



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



## La investigación molecular con encina (*Quercus ilex*): por qué, para qué y cómo

TIENDA-PARRILLA, M., LABELLA-ORTEGA, M., HERNÁNDEZ-LAO, T., DOROUDI, A., HONRUBIA-GÓMEZ, I., GUERRERO-SANCHEZ, VM., SAN-EUFRASIO, B., LÓPEZ-HIDALGO, C., SÁNCHEZ-LUCAS, R., ESCANDÓN, M., MALDONADO-ALCONADA, AM., CASTILLEJO MA., JORRÍN-NOVO, JV., REY, MD.

Bioquímica, Proteómica y Biología de Sistemas Vegetal y Agroforestal, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba, UCO-CeiA3, 14014 Córdoba, España.

### Resumen

El grupo de investigación “Bioquímica, Proteómica, y Biología de Sistemas Vegetal y Agroforestal” de la Universidad de Córdoba, inició en 2004 una línea de investigación centrada en encina cuyo objetivo es optimizar técnicas moleculares, en especial ómicas, y generar conocimiento sobre aspectos claves de su biología y de la variabilidad y estructura genética de individuos y poblaciones. Se han puesto a punto técnicas de análisis ómico generando el transcriptoma, proteoma y metaboloma de encina. Actualmente, estamos avanzando en un primer borrador del genoma de la especie. Las técnicas mencionadas se combinan con otras clásicas de fisiología y bioquímica en la dirección de la Biología de Sistemas. Dichas aproximaciones, junto con la de marcadores de DNA y epigenética, se emplean en el estudio de la variabilidad, biodiversidad, carácter recalcitrante de las semillas, respuestas a estreses bióticos y abióticos asociados al síndrome de la seca y el cambio climático. También, estamos identificando posibles alérgenos en semilla y polen, así como compuestos bioactivos con posible actividad anticancerígena y antimicrobiana.

Disponemos de marcadores de DNA, epigenéticos, proteínas y metabolitos relacionados con la variabilidad inter- e intrapoblacional y la respuesta a estreses. Se han identificado genes y productos génicos indicadores de variabilidad e implicados en la respuesta a estreses.

### Palabras clave

Encina, *Quercus ilex*, seca, cambio climático, biodiversidad, ómicas, Biología de Sistemas.

### 1. Introducción

El género *Quercus*, familia Fagaceae, comprende alrededor de 500 especies, siendo una de las angiospermas leñosas más importantes y dominantes del hemisferio norte, con relevancia desde el punto de vista ambiental y económico (Manos et al., 1990; Nixon, 1993). Dentro del género, la encina (*Quercus ilex* subp. *ballota* (Desf.) Samp) (Figura 1) es la especie predominante del ecosistema forestal mediterráneo y del sistema agrosilvopastoral “dehesa” (De Rigo & Caudillo, 2016). En España, la dehesa ocupa un total de 3,6 millones de Ha, y el bosque mediterráneo un total de 6 millones Ha (Campos et al., 2020). La encina es considerada parte del patrimonio natural de España debido a su gran importancia superficial, medioambiental, ecológica, social y económica. Su fruto, la bellota, que antiguamente formaba parte de la dieta humana, es utilizado como principal alimento del cerdo ibérico, dando lugar a jamón y embutidos de calidad y alto valor nutricional (Cantos et al., 2003; Tejerina et al., 2011; Akcan et al., 2017; López-Hidalgo et al., 2021). En la actualidad, hay un cambio en la percepción en el uso de la bellota debido al renovado interés con fines alimenticios e industriales, lo cual le daría valor añadido a esta especie forestal.

El manejo y conservación de encinares es una prioridad de la política forestal en España, consciente de los grandes beneficios ambientales, sociales y económicos que estas masas arbóreas aportan (Carrasco et al., 2009). Sin embargo, en la actualidad *Q. ilex* se enfrenta a serios problemas

que ponen en riesgo su conservación y uso. A ello contribuye factores tales como el envejecimiento de los árboles, la pérdida de subvenciones, la sobreexplotación, los factores bióticos y abióticos entre los que destaca el síndrome de la seca o el alto grado de intervención antrópica (principalmente, incendios forestales). Incluso, la situación puede verse agraviada en un escenario de cambio climático (Allen et al., 2010, 2015). De todos los problemas citados, cabría destacar el síndrome de la seca. El término “seca” hace referencia a un conjunto de síntomas producido por diversos factores (climáticos, edáficos y biológicos) que provocan el declive de especies forestales tales como *Q. suber* (alcornoque) y *Q. ilex* (Moralejo et al., 2009). La sintomatología que presentan los árboles afectados es inespecífica: defoliación, muerte regresiva de brotes y ramos, abundante emisión de brotes adventicios, necrosis del sistema radical, acabando con la muerte del individuo (Brasier, 1996; Sánchez et al., 2000; Viva et al., 2021). Los agentes bióticos y abióticos causantes del síndrome de la seca son múltiples, de manera que ninguno de ellos por separado es capaz de reproducir los síntomas observados en campo. Actualmente, la atención recae sobre el patógeno causante de la podredumbre radical *Phytophthora cinnamomi*, quien, asociado a factores climáticos como la sequía, son los principales causantes de la seca (Brasier, 1996; Sánchez et al., 2002; Ruiz-Gómez et al., 2018; Frisullo et al., 2018; San-Eufrasio et al., 2021a). Aunque la encina es considerada una especie tolerante a la sequía, ya que posee adaptaciones morfológicas, fisiológicas, y moleculares que le permiten resistir a este tipo de estrés (Barbetta & Peñuelas, 2016), es un hecho constatado la muerte de individuos juveniles tras su trasplante a campo en condiciones de estrés múltiple, como es la sequía junto con la presencia del patógeno *P. cinnamomi* (Cobos et al., 1993; San-Eufrasio et al., 2021a).

Ante la preocupante situación que atraviesa *Q. ilex*, es urgente proponer alternativas para la conservación, gestión sostenible, reforestación y aprovechamiento de esta especie y, por ende, de su ecosistema. En este sentido, la biotecnología, basada en el conocimiento biológico, especialmente a nivel molecular, es una alternativa a integrar con otras estrategias preventivas y curativas (culturales, químicas o biológicas) (Escandón et al., 2021). Desde el punto de vista biotecnológico, se pueden llevar a cabo diferentes estrategias como son la mejora genética clásica, la ingeniería genética, la búsqueda de agroquímicos y el aprovechamiento de la biodiversidad. Es esta última la considerada como la más factible, teniendo en cuenta las características biológicas de *Q. ilex* (ciclo biológico largo, alógama) y que es, además, una especie no domesticada y recalcitrante. Dicha estrategia intenta explotar la enorme variabilidad fenotípica encontrada en la especie y se basa en la selección de genotipos élite o plus (San-Eufrasio et al., 2020, 2021a; López-Hidalgo et al., 2021). Es, por tanto, necesario caracterizar desde un punto de vista morfológico, fisiológico y molecular la variabilidad y diversidad, apoyado por técnicas de marcadores moleculares relacionados con genotipos élite en términos de mayores tasas de germinación, mayor producción de bellota con rasgos de calidad deseables relacionados con valores nutricionales, o adaptación a estreses bióticos y abióticos adversos (Rey et al., 2019; Escandón et al., 2021). Hasta la fecha, el número de trabajos científicos centrados en los aspectos moleculares de la encina es limitado ya que debido a las dificultades metodológicas supone un reto (Escandón et al. 2021). Sin embargo, a pesar de la dificultad que presenta dicha especie forestal desde un punto de vista experimental, la biodiversidad existente puede ser caracterizada siguiendo el Dogma Central de la Biología Molecular, así como la cascada ómica que explican el flujo de la información genética desde el DNA (genómica, epigenómica y marcadores basados en el DNA) hasta los metabolitos (metabolómica), pasando por el mRNA (transcriptómica) y las proteínas (proteómica).

