



2022  
Lleida

27·1  
junio · juny  
julio · juliol

Cataluña  
Catalunya

## 8º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

La **Ciencia forestal** y su contribución a  
los **Objetivos de Desarrollo Sostenible**

8CFE

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales  
**Cataluña | Catalunya · 27 junio | juny - 1 julio | juliol 2022**  
**ISBN 978-84-941695-6-4**  
© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Organiza



## Programa nacional de mejora y conservación de los recursos genéticos de la encina y el alcornoque frente a la seca

PÉREZ MARTÍN, F.<sup>1</sup>, CUENCA VALERA, B.<sup>2</sup>, OCAÑA BUENO, L.<sup>2</sup>, NAVARRO CERRILLO, R.M.<sup>3</sup>, RUIZ GÓMEZ, F.J.<sup>3</sup>, JORRÍN NOVO, J.V.<sup>4</sup>, REY, M.D.<sup>4</sup>, MARTÍN CUEVAS, M.A.<sup>5</sup>, FERNÁNDEZ MARTÍNEZ, M.<sup>6</sup>, FERNÁNDEZ GARCÍA, M.L.<sup>6</sup>, TAPIAS MARTÍN, R.<sup>6</sup>, ARRILLAGA MATEOS, I.<sup>7</sup>, RUIZ GALEA, M.M.<sup>8</sup>, HERNÁNDEZ SÁNCHEZ, I.<sup>8</sup>, CORREDOIRA CASTRO, E.<sup>9</sup>, MARTÍNEZ SANTIAGO, M.T.<sup>9</sup>, MANZANERA DE LA VEGA, J.A.<sup>10</sup>, GÓMEZ GARAY, M.A.<sup>11</sup>, PINTOS LÓPEZ, B.<sup>11</sup>, GONZÁLEZ GONZÁLEZ, R.<sup>12</sup>, DORADO REYES, F.J.<sup>12</sup>, ALCAIDE ROMERO, F.<sup>12</sup>, SOLLA HACH, A.<sup>12</sup>

<sup>1</sup> Dirección General de Biodiversidad, Bosques y Desertificación. Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO).

<sup>2</sup> Grupo TRAGSA.

<sup>3</sup> ETSIAM. Departamento de Ingeniería Forestal. Universidad de Córdoba.

<sup>4</sup> ETSIAM. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Bioquímica, Proteómica y Biología de Sistemas Vegetal y Agroforestal. Universidad de Córdoba.

<sup>5</sup> ETSIAM. Departamento de Genética. Universidad de Córdoba.

<sup>6</sup> Departamento de Ciencias Agroforestales. Universidad de Huelva.

<sup>7</sup> Instituto Universitario de Biotecnología/Biomedicina. Universidad de Valencia.

<sup>8</sup> Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA)

<sup>9</sup> Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia - IIAG (CSIC)

<sup>10</sup> ETS de Ingeniería de Montes, Forestal y del Medio Natural. Universidad Politécnica de Madrid.

<sup>11</sup> Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas.

<sup>12</sup> Ingeniería Forestal y del Medio Natural, INDEHESA, Universidad de Extremadura, España (asolla@unex.es).

### Resumen

Como respuesta a la gravedad de los procesos de decaimiento y mortalidad de la encina y el alcornoque, que amenazan la sostenibilidad de sus masas en la Península Ibérica, en el año 2019 se constituyó el subgrupo de trabajo “Mejora genética y fisiológica”, que forma parte del grupo de trabajo “Seca”, coordinado por el MITECO. Este subgrupo incluye a científicos y técnicos de varias administraciones y numerosos centros de investigación y Universidades y una empresa pública, expertos en mejora genética, fitopatología, ecología, propagación vegetativa, bioquímica y biología molecular. El programa tiene como objetivo la selección de genotipos de *Quercus ilex* y *Q. suber* tolerantes al estrés hídrico y a la podredumbre radical provocada por *Phytophthora cinnamomi*. A partir del estudio de 18 poblaciones y de 194 árboles “escape” seleccionados en focos de seca, se espera seleccionar un material apto para restaurar zonas afectadas por problemas de decaimiento. Se presenta una síntesis de las primeras actividades de caracterización e identificación de árboles escape en focos de seca, ensayos de invernadero para el estudio de la variabilidad poblacional en cuanto a vigor y tolerancia al estrés, recogida de muestras vegetales y edáficas para el análisis genético, molecular y de microbioma, identificación de marcadores moleculares asociados a resiliencia y micropropagación del material de mayor valor potencial.

### Palabras clave

Biodiversidad forestal, conservación de la diversidad genética, recuperación de especies amenazadas, genética de poblaciones, seca, decaimiento, clonación

### 1. Introducción

La “seca” de los *Quercus* es actualmente la principal amenaza de las encinas y alcornoques en buena parte de la Península Ibérica, especialmente en el Suroeste, ya que compromete la estabilidad y la persistencia de ecosistemas importantes a nivel ecológico y socioeconómico en el ámbito mediterráneo, como es el caso de la dehesa o el monte alcornocal. Se trata de un síndrome

del arbolado que provoca una elevada mortandad y que no puede atribuirse a una única causa. La interacción de factores tales como el cambio climático, los agentes bióticos y la gestión tienen una incidencia conjunta importante (CARRASCO-GOTARREDONA et al., 2009). Sin embargo, dentro de este escenario destacan la presencia de microorganismos patógenos que generan pudrición de raíz, en especial el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* (CORCOBADO et al., 2013). Se tienen evidencias de que este patógeno invasor actúa aditivamente junto a otros factores de estrés, como el déficit hídrico (CORCOBADO et al., 2014a, b; CUENCA et al., 2017; SAN-EUFRASIO et al., 2021), lo cual justifica que se le dediquen esfuerzos de investigación conjuntos.

Ante la preocupación creciente sobre el problema de la “seca”, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), competente en sanidad vegetal, y el Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO), competente en materia forestal, crearon en 2017 un grupo de trabajo orientado a concentrar los esfuerzos científico-técnicos de lucha contra la “seca”. Coordinado por ambos Ministerios, el grupo incluye a representantes de las comunidades autónomas más afectadas y a organismos de investigación y universidades que se dedican al estudio de este síndrome. El objetivo del grupo de trabajo es profundizar en el conocimiento y promover actuaciones concretas y prácticas que intenten poner freno a este complejo y grave problema. Está organizado en los siguientes subgrupos: 1) Inventario y seguimiento de focos de Seca, 2) Mejora genética y fisiológica, y 3) Gestión silvopastoral. En este marco, el subgrupo 2, de “Mejora genética y fisiológica” se creó para poner en común las diferentes líneas de trabajo, sobre la base de los resultados de investigación previos, en el ámbito de la selección y la propagación de la encina y el alcornoque tolerantes a la podredumbre radical (MOREIRA et al. 2018; MARTÍNEZ et al. 2020).

## 2. Objetivos

Tras diversas reuniones de este subgrupo, se detectó la necesidad de iniciar un Programa Nacional a largo plazo para la conservación y mejora de los recursos genéticos de la encina y el alcornoque. El programa, coordinado y gestionado por el MITECO, pretende seleccionar y propagar planta de encina y alcornoque tolerante a *Phytophthora cinnamomi* y/o estrés hídrico que pueda utilizarse en un futuro próximo para restaurar focos de “seca” (PÉREZ et al., 2020).

La puesta en marcha del programa tiene los siguientes objetivos principales:

1. Evaluar la tolerancia de las dos quercíneas a lo largo de sus áreas de distribución con objeto de mejorar la estrategia de manejo de su variabilidad intraespecífica en el ámbito nacional.
2. Estrategia de reproducción sexual, consistente en seleccionar individuos tolerantes para la instalación de huertos semilleros en cada una de las regiones de procedencia consideradas importantes para las dos especies. Los individuos seleccionados serían la base para un siguiente ciclo de mejora.
3. Estrategia de reproducción asexual, consistente en seleccionar y propagar vegetativamente genotipos tolerantes a *Phytophthora cinnamomi* y/o estrés hídrico y lograr una “variedad sintética”, material de diverso origen que se va a usar en mezcla y que, por tanto, en su conjunto, pierde el valor de la identificación de la referencia local.

Para la consecución de los tres objetivos principales, el programa se desarrolla en dos grupos de tareas que abordarán (i) el programa de mejora propiamente dicho y ensayos que permitan incrementar el conocimiento de la enfermedad y (ii) determinar los marcadores genéticos y moleculares que permitan identificar en el futuro con simples analíticas los genotipos tolerantes, logrando acelerar la mejora. De esta manera se podrá disponer de los recursos necesarios para combatir la enfermedad con la eficacia y la capacidad de reacción necesarias ante posibles variaciones de las condiciones ambientales o de evolución de la propia enfermedad.

El primer grupo de tareas incluye los siguientes objetivos específicos:

- Caracterización e identificación de árboles en focos de “seca” y selección de árboles escape.
- Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de poblaciones no afectadas por seca y selección de árboles madre y brinzales tolerantes a *P. cinnamomi* y/o estrés hídrico.

