



7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

**Gestión del monte: servicios
ambientales y bioeconomía**

26 - 30 junio 2017 | Plasencia
Cáceres, Extremadura

7CFE01-501

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales
Plasencia. Cáceres, Extremadura. 26-30 junio 2017
ISBN 978-84-941695-2-6

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Evaluación de la inducción de respuestas de defensa a *Phytophthora cinnamomi* Rands. en embriones somáticos de encina

RUIZ GALEA, M.¹, CELESTINO MUR, C.¹ y TORIBIO IGLESIAS, M.¹

¹ Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDRA)

Resumen

En las últimas décadas se ha producido una alta mortalidad de encinas por la "seca", entre otras razones por la infección de *Phytophthora cinnamomi* Rands. Las técnicas de mejora genética para su solución pasan por seleccionar material de individuos tolerantes, transferir genes relacionados con la patogénesis o inducir mediante elicitores, cambios epigenéticos en la semilla que provoquen respuestas de defensa en la planta. En este último campo, la embriogénesis somática permite obtener embriones genéticamente iguales donde evaluar estas respuestas. Se trataron tres líneas embriogénicas de encina con 50-100µM de los elicitores; BABA, BTH, salicílico, metiljasmonato y 10%-30% de filtrado del cultivo del oomiceto, durante 3 y 60 días. Se registró el efecto sobre la producción de embriones y se diseñó un sistema de evaluación precoz de tolerancia al patógeno mediante un cultivo dual. Los elicitores no afectaron significativamente a la producción de embriones por envase salvo metiljasmonato que recuperó la producción en un genotipo y BTH que usado 60 días necrosó los cultivos. El ensayo dual detectó respuestas diferentes según elicitor, genotipo y tiempo, no siendo significativas las diferencias entre concentraciones. Los filtrados aplicados 60 días y el BABA indujeron cambios relacionados con la reducción de la necrosis o del avance del micelio.

Palabras clave

Bioteología forestal, cultivo dual, elicitores, embriogénesis somática, encina, seca, tolerancia.

1. Introducción

El oomiceto *Phytophthora cinnamomi* es el principal agente biótico asociado con la "seca", síndrome que causa el decaimiento y la mortalidad de la encina (*Quercus ilex* L.) y el alcornoque (*Quercus suber* L.) en una amplia zona del suroeste peninsular. Este patógeno produce la necrosis de las raíces, habiéndose descrito que las hifas de *P.cinnamomi* pueden atravesar intra e intercelularmente el parénquima cortical, y alcanzar xilema y floema produciendo su colapso (HORTA et al., 2010; OBSWALD et al., 2014). Durante la colonización el oomiceto segrega elicinas que facilitan la infección y son determinantes de su agresividad. Estas proteínas al mismo tiempo inducen respuestas de defensa inmediata en la planta huésped mediante reacciones de hipersensibilidad o a más largo plazo, generando una resistencia sistémica adquirida (SAR). Ello sugiere que puede mejorarse la resistencia a un patógeno mediante el tratamiento previo con sus propias elicinas (EBADZAD et al. 2015).

Dentro del campo de la patología, la investigación sobre la inducción de respuestas de defensa ha permitido la identificación de una serie de compuestos naturales o de síntesis química, denominados inductores (VIVAS & SOLLA, 2012), capaces de provocar reacciones similares a las elicinas. Aplicados a cultivos *in vitro* de plantas hospedador se han obtenido y seleccionado líneas con mayor resistencia (SVÁBOVA & LEBEDA, 2005). Se conoce como resistencia sistémica inducida (ISR) y suele ser una respuesta no específica y a largo plazo contra varios patógenos. Este tipo de respuesta se ha observado con sustancias tales como el ácido β-amino butírico (BABA), el ácido salicílico (SA), el metiljasmonato (MeJA) o el benzotiadiazol o acibenzolar (BTH) entre otros. La aplicación externa de estos elicitores en la planta provoca una serie de cambios bioquímicos entre los que se incluye la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la síntesis de proteínas y la activación de

enzimas ligadas a las respuestas de defensa (JAITI *et al.*, 2009). También, aplicados sobre las semillas, son capaces de causar un cambio (KROL *et al.*, 2015; WORRAL *et al.* 2012) de modo que cuando se convierten en plantas, éstas están “acondicionadas” (“primed”) para dar respuestas de defensa más rápidas y/o con mayor intensidad al ser atacadas por patógenos microbianos, insectos, herbívoros o incluso cuando sufren un estrés abiótico.

En alcornoque y encina se han evaluado los efectos de la cinnamomina, elicitor de *P. cinnamomi*, en planta y los resultados indican que están involucradas en el proceso de infección y son capaces de inducir respuesta de defensa a este oomiceto (HORTA *et al.*, 2010; EBADZAD *et al.* 2015), pero no se tiene conocimiento de trabajos sobre el uso de elicitorinas o elicitores para inducir respuestas de defensa en semillas de *Quercus sp.* Mediante embriogénesis somática, se puede inducir la formación de embriones en hojas y tejidos florales de alcornoque (HERNANDEZ *et al.*, 2003) y encina (BLASCO *et al.*, 2013; BARRA-JIMÉNEZ *et al.*, 2014), los cuales se pueden multiplicar por embriogénesis recurrente hasta obtener un gran número de embriones genéticamente iguales. En estos embriones, equivalentes a “semillas clónicas”, se puede estudiar el efecto de diferentes tratamientos que generen la posible señal de acondicionamiento (“priming”). La inducción de respuesta depende de la especie, el genotipo, el tipo de elicitor, la concentración o el tiempo de aplicación (THAKUR & SINGH SOHAL, 2013). Una primera selección a nivel embriogénico de genotipos resistentes o tratamientos eficaces puede hacerse mediante cultivos duales con el material embriogénico y el oomiceto. El grado de estimulación del crecimiento, relacionado con la virulencia del hongo o susceptibilidad de la planta, y la necrosis del tejido como respuesta de hipersensibilidad al estrés, puede resultar un método útil a este nivel (NAWROT-CHORABIK, 2013).

2. Objetivos

El estudio tuvo dos objetivos: (1) determinar si el tratamiento de líneas embriogénicas de encina con elicitores influye en la capacidad de producir embriones somáticos, y (2) determinar si el tratamiento con elicitores induce cambios en los embriones somáticos que puedan detectarse con un bioensayo de cultivo dual con *Phytophthora cinnamomi*.

3. Metodología

Los ensayos se realizaron con embriones somáticos de tres genotipos de encina obtenidos mediante la inducción de embriogénesis somática en tegumentos de bellota inmadura, recogidos en árboles de la Finca de El Encín de Madrid (E00, E2) y Quintos de Mora en Toledo (Q8). La multiplicación de estos embriones se realizó en medio SH en envases dispuestos en cámara con 16h de luz a $23\pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura y con repicados mensuales (BARRA-JIMÉNEZ *et al.*, 2014). Los cultivos de *Phytophthora cinnamomi* fueron cedidos por la Universidad de Plasencia (cepa UEX1), aislada en mayo de 2008 en Valverde de Mérida, Badajoz (CORCOBADO *et al.*, 2014) y mantenidos en cámara a 4°C con repicados mensuales. Para tener cultivos activos, se usaron fragmentos de 10x10 mm PDA-agar con micelio, los cuales se cultivaron en el centro de placas de 90 mm \varnothing que se dispusieron en cámara a $23\pm 2^\circ\text{C}$ durante una semana.

Se ensayó el efecto de los elicitores químicos BABA, SA, MeJA y BTH en dos concentraciones, 50 y 100 μM , y también del filtrado del cultivo de *P.cinnamomi* (FILTR) en un medio inductor de cinnamominas, también en dos concentraciones, 10% y 30% (v/v) (GANESAN and JAYABALAN 2006). Para obtener el FILTR se utilizó el medio ESM (Elicitin Secretion Medium) (HORTA *et al.*, 2008). Una vez esterilizado por filtración, se cultivó el oomiceto en agitación a 50 rpm, en oscuridad y $23\pm 2^\circ\text{C}$ durante cinco días, volviéndose a filtrar antes de añadirlo al medio de cultivo. En todos los casos, los elicitores se aplicaron a los embriones somáticos añadiéndolos al medio de cultivo SH de multiplicación.

