



Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y  
Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**IMPLICACIÓN DE MECANISMOS (EPI)-GENÉTICOS EN LA  
MADURACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE *QUERCUS  
SUBER L.***



Laura Ossorio Carballo  
21/Julio/2014

Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y  
Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

IMPLICACIÓN DE MECANISMOS FISIOLÓGICOS Y (EPI)-  
GENÉTICOS EN LA MADURACIÓN DE EMBRIONES  
SOMÁTICOS DE *QUERCUS SUBER* L.

Laura Ossorio Carballo



Firma

María Jesús Cañal Villanueva



Firma

Marta Pérez-Suárez



Firma

# AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a Maria Jesús Cañal el apoyo y la ayuda que me ha dado como tutora de este trabajo, pero también por haberme dado la oportunidad de trabajar durante este tiempo en el laboratorio de Fisiología vegetal.

A Marta, mi cotutora y compañera de viaje, porque me he sentido muy afortunada de poder trabajar a su lado, porque siempre ha estado dispuesta a ayudarme, porque sin ella este trabajo no hubiese salido adelante (o al menos, no de esta manera tan cachi). A ella le deseo lo mejor en los próximos retos que se le presentan.

A Mauro, también compañero, por estar siempre dispuesto y disponible, y porque el buen humor que tiene siempre, consigue alegrar el día a cualquiera.

A mis compañeros de clase, porque han sido muchas horas, y han sido muchas manos las que nos hemos echado.

A Alex, porque siento que he ganado a un amigo de esos que son para toda la vida, y porque sin él, todo hubiese sido demasiado complicado. Se le echa de menos.

A Xurde, porque aunque su cruzada en el descubrimiento de la cura del cáncer le ha dejado poco tiempo para vernos, siempre ha estado ahí.

A los chicos del laboratorio, porque siempre han estado dispuestos a ayudar (sobre todo a Carolina, no todo el mundo se queda hasta las tantas de la tarde extrayendo hormona).

A mis padres, por creer en mí. Su orgullo ha sido un motivante muy importante.

A Rubén, porque caminar juntos por el lado oscuro de la luna no ha sido fácil, pero nunca mar en calma hizo experto marinero. Sin su apoyo sí que nada de esto hubiese sido posible. Gracias. Sé que hay un lugar en el mundo esperando por nosotros.

A mis amigos, porque detrás de las juergas hay muchos sentimientos, y aunque la época en la que vivimos probablemente nos obligue a separarnos, todos han dejado una huella imborrable en mí. Les deseo lo mejor, de corazón.

Y en general, a todos mis conocidos, amigos de amigos... personas más o menos importantes, que han formado el conjunto de vida y que han pasado con o sin pena, con o sin gloria, pero que sin saberlo han hecho de estos años una época muy importante.

Se acaba nuestra etapa de estudiantes, el horno no está para bollos y el futuro más que incierto, es oscuro. Pero saldremos adelante. Siempre.

# ABREVIATURAS

3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A sintasa .....	HMG
9- <i>cis</i> epoxicarotenoide dioxigenasa .....	NCED
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético .....	2,4-D
Ácido abscísico .....	ABA
Ácido desoxirribonucleico .....	ADN
Ácido desorribonucleico complementario .....	ADNc
Ácido giberélico .....	GA <sub>4</sub>
Ácido indolbutírico .....	AIB
Ácido ribonucleico .....	ARN
Agrupamientos de embriones con embriogénesis recurrente .....	EC
Bencilaminopurina .....	BAP
Estadios proliferaticos .....	EP
Giberelinas.....	GAs
Histona deacetilasa .....	HDA
Peso en unidad de volumen .....	p/v
Radiación fotosintéticamente activa.....	PAR
Sistemas de inmersión temporal.....	SIT

# ÍNDICE

<b>1. Resumen</b> .....	<b>Pág. 1</b>
<b>2. Introducción</b> .....	<b>Pág. 3</b>
2.1. <i>Planteamiento y objetivos</i> .....	Pág. 6
<b>3. Material y métodos</b> .....	<b>Pág. 7</b>
3.1. <i>Material vegetal</i> .....	Pág. 7
3.2. <i>Medios y condiciones de cultivo</i> .....	Pág. 7
3.3. <i>Caracterización de los embriones</i> .....	Pág. 9
3.3.1. <i>Caracterización macro-morfológica</i> .....	Pág. 9
3.3.2. <i>Capacidad de germinación</i> .....	Pág. 9
3.4. <i>Separación y cuantificación de ABA</i> .....	Pág. 9
3.4.1. <i>Extracción de ABA</i> .....	Pág. 9
3.4.2. <i>Cuantificación de ABA</i> .....	Pág. 10
3.5. <i>Cuantificación de la expresión génica</i> .....	Pág. 10
3.5.1. <i>Extracción de ARN y síntesis de ADNc</i> .....	Pág. 10
3.5.2. <i>Real time RT-PCR</i> .....	Pág. 11
3.6. <i>Análisis estadísticos</i> .....	Pág. 11
<b>4. Resultados</b> .....	<b>Pág. 13</b>
4.1. <i>Caracterización macro-morfológica</i> .....	Pág. 13
4.2. <i>Capacidad de germinación</i> .....	Pág. 13
4.3. <i>Cuantificación ABA</i> .....	Pág. 14
4.4. <i>Expresión génica diferencial de NCED3, HDA6 y HDA19</i> .....	Pág. 15
<b>5. Discusión</b> .....	<b>Pág. 17</b>
5.1. <i>Efecto del frío y la fluridona en los niveles de ABA y en su ruta de síntesis y la capacidad de germinación</i> .....	Pág. 17
5.2. <i>Regulación epigenética de la maduración de los embriones</i> ...	Pág. 18
<b>6. Conclusiones</b> .....	<b>Pág. 21</b>
<b>7. Bibliografía</b> .....	<b>Pág. 23</b>

## 1. Resumen

El alcornoque (*Quercus suber* L.) es considerada una especie de gran importancia ecológica y económica. Desde que se ha logrado clonar mediante embriogénesis somática genotipos élite de edades avanzadas, se han producido numerosos avances. La optimización del uso de sistemas de inmersión temporal como método que permite aumentar el número de embriones somáticos producidos es uno de ellos. Sin embargo, la necesidad de someter a los embriones somáticos a una estratificación en frío para que adquieran competencia germinativa supone una limitación en el techo productivo de esta técnica.

Por tanto, con el objetivo de definir si la estratificación en frío es necesario para que los embriones maduren y adquieran competencia germinativa; y de ser así, si éste podría ser sustituido por la aplicación de fluridona, un inhibidor de la síntesis de ABA; en el presente trabajo los embriones somáticos se han expuesto a diferentes condiciones de temperatura; así como a fluridona y a giberelinas, para comprobar si alguno de estos tratamientos podría sustituir al frío. Además, se ha analizado la expresión génica diferencial de varios genes relacionados con ABA, hormona clave en la regulación de la maduración de los embriones, y con la regulación epigenética de este proceso, con el fin de caracterizar la respuesta de los embriones ante los diferentes tratamientos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la estratificación en frío no se puede sustituir en el proceso de maduración ni por la fluridona ni por la aplicación de giberelinas en el medio de germinación. Asimismo, se ha observado que existe una relación entre los niveles de ABA y la regulación epigenética llevada a cabo por *HDA6* y *HDA19* (histonas deacetilasas implicadas en la remodelación de la cromatina). El frío muestra un sinergismo con la fluridona en los efectos que produce sobre la expresión de *NCED3* (gen de la ruta de síntesis de ABA) y sobre la de *HDA6* y *HDA19*. Por otro lado, la fluridona parece tener un efecto estimulador de la aparición de la embriogénesis recurrente.

## Summary

Cork oak (*Quercus suber* L.) is considered a very valuable species providing good economical and ecological perspectives. Great progresses have been done in cork oak clonal propagation since somatic embryogenesis has been achieved on adult trees from elite genotypes. Moreover, the use of temporary immersion systems (TIS) has been optimized for improving somatic embryos proliferation. In spite of the advantages that this technique offers, the impossibility of applying low temperatures to these systems, needed for somatic embryos to acquire germination competence, limits the production that this technique offers.

Hence, in this work several experiments have been carried out in order to define if cold stratification was necessary for embryos to mature and acquire germination ability and if it could be replaced by the addition of fluridone, an ABA synthesis inhibitor. Somatic embryos have been exposed to different temperatures. Additionally, fluridone and gibberellins have been added to culture media to check if any of these treatments could replace cold treatment. Moreover, analyses of differential gene expression of genes related to ABA, a key plant hormone during embryos maturation, as well as to epigenetic regulation were performed in order to characterize embryos response to the different treatments applied.

The obtained results indicate that cold stratification cannot be replaced by the application of neither fluridone o gibberellins on the maturation and germination media respectively. It has also been recorded that there is a relationship between ABA levels and the epigenetic regulation of *HDA6* and *HDA19* (histone deacetylases related to chromatin remodeling). A synergy effect of fluridone and cold was also observed onto *NCED3* (related to ABA synthesis pathway) and *HDA6* and *HDA19* gene expression levels of genes related to the ABA pathway. Moreover, it also seems that fluridone stimulates the emergence of recurrent embryogenesis.



## 2. Introducción

Los bosques de alcornoque (*Quercus suber* L.) cubren aproximadamente una extensión de 2,7 millones de hectáreas distribuidas entre Portugal, España, Argelia, Marruecos, Italia, Túnez y Francia (WWF/MEDPO 2006; Gil y Varela 2008), y constituyen una fuente de recursos vitales para más de 100.000 personas. Además, estos bosques poseen una alta biodiversidad, y la explotación de sus recursos, como el corcho, se considera una actividad respetuosa con el medio ambiente, ya que no implica la tala de árboles y contribuye al mantenimiento de la dehesa.

El alcornoque es una especie leñosa perenne, muy longeva (se pueden encontrar individuos de más de 200 años de edad) que no tolera temperaturas por debajo de los -10°C. Crece principalmente en suelos no calcáreos, preferiblemente arenosos, aunque también puede encontrarse ocasionalmente en suelos descarbonatados. Es una especie cuyo polen se transporta a través del aire, y posee flores masculinas y flores femeninas, que se encuentran en el mismo árbol (Gil y Varela 2008).

Los métodos de cultivo tradicionales presentan limitaciones en esta especie debido a sus ciclos reproductivos largos así como la imposibilidad de almacenar las semillas a largo plazo (Vieitez *et al.* 2012). La propagación vegetativa es la mejor alternativa para la propagación rápida y efectiva de árboles de alcornoque que poseen características idóneas para su explotación (árboles élite), ya que permite propagar material genéticamente mejorado a un coste reducido (Lelu-Walter *et al.* 2013). La propagación vegetativa se puede llevar a cabo mediante técnicas de micro y macro propagación. Sin embargo, clonar individuos mediante técnicas de macropropagación (por ejemplo, técnicas de esquejado) sólo es posible cuando el árbol todavía se encuentra en una etapa juvenil, en la que la selección de genotipos élite no es posible ya que los individuos todavía no muestran las características relevantes para su explotación (Fraga *et al.* 2002).

Los métodos basados en la micropropagación utilizan técnicas de cultivo *in vitro* que permiten controlar las condiciones de cultivo así como monitorizar los efectos de uno o varios factores en el sistema. La aplicación de nuevas tecnologías en la micropropagación de diferentes especies del género *Quercus* ha contribuido al progreso de la propagación clonal, y se han llevado a cabo relevantes avances en este área gracias al uso de la organogénesis y la embriogénesis somática (ES) (Vieitez *et al.* 2012). Esta última ha demostrado ser una herramienta eficaz en la mejora de especies leñosas, y es considerada como la técnica más apropiada para la propagación a gran escala de material seleccionado.

La imposibilidad de iniciar cultivos embriogénicos procedentes de árboles adultos es considerada la principal limitación de la ES en la propagación de especies forestales; sin embargo, en el alcornoque la iniciación de cultivos embriogénicos a partir de hojas de árboles adultos con una edad superior a 50 años ha sido obtenida con una tasa relativa de éxito del 20% (Wilhelm 2000). Una vez iniciado el cultivo, éste podría ser potencialmente mantenido indefinidamente mediante embriogénesis recurrente. A pesar de las ventajas que esta técnica ofrece, la baja eficiencia de proliferación de los cultivos y, fundamentalmente, la baja calidad de los embriones producidos y la incompleta maduración de los mismos es

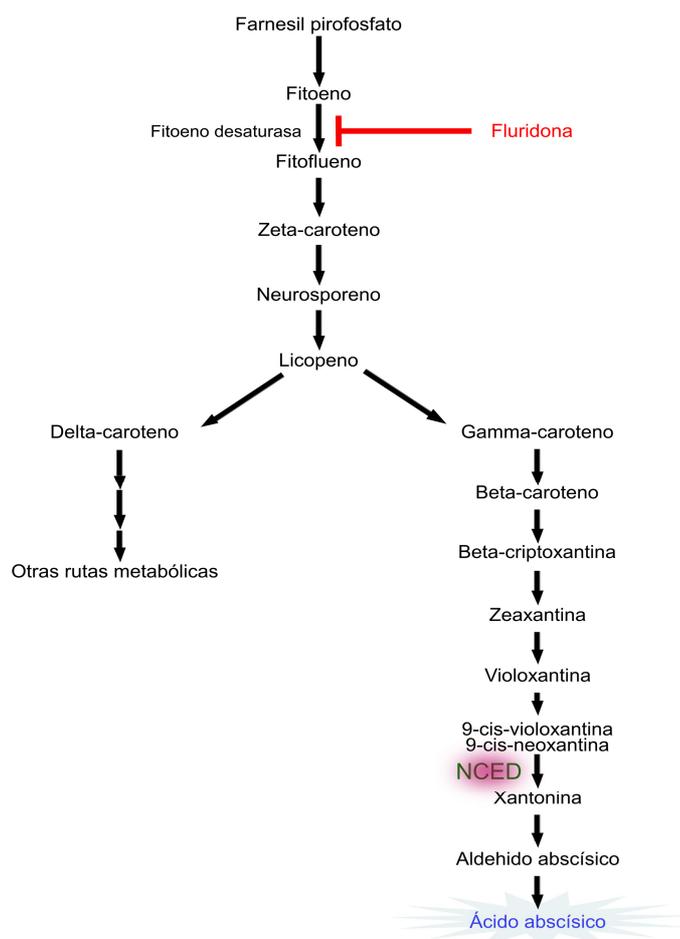
considerada el mayor cuello de botella de esta técnica en especies del género *Quercus* (Wilhem 2000; Vieitez *et al.* 2012).

El uso de medios líquidos para la propagación de embriones somáticos puede reducir costes y permite la automatización de los cultivos (Colmenares y Jiménez 2003); sin embargo, problemas asociados, tales como la hiperhidricidad o la asfixia de los tejidos limitan el techo productivo de esta técnica (Etienne and Berthouly 2002; Roels *et al.* 2005). Los sistemas de inmersión temporal (SIT) son sistemas semi-automáticos que poseen las ventajas del cultivo en medio líquido, pero evitan los problemas asociados a este tipo de medios, ya que proveen a los explantos de una buena aireación y un adecuado intercambio de nutrientes (Etienne and Berthouly 2002). Uno de estos SIT es el denominado RITA<sup>®</sup> (Recipient for Automated Temporary Inmersion) que ha sido utilizado con éxito en la proliferación de embriones somáticos de alcornoque (Pérez *et al.* 2013). No obstante, una de las limitaciones metodológicas que presentan estos sistemas, es la imposibilidad de someter a los explantos a una estratificación en frío, necesaria para la correcta maduración de los embriones somáticos de *Q. suber* (comunicación personal).

En las semillas, la progresión del desarrollo de los embriones, la maduración y la germinación están coordinados por interacciones de señales hormonales y reguladores del desarrollo específicos de cada fase (Brocard-Giffor *et al.* 2003). El ácido abscísico (ABA) juega un papel muy importante durante la maduración de las semillas y el desarrollo de los embriones (Kermode 2005). Esta hormona se acumula promoviendo la síntesis de proteínas relacionadas con esta etapa, como las de la familia LEA (Late Embryogenesis Abundant), que están relacionadas con la adquisición de la tolerancia a la desecación en la semilla madura. Además, el ABA favorece la dormición e inhibe la germinación temprana en las semillas maduras y en los embriones somáticos (Nakashima y Yamaguchi-Shinozaki 2013; Rai *et al.* 2011) y está implicado en la transición de la etapa vegetativa a la reproductiva así como en la tolerancia al estrés abiótico (Chinnusamy *et al.* 2008).

Se ha descrito que, durante la maduración tardía de los embriones, una estratificación en frío disminuye los niveles de ABA anulando por tanto su efecto inhibitorio sobre la germinación, y además, favorece el aumento de los niveles de giberelinas (GA), promoviendo la entrada en la fase de germinación. La tasa de germinación de embriones somáticos en *Q. suber*, así como la de otras especies del mismo género (Mauri y Manzaneda 2004), es mayor cuando éstos son expuestos durante dos meses a bajas temperaturas, indicando que este tratamiento estimula su maduración (Lelu-Walter *et al.* 2013).

La fluridona (1-metil-3-fenil-5-[3-(trifluorometil)fenil]-4(1H)-piridinona), es un compuesto que inhibe a la fitoeno desaturasa, enzima que cataliza la conversión de fitoeno a fitoflueno, reduciendo así la síntesis de carotenoides que a su vez, son los precursores del ABA en los tejidos vegetales (Figura 1). Este compuesto ha sido utilizado en numerosos ensayos para la caracterización de la respuesta de plantas de diferentes especies cuando éstas tienen inhibida la síntesis de carotenoides (Gamble y Mullet 1986; Quin *et al.* 2007; Du *et al.* 2013), así como inhibidor de la dormición en semillas (Fong *et al.* 1983; Chae *et al.* 2004). Sin embargo, no se han descrito sus efectos sobre los cultivos embriogénicos de *Q. suber*.



**Figura 1.** Ruta de biosíntesis del ABA. *NCED*, 9-*cis* epoxicarotenoide dioxigenasa. Modificado desde Chinnusamy *et al.* 2008; Gamble y Mullet, 1986.

Durante la biosíntesis de ABA, uno de los pasos clave y limitante es la conversión de las 9-*cis* xantofilas a xantonina, el cual es catalizado por los enzimas codificados por la familia de genes de la 9-*cis* epoxicarotenoide dioxigenasa (*NCED*) (Seo y Koshiba 2002; Rodríguez–Gacio *et al.* 2009). La regulación espacio-temporal de los genes *NCED* juega un papel muy importante en el control de los niveles de ABA endógenos, que afectan a la dormición y germinación en semillas (Frey *et al.* 2012). En particular, la expresión del gen *NCED3*, contribuye notablemente a la regulación de la síntesis de ABA, y se ha descrito que su expresión es inducida en *Arabidopsis thaliana* cuando se somete a las plantas a estrés por sequía (Iuchi *et al.* 2001). En base a esto, el estudio de la expresión génica del gen *NCED3* en embriones expuestos a fluridona, permitiría un mayor conocimiento sobre el efecto de esta sustancia en la regulación de la síntesis de ABA, ya que no se han encontrado resultados concluyentes que relacionen la inhibición de la fitoeno desaturasa con una disminución en la regulación de los enzimas principales de la ruta metabólica de esta hormona. Por otro lado, durante la maduración de las semillas, se ha descrito que el ABA controla la expresión de numerosos genes implicados en este proceso, y que la regulación epigenética juega un papel muy importante en las respuestas mediadas por ABA (Chinnusamy *et al.* 2008; Rai *et al.* 2011).

La diferenciación celular y el desarrollo están controlados mediante la activación o silenciamiento espacial y temporal de genes específicos. Estos procesos están

acompañados por modificaciones heredables pero potencialmente reversibles en el ADN y proteínas asociadas a la cromatina que se definen como marcas epigenéticas (Neelakandan y Wang 2012). Entre estas marcas se incluyen la metilación del ADN y las modificaciones post-traduccionales de histonas.

Las histonas deacetilasas son enzimas que catalizan la escisión de un grupo acetilo de los residuos de lisina acetilados en los extremos N-terminal de las histonas (Kim *et al.* 2012). La desacetilación del extremo N-terminal de estas proteínas está íntimamente relacionada con el silenciamiento génico y la formación de heterocromatina (Tanaka *et al.* 2008).

La expresión de las histonas deacetilasas HDA6 y HDA19 se ve incrementada después del ataque de patógenos en *A. thaliana* (L.) Heynh., y se ha demostrado que la histona HDA19 interacciona con factores de transcripción que regulan la expresión génica en la respuesta de las plantas al estrés (Chen *et al.* 2010<sup>a</sup>; Chen *et al.* 2010<sup>b</sup>), mientras que la histona HDA6 está implicada en el silenciamiento de la cromatina en respuesta a señales del desarrollo y ambientales (Kim *et al.* 2012). Debido a la relación directa que se ha descrito entre la actividad de estas deacetilasas y el contenido en ABA en diferentes especies, un estudio de la expresión de los genes HDA6 y HDA19 en los embriones de *Q. suber* tratados con fluridona esclarece qué efecto tiene esta sustancia sobre la regulación de la compactación de la cromatina.

### **2.1. Planteamientos y objetivos**

Teniendo en cuenta los efectos que la etapa de estratificación en frío tiene sobre la maduración de los embriones de alcornoque, y que ésta está directamente relacionada con el éxito en la propagación a gran escala mediante los SIT, es necesario optimizar los protocolos ya descritos para esta especie. Por tanto, se planteó como objetivo principal del presente trabajo:

*Determinar si la exposición de los embriones a bajas temperaturas es absolutamente necesaria para que maduren y adquieran competencia germinativa; y de ser así, si éste podría ser sustituido por la aplicación al medio de fluridona, un inhibidor de la síntesis del ABA.*

Con el objeto de entender y describir los efectos de la estratificación en frío y de la fluridona en los embriones somáticos, se planteó el análisis la expresión de genes de interés relacionados con el control (epi)genético de la maduración de los mismos.

Para llevar a cabo este objetivo, se definieron los siguientes objetivos parciales:

- Caracterizar macro-morfológicamente los embriones obtenidos tras la aplicación de los distintos tratamientos.
- Cuantificar los niveles endógenos de ABA tras los tratamientos con y sin estratificación en frío.
- Analizar la expresión génica diferencial de los genes de interés *NCED3*, *HDA6* y *HDA19* tras los distintos tratamientos.

### 3. Material y métodos

#### 3.1. Material vegetal

Se utilizaron cultivos embriogénicos de alcornoque en fase de proliferación previamente establecidos a partir de embriones inmaduros de *Quercus suber* L. de acuerdo al protocolo descrito por Bueno *et al.* (2000).

Los embriones inmaduros se cultivaron durante un mes en un medio que contenía macronutrientes (Sommer *et al.* 1975), micronutrientes y vitaminas (Murashige y Skoog 1962), 3% (p/v) sacarosa y suplementado con 2,3  $\mu\text{M}$  ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Los embriones se transfirieron posteriormente a un medio basal de proliferación con la misma composición y suplementado con 3,4 mM Glutamina (Tabla 1).

#### 3.2. Medios y condiciones de cultivo

La proliferación, maduración y germinación de los embriones somáticos se llevó a cabo de acuerdo al protocolo utilizado por Pérez (2014). La composición de los medios y las condiciones de cultivo utilizadas en cada fase se describen en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Composición de los diferentes tipos de medio de cultivo utilizados para la proliferación, maduración y germinación de los embriones somáticos.

Tipo de medio	Composición del medio	Condiciones del cultivo
<b>Basal (proliferación)<sup>a</sup></b>	Macronutrientes de Sommer (Sommer <i>et al.</i> 1975) MS micronutrientes y vitaminas (Murashige y Skoog, 1962) Sacarosa al 3% (p/v) Agar (Duchefa) al 0,8 % (p/v) Glutamina 3,4 mM	Luz 30 días
<b>Maduración<sup>b</sup></b>	Macronutrientes de Sommer MS micronutrientes y vitaminas Sacarosa al 3% (p/v) Agar (Duchefa) al 0,8 % (p/v) Carbón activo al 1%	Oscuridad 30 días a 25 $\pm$ 2°C 60 días a 4 y 25°C
<b>Maduración con fluridona</b>	Macronutrientes de Sommer MS micronutrientes y vitaminas Sacarosa al 3% (p/v) Agar (Duchefa) al 0,8 % (p/v) Carbón activo al 1% Fluridona 1 $\mu\text{M}$	Oscuridad 60 días a 4 y 25°C
<b>Germinación<sup>c</sup></b>	Macronutrientes de Sommer MS micronutrientes y vitaminas Sacarosa al 1,5% (p/v) Bencilaminopurina (BAP) 0,2 $\mu\text{M}$ Ácido indolbutírico (IBA) 0,5 $\mu\text{M}$	Luz 30 días
<b>Germinación con giberelina</b>	Macronutrientes de Sommer MS micronutrientes y vitaminas Sacarosa al 1,5% (p/v) Bencilaminopurina (BAP) 0,2 $\mu\text{M}$ Ácido indolbutírico (AIB) 0,5 $\mu\text{M}$ Ácido giberélico (GA <sub>4</sub> ) 10 $\mu\text{M}$	Luz 30 días