- Propagación de árboles escape en focos de “seca” y de árboles madre y brinzales en poblaciones no afectadas por seca.
- Ensayos de tolerancia en vivero y evaluación de sistema radicular.
- Propagación clonal y micropropagación del material evaluado y crioconservación.
- Evaluación de la aptitud como portainjertos del material tolerante.
- Ensayos de tolerancia en campo.
- Instalación de poblaciones de mejora, bancos clonales y huertos semilleros, incluyendo la autorización de materiales de base para la producción de material forestal de reproducción.

El segundo grupo de tareas incluye los siguientes objetivos específicos:

- Ensayos de tolerancia *in vitro*.
- Ensayos de variabilidad (marcadores de DNA tipo microsatélites y proteómica) y análisis multiómico de la respuesta al patógeno e identificación de marcadores asociados a la resistencia al patógeno.
- Estudio del componente biológico del suelo en relación al patógeno y su interacción con el estado sanitario del arbolado.

En esta comunicación se presenta una síntesis de aquellas actividades descritas que disponen de resultados preliminares.

### 3. Metodología

A continuación se describe sólo la metodología de las actividades de las que se disponen resultados.

#### 3.1. Caracterización e identificación de árboles en focos de “seca” y selección de árboles “escape”

A través de la información disponible de las CCAA y de los OPIs participantes, y con el apoyo de los resultados del Subgrupo de Trabajo de Inventario y seguimiento de focos de “seca”, se han caracterizado y seleccionado bajo un protocolo común 21 parcelas de encina y 50 de alcornoque ubicadas en Andalucía, Extremadura y Castilla-La Mancha, procurando reflejar la variabilidad de climas y suelos y donde se ha constatado la presencia de *Phytophthora*. En dichas parcelas se han seleccionado 3-5 árboles “escape”, es decir asintomáticos, de los que se han recolectado bellotas, hojas y muestras de suelo en el entorno próximo para evaluar la composición de la microbiota del suelo, además de caracterizar su comportamiento fisiológico a través de medidas de fotosíntesis y en algunos casos, el potencial hídrico. También se han caracterizado “árboles susceptibles”, es decir, sintomáticos. La comparación de la información procedente de los árboles susceptibles con la de los árboles escape permitirá caracterizar individuos que pudieran presentar tolerancia a la podredumbre de raíz.

#### 3.2. Caracterización e identificación de árboles para estudio de variabilidad poblacional

Para evaluar la resiliencia a la seca de encinas y alcornoques a escala nacional se han seleccionado 9 poblaciones por especie, de manera sistematizada, una por región de procedencia relevante (y dos en la región de procedencia número 11, “Extremadurese”, de encina, por su mayor extensión), y recogido hojas y bellotas de 10 árboles vigorosos por población.

#### 3.3. Ensayos de tolerancia en vivero

Se germinaron bellotas de 374 árboles, 194 de focos de seca y 180 de poblaciones sanas para evaluar la tolerancia a *P. cinnamomi* de las plántulas. Los ensayos se llevaron a cabo en el vivero de TRAGSA (Ourense) y los invernaderos de la Universidad de Extremadura (Plasencia) y Universidad de Huelva (Huelva), simultáneamente, incluyéndose tratamientos de estrés hídrico (Eh) e inoculación con *P. cinnamomi* (Pc), individuales y combinados (Eh+Pc, Pc+Eh y Eh+Pc+Eh). En

parte del material se evaluó la influencia del peso de la bellota (Figura 1a), la fecha de germinación, la fenología de brotación y la altura de la planta (Figura 1b) en la respuesta al estrés. Se utilizó siempre la misma cepa de *P. cinnamomi* (Figura 1c), de elevada virulencia, y los ensayos se prolongaron durante dos años. Finalmente, la tolerancia de los árboles madre se estimó a través de la supervivencia y longevidad (tiempo en morir) de sus progenies (Figura 1d). La selección de brinzales para mejora se hizo atendiendo al vigor, rectitud, abundancia de follaje de ausencia de bifurcaciones y puntisecado a partir de 16.050 plantas evaluadas.



Figura 1. Siembra y pesado de bellota en enero de 2020 (a), estado de aproximadamente 3.500 brinzales en la Universidad de Extremadura a principios de junio de 2020, antes de iniciarse los tratamientos (b), preparación del inóculo (c), y pérdida de turgencia en brotes apicales de *Quercus suber*, primer signo de la podredumbre radicular causada por *Phytophthora cinnamomi*.

### 3.4. Propagación vegetativa y crioconservación del material evaluado

Se pretende desarrollar suficientemente protocolos de micropropagación de encinas y alcornoques mediante embriogénesis somática y/o cultivo de yemas axilares para poder aplicarlos a la producción comercial y así poner a disposición del sector forestal materiales mejorados tolerantes a la seca. Al mismo tiempo, las líneas embriogénicas generadas se están crio-conservando para su mantenimiento a largo plazo en condiciones estables desde el punto de vista genético. Las plantas generadas se emplearán para los ensayos de confirmación de tolerancia y para el establecimiento de poblaciones de mejora.

### 3.5. Ensayos de tolerancia *in vitro*

Esta tarea, a desarrollar por la UPM-UCM, tiene como finalidad desarrollar un protocolo que permita evaluar la tolerancia *in vitro* de diferentes genotipos de encina y alcornoque a *P. cinnamomi* y correlacionar los resultados obtenidos con los del test de tolerancia en vivero. Se pretende acortar los períodos de ensayo y acelerar los resultados del programa. Se realizará un análisis de

correlación entre los resultados obtenidos en laboratorio y en vivero para determinar la validez del test.

### 3.6. Búsqueda de marcadores moleculares de respuesta a resistencia/tolerancia

En esta tarea se han utilizado protocolos desarrollados por la Universidad de Córdoba para encina (ECHEVARRÍA-ZOMEÑO et al., 2009; VALERO-GALVÁN et al., 2011; FERNÁNDEZ I MARTI et al., 2018) y la Universidad de Extremadura para castaño (ALCAIDE et al., 2019, 2020). Individuos muestreados de *Q. ilex* y *Q. suber* con y sin síntomas causados por *P. cinnamomi* se recogen en la Figura 2. Se han utilizado bellotas y hojas de 24 individuos (12 zonas con individuos de *Q. ilex* y *Q. suber* con y sin síntomas) para analizar variabilidad biológica (electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida y marcadores de DNA-microsatélites, respectivamente).

Se ha llevado a cabo la extracción de DNA de hojas y proteínas de harina de bellota de los 24 individuos con tres réplicas biológicas por individuo (72 muestras en total). La integridad del DNA se comprobó por electroforesis en geles de agarosa al 2 % y se cuantificó por Nanodrop1000 (Thermo Fisher Scientific Rockford, IL, USA). Se han empleado 20 marcadores microsatélites (SSRs) (10 cloroplásticos y 10 nucleares) previamente descritos en Fernández i Marti et al., (2018) y los productos de amplificación de PCR se han analizado por electroforesis capilar. Los resultados se han analizado con los siguientes programas: GeneMapper para la identificación de los alelos, GeneAlex para la determinación del haplotipo y NETWORK para el desarrollo de la red de haplotipos, Structure para la estructura génica de la población, STRUCTURE-HARVEST para determinar el valor de K óptimo. Las proteínas se han cuantificado por el método de Bradford y los extractos proteicos se han sometido a electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida al 12 %. Tras el teñido de los geles con Coomassie, se han capturado las imágenes de los geles en un densitómetro, analizándose con el software ImageLab. La cuantificación de proteínas se ha llevado a cabo a partir de los valores de intensidad de banda (densidad óptica) y los datos se han analizado estadísticamente (T-Student,  $p < 0.05$ ) utilizando el programa Statistix 10.

### 3.7. Estudio del componente biológico del suelo

La identificación de los mecanismos de tolerancia de los individuos de encina y alcornoque seleccionados conllevan el diagnóstico preciso de la presencia de *P. cinnamomi* en la rizosfera de dichos pies y en la de árboles afectados, junto con la determinación de la estructura y composición de la comunidad fúngica acompañante, para evaluar la presencia de otros mecanismos distintos a la tolerancia de origen genético que pudieran estar mejorando el estado fisiológico de arbolado infectado. Para ello, se acompañó el diagnóstico de *P. cinnamomi* mediante técnicas clásicas (captura en trampa vegetal a partir de “soil baiting” con diagnósticos moleculares por PCR cuantitativa y análisis de ADN ambiental (e-DNA) mediante técnicas de metabarcoding.

Las muestras de suelo de la rizosfera de pies afectados y pies candidatos en zonas previamente identificadas como foco de seca fueron enviadas al laboratorio del grupo ERSAF de la Universidad de Córdoba, y procesadas mediante homogenización mecánica y filtrado, para posteriormente obtener el ADN total presente en el suelo con la ayuda del kit de extracción PowerSoil DNA Max de Quiagen (Quiagen LLC., Dusseldorf, Alemania). El ADN extraído se amplificó mediante PCR para obtener librerías de secuencias amplificadas de los oomicetos, hongos y bacterias presentes en cada muestra mediante cebadores marcados (ITS1F / ITS2 para hongos, GAO et al., 2010; ITS6/ITS7 para oomicetos, COOKE et al., 2000; S\_D-Bact-0343-a-A-15 / S-D-Bact-0008-a-S-16 para bacterias, Klindworth et al., 2013) . Posteriormente las librerías fueron secuenciadas *de-novo* en la plataforma Illumina MiSeq 2x300 (Illumina Inc., San Diego, California). Los datos fueron posteriormente tratados siguiendo el protocolo bioinformático establecido en Ruiz Gómez et al. (2019), las secuencias agrupadas en unidades taxonómicas operacionales (OTU's por sus siglas en inglés), y dichos OTU's se identificaron a nivel de familia, género y especie utilizando la herramienta de búsqueda por homología del NCBI (Blast, nucleotide database). Este análisis

permitirá identificar respuestas de los árboles frente al patógeno, relacionando la ausencia de síntomas con la estrategia de escape o con la tolerancia, y aportar información valiosa sobre la biodiversidad del suelo

#### 4. Resultados

##### 4.1. Caracterización e identificación de árboles en focos de “seca” y selección de árboles “escape”

Se seleccionaron 194 árboles escape en 53 parcelas, 61 encinas (29 de Andalucía, 2 de Extremadura y 12 de Castilla-La Mancha) en 22 parcelas, y 123 alcornoques (28 andaluces, 76 extremeños y 19 castellano-manchegos) en 31 parcelas (Figura 2). Las muestras de suelo se enviaron a la ERSAF-UCO para la caracterización de la microbiota, así como las fichas que caracterizan el estado físico y fitosanitario de la parcela y de los árboles seleccionados (ver apartado 4.7). Las hojas y bellotas de todos los árboles excepto de 32 alcornoques y 2 encinas que no presentaban fruto, se enviaron al grupo de Bioquímica-UCO para el estudio de marcadores moleculares de tolerancia (ver apartado 4.6).

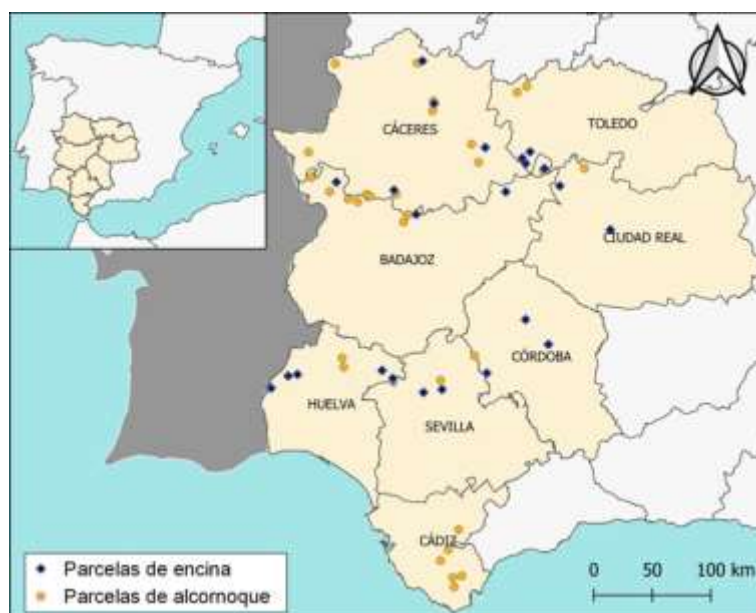


Figura 2. Mapa de localización de las parcelas caracterizadas y muestreadas en focos de seca, donde se han seleccionado los árboles escape.

##### 4.2. Caracterización e identificación de árboles para estudio de variabilidad poblacional

Los resultados de diversidad genética de las 18 poblaciones obtenidos con marcadores microsatélites neutrales han mostrado claras diferencias entre especies. Las poblaciones de *Q. ilex* han presentado valores significativamente superiores a los de *Q. suber* para todos los parámetros genéticos evaluados. Estos resultados han sido similares a los descritos en otros trabajos para ambas especies, empleando diferentes tipos de marcadores moleculares (TOUMI & LUMARET, 1998; LUMARET & JABBOUR-ZAHAB, 2009). En relación a la estructura poblacional, en *Q. ilex*, las poblaciones Dosrius (Barcelona) y Alcudia (Mallorca), pertenecientes a la subespecie *Q. ilex* subsp. *ilex*, han mostrado una clara separación del resto, y éstas a su vez han mostrado dos grupos genéticos mezclados en una proporción aproximada del 50%. Por el contrario, los resultados no han detectado estructura genética en el caso de *Q. suber*, hecho que ha sido constatado por otros autores previamente (MAGRI et al., 2007).

### 4.3. Ensayos de tolerancia en vivero

A finales de 2021, transcurridos 500 días tras el inicio de los tratamientos, se observaron mortalidades aproximadas del 75% en el total de las plantas. La encina se mostró más tolerante al estrés hídrico que el alcornoque (Figura 3a), y el alcornoque más tolerante a *P. cinnamomi* que la encina (Figura 3b). En cuanto a los tratamientos combinados, la encina es la que vio más incrementada su mortalidad, especialmente ante Eh+Pc (Figura 3c). El alcornoque se vio muy afectado ante Pc+Eh (Figura 3d). La longevidad media de la planta control fue significativamente superior a las longevidades medias de la planta sometida a los tratamientos (Tabla 1). En *Q. ilex*, Pc+Eh y Eh+Pc fueron los tratamientos que más redujeron la longevidad en las plantas, seguidos de Eh (Tabla 1). En *Q. suber*, sin embargo, Eh fue el tratamiento que más redujo la longevidad en las plantas, seguido de Pc+Eh y Eh+Pc (Tabla 1). En ambas especies resultó interesante observar que el tratamiento triple Eh+Pc+Eh incrementó la longevidad de las plantas frente a los tratamientos dobles Pc+Eh y Eh+Pc (Tabla 1).

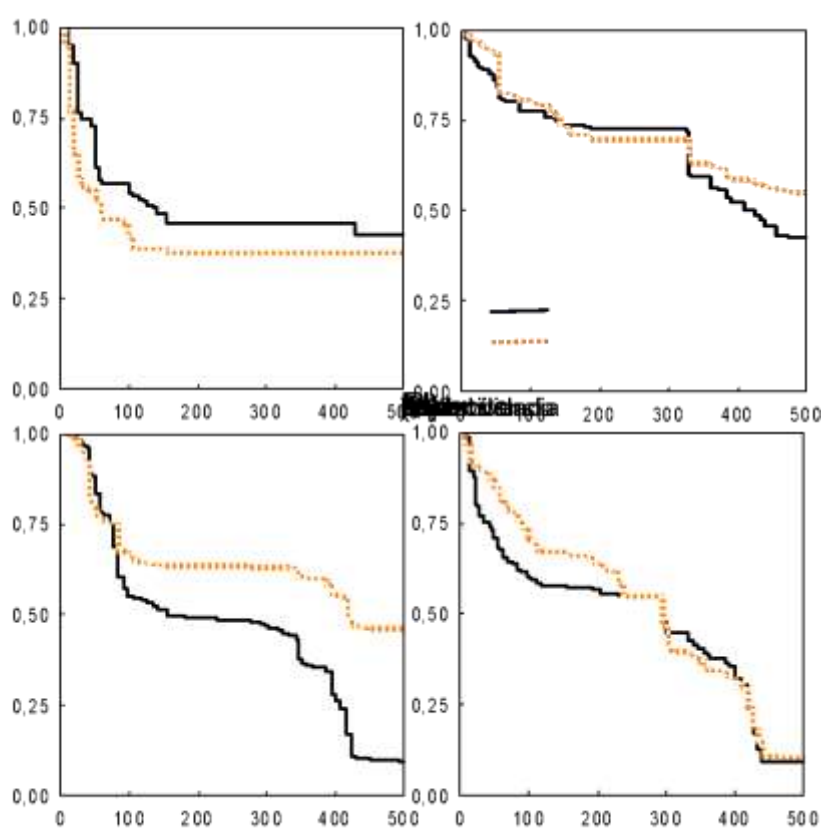


Figura 3. Disminución de la supervivencia de plántulas de *Quercus ilex* y *Q. suber* estresadas hídricamente (Eh)(a), inoculadas con *Phytophthora cinnamomi* (Pc) (b), o las combinaciones Eh+Pc (c) y Pc+Eh (d), durante los periodos vegetativos de 2020 y 2021, según el estadístico de Kaplan-Meier.

Tabla 1. Longevidad o días de supervivencia de plántulas de *Quercus ilex* y *Q. suber* sometidas a tratamientos individuales y combinados de estrés hídrico y *Phytophthora cinnamomi*. La supervivencia se modelizó según el estadístico de Kaplan-Meier y las diferencias entre tratamientos (letras distintas si  $p < 0.05$ ) y especies (valores  $p$ ) se obtuvieron a partir del test no paramétrico de Gehan.