Se evaluó el efecto del modo de aplicación de los elicitores, a largo plazo y a corto plazo. Para el modo a largo plazo se cultivó cada genotipo en medio SH con agar, con cada una de las dos concentraciones y con cada elicitador, durante 60 días. Para el modo a corto plazo, se aplicaron los elicitores en medio SH líquido con 50µM de cada elicitador y 10% y 30% del FILTR, manteniendo el material embriogénico agitado a 110rpm durante tres días, seguido del cultivo en medio SH con agar sin elicitores hasta completar los 60 días. Se prepararon en todos los casos 5 repeticiones por tratamiento y genotipo que se cultivaron a $23\pm 2^\circ\text{C}$ y 16h luz. El cultivo se repicó a los 30 días. Para cada tratamiento y genotipo se contó el número de embriones aislados producidos por envase tras los 60 días de cultivo.

Para evaluar los posibles cambios inducidos en los embriones somáticos en respuesta a cada tratamiento se estableció un cultivo dual con los embriones somáticos elicitados y el micelio de *P. cinnamomi*. Se usaron placas de 90 mm Ø con medio SH y un cuadrado de 10x10 mm de micelio en PDA-agar colocado frente al material embriogénico elicitado. Se hicieron entre 6 y 10 repeticiones por tratamiento y genotipo incluyendo el "control" de embriones sin elicitar, más un tratamiento "blanco" consistente en cultivo del oomiceto sin embriones. Se mantuvieron en oscuridad a 23°C. Se midió diariamente el avance del micelio hacia el material elicitado y en sentido opuesto, calculándose el crecimiento diferencial medio diario (L-I) hasta que llegó el micelio al final de la placa, lo que ocurrió entre los días 5º y 7º. Una vez alcanzó el micelio el material embriogénico se valoró también mediante una escala de 0 a 10 la necrosis en los embriones hasta el día 10º del ensayo (Figura 1).

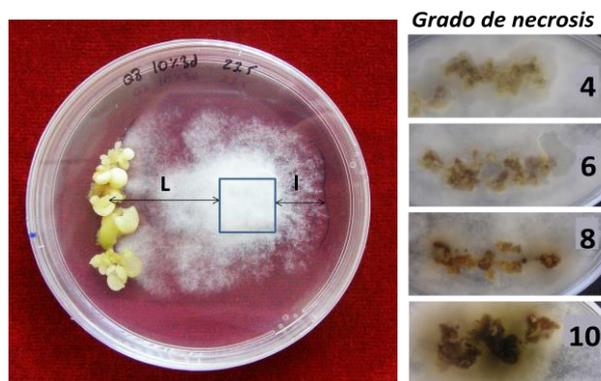


Figura1. Cultivo dual de embriones somáticos elicitados y micelio de *P.cinnamomi*: **izquierda**, Medidas de avance del micelio; **derecha**, Escala del grado de Necrosis

Los resultados, tanto del número de embriones producidos por envase como de los crecimientos diferenciales y grado de necrosis en el cultivo dual, se analizaron mediante análisis de varianza estudiando los efectos de genotipo, elicitador, modo de aplicación y concentración, utilizando el programa Statistica v5.1 (Stat software Inc., Tulsa, OK, USA).