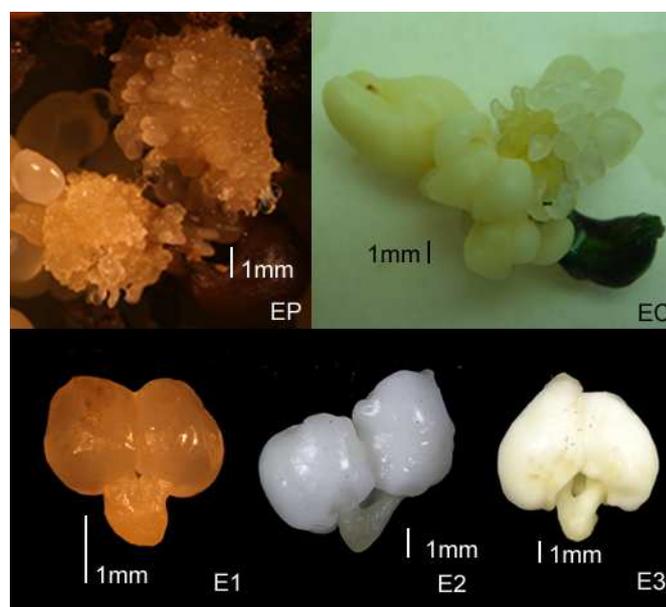
<sup>a</sup> Bueno *et al.* 1992

<sup>b</sup> Pintos *et al.* 2008

<sup>c</sup> Pintos *et al.* 2010

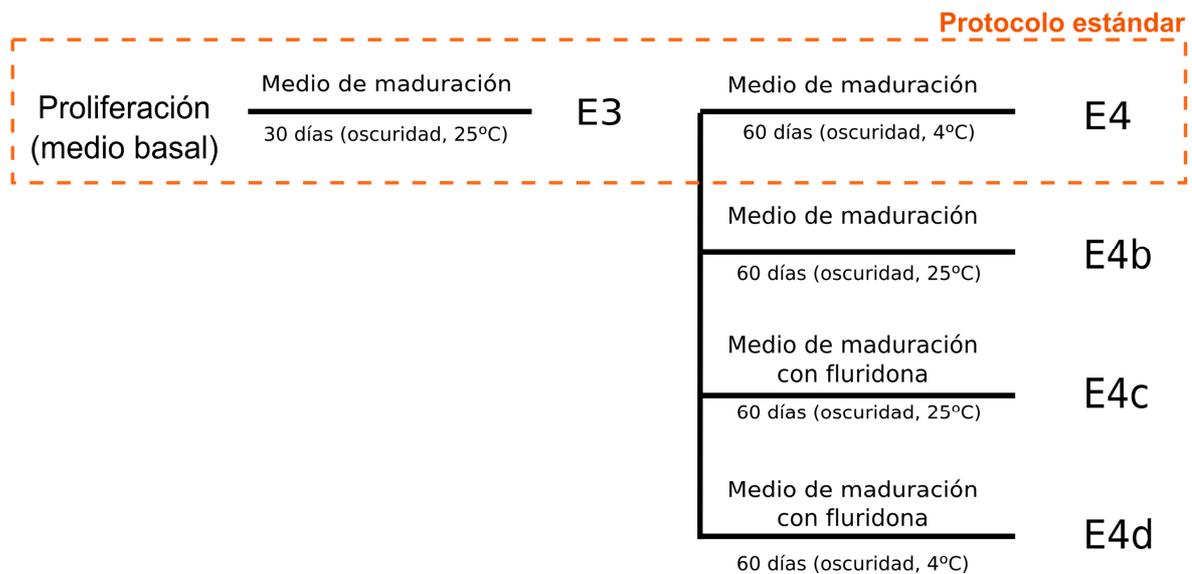
Todos los medios fueron ajustados a un pH de  $5,6\pm 0,1$  y esterilizados durante 20 min bajo una presión de  $1\text{Kg cm}^{-2}$  a  $120^{\circ}\text{C}$ . La glutamina se añadió al medio basal tras la esterilización mediante esterilización por filtro ( $0,22\ \mu\text{m}$ ). Los medios en cuya composición se incluyó agar se dispensaron en placas Petri de 9 cm de diámetro, a las que se añadió 20 ml de medio. Los cultivos se mantuvieron en una cámara de cultivo bajo tubos de fluorescencia blanca (31, 36 vatios) que emiten radiación fotosintéticamente activa (PAR) de  $40\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$  y un fotoperiodo de 16:8 (día/luz) a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Durante la fase de proliferación, los embriones se subcultivaron cada 30 días.

Durante la fase de proliferación, se observaron 4 tipos de estructuras en los cultivos (Figura 2): estadios proliferativos (EP) caracterizados por estructuras callogénicas blancas con embriones globulares; agrupamientos de embriones que mostraban embriogénesis recurrente (EC); embriones cotiledonares tipo E1, definidos como embriones inmaduros y traslúcidos de tamaño de 3-4 mm y embriones cotiledonares tipo E2 que mostraban una coloración blanquecina y opaca sin signos de embriogénesis secundaria y longitud de 6-7 mm.



**Figura 2:** Tipos de estructuras observados durante el proceso de embriogénesis somática en *Q. suber*.

Después de 30 días en proliferación, los embriones somáticos cotiledonares tipo E1 y E2 sin signos de embriogénesis recurrente se maduraron en medio basal suplementado con carbón activo al 1% (medio de maduración) en oscuridad a  $25^{\circ}\text{C}$  durante un mes, obteniéndose embriones tipo E3 (Figura 2) que presentaban un aumento en el tamaño de los cotiledones mientras que el eje embrionario mostraba una coloración amarillenta. Los embriones E3 se transfirieron posteriormente a diferentes medios y condiciones de cultivo durante 8 semanas (Figura 3). Los embriones E4, obtenidos tras un tratamiento en frío y oscuridad corresponden al protocolo descrito para la embriogénesis somática de alcornoque (Bueno *et al.* 1992; Bueno *et al.* 2000; Pintos *et al.* 2008; Pintos *et al.* 2010) y fueron considerados como tratamiento control en el presente trabajo.



**Figura 3.** Esquema de los diferentes tratamientos analizados, con sus respectivos medios de cultivo.

Los embriones obtenidos se rehidrataron en 10 ml de agua destilada estéril durante 24 h a 4°C y posteriormente se germinaron en un medio de germinación con 1,5% sacarosa y suplementado con 0,2 µM de 6-Bencilaminopurina (BAP) and 0,5 µM de Ácido indolbutírico (AIB). Asimismo, los embriones se transfirieron al mismo medio de germinación indicado anteriormente y suplementado con 10 µM de Ácido giberélico (GA<sub>4</sub>).

### 3.3. Caracterización de los embriones

#### 3.3.1. Caracterización macro-morfológica

Una vez finalizado el periodo de cultivo en cada uno de los tratamientos (E4, E4b, E4c y E4d), se realizó una caracterización morfológica visual de los embriones generados en cada uno de ellos.

#### 3.3.2. Capacidad de germinación

La capacidad germinativa de los embriones somáticos procedentes de todos los tratamientos señalados en la Figura 3 se determinó de acuerdo al protocolo descrito por Pintos *et al.* (2008) . Para ello, los embriones se hidrataron en 10 ml de agua destilada y esterilizada durante 24 h a 4°C, y se transfirieron posteriormente a tubos con tapones de celulosa y 10 ml de medio de germinación descrito en la Tabla 1. Se ensayaron 10 embriones por cada tratamiento y medio de germinación, a excepción de los embriones E4 que sólo se transfirieron a medio de germinación sin GAs. La respuesta de germinación se evaluó como el porcentaje de emisión de radícula a los 7, 14, 21 y 28 días.

### 3.4. Separación y cuantificación de ABA

Con el fin de determinar qué efectos produce el frío sobre los niveles de ABA se analizó el contenido endógeno de esta hormona de los embriones E4y E4b.

#### 3.4.1. Extracción de ABA

El ABA se extrajo de acuerdo al protocolo descrito por Pan *et al.*, (2010) con algunas modificaciones. Entre 48 a 90 mg de tejido liofilizado se trituraron en un homogenizador de

fricción modelo Silamat S6 (Ivoclar Vivadent); posteriormente, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de 2-propanol/ $\text{H}_2\text{O}$ / $\text{HCl}$  concentrado (2:1:0.002, v/v/v) y 1,2  $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$  de ABA como estándar interno deuterado. Las muestras se mantuvieron en agitación orbital y oscuridad durante 30 min a 4°C. A continuación se añadió 1 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , y las muestras se mantuvieron de nuevo 30 min en agitación a 4°C y en oscuridad. De las dos fases formadas se recogió la inferior que contenía el ABA, y se concentró en un vial de 2 mL de cristal con flujo de nitrógeno. El material fue almacenado a -20°C hasta de su análisis. Las muestras fueron resuspendidas en 150  $\mu\text{L}$  de metanol absoluto (100%) y filtradas a través de un filtro de celulosa de un tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$  (Agilent Technologies).

#### 3.4.2. Cuantificación de ABA

El ABA fue separado y cuantificado mediante cromatografía de ultra-alta resolución (UHPLC) acoplada a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo 6460 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies) usando el protocolo descrito por Novak *et al.* (2008) para las citoquininas, y adaptado para el análisis de ABA por De la Torre (2011). La separación cromatográfica fue realizada usando una columna de fase reversa (Zorbax SB-C18 2.1 x 50 mm) que se mantuvo a 40°C. La fase móvil estuvo compuesta de formato de amonio (15 mM, pH 4) y de MeOH al 99,9% con COOH al 0,1%. La separación se realizó mediante un gradiente lineal de MeOH desde el 10% al 50% durante 7 min seguido por MeOH al 100% durante 2 min. La hormona fue identificada y cuantificada mediante la monitorización dinámica de reacción múltiple (MRM) de sus iones resultantes, utilizando voltajes optimizados y sus energías de colisión.

### 3.5. Cuantificación de la expresión génica

En el presente trabajo se cuantificó la expresión de los genes *NCED3*, *HDA6* y *HDA19* en los tratamientos E4b, E4c y E4d relativa a la expresión de E4.

#### 3.5.1. Extracción de ARN y síntesis de ADNc.

El ARN total se extrajo a partir de 100 mg de tejido fresco de embriones en todos embriones (Figura 1), mediante el kit de extracción NucleoSpin RNA Plant (Macherey-Nagel) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó el tampón de extracción RAP con 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol y el ADN fue digerido con DNasa (Macherey-Nagel). El ARN fue eluído en 60  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNasa. La concentración y calidad del ARN extraído se estimaron utilizando un Picodrop Microliter UV/Vis Spectrophotometer (Picodrop, United Kingdom) y mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa (1% y con 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de bromuro de etidio), utilizando lambda DNA (New England Biolabs) como marcador del tamaño. La relación 28S/18S fue determinado con el software KODAK 1D Image Analysis (KODAK) para verificar la integridad del ARN.

Para cada muestra, el ADN de cadena simple complementario (ADNc) al ARN mensajero fue sintetizado a partir de 1  $\mu\text{g}$  de ARN utilizando el kit RevertAid<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific), añadiendo 1,5  $\mu\text{L}$  de Random Hexameres oligo (dT) siguiendo el protocolo del fabricante con modificaciones, en el programa del termociclador Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems), que se detalla a continuación: incubación a 25°C durante 10 min, 45°C durante 75 min y, finalmente a 80°C durante 10 min. El ADNc obtenido se almacenó a -20°C hasta su análisis.

### 3.5.2. Real time RT-PCR

Los análisis de PCR cuantitativa RT-PCR se llevaron a cabo en muestras sometidas a todos los tratamientos utilizando cebadores específicos de los genes *NCED3*, *HDA6* y *HDA19* previamente diseñados por Pérez (2014) (Tabla 2). Las reacciones de PCR se realizaron en un sistema 7900 HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems), en un volumen final de 10  $\mu$ L usando 1x Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), 0,2  $\mu$ M de cada cebador específico y 1  $\mu$ L de ADNc diluido 15 veces.

**Tabla 2.** Descripción de los genes de interés analizados en el ensayo y sus respectivos cebadores.

Gen	Cebador en sentido (5' 3')	Cebador reverso (5' 3')	Número de pares de bases del amplicón
<i>NCED3</i>	ACAGGCTTGAAGGAAATCCC	AAGGCTCACCACCAAACCTC	144
<i>HDA 6</i>	CCTCGCCGACGTTAAACCTCTTG	CGGCCAACCCCTCCGACAT	129
<i>HDA 19</i>	CACCATGGAGATGGTGTGG	TCGCGTATGTCACCTGTACC	107
<i>HMG-CoA sintasa</i>	GCAAGCGAGTGATACTGTTTC	TCCATACCTGTGCTCCATTAG	200

Los fragmentos se amplificaron siguiendo el siguiente programa de PCR: activación de la polimerasa a 95°C durante 20 s, seguida de 50 ciclos a 95°C 1 s y 60°C 20 s; la curva de disociación y extensión final fue realizada a 95°C 15 s, 15 s a 60°C y 15 s a 95°C. Se utilizaron 3 réplicas biológicas para cada tratamiento analizado y cada reacción de PCR se realizó por triplicado. Se utilizó como gen de expresión constitutiva para la normalización de la expresión de los genes de interés la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A sintasa (*HMG-CoA*, Tabla 2) de acuerdo a los resultados obtenidos previamente por Pérez (2014).

Para cada gen de interés, los valores de expresión relativa fueron calculados usando el parámetro  $\Delta\Delta C_t$  (Livak and Schmittgen 2001). Los valores se normalizaron de acuerdo a los valores de expresión del gen constitutivo y se muestran en relación a su expresión en E4.

### 3.6. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos a partir de los análisis de ABA, y los valores de expresión génica fueron analizados usando el software SPSS (SPSS Inc., USA) versión 20. La normalidad y la homogeneidad de varianza fueron analizadas mediante los test estadísticos de Kolmogorov-Smirnov y Levene respectivamente. Las diferencias entre los datos obtenidos fueron contrastados con un análisis de la varianza de una vía (ANOVA), y un test Duncan a posteriori. En todos los casos, el nivel de significación fue de 0,05.



## 4. Resultados

### 4.1. Caracterización macro-morfológica

Tras la aplicación de los distintos tratamientos, se observó que los embriones E4 (tratamiento con frío), E4b (ausencia de frío) y E4d (tratamiento con frío y fluridona) muestran características morfológicas similares, con un eje embrionario elongado y de tonalidad blanco-amarillenta y los cotiledones grandes (Figura 4).

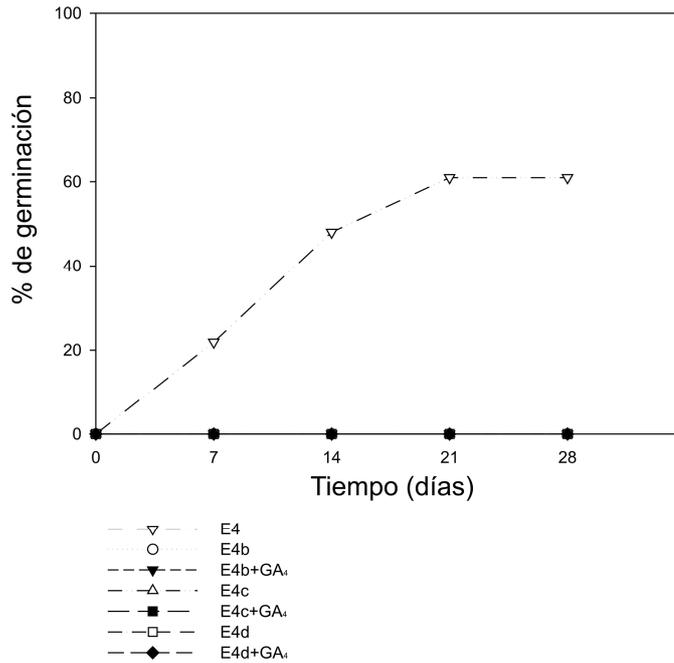


**Figura 4.** Aspecto de los embriones obtenidos tras la aplicación de los distintos tratamientos. Las flechas señalan las masas embriogénicas formadas en el ápice.

Por el contrario, los embriones E4c que habían sido sometidos a un tratamiento con fluridona, mostraron embriogénesis recurrente en el extremo apical del eje embrionario.

### 4.2. Capacidad de germinación

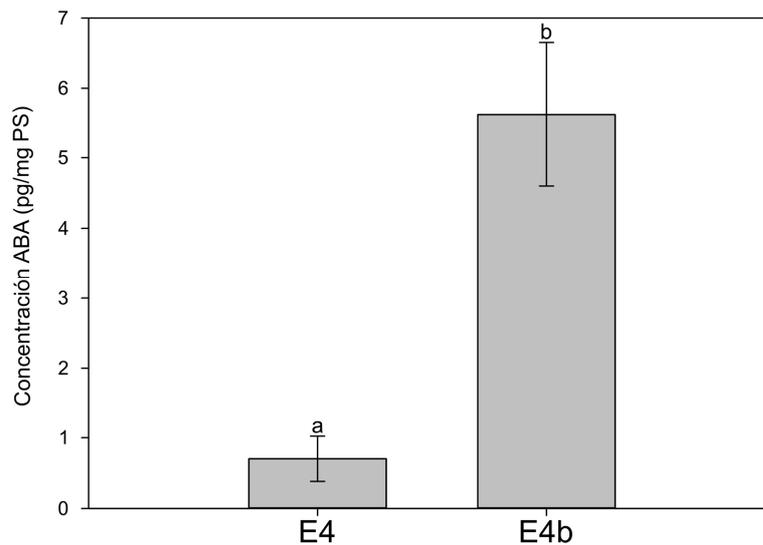
Tras el ensayo de la germinación, se observó que sólo los embriones E4 mostraron capacidad germinativa, alcanzando porcentajes de germinación en torno al 60% tras 21 días. En el resto de tratamientos no se obtuvo respuesta de germinación, ni se logró estimular la misma mediante la adición de giberelinas al medio de cultivo (Figura 5).



**Figura 5.** Porcentaje de germinación de los embriones E4, E4b, E4c y E4d en medio con y sin giberelinas.

### 4.3. Cuantificación ABA

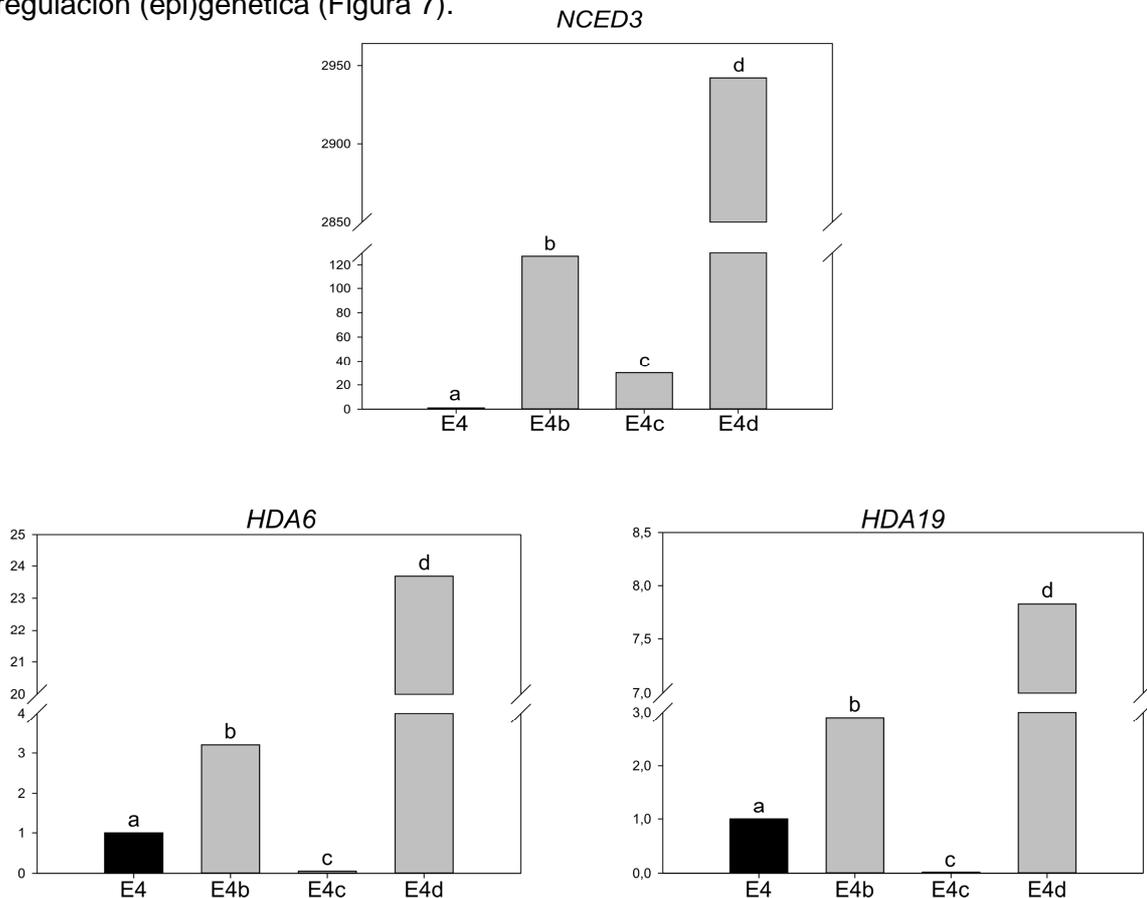
La cuantificación de los niveles endógenos de ABA muestra diferencias significativas entre los tratamientos E4 y E4b (con estratificación en frío durante su maduración y sin ella, respectivamente). Para los embriones E4, la cantidad de ABA estuvo en torno a los 0,7 pg/mg de peso seco (PS), mientras que en los E4b, la cantidad de ABA endógeno fue significativamente mayor, alrededor de los 5,6 pg/mg PS (Figura 6).



**Figura 6.** Contenido de ABA en los embriones E4 y E4b. Distintas letras indican diferencias significativas (datos analizados estadísticamente mediante un test ANOVA,  $P \leq 0,05$ ).

#### 4.4. Expresión génica diferencial de *NCED3*, *HDA6* y *HDA19*

El análisis de la expresión génica mediante PCR en tiempo real nos permitió determinar que existen cambios significativos entre los distintos tratamientos estudiados en los niveles de expresión de los genes de interés relacionados con la síntesis de ABA y mecanismos de regulación (epi)genética (Figura 7).



**Figura 7.** Expresión génica relativa de *NCED3*, *HDA6* y *HDA19* en los diferentes tratamientos, analizada mediante PCR en tiempo real. La expresión se normalizó con los valores obtenidos para *HMG*, y se muestra la expresión de los genes en los diferentes tratamientos relativa a E4. Diferentes letras indican diferencias significativas (datos analizados mediante ANOVA y test de Duncan a posteriori.  $P \leq 0,05$ ).

Se observó que los mayores niveles de expresión de todos los genes analizados fueron obtenidos en el embrión E4d, el cual había sido cultivado en un medio suplementado con fluridona y sometido a un proceso de estratificación en frío.

El gen *NCED3*, implicado en la ruta de síntesis del ABA, muestra valores de expresión superiores a los del control (E4) en todos los tratamientos realizados, siendo mayores en los embriones tipo E4b y E4d.

Las dos histonas deacetilasas estudiadas (*HDA6* y *HDA19*) muestran patrones de expresión similares, con valores significativamente superiores al control en los embriones E4b y E4d mientras que en los embriones que habían sido sometidos a un tratamiento con fluridona y cultivados en ausencia de frío (E4c) se observan valores de expresión menores al control E4.



## 5. Discusión

### 5.1. Efecto del frío y la fluridona en los niveles de ABA y en su ruta de síntesis y la capacidad de germinación

El ácido abscísico (ABA) es un regulador clave del crecimiento de las plantas, y juega un papel muy importante en procesos tales como la germinación o el crecimiento de las semillas y su desarrollo (Chinnusamy *et al.* 2008). Asimismo, durante los procesos de embriogénesis somática, el ABA regula la acumulación de sustancias de reserva y, se ha descrito que, sólo aquellos embriones que han acumulado suficientes sustancias de reserva son capaces de desarrollarse en plantas (Rai *et al.* 2011).

En semillas, la entrada en la fase de desecación y el final de la maduración están asociadas con una disminución del contenido endógeno de ABA (Nambara and Marion-Poll 2003; Gutierrez *et al.* 2007; Zhang and Ogas 2009). Esta dinámica se ha descrito también para semillas de especies pertenecientes al género *Quercus* (Michalski 1986; Prewein *et al.* 2006; Ghasemi and Khosh-Khui 2007). La disminución del contenido endógeno de ABA después de un tratamiento con frío se ha correlacionado con un incremento en la capacidad germinativa (Kermode 2005); más aún, se ha descrito que tras un proceso de estratificación en frío el catabolismo de ABA es más activo en embriones de *Fagus sylvatica* (Le Page-Degivry *et al.* 1997). Este hecho podría explicar el aumento de los niveles endógenos de ABA observados en los embriones E4b que no han experimentado un periodo de frío frente a los embriones tipo E4 que han sido sometidos a una estratificación a 4°C durante 8 semanas. De hecho, en embriones de alcornoque, se ha observado que el porcentaje de germinación es mayor cuando se someten a un periodo de frío de dos meses (García-Martín *et al.* 2001). Esto apoyaría lo observado en los embriones E4, los únicos con capacidad para germinar con un porcentaje de germinación similar al obtenido en estudios anteriores en embriones somáticos del género *Quercus* (Wilhem 2000; Vietez *et al.* 2012), mientras que en los demás tratamientos no se obtuvo respuesta.

La fluridona es un herbicida sistémico y selectivo que inhibe a la fitoeno desaturasa, uno de los enzimas clave en la síntesis de carotenoides que actúan como precursores del ABA, la cual se localiza en la membrana de los tilacoides y cuya función es la de deshidrogenar al fitoeno (Chae *et al.* 2003). Es por ello que se trató de determinar si los efectos de esta sustancia en los embriones somáticos de *Q. suber* eran análogos a los provocados por la estratificación en frío y si los mismos tenían repercusión sobre la capacidad germinativa de los embriones.

En los embriones E4c y E4d, los cuales fueron expuestos a fluridona y fluridona más frío respectivamente, cabría esperar que la síntesis de ABA estuviese inhibida, por lo que la germinación no debería verse afectada. Sin embargo ninguno de los dos tipos de embriones germinaron. Estudios anteriores han demostrado que el uso de la fluridona sin la adición de ácido giberélico es mucho menos efectivo en la ruptura de la dormición que el uso de ambos compuestos simultáneamente (Schmitz *et al.* 2001), lo que indica que una supuesta disminución de la cantidad de ABA por sí sola no es suficiente para promover la germinación, y que otros cambios (como el aumento en la síntesis de giberelinas al final de la fase de maduración) son necesarios. Esto explicaría los resultados obtenidos en nuestro sistema experimental, ya que la fluridona y la GA<sub>4</sub> fueron incluidas en diferentes medios (proliferación y germinación) y no de forma combinada. Además, estudios recientes en semillas de trigo

han demostrado que la fluridona aplicada en condiciones de frío no solo afecta a los niveles de ABA, sino que también es capaz de producir un descenso en el contenido de giberelinas endógenas (Kondhare *et al.* 2014). Esto se apoya en estudios anteriores realizados en *Arabidopsis*, en los cuales se señala que el fenotipo albino de los mutantes carentes de la actividad enzimática de la fitoeno desaturasa es revertido al fenotipo silvestre mediante la adición de GAs exógenas, además de que los genes implicados en la ruta de biosíntesis de esta hormona presentan una expresión menor en comparación con el tipo silvestre (Qin *et al.* 2007). Todo esto explicaría por qué los embriones expuestos a fluridona durante su fase de maduración y posteriormente puestos a germinar en medio con y sin giberelinas no fueron capaces de germinar.

La síntesis del ABA y los enzimas implicados en su ruta metabólica, han sido ampliamente estudiados (Nambara y Marion-Poll 2003; Taiz y Zeiger 2006; Rai *et al.* 2011). Gracias a ello, hoy en día se conocen cuáles son los procesos metabólicos que tienen lugar en la biosíntesis de esta hormona, y los genes que codifican los enzimas implicados en este proceso han sido identificados (Rai *et al.* 2011). La familia de los genes que codifican para la 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (*NCED*), enzimas clave en esta ruta de biosíntesis, ha sido estudiada en numerosas especies (Iuchi *et al.* 2001; Frey *et al.* 2012). Entre ellos, el gen *NCED3* ha sido descrito como un gen que juega un papel importante durante los procesos de embriogénesis (Frey *et al.* 2012; Tan *et al.* 2003; Le *et al.* 2010). Asimismo, se ha descrito que, al igual que lo observado en nuestros resultados, existe una correlación entre los niveles endógenos de ABA y la expresión de *NCED3* (Chernys y Zeevaart 2000; Kermode 2005; Pérez *et al.* 2014). Esta correlación se observa en los resultados obtenidos en la cuantificación de la hormona en los embriones E4b, que presenta niveles significativamente superiores a los E4, cuando se comparan con los niveles de expresión del *NCED3*.