	<i>Quercus ilex</i>		<i>Quercus suber</i>		Diferencia entre especies
Control	462	d	424	f	<0,001
Eh	255	b	211	a	0,010
Pc	340	c	355	e	0,004



Eh+Pc	236	ab	321	c	<0,001
Pc+Eh	243	a	262	b	0,004
Eh+Pc+Eh	363	c	343	d	0,002
Media	317		328		<0,001

La población de encina de Dosrius y la de alcornoque de Carmonita han destacado sobre otras por los mayores niveles de tolerancia de sus progenies (Tabla 2). Las encinas que generaron descendencia más tolerante a Eh+Pc, Pc+Eh y Eh+Pc+Eh fueron las de código 71 (63% de mortalidad, ubicada en Valdepeñas de Jaén), 30 (73% de mortalidad, Dosrius) y 65 (57% de mortalidad, Valdepeñas de Jaén), respectivamente. Los alcornoques que generaron descendencia más tolerante a Eh+Pc, Pc+Eh y Eh+Pc+Eh fueron los de código 140 (0% de mortalidad, ubicado en Hinojos), 176 (72% de mortalidad, Santa María de Soliús), y 172 (59% de mortalidad, Santa María de Soliús), respectivamente.

Tabla 2. Porcentajes de mortalidad de encinas y alcornoques de nueve poblaciones sometidas a tratamientos combinados de estrés hídrico y *Phytophthora cinnamomi*. Las diferencias entre poblaciones se indican con letras distintas a partir de un test HSD de Tukey ( $p < 0.05$ ), y se señalan en **negrita** dos poblaciones destacables en cuanto a resistencia.

Especie	Población	Eh+Pc		Pc+Eh		Eh+Pc+Eh	
<i>Q. ilex</i>	Alcudia	93	a	88	ab	77	ab
	Corral de Almaguer	90	a	93	ab	80	b
	<b>Dosrius</b>	91	a	86	a	72	a
	Oliva de la Frontera	93	a	94	b	79	b
	Palacios del Pan	92	a	90	ab	78	ab
	Talayuela	91	a	90	ab	80	b
	Valdepeñas de Jaén	88	a	90	ab	75	ab
	Vélez-Rubio	90	a	91	ab	77	ab
	Villarcayo	93	a	93	ab	80	b
<i>Q. suber</i>	Agullana	57	b	93	ab	80	a
	<b>Carmonita</b>	39	a	89	a	80	a
	Castellar de la Frontera	46	ab	94	ab	89	b
	Fuencaliente	49	ab	96	b	82	a
	Hinojos	42	ab	95	ab	85	ab
	Oliva de la Frontera	45	ab	90	ab	81	a
	Pasarón de la Vera	39	a	93	ab	83	ab
	Santa María de Soliús	45	ab	89	ab	83	ab
	Talayuela	46	ab	90	ab	84	ab

#### 4.4. Propagación vegetativa de material evaluado y crioconservación

Se abordó la micropropagación de colecciones resultado de evaluaciones previas de tolerancia a la seca realizadas por TRAGSA, UEx y UHu, y genotipos seleccionados por TRAGSA por la calidad de corcho. Se ha aplicado la embriogénesis somática (ES) para la clonación de adultos de alcornoque usando el protocolo de TORIBIO et al. (2005) por parte del IMIDRA, quienes han establecido con éxito el 94% de los genotipos abordados con una media de germinación y aclimatación del 75 y 55%, respectivamente. Para clonar genotipos juveniles de alcornoque se ha empleado también la embriogénesis somática según el protocolo de HERNÁNDEZ et al. (2011) por la Universidad de Valencia, quienes han establecido el 77% de los genotipos ensayados con un claro efecto materno, y unas tasas de conversión a plántula que oscilaron entre el 20 y el 70% según el genotipo. TRAGSA y la Universidad de Huelva han abordado también la clonación de juveniles de alcornoque mediante cultivo de yemas axilares con un éxito que osciló entre el 23 y el 86% según la colección, empleando modificaciones del protocolo de MARTÍNEZ et al. (2017). Para la clonación de encinas juveniles se ha empleado la técnica del cultivo por yemas axilares por parte del IAG y de la UHu empleando el protocolo de MARTÍNEZ et al. (2020) con alguna modificación. Se han establecido entre el 32 y el 92% de los genotipos según la colección abordada, con cultivos estables en porcentajes que oscilan entre 3 y 27%. En la actualidad se dispone de aproximadamente 20-25

plantas de 16 genotipos de alcornoque, 12 producidos por ES y 4 producidos mediante yemas axilares, para establecer los ensayos de evaluación de tolerancia.



Figura 4. Fases de cultivo de la embriogénesis somática: embriogénesis recurrente, germinación y aclimatación.

#### 4.5. Ensayos de tolerancia *in vitro*

Se ha procedido a establecer los protocolos de enraizamiento de los embriones somáticos y los clones producidos mediante yemas axilares. Se ha trabajado con material de *Q. suber*, ya que el material de *Q. ilex* se ha mostrado recalcitrante a la producción de raíces adecuadas para realizar los ensayos. En el caso de los embriones somáticos de *Q. suber*, se ha producido una germinación adecuada mostrando una raíz pivotante, aunque en ocasiones se ha producido una deformación de tipo bucle, cerca del cuello de la raíz, que compromete la calidad de las plantas. Sin embargo, en el caso de las yemas axilares, es normal que se desarrolle un sistema de raíces múltiples y frágiles, que dificultan el establecimiento de los ensayos.

Una vez estratificados a 4 °C, los embriones somáticos de alcornoque se hidrataron y fueron transferidos de forma individual al medio de germinación, obteniéndose un 97,3% de tasa de germinación en estos embriones.

Para el ensayo de infección con *P. cinnamomi*, las plántulas se sacaron del medio de germinación con agar y se pasaron a tubos *De Wit* (Duchefa) con puentes de papel. A los tubos CONTROL (AGUA), se les añadió agua destilada estéril y a los tubos INFECCIÓN (*Phytophthora*) se les añadió un homogeneizado de *P. cinnamomi*. Después de cinco días de cultivo en cámara se procedió a la detección del síntoma de pudrición en las raíces según los EPPO Standards (Diagnostic protocols for regulated pests PM 7/26). En las plántulas control se produjo un crecimiento de la raíz. Prácticamente el 100% de las raíces de estas plántulas presentaban buen aspecto y eran de color blanco. En las plántulas inoculadas con *P. cinnamomi*, el 100% de las raíces manifestaron síntomas de infección, siendo estas raíces de color negro y de aspecto necrosado. Hasta el momento no se han constatado diferencias entre los genotipos analizados en cuanto a la susceptibilidad a la infección. Las áreas afectadas en las raíces fueron medidas con el programa NIH ImageJ, obteniéndose un porcentaje medio de las áreas sintomáticas en las raíces superior al 50%.

#### 4.6. Búsqueda de marcadores moleculares de respuesta a resistencia/tolerancia

Los resultados preliminares incluyen el análisis por marcadores SSRs en hojas, así como el análisis proteómico de bellotas de *Q. ilex* y *Q. suber* en individuos con y sin síntomas. Para los marcadores cloroplásticos y nucleares se observó una separación clara entre especies del género *Quercus* sin que poblaciones o fenotipos fueran diferenciadas. En los microsatélites cloroplásticos, todos los individuos de *Q. suber* se agruparon en un único clúster, sin que poblaciones y fenotipos fueran diferenciados. En *Q. ilex*, las poblaciones 2 y 3 se agruparon en un mismo clúster, las poblaciones 1 y 5 se agruparon en clústeres diferentes pero cercanos, y la población 4 fue la más

alejada del grupo y en la única en la que se diferenció el individuo sintomático (F16-S-Qi) del asintomático (Qi511) (Figura 5). En los microsátelites nucleares, las 5 poblaciones de *Q. ilex* se separaron y sólo en las poblaciones 3 y 4 se diferenciaron los individuos sintomáticos (F30-S-Qi y F16-S-Qi, respectivamente) de los asintomáticos (Qi490 y Qi511, respectivamente) (Figura 6A). En cuanto a *Q. suber*, las 3 poblaciones fueron diferenciadas y en la población 6, se discriminaron dos de los tres individuos sintomáticos (F9-1S-Qs y F9-3S-Qs) de sus correspondientes asintomáticos (Qs450 y Qs451) (Figura 6B). De los SSRs cloroplásticos, CmCs9 y Udt1 discriminaron fenotipos en la población 4 en *Q. ilex*. De los SSRs nucleares, MSQ13, QrZAG9 y QrZAG20 discriminaron fenotipos en *Q. ilex* y MSQ13 y QrZAG7 en *Q. suber*. En el análisis proteómico, mediante electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida de harina de bellotas procedentes de las poblaciones reflejadas en la Figura 4, se identificaron un total de 26 bandas. El perfil proteico fue similar entre especies, poblaciones y fenotipos, no observándose diferencias cualitativas entre las muestras. En *Q. ilex*, la banda 21.2 kDa fue más abundante en tres individuos asintomáticos (Qi438, Qi511 y Qi547), la 22.3 kDa en dos (Qi490 y Qi511), y la 196.9 kDa en otros dos (Qi504 y Qi511). Estos datos concuerdan con las diferencias observadas por microsátelites para la población 4 (Qi511). En *Q. suber*, la banda 79.3 kDa fue más abundante en dos individuos asintomáticos (Qs437 y Qs451) y la 167.9 kDa también en dos (Qs451 y Qs499).

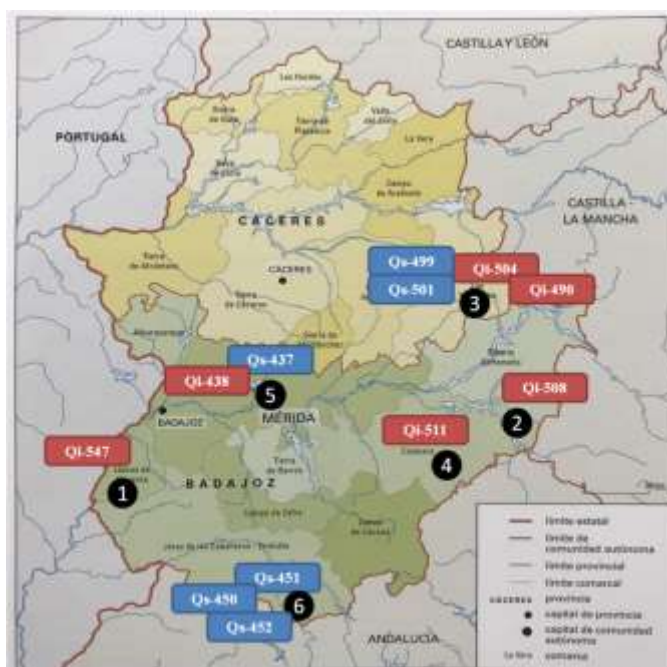


Figura 5. Mapa en el que se señala las zonas de muestreo y la localización de los individuos muestreados. En rojo y en azul se marcan los individuos de *Q. ilex* (Qi) y *Q. suber* (Qs), respectivamente, con y sin síntomas causados por la presencia de *Phytophthora cinnamomi*. Los números indican las poblaciones de Badajoz: (1) Alconchel, (2) Garlitos, (4) Monterrubio, (5) Mérida y (6) El Cabril/Monesterio y de Cáceres: (3) Castilblanco de donde se recogieron tanto hoja como bellotas.

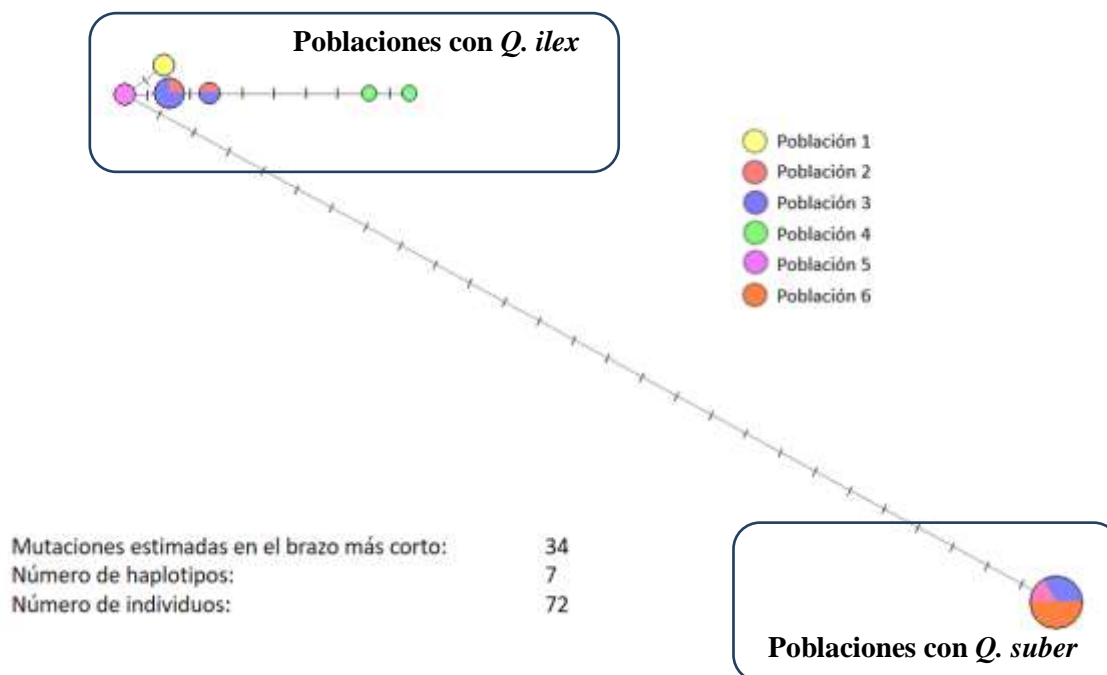


Figura 6. Red de haplotipos con 10 marcadores SSRs cloroplásticos utilizando el programa Network. El tamaño de los gráficos circulares es proporcional al número de individuos divididos en poblaciones.

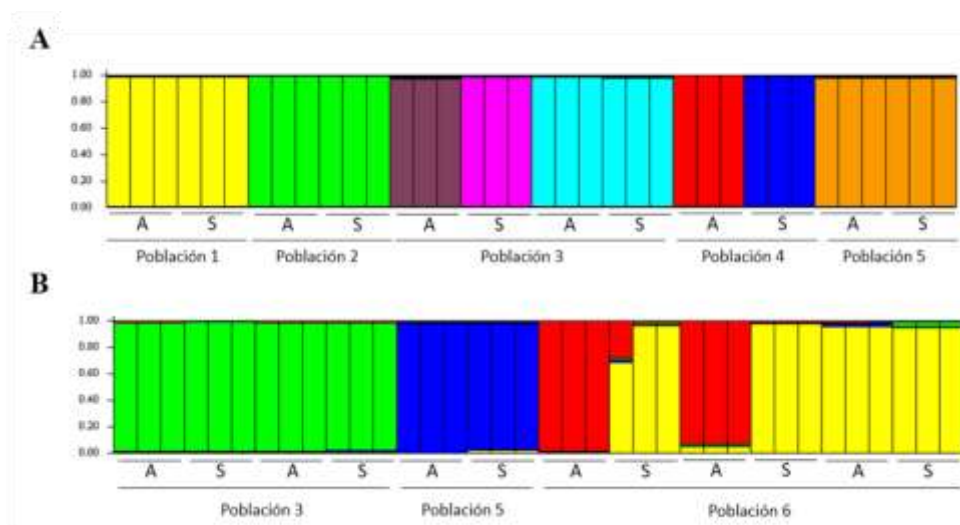


Figura 7 Diagrama de barras obtenido en el programa STRUCTURE para las poblaciones de *Q. ilex* (A) y de *Q. suber* (B). A y S indican la sintomatología del individuo (sintomático (S) y asintomático (A)).

#### 4.7. Estudio del componente biológico del suelo

Actualmente se ha concluido el análisis de la presencia de *P. cinnamomi* por técnicas clásicas, habiéndose aislado a *P. cinnamomi* de la rizosfera de 13 pies, 4 de ellos considerados "candidatos", así como otros oomicetos considerados en la literatura causantes de podredumbre de raíz en encina y otras especies de *Quercus* en otros 43 pies, 11 de ellos considerados pies candidatos. El análisis molecular por PCR cuantitativa ha confirmado dicha presencia en todos los

casos, además de en varios casos más en los que no se consiguió aislar al oomiceto directamente desde el suelo. Se continúa realizando rondas de análisis en algunas muestras que, por su compleja composición, han arrojado resultados dispares en la qPCR, con coeficientes de determinación inferiores al límite establecido. El análisis de los resultados preliminares de diagnóstico de los árboles frente a la clasificación inicial ha mostrado en el caso de la encina que los pies con diagnóstico positivo de *P. cinnamomi* y considerados pies candidatos a individuos tolerantes presentaron unos valores de fisiología similares a los pies no afectados por *P. cinnamomi*, mientras que los pies de encina infectados y considerados pies sensibles mostraron un estado fisiológico significativamente peor (Figura 7). En el caso del alcornoque, los resultados fueron más dispares, no encontrándose diferencias en la fisiología por las características anteriores.

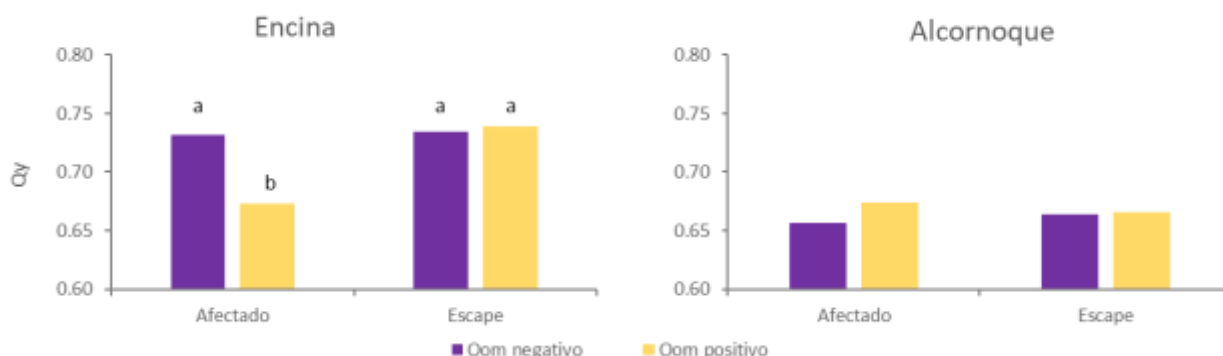


Figura 8. Estado fisiológico (eficiencia fotosintética medida a través de fluorescencia) de los pies de encina (izquierda) y alcornoque (derecha) analizados en el Programa de Conservación y Mejora de los Recursos Genéticos de la Encina y el Alcornoque, en función del diagnóstico de presencia de *P. cinnamomi* y de la clasificación otorgada por los agentes de campo. Escape: Pies candidatos a presentar tolerancia al ataque de *P. cinnamomi*. Afectados: Pies considerados como susceptibles por presentar síntomas de decaimiento. Columnas con diferente letra muestran diferencias significativas entre medias.

Respecto a la determinación de la composición y estructura del microbioma de los suelos analizados, actualmente se ha finalizado el trabajo de creación de librerías y secuenciación de-novo en Illumina de aproximadamente la mitad de los pies seleccionados. Los resultados preliminares muestran una elevada riqueza de hongos, con más de 1800 OTU's diferentes, y una riqueza moderada a alta de oomicetos, con 182 OTU's diferentes. En conjunto, el orden más abundante de hongos en las dehesas de encina y alcornoque no varía, siendo el de los agaricomycetes (40,5% de abundancia relativa en alcornocal, y 48,3% en encinar), sin diferencias significativas entre pies considerados tolerantes y escape. Los basidiomicetos y ascomycetes, divisiones que incluyen algunas de las especies ectomicorrícicas más relevantes en la encina y el alcornoque, presentaron una mayor abundancia en la rizosfera de los pies de alcornoque. En el caso de los ascomycetes se ha observado una abundancia relativa mayor en los pies considerados candidatos en los que no se ha podido identificar a *P. cinnamomi*. Respecto a los oomicetos, el género *Phytophthora* representa más de 50% del total de dicho taxón en todos los casos, nuevamente con mayores proporciones en las parcelas de encina que en las de alcornoque (50,1% en alcornoque, 60,1% en encina, datos de 113 pies, 62 de encina, 51 de alcornoque).

## 5. Discusión

### 5.1. Ensayos de tolerancia en vivero

Los resultados muestran un diferente comportamiento de la supervivencia de las dos especies analizadas frente a los dos agentes de estrés ensayados tanto por separado como en combinación. La elevada tolerancia de la encina al estrés hídrico y su susceptibilidad a *P. cinnamomi* ha sido señalada en varios estudios (BRASIER et al., 1993; ROBIN & DESPREZ-LOSTAU

1998; LEÓN et al. 2017) y se confirma en los tratamientos Eh y Pc. La combinación de los dos factores incrementa significativamente la mortalidad pero afecta de distinta manera a las dos especies según el orden en el que se apliquen. Cuando el tratamiento de estrés hídrico severo precede a la infección de *P. cinnamomi*, la mortalidad en la fase de sequía es más intensa en alcornoque (31% frente al 6% en la encina) ante la infección de *P. cinnamomi* los resultados se invierten (45% de mortalidad en alcornoque frente a 91% en encina). Cuando la infección precede a un estrés hídrico continuado, la mortalidad es parecida en las dos especies (92 y 90% respectivamente), aunque algo más rápida en encina. La combinación de tratamientos se ha abordado en estudios previos (CORCOBADO et al., 2014a; CUENCA et al., 2017; SAN-EUFRASIO et al., 2021).

Una posible explicación del diferente comportamiento de las dos especies ante Eh+Pc y Pc+Ec es que los daños producidos por un episodio de estrés hídrico de corta duración son compensados de manera eficiente en alcornoque (originando un posterior rebrote) sin afectar significativamente a su tolerancia al patógeno. En encina, sin embargo, un episodio de estrés hídrico previo a la infección incrementa la susceptibilidad de las plantas a Pc (CORCOBADO et al., 2014a), tal y como se observó aquí. Cuando el estrés hídrico es posterior a la infección, el alcornoque pierde su ventaja frente al patógeno (y a la encina) pues la destrucción parcial de su sistema radicular le hace muy susceptible a la sequía, y la planta muere.

## 5.2. Propagación vegetativa de material evaluado y crioconservación

La embriogénesis somática (ES) ha permitido en este trabajo la clonación de alcornoques adultos tolerantes a *P. cinnamomi* y/o sequía (HERNÁNDEZ et al., 2011), lotes de plantas idénticas que permiten su evaluación en ensayos, si bien el éxito del proceso estuvo condicionado por el genotipo. La ES de encinas adultas a partir de amentos (BLASCO et al. 2013) o bellotas inmaduras (BARRA-JIMÉNEZ et al., 2014) está en fase de desarrollo, con un bajo porcentaje en el éxito de la inducción, y dificultad de recolectar bellotas en el estado de desarrollo adecuado. Una alternativa es utilizar cultivos de brotes *in vitro* como fuente de explantos iniciales (MARTÍNEZ, et al., 2019).

El establecimiento *in vitro* de cultivos de yemas axilares a partir de la brotación forzada de plantas juveniles en condiciones controladas se ha empleado con éxito en varias especies de *Quercus* (VIEITEZ et al., 2009). Aquí se ha logrado el establecimiento de cultivos de encina y alcornoque a partir de brinzales de entre 4 y 12 años, si bien la estabilización posterior ha tenido diferente éxito. Esto puede deberse a la diferente edad u origen de las plantas establecidas, lo que se ha puesto de manifiesto en anteriores trabajos (GOMES et al., 2010; RATHORE et al., 2015; MARTÍNEZ et al., 2020), y afectaría no sólo al establecimiento sino también a la tasa de proliferación y al porcentaje de enraizamiento.

La ES a partir de hojas de plantas jóvenes de alcornoque, a pesar de las complicaciones de la aclimatación, está permitiendo la producción de planta aclimatada Mediante cultivo de yemas axilares, sin embargo, sólo se han aclimatado unas pocas plantas. Esto puede deberse a que las plantas obtenidas por ES presentan una raíz pivotante similar a la raíz desarrollada por una bellota en germinación (MARTÍNEZ, 2021). Por este motivo, el éxito del resultado puede hacer recomendable usar la ES como sistema de clonación en estas especies, a pesar de su mayor complejidad técnica.

La combinación de embriogénesis somática y crioconservación es especialmente útil en la selección de genotipos superiores, ya que permite el almacenamiento de las líneas embriogénicas generadas mientras son evaluadas sus características (CORREDOIRA et al., 2017). En nuestro caso se ha aplicado con éxito el método de la vitrificación siguiendo el protocolo de VALLADARES et al. (2004).



Figura 9. Plántulas somáticas de alcornoque en aclimatación en cámara controlada en el IMIDRA.

### 5.3. Ensayos de tolerancia *in vitro*

Aunque los ensayos *in vitro* de tolerancia de plantas de alcornoque y encina al patógeno *P. cinnamomi* realizados en este proyecto son todavía muy provisionales, y se han centrado fundamentalmente en la puesta a punto y calibración de las condiciones de inoculación y el estado fisiológico de las plántulas para la cuantificación de las respuestas, se han obtenido resultados muy prometedores. La experiencia previa en embriogénesis somática de alcornoque (BUENO et al., 1992; PINTOS et al., 2008, 2010; GÓMEZ-GARAY et al., 2014) y encina (MAURI y MANZANERA, 2003, 2004, 2011), y en la micropropagación de dichas especies (MANZANERA y PARDOS, 1990), ha permitido determinar la fase adecuada para la inoculación del patógeno tras el inicio del desarrollo de la radícula en los embriones germinados. En cuanto a los síntomas observados tal como se ha expuesto en el apartado de Resultados, se ha cuantificado una respuesta de susceptibilidad en una línea supuestamente tolerante (Qs452), pero no se ha podido disponer de controles susceptible y resistente, por lo que todavía es pronto para dilucidar si dicha respuesta forma parte del proceso de afección y posterior recuperación a medio plazo de los individuos presuntamente tolerantes, o si, por el contrario, la respuesta de las plantas inoculadas al patógeno no siguen el mismo patrón que en el caso de los ensayos llevados a cabo en condiciones *ex vitro*. Es de esperar que, conforme avanza el proyecto, estaremos en condiciones de poder dar respuesta a esta incógnita.

### 5.4. Búsqueda de marcadores moleculares de respuesta a resistencia/tolerancia

Los marcadores microsatélites diferencian claramente las dos especies del género *Quercus*. En *Q. ilex*, el set de marcadores SSRs ha diferenciado el individuo sintomático (F16-S-Qi) de su asintomático (Qi511) en la población 4. En *Q. suber*, el set de marcadores SSRs nucleares ha diferenciado dos individuos sintomáticos (F9-1S-Qs y F9-3S-Qs) de sus correspondientes

asintomáticos (Qs450 y Qs451). Para futuros estudios, se propone el uso de los siguientes marcadores: CmCs9 y Udt1 en *Q. ilex* (cloroplásticos), MSQ13, QrZAG9 y QrZAG20 en *Q. ilex* y MSQ13 y QrZAG7 en *Q. suber* (nucleares) para la identificación de individuos sintomáticos y asintomáticos. El perfil proteico de harina de bellota obtenido por electroforesis SDS-PAGE diferenció las dos especies y algunas de las bandas fueron más abundantes en individuos asintomáticos de al menos dos parejas: 21.2, 22.3 y 196.9 kDa (*Q. ilex*), y 79.3 y 167.9 kDa (*Q. suber*).

### 5.5. Estudio del componente biológico del suelo

Los resultados de caracterización de la fisiología en función del diagnóstico de oomicetos en pies considerados susceptibles y candidatos a presentar tolerancia parecen confirmar la hipótesis de que algunos de los pies de encina que se encuentran en buen estado en localizaciones afectadas por *P. cinnamomi* podrían estar influidos por condiciones de micrositio que evitan la infección por el patógeno. Los resultados permiten, además, identificar comportamientos positivos de pies que presentan al patógeno en la rizosfera, quedando abierta la posibilidad de encontrar mecanismos de tolerancia asociados al material genético en los mismos. Todo ello hace relevante la caracterización del componente biológico del suelo. Los resultados preliminares concuerdan con los obtenidos en estudios previos (RUIZ-GÓMEZ et al., 2019), e indican una abundancia considerable de especies fúngicas, principalmente agaricomycetos. Cabe destacar una tendencia que, de confirmarse, arrojaría pistas importantes sobre la interacción entre la comunidad microbiana del suelo y los patógenos de podredumbre de raíz. Concretamente, en relación a la abundancia diferencial de ascomycetos en los pies de encina que no presentaron *P. cinnamomi* en su rizosfera. En esta división se encuentran especies del género *Trichoderma*, hongos endófitos conocidos por su actividad antagonista respecto a diversas especies de *Phytophthora* spp., incluida *P. cinnamomi* (VINALE et al., 2008, RUIZ-GÓMEZ y MIGUEL-ROJAS, 2021).

## 6. Conclusiones

Aunque el síndrome de la “seca” se lleva estudiando desde hace décadas en nuestro país, hasta el momento no se había promovido la búsqueda coordinada de soluciones prácticas a nivel estatal. Así, con los resultados esperados de este programa se confía contribuir en gran medida a paliar este vacío, al producir materiales forestales de reproducción de encina y alcornoque tolerantes que puedan ser utilizados en el futuro en zonas afectadas por *P. cinnamomi*. Se presentan aquí los resultados de una selección de dos años de evaluaciones, tras los cuales se seleccionaron 210 plantas tolerantes a partir de 16.050 iniciales, lo que supone una intensidad de selección de 1,3%. En paralelo se está avanzando enormemente en el conocimiento de marcadores moleculares, el componente biológico del suelo y el desarrollo y transferencia de las técnicas de micropropagación, como parte de una estrategia conjunta de lucha contra la enfermedad. No hay que olvidar que el problema de la “seca” es complejo y para combatirlo debe ser abordado desde un punto de vista integral, incorporando una gestión silvopastoral adecuada, sin olvidar que la mejora genética es un complemento importante, sin ser la única solución.

## 7. Agradecimientos

Agradecimientos a todos los miembros del subgrupo de trabajo de mejora genética y fisiológica frente a La Seca, en especial a: G. Fernández, D. León, C. Anegón, L. Prieto, J.L. Peñuelas, J.L. Nicolas, N. Herrero y E. Pérez del MITECO., J.M. Jaquotot y J.M. Cobos del MAPA., J.R. Guzmán y J.M. Ruiz de la Junta de Andalucía, J.L. del Pozo, J. González de Miranda y F.J. Nieto de la Junta de Extremadura, D. García, y F.M. Vázquez del CICYTEX, M. Espinosa de la Junta de Comunidades de Castilla – La Mancha, L. Luquero, L. Rodríguez, F. Roman, C. del Campo, A. Murcia y A. Quevedo de TRAGSA, R. Sánchez-Cuesta, C. de Miguel Rojas, M.A. Castillejo B. San Eufrasio M. Labella-Ortega, T.



Hernández-Lao y, M. Escandón y de la Universidad de Córdoba, A. Camisón, M. Vivas, R. Bonal, M. Rodríguez y F. Pulido de la Universidad de Extremadura, J.R. González Adrados, M. Berrocal y J.A. Domínguez Núñez de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM), Gómez Garay, B. Pintos y T. Solís de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), A. Alborch, M.A. Sánchez y M.A. Pérez-Oliver de la Universidad de Valencia, C. Villarreal y M. Márquez en el IMIDRA, F.J. Vieitez y F. Mosteiro del Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (IIAG - CSIC), R. Alía y D. Barba del CIFOR-INIA.

Durante los cuatro primeros años el Programa de mejora y conservación de los recursos genéticos de la encina y el alcornoque frente al síndrome de la “seca” cuenta con una cofinanciación del FEADER al 75%, al estar estas actividades incluidas en el Programa Nacional de Desarrollo Rural 2014 - 2020, dentro de la submedida 15.2, de apoyo al fomento y la conservación de los recursos genéticos forestales.

## 8. Bibliografía

ALCAIDE, F.; SOLLA, A.; MATTIONI, C.; CASTELLANA, S.; MARTÍN, M.Á.; 2019. Adaptive diversity and drought tolerance in *Castanea sativa* assessed through EST-SSR genic markers. *Forestry* 92, 287-296.

ALCAIDE, F.; SOLLA, A.; CHERUBINI, M. et al. 2020. Adaptive evolution of chestnut forests to the impact of ink disease in Spain. *J Syst Evol* 58, 504-516.

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(3), 657-667.

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.  
BRASIER C.M., ROBREDO F., FERRAZ J.F. (1993). Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. *Plant Pathology* 42(1): 140–145.

BUENO, M.A.; ASTORGA, R.; MANZANERA, J.A. 1992. Plant regeneration through somatic embryogenesis in *Quercus suber*. *Physiol. Plant.* 85: 30-34

CARRASCO-GOTARREDONA, A. et al. (2009). Procesos de Decaimiento Forestal (la Seca), Situación del Conocimiento. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía.

COOKE, D. E. L., DRENTH, A., DUNCAN, J. M., WAGELS, G. & BRASIER, C. M. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genet. Biol.* 30, 17–32.

CORCOBADO, T.; CUBERA, E.; MORENO, G. et al. 2013. *Quercus ilex* forests are influenced by annual variations in water table, soil water deficit and fine root loss caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Agric For Meteorol* 169: 92-99.

CORCOBADO, T.; CUBERA, E.; JUÁREZ, E.; MORENO, G.; SOLLA, A.; 2014a. Drought events determine performance of *Quercus ilex* seedlings and increase their susceptibility to *Phytophthora cinnamomi*. *Agric For Meteorol* 192, 1-8.

CORCOBADO, T.; VIVAS, M.; MORENO, G.; SOLLA, A.; 2014b. Ectomycorrhizal symbiosis in declining and non-declining *Quercus ilex* trees infected with or free of *Phytophthora cinnamomi*. *For Ecol Manage* 324, 72-80.

CORREDOIRA, E.; MARTÍNEZ, M.T.; SAN-JOSÉ, M.C.; BALLESTER, A. 2017. Conservation of hardwood forest species. En: Ahuja, M.R.; Jain, S.M. (eds.): Biodiversity and Conservation of Woody Plants. Vol. 17. Páginas 421-453. Springer International Publishing.

CUENCA VALERA, B.; RODRIGUEZ NUÑEZ, L.; GRAGERA FACUNDO, J.; BERDON BERDÓN, L.; LUQUERO RAMOS, L.; OCAÑA BUENO, L.; SOLLA, A.; 2017. Mejora de alcornoques y encinas de Extremadura ante *Phytophthora cinnamomi*: selección de genotipos resistentes. En actas del séptimo Congreso Forestal Español, 7CFE01-289.