Resultados

Entre las dos concentraciones ensayadas, 50 y 100µM, de los elicitores químicos y 10 y 30% del filtrado de *P.cinnamomi* no hubo diferencias significativas para el número de embriones producidos por envase. El modo de aplicación resultó más importante, aunque no se detectaron diferencias significativas ($p=0,060$), la aplicación a corto plazo redujo la producción media por envase frente a la aplicación a largo plazo. Se observaron diferencias significativas entre genotipos ($p=0,0000$) con ambos tiempos de aplicación, pero las diferencias entre elicitores sólo fueron significativas en el modo de aplicación a largo plazo ($p=0,007$). En el caso del genotipo E2, la aplicación de metiljasmonato a corto plazo, recuperó la producción de embriones por envase respecto

al control. En el resto de los genotipos la aplicación de los elicitores no afectó a la producción de embriones, excepto en el caso del tratamiento con BTH a largo plazo en el que se observó la necrosis del material en todos los genotipos (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto sobre la producción de embriones por envase del modo de aplicación (tratamientos de corto plazo, 3 días, y largo plazo, 60 días) con diferentes elicitores (MeJa, BTH, BABA, Filtrado al 30% y Filtrado 10%) a líneas embriogénicas de tres genotipos de encina (Q8, E2 y E00). Los datos son medias \pm error estándar. Medias dentro de cada columna seguidas de letras diferentes son significativamente diferentes según la prueba de Rango Múltiple de Duncan, $p < 0,5$

Tratamiento	Corto plazo			Largo plazo		
	Q8	E2	E00	Q8	E2	E00
CONTROL	5,2 \pm 1,4a	0,0 \pm 0,0a	3,0 \pm 0,3a	7,7 \pm 1,0a	3,0 \pm 0,8a	3,7 \pm 0,4a
MeJa	3,5 \pm 1,1a	4,6 \pm 1,4b	3,6 \pm 1,1a	5,6 \pm 1,0a	6,0 \pm 1,2a	2,0 \pm 0,6ab
BTH	5,0 \pm 1,9a	0,0 \pm 0,0a	4,2 \pm 2,5a	0,4 \pm 0,2b	0,4 \pm 0,2b	0,6 \pm 0,4b
BABA	5,7 \pm 0,6a	0,4 \pm 0,3a	2,7 \pm 1,8a	6,5 \pm 1,0a	5,0 \pm 1,2a	2,3 \pm 0,7ab
SA	6,8 \pm 2,3a	1,0 \pm 0,7a	4,3 \pm 1,0a	2,9 \pm 1,1a	2,6 \pm 0,8a	3,3 \pm 0,8a
FILTR 30%	5,9 \pm 1,7a	0,0 \pm 0,0a	3,4 \pm 0,8a	4,2 \pm 0,9a	3,3 \pm 1,1a	4,0 \pm 0,0a
FILTR 10%	2,6 \pm 0,7a	0,0 \pm 0,0a	3,1 \pm 1,0a	4,7 \pm 0,9a	1,3 \pm 0,7ab	3,5 \pm 0,5a

Cuando se realizó el ensayo dual con el material procedente de cada uno de los tratamientos y se midió el crecimiento diferencial del micelio del oomiceto, se comprobó que la presencia de embriones somáticos en el cultivo dual activaba el crecimiento del micelio y que este crecimiento podía variar entre genotipos. Se analizaron las diferencias entre genotipos y tratamientos cada día, resultando significativas en el día 4. En la aplicación a largo plazo, ese día se obtuvieron valores inferiores respecto al control sin elicitar en los tratamientos con BABA, tanto a 50 como a 100 μ M. En la aplicación a corto plazo, el crecimiento fue inferior que a largo plazo (menor atracción entre el material elicitado y el micelio) pero también se detectó este día un crecimiento diferencial debido al tratamiento con BABA 50 μ M (Figura 2).

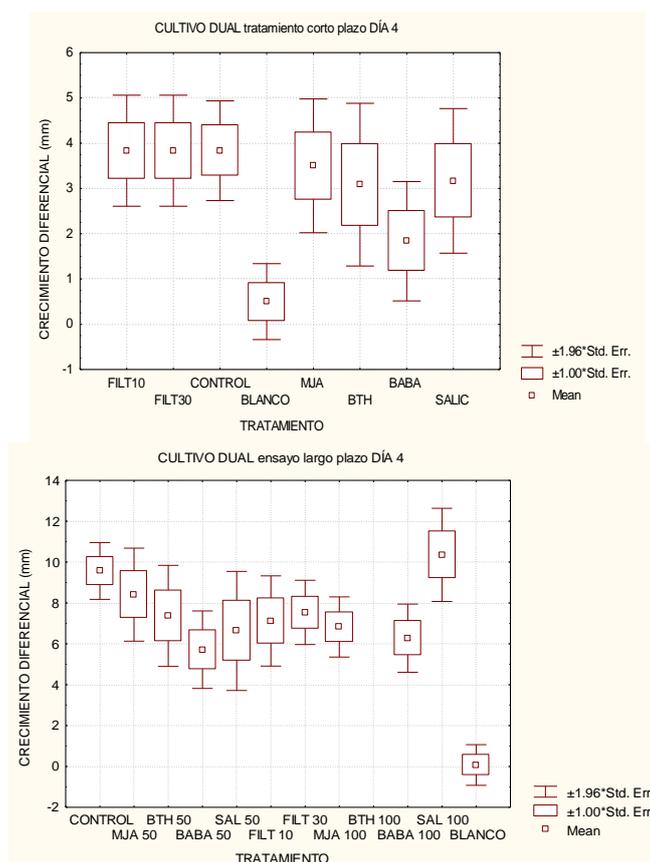


Figura 2. Efecto de diferentes elicitores sobre el crecimiento del micelio de *Phytophthora cinnamomi* en cultivo dual con líneas embriogénicas de encina: **izquierda**, tratamientos de corto plazo; 3 días; **derecha**, tratamiento a largo plazo, 60 días.

Considerando los genotipos por separado, en la aplicación a corto plazo el tratamiento con BABA 50 μ M fue muy significativo en el genotipo Q8 y algo menos en E00. La línea embriogénica E2 se perdió. En la aplicación a largo plazo los tratamientos que redujeron el crecimiento en Q8 fueron MeJA100 y BABA100, en E00 SA50, BTH50, y BABA en cualquiera de las concentraciones, y en E2 BABA50 y FILT 10% (datos no mostrados).

En cuanto a la necrosis provocada en los embriones somáticos durante el cultivo dual, resultó muy significativa la diferencia entre tratamientos cuando se compararon los valores alcanzados entre el 5 $^{\circ}$ y el 7 $^{\circ}$ día del ensayo, coincidente con el 2 $^{\circ}$ o 3 $^{\circ}$ días después de llegar el micelio al material embriogénico (Tabla 2).

Tabla2. Efecto del modo de aplicación de los elicitores sobre el grado de necrosis de los embriones somáticos en cultivo dual, medido a diferentes tiempos

	Tiempo de medición (días)		
	5 $^{\circ}$	6 $^{\circ}$	7 $^{\circ}$
Corto plazo	4,3 \pm 0,1	6,3 \pm 0,2	7,4 \pm 0,2
Largo plazo	3,7 \pm 0,2	5,6 \pm 0,3	8,5 \pm 0,2
ANOVA, p	0,043759	0,028627	0,000301

Comparando el efecto de los tratamientos el día 7, hubo una reducción significativa de la necrosis con los extractos del oomiceto y el BTH aplicados largo plazo (Tabla 3). Por genotipos, el filtrado al 10% reduce la necrosis en Q8, el BABA50 en E00 y el BABA en cualquiera de las concentraciones y el filtrado al 30% en E2. En el tratamiento a corto plazo, se reduce sin embargo aplicando 3 días BABA y SA en los dos genotipos y extracto al 10% y MeJA en el genotipo Q8. No hubo diferencias significativas sin embargo entre las dos concentraciones utilizadas aunque SA y MeJA redujeron más la necrosis a menor concentración (datos no mostrados).