## 2. Objetivos

La línea de investigación principal del grupo de investigación liderado por el Prof. Jesús V. Jorrín Novo en la Universidad de Córdoba se centra en la biología molecular de *Q. ilex*, aunque también realiza, en menor medida, estudios en otras especies forestales tales como *Q. suber* y *Pinus pinea*. Siguiendo el Dogma central de la Biología Molecular, el grupo pretende interpretar las

bases moleculares de fenotipos de interés, para trasladarlas a los programas de mejora, conservación y reforestación. En los primeros 15 años de desarrollo de la línea de investigación, se ha realizado un extraordinario esfuerzo en la optimización de la metodología necesaria para la identificación y caracterización de individuos élitres resilientes a condiciones ambientales adversas, con una alta producción, así como para la identificación de compuestos nutracéuticos y bioactivos de bellota. Otros de los objetivos alcanzados por el grupo han sido el estudio de la respuesta fisiológica y molecular a estreses individuales como son la sequía y la presencia de *P. cinnamomi* en plántulas de encina; y en profundizar en la naturaleza recalcitrante de la semilla de *Q. ilex*. En la actualidad, el grupo ha iniciado nuevos estudios como el de la respuesta a estrés múltiple (sequía y *P. cinnamomi*) ajustándose más a lo que ocurre en la naturaleza. Por otra parte, y coincidiendo con el avance en las técnicas moleculares, se han abierto nuevas líneas de investigación como son la genómica y la epigenómica. Ambas aproximaciones se integrarán con las aproximaciones ómicas (la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica) que venimos usando para dar un enfoque desde la biología de sistemas. Los objetivos concretos de los proyectos en curso son:

- I. Identificar y caracterizar genotipos élitres resilientes al síndrome de la seca y a condiciones de cambio climático.
- II. Caracterizar a nivel fitoquímico la bellota para posteriores estudios de trazabilidad y búsqueda de alérgenos y compuestos bioactivos, atendiendo al objetivo alimentario que se pretende dar a dicho producto.

El flujo de trabajo de estos proyectos incluye la prospección, en especial en zonas de seca de Andalucía y Extremadura, el muestreo de bellotas, hojas y polen, la germinación de bellotas y crecimientos de plántulas, los tratamientos de estrés, el análisis morfológico (crecimiento, síntomas de daño y mortalidad de individuos), fisiológico (régimen hídrico y fotosíntesis), y molecular mediante técnicas de bioquímica clásica y ómicas.

Un total de 7 proyectos de investigación ha financiado esta línea de investigación: "Variabilidad, catalogación, respuesta al estrés y propagación clonal de la encina (*Q. ilex*) (AGL2009-12243-C02-02), "Population variability analyses and stress response in holm oak using a multiomics approach (transcriptomics, proteomics and metabolomics) (BIO2015-64737-R)", "Facing holm oak "decline" syndrome through molecular marked assisted selection of elite, resilient genotypes, and priming of defence mechanisms (ENCINOMICS-2)" (PID2019-109038RB-I00), y "La secuenciación del genoma de la encina (*Quercus ilex*) y la búsqueda de genes de respuesta a estreses asociados al síndrome de la seca: caracterización estructural y funcional" (Referencia: 1257595)". Estos proyectos se han complementado con otros centrados en ensayos de campo mediante teledetección y ecofisiología: "Early detection of decay processes in *Quercus ilex* through the integration of hyperspectral and ecophysiological data" (CLG2013-40790-R) y "Spatial patterns of photosynthetic efficiency and water balance analysed from space in Mediterranean ecosystems" (CGL2017-86161-), y un contrato al amparo del Artículo 83 "Desarrollo de marcadores moleculares de respuesta y resistencia/tolerancia a *Phytophthora cinnamomi* en *Quercus ilex* y *Q. suber* a partir de aproximaciones ómicas (Referencia: TSA0069754) el cual es incluido en el "Programa nacional de mejora y conservación de los recursos genéticos de la encina y el alcornoque contra el síndrome de decaimiento. Subgrupo 2, "Mejora genética y fisiológica". 2020-2023. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Área de Recursos Genéticos Forestales - Subdirección General de Política Forestal)".

Además, debemos resaltar las colaboraciones que hemos comenzado con el sector productivo en la dirección de la caracterización fitoquímica de la bellota para su uso en la producción de harina que se utiliza en la elaboración de pan, galletas, y para la producción de leche de bellota.

A continuación, utilizando como hilo conductor el Dogma Central de la Biología Molecular y la cascada ómica, en los siguientes apartados se presentarán los trabajos realizados haciendo

referencia a las publicaciones científicas llevadas a cabo por nuestro grupo, señalando cuáles serán los próximos retos, así como las principales conclusiones. Por lo tanto, en los diferentes apartados se comentarán diferentes aspectos de la biología molecular de *Q. ilex* desde un punto de vista morfológico, fisiológico, bioquímico, de marcadores basados en DNA, de genómica, de epigenómica, de transcriptómica, de proteómica y de metabolómica acabando con una integración de los datos en la dirección de la Biología de Sistemas. Haremos referencia, en este trabajo, a los estudios de respuesta a estrés individual o múltiple.

### 3. Morfología, Fisiología y Bioquímica en la encina

Aunque nuestro trabajo se ha centrado principalmente en aspectos de la biología molecular de *Q. ilex*, estos deben de ir, y van, acompañados de análisis de crecimiento, daños, mortalidad, fisiología y bioquímica. Dichos resultados permitirán, entre otras cosas, determinar el momento de muestreo para el análisis molecular.

Los primeros estudios llevados a cabo en *Q. ilex* se han centrado en el análisis de la población de manera global; sin embargo, a medida que se avanzaba en el conocimiento de la respuesta fisiológica y molecular, se concluyó que la respuesta debe considerarse a nivel individual (Buras et al., 2021), dado la alta variabilidad encontrada. Las diferencias poblacionales son no tanto cualitativas como cuantitativas. En una primera aproximación para determinar la respuesta a condiciones ambientales, hemos determinado el porcentaje de daños y mortalidad de la descendencia por individuo (San-Eufrasio et al., 2020; 2021a). San-Eufrasio et al., (2020) en su estudio de respuesta a sequía severa en especies del género *Quercus* y diferentes poblaciones andaluzas de *Q. ilex* concluyó que la supervivencia en la descendencia fue significativamente mayor en *Q. ilex*, seguida de *Q. suber*. Dentro de las poblaciones andaluzas, las poblaciones del este mostraron una mayor supervivencia que las del oeste. Como continuación a este trabajo, y centrandonos en el estrés múltiple (*P. cinnamomi* y sequía), San-Eufrasio et al., 2021a concluye que existen diferencias en la respuesta poblacional a estreses individuales y combinados, siendo las diferencias no tanto cualitativas sino cuantitativas. La supervivencia, la aparición de daños y los parámetros fisiológicos (régimen hídrico y fotosíntesis) dependieron del individuo, la población y el estrés. Así, los individuos del este fueron más y menos afectados por *P. cinnamomi* y sequía que los del oeste, respectivamente, siendo la resiliencia al doble estrés menor en las poblaciones del este. No obstante, dentro de cada población existen, en mayor o menor porcentaje, individuos altamente resilientes.

A nivel fisiológico, los parámetros más estudiados en nuestro grupo han sido el contenido relativo de agua y fluorescencia en hojas, la fotosíntesis neta y la conductancia estomática. La respuesta fisiológica observada fue muy similar tanto a nivel de estrés individual (*P. cinnamomi* o sequía) como combinado (*P. cinnamomi* y sequía) observándose una disminución en el contenido relativo de agua en la hoja, y una caída de fluorescencia, actividad fotosintética y conductancia estomática (Echevarría-Zomeño et al., 2009; Sghaier-Hammami et al., 2013; Valero-Galván et al., 2013; San-Eufrasio et al., 2020; San-Eufrasio et al., 2021a). La diferencia entre individuos vino dada por el porcentaje y cinética de la caída.

A nivel de bioquímica clásica, en la que se utilizan técnicas espectrofotométricas (López-Hidalgo et al., 2021), se ha determinado el contenido en pigmentos fotosintéticos, almidón, azúcares totales, fenólicos, flavonoides y aminoácidos, tanto en plántulas control como sometidas a estrés individual y combinado (San-Eufrasio et al., 2020, 2021a). El contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofilas a y b, y carotenoides) no se vio afectado en plantas sin daños visuales aparentes en condiciones de estrés. El contenido de aminoácidos y azúcares totales fue mayor en condiciones de estrés (individual o combinado) en comparación a las plántulas control. En cuanto a los fenólicos, los valores fueron mayores en plántulas sometidas a sequía, sin que se encontraran diferencias entre plantas control y aquellas sometidas a estrés combinado.

#### 4. Marcadores basados en el DNA

A pesar de los avances en las aproximaciones -ómicas llevados a cabo en la encina (Escandón et al., 2021), la caracterización genómica y genética sigue siendo un objetivo pendiente, a diferencia de lo que ocurre en otras especies del género *Quercus* (Backs & Ashley, 2021.) Las técnicas de análisis de DNA requieren la puesta a punto de protocolos de extracción, lo que en encina ha constituido un reto importante y que prueba el carácter recalcitrante de la especie como sistema experimental (Echevarría-Zomeño et al., 2012; Labella-Ortega, 2020).

Los marcadores basados en el DNA son los más utilizados en la actualidad para estimar la diversidad y estructura genética y la identificación del germoplasma (Idrees & Irshad, 2014), logrando un gran impacto en los programas de mejora forestal. Entre los diferentes tipos de marcadores disponibles, nuestro grupo ha utilizado los marcadores microsatélites (*Single Sequence Repeats*, SSRs). Este tipo de marcadores se define como secuencias cortas repetidas en tandem, de 1 a 6 bases, que se encuentran distribuidas en el genoma, incluyendo el DNA mitocondrial y cloroplástico (Grover et al., 2016). Entre los estudios llevados a cabo en la encina utilizando los marcadores SSRs, caben destacar aquellos que han permitido identificar individuos puros de híbridos entre *Q. ilex* y otras especies del género *Quercus*, como por ejemplo *Q. ilex-Q. suber* (Soto et al., 2007) y *Q. ilex-Q. coccifera* (Ortego & Bonal, 2010), así como aquellos trabajos en los que se ha llevado a cabo un análisis de la estructura y diversidad genética en poblaciones españolas (Guzmán et al., 2015; Fernández i Martí et al., 2018). En nuestro grupo de investigación, utilizando esta herramienta molecular, se llevó a cabo un análisis comparativo utilizando una batería de SSRs cloroplásticos, herencia materna, y nucleares, recombinación cromosómica, para detectar la estructura genética entre las poblaciones de encina de las principales regiones biogeográficas de Andalucía (Fernández i Martí et al., 2018). Se encontraron altos niveles de diferenciación espacial con el DNA cloroplástico, lo que indica poca dispersión de semillas entre las poblaciones. La población de la Cordillera Bética (Cádiz) apareció consistentemente bien separada de las poblaciones del norte de Sierra Morena, sugiriendo que el Valle del Guadalquivir ha jugado un papel importante en la determinación de la divergencia poblacional. Actualmente, esta batería de SSRs se está utilizando para caracterizar individuos sintomáticos y asintomáticos localizados en focos de seca. Hasta el momento, los resultados apuntan a una separación clara entre individuos sintomáticos y asintomáticos en focos de seca de Andalucía (Carmona Triguero, 2021). En concreto, los marcadores cloroplásticos CmCs9, Udt5, Udt4 y Udt3 y los nucleares QrZAG15 y QrZAG36 fueron los que más contribuyeron a la diferenciación entre los individuos a nivel de fenotipo. Por lo tanto, la combinación de estos marcadores microsatélites podrían ser claves para el estudio de la respuesta de *Q. ilex* a condiciones ambientales adversas relacionadas con el síndrome de la Seca y a condiciones de cambio climático.

#### 5. Genómica

La genómica se centra en el estudio y catalogación de todos los genes que posee un organismo, así como su organización, estructura, regulación y función. La investigación sobre genómica forestal es un objetivo casi anecdótico si lo comparamos con la de los sistemas modelo y de cultivo. Sin embargo, en la actualidad está siendo impulsada con la llegada de las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS). En el género *Quercus*, hasta el momento, tres especies han sido secuenciadas (*Q. robur* (Plomión et al., 2016, 2017); *Q. lobata* (Sork et al., 2016) y *Q. suber* (Ramos et al., 2018)). Estas especies presentan un tamaño de genoma de 1.45 Gb, 1.15 Gb y 1.90 Gb en condiciones diploides (2C), respectivamente. En el caso de *Q. ilex*, nuestro grupo está trabajando en un primer borrador de su genoma. El DNA se extrajo de hojas de individuo adulto localizado en Aldea de Cuenca, Fuenteobejuna, Córdoba (coordenadas: N 38° 3' 95"; E 5° 55' 40"). Para ello, se ha utilizado la tecnología de una sola molécula en tiempo real (*Single-Molecule Real-*

*Time, SMRT) de la plataforma PacBio en colaboración con la Universidad de Delaware (California, Estados Unidos). El conjunto de datos del genoma se ha enviado al repositorio BioProject del NCBI (ID: PRJNA687489), aunque no se encuentran disponibles en estos momentos. El tamaño del genoma ensamblado de *Q. ilex* es de 1,24 Gb habiéndose identificado 21357 genes (datos no publicados). Como pasos previos a la secuenciación del genoma de *Q. ilex*, mediante citometría de flujo, se determinó que el tamaño de su genoma era de 1.94 Gb/2C, y se identificaron las 12 parejas de cromosomas homólogos utilizando microscopía de fluorescencia ( $2n = 2x = 24$ ) (Rey et al., 2019). El conocimiento del genoma permitirá la anotación funcional e identificación de genes de interés relacionados con la resistencia a estreses, en general, y a estreses asociados al síndrome de la Seca, en particular. Además, permitirá la validación de todos los datos ómicos ya generados en *Q. ilex* a nivel transcriptómico, proteómico y metabolómico (Escandón et al., 2021).*

## 6. Epigenética

La epigenética estudia los cambios heredables en la expresión génica que no dependen de la secuencia de DNA, contribuyendo a la variabilidad fenotípica, incluida la respuesta a estreses y resiliencia (Turgut et al., 2020). Los cambios epigenéticos están mediados por marcas reversibles a nivel de DNA (metilaciones), histonas (metilación, fosforilación, ubiquitinación y acetilación) y/o por pequeños RNAs, regulando la expresión de genes o regiones genómicas (Bräutigam et al., 2013). La metilación del DNA implica modificaciones covalentes, que en plantas tiene lugar en las citosinas, más concretamente en los sitios CG, CHG y CHH (donde H puede ser A, T o C) (Zhang et al., 2018). Algunas marcas epigenéticas son eliminadas en la meiosis, evitando la creación de nuevos epialelos (alelos cuya expresión está condicionada por el estado epigenético), mientras que otras marcas epigenéticas son estables y heredables, confiriendo fenotipos específicos que pueden ser usados para la selección en mejora genética (Bräutigam et al., 2013). Actualmente se desconoce el mecanismo por el que los factores ambientales contribuyen a la formación de nuevos epialelos, aunque se propone que pudieran estar implicados elementos cis derivados de transposones. Estas metilaciones inducidas por estrés abiótico favorecen por tanto la plasticidad fenotípica (Iwasaki & Paszkowski, 2004; Gugger et al., 2016).

Aunque en los últimos años ha aumentado considerablemente el interés en el análisis de la variación epigenética en especies forestales, son escasos los trabajos publicados con el género *Quercus* (Amaral et al., 2020) y la relación con la variabilidad, resiliencia y adaptación a condiciones climáticas es poco conocida. Estos estudios permitirán explicar, al menos parcialmente, la variabilidad fenotípica. Actualmente, las marcas epigenéticas son incluidas como marcadores moleculares para la selección de individuos con características fenotípicas de interés, como pueden ser un mayor crecimiento, producción y tolerancia a factores tanto bióticos como abióticos (Thiebaut et al., 2019).

Entre las diferentes técnicas empleadas en el estudio de marcas epigenéticas, en nuestro grupo hemos puesto a punto la técnica MSAP (*Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism*), que se basa en el uso de enzimas de restricción sensibles a metilación. Esta técnica ha sido utilizada con otras especies vegetales, incluyendo encina (Rico et al., 2014); en el citado trabajo, se describen cambios en los patrones de metilación global en individuos adultos sometidos sequía durante 12 años, lo cual parece indicar que estos cambios están asociados con la aclimatación al estrés. Recientemente, mediante aproximación epigenómica utilizando la técnica MSAP, hemos analizado las marcas epigenéticas globales en hojas de individuo adulto, de plántulas y de embriones de *Q. ilex*, observándose un total de 187 loci con metilación o hemimetilación (Labella-Ortega, 2021). De estos 187, tres se encontraron en todas las muestras, por lo que se podrían considerar como marcas permanentes, y 184 fueron específicas del individuo, órgano o estadio de desarrollo, pudiéndose considerar como marcas transitorias.

## 7. Transcriptómica

El transcriptoma es el conjunto de todas las moléculas de RNA, incluidos el RNA mensajero, el RNA ribosómico, el RNA de transferencia, los pequeños RNA nucleares, los pequeños RNA nucleolares, y otros ARN no codificantes, presentes en la célula (Kukurba et al., 2015). El transcriptoma, a diferencia del genoma, es variable y característico del tipo de célula, tejido, estadio de desarrollo y condiciones ambientales. Las técnicas utilizadas en el análisis del transcriptoma se agrupan en dirigidas (transcripción inversa-PCR cuantitativa, RT-qPCR) y holísticas (secuenciación de RNA, RNA-seq).

Hasta el momento, al no disponer del genoma secuenciado de la encina, se ha avanzado en el desarrollo del transcriptoma para explorar la expresión génica en una gran variedad de contextos biológicos, como los relacionados con el estrés ambiental y la interacción planta-patógeno. La disponibilidad de la técnica RNA-seq ha permitido un avance significativo en el análisis de la respuesta a estrés en *Q. ilex*. El primer transcriptoma se generó utilizando la plataforma de secuenciación Illumina a partir de una mezcla de tejidos (hoja, raíz, embrión) (Guerrero-Sánchez et al., 2017). Con el objetivo de enriquecer el primer transcriptoma, se generó un segundo utilizando la plataforma Ion Torrent (Guerrero-Sánchez et al., 2019). Además de la comparación de las dos plataformas de secuenciación, los datos crudos se ensamblaron utilizando tres algoritmos diferentes, MIRA, RAY y TRINITY. El resultado final fue la generación de un transcriptoma híbrido combinando ambas plataformas, transcriptoma que se va enriqueciendo tras cada experimento. Se anotó un total de 34,360 transcritos, los cuales eran completos (C) y de una sola copia (S) en su mayoría, de acuerdo los resultados del análisis BUSCO (C:77.5% [S:75.3%, D:2.2%], F:11.0%, M:11.5%, n:1440). Los transcritos fueron clasificados en términos de procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares. Dentro de los procesos biológicos, se asignaron más transcritos a la respuesta al estrés y a los procesos biosintéticos. En el caso de las funciones moleculares, muchos transcritos se asociaron con la unión a iones y DNA, a quinasas, oxidoreductasas. En la categoría de componentes celulares, los transcritos se asociaron a diferentes fracciones, incluyendo el núcleo, plastidios y membrana plasmática. Un elevado número de transcritos, 5,405 transcritos, se asociaron a la respuesta al estrés, de los que 46 estaban implicados en el estrés por sequía (Guerrero-Sánchez et al., 2019). Recientemente, el grupo ha publicado un artículo centrado en el análisis transcriptómico y proteómico de la respuesta a estrés, que será mínimamente descrito en una sección posterior (Guerrero-Sánchez et al., 2021).

Finalmente, a partir del análisis de RNA-seq, es posible observar una selección de genes que no varían su expresión a lo largo del estrés. Estos genes, considerados como genes de referencia candidatos, son necesarios para llevar a cabo estudios de transcriptómica dirigida y podrían mejorar la normalización de la RT-qPCR respecto a los genes de referencia clásicos. Jiménez-Herrera (2021) optimizó la técnica de RT-qPCR utilizando genes que no variaron su expresión en plántulas de *Q. ilex* sometidas a condiciones de estrés severo (Guerrero-Sánchez et al., 2017, 2019, 2021). Se seleccionaron un total de 12 genes candidatos a partir del experimento de respuesta a sequía llevado a cabo en *Q. ilex* por Guerrero-Sánchez et al., (2021), así como cuatro genes previamente descritos en Kotrade et al., (2019) para esta especie. El nivel de expresión se determinó en un experimento del efecto y respuesta a estrés múltiple (sequía y *P. cinnamomi*) en plántulas de *Q. ilex* de 8 meses de edad procedentes de dos procedencias andaluzas, Sevilla y Almería (San-Eufrasio et al., 2021a). A partir de los datos obtenidos, y mediante los algoritmos Bestkeeper, GeNorm, NormFinder y método comparativo  $\Delta Ct$ , se seleccionaron la actina, el GAPDH y la  $\beta$ -tubulina como los genes candidatos más estables. Una vez que se han identificado genes de referencia candidatos, éstos serán usados en estudios de perfiles de expresión de germinación, variabilidad y respuesta a condiciones ambientales adversas relacionados con el síndrome de la seca y las previstas en un escenario de cambio climático.

La bellota se considera una semilla no ortodoxa o recalcitrante, es decir, pierde viabilidad tras almacenarse durante largos períodos de tiempo, provocando serias dificultades en la conservación y propagación de las semillas (Pasquini et al., 2012). Uno de los primeros estudios centrados en la naturaleza recalcitrante de la bellota se basó en un análisis transcriptómico dirigido, hormonal y de azúcares en semillas maduras, semillas germinadas y en plántulas con el fin de entender los cambios fisiológicos que tienen lugar durante la germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas en *Q. ilex* (Romero-Rodríguez et al. 2015). Para el análisis transcriptómico, se seleccionaron once genes que codifican proteínas implicadas en la tolerancia a la desecación (DHN3 y GOLS), la regulación de la señalización del ABA (OCP3, SKP1 y SDIR1), el metabolismo (FDH, GAPDH, RBLC y NADH6) y el estrés oxidativo (SOD1 y GST). Se recogieron embriones y plántulas en ocho estadios de desarrollo y se observó una disminución de la sacarosa, así como un aumento de la glucosa y la fructosa. En las semillas maduras se observaron bajos niveles de ácido abscísico (ABA) y altos niveles de giberelinas (GAs), mientras que en las semillas germinadas el ácido indol 3-acético (IAA) aumentó y las GAs se mantuvieron altas. La abundancia de transcritos de los genes relacionados con el ABA, OCP3, SKP1 y SDIR1, se correlacionó positivamente con los cambios en el contenido de la fitohormona. Los transcritos de los genes relacionados con la sequía, DHN3 y GOLS, con el metabolismo, GAPDH y NADH6, y con el estrés oxidativo, SOD1 y GST, fueron más abundantes en las semillas maduras. Estos resultados indican que la recalcitrancia se establece durante el desarrollo de la semilla, pero no se manifiesta hasta la germinación, en la cual los patrones son similares para las semillas ortodoxas y recalcitrantes.

## 8. Proteómica

La proteómica tiene como objetivo el estudio del proteoma, entendido como el conjunto de todas y cada una de las especies proteicas o proteoformas de un organismo, tejido o célula en unas determinadas coordenadas espaciales y temporales. El análisis proteómico es una poderosa herramienta para el descubrimiento de los mecanismos moleculares implicados en diferentes procesos biológicos, entre ellos la respuesta a estreses.

El grupo de investigación del Prof. Jorrín-Novo es considerado un referente internacional en el campo de la proteómica vegetal. Es en éste área donde se ha hecho un gran esfuerzo para avanzar en el conocimiento molecular de la encina, desde la optimización de protocolos desde un punto de vista metodológico (Jorge et al., 2006; Romero-Rodríguez et al., 2014; Gómez-Gálvez et al., 2020; Escandón et al., 2020; Sghaier-Hammami et al., 2021), caracterización descriptiva del proteoma (Valero-Galván et al., 2011, 2012, 2014), respuesta a factores bióticos y abióticos (Jorge et al., 2006; Echevarría-Zomeño et al., 2009; Sghaier-Hammami et al., 2013; Valero-Galván et al., 2013; Simova-Stoilova et al., 2015, 2018; San-Eufrasio et al., 2021a, 2021b; Guerrero-Sánchez et al., 2021), maduración y germinación de semillas (Romero-Rodríguez et al., 2015, 2019; Sghaier-Hammami et al., 2016, 2020), identificación de alérgenos (Pedrosa et al., 2020) y de búsqueda de péptidos proteotípicos de respuesta a sequía utilizando una estrategia dirigida (San-Eufrasio et al., 2021b). En 2005, se publicó el primer trabajo de proteómica en encina (Jorge et al., 2005). En él, se describió por primera vez el proteoma de hoja de encina, haciendo hincapié en el efecto de la variabilidad tanto biológica como analítica. Los primeros estudios llevados a cabo en esta especie forestal en respuesta a estreses bióticos y abióticos incluyeron *P. cinnamomi* (Sghaier-Hammami et al., 2013) y sequía (Jorge et al., 2006; Echevarría-Zomeño et al., 2009; Valero-Galván et al., 2013; Simova-Stoilova et al., 2015, 2018; San-Eufrasio et al., 2021a, 2021b). El análisis proteómico demostró una respuesta similar frente a ambos estreses, observándose diferencias a nivel de procedencia de *Q. ilex*, así como una tendencia a la disminución de las proteínas de la fotosíntesis, metabolismo de aminoácidos y de las proteínas relacionadas con el estrés. En la actualidad, el grupo ha comenzado el análisis de la respuesta a estreses múltiples (*P. cinnamomi* y sequía, considerando que esta situación se asemeja más a lo que ocurre en la naturaleza (San-Eufrasio et al., 2021a). Los cambios observados en el proteoma dependieron del individuo y tipo de estrés. De

forma general, se observó una mayor caída de proteínas fotosintéticas en todos los individuos estudiados. A partir de los datos de proteínas variables, tomándose como tales aquellas más abundantes en situaciones de estrés, se propusieron cuatro como posibles marcadores de resiliencia: aldehído deshidrogenasa, glucosa 6-fosfato isomerasa, proteína ribosomal 50S L5 y  $\alpha$ -1,4 glucano-proteína sintasa [formadora de UDP]. Por otra parte, el análisis a nivel de péptidos proteotípicos utilizando una estrategia de proteómica dirigida descrito en San-Eufrasio et al., (2021b) permitió identificar 30 proteínas y 46 péptidos más representados en condiciones de sequía en dos tiempos de muestreo en al menos dos de las cuatro poblaciones de encinas estudiadas, entre los que se proponen dos proteínas como posibles marcadores de tolerancia a sequía: la subtilisina y la chaperona GrpE.

El carácter recalcitrante de la semilla de *Q. ilex* también ha sido caracterizado a nivel proteómico. En esta dirección, Sghaier-Hammami et al., (2016) comparó el contenido y los perfiles proteicos en cada uno de los tejidos que forman la bellota (eje embrionario, cotiledón y tegumento). El eje embrionario mostró un contenido proteico 4 y 20 veces mayor que el cotiledón y el tegumento, respectivamente. A su vez, el cotiledón presentó un mayor número de proteínas metabólicas y de reserva. En el eje embrionario se observó un mayor número de especies dentro del grupo de metabolismo de proteínas (síntesis y degradación), y en el tegumento se presentó el mayor número de proteínas relacionadas con la defensa/estrés y el citoesqueleto. Más recientemente, Sghaier-Hammami et al., (2020) estudió la maduración y germinación de semillas de *Q. ilex* mediante una estrategia proteómica. Se tomaron muestras de cotiledones y embriones/radículas en diferentes etapas de desarrollo, incluyendo la maduración temprana, media y tardía de las semillas, así como la germinación temprana y tardía y de semillas no germinadas o inviables. Cada etapa mostró un contenido proteico específico. Las semillas no germinadas mostraron una menor cantidad de proteínas relacionadas con el metabolismo, traducción, proteasas, y relacionadas con el estrés. Los cotiledones estaban enriquecidos en proteínas de reserva y proteasas mientras que en el eje embrionario abundaban proteínas de defensa y rescate celular, incluyendo proteínas de choque térmico (HSPs) y antioxidantes. A diferencia de las semillas ortodoxas, las proteínas asociadas a la glucólisis, el ciclo del ácido tricarboxílico, el metabolismo de los carbohidratos, los aminoácidos y los lípidos estuvieron presentes en niveles elevados en la semilla madura y se mantienen durante toda la germinación.

Otra de las líneas de investigación que se llevan a cabo en el grupo de investigación es la identificación de posibles alérgenos tanto en polen como en bellota. Recientemente el grupo ha participado en la identificación del primer alérgeno de polen de encina, Que i 1 (Pedrosa et al., 2020).

## 9. Metabolómica

La metabolómica es la disciplina que tiene como objetivo el estudio y análisis sistemático del metaboloma o conjunto de metabolitos que caracterizan un sistema biológico. Como el transcriptoma y proteoma, y a diferencia del genoma, es dinámico y característico del tipo de célula, desarrollo y condiciones externas. Constituye y define en gran medida el fenotipo molecular, el cual se ve altamente afectado por las condiciones ambientales y situaciones de estrés. El estudio del metaboloma ha sido posible gracias al desarrollo de técnicas de RMN y espectrometría de masas, favoreciendo el descubrimiento de una amplia gama de biomoléculas y rutas metabólicas. Está contribuyendo al conocimiento de las respuestas a estreses, resiliencia y homeostasis metabólica, y a la identificación de marcadores moleculares, incluyendo hormonas, metabolitos de estrés o moléculas de señalización, entre otros (Monteiro et al., 2013; Escandón et al., 2018). Es una técnica primordial en la identificación de compuestos nutracéuticos y bioactivos (López-Hidalgo et al., 2021).

A nivel metabolómico, como novedad, el grupo ha comenzado una línea de investigación centrada en estudios de la composición fitoquímica del fruto de *Q. ilex*, la bellota, utilizando la tecnología NIRS, técnicas colorimétricas, análisis de nutrientes, y la metabolómica basada en la espectrometría de masas (López-Hidalgo et al., 2021; Tienda-Parrilla, 2021). Dicha línea surge a raíz del renovado interés en el uso de la bellota con fines alimenticios e industriales. La bioquímica clásica y la tecnología NIRS revelaron un perfil químico de la harina muy similar al de otros cereales y frutos secos comestibles, destacando también la composición de ácidos grasos similar al del aceite de oliva y el alto contenido en polifenoles. Respecto al análisis de nutrientes, el hierro y el zinc fueron los más abundantes, mientras que el sodio fue el menos abundante, al igual que ocurre en muchas hortalizas y frutos secos. Además, se han anotado 192 metabolitos en la harina de bellota de *Q. ilex* (López-Hidalgo et al., 2021). De los cuales, los compuestos más abundantes pertenecieron a diversos grupos químicos: los compuestos fenólicos (benzoicos, cinámicos, cumarinas, estilbenos, flavonoides, lignanos y taninos), los carbohidratos, los aminoácidos, los ácidos grasos, y los ácidos carboxílicos, pudiendo destacar varios compuestos con actividad antioxidante, antiproliferativa, antiinflamatoria y/o antimicrobiana.

Como continuación y complementación de los estudios previos de germinación y maduración de la bellota llevados a cabo a nivel proteómico, se ha llevado a cabo recientemente una aproximación metabolómica en *Q. ilex* (Del Orbe Matos, 2021). Mediante el empleo de técnicas de bioquímica clásica, NIRS y espectrometría de masas (LC-MS), se analizaron los cambios en el perfil metabolómico a lo largo del proceso de germinación de semillas en un intento de establecer las bases moleculares de su recalcitrancia. A nivel de cotiledón, en las primeras etapas de la germinación, los carbohidratos solubles, el almidón, los aminoácidos, y los fenoles no mostraron grandes diferencias. Sin embargo, a nivel de eje embrionario se observó una disminución en el contenido de almidón y de azúcares totales, así como un aumento en el contenido de fenólicos y flavonoides. El análisis por LC-MS permitió anotar un total de 440 metabolitos significativamente variables entre las etapas de germinación, pertenecientes a diferentes familias, y destacando los ácidos grasos, intermediarios de la ruta del shikimato, y su extensión a fenólicos.

## 10. Biología de Sistemas e integración de datos

La Biología de Sistemas se basa en el estudio de un sistema biológico, el cual es considerado como un sistema integrado e interrelacionado de genes, proteínas y reacciones bioquímicas que da lugar a los procesos biológicos (Palsson, 2015). Para ello, se utilizan herramientas bioinformáticas que permiten la integración de las diferentes aproximaciones ómicas, así como los datos de bioquímica clásica, fisiológicos y fenotípicos proporcionando una visión más completa de la respuesta al estrés en las plantas. Este enfoque ha sido poco empleado en el género *Quercus*, en particular, y en especies forestales, en general. El primer estudio multiómico llevado a cabo en *Q. ilex* ha sido recientemente publicado, en el cual se han integrado datos transcriptómicos, proteómicos y metabolómicos para una reconstrucción más completa de la red de rutas metabólicas (López-Hidalgo et al., 2018). La integración de estos datos usando herramientas bioinformáticas permitió la reconstrucción parcial de 123 rutas metabólicas, incluyendo el metabolismo energético y de carbohidratos, de aminoácidos, de lípidos, de nucleótidos y la biosíntesis de metabolitos secundarios, siendo el ciclo del ácido tricarboxílico la vía más representada. Por otra parte, Guerrero-Sánchez et al., (2021) describieron los perfiles del transcriptoma y del proteoma de plántulas de 6 meses de edad sometidas a condiciones de sequía severa. Se evaluó la calidad y la confianza de las identificaciones y cuantificaciones de RNA y proteínas, obteniéndose 25,169 transcritos y 3,312 proteínas. Tras la integración de los datos se seleccionaron un total de cuatro genes (*FtSH6*, *CLPB1*, *CLPB3* y *HSP22*) observados a dos tiempos y en las dos plataformas ómicas. Por lo tanto, estas chaperonas y proteasas podrían ser consideradas como potenciales marcadores de tolerancia a la sequía para ser utilizados en la selección de genotipos élite, resistentes, y en programas de mejora genética.

## 11. Conclusiones y perspectivas futuras

*Quercus ilex* se podría considerar como una especie genéticamente sencilla pero experimentalmente recalcitrante. Hasta la fecha, son muchos los avances que hemos conseguido a nivel molecular desde la secuenciación de su genoma hasta la identificación de compuestos bioactivos, pasando por la identificación y caracterización de genes y productos génicos relacionados con la variabilidad, biodiversidad, carácter recalcitrante de la semilla, producción y respuestas a estreses bióticos y abióticos asociados al síndrome de la seca y al cambio climático. Sin embargo, la interpretación molecular en *Q. ilex* ha sido un reto debido a la alta variabilidad molecular observada, por lo que definir fenotipos de referencia ayudará a entender mejor las bases moleculares de procesos relacionados con la germinación, la alta producción de bellotas con rasgos de calidad deseables relacionados con valores nutricionales y la adaptación a estreses bióticos y abióticos adversos, así como el éxito de los programas de mejora genética y de reforestación en esta especie forestal.

Tras la secuenciación del genoma, se pretende seguir avanzado en la biología molecular de la encina a través de un estudio de asociación de genoma completo (*Genome-wide association study*, GWAS), en el cual se identificarán variaciones genéticas específicas (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) asociadas a determinados caracteres de interés como mayor crecimiento, producción y tolerancia a factores bióticos y abióticos. A nivel epigenético, tras conocer los patrones de metilación global en individuos adultos, plántulas y embriones, así como en respuesta al síndrome de la seca, el siguiente paso será la identificación y caracterización de genes metilados mediante la técnica MSAP-Seq (Chwialkowska et al., 2017). Otros de los mecanismos epigenéticos en los que se debería avanzar es la caracterización de los RNA pequeños (Lamelas et al., 2021). La interacción ARNs-ARNs es necesaria para el mecanismo de resiliencia, mientras que la metilación del DNA y sus variaciones juegan un papel importante en la regulación de los genes. Por otra parte, se avanzará en estudios de transcriptómica dirigida (RT-qPCR), la cual permite analizar más tiempos de muestreos, diferentes tejidos, estados de desarrollo y un mayor número de réplicas biológicas, debido a su bajo coste en comparación con la técnica RNA-Seq. En cuanto a la proteómica, como perspectiva de futuro, aunque sin dejar de lado las clásicas técnicas basadas en gel, se avanzará en el uso de técnicas de proteómica de última generación, como la técnica DIA (*Data Independent Acquisition*) que posee una capacidad de identificación y reproducibilidad muy superior a las técnicas convencionales (*Data Dependent Acquisition*), o técnicas de proteómica cuantitativa dirigida, como PRM (*Parallel Reaction Monitoring*) que nos permitirán de manera más rápida y altamente precisa identificar y cuantificar en un gran set de datos péptidos y proteínas de interés previamente seleccionados. Además, haciendo hincapié en el renovado interés por el uso de la bellota en la alimentación humana, la proteómica debe seguir usándose en la dirección de la identificación y caracterización de alérgenos, sobre todo aquellos que se encuentren a nivel de fruto. Siguiendo en esta línea, a nivel de metabolómica, debemos seguir apostando por la búsqueda de compuestos bioactivos con actividad antioxidante, antiproliferativa, antiinflamatoria y/o antimicrobiana que permitan darle un valor añadido a *Q. ilex*.

## 12. Agradecimientos

Esta línea de investigación ha sido financiada por los siguientes proyectos: Variabilidad, catalogación, respuesta al estrés y propagación clonal de la encina (*Q. ilex*) (AGL2009-12243-C02-02), “Population variability analyses and stress response in holm oak using a multiomics approach (transcriptomics, proteomics and metabolomics) (BIO2015-64737-R)”, “Facing holm oak “decline” syndrome through molecular marked assisted selection of elite, resilient genotypes, and priming of defence mechanisms (ENCINOMICS-2)” (PID2019-109038RB-I00), “La secuenciación del genoma de la encina (*Quercus ilex*) y la búsqueda de genes de respuesta a estreses asociados al síndrome

de la seca: caracterización estructural y funcional") (Referencia: 1257595)" y un contrato al amparo del Artículo 83 "Desarrollo de marcadores moleculares de respuesta y resistencia/tolerancia a *Phytophthora cinnamomi* en *Quercus ilex* Y *Q. suber* a partir de aproximaciones ómicas (Referencia: TSA0069754) el cual es incluido en el "Programa nacional de mejora y conservación de los recursos genéticos de la encina y el alcornoque contra el síndrome de decaimiento. Subgrupo 2, "Mejora genética y fisiológica". 2020-2023. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Área de Recursos Genéticos Forestales - Subdirección General de Política Forestal)". M.A.C., M.-D.R. y M.E. agradecen la concesión de los contratos Ramón y Cajal (RYC-2017-23706), Juan de la Cierva-Incorporación (IJC2018-035272-I) y Juan de la Cierva-Formación (FJCI-2017-31613) por parte del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, respectivamente. C.L.H agradece la financiación recibida por parte del Programa Predoctoral Severo Ochoa del Gobierno del Principado de Asturias (BP17-112) para la realización de su tesis doctoral.

### 13. Bibliografía

- Akcan, T.; Gökçe, R.; Asensio, M.; Estévez, M.; Morcuende, D.; 2017. Acorn (*Quercus spp.*) as a novel source of oleic acid and tocopherols for livestock and humans: discrimination of selected species from Mediterranean forest. *J. Food. Sci. Technol.* 54 3050-3057.
- Allen, C. D; Macalady, A. K.; Chenchouni H.; Bachelet D.; McDowell N.; Vennetier M.; Kitzberger T.; Rigling A.; Breshears D. D.; Hogg, E. H.; Gonzalez, P.; Fensham R.; Zhang, Z.; Castro, J.; Demidova, N.; Jong-Hwan, L.; Allard, G.; Running, S. W.; Semerci, A.; Cobb, N.; 2010. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *For. Ecol. Manag.* 259 660-684.
- Allen, C. D.; Breshears, D. D.; McDowell, N. G.; 2015. On underestimation of global vulnerability to tree mortality and forest die-off from hotter drought in the Anthropocene. *Ecosphere* 6 1-55.
- Amaral, J.; Ribeyre, Z.; Vigneaud, J.; Sow, M. D.; Fichot, R.; Messier, C.; Pinto, G.; Nolet, P.; Maury, S.; 2020. Advances and promises of epigenetics for forest trees. *Forests* 11 976.
- Barbeta, A.; Peñuelas, J.; 2016. Sequence of plant responses to droughts of different timescales: lessons from holm oak (*Quercus ilex*) forests. *Plant Ecol. Divers.* 9 321-338.
- Backs, J.; Ashley, M.; 2021. *Quercus* conservation genetics and genomics: past, present, and future. *Forests* 12 882.
- Brasier, C.; 1996. *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Ann. sci. for.* 53 347-358.
- Bräutigam, K.; Vining, K.; Lafon-Placette, C.; Fossdal, C. G.; Mirouze, M.; Marcos, J. G.; Fluch, S.; Fraga, M. F.; 2013. Epigenetic regulation of adaptive responses of forest tree species to the environment. *Ecol. Evol.* 3 399-415.
- Buras, A.; Rammig, A.; Zang, C. S.; 2021. The European Forest condition monitor: Using remotely sensed forest greenness to identify hot spots of forest decline. *Front. Plant Sci.* 12 689220-689220.
- Campos, P.; Álvarez, A.; Mesa, B.; Oviedo, J. L.; Ovando, P.; Caparrós, A.; 2020. Total income and ecosystem service sustainability index: Accounting applications to holm oak dehesa case study in Andalusia-Spain. *Land Use Policy* 97 104692.

Cantos, E.; Espín, J. C.; López-Bote, C.; de la Hoz, L.; Ordóñez, J. A.; Tomás-Barberán, F. A.; 2003. Phenolic compounds and fatty acids from acorns (*Quercus* spp.), the main dietary constituent of free-ranged Iberian pigs. *J. Agric. Food Chem.* 51 6248-6255.

Carmena-Triguero, R.; 2021. Marcadores moleculares de DNA para la selección de genotipos élite en *Quercus*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Córdoba.

Carrasco, A.; 2009. Procesos de declive forestal (la Seca): situación del conocimiento. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Córdoba.

Cobos, J.; Montoya, R.; Tusset, J. J.; 1993. New damage to *Quercus* woodlands in Spain. Preliminary evaluation of the possible implication of *Phytophthora cinnamomi*. *Recent Advances in Studies on Oak Decline* 163-170.

Chwialkowska, K.; Korotko, U.; Kosinska, J.; Szarejko, I.; Kwasniewski, M.; 2017. Methylation Sensitive Amplification Polymorphism Sequencing (MSAP-Seq)—A method for high-throughput analysis of differentially methylated CCGG sites in plants with large genomes. *Front. Plant Sci.* 8 2056.

De Rigo, D.; Caudullo, G.; 2016. *Quercus ilex* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. En: San-Miguel-Ayanz, J.; de Rigo, D.; Caudullo, G.; Houston Durrant, T.; Mauri, A. (eds.): European Atlas of Forest Tree Species. 152-153. Publications Office of the European Union. Luxembourg.

Del Orbe Matos, D.; 2021. Metabolomics approaches to seed germination studies and characterization of the recalcitrant character in *Quercus ilex*. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Córdoba.

Echevarría-Zomeño, S.; Ariza, D.; Jorge, I.; Lenz, C.; Del Campo, A.; Jorrín, J. V.; Navarro, R. M.; 2009. Changes in the protein profile of *Quercus ilex* leaves in response to drought stress and recovery. *J. Plant Physiol.* 166 233-245.

Echevarría-Zomeño, S.; Abril, N.; Ruiz-Laguna, J.; Jorrín-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.

Escandón, M.; Mejón, M.; Valledor, L.; Pascual, J.; Pinto, G.; Cañal, M. J.; 2018. Metabolome integrated analysis of high-temperature response in *Pinus radiata*. *Front. Plant Sci.* 9 485.

Escandón, M.; Jorrín-Novo, J. V.; Castillejo, M. Á.; 2021. Application and optimization of label-free shotgun approaches in the study of *Quercus ilex*. *J. Proteom.* 233 104082.

Escandón, M.; Castillejo, M. Á.; Jorrín-Novo, J. V.; Rey, M. D.; 2021. Molecular research on stress responses in *Quercus* spp.: From classical biochemistry to systems biology through omics analysis. *Forests* 12 364.

Fernández i Martí, A.; Romero-Rodríguez, C.; Navarro-Cerrillo, R. M.; Abril, N.; Jorrín-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.

Frisullo, S.; Lima, G.; Magnano di San Lio, G.; Camele, I.; Melissano, L.; Puglisi, I.; Pane, A.; Agosteo, E. G.; Prudente, L.; Cacciola, S. O.; 2018. *Phytophthora cinnamomi* involved in the decline of holm oak (*Quercus ilex*) stands in southern Italy. *For. Sci.* 64 290-298.

Gómez-Gálvez, I.; Sánchez-Lucas, R.; San-Eufrasio, B.; Rodríguez de Francisco, L. E.; Maldonado-Alconada, A. M.; Fuentes-Almagro, C.; Castillejo, M. A.; 2020. Optimizing shotgun proteomics analysis for a confident protein identification and quantitation in orphan plant species: The case of Holm oak (*Quercus ilex*). En: Jorrín-Novo, J. V.; Valledor, L.; Castillejo, M. A.; Rey, M. D. (eds.): Plant Proteomics. Methods in Molecular Biology. 157-168. Springer. New York

Grover, A.; Sharma, P. C; 2016. Development and use of molecular markers: past and present. *Crit. Rev. Biotechnol.* 36 290-302.

Guerrero-Sánchez, V. M.; Maldonado-Alconada, A. M.; Amil-Ruiz, F.; Jorrín-Novo, J. V.; 2017. Holm oak (*Quercus ilex*) transcriptome. *De novo* sequencing and assembly analysis. *Front. Mol. Biosci.* 4 70.

Guerrero-Sánchez, V. M.; Maldonado-Alconada, A. M.; Amil-Ruiz, F.; Verardi, A.; Jorrín-Novo, J. V.; Rey, M. D.; 2019. Ion Torrent and Illumina, two complementary RNA-seq platforms for constructing the holm oak (*Quercus ilex*) transcriptome. *PLoS One*, 14(1), e0210356.

Guerrero-Sánchez, V. M.; Castillejo, M. Á.; López-Hidalgo, C.; Alconada, A. M.; Jorrín-Novo, J. V.; Rey, M. D.; 2021. Changes in the transcript and protein profiles of *Quercus ilex* seedlings in response to drought stress. *J. Proteom.* 243 104263.

Gugger, P. F.; Fitz-Gibbon, S.; Pelligrini, M.; Sork, V. L.; 2016. Species-wide patterns of DNA methylation variation in *Quercus lobata* and their association with climate gradients. *Mol. Ecol.* 25 1665-1680.

Guzmán, B.; López, C. M. R.; Forrest, A.; Cano, E.; Vargas, P.; 2015. Protected areas of Spain preserve the neutral genetic diversity of *Quercus ilex* L. irrespective of glacial refugia. *Tree Genet. Genomes* 11 1-18.

Idrees, M.; Irshad, M.; 2014. Molecular markers in plants for analysis of genetic diversity: a review. *Eur. J. Acad. Res.* 2 1513-1540.

Iwasaki, M.; Paszkowski, J.; 2014. Epigenetic memory in plants. *EMBO J.* 33 1987-1998.

Jiménez-Herrera, M.; 2021. Estudios del efecto y la respuesta a estrés múltiple en *Quercus ilex*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Córdoba.

Jorge, I.; Navarro, R. M.; Lenz, C.; Ariza, D.; Porras, C.; Jorrín-Novo, J. V.; 2005. The Holm Oak leaf proteome: Analytical and biological variability in the protein expression level assessed by 2-DE and protein identification tandem mass spectrometry *de novo* sequencing and sequence similarity searching. *Proteomics* 5 222-234.

Jorge, I.; Navarro, R. M.; Lenz, C.; Ariza, D.; Jorrín-Novo, J. V.; 2006. Variation in the holm oak leaf proteome at different plant developmental stages, between provenances and in response to drought stress. *Proteomics* 6 S207-214.

Kotrade, P.; Sehr, E. M.; Wischnitzki, E.; Brüggemann, W.; 2019. Comparative transcriptomics-based selection of suitable reference genes for normalization of RT-qPCR experiments in drought-stressed leaves of three European *Quercus* species. *Tree Genet. Genomes* 15 1-12.

Kukurba, K. R.; Montgomery, S. B.; 2015. RNA sequencing and analysis. *Cold Spring Harb. Protoc.* 951-969.

Labella-Ortega, M.; 2020. Búsqueda e identificación de marcadores genéticos y epigenéticos para la caracterización de la variabilidad en encina. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Córdoba.

Labella-Ortega, M.; 2021. Estudio de la variabilidad de *Quercus ilex* mediante análisis de DNA tipo microsatélites y marcas epigenéticas. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Córdoba.

Lamelas, L.; Valledor, L.; López-Hidalgo, C.; Cañal, M. J.; Meijón, M.; 2021. Nucleus and chloroplast: A necessary understanding to overcome heat stress in *Pinus radiata*. *Plant Cell Environ.*

López-Hidalgo, C.; Menéndez, M.; Jorrín-Novo, J. V.; 2021. Phytochemical composition and variability in *Quercus ilex* acorn morphotypes as determined by NIRS and MS-based approaches. *Food Chem.* 338 127803.

López-Hidalgo, C.; Guerrero-Sánchez, V. M.; Gómez-Gálvez, I.; Sánchez-Lucas, R.; Castillejo-Sánchez, M. A.; Maldonado-Alconada, A. M.; Valledor, L.; Jorrín-Novo, J. V.; 2018. A multi-omics analysis pipeline for the metabolic pathway reconstruction in the orphan species *Quercus ilex*. *Front. Plant Sci.* 9 935.

Manos, P. S.; Doyle, J. J.; Nixon, K. C.; 1999. Phylogeny, biogeography, and processes of molecular differentiation in *Quercus* subgenus *Quercus* (Fagaceae). *Mol. Phylogen. Evol.* 12 333-349.

Monteiro, M. S.; Carvalho, M.; Bastos, M. L.; Guedes de Pinho, P.; 2013. Metabolomics analysis for biomarker discovery: advances and challenges. *Curr. Med. Chem.* 20 257-271.

Moralejo, E.; Pérez-Sierra, A. M.; Álvarez, L. A.; Belbahri, L.; Lefort, F.; Descals, E.; 2009. Multiple alien Phytophthora taxa discovered on diseased ornamental plants in Spain. *Plant Pathol.* 58 100-110.

Nixon, K. C.; 1993. Infrageneric classification of *Quercus* (Fagaceae) and typification of sectional names. *Ann. sci. for.* 50 25-34.

Ortego, J.; Bonal, R.; Muñoz, A.; 2010. Genetic consequences of habitat fragmentation in long-lived tree species: the case of the Mediterranean holm oak (*Quercus ilex*, L.). *J. Hered.* 101 717-726.

Palsson, B; 2015. Systems biology. Cambridge university press.

Pasquini, S.; Braidot, E.; Petruzza, E.; Vianello, A.; 2011. Effect of different storage conditions in recalcitrant seeds of holm oak (*Quercus ilex* L.) during germination. *Seed Sci. Technol.* 39 165-177.

Pedrosa, M.; Guerrero-Sánchez, V. M.; Canales-Bueno, N.; Loli-Ausejo, D.; Castillejo, M. A.; Quirce, S.; Jorrín-Novo, J. V.; Rodriguez-Perez, R.; 2020. *Quercus ilex* pollen allergen, Que i 1, responsible for pollen food allergy syndrome caused by fruits in Spanish allergic patients. *Clin. Exp. Allergy* 50 815-823.

Plomión, C.; Aury, J. M.; Amselem, J.; Alaeitabar, T.; Barbe, V.; Belser, C.; Bergès, H.; Bodénès, C.; Boudet, N.; et al; 2016. Decoding the oak genome: public release of sequence data, assembly, annotation and publication strategies. *Mol. Ecol. Resour.* 16 254-265.

Plomíón, C.; Aury, J. M.; Amselem, J.; Leroy, T.; Murat, F.; Duplessis, S.; Fayne, S.; Francillonne, N.; et al; 2018. Oak genome reveals facets of long lifespan. *Nat. Plants* 4 440-452.

Ramos, A. M.; Usié, A.; Barbosa, P.; Barros, P. M.; Capote, T.; Chaves, I.; Simoes, F.; Abreu, I.; et al; 2018. The draft genome sequence of cork oak. *Sci. Data* 5 1-12.

Rey, M. D.; Castillejo, M. Á.; Sánchez-Lucas, R.; Guerrero-Sánchez, V. M.; López-Hidalgo C.; Romero-Rodríguez, M. C.; Valero-Galván, J.; Sghaier-Hammami, B.; et al; 2019. Proteomics, Holm oak (*Quercus ilex* L.) and other recalcitrant and orphan forest tree species: How do they see each other? *Int. J. Mol. Sci.* 20 692.

Rico, L.; Ogaya, R.; Barbata, A.; Peñuelas, J.; 2014. Changes in DNA methylation fingerprint of *Quercus ilex* trees in response to experimental field drought simulating projected climate change. *Plant Biol.* 16 419-427.

Romero-Rodríguez, M. C.; Pascual, J.; Valledor, L.; Jorrín-Novo, J.; 2014. Improving the quality of protein identification in non-model species. Characterization of *Quercus ilex* seed and *Pinus radiata* needle proteomes by using SEQUEST and custom databases. *J. Proteom.* 105 85-91.

Romero-Rodríguez, