativamente menores que las plantas CT	Fu <i>et al.</i> 2004
Zanahoria	Arroz	<i>Alternaria dauci</i> ; <i>Alternaria petroselini</i> ; <i>Alternaria radicina</i> ; <i>Botrytis cinerea</i> ; <i>Rhizoctonia solani</i> ; <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ; <i>Sclerotium rolfsii</i>	Infección: Hojas inoculadas con discos de micelio, o con suspensiones de esporas, colocados en ambos extremos de las hojas Parámetro: Evaluación del porcentaje de la hoja necrosada tras 7 días	Las líneas TR mostraron significativamente menos síntomas de infección que las líneas CT	Punja <i>et al.</i> 2005

CT: plantas control; TR: plantas transgénicas; -: no se realizó análisis tolerancia

Anexo 1. continua...

Anexo 1. continuación.

Especie huésped	Origen del gen	Patógeno	Tipo de ensayo de tolerancia	Resultado	Referencia
Herbáceas					
Fresa	<i>Thaumatooccus daniehellii</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<p>Infeción: Las hojas se incuban en una solución de esporas</p> <p>Parámetro: Evaluación del porcentaje de marchitamiento y la densidad de esporulación</p>	Las líneas TR mostraron leves signos de infección y bajo porcentaje de esporulación, al contrario que las líneas CT	Schestibratov y Dolgov 2005
Trigo	Cebada	<i>Fusarium graminearum</i>	<p>Infeción: Inóculo aplicado en el suelo mediante fumigación</p> <p>Parámetro: Evaluación del porcentaje de espigas infectadas a los 21 días</p>	Todas las líneas TR menos una mostraron reducción significativa de al menos un síntoma de la enfermedad	Mackintosh et al. 2007
<i>Hyacinthus orientalis</i>	T. <i>daniehellii</i>	<i>Fusarium culmorum</i> ; <i>Botrytis cinerea</i>	<p>Infeción: Las hojas incubadas durante 2 días en una solución de esporas. Los bulbos fueron inyectados con la misma suspensión</p> <p>Parámetro: Evaluación del porcentaje de marchitamiento</p>	No hubo diferencias significativas entre las hojas TR y CT. En los bulbos se observaron diferencias en el tiempo de aparición de los síntomas entre las diferentes líneas TR, siendo unas más resistentes que otras en comparación con las líneas CT	Popowich et al. 2007
Tabaco	Algodón	<i>Verticillium dahliae</i> ; <i>Fusarium oxysporum</i>	<p>Infeción: Aplicación mediante el riego de una dilución de esporas filtradas</p> <p>Parámetro: Evaluación del porcentaje de hojas marchitas tras 6 semanas de infección</p>	El área de la infección fue significativamente menor en las hojas TR que en las hojas CT	Munis et al. 2010
CT: plantas control; TR: plantas transgénicas; --: no se realizó análisis tolerancia					

Anexo 1. continua...

Anexo 1. continuación.

Especie huésped	Origen del gen	Patógeno	Tipo de ensayo de tolerancia	Resultado	Referencia
Herbáceas					
Tabaco	Algodón	<i>Verticillium dahliae</i> ; <i>F. oxysporum</i>	Infección: Aplicación de una dilución de esporas filtradas sobre una herida hecha en las hojas Parámetro: Evaluación del avance de los síntomas 7 días después de la infección	Las plantas TR mostraron menores porcentajes de infección que las plantas CT	Munis <i>et al.</i> 2010
Tabaco	<i>Pyrus pyrifolia</i>	<i>Penicillium sp.</i> ; <i>Aspergillus niger</i> ; <i>Phytophthora parasitica var. Nicotianae</i> ; <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ; <i>Fusarium sp.</i> ; <i>Phomopsis sp.</i> ; <i>Alternaria sp.</i>	Infección: Cada disco de micelio (3 cm) fue inoculado con 100 µg de extracto crudo de proteína de las hojas Parámetro: Evaluación de la actividad antifúngica tras 2-3 días	Las líneas TR mostraron diferentes niveles de actividad antifúngica, pero todas inhibieron el crecimiento del micelio de todos los patógenos testados	Liu <i>et al.</i> 2012
Arroz	Arroz	<i>Rhizoctonia solani Kuhn</i>	Infección: Inoculación de la base de la vaina con un disco de micelio (5 mm) Parámetro: Evaluación del grado de necrosis	Las lesiones fueron significativamente mayores y se extendieron rápidamente en las plantas CT. Las plantas TR tardaron más tiempo en mostrar signos de infección y estos avanzaban más despacio	Naseri <i>et al.</i> 2012
CT: plantas control; TR: plantas transgénicas; -: no se realizó análisis tolerancia					

Anexo 1. continua...

Anexo 1. continuación.

Especie huésped	Origen del gen	Patógeno	Tipo de ensayo de tolerancia	Resultado	Referencia
Herbáceas					
<i>Solanum tuberosum</i> L.	<i>Camellia sinensis</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Infección: Inoculación del micelio dentro de cada tubérculo Parámetro: Evaluación del grado de necrosis dentro del tubérculo y en los brotes laterales	Los tubérculos TR mostraron lesiones significativamente menores que los CT, con diferencias entre las líneas TR	Acharya et al. 2013
<i>Solanum tuberosum</i> L.	<i>Camellia sinensis</i>	<i>M. phaseolina</i>	Infección: Cultivo del micelio sobre medio PDA + extracto de hojas Parámetro: Evaluación del diámetro de crecimiento del micelio	Los extractos de las hojas TR inhibieron el crecimiento del micelio	Acharya et al. 2013
<i>Solanum tuberosum</i> L.	<i>Camellia sinensis</i>	<i>P. infestans</i>	Infección: Inoculación de hojas con disco de micelio Parámetro: Evaluación del tiempo que tardan en aparecer los síntomas de infección	Las plantas TR tardaron significativamente más días en mostrar síntomas de infección que las CT	Acharya et al. 2013
Leñosas					
Naranja	Tomate	<i>P. Citrophthora</i>	Infección: Inoculación de un disco de micelio en un trozo de corteza extraída del tronco de una planta de un año de edad Parámetro: Evaluación del tiempo de supervivencia durante un año	Las cortezas de las plantas TR tuvieron mayores porcentajes de resistencia que las líneas CT, pero de forma variable, y solo una línea TR mostró diferencias significativas con respecto a las líneas CT.	Fagoaga et al. 2001

CT: plantas control; TR: plantas transgénicas; -: no se realizó análisis tolerancia

Anexo 1. continua...

Anexo 1. continuación.

Especie huésped Leñosas	Origen del gen	Patógeno	Tipo de ensayo de tolerancia	Resultado	Referencia
Naranja	Tomate	<i>P. citrophthora</i>	Infección: Inoculación de un disco de micelio en una herida del tronco de plantas de un año de edad Parámetro: Evaluación del área de podredumbre tras 3-4 días de infección	Las plantas TR tuvieron mayores porcentajes de supervivencia que las líneas CT, pero sólo una línea TR mostró diferencias significativas con respecto a CT	Fagoaga et al. 2001
<i>Vitis vinifera</i>	<i>V. vinifera</i>	<i>Erysiphe necator</i>	Infección: Inoculación de 5 hojas por cada planta. Ensayo realizado en invernadero y en campo Parámetro: Evaluación cada dos días del número de colonias que crecen en cada hoja	Se observaron diferencias significativas entre las hojas infectadas de las plantas TR y CT en los primeros 8 días de la infección, pero no hubo diferencias a partir de 18 días de infección. Resultados similares se observaron en los ensayos en campo	Dhekney et al. 2011
<i>Castanea sativa</i>	<i>C. sativa</i>	<i>P. cinnamomi</i>	--	--	Corredoira et al. 2012
Banana	Arroz	<i>Fusarium sp.</i>	Infección: Raíces de plantas de 60 días fueron sumergidas en una suspensión de esporas durante 1h. Posteriormente fueron regadas con la misma solución Parámetro: Evaluación de los síntomas en las hojas tras 4 semanas	Las plantas TR mostraron significativamente menos síntomas de clorosis en las hojas que las plantas CT	Mahdavi et al. 2012

CT: plantas control; TR: plantas transgénicas; --: no se realizó análisis tolerancia

Anexo 1. continua...

Anexo 1. continuación.

Especie huésped	Origen del gen	Patógeno	Tipo de ensayo de tolerancia	Resultado	Referencia
<b>Lefiosas</b>					
<i>Quercus robur</i>	<i>C. sativa</i>	<i>P. cinnamomi</i>	--	--	Mallón <i>et al.</i> 2014
<i>Vitis vinifera</i>	<i>Vitis amurensis</i>	<i>Plasmopara viticola</i>	Infección: Inoculación de discos de hojas (9 mm de diámetro) con suspensión de esporangios Parámetro: Evaluación del porcentaje de esporulación y síntomas de la hoja	Los discos TR mostraron síntomas significativamente menos severos y menor número de esporangios que los discos CT	He <i>et al.</i> 2017
<i>Vitis vinifera</i>	<i>Vitis amurensis</i>	<i>Plasmopara viticola</i>	Infección: La 4ª y 5ª hoja empezando por el ápice fueron fumigadas con una suspensión de esporangios Parámetro: Evaluación de los síntomas a los 8 días	Las plantas TR mostraron síntomas significativamente menos severos y menor densidad de esporas que las plantas CT	He <i>et al.</i> 2017
Mandioca	Arroz	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Infección: Tallos y hojas fueron inoculados en cuatro puntos con una alícuota de esporas en suspensión Parámetro: Evaluación del tamaño de las áreas necrosadas a los 10 días	Las líneas TR tardaron más tiempo en presentar síntomas de necrosis, y esta creció más despacio que en las líneas CT	Odeny Ojola <i>et al.</i> 2018
<b>CT: plantas control; TR: plantas transgénicas; --: no se realizó análisis tolerancia</b>					

Anexo 1. continua...

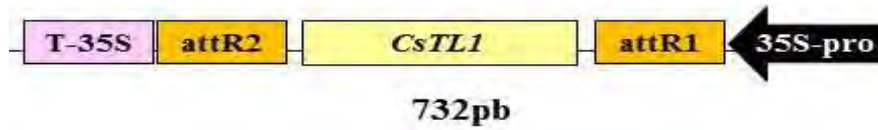


## ANEXO 2





**Anexo 2.** Secuencia del gen *CsTL1* (amarillo), y del promotor (verde) y terminador del gen CaMV35S (rosa).



```

ACTAGAGCCAAGCTGATCTCCTTTGCCCGGATCACC
ATGGACGACTTTCTCTATCTCTACGATCTAGGAAGAAAGTT
CGACGGAGAAGGTGACGATACCATGTTACCACCGATAATG
AGAAGATTAGCCTCTTCAATTCAGAAAGAATGCTGACCCA
CAGATGGTTAGAGAGGCCTACGCGGCAGGTCTCATCAAGAC
GATCTACCCGAGTAATAATCTCCAGGAGATCAAATACCTTC
CCAAGAAGGTTAAAGATGCAGTCAAAGATTGAGGACTAA
CTGCATCAAGAACACAGAGAAAGATATATTTCTCAAGATCA
GAAGTACTATTCCAGTATGGACGATTCAAGGCTTGCTTCAT
AAACCAAGGCAAGTAATAGAGATTGGAGTCTCTAAGAAAG
TAGTTCCTACTGAATCAAAGGCCATGGAGTCAAAAATTCAG
ATCGAGGATCTAACAGAACTCGCCGTGAAGACTGGCGAAC
AGTTCATACAGAGTCTTTTACGACTCAATGACAAGAAGAAA
ATCTTCGTCAACATGGTGGAGCACGACACTCTCGTCTACTCC
AAGAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCTA
TTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCGGGAAACCTCCTC
GGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTCATCAAAGGAC
AGTAGAAAAGGAAGGTGGCACCTACAAATGCCATCATTGC
GATAAAGGAAAGGCTATCGTTCAAGATGCCTCTGCCGACAG
TGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGG
AAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGAT
TGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATC
CCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTC
ATTCATTTGGAGAGGACTCCGGTATTTTTACAACAATACCA
CAACAAAACAACAACAACAACATTACAATTTACTATTCT
AGTCGACCTGCAGGCGGCCGCACTAGTGATATCACAAAGTTT
GTACAAAAAAGCAGGCTCCGCGGCCGCCCCCTTCACCATGA
TGAAAACCCTGGCACTCTACGGCCTTACCTTGGCTCTCTTTT

```

TCTTATCTGGTGCGCACTCTGCTAAAATAACTTTCACAAACA  
ACTGTCCAAGAACCATCTGGCCAGGAACCCTAACTTCAGAT  
CAAAAACCTCAACTACCGAACACTGGATTTGTGTTAGCATC  
CAAAGCATCTTTAACACTGGGTGTTCAAGCTCCATGGAAAG  
GCCGGTTCTGGGCCCGAACCCGATGCACCACCAACTCAGGA  
AAGTTCACCTGCGGAGACTGCTGATTGTAGCACCGGTCAGGT  
TGCATGCAACGGTAATGGTGCAATCCCACCAGCATCTTTAG  
TAGAAATCAACATAGCAGCCAATCGCGGGATGGACTTTTAC  
GATGTTAGCCTTGTAGATGGCTACAACCTGCCTGTTTCTGTA  
GCCACCAGAGGCGGCACAGGTGATTGCAAGGCCACAAGCT  
GTCGAGCCAACGTGAACGCGGTTTGCCAGCGGAATTGCAA  
GTGAAAGGGTCTGATGCGAGCGTGCTTGCTTGCAAGAGCGC  
TTGTAAGTCTTTCAATCAACCACAATACTGTTGCACTGGTGC  
ATTTGACACCGCGAGAACATGTCCAGCCACAAAATATTCTC  
GCATCTTTAAGCAACAATGTCCTCAAGCTTATAGCTATGCTT  
ATGATGATTCTACCAGCACCTTTACCTGCTCTGGTGCACCCG  
ACTATGTTATCACTTTTTGTCCATGAATTATAGAGAGGAAG  
GGTGGGCGCGCCGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTGAT  
ATCCCGCGGCCATGCTAGAGTCCGCAAAAATCACCAGTCTC  
TCTCTACAAATCTATCTCTCTCTATTTTTCTCCAGAATAATGT  
GTGAGTAGTTCCCAGATAAGGGAATTAGGGTTCTTATAGGG  
TTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCTTAGTATGTA  
TTTGTATTTGTAAAATACTTCTATCAATAAAAATTTCTAATTC  
CTAAAACCAAAAATCCAGTGACCT

\*\*Sin color regiones attR1 y attR2.

**ANEXO 3**





**Anexo 3.** Artículos en los que se han publicado parte de los ensayos descritos en este trabajo:

Cano-Lázaro, Corredoira E, Martínez MT, Ballester A, Toribio M, San José MC (2016) Transformation of *Quercus suber* and *Quercus ilex* somatic embryos with a gene encoding a thaumatin-like protein. Proceedings of the Fourth International Conference of the IUFRO Unit 2.09.02 on “Development and application of vegetative propagation technologies in plantation forestry to cope with a challenging climate and environment” La Plata, Argentina; Cano V, Martínez MT, San José MC, Couselo JL, 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. doi: 10.1007/s11056-020-09771-9.







## Transformation of *Quercus suber* and *Quercus ilex* somatic embryos with a gene encoding a thaumatin-like protein

Cano-Lázaro V<sup>1§\*</sup>, Corredoira E<sup>1§</sup>, Martínez MT<sup>1</sup>, Ballester A<sup>1</sup>, Toribio M<sup>2</sup>, San José MC<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (IIAG), Santiago de Compostela, Spain

<sup>2</sup>Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA),  
Alcalá de Henares, Madrid, Spain

<sup>§</sup>V. Cano-Lázaro and E. Corredoira contributed equally to this work

\*Corresponding author: [vanesa.cano.lazaro@iiag.csic.es](mailto:vanesa.cano.lazaro@iiag.csic.es)

### Abstract

An efficient protocol for the genetic transformation of cork oak and holm oak somatic embryos (SEs) with the *CsTL1* gene that encodes a thaumatin-like protein is described. Cork oak SEs at the globular or early torpedo stages, isolated from three embryogenic lines, were pre-cultured for one day and co-cultured for 5 days with *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 harbouring the pK7WG2D-tau plasmid. Genetic transformation was successfully achieved in all three embryogenic lines studied. Transformation efficiency was clearly genotype dependant, and the highest rate (17%) was obtained with SEs of line TGR3. Successful transformation of holm oak SEs was not achieved under the above-described conditions; transgenic SEs were only obtained, and at a lower frequency (2%), when the original SEs were pre-cultured for 2-3 weeks with the *Agrobacterium* strain. At present, 30 *GFP*-positive cork oak embryogenic lines and 10 *GFP*-positive holm oak embryogenic lines are being maintained in our laboratory by secondary embryogenesis. The presence of different transgenes in the SEs was confirmed by PCR analysis.

**Keywords:** *Agrobacterium tumefaciens*, cork oak, holm oak, embryogenic cultures, genetic transformation

**Abbreviations:** *GFP*, Green Fluorescent Protein; kan, kanamycin; SEs, Somatic Embryos

### Introduction

Cork oak (*Quercus suber* L.) and holm oak (*Quercus ilex* L.) are widely distributed in the Mediterranean ecosystem. The economic importance of these tree species in the region is mainly due to production of cork and acorns respectively. However, populations of both species have been decimated over the last few decades by a syndrome denominated as oak decline, which is mainly caused by *Phytophthora cinnamomi*, *Diplodia mutila* and *Biscogniauxia mediterranea* (Muñoz López et al. 1992; Vannini et al. 1996; Sánchez et al. 2002).

*Phytophthora cinnamomi* Rands. is an oomycete belonging to the family *Pythiaceae* (European and Mediterranean Plant Protection Organization 2004). This pathogen infects more than 3,000 potential hosts (Hardham 2005). It invades the root by the spread of primary hyphae from the cortex to parenchymal tissues via apoplast and symplast pathways (Ruiz-Gómez et al. 2012). *Quercus ilex* is more susceptible to *P. cinnamomi* than *Q. suber*, although both trees undergo a decrease in stomatal conductance when infected, due to root loss and root lesions (Robin et al. 2001). Other symptoms caused by *Phytophthora* include bleeding cankers on trunks, crown symptoms, chronic decline and death (Robin et al. 1992). Although in nature some trees show tolerance to oak decline, their distribution and breeding by traditional means are constrained by a long juvenile period and reproductive cycle, complex reproductive characteristics (such





as self-incompatibility and a high degree of heterozygosis) and recalcitrance to conventional vegetative propagation methods.

Genetic transformation can be used to produce individual trees that are tolerant to oak decline. Over-expression of genes conferring resistance is not yet possible, because specific genes for resistance to oak decline have not been identified. Tolerance to fungal pathogens can occur via expression of heterologous genes whose products, including pathogenesis-related (PR) proteins, display *in vitro* antifungal activity (Van Loon 1997; Lorito et al. 1998). Such proteins are expressed in response to pathogen attack, abiotic stress and developmental signals (Veluthakkal and Dasgupta 2010). Among these, the PR-5 family of proteins (thaumatin-like proteins) are generally of low molecular weight (below 35 kDa) and may produce transmembrane pores on fungal plasma membranes, thus promoting osmotic rupture and inhibition of hyphal growth and spore germination.

The isolation of PR-proteins from chestnut seeds provides an opportunity to produce transgenic cork oak and holm oak trees with genes encoding these proteins isolated from a species in the same family (*Fagaceae*). The *CsTLL1* gene, which encodes a thaumatin-like protein, has been isolated from mature European chestnut cotyledons (García-Casado et al. 2000). Moreover, this protein exerts *in vitro* antifungal activity against *Trichoderma viride* and *Fusarium oxysporum* (García-Casado et al. 2000).

The objective of this study was to develop a protocol for the genetic transformation of cork oak and holm oak somatic embryos (SEs) with the *CsTLL1* gene, in a first step towards producing cork and holm oak trees tolerant to oak decline.

## Material and methods

### Plant material

Three different embryogenic lines of *Quercus suber* (ALM6, ALM80 and TGR3) were used as sources of target explants. All were initiated from leaves of adult trees selected for the high quality and yield of cork produced (Toribio et al. 2005). One embryogenic line of *Quercus ilex*, named Q8, was used as the source of explants. In this case, SEs were induced from adult trees selected for their high fruit yield (Barra-Jiménez et al. 2014).

The embryogenic cultures were maintained by secondary embryogenesis with sequential subculture at 6-week intervals on proliferation medium consisting of SH medium (Schenk and Hildebrandt 1972) supplemented with 3% (w/v) sucrose and 0.6% (w/v) Vitro-agar (Pronadisa, Spain). The pH of the medium was adjusted to 5.6 before sterilization by autoclaving at 120°C for 20 min. The embryogenic cultures were subjected to a 16 h 25°C light/8h 20°C dark photoperiod (provided by cool-white fluorescent lamps at a photon flux density of 50-60 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

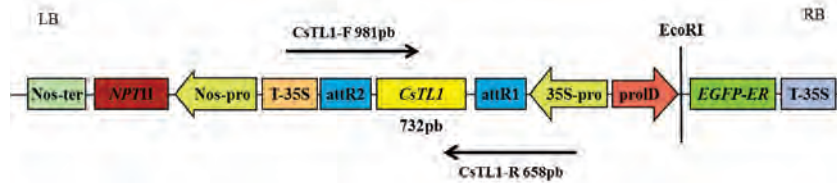
### Agrobacterium strain and plasmid

The chestnut gene encoding the thaumatin-like protein *CsTLL1* was cloned using the Gateway cloning system (Invitrogen, USA) into plasmid pK7WG2D (VIB, Ghent University, Belgium) under control of the CaMV35S promoter.

The *CsTLL1* coding region was mobilized into the pENTR/D-TOPO intermediate vector, and the resulting pENTR/D-TOPO-*CsTLL1* was transferred into the Gateway-compatible plasmid pK7WG2D by the LR clonase reaction (Invitrogen, USA). The vector, pK7WG2D-TAU (Fig. 1), was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 (Hood et al. 1993) by the freeze-thaw method (Xu and Li 2008).



This plasmid also includes the green fluorescence protein (*EGFP*) as a reporter gene, driven by the rol root loci D (*rolD*) promoter, and neomycin phosphotransferase (*NPTII*) as selectable marker gene, driven by the nopaline synthase (*nos*) promoter.



**Figure 1.** Representation of the T-DNA region of plasmid pK7WG2D-TAU used for the genetic transformation of cork oak and holm oak somatic embryos.

### Transformation procedures

Explants consisting of small groups of two-three SEs at globular and early torpedo stages were used for the cork oak transformation experiments, whereas in holm oak the target explants consisted of one-two isolated pro-embryogenic masses (PEMs) (Fig. 2). The cork oak explants were pre-cultured for one day, whereas holm oak explants were pre-cultured for different times (one day, one week and two weeks) prior to transformation (Fig. 2).

Cultures of *Agrobacterium* were initiated from a glycerol stock and grown overnight in liquid Luria-Bertani medium (LB: 1% tryptone, 0.5% yeast extract, and 1% NaCl, pH 7.0 (Sambrook et al. 1989) containing kan (10 mg/l) at 28°C with shaking (200 rpm). A single colony of the bacterium was inoculated into 2 ml of LB medium containing 10 mg/l kan, and the culture was incubated overnight at 28°C at 200 rpm in darkness. One ml of the bacterial suspension was inoculated into 600 ml of LB liquid medium with the appropriate antibiotics. The bacterial suspension was then incubated at 28°C at 90 rpm until an  $OD_{600}$  of 0.6-0.7 was achieved. The bacterial culture was then centrifuged at 6500 rpm for 10 min at 10°C and re-suspended in 200 ml of Murashige and Skoog (1962) liquid medium containing 5% sucrose, pH 5.6-5.7.

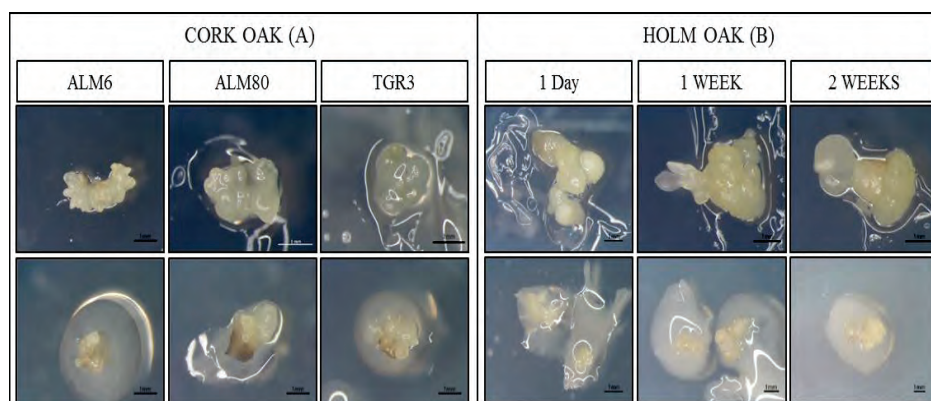
Pre-cultured SEs were transformed by immersion in bacterial suspension for 30 minutes, before being blotted dry on sterile paper and transferred to proliferation medium. The SEs were co-cultured for 5 days in darkness at 25°C. The SEs were then washed for 30 min with sterile water containing 300 mg/l carbenicillin.

The explants were transferred to Petri dishes with selective medium consisting of proliferation medium containing 300 mg/l carbenicillin plus 100 mg/l kan (for cork oak) or 75 mg/l kan (for holm oak). The explants were incubated under standard conditions, with transfer to fresh medium every two weeks. After 10 weeks, kan-resistant embryos were transferred to fresh proliferation medium containing 300 mg/l carbenicillin plus 150 mg/l kan (for cork oak) or 100 mg/l kan (for holm oak). Somatic embryos were maintained for a further four weeks in this medium (14 weeks in total) and putative transformants identified by growth on selection medium were then evaluated by the *GFP*-specific fluorescence technique (*GFP*<sup>+</sup>).

Genetic transformation was indicated by *GFP*-specific fluorescence observed under a Leica M205 FA epifluorescence stereomicroscope equipped with a light source consisting of a 100-W mercury bulb and a filter

set including a 470/40x nm excitation filter and a 525/50m nm long-pass emission filter. Images were taken with a Leica DSC7000T camera. The transformation efficiency was defined as the percentage of initial explants that are *GFP*-positive after culture for 14 weeks in selection medium.

For each cork oak embryogenic line, duplicate experimental set-ups comprising ten explants placed in each of 10 Petri dishes were established. For holm oak, ten explants were placed in each of 10 Petri dishes for each pre-culture treatment, and the experiment was duplicated. In each transformation experiment, 20 non-inoculated (wild type, WT) embryogenic explants were cultured on proliferation medium with or without antibiotics (negative and positive controls).



**Figure 2.** Morphological appearance of individual cork oak (A) and holm oak (B) somatic embryos after the pre-culture period (upper row) and after the *Agrobacterium* cultivation period (bottom row). Scale bar 1 mm.

#### PCR analysis

We extracted genomic DNA from cork oak and holm oak SEs derived from untransformed and putative transgenic embryo lines, by using the Real Plant and Fungi Extraction Kit according to the manufacturer's instructions (Durviz, Spain). The presence of the *CsT1I* (in both transcriptional senses), *NPTII* and *EGFP* transgenes was confirmed by PCR analysis. Reactions were carried out in a 50  $\mu$ L volume containing 1 $\times$  supplied Taq buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTPs, 0.6  $\mu$ M each primer, 1 U Taq DNA polymerase (Qiagen, Germany) and 100-200 ng of genomic DNA. PCR analysis was conducted with gene-specific primers: *CsT1I-F* (forward: 5'-AGGTCACCTGGATTTTGGT-3'; reverse: 5'-CACCATGATGAAAACCCTG-3'; including T-35S region (**Fig. 1**)), *CsT1I-R* (forward: 5'-GGTAAGGCCGTAGAGT-3'; reverse: 5'-GATCTAACAGAAGCTCGCC-3'; including p35S region (**Fig. 1**)), *NPTII* (forward: 5'-GTCATCTCACCTTGCTCCTGCC-3'; reverse: 5'-AAGAAGGCGATAGAAGGCGA-3') and *EGFP* (forward: 5'-CACCGGGTGGTGCCCAT-3'; reverse: 5'-CTAGTGGATCCCCGGGC-3'). The expected sizes of PCR fragments were 981 bp for *CsT1I-F*, 658 bp for *CsT1I-R*, 472 bp for *NPTII*, and 740 bp for *EGFP*. Amplifications were carried out in a MJ Mini™ thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA) by applying the following programs after initial polymerase activation: 40 cycles at 94°C for 15s, 60°C for 30s and 72°C for 1 min for *CsT1I* gene, 35 cycles at 94°C for 50s, 60°C for 50 s and 72°C for 70 s for the *NPTII* gene,



and 40 cycles at 94°C for 15s, 56°C for 30s and 72°C for 1 min for *EGFP* gene. The amplified products were resolved on 1.2% (w/v) agarose gel and confirmed by the presence of a single band of expected size.

### **Maturation and germination**

Cotyledonary-stage somatic embryos ( $\geq 5$ mm) were isolated from transgenic lines of both species. Cork oak somatic embryos were transferred to baby food jars with 30 ml of SH medium and stored at 4°C in total darkness for two months according to Toribio et al. (2005). Somatic embryos were then transferred to jars with 70 ml of SH medium supplemented with 0.025 mg/l 6-benzyladenine (BA) plus 0.05 mg/l indole-3-butyric acid. Holm oak somatic embryos were transferred to empty Petri dishes and stored at 4°C in semi-darkness for two months. The explants were then transferred to jars containing 70 ml of Gresshoff and Doy (1972) medium with 0.1 mg/l BA. In both cases, SEs were cultured under standard conditions for 6 weeks.

### **Results**

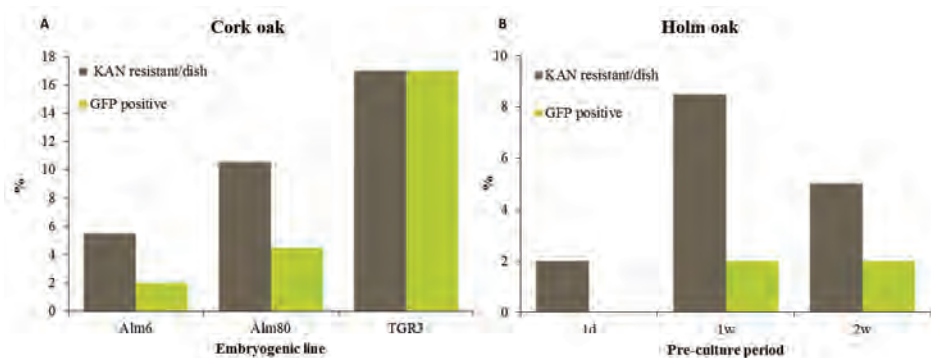
#### **Evaluation of GFP fluorescence and development of transformants**

Following the co-cultivation period, the explants gradually turned brown and many showed signs of necrosis. Newly emerging somatic embryos or embryogenic structures were observed in necrotic explants after culture for 6 (cork oak) or 8 weeks (holm oak). Kan-resistant explants were observed in all four embryogenic lines after 10 weeks of culture on selective medium, although the highest rate of production was achieved with line TGR3 (Fig. 3A, B). Only kan-resistant explants were isolated after 10 weeks of culture on selective medium. In both species, all explants cultured in the absence of the *Agrobacterium* suspension but in the presence of antibiotics (selective medium) became necrotic and did not survive (negative control). In both species, the transformation efficiency was determined on the basis of the fluorescence of surviving explants (Fig. 4). In cork oak, this parameter was clearly genotype-dependent, with rates of 17 %, 4.5% and 2 % obtained for lines TGR-3, ALM80 and ALM6, respectively (Fig. 3A).

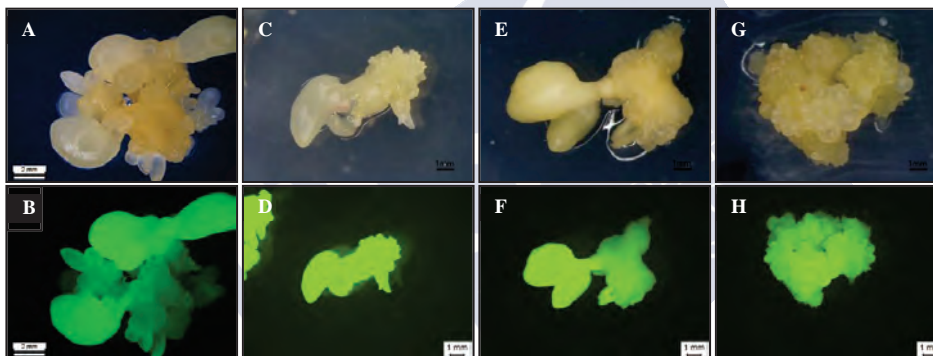
In holm oak, no response was obtained when the SEs were pre-cultured for only one day; however, a transformation frequency of 2% was obtained when the explants were pre-cultured for one or two weeks (Fig. 3B). Although larger explants were obtained after two weeks and were easier to manipulate (Fig. 2B), several of them were contaminated with *Agrobacterium*, probably due to the complex shapes of the embryogenic forms, which may have impeded exposure of the surfaces to the bactericidal agent used during the washing step. A total of 30 *GFP*-positive embryogenic lines of cork oak were obtained and 10 *GFP*-positive lines of holm oak.

After *GFP* evaluation, new embryogenic transgenic lines of each genotype were established. One cotyledonary-stage embryo was isolated from each *GFP*-positive line and subcultured on selective medium for proliferation and establishment of different embryogenic transgenic lines. These lines were then successfully maintained by secondary embryogenesis on proliferation medium.





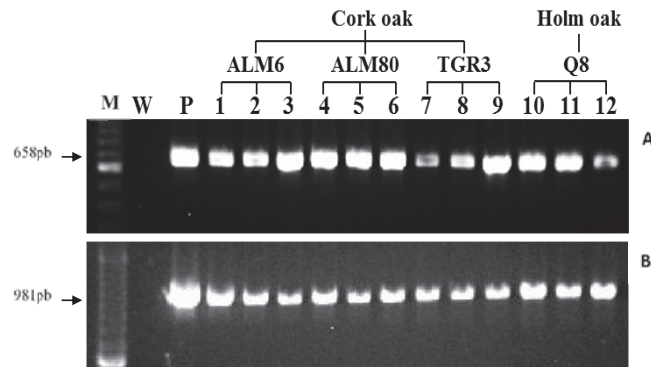
**Figure 3.** Kanamycin resistance frequency and transformation efficiency obtained for somatic embryos of cork oak (A) and holm oak (B). In cork oak the three different embryogenic lines are specified. In holm oak are shown the three pre-culture times.



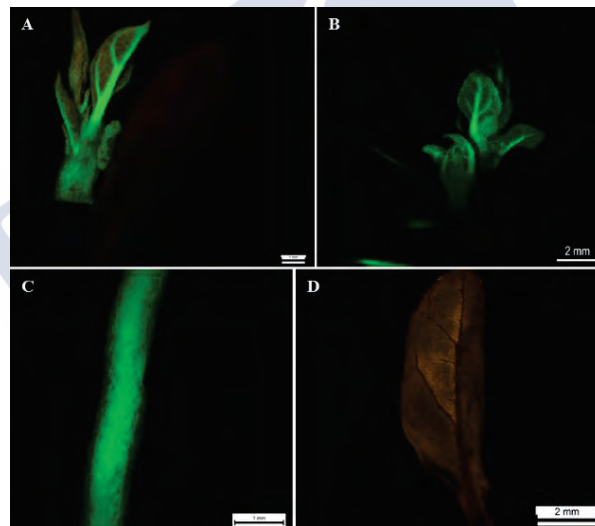
**Figure 4.** A, C, E, G. Kanamycin resistant explants of holm oak (A) and cork oak (C, E, G) observed under white light after culture for 8 weeks in selection medium. B, D, F, H. The same somatic embryos as shown in A, C, E, G observed under blue light and showing green fluorescence.

#### PCR analysis

The presence of the three transgenes was confirmed by PCR analysis in all putative transgenic lines analysed, but not from untransformed somatic embryos. A single band of the expected size was obtained in each embryogenic line. The presence of a thaumatin-like gene was confirmed in both transcriptional senses (Fig. 5).



**Figure 5.** PCR amplification obtained with primers specific for production of a 658-bp (A) and 981-bp (B) *CsTL-F* and *CsTL-R* fragments, respectively. M: DNA ladder; W: non transgenic somatic embryos (negative control); P corresponds to plasmid DNA (positive control); Lanes 1-12: cork oak transgenic lines (lanes 1-9) and holm oak transgenic lines (lanes 10-12).



**Figure 6.** *GFP* expression on apex (A, B) and root (C) derived from transgenic plants visualized in an epi-fluorescence stereomicroscope. Untransformed leaf without *GFP* expression (D) visualized in an epi-fluorescence stereomicroscope.



### *Evaluation of GFP in plants*

Transgenic plants were obtained after germination of SEs derived from cork oak and holm oak transgenic lines. No phenotypic differences were found relative to control plants, suggesting no potential cytotoxic effects of the *GFP*.

*GFP* expression was also verified in shoots, leaves and roots derived from plantlets obtained after somatic embryo germination (Fig. 6A, B, C). Fluorescence was also more intense in young, small leaves than in older, larger leaves, and it was easier to detect in veins, midrib and petioles than in blades. *GFP* expression was not detected in roots, leaves (Fig. 6D) or shoots obtained from the non-transformed plants used as negative control.

### **Discussion**

This is the first report of the genetic transformation of cork oak and holm oak with a gene from the *Fagaceae* family that describes attempts to improve the tolerance of the species to oak decline. Genes that encode thaumatin-like protein have been tested in other species, such as European chestnut (Corredoira et al. 2012), *Citrus* (Fagoaga et al. 2001; Zaneck et al. 2008), wheat (Mackintosh et al. 2007) and pedunculate oak (Mallón et al. 2014).

Genetic transformation has been achieved in several oak species, including cork oak. In *Quercus robur*, successful transformation of SEs initiated from mature and juvenile pedunculate oak trees has been reported with the *Agrobacterium* strain EHA 105 harbouring with p35SGUSINT plasmid containing a *uidA* reporter gene and *nptII* marker gene. Transformation efficiencies of 6% and 2% were achieved in juvenile material and in the mature genotype respectively (Vidal et al. 2010; Mallón et al. 2013). Different strategies for genetic transformation have been proposed for cork oak. Álvarez et al. (2004) reported a transformation frequency of 4% when embryogenic clusters and isolated embryos derived from a single embryogenic line were used in transformation experiments. These explants, without pre-culture, were infected with different *Agrobacterium* strains harbouring pBINUbiGUSint, co-cultured for 2 days in darkness, washed with a solution of cefatoxime (600 mg/l) for 2 hours, and cultured on proliferation medium supplemented with 500 mg/l cefatoxime and 100 mg/l kan. In a subsequent study using the same protocol, Álvarez and Ordás (2007) achieved successful transformation of only 3 of the 6 embryogenic lines evaluated using the *Agrobacterium* strain AGL1 transformed with the plasmid pBINUbiGUSint. Later on, somatic embryos isolated from an embryogenic line with a higher transformation capacity were subsequently transformed with *Agrobacterium* strain AGL1 harbouring the plasmid pBINUbiBar, with the objective of producing adult transgenic cork oak trees resistant to the herbicide phosphinothricin (Álvarez et al. 2009).

The protocol defined in this study differs in several aspects from those previously applied to cork oak. For example, we used carbenicillin (300 mg/l) as the bactericidal agent, after earlier attempts using cefatoxime proved unsuccessful (the embryos tended to acquire a dark yellowish colour and did not grow). Moreover, as cefatoxime is thermolabile and photolabile, it is advisable to maintain the cultures in darkness (Álvarez and Ordás 2007). We also used *GFP* rather than GUS as a selectable marker. The *GFP* assay greatly simplified and improved evaluation of the transformation events in real time, relative to the GUS assay. The presence of necrotic tissues or green spots may interfere in the GUS assay, thus necessitating longer periods of incubation or maintenance of the embryos in darkness to avoid greening (Álvarez and Ordás 2007); however, these difficulties were precluded by the use of *GFP*. Detection of *GFP* fluorescence is easy and non-destructive, whereas large numbers of explants must be sacrificed in the GUS assay (Wu et al. 2015). As each putative transformed line is established from a single transformation event, *GFP* helps to isolate only transformed embryogenic masses. In our study, only one fluorescent embryo at its cotyledonary-stage was isolated in order to establish the putative transgenic lines.





In all previous reports concerning genetic transformation of cork oak, the genotype was indicated to have a strong influence. Álvarez and Ordás (2007) reported higher transformation efficiency with the M10 line (43%) than with lines ALM6 and ALM80, which died after 4 months of culture in the presence of kan. In the present study, genetic transformation of all three cork oak lines was achieved (17% in TGR3, 4.5% in ALM80 and 2% in ALM6), including the lines ALM6 and ALM80 which were not transformed in previous studies.

To our knowledge, this is the first report of the successful genetic transformation of holm oak. A similar protocol was also applied to cork oak, although the procedure had to be modified as pre-culturing the explants for only one day did not produce successful results. When the explants were pre-cultured for one or two weeks, a comparable transformation efficiency (~2%) was achieved. Although low, this rate was sufficient to establish ten transgenic embryogenic lines in holm oak. The same pre-culture time was necessary for the genetic transformation of pedunculate oak somatic embryos (Vidal et al. 2010).

**Acknowledgement:** This research was partly funded by the Ministerio de Economía y Competitividad, (MINECO, Spain), through projects AGL2013-47400-C4-3-R and AGL2016-76143-C4-4-R. The authors thank Dr I. Allona and Dr C. Aragoncillo for providing the *CsTL1* gene.

## References

- Álvarez R, Alonso P, Cortizo M, Celestino C, Hernández I, Toribio M, Ordás RJ (2004) Genetic transformation of selected mature cork oak (*Quercus suber* L.) trees. *Plant Cell Report*. 23:218-223
- Álvarez R, Álvarez JM, Humara JM, Revilla A, Ordás RJ (2009) Genetic transformation of cork oak (*Quercus suber* L.) for herbicide resistance. *Biotechnol Lett* 31:1477-1483
- Álvarez R, Ordás RJ (2007) Improved genetic transformation protocol for cork oak (*Quercus suber* L.). *Plant Cell Tissue Organ Culture* 91:45-52
- 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* 28:657-667
- Corredoira E, Valladares S, Allona I, Aragoncillo C, Vieitez AM, Ballester A (2012) Genetic transformation of European chestnut somatic embryos with a native thaumatin-like protein (*CsTL1*) gene isolated from *Castanea sativa* seeds. *Tree Physiol* 32(11): 1389-1402
- European and Mediterranean Plant Protection Organization: Diagnostic protocols for regulated pests. *Bulletin EPP/EPPO* 2004, 34:201-207
- Fagoaga C, Rodrigo I, Conejero V, Hinarejos C, Tuset JJ, Arnau J, Pina JA, Navarro L, Peña L (2001) Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. *Molecular Breeding* 7:175-185
- García-Casado G, Collada C, Allona I, Soto A, Casado R, Rodríguez-Cerezo E, Gómez L, Aragoncillo C (2000) Characterization of an apoplastic basic thaumatin-like protein from recalcitrant chestnut seeds. *Physiol Plant* 110(2):172-180
- Gresshoff PM, Doy CH (1972) Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum*. *Planta* 107:161-170
- Hardham AR (2005). *Phytophthora cinnamomi* pathogen profile. *Mol Plant Pathol* 6(6): 589-604
- Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS, Hoekema A (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res* 2:208-218
- Lorito M, Woo LS, García-Fernandez I, Colucci G, Harman GE, Pintor-Toro JA, Filippone E, Muccifora S, Lawrence CB, Zoina A, Tuzun S, Scala F (1998) Genes from mycoparasitic fungi as source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(14):7860-7865
- Mackintosh CA, Lewis J, Radmer LE, Shin S, Heinen SJ, Smith LA, Wyckoff MN, Dill-Mackey R, Evans CK, Kravchenko S, Baldrige GD, Zeyen RJ, Muehlbauer GJ (2007) Overexpression of defense response genes in transgenic wheat enhances resistance to *Fusarium* head blight. *Plant Cell Rep* 26(4):479-488
- Mallón R, Valladares S, Corredoira E, Vieitez AM, Vidal N (2014) Overexpression of the chestnut *CsTL1* gene coding for a thaumatin-like protein in somatic embryos of *Quercus robur*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 116:141-151





- Mallón R, Vieitez AM, Vidal N (2013) High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation in *Quercus robur*: Selection by use of a temporary immersion system and assessment by quantitative PCR. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 114: 171-185
- Muñoz López MC, Cobos Suárez P, Martínez Saavedra G (1992) La traqueomicosis de *Diplodia sp.* Sobre *Quercus sp.* *Bol. San. Veg. Plagas*, 18: 641-657
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15(3):473-497
- Robin C, Capron G, Desprez-Loustau ML (2001) Root infection by *Phytophthora cinnamomi* in seedlings of three oak species. *Plant Pathol* 50: 708-716
- Robin C, Desprez-Loustau ML, Delatour C (1992) Spatial and temporal enlargement of cankers of *Phytophthora cinnamomi* in red oak. *Can J Forest Res* 22(3): 362-366
- Ruiz-Gómez FJ, Sánchez-Cuesta R, Navarro-Cerrillo RM, Pérez-de-Luque A (2012) A method to quantify infection and colonization of holm oak (*Quercus ilex*) roots by *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Methods* 8(1):39
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sánchez ME, Caetano P, Ferraz J, Trapero A (2002) *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in south-western Spain. *For Pathol* 32:5-18
- Schenk RU, Hildebrand AC (1972) Medium and techniques for induction of growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell culture. *Can J Bot* 50(1):199-204
- Toribio M, Celestino C, Molinas M (2005) Cork oak, *Quercus suber* L. In: Jain SM, Gupta PK (eds) *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Springer, Springer, The Netherlands 77(35):445-457
- Van Loon LC (1997) Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *Eur. J. Plant Pathol.* 103:753-765
- Vannini A, Valentini R, Luisi N (1996) Impact of drought and *Hypoxylon mediterraneum* on oak decline in the Mediterranean region. *Ann SciFor* 53(2-3): 753-760
- Veluthakkal R, Dasgupta MG (2010) Pathogenesis-related genes and proteins in forest tree species. *Trees* 24:993-1006
- Vidal N, Mallón R, Valladares S, Meijomín AM, Vieitez AM (2010) Regeneration of transgenic plants by *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos of juvenile and mature *Quercus robur*. *Plant Cell Rep* 29:1411-1422
- Wu H, Acanda Y, Shankar A, Peebles M, Hubbard C, Orbovic V, Zale J (2015) Genetic transformation of commercially important mature *Citrus* scions. *Crop Sci* 55(6):2796-2797
- Xu R, Li QQ (2008) Protocol: streamline cloning of genes into binary vectors in *Agrobacterium* via the Gateway@TOPO vector system. *Plant Methods* 4:4
- Zanek MC, Reyes CA, Cervera M, Peña EJ, Velázquez K, Costa N, Plata MI, Grau O, Peña L, García ML (2008). Genetic transformation of sweet orange with the coat protein gene of *Citrus psorosis virus* and evaluation of resistance against the virus. *Plant Cell Rep* 27(1):57-66





## Regeneration of transgenic plants by *Agrobacterium*-mediated transformation of *Quercus ilex* L. somatic embryos with the gene *CsTL1*

V. Cano<sup>1</sup> · M. T. Martínez<sup>1</sup> · M. C. San José<sup>1</sup> · J. L. Coucelo<sup>2,3</sup> · E. Varas<sup>3</sup> ·  
L. Bouza-Morcillo<sup>1</sup> · M. Toribio<sup>4</sup> · E. Corredoira<sup>1</sup>

Received: 28 February 2019 / Accepted: 14 January 2020  
© Springer Nature B.V. 2020

### Abstract

Here we describe for the first time a protocol for the genetic transformation of the holm oak *Quercus ilex*. Holm oak populations are seriously affected by a disorder known as oak decline syndrome. However, tolerant plants can be obtained by overexpression of pathogenesis-related (PR) proteins. The aim of the present study was to define a protocol for transforming somatic embryos (SEs) of holm oak with the gene *CsTL1* encoding a chestnut thaumatin-like protein (PR protein). Lethal concentrations of kanamycin (kan) were determined in previous studies, in which SE formation was found to be inhibited by kan concentrations of 100 mg/L and above. Genetic transformation was only achieved when target explants were pre-cultured for one or 2 weeks, with a transformation efficiency of 2%. Transformation was also affected by genotype and was only successful in 2 of the 3 embryogenic lines evaluated. A total of 11 transformed lines (10 corresponding to line Q8 and 1 to line Q10–16) were obtained, all of which were maintained by secondary embryogenesis on proliferation medium (Schenk and Hildebrandt medium lacking plant growth regulators). The transgenic embryogenic lines were successfully cryopreserved by a vitrification-based procedure, thus enabling the lines to be preserved while tolerance tests were performed. The presence of *CsTL1* in genomic DNA was confirmed by PCR, and expression of the gene was determined by qPCR. *CsTL1* expression was up to 5.93 times higher in transgenic lines than in the corresponding untransformed line. Transgenic plants were produced from transformed SEs, with embryo conversion rates ranging from 2.8 to 66.7%.

**Keywords** Holm oak · Cryopreservation · GFP · Genetic transformation · Oak decline · Pathogenesis related proteins · Somatic embryogenesis · Thaumatin-like protein

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11056-020-09771-9>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ E. Corredoira  
elenac@iiag.csic.es

Extended author information available on the last page of the article

Published online: 20 January 2020

Springer

## Introduction

*Quercus ilex* L. (holm oak) is one of the main constituents of the Spanish agrosylvopastoral systems known as “dehesas”, reported to the most widespread type of agroforestry system in Europe and covering a total area of 3.1 million hectares (Moreno and Pulido 2009). Holm oak acorns provide a rich source of nutrients for foraging animals, especially Iberian pigs (the meat of which is the basis of a high-quality food industry), as well as sheep, cattle, horses and fighting bulls (Cañellas et al. 2007). In addition, the ectomycorrhizal fungus *Tuber melanosporum* develops a symbiotic relationship with holm oak roots, producing the black truffle, one of the most expensive edible mushrooms in the world due to its use in international *haute cuisine* (Reyna-Domenech and García-Barreda 2009). This production system is at risk due to the high rate of mortality of the trees across the southwest of Iberian Peninsula, caused by oak decline syndrome, denominated “La seca” (in Spanish) and “A secca” (in Portuguese). Several research groups indicate that the oomycete *Phytophthora cinnamomi* Rands may be the main cause of the disease (Corcobado et al. 2013). *P. cinnamomi* invades the root system via the spread of primary hyphae from the cortex to parenchymal tissues through apoplast and symplast pathways (Ruiz-Gómez et al. 2012).

Plants, included trees, have an array of structural barriers and pre-formed antimicrobial metabolites to prevent or attenuate invasion by potential attackers and to defend themselves against all pathogens. These defence systems mainly include cell wall fortification through the synthesis of callose and lignin, the production of antimicrobial secondary metabolites (such as phytoalexins) and the accumulation of pathogenesis-related (PR) proteins (Dumas et al. 2008; Kovalchuk et al. 2013; Ali et al. 2018). Recognition of pathogen-specific effectors through the effector-triggered immunity system is particularly effective, as it is followed by production of reactive oxygen species and culminates in programmed hypersensitive cell death at the site of pathogen invasion, thus isolating the pathogen from the rest of the plant and preventing further damage (Pieterse et al. 2009). In addition, a systemic acquired response (SAR) is induced in different parts of the plant in order to protect live tissues (Vlot et al. 2008). SAR response is characterized by accumulation of the salicylic acid and activation of PR genes (Fu and Dong 2013). PR proteins constitute a diverse group of proteins which not only accumulate during SAR response but also were triggered by abiotic stress, pathogen attack, and hypersensitive response (Van Loon et al. 2006). They play a major role in natural defence against pests and pathogens, and they form an intersection point for various response networks by reacting with different inducers such as phytohormones, salicylic acid, and jasmonic acid. The currently recognized PR proteins comprise 17 families of induced proteins (Veluthakkal and Dasgupta 2010); however, for the purpose of the present study, we focused on the PR-5 families. The PR-5 family of proteins includes permatins, osmotins, zeamatins and thaumatin-like proteins (TLPs). TLPs are the proteins of a large, highly complex gene family involved in host defense and a broad range of developmental routes in animals, fungi and plants (Liu et al. 2010). It seems that high concentrations of TLPs can form transmembrane pores on fungal plasma membranes, causing osmotic rupture, inhibition of spore germination and inhibition of hyphal extension (Velazhahan et al. 1999). A major 23-kDa TLP, termed *CsTLL1*, purified from mature *Castanea sativa* cotyledons, has been shown to possess in vitro antifungal activity against *Trichoderma viride* and *Fusarium oxysporum*. It also interacts synergistically with endochitinase and endoglucanase and forms a complex seed defensive system against microbial growth in *Castanea* (García-Casado et al. 2000).

No effective treatments have yet been developed to control oak decline. Moreover, conventional breeding programs including backcross steps have not been carried out to produce disease-resistant plants (Martínez et al. 2019). Such programs will probably not be carried out with holm oak, as the completion of improvement cycles is very time-consuming. Genetic transformation may represent a practical alternative, as they can be carried out relatively quickly once in vitro plant regeneration procedures are available and genes related to plant defence are identified. Genomic research on oaks has increased greatly in recent years (<http://www.hardwoodgenomics.com>). The information obtained in this research could be of great interest in identifying holm oak trees that are resistant or tolerant to disease. Furthermore, although the genes involved in the resistance of oak plants to pathogens attacks are not yet known, isolation of PR proteins from chestnut seeds may lead to the production of transgenic holm oak plants with genes encoding these proteins.

Despite the potential usefulness of genetic transformation, no research on holm oak genetic transformation is available in the international databases. By contrast, genetic transformation using marker genes has been reported in other species in the family *Fagaceae*, such as cork oak (Álvarez et al. 2004), pedunculate oak (Vidal et al. 2010) and chestnut (Corredoira et al. 2004, 2007; Andrade et al. 2009). In addition, somatic embryos of American chestnut (Kong et al. 2014; Newhouse et al. 2014), European chestnut (Corredoira et al. 2012, 2016) and pedunculate oak (Mallón et al. 2014) have been transformed using antifungal candidate genes.

The objective of the present study was to define a protocol for transforming holm oak embryogenic lines with the thaumatin-like protein *CsTLI* gene to increase tolerance or resistance to the pathogen causing oak decline.

## Materials and methods

### Plant material and culture conditions

Embryogenic cultures initiated from teguments (Lines Q8 and E2; Barra-Jiménez et al. 2014) or from leaf explants (Line Q10–16; Martínez et al. 2017a) were used in the transformation experiments. Embryogenic lines have been maintained by secondary embryogenesis with subculture at 6-week intervals onto proliferation medium consisting of Schenk and Hildebrandt macro- and micronutrients (SH 1972), Murashige and Skoog vitamins (MS 1962), 3% sucrose (w/v) and 0.6% Vitro-agar (w/v) (Pronadisa, Spain). The medium was sterilized by autoclaving at 121 °C for 20 min, after the pH was adjusted to 5.6. Cultures were subjected to a 16-h photoperiod (provided by cool-white fluorescent lamps at a photon flux density of 50–60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and 25 °C light/20 °C darkness (standard conditions).

### Determination of tolerance to antibiotics

The tolerance of somatic embryos (SEs) to kanamycin (kan) was tested in a preliminary experiment. Two or three nodular embryogenic structures (NES) isolated from Q8 line were cultured on proliferation medium augmented with different concentrations of kan (0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, and 175 mg/L). The effects of the antibiotics carbenicillin (300 mg/L) and cefotaxime (300 mg/L) on the somatic embryo proliferation were also assessed. All antibiotics were added to autoclaved proliferation medium by filtration. For

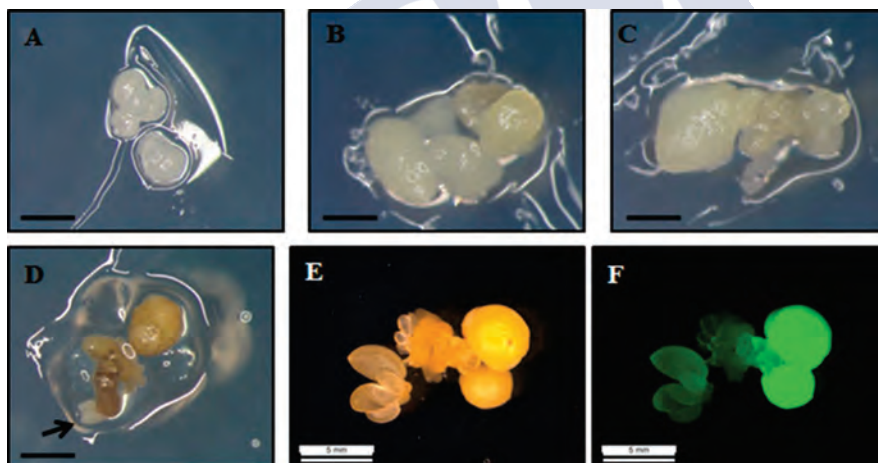
each concentration of antibiotic, four Petri dishes with eight NES per dish were used, and the experiment was repeated twice. After 8 weeks of culture under standard conditions, data were recorded by evaluating the percentage of explants forming secondary somatic embryos and the number of somatic embryos per explant.

### ***Agrobacterium* strain, binary plasmid and preparation of bacteria culture**

In the present study, we used the *CsTL1* gene, which encodes the thaumatin-like protein and which was first identified by García-Casado et al. (2000) in mature European chestnut cotyledons. Briefly, the *CsTL1* gene was cloned into pK7WG2D vector (Karimi et al. 2002) under CaMV35S promoter and terminator. This vector also carries the green fluorescence protein (*EGFP*) scorable marker gene driven by the rol root loci D (rolD) promoter and the neomycin phosphotransferase (*NPTII*) selectable marker gene driven by the nopaline synthase (nos) promoter and terminator (Supplementary information 1). The vector resulting from cloning the *CsTL1* gene was denominated pK7TAU (Supplementary information 1). Disarmed *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 (Hood et al. 1993) was transformed with pK7TAU by applying the freeze/thaw method (Xu and Li 2008). Cultures of EHA105pK7TAU to use in the transformation experiments were done according Corredoira et al. (2015).

### **Transformation procedures**

For the transformation experiments, explants consisting of 2–3 NES were isolated from embryogenic cultures of line Q8, 6 weeks after the last subculture. Target explants were pre-cultured on proliferation medium for 1 day, 1 week and 2 weeks (Fig. 1a–c).



**Fig. 1** Genetic transformation of somatic embryos of holm oak mediated by *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105pK7TAU. **a–c** Morphological aspect of target explants after pre-culture for 1 day (**a**), 1 week (**b**) and 2 weeks (**c**) on proliferation medium. Bar: 1 mm. **d** Kanamycin resistant somatic embryos (arrow) after culture for 10 weeks on selective medium. Bar: 1 mm. **e** Transformed somatic embryos observed under white light. Bar: 5 mm. **f** The same somatic embryos as in **e** showing green fluorescence under UV light. Bar: 5 mm

Pre-cultured explants were immersed in 20 mL of infection medium for 30 min, before being filtered and finally transferred to proliferation medium and co-cultivated for 5 days at 25 °C in darkness. After the co-cultivation period, *Agrobacterium* was removed by washing the explants in autoclaved water containing 300 mg/L carbenicillin, for 30 min with gentle shaking. The explants were recovered by filtration and transferred to Petri dishes containing proliferation medium supplemented with 300 mg/L carbenicillin and 75 mg/L kan. Explants were cultured under standard conditions in this medium for 2 weeks and were subsequently transferred every 2 weeks to selective medium consisting of proliferation medium with 300 mg/L carbenicillin and 100 mg/L kan. After 10 weeks, kanamycin-resistant embryos were isolated (Fig. 1d) and transferred to fresh selective medium for a further 4 weeks. At the end of this period (14 weeks in total), putative transformants (identified by clear new growth on selective medium) were evaluated using GFP-specific fluorescence (GFP+). In this experiment, 120 explants (12 Petri dishes with 10 explants per dish) were used per pre-culture time evaluated, yielding a total of 360 explants.

To evaluate the effect of genotype, 2–3 NES of the embryogenic lines Q8, Q10–16 and E2 were pre-cultured for 1 week on proliferation medium, infected with EHA105pK7TAU, co-cultured for 5 days on proliferation medium, and transferred to selective medium for 10 weeks, as described above. In these experiments, 60 explants (6 Petri dishes with 10 explants per dish) were used per embryogenic line, yielding a total of 180 explants.

In addition, in each transformation experiment, twenty uninfected control NES (10 explants per Petri dish) were cultured on proliferation medium (positive control) and on selective medium (negative control).

### **Analysis of putative transformants**

#### **Evaluation of transformation efficiency by GFP visualization**

After culture of the somatic embryos for 14 weeks on selective medium, GFP-specific fluorescence of kan-resistant somatic embryos was visualized in a Leica M205FA epifluorescence stereomicroscope (Leica, Germany). Images were taken with a Leica DSC7000T camera (Leica, Germany). The transformation efficiency was calculated as the percentage of initial explants that showed GFP fluorescence (GFP+).

From each GFP+ explant, one somatic embryo at cotyledonary-stage was isolated and subcultured on selective medium to produce the different transformed embryogenic lines. The transgenic lines were maintained by subculture of NES with sequential subculture at 5–6-week periods on selective medium.

### **Molecular analysis of transgenic embryogenic lines**

#### **PCR analysis**

Genomic DNA was obtained from somatic embryos at early cotyledonary stage, isolated from untransformed (wild type, wt) and putative transgenic embryogenic lines by using the Realpure Spin Plants and Fungi Kit (Durviz, Spain) according to the manufacturer's instructions. Reactions were carried out in a total volume of 25 µL containing 200 µM dNTPs, 0.5 µM each primer, 0.5–1 U Taq DNA polymerase (Qiagen, Germany), 1 × supplied Taq buffer, and 150–250 ng of genomic DNA. PCR reactions were performed

using gene-specific primers (Supplementary information 2) in a MJ Mini™ thermal cycler (Bio-Rad, USA).

The amplified PCR products were observed and photographed using the UVP gel documentation system (Bio-Rad, USA), after electrophoresis on a 1.5% (w/v) agarose gel. The presence of transgenes was confirmed by detection of a single band of the expected size (Supplementary information 2).

### Real-time PCR quantification of *CsTL1* overexpression

Total RNA was obtained from early cotyledonary somatic embryos of 6 putatively transgenic lines as well as of the untransformed embryogenic lines Q8 and Q10–16 by using Qiagen RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany), following the manufacturer's instructions. Genomic DNA contamination was eliminated using the RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hamburg, Germany), and the quality of the RNA was checked in a NanoDrop 3300 fluorometer (ThermoFisher, USA). cDNA was obtained from 1 µg total RNA by using the Quanta cDNA synthesis kit (Quanta Biosciences, USA). Quantitative real-time PCR (qPCR) was carried out in an optical 48-well plate with an Eco Real-Time PCR System (Illumina, USA). Four independent biological replicate samples were evaluated per line. The samples were processed in triplicate in a final reaction volume of 15 µL. These reactions contained 1 × SYBR Green Master Mix (ThermoFisher, USA), 400 mM of each primer and 1 µL of cDNA template. The *CsTL1* primers used in the qPCR analysis were designed with Primer 3 software (Supplementary information 2).

The expression values were normalized to those of three reference genes: polymerase elongation factor (EF) (Soler et al. 2008), actin (ACT) and tubulin (TUB) (Porth et al. 2005) (Supplementary information 2). These reference genes were previously chosen (using geNorm software) for their stability during somatic embryo histodifferentiation (Vandesompele et al. 2002). Relative expression data for *CsTL1* were expressed as fold-changes determined using the comparative Ct method (Livak and Schmittgen 2008). All normalizations and calculations were performed applying EcoStudy™ v5.0.4890 software (Illumina, USA).

### Establishment of transgenic plants

Cotyledonary-stage somatic embryos ( $\geq 5$  mm) isolated from transformed lines and untransformed lines (Q8 and Q10–16) were transferred to empty Petri dishes and stored at 4 °C in dim light conditions for 2 months. The somatic embryos were then transferred to 500 mL-jars containing 70 mL of GD medium (Gresshoff and Doy 1972) supplemented with 3% sucrose (w/v), 0.6% Vitro-agar (w/v) (Pronadisa, Spain), 0.1 mg/L 6-benzyladenine (BA) and 20 µM silver thiosulphate (Martínez et al. 2017a).

The embryos were cultured for 8 weeks under standard conditions. The percentages of embryos with only roots ( $\geq 5$  mm) or only shoots ( $\geq 5$  mm) and the percentage of somatic embryos that converted into plantlets (i.e. with simultaneous shoot and root development  $\geq 5$  mm) were then estimated. For each transgenic and wt line, six replicate jars with six somatic embryos (36 embryos per line), were evaluated.

## Cryopreservation of transgenic lines

Cryopreservation experiments were performed using the vitrification-based procedure described by Martínez et al. (2019). Briefly, explants for cryopreservation consisted of individual NES (1–2) that were isolated from transgenic lines derived Q8 and Q10–16. The NES were incubated on proliferation medium supplemented with 0.3 M sucrose for 3 days and were then placed in cryovials (10 NES per vial) with 1.8 ml of PVS2 solution (Sakai et al. 1990) for 15 min at 25 °C. Half of the samples (cooled explants) were then immediately immersed in liquid nitrogen (LN). The other half of the samples (uncooled explants) were processed without cold storage. After 1 month in LN, the cooled explants were warmed in a 40 °C water bath for 2 min. Uncooled and cooled NES were cultured in proliferation medium for 5 weeks. A total of 30 NES were used for each transformed line and treatment (cooled and un-cooled samples). Survival and embryo recovery rates were evaluated after culture for 8 weeks. The presence of genes in transformed and cryopreserved somatic embryos was confirmed by PCR analysis.

## Statistical analysis

Any significant differences between pre-culture time and genotype were determined by Chi squared test (Figs. 3 and 4). Statistically significant differences between transgenic lines and their wild-type counterparts in *CsTL1* overexpression (as determined by qPCR; Fig. 6) were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA I). All statistical analyses were conducted using SPSS 21.0 statistical package for Windows (Chicago, USA).

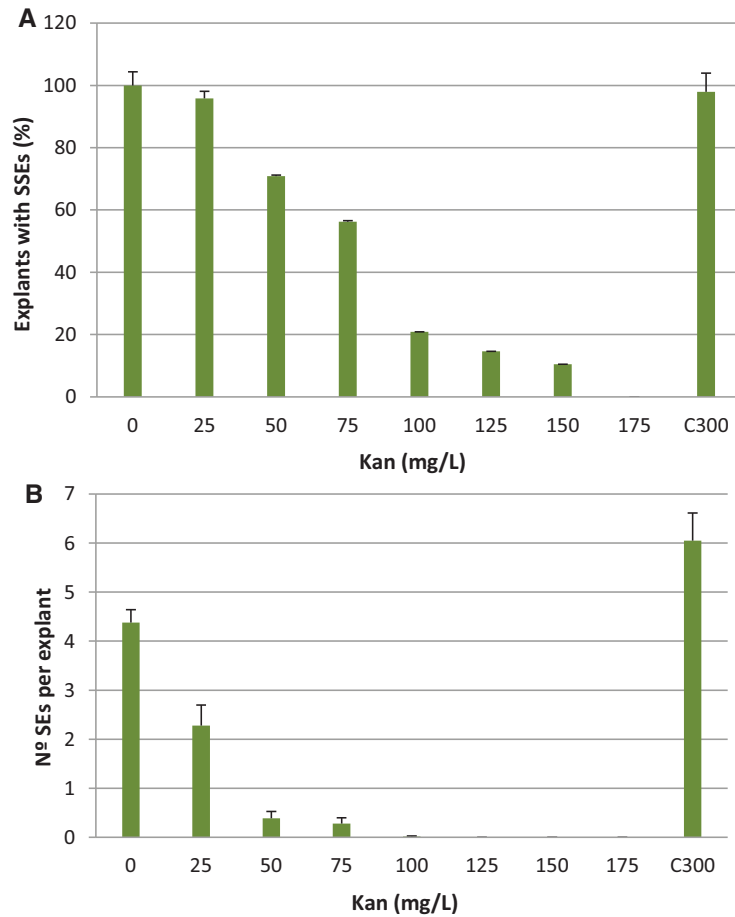
## Results

### Effect of antibiotics on somatic embryo proliferation

The percentage of explants with secondary somatic embryos was gradually reduced by increasing the concentration of kan (Fig. 2a). At toxic concentrations of kan, the embryo explants gradually turned brown or remained white and did not proliferate further. On the other hand, the number of SEs was strongly affected by the presence of kan, and formation of SEs was completely inhibited at concentrations of 100 mg/L or above (Fig. 2b). This concentration was therefore used to select putative transgenic events. Carbenicillin (300 mg/L), used to prevent overgrowth of *Agrobacterium*, had an apparently beneficial effect on the proliferation of holm oak somatic embryos and its presence on proliferation medium increased the number of SEs relative to the control without carbenicillin (Fig. 2a, b). By contrast, as cefotaxime has a deleterious effect on the proliferation of somatic embryos, its use as bactericidal agent on holm oak transformation was ruled out (data not shown).

### Genetic transformation

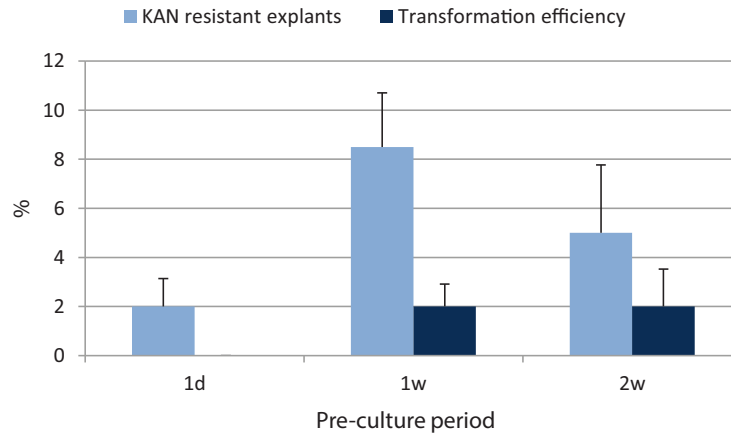
As transformations using kan 100 mg/L and 1 day of pre-culture were unsuccessful in the preliminary experiments, the selective pressure of kan during explant culture was reduced



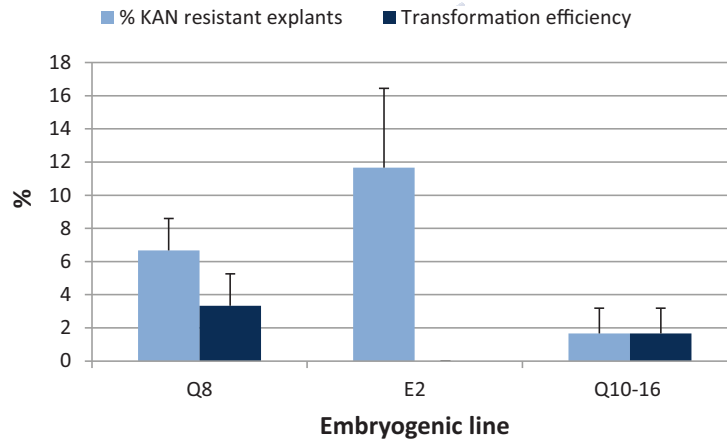
**Fig. 2** Effect of different kanamycin concentrations and carbenicillin (C300 mg/L) on the percentage of explants with secondary somatic embryos (a) and on the number of somatic embryos per explant (b). Data recorded after culture of explants for 8 weeks. SEs: somatic embryos; SSEs: secondary somatic embryos. Bar: standard error

to 75 mg/L the first 2 weeks of culture, and the effect of different pre-culture times of explants was also evaluated. After 10 weeks, the percentage of kan-resistant explants was significantly ( $p \leq 0.05$ ) influenced by the duration of the pre-culture step (Fig. 3). The highest percentages of kan-resistant explants were obtained with 1 week of pre-culture (8.5%; Fig. 3), although with no significant differences for 2 weeks of pre-culture (5%). All negative control explants (un-transformed cultures) turned brown and died during culture on selection medium, and neither calli- nor somatic embryos were obtained.

Kan-resistant explants (Fig. 1d) were isolated from the initial explants and subcultured on selective medium to continue embryogenic growth. After subculture for 4 weeks, the transformation efficiency (calculated as the percentage of initial explants that showed GFP+ embryogenic cultures) was recorded (Fig. 3). GFP+ explants (Fig. 1e–f) were only observed after one and 2 weeks of pre-culture, and the



**Fig. 3** Effect of length of the pre-culture step on the percentage of kan-resistant explants and on the transformation efficiency of the embryogenic line Q8 transformed with *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105pK7TAU. Bar: standard error



**Fig. 4** Effect of genotype on the percentage of kan-resistant explants and on the transformation efficiency of the three embryogenic lines of holm oak. Target explants isolated from three different embryogenic lines were pre-cultured for 1 week and co-cultured for 5 days with *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105pK7TAU. Bar: standard error

transformation efficiency was 2% in both cases (Fig. 3). Although both pre-culture times yielded the same transformation efficiency, the duration of the protocol was reduced by pre-culturing the explants for 1 week only. A 1-week long pre-culture step was used to evaluate the effect of genotype on the holm oak transformation. NES isolated from three different embryogenic lines were pre-cultured for 1 week and co-cultured for 5 days with EHA105pK7TAU. Transformation ability was affected by the genotype (Fig. 4). After 10 weeks of culture in selective medium, kan-resistant explants were observed in the three embryogenic lines evaluated and the best percentages were obtained on

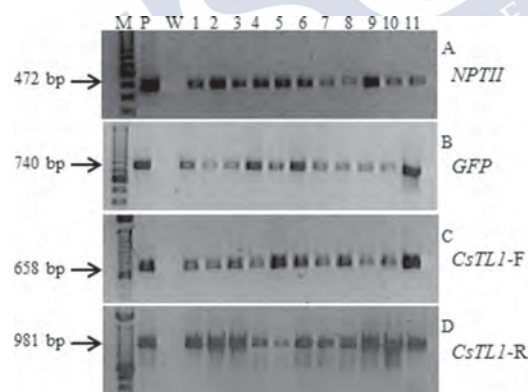
embryogenic line E2 (Fig. 4). However, after 4 weeks in selection medium all isolated explants in embryogenic line E2 turned dark-coloured and necrotic, with no signs of new growth. GFP+ explants were only recorded in lines Q8 and Q10–16. The highest transformation efficiency was achieved with line Q8, although the difference was not significant (Fig. 4).

One cotyledonary embryo was isolated from each GFP+ explant and independently proliferated by repetitive embryogenesis on selective medium to establish the different transgenic lines. Embryo multiplication was successful in all of the transgenic lines established. A total of 11 GFP+ transgenic lines were obtained. Ten of these transgenic lines were derived from line Q8 and one was derived from line Q10–16.

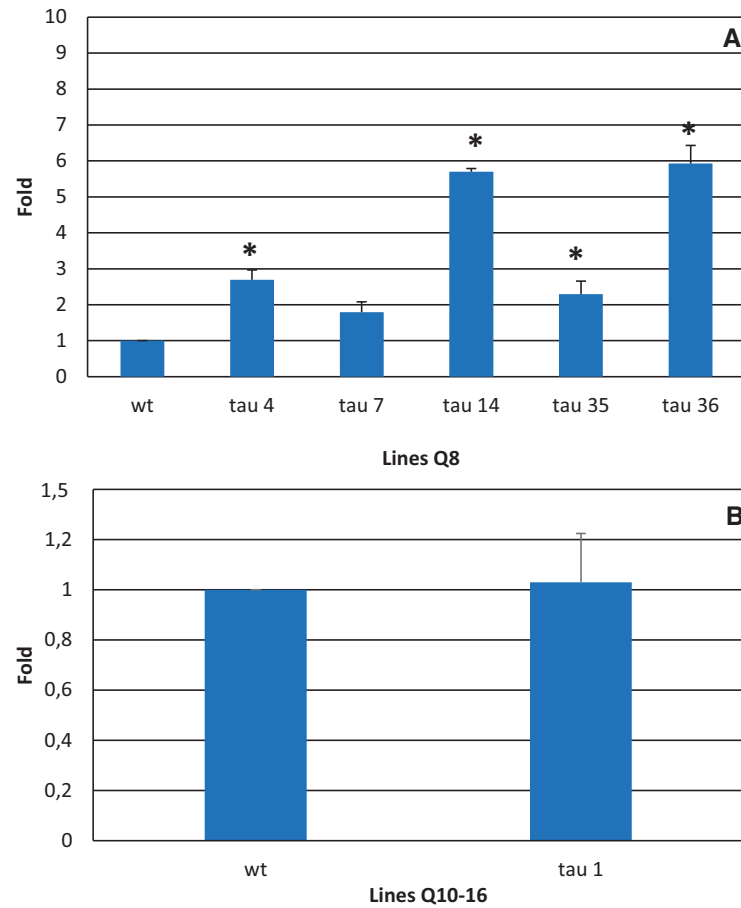
### Molecular analysis of transgenic lines

To confirm gene presence and expression of transgenes, holm oak transgenic lines were analyzed by PCR and qPCR (Figs. 5 and 6). The presence of the three transgenes (*NPTII*, *EGFP* and *CsTLI*) was confirmed by PCR analysis in all transgenic lines evaluated and in the plasmid (positive control), but not in untransformed somatic embryos (Fig. 5a–d). A single band of the expected size was obtained in every embryogenic transgenic line analyzed. The presence of the *CsTLI* gene was confirmed in both transcriptional senses (Fig. 5c, d; Supplementary information 1 and 2).

qPCR analysis of the total RNA from 6 PCR-positive transgenic lines (Q8-tau 4, Q8-tau 7, Q8-tau 14, Q8-tau 35, Q8-tau 36, and Q10–16-tau 1) and the untransformed counterparts (Q8-wt and Q10–16-wt) was carried out to verify *CsTLI* transgene expression. The *CsTLI* transcripts were detected in all the transgenic lines tested, but expression levels were variable (Fig. 6a, b). *CsTLI* expression was significantly lower ( $p \leq 0.05$ ) in line Q8-tau 7 (1.7-fold), with similar expression to Q8-wt (Fig. 6a).



**Fig. 5** PCR-based detection of the presence of transgenes in putative transgenic lines of holm oak. **a** *NPTII* product of 472-bp obtained by PCR using specific primers. **b** *EGFP* product of 740-bp obtained by PCR using specific primers. **c, d** *CsTLI* products of 658-bp (C) and 981-bp (D) obtained by PCR using specific primers *CsTLI-F* and *CsTLI-R*, respectively. M: DNA size marker; W: DNA from non-transgenic somatic embryos (negative control); P: DNA from plasmid pK7TAU (positive control); Lanes 1–11: DNA from embryogenic transgenic lines



**Fig. 6** qPCR analysis of *CsTLL* gene overexpression in holm oak transgenic lines. Total RNA was extracted from 6 independent transgenic lines and their counterpart non-transgenic lines (wt). **a** Transcript levels of *CsTLL* on transgenic lines derived from Q8 embryogenic line. **b** Transcript levels of *CsTLL* on transgenic lines derived from Q10–16 embryogenic line. Values represent means  $\pm$  standard error of at least three independent experiments and are normalized to the wt value (set at 1). Transcript levels of *CsTLL* were normalized to *ACT*, *EF* and *TUB* transcript levels. \*Indicates values which are significantly different from the wt value (ANOVA,  $p \leq 0.05$ )

Likewise, Q10–16-tau1 showed a similar level of expression (1.2-fold) to line Q10–16 (Fig. 6b). By contrast, *CsTLL* expression was significantly higher ( $p \leq 0.05$ ) in other transgenic lines analyzed (Q8-tau 14 and Q8-tau 36 lines: 5.7- and 5.9-fold, and Q8-tau 35 and Q8-tau 4: 2.2- and 2.6-fold).

### Plant regeneration

Cotyledonary-stage somatic embryos of transgenic lines and the corresponding untransformed lines Q8-wt and Q10–16-wt were held in cold storage at 4 °C for 2 months before

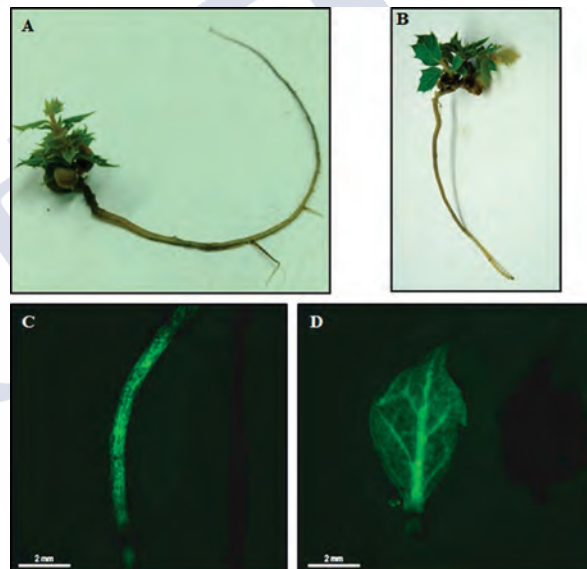
**Table 1** Conversion performance with root only development, shoot only development and conversion into plantlets (root and shoot development) of different holm oak transformed and untransformed lines after 8 weeks on germination medium

	Root only	Shoot only	Conversion (shoot+root)			
	(%)	(%)	(%)	RL (mm)	SL (mm)	NL
<i>Lines Q8</i>						
Q8-wt	25.0±10.3	0.0±0.0	75.0±10.3	94.1±10.6	17.8±2.0	9.7±0.8
Q8-tau 4	0.0±0.0	25.0±8.6	2.9±2.6	10.0±0.0	6.0±0.0	5.0±0.0
Q8-tau 7	13.9±8.3	11.1±7.6	25.0±17.1	59.8±5.8	20.2±0.6	11.7±1.9
Q8-tau 14	13.9±12.7	19.4±8.3	27.8±5.1	98.9±26.9	11.8±1.5	7.8±0.9
Q8-tau 26	11.1±7.6	11.1±3.2	11.1±7.6	65.0±6.1	8.8±1.1	8.3±1.8
Q8-tau 35	5.6±5.1	11.1±6.4	25.0±5.2	68.9±19.4	13.3±2.3	12.2±1.9
Q8-tau 36	16.7±9.7	5.6±5.1	2.8±2.6	130.0±0.0	15.0±0.0	25.0±0.0
Q8-tau 38	16.7±7.9	2.8±2.6	66.7±7.9	131.8±16.2	12.1±1.7	8.8±0.4
<i>Lines Q10–16</i>						
Q10–16-wt	53.3±9.1	0.0±0.0	26.7±12.7	84.7±7.4	12.1±1.0	4.4±1.1
Q10–16-tau 1	43.3±3.3	3.3±2.7	16.7±4.3	40.6±9.6	6.8±0.8	4.8±0.9

Each value represents the mean ± standard error of 6 replications with 6 explants in each replicate

RL root length, SL shoot length, NL leaf number

**Fig. 7** Regeneration of plants from transgenic somatic embryos of holm oak and GFP visualization of transformants. **a, b** Transgenic plants derived from somatic embryo germination. **c** GFP expression on root of transgenic plant (left) and untransformed plant (right) visualized with blue light. Bar: 2 mm. **d** GFP expression on leaf of transgenic plant (left) and untransformed plant (right) visualized with blue light. Bar: 2 mm



being germinated. Conversion performance (conversion into plantlets and/or shoot or root only development) occurred in all transgenic lines evaluated (Table 1), although the conversion frequencies were lower than in the untransformed lines. All transgenic lines produced plantlets of good quality in terms of shoot and root lengths and number of leaves (Fig. 7a–b and Table 1), although the conversion frequencies were variable (2.8–66.7%).

GFP expression was observed in roots, leaves and shoots derived from transgenic plantlets (Fig. 7c–d). No phenotypic differences were found relative to control plants, suggesting no potential deleterious effects of the GFP gene in the cells. Fluorescence was more intense in small, young leaves than in older, larger leaves, and it was easier to detect in veins, midrib and petioles than in blades. GFP expression was not detected in roots, leaves and shoots obtained from untransformed plants used as negative control (Fig. 7c–d). Plants derived from transgenic embryogenic lines grew normally and were indistinguishable morphologically from untransformed line.

### Cryopreservation of transgenic lines

Holm oak transgenic embryogenic lines were successfully cryopreserved using a vitrification procedure, with survival and embryo recovery rates ranging from respectively 53–97% and 43–77% (Supplementary information 3A and B). Treatment with only 0.3 M sucrose and PVS2 for 15 min did not affect the survival or the recovery rates of transgenic holm oak lines (Supplementary information 3A and B). The presence of the three transgenes was confirmed by PCR analysis of DNA extracted from cryopreserved transgenic somatic embryos (Supplementary information 4A and B), confirming that the integrity of the transgene was not affected by the cryopreservation procedure.

### Discussion

A reliable protocol for the *Agrobacterium*-mediated production of transgenic holm oak somatic embryos is described for the first time. Biotechnological tools such as genetic transformation and somatic embryogenesis should be incorporated in holm oak breeding programs to produce individual trees with tolerance/resistance to oak decline. Overexpression of genes encoding PR proteins, such as thaumatin-like proteins, glucanases or chitinases has commonly been used to improve the antifungal defence of plants (Ceasar and Ignacimuthu 2012; Ali et al. 2018). Nowadays, the number of species that have been transformed with PR-proteins to improve their fungal/oomycete resistance has increased considerably. For example, genes that encode TLPs have been tested in bentgrass (Fu et al. 2005), wheat (Mackintosh et al. 2007), grape (Dhekney et al. 2011) and rice (Naseri et al. 2012). Orange plants transformed with a 23-kDa PR-5 protein isolated in tomato survived longer than the control when it was infected with *Phytophthora citrophthora* (Fagoaga et al. 2001). In European chestnut, a total of 126 independent transformed lines that overexpressed the *CsTLL1* gene were obtained (Corredoira et al. 2012). The regenerated plantlets are currently under evaluation for their resistance to *P. cinnamomi*, and the preliminary results are quite encouraging (Corredoira and Vieitez 2014). In addition, an endochitinase has also been isolated from chestnut seeds and is used in our laboratory to transform somatic embryos of chestnut to produce plants resistant to blight disease caused by the fungus *Cryphonectria parasitica* (Corredoira et al. 2016). Somatic embryos of American chestnut have been transformed with a gene coding an antifungal enzyme oxalate oxidase (*OxO*) isolated from wheat (Polin et al. 2006; Maynard et al. 2008). Production of the enzyme in plants degrades the oxalic acid produced by fungal pathogens and produces hydrogen peroxide, which induces the plant defence response. Preliminary results of resistance tests in plants growing in the field are very promising and indicate that resistance to blight has been

obtained (Newhouse et al. 2014). All of these findings indicate that the strategy used in the present study may be a good approach to producing tolerant holm oak trees.

As no previous reports on genetic transformation of holm oak were available for comparison, the first step in the present study was to define a selection medium. Kanamycin is one of the most widely used antibiotics for selecting transgenic plant cells and it is usually applied at concentrations in the range of 30–150 mg/L (Mondal et al. 2001). In holm oak, a kan concentration of 100 mg/L was found to be sufficient to inhibit the formation of bipolar somatic embryos, and this concentration was therefore used to prevent regeneration of non-transformed cells. A similar concentration has been used in somatic embryogenic systems of other woody species such as cork oak (Álvarez et al. 2004) and grape vine (Dhekney et al. 2008). The antibiotics carbenicillin and cefotaxime are commonly used to eliminate *Agrobacterium tumefaciens* on plant transformation. In holm oak, carbenicillin has been used successfully to kill *Agrobacterium* after a co-cultivation period. Besides its effective bacteriostatic activity, this antibiotic improved holm oak embryo proliferation rates in somatic embryos cultured in proliferation medium supplemented with carbenicillin, relative to somatic embryos cultured in medium without the antibiotic. This favourable effect has also been reported for other species (Estopà et al. 2001; Corredoira et al. 2004). Cefotaxime has also been used to enhance proliferation of embryogenic cultures and shoot regeneration of many species such as olive (Rugini et al. 2016) and millet (Satish et al. 2016). However, in the present study, the addition of cefotaxime to the holm oak proliferation medium did not improve embryo multiplication. Hence, the sensitivity of embryogenic tissues to antibiotics should be evaluated in individual species.

The simple protocol already tested in European chestnut somatic embryos transformation was initially applied (Corredoira et al. 2012). In this procedure, embryos were isolated 1 day before transformation and co-cultured 5 days with the bacteria. However, these first attempts in holm oak failed because explants necrosed and did not show any signs of new growth. The selection regime and kan concentration used during the selection step have been identified as important factors in the optimization of genetic transformation in woody plants (Petri and Burgos 2005). In holm oak, reduction of the kan concentration during the first 2 weeks of culture and pre-culture of target explants for one or 2 weeks were important for the successful transformation of this species. A two-step selection procedure with an initial reduction of kanamycin to prevent the excessive antibiotic selective pressure has also been used with other woody species, including tea (Mondal et al. 2001), rubber tree (Leclercq et al. 2010) and pedunculate oak (Vidal et al. 2010). Together with the longer pre-culture time, this yields a transformation efficiency of 2%. The transformation efficiency may be related to the physiological state of the somatic embryo explants used as target material (Vieitez et al. 2012). For holm oak proliferation, NES are the most effective explants for maintaining embryogenic capacity (Martínez et al. 2017a). After pre-culture for one or 2 weeks, these explants showed histodifferentiation, and globular and heart stage somatic embryos were generated from the initial explants. These developmental stages are considered more susceptible to *Agrobacterium* infection (Corredoira et al. 2007) as they have greater numbers of actively embryogenic cells (Yeung 1995; Corredoira et al. 2006). Consequently, pre-culture of initial explants is considered a key step in the genetic transformation of holm oak.

The transformation efficiency obtained in the present study was lower than that reported in previous studies, in which chestnut or pedunculate oak somatic embryos were transformed with a TLP (Corredoira et al. 2012; Mallón et al. 2014). As similar strains and vectors were used, the differences in the transformation frequencies may be attributable to the effect of the genotype or/and the low capacity for genetic transformation of holm oak, as

this species is considered recalcitrant to in vitro culture (Martínez et al. 2017a, b). Recalcitrance to genetic transformation can be attributed to the application of inappropriate transformation procedures as well as the low embryogenic regeneration capacity of the putatively transformed cells (Cervera et al. 2008). In addition, different reports corroborate the importance of the genotype on genetic transformation of woody species (Polin et al. 2006; Kong et al. 2014; Álvarez and Ordás 2007; Corredoira et al. 2016), suggesting the need to define specific procedures for optimal somatic embryo proliferation and transformation and the use of wide range of genotypes in the transformation experiments.

The results obtained in the present report demonstrate that GFP analysis is an efficient and non-destructive method for identifying transgenic somatic embryos in holm oak. The GFP assay clearly simplified and improved the evaluation of the transformation events in real time relative to the GUS assay. The appearance of necrosed tissues or green spots may interfere in the GUS assay, and longer periods of incubation or keeping the embryos in darkness may be necessary to prevent greening (Álvarez and Ordás 2007); however, these difficulties do not occur in GFP analysis. Detection of GFP fluorescence is straightforward and non-destructive, while a high number of explants must be sacrificed for GUS assays (Wu et al. 2015). As it is necessary to obtain all putative transformed lines from a single transformation event, isolation of only transformed embryogenic masses is helpful (Escobar et al. 2000; Corredoira et al. 2015; Palomo-Rios et al. 2017). In our study, only fluorescent embryos at the cotyledonary stage were isolated for establishment of the putative transgenic lines.

The low rate of plant regeneration from somatic embryos is a common problem in somatic embryogenesis systems in hardwoods (Corredoira et al. 2018). Nevertheless, regenerated plants were obtained in all transgenic lines of holm oaks evaluated, and acceptable rates of plantlet conversion were also observed in some transgenic lines. The plantlets were also vigorous and displayed good shoot and root development. These findings are noteworthy in a recalcitrant woody species such as holm oak.

Although transformed holm oak embryogenic lines obtained from different transformation experiments can be successfully maintained by secondary embryogenesis, cryopreservation may enable storage of transgenic embryogenic lines while tolerance tests are performed (Corredoira et al. 2012). Indeed, cryopreservation procedures reduce the risk of contamination, as well as labour and supply costs (Corredoira et al. 2012, 2017). In the present study, all holm oak embryogenic lines evaluated were successfully preserved using a vitrification-based protocol, and new somatic embryos were observed in explants stored in LN for 1 month.

Molecular analyses involving PCR and qPCR demonstrated the presence and expression of *CsTLL1* gene in the holm oak genome. All holm oak transgenic lines evaluated expressed the *CsTLL1* gene and values obtained for transgenic lines varied depending on the embryogenic line considered. Similar variation in levels in *CsTLL1* gene expression have been detected in transgenic somatic embryos of European chestnut (Corredoira et al. 2012) and pedunculate oak (Mallón et al. 2014). These variable expression levels can be explained by the chromosomal location of the transgene, transgene structure and co-suppression, amongst other factors (Fu et al. 2005 and references therein).

In conclusion, the present report establishes, for the first time, a reliable protocol for the genetic transformation of holm oak and regeneration of transgenic plantlets from embryogenic lines using a chestnut thaumatin-like gene. The study findings indicate that the kan regime, pre-culture time and genotype are important factors determining successful transformation. This protocol represents a significant advance towards producing holm oak trees that are tolerant to oak decline. The availability of a transformation protocol is also an

important for breeding programs and for functional genomic studies, leading to the identification of holm oak genes involved in fungal resistance and/or tolerance.

**Acknowledgements** This research was partly supported by MINECO (Spain), through the projects AGL2013-47400-C4-3-R and AGL2016-76143-C4-4-R. V. Cano was supported by a pre-doctoral fellowship (BES-2014-070572) from the MINECO (Spain). The authors thank Dr. Isabel Allona and Dr Cipriano Aragoncillo for providing the *CsTLL1* gene. They also thank Dr. Antonio Ballester for critical reading of the manuscript and Fátima Mosteiro for technical assistance.

## References

- Ali S, Ganai BA, Kamili AN, Bhat AA, Mir ZA, Bhat JA, Tyagi A, Islam ST, 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
- Álvarez R, Ordás RJ (2007) Improved genetic transformation protocol for cork oak (*Quercus suber* L.). *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 91:45–52
- Álvarez R, Alonso P, Cortizo M, Celestino C, Hernández I, Toribio T, Ordás RJ (2004) Genetic transformation of selected mature cork oak (*Quercus suber* L.). *Plant Cell Rep* 23:218–223
- Andrade GM, Naira CJ, Le HT, Merkle SA (2009) Sexually mature transgenic American chestnut trees via embryogenic suspension-based transformation. *Plant Cell Rep* 28:1385–1397
- 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* 28:657–667
- Cañellas I, Roig S, Poblaciones MJ, Gea-Izquierdo G, Olea L (2007) An approach to acorn production in Iberian dehesas. *Agrofor Syst* 70:3–9
- Cearar SA, Ignacimuthu S (2012) Genetic engineering of crop plants for fungal resistance: role of antifungal genes. *Biotechnol Lett* 34:995–1002
- Cervera M, Navarro A, Navarro L, Peña L (2008) Production of transgenic adult plants from clementine mandarin by enhancing cell competence for transformation and regeneration. *Tree Physiol* 28:55–66
- 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*. *Agr For Meteorol* 169:92–99
- Corredoira E, Vieitez AM (2014) Biotecnología aplicada a la obtención de castaños resistentes a las enfermedades de la tinta y del chancro. *Rev Real Acad Gall Cienc* 33:101–130
- Corredoira E, Montenegro D, San José MC, Vieitez AM, Ballester A (2004) *Agrobacterium*-mediated transformation of European chestnut embryogenic cultures. *Plant Cell Rep* 23:311–318
- Corredoira E, Valladares S, Vieitez AM (2006) Morphohistological analysis of the origin and development of somatic embryos from leaves of mature *Quercus robur*. *Vitro Cell Dev Biol Plant* 42:525–533
- Corredoira E, San José MC, Vieitez AM, Ballester A (2007) Improving genetic transformation of European chestnut and cryopreservation of transgenic lines. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 91:281–288
- Corredoira E, Valladares S, Allona I, Aragoncillo C, Vieitez AM, Ballester A (2012) Genetic transformation of European chestnut somatic embryos with a native thaumatin-like protein (*CsTLL1*) gene isolated from *Castanea sativa* seeds. *Tree Physiol* 32:1389–1402
- Corredoira E, Valladares S, Vieitez AM, Ballester A (2015) Chestnut, European (*Castanea sativa*). In: Wang K (ed) *Methods in molecular biology. Agrobacterium protocols*. Springer, New York, pp 163–176
- Corredoira E, San José MC, Vieitez AM, Allona I, Cipriano A, Ballester A (2016) *Agrobacterium*-mediated transformation of European chestnut somatic embryos with a *Castanea sativa* (Mill.) endochitinase gene. *New For* 47:669–684
- Corredoira E, Martínez MT, San José MC, Ballester A (2017) Conservation of hardwood forest species. In: Ahuja MR, Jain SM (eds) *Biodiversity and conservation of woody plants. Sustainable development and biodiversity 17*. Springer, New York, pp 422–453
- Corredoira E, Merkle SA, Martínez MT, Toribio M, Canhoto JM, Correia SI, Ballester A, Vieitez AM (2018) Non-zygotic embryogenesis in hardwood species. *Crit Rev Plant Sci* 38:29–97. <https://doi.org/10.1080/07352689.2018.1551122>
- Dhekney SA, Li ZT, Dutt M, Gray DJ (2008) *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic cultures and regeneration of transgenic plants in *Vitis rotundifolia* Michx. (muscadine grape). *Plant Cell Rep* 27:865–872

- Dhekney SA, Li ZT, Gray DJ (2011) Grapevines engineered to express cisgenic *Vitis vinifera* thaumatin-like protein exhibit fungal disease resistance. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 47:458–466
- Dumas B, Bottin A, Gaulin E, Esquerré-Tugayé MT (2008) Cellulose-binding domains: cellulose associated-defensive sensing partners? *Trends Plant Sci* 13:160–164
- Escobar MA, Park JI, Polito VS, Leslie ChA, Uratsu SL, McGranahan GH, Dandekar AM (2000) Using GFP as a scorable marker in walnut somatic embryo transformation. *Ann Bot* 85:831–835
- Estopà M, Marfà V, Melé E, Messegueur J (2001) Study of different antibiotic combinations for use in the elimination of *Agrobacterium* with kanamycin selection in carnation. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 65:211–220
- Fagoaga C, Rodrigo I, Conejero V, Hinarejos C, Tuset JJ, Arnau J, Pina JA, Navarro L, Peña L (2001) Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. *Mol Breed* 7:175–185
- Fu ZQ, Dong X (2013) Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu Rev Plant Biol* 64:839–863
- Fu D, Tisserat NA, Xiao Y, Settle D, Muthukrishnan S, Liang GH (2005) Overexpression of rice TLPD34 enhances collar-spot resistance in transgenic bentgrass. *Plant Sci* 168:671–680
- García-Casado G, Collada C, Allona I, Soto A, Casado R, Rodríguez-Cerezo E, Gómez L, Aragoncillo C (2000) Characterization of an apoplastic basic thaumatin-like protein from recalcitrant chestnut seeds. *Physiol Plant* 110:172–180
- Gresshoff PM, Doy CH (1972) Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum*. *Planta* 107:161–170
- Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS, Hoekema A (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res* 2:208–218
- Karimi M, Inze D, Depicker A (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7:193–195
- Kong L, Holtz CT, Nairn CJ, Houke H, Powell WA, Baier K, Merkle SA (2014) Application of airlift bioreactors to accelerate genetic transformation in American chestnut. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 117:39–50
- Kovalchuk A, Keriö S, Oghenekaro AO, Jaber E, Raffaello T, Asiegbu FO (2013) Antimicrobial defenses and resistance in forest trees: challenges and perspectives in genomic era. *Annu Rev Phytopathol* 51:221–244
- Leclercq J, Lardet L, Martin F, Chapuset T, Oliver G, Montoro P (2010) The green fluorescent protein as an efficient selection marker for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). *Plant Cell Rep* 29:513–522
- Liu J-J, Sturrock R, Ekramoddoullh AKM (2010) The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. *Plant Cell Rep* 29:419–436
- Livak KJ, Schmittgen TD (2008) Analyzing real-time PCR data by comparative CT method. *Nat Protoc* 3:1101–1108
- Mackintosh CA, Lewis J, Radmer LE et al (2007) Overexpression of defence response genes in transgenic wheat enhances resistance to *Fusarium* head blight. *Plant Cell Rep* 26:479–488
- Mallón R, Valladares S, Corredoira E, Vieitez AM, Vidal N (2014) Overexpression of the chestnut *CsTL1* gene coding for a thaumatin-like protein in somatic embryos of *Quercus robur*. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 116:141–151
- Martínez MT, Corredoira E, Vieitez AM, Cernadas MJ, Montenegro R, Ballester A, Vieitez FJ, San José MC (2017a) Micropropagation of mature *Quercus ilex* L. trees by axillary budding. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 131:499–512
- Martínez MT, San José MC, Vieitez AM, Cernadas MJ, 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
- Martínez MT, San José MC, Arrillaga I, Cano V, Morcillo M, Cernadas MJ, 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>
- Maynard CA, Powell WA, Polin-McGuigan LD, Vieitez AM, Ballester A, Corredoira E, Merkle SA, Andrade A (2008) Chestnut. In: Kole C, Hall TC (eds) *Compendium of transgenic crop plants: transgenic forest tree species*. Blackwell Publishing, Chichester, pp 169–192
- Mondal TK, Bhattacharya A, Ahuja PS, Chand PK (2001) Transgenic tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze cv. Kangra Jat) plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos. *Plant Cell Rep* 20:712–720

- Moreno G, Pulido F (2009) The functioning, management, and persistence of dehesas. In: Rigueiro-Rodríguez A, McAdam J, Mosquera-Losada MR (eds) Agroforestry in Europe. Advances in agroforestry. Springer, Dordrecht, pp 127–160
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–479
- Naseri G, Sohani MM, Pourmassalehgo A, Allahi S (2012) In planta transformation of rice (*Oryza sativa*) using thaumatin-like protein gene for enhancing resistance to sheath blight. *Afr J Biotechnol* 11(31):7885–7893
- Newhouse AE, Polin-McGuigan L, Baier KA, Valletta KER, Rottmann WH, Tschaplinski TJ, Maynard CA, Powell WA (2014) Transgenic American chestnut show enhanced blight resistance and transmit the trait to T1 progeny. *Plant Sci* 228:88–97
- Palomo-Rios E, Cerezo S, Mercado JA, Pliego-Alfaro F (2017) *Agrobacterium*-mediated transformation of avocado (*Persea americana* Mill.) somatic embryos with fluorescent marker genes and optimization of transgenic plant recovery. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 128:447–455
- Petri C, Burgos L (2005) Transformation of fruit trees. Useful breeding tool or continued future prospect? *Trans Res* 14:15–26
- Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SCM (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* 5:308–316
- Polin LD, Liang H, Rothrock RE, Nishii M, Diehl DL, Newhouse AE, Mairn CJ, Powell WA, Maynard CA (2006) *Agrobacterium*-mediated transformation of American chestnut (*Castanea dentata* (Marsh) Borkh.) somatic embryos. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 84:69–79
- Porth I, Koch M, Berenyi M, Burg A, Burg K (2005) Identification of adaptation-specific differences in mRNA expression of sessile and pedunculate oak based on osmotic-stress-induced genes. *Tree Physiol* 25:1317–1329
- Reyna-Domenech S, García-Barreda S (2009) European black truffle: its potential role in agroforestry development in the marginal lands of Mediterranean calcareous mountains. In: Rigueiro-Rodríguez A, McAdam J, Mosquera-Losada MR (eds) Agroforestry in Europe. Advances in agroforestry. Springer, Dordrecht, pp 127–160
- Rugini E, Cristofori V, Silvestri C (2016) Genetic improvement of olive (*Olea europaea* L.) by conventional and in vitro biotechnology methods. *Biotechnol Adv* 34:687–696
- Ruiz-Gómez FJ, Sánchez-Cuesta R, Navarro-Cerrillo RM, Pérez-de-Luque A (2012) A method to quantify infection and colonization of holm oak (*Quercus ilex*) roots by *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Methods* 8(1):39
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1990) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tnaka) by vitrification. *Plant Cell Rep* 9:30–33
- Satish L, Rathinapriya P, Ceasar SA, Rency AS, Pandian S, Rameshkumar R, Subramanian A, Ramesh M (2016) Effects of cefotaxime, amino acids and carbon source on somatic embryogenesis and plant regeneration in four Indian genotypes of foxtail millet (*Setaria italica* L.). *Vitro Cell Dev Biol Plant* 52(2):140–153
- Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction of growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell culture. *Can J Bot* 50:199–204
- 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
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Ann Rev Phytopathol* 44:135–162
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: research0034.I-0034.II
- Velazhahan R, Datta SK, Muthukrishnan S (1999) The PR-5 family: Thaumatin-like proteins. In: Datta SK, Muthukrishnan S (eds) Pathogenesis-related proteins in plants. CRC Press, Boca Raton, pp 107–129
- Veluthakkal R, Dasgupta MG (2010) Pathogenesis-related genes and proteins in forest tree species. *Trees* 24:993–1006
- Vidal N, Mallón R, Valladares S, Meijomín AM, Vieitez AM (2010) Regeneration of transgenic plants by *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos of juvenile and mature *Quercus robur*. *Plant Cell Rep* 29:1411–1422
- Vieitez AM, Corredoira E, Martínez MT, San José MC, Sánchez C, Valladares S, Vidal N, Ballester A (2012) Application of biotechnological tools to *Quercus* improvement. *Eur J For Res* 131:519–539
- Vlot AC, Klessig DF, Park S-W (2008) Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Curr Opin Plant Biol* 11:436–442

- Wu H, Acanda Y, Shankar A, Peebles M, Hubbard C, Orbovic V, Zale J (2015) Genetic transformation of commercially important mature *Citrus* scions. *Crop Sci Soc Am* 55:2786–2797
- Xu R, Li QQ (2008) Protocol: Streamline cloning of genes into binary vectors in *Agrobacterium* via the Gateway®TOPO vector system. *Plant Methods* 4:4
- Yeung EC (1995) Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: Thorpe TA (ed) *In vitro embryogenesis in plants*. Kluwer Academic Publishers, Deventer, pp 205–248

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Affiliations

V. Cano<sup>1</sup> · M. T. Martínez<sup>1</sup> · M. C. San José<sup>1</sup> · J. L. Couselo<sup>2,3</sup> · E. Varas<sup>3</sup> · L. Bouza-Morcillo<sup>1</sup> · M. Toribio<sup>4</sup> · E. Corredoira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (IIAG), Avd Vigo s/n, 15705 Santiago de Compostela, Spain

<sup>2</sup> Departamento de Biología Vegetal y Ciencias del Suelo, Facultad de Biología, Universidad de Vigo, Campus Universitario Lagoas-Marcosende, 36310 Vigo, Spain

<sup>3</sup> Estación Fitopatológica do Areeiro (EFA), Subida a la Robleada s/n, 36153 Pontevedra, Spain

<sup>4</sup> Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA), Apartado 127, 28800 Alcalá de Henares, Spain





El alcornoque y la encina, dos de las especies más representativas de las dehesas, están seriamente afectadas por la enfermedad de “la seca”, causada principalmente, por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands.

Para incrementar la tolerancia frente a *P. cinnamomi*, se ha sobre-expresado el gen *CsTL1*, aislado de castaño europeo y que codifica una proteína tipo taumatina, mediante la transformación genética con *Agrobacterium tumefaciens*.

Los resultados obtenidos avalan esta estrategia para mejorar la resistencia en especies vegetales.