ECHEVARRÍA-ZOMEÑO, S.; ABRIL, N.; RUIZ-LAGUNA, J.; JORRIÍN-NOVO, J. V.; MALDONADO-ALCONADA, A. M.; 2012. Simple, rapid and reliable methods to obtain high quality RNA and genomic DNA from *Quercus ilex* L. leaves suitable for molecular biology studies. *Acta Physiol Plant* 34 793-805

FERNÁNDEZ I MARTI, A.; ROMERO-RODRÍGUEZ, C.; NAVARRO-CERRILLO, R. M.; ABRIL, N.; JORRIÍN-NOVO, J. V.; Dodd, R. S.; 2018. Population genetic diversity of *Quercus ilex* subsp. *ballota* (Desf.) Samp. reveals divergence in recent and evolutionary migration rates in the Spanish dehesas. *Forests* 9 337

GAO, Z., PEREZ-PEREZ, G. I., CHEN, Y. & BLASER, M. J. (2010). Quantitation of major human cutaneous bacterial and fungal populations. *J. Clin. Microbiol.* 48, 3575–3581.

GOMEZ-GARAY, A.; MANZANERA, J.A.; PINTOS, B. 2014. Embryogenesis in Oak species. A Review. *Forest Systems* 23(2): 191-198.

GOMES, F.; SIMÕES, M.; LOPEZ, M.L.; CANHOTO, J.M. 2010. Effect of plant growth regulatros and genotype on the micropropagation of adult trees of *Arbutus unedo* L. (Strawberry tree). *New Biotechnology* 27, 882-892.

HERNÁNDEZ, I.; CUENCA, B.; CARNEROS, E.; ALONSO-BLAZQUEZ, N.; RUIZ, M.; CELESTINO, C.; OCAÑA, L.; ALEGRE, J.; TORIBIO, M. 2011. Applications of plant regeneration of selected cork oak trees by somatic embryogenesis to implement multivarietal forestry for cork production. *Tree For. Sci. Biotech.* 5:19-26

KLINDWORTH, A., PRUESSE, E., SCHEWEERE, T., PEPLIES, J., QUAST, C., HORN, M., GLÖCKNER, F.O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41, e1.

LEÓN I.; GARCÍA J.J.; FERNÁNDEZ M.; VÁZQUEZ-PIQUÉ J.; TAPIAS R.; 2017. Differences in root growth of *Quercus ilex* and *Quercus suber* seedlings infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Silva Fennica* 51, 6991.

LUMARET, R.; JABBOUR-ZAHAB, R.; 2009. Ancient and current gene flow between two distantly related Mediterranean oak species, *Quercus suber* and *Q. ilex*. *Ann Bot* 104, 725-736.

MAGRI, D.; FINESCHI, S.; BELLAROSA, R.; BUONAMICI, A.; SEBASTIANI, F.; SCHIRONE, B.; VENDRAMIN, G.G.; 2007. The distribution of *Quercus suber* chloroplast haplotypes matches the palaeogeographical history of the western Mediterranean. *Mol Ecol* 16, 5259-5266.

MANZANERA, J.A.; PARDOS, J.A. 1990. Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 21: 1-8.

MARTÍNEZ, M. T.; SAN-JOSÉ, M. C.; VIEITEZ, A.M.; CERNADAS, M. J.; BALLESTER, A.; CORREDOIRA, E. 2017. Propagation of mature *Quercus ilex* L. (holm oak) trees by somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 131, 321-330.

MARTÍNEZ, M.T.; SAN-JOSÉ, M.C.; ARRILLAGA, I.; CANO, v.; MORCILLO, M.; CERNADAS, M. J.; CORREDOIRA, E. 2019. Holm Oak Somatic Embryogenesis: Current Status and Future Perspectives. *Front Plant Sci.* 10, 239-253.

MARTÍNEZ, M.T.; VIEITEZ, F.J.; SOLLA, A.; TAPIAS, R.; RAMIREZ-MARTÍN, N.; CORREDOIRA, E. 2020. Vegetative propagation of *Phytophthora cinnamomi*-tolerant holm oak genotypes by axillary budding and somatic embryogenesis. *Forests* 11, 841-863.

MARTÍNEZ, M.T. 2021. Micropropagation of holm oak by axillary budding and somatic embryogenesis. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.

MARTÍN, J. A.; SOBRINO-PLATA, J.; RODRÍGUEZ-CALCERRADA, J.; COLLADA, C., GIL, L. 2019. Breeding and scientific advances in the fight against Dutch elm disease: Will they allow the use of elms in forest restoration? *New Forests*, 50, 183-215.

MAURI, P.V.; MANZANERA, J.A. (2003). Induction, maturation and germination of holm oak (*Quercus ilex* L.) somatic embryos. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 74: 229-235.

MAURI, P.V.; MANZANERA, J.A. (2004). Effect of Abscisic Acid and stratification on somatic embryo maturation and germination of holm oak (*Quercus ilex* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 40: 495-498.

MAURI, P.V.; MANZANERA, J.A. (2011). Somatic embryogenesis of holm oak (*Quercus ilex* L.): ethylene production and polyamine content. *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 717-723.

MOREIRA, A. C.; TAPIAS, R.; FERNANDES, L., et al. 2018. Field susceptibility of cork oak trees with different provenances to *Phytophthora cinnamomi*. *For. Pathol.* 48, e12461.

PÉREZ, F.; CUENCA, B.; RUIZ-GÓMEZ, F. J.; REY, M. D.; RUIZ-GALEA, M.; ARRILLAGA, I. et al. 2020. Programa de mejora y conservación de los recursos genéticos de la encina y el alcornoque frente al síndrome de la “seca”. *Foresta* 78, 56-61.

PINTOS, B.; BUENO, M.A.; CUENCA, B.; MANZANERA, J.A. 2008. Synthetic seed production from encapsulated somatic embryos of cork oak (*Quercus suber* L.) and automated growth monitoring. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 95(2): 217-225.

PINTOS, B.; MANZANERA, J.A.; BUENO, M.A. 2010. Oak somatic and gametic embryos maturation is affected by charcoal and specific aminoacids mixture. *Annals of Forest Science* 67: 205.

RATHORE, M.S.; YADAV, S.; YADAV, P.; KHENI, J.; JHA, B. 2015. Micropropagation of elite genotype of *Jatropha curcas* L. through enhance axillary bud proliferation and ex vitro rooting. *Biomass and Bioenergy* 83, 501-510.

ROBIN C., DESPREZ-LOUSTAU M.L. (1998). Testing variability in pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi*. *European Journal of Plant Pathology* 104(5): 465–475. <https://doi.org/10.1023/A:1008649806620>.

RUIZ-GOMEZ, F. J.; NAVARRO-CERRILLO, R.; OSSWALD, W. et al. (2019). Assessment of functional and structural changes of soil fungal and oomycete communities in holm oak declined dehesas through metabarcoding análisis. *Sci. Rep.* 9, 5315

RUIZ-GÓMEZ, F.J.; MIGUEL-ROJAS, C. (2021) Antagonistic Potential of Native Trichoderma spp. against *Phytophthora cinnamomi* in the Control of Holm Oak Decline in Dehesas Ecosystems. *Forests*, 12, 945.

SAN-EUFRASIO, B.; CASTILLEJO, M.Á.; LABELLA-ORTEGA, M.; RUIZ-GÓMEZ, F.J.; NAVARRO-CERRILLO, R.M. et al. 2021. Effect and response of *Quercus ilex* subsp. *ballota* [Desf.] Samp. seedlings from three contrasting Andalusian populations to individual and combined *Phytophthora cinnamomi* and drought stresses. *Front Plant Sci* 12, 722802.

TORIBIO, M.; CELESTINO, C.; MOLINAS, M. 2005. Cork oak, *Quercus suber* L. En: JAIN, S.M.; GUPTA, P.K. (eds.): Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants 445-457. Springer. Netherlands.

TOUMI, L.; LUMARET, R.; 1998. Allozyme variation in cork oak (*Quercus suber* L.): the role of phylogeography and genetic introgression by other Mediterranean oak species and human activities. *Theor App Genet* 97, 647-656.

VALERO-GALVÁN, J.; VALLEDOR, L.; NAVARRO-CERRILLO, R. M.; PELEGRÍN, E. G.; JORRÍN-NOVO, J. V.; 2011. Studies of variability in Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota* [Desf.] Samp.) through acorn protein profile analysis. *J. Proteom.* 74 1244-1255.

VALLADARES, S.; TORIBIO, M.; CELESTINO, C.; VIEITEZ, A.M. 2004. Cryopreservation of Embryogenic Cultures from Mature *Quercus suber* Trees Using Vitrification. *CryoLetters* 25, 177–186.

VIEITEZ, A.M.; CORREDORIORA, E.; BALLESTER, A.; MUÑOZ, F.; DURÁN J.; IBARRA, M. 2009. *In vitro* regeneration of the important North American oak species *Quercus alba*, *Q. bicolor* and *Q. rubra*. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* 98(2), 135-145.

VINALE, F. et al. 2018. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biol. Biochem.* 40, 1–10.