Tabla 3. Efecto del tipo de tratamiento y de los elicitores evaluados sobre el grado de necrosis de embriones somáticos de dos (corto plazo) y tres (largo plazo) genotipos de encina en cultivo dual con *Phytophthora cinnamomi*. Medias seguidas de letras diferentes son significativamente diferentes según la prueba de Rango Múltiple de Duncan, $p < 0,5$

Elicitor	Media de la necrosis día 7	
	Corto plazo	Largo plazo
Control	8,3 ± 0,6 ab	8,9 ± 0,3 a
MeJA	7,0 ± 0,6 b	8,5 ± 0,4 ab
BTH	8,8 ± 0,4 a	7,7 ± 0,3 bc
BABA	6,7 ± 0,4 b	8,5 ± 0,3 ab
SA	6,7 ± 0,4 b	8,3 ± 0,3 ab
Extr10%	6,7 ± 0,8 b	7,1 ± 0,4 c
Extr30%	8,0 ± 0,5 ab	7,3 ± 0,4 c
Total	7,4 ± 0,2	8,1 ± 0,1

4. Discusión

La determinación del efecto de la aplicación de inductores de resistencia a embriones somáticos es necesaria para conocer su impacto en el rendimiento del sistema de regeneración de plantas por vía embriogénica. Los elicitores utilizados, a las concentraciones ensayadas, no han afectado a la diferenciación de embriones, salvo el BTH que resultó tóxico al aplicarse durante 60 días. Las concentraciones se encuentran entre los valores descritos en la bibliografía para la producción de metabolitos de interés mediante elicitación de cultivos celulares *in vitro* (GIRI & ZAHEER, 2016), lo que justificaría la ausencia de influencia sobre el desarrollo de los embriones. Por otra parte, el ensayo dual no detectó diferencias significativas entre estas concentraciones lo que sugiere que se podrían aplicar diferencias más amplias en nuevos ensayos. La menor producción de embriones en el tratamiento a corto plazo se debió a una reducida capacidad de diferenciación de la línea embriogénica E2. La pérdida de la capacidad de diferenciación de líneas embriogénicas con el tiempo en cultivo es uno de los problemas de la regeneración de plantas por embriogénesis somática, y se ha constatado que ocurre en cultivos de encina (BARRA-JIMÉNEZ *et al.*, 2014). Es interesante la observación de que la capacidad de diferenciación de dicha línea se recupera en el tratamiento con MeJa. Ello se puede explicar al haberse demostrado recientemente que niveles elevados de ácido jasmónico favorecen la acumulación de ácido indolacético, y con ello la producción de embriones somáticos (MIRA *et al.*, 2016).

En el presente estudio se ha observado que, en cultivo dual, la presencia de embriones somáticos de encina provoca una atracción quimiotáctica al micelio del oomiceto. En los procesos de infección también se ha constatado la existencia de este fenómeno de quimiotactismo (Oßwald *et al.*, 2014). También se ha comprobado que el tratamiento de los embriones con elicitores puede alterar esa atracción. Las medidas de crecimiento diferencial mostraron que los embriones somáticos activaron el crecimiento del micelio, pero al aproximarse a ellos se redujo, dando el día 4 diferencias significativas en el caso de los embriones tratados con BABA, siendo particularmente relevante para el genotipo Q8 (datos no mostrados). El BABA es un aminoácido ya vinculado a mecanismos de "priming" frente a *Phytophthora sp.* (SI-AMMOUR, 2003) y conocido por inducir respuestas de defensa

en planta al tratar sus semillas (WORRALL *et al.*, 2012). Mediante ensayos *in vitro* del micelio de *P. cinnamomi* en cultivo dual con callos de diferentes especies, algunas de ellas forestales, se ha podido evidenciar una correlación entre el crecimiento del micelio y la susceptibilidad de la planta de la que se obtuvo el callo (McCOMB *et al.*, 1987). Las diferencias entre tratamientos fueron más patentes al considerar los genotipos por separado. La influencia genética en la respuesta al tratamiento con inductores de defensa se ha descrito en otros casos, existiendo genotipos o familias que responden mejor al tratamiento con estas sustancias (VIVAS & SOLLA, 2012).

Con respecto a la respuesta de necrosis de los embriones somáticos, el cultivo dual detectó diferencias significativas entre los dos modos de aplicación. Se redujo la necrosis con los filtrados del oomiceto cuando se aplicaron a largo plazo, lo que puede responder a una presión de selección progresiva ya descrita por otros autores como sistema de obtención de planta tolerante (JAYASANKAR *et al.*, 2000; SAVITA *et al.*, 2011), pero también al efecto del filtrado fúngico como elicitador (SVÁBOVÁ & LEBEDA, 2005). Para el resto de los elicitores, aunque no redujeron significativamente la necrosis frente al control, resultó mejor la aplicación a corto plazo reduciendo también BABA la necrosis en 2 de 3 de los genotipos.

Se ha descrito en diversas especies, entre ellas varias forestales, que el ambiente en el que se desarrollan las semillas induce una “memoria epigenética” en las mismas que condiciona a largo plazo el comportamiento de las plantas producidas (YAKOVLEV *et al.*, 2012). Este fenómeno también se ha constatado en embriones somáticos producidos bajo diferentes temperaturas, generando el mismo genotipo diferentes epitipos (KVAALEN & JOHNSEN, 2008). En el presente estudio se verificó que embriones somáticos de encina del mismo genotipo sometidos a diferentes elicitores, pueden tener diferente comportamiento detectable en cultivo dual con *P. cinnamomi*. SOLLA *et al.*, 2013, constataron la inducción de resistencia transgeneracional en plantas procedentes de bellotas de encinas afectadas de seca, infectadas por el oomiceto, lo que podría ser un elemento eficaz de lucha contra la seca.

5. Conclusiones

La utilización de elicitores en el medio de cultivo no afectó significativamente a la producción de embriones somáticos por envase. Sin embargo, el cultivo dual sí detectó un comportamiento diferencial de los embriones somáticos tratados con elicitores. El sistema propuesto puede considerarse un sistema efectivo de discriminación de material a nivel de laboratorio para selección precoz, lo que requerirá establecer correlaciones de tolerancia frente a la infección en planta. Los tratamientos a embriones somáticos con elicitores podrían producir plantas acondicionadas, más tolerantes a la infección, que servirían para estudiar los mecanismos de inducción y transmisión de tolerancia.

6. Agradecimientos

Nuestro agradecimiento al Prof. A. Solla de la Universidad de Extremadura (Plasencia) por compartir su conocimiento y tiempo, así como cedernos la cepa de *P. cinnamomi*. Este trabajo ha sido financiado dentro del proyecto nacional AGL2013-47400-C4-1R.

7. Bibliografía

- BARRA-JIMENEZ, 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.
- 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.

CORCOBADO, T., CUBERA, E., JUÁREZ, E., MORENO, G.; SOLLA, A.; 2014. Drought events determine performance of *Quercus ilex* seedlings and increase their susceptibility to *Phytophthora cinnamomi*. *Agr. Forest Meteorol.* 192-193: 1-8.

EBADZAD, G.; MEDEIRA, CL.; MAIA, I.; MARTINS, J.; CRAVADOR, A.; 2015. Induction of defence responses by cinnamomins against *Phytophthora cinnamomi* in *Quercus suber* and *Quercus ilex* subs. *Rotundifolia*. *Eur J Plant Pathol* 143:705-723.

GANESAN, M.; JAYABALAN, N.; 2006. Isolation of disease-tolerant cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR 2) plants by screening somatic embryos with fungal culture filtrate. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 87: 273-284.

GIRI, C.C.; ZAHEER, M.; 2016. Chemical elicitors versus secondary metabolite production *in vitro* using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 126: 1-18.

- HERNÁNDEZ, I.; CELESTINO, C.; ALEGRE, J.; TORIBIO, M.; 2003. Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 21: 765.

HORTA, M.; CAETANO, P.; MEDEIRA, C.L.; MAIA, I.; CRAVADOR, A.; 2010. Involvement of the β -cinnamomin elicitor in infection and colonisation of cork oak roots by *Phytophthora cinnamomi*. *Eur J Plant Pathol* 127:427-436 .

HORTA, M.; SOUSA, N.; COELHO, A.C., NEVES, D.; CRAVADOR, A.; 2008. *In vitro* and *in vivo* quantification of elicitor expression in *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 73: 48-57.

JAITI, F.; VERDEIL, J.L.; HADRAMI, I.; 2009. Effect of jasmonic acid on the induction of polyphenoloxidase and peroxidase activities in relation to date palm resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedinis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74(1): 84-90.

JAYASANKAR, S.; LI, Z.; GRAY, D. J.; 2000. In-vitro selection of *Vitis vinifera* 'Chardonnay' with *Elsinoe ampelina* culture filtrate is accompanied by fungal resistance and enhanced secretion of chitinase. *Planta* 211: 200-208.

KVAALEN, H.; JOHNSEN, Ø.; 2008. Timing of bud set in *Picea abies* is regulated by a memory of temperature during zygotic and somatic embryogenesis. *New Phytologist* 177: 49-59.

McCOMB, J.A.; HINCH, J.M.; CLARKE, A.E.; 1987. Expression of field resistance in callus tissue inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 77: 346-351.

MIRA, M.; WALLY, O.; ELHITI, M.; 2016. Jasmonic acid is a downstream component in the modulation of somatic embryogenesis by Arabidopsis Class 2 phytochrome. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 67, No. 8: 2231-2246.

NAWROT-CHORABIK, K.; 2013. The use of interactions in dual cultures *in vitro* to evaluate the pathogenicity of fungi and susceptibility of host plant genotypes. *Environmental Biotechnology - New Approaches and Prospective Applications*, Prof. Marian Petre (Ed.). 287-301.

OSWALD, W.; FLEISCHMANN, F.; RIGLING, D.; COELHO, A. C.; CRAVADOR, A.; DIEZ, J.; DALIO, R. J.; HORTA, M.; PFANZ, H.; ROBIN, C.; SIPOS, G.; SOLLA, A.; CECH, T.; CHAMBERY, A.; DIAMANDIS, S.;

HANSEN, E.; JUNG, T.; ORLIKOWSKI, L. B.; PARKE, J.; PROSPERO, S. and WERRES, S.; 2014. Strategies of attack and defence in woody plant-Phytophthora interactions. *For. Path.* 44(3).

SAVITA; VIRK, G.S., NAGPAL, A.; 2011. In vitro selection of calli of Citrus jambhiri Lush for tolerance to culture filtrate of *Phytophthora paradisiaca* and their regeneration. *Physiol Mol Biol Plants* 17: 41-47.

SI-AMMOUR, A.; MAUCH-MANI, B.; MAUCH, F.; 2003. Quantification of induced resistance against *Phytophthora* species expressing GFP as a vital marker: β -aminobutyric acid but not BTH protects potato and Arabidopsis from infection. *Molecular Plant Pathology* 4(4): 237-248.

SOLLA, A.; HERNÁNDEZ, J.; CORCOBADO, T.; CUBERA, E.; 2013. Inducción de resistencia transgeneracional de *Quercus ilex* ante *Phytophthora cinnamomi*. Sexto Congreso Forestal Español. Contribución 6CFE01-392

SVÁBOVÁ, L.; LEBEDA, A.; 2005. In Vitro selection for improved plant resistance to toxin-producing pathogens. *J. Phytopathology* 153: 52-64

THAKUR, M.; SINGH SOHAL, B.; 2013. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: A review. *ISRN Biochemistry*. Volume 2013, Article ID 762412, 10 pages.

VIVAS, M.; SOLLA, A.; 2012. Aplicaciones de BABA y BTH en brinzales de Pinus pinaster para la inducción de resistencia ante *Fusarium circinatum*. *Cuad Soc Esp Cienc For* 36: 55-60.

WORRALL, D.; HOLROYD, G. H.; MOORE, J. P.; GLOWACZ, M.; CROFT, P.; TAYLOR, J. E.; PAUL, N. D.; ROBERTS, M. R.; 2012. Treating seeds with activators of plant defence generates long-lasting priming of resistance to pests and pathogens. *New Phytologist* 193: 770-778.

YAKOVLEV, I.; FOSSDAL, C.G.; SKRØPPA, T.; OLSEN, J.E.; JAHREN, A.H.; JOHNSEN, Ø.; 2012. An adaptive epigenetic memory in conifers with important implications for seed production. *Seed Sci. Res.*, 22: 63-76.