A pesar de que el resultado esperado en los embriones tratados con fluridona o fluridona y frío fuese de un descenso en los niveles de expresión de *NCED3*, la elevada expresión de este gen observada en E4c y E4d con respecto al E4, puede deberse al estrés generado con la inhibición de la fitoeno desaturasa con la fluridona (Frey *et al.* 2012). Esto tiene como consecuencia un descenso en la síntesis de carotenoides necesarios para evitar la fotooxidación de los tejidos, y en mutantes para este enzima se ha descrito un importante aumento en la inducción de la expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con estrés (Qin *et al.* 2007). Bajo estas condiciones los tejidos podrían estar sintetizando ABA a partir de los carotenoides acumulados antes de la exposición a la fluridona, como indican Gamble and Mullet (1986), lo que justificaría una sobreexpresión de gen *NCED3*. Además, en los embriones E4d, el efecto de la fluridona y el frío parecen tener un efecto combinado que también se observa en los otros genes.

## **5.2. Regulación epigenética de la maduración de los embriones**

En las plantas, las histonas deacetilasas (HDACs) HDA6 y HDA19, juegan un papel fundamental en la regulación del proceso embriogénico, la represión de los principales genes relacionados con la embriogénesis y con la maduración de las semillas y la sensibilidad al ABA (Kim *et al.* 2012).

Mutantes de *Arabidopsis* para la histona HDA19 mostraron en el estudio de Chen *et al.* (2010 a y b) un fenotipo de sensibilidad a ABA y a estrés abiótico similar a los mutantes para

la histona HDA6, así como unos patrones de expresión génica parecidos. El hecho de que los resultados de estos autores coincidan con los obtenidos en este trabajo, sugiere que ambas enzimas podrían tener un papel redundante en la modulación de la expresión de los genes de respuesta a ABA ya que se observa que ambos genes poseen un patrón de expresión similar en los diferentes tratamientos.

En otros trabajos, se ha señalado que la ruptura la dormición de las semillas de *Arabidopsis* mediante la estratificación en frío tiene como resultado una mayor expresión global de todos los genes analizados (Finch-Savage *et al.* 2007), posiblemente promovida por cambios en las marcas epigenéticas de los promotores de los genes, incluyendo la desaparición de otras marcas represivas como la deacetilación de las histonas. Esto explicaría la mayor expresión de ambos genes en los embriones E4b, los cuales no han sido sometidos a bajas temperaturas durante su maduración. Además, en el estudio de Chen *et al.* (2010a), los autores señalan que la actividad de ambas HDACs es necesaria para la inducción total de los genes implicados en la respuesta a ABA, y para la inducción por ABA de la acetilación de otros residuos de histonas. Esto apoyaría lo comentado anteriormente, ya que los embriones E4b presentan un mayor contenido de ABA con respecto a los E4.

En los embriones E4c, se observa una expresión de ambos genes significativamente menor que en los demás tratamientos. Esto podría estar relacionado con la alta tasa de embriogénesis recurrente observada en estos embriones al final de tratamiento (Figura 4). Se ha descrito que antes del inicio de un proceso de desarrollo, existe una reprogramación de la expresión génica que va acompañada de una demetilación generalizada y un proceso de apertura de la cromatina (Valledor *et al.* 2007; Viejo *et al.* 2012). Además, en el estudio realizado por Tanaka *et al.* (2008) se observa que los dobles mutantes de *Arabidopsis* para *HDA6* y *HDA19* de 6 semanas de edad presentan formación de estructuras embrionarias en las hojas, por lo que se podría concluir que la baja expresión de los genes que codifican para estas enzimas están favoreciendo la embriogénesis observada en los embriones E4c.

En los embriones E4d, los niveles de expresión de los genes *HDA6* y *HDA19* son significativamente mayores que en los demás tratamientos. Un estudio reciente indica que la acción de estas enzimas juega un papel muy importante en la adquisición de tolerancia al frío en plantas de *Arabidopsis* (To *et al.* 2011). Además, el mismo estudio también señala que una exposición durante más de 4 semanas a bajas temperaturas promueve la transcripción de los genes *HDA6* y *HDA19*. El hecho de que los niveles de expresión de estos genes sean significativamente mayores en el tratamiento E4d con respecto al E4, en el cual los embriones también son sometidos a estratificación en frío, sugiere que debe existir un efecto sinérgico entre el estrés causado por la exposición a la fluridona y las bajas temperaturas que promueve la expresión de estos genes al igual que ocurría con *NCED3*.



## 6. Conclusiones

1- La estratificación en frío es necesaria para que los embriones somáticos de *Q. suber* adquieran competencia germinativa.

2- La aplicación de fluridona, inhibidor de la síntesis de ABA, durante la maduración y/o de GA<sub>4</sub> en el medio de germinación no tiene efectos análogos al frío. Además, parece influir en otros procesos fisiológicos (aparición de embriogénesis recurrente).

3- Existe un efecto sinérgico entre la estratificación en frío y la aplicación de fluridona sobre el aumento de la expresión génica del gen *NCED3* implicado en la ruta de síntesis del ABA que podría relacionarse con el estrés generado por la inhibición de la biosíntesis de los carotenoides.

4- Los niveles de ABA están implicados en la regulación epigenética llevada a cabo por *HDA6* y *HDA19*.

5- La fluridona puede promover la expresión de programas de desarrollo embrionarios y la apertura de la cromatina.



## 7. Bibliografía

- Braybrook, S. A., Harada, J. J. (2008). LECs go crazy in embryo development. *Trends Plant Sci*, 13(12), 624-630. doi: 10.1016/j.tplants.2008.09.008.
- Brocard-Gifford, I.M., Lynch, T.J., Finkelstein, R.R. (2003). Regulatory networks in seeds integrating developmental, abscisic acid, sugar, and light signaling. *Plant Physiol*, 131: 78-92.
- Bueno, M.A., Astorga, R., Manzanera, J.A. (1992). Plant regeneration through somatic embryogenesis in *Quercus suber*. *Physiol Plant*, 85: 30-34.
- Bueno, M.A., Gomez, A., Manzanera, J.A. (2000). Somatic and gametic embryogenesis in *Quercus suber* L. In: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, Forestry Sciences, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, vol 6, pp 470-508.
- Chae, S. H., Yoneyama, K., Takeuchi, Y., Joel, D. M. (2004). Fluridone and norflurazon, carotenoid-biosynthesis inhibitors, promote seed conditioning and germination of the holoparasite *Orobancha minor*. *Physiol Plant*, 120(2), 328-337. doi: 10.1111/j.0031-9317.2004.0243.
- Chen, L.-T., Luo, M., Wang, Y.-Y., Wu, K. (2010). Involvement of Arabidopsis histone deacetylase HDA6 in ABA and salt stress response. *Journal of Experimental Botany*, 61(12), 3345-3353. doi: 10.1093/jxb/erq154.
- Chen, L. T., Wu, K. (2010). Role of histone deacetylases HDA6 and HDA19 in ABA and abiotic stress response. *Plant Signaling and Behaviour*, 5(10), 1318-1320. doi: 10.4161/psb.5.10.13168.
- Chernys, J.T., Zeevaart, A.D. (2000). Characterization of the 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado. *Plant Physiol*, 124: 343-353.
- Chinnusamy, V., Gong, Z., Zhu, J. K. (2008). Abscisic acid-mediated epigenetic processes in plant development and stress responses. *J Integr Plant Biol*, 50(10), 1187-1195. doi: 10.1111/j.1744-7909.2008.00727.x
- Colmenares, M., Jiménez, C. (2003). Multiplicación in vitro *Musa* spp. Mediante sistema de inmersión temporal. *Rev Fac Agron*, 20 (4): 468 – 477. ISSN 0378-7818.
- Du, H., Wu, N., Chang, Y., Li, X., Xiao, J., Xiong, L. (2013). Carotenoid deficiency impairs ABA and IAA biosynthesis and differentially affects drought and cold tolerance in rice. *Plant Mol Biol*, 83(4-5), 475-488. doi: 10.1007/s11103-013-0103-7.
- Etienne, H., Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 69: 215-231.
- Finch-Savage, W.E., Cadman, C.S.C., Toorop, P.E., Lynn, J.R., Hilhorst, H.W.M. (2007). Seed dormancy release in *Arabidopsis Cvi* by dry after-ripening, low temperature, nitrate and light shows common quantitative patterns of gene expression directed by environmentally specific sensing. *Plant J*, 51:60-78.

- Fraga, M. F., Rodríguez, R., Cañal, M. J. (2003). Reinvigoration of *Pinus radiata* is associated with partial recovery of juvenile-like polyamine concentrations. *Tree Physiology*, 23(3), 205-209. doi: 10.1093/treephys/23.3.205.
- Frey, A., Effroy, D., Lefebvre, V., Seo, M., Perreau, F., Berger, A., Marion-Poll, A. (2012). Epoxy-carotenoid cleavage by NCED5 fine-tunes ABA accumulation and affects seed dormancy and drought tolerance with other NCED family members. *The Plant Journal*, 70(3), 501-512. doi: 10.1111/j.1365-3113.2011.04887.x
- Fong, F., Smith, J. D., Koehler, D. E. (1983). Early Events in Maize Seed Development : 1-Methyl-3-phenyl-5-(3-[trifluoromethyl]phenyl)-4-(1H)-Pyridinone Induction of Vivipary. *Plant Physiol*, 73(4), 899-901.
- Gamble, P. E., Mullet, J. E. (1986). Inhibition of carotenoid accumulation and abscisic acid biosynthesis in fluridone-treated dark-grown barley. *Eur J Biochem*, 160(1), 117-121.
- Ghasemi, M., Khosh-Khui, M. (2007). Effects of stratification and growth regulators on seed germination and seedling growth of *Quercus ilex* L. *J. Plant Sci*, 2(3): 341-346.
- Gil, L., Varela, C. (2008). EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use of cork oak (*Quercus suber*). Biodiversity International, pp 1-6.
- Gutierrez, L., Van Wuytswinkel, O., Castelain, M., Bellini, C. (2007). Combined networks regulating seed maturation. *Trends Plant Sci*, 12(7): 294-300.
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Shinozaki, K. (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J*, 27(4), 325-333.
- Jenuwein, T., Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science*, 293(5532), 1074-1080. doi: 10.1126/science.1063127.
- Kermode, A. R. (2005). Role of Abscisic Acid in Seed Dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation*, 24(4), 319-344. doi: 10.1007/s00344-005-0110-2.
- Kim, J. M., To, T. K., Seki, M. (2012). An epigenetic integrator: new insights into genome regulation, environmental stress responses and developmental controls by histone deacetylase 6. *Plant Cell Physiol*, 53(5), 794-800. doi: 10.1093/pcp/pcs004.
- Kondhare, K. R., Hedden, P., Kettlewell, P. S., Farrell, A. D., Monaghan, J. M. (2014). Use of the hormone-biosynthesis inhibitors fluridone and paclobutrazol to determine the effects of altered abscisic acid and gibberellin levels on pre-maturity  $\alpha$ -amylase formation in wheat grains. *Journal of Cereal Science*, 60(1), 210-216. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2014.03.001>.
- 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.
- Michalski, L. (1986). The content of abscisic acid in the developing seeds of oak (*Quercus robur* L.). *Biologia Plantarum*, 28(6), 434-439. doi: 10.1007/BF02885047.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth on bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, 15: 473-497.

Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2013). ABA signaling in stress-response and seed development. *Plant Cell Reports*, 32(7), 959-970. doi: 10.1007/s00299-013-1418-1.

Nambara, E., Marion-Poll, A. (2003). ABA action and interactions in seeds. *Trends Plant Sci.* 8(5): 213-219.

Neelakandan, A.K., Wang, K. (2012). Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Rep.* 31: 597-620. doi: 10-1007/s00299-011-1202.

Novak, O., Hauserova, E. (2008). Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* 69(11): 2214-2224

Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods*. 25: 402-408.

Le Page-Degivry, M. T., Garello, G., Barthe, P. (1997). Changes in Abscisic Acid Biosynthesis and Catabolism during Dormancy Breaking in *Fagus sylvatica* Embryo. *Journal of Plant Growth Regulation*, 16(2), 57-61. doi: 10.1007/PL00006978.

Le, B.H., Cheng, C., Bui, A.Q., Wagmaister, J.A., Henry, K.F., Pelletier, J., Kwong, L., Belmonte, M., Kirkbride, R., Horvath, S., Drews, G.N., Fischer, R.L., Okamoto, J.K., Harada, J.J., Goldberg, R.B. (2010). Global analysis of gene activity during Arabidopsis seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107: 8063-8070.

Lelu-Walter, M.A., Thompson, D., Harvengt, L., Sánchez, L., Toribio, M., Pâques, L.E. (2013). Somatic embryogenesis in forestry with focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction. *Tree Genet. Genomics*. 9: 883-899. doi: 10.1007/s11295-013-0620-1.

Pan, X., Welti, R., Wang, X. (2010). Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Nature Protocols*. 5(6):986-92.

Pérez, M. (2014). Embriogénesis somática en *Quercus suber* L. Optimización de la proliferación en sistemas de inmersión temporal y regulación epigenética de la maduración. Tesis doctoral. Departamento de Biología de Organismos y Sistemas. Universidad de Oviedo.

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 Organ Cult* 95(2): 217-225. doi: 10.1007/s11240-008-9435-4.

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*. doi: 10.1051/forest/2009098.

Prewein, C., Endemann, M., Reinöhl, V., Salaj, J., Sunderlikova, V., Wilhelm, E. (2006). Physiological and morphological characteristics during development of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) zygotic embryos. *Trees*, 20(1), 53-60. doi: 10.1007/s00468-005-0012-8.

Qin, G., Gu, H., Ma, L., Peng, Y., Deng, X. W., Chen, Z., Qu, L. J. (2007). Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. *Cell Res*, 17(5), 471-482. doi: 10.1038/cr.2007.40.

Rai, M., Shekhawat, N. S., Harish, Gupta, A., Phulwaria, M., Ram, K., Jaiswal, U. (2011). The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 106(2), 179-190. doi: 10.1007/s11240-011-9923-9.

Rodríguez-Gacio, M.C., Matilla-Vázquez, M.A., Matilla, A.J. (2009). Seed dormancy and ABA signaling. *Plant Signal. Behav.* 4(11): 1035-1048.

Roels, S., Escalona, M., Cejas, I., Noceda, C., Rodríguez, R., Cañal, M.J., Sandoval, J., Debergh, P. (2005). Optimization of plantain (*Musa AAb*) micropropagation by temporary immersion system. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 82: 57-66.

Schmitz, N., Xia, J-H., Kermode, AR. (2001). Dormancy of yellow-cedar seeds is terminated by gibberellic acid in combination with fluridone or with osmotic priming and moist chilling. *Seed Science Technology*, 29 (1), 331-346.

Seo, M., Koshiba, T. (2002). Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *TRENDS Plant Sci.* 7(1): 41-48.

Soler, M., Serra, O., Molinas, M., García-Berthou, E., Caritat, A., Figueras, M. (2008). Seasonal variation in transcript abundance in cork tissue analyzed by real time RT-PCR. *Tree Physiology.* 28: 743-751.

Sommer, H.E., Brown, C.L., Kormanik, P.P. (1975). Differentiation of plantlets in longleaf pine (*Pinus palustris* Mill.) tissue culture in vitro. *Botanical Gazette.* 136: 196-200.

Song, C.-P., Agarwal, M., Ohta, M., Guo, Y., Halfter, U., Wang, P., Zhu, J.-K. (2005). Role of an *Arabidopsis* AP2/EREBP-Type Transcriptional Repressor in Abscisic Acid and Drought Stress Responses. *The Plant Cell Online*, 17(8), 2384-2396. doi: 10.1105/tpc.105.033043.

Taiz, L., Zeiger, E. (2006). *Plant Physiology*. In: Sinauer Associates (ed). Massachusetts, USA, pp 1-764.

Tan, B.C, Joseph, L.M., Deng, W.T., Liu, L., Li, Q.B., Cline, K., McCarty, D.R. (2003). Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene family. *Plant Journal.* 35: 44-56.

Tanaka, M., Kikuchi, A., Kamada, H. (2008). The *Arabidopsis* histone deacetylases HDA6 and HDA19 contribute to the repression of embryonic properties after germination. *Plant Physiol.* 146: 149– 161.

To, T. K., Nakaminami, K., Kim, J.-M., Morosawa, T., Ishida, J., Tanaka, M., Seki, M. (2011). *Arabidopsis* HDA6 is required for freezing tolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 406(3), 414-419. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.058>.

Torre de la, C. (2011). Desarrollo de técnicas analíticas para la valoración del perfil hormonal en especies forestales. Proyecto Fin de Máster "Técnicas Experimentales Aplicadas al Manejo y Conservación de los Recursos Biológicos. Facultad de Biología. Universidad de Oviedo.

Tuteja, N. (2007). Abscisic Acid and abiotic stress signaling. *Plant Signal Behav*, 2(3), 135-138.

Vieitez, A.M., Corredoira, E., Martínez, M.T., San-José, M.C., Sánchez, C., Valladares, S., Vidal, N., Ballester, A. (2012). Application of biotechnological tools to *Quercus* improvement. *Eur. J. Forest Res.* 131: 519- 539. doi: 10.1007/s10342-011-0526-0.

Valledor, L., Hasbún, R., Meijón, M., Rodríguez, J.L., Santamaría, E., Viejo, M., Berdasco, M., Feito, I., Fraga, M.F., Cañal, M.J., Rodríguez, R. (2007). Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 91: 75-86. doi: 10.1007/s11240-007-9262-z.

Viejo, M., Santamaría, M.E., Rodríguez, J.L., Valledor, L., Meijón, M., Pérez, M., Pascual, J., Hasbún, R., Fraga, M.F., Berdasco, M., Toorop, P.E., Cañal, M.J., Rodríguez, R. (2012). Epigenetics, the role of DNA methylation in tree development. In : Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N (eds). *Plant Cell Culture Methods, Methods in Molecular Biology*, Springer, Netherlands, vol. 877, pp 277-301.

von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 233-249. doi: 10.1023/A:1015673200621.

Wilhem, E. (2000). Somatic embryogenesis in oak (*Quercus* spp.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 36: 349-357.

WWF/MEDPO (2006). Cork screwed?. Environmental and economic impacts of the cork stoppers market.

Zhang, H., Ogas, J. (2009). An epigenetic perspective on developmental regulation of seed genes. *Mol. Plant.* 2(4): 610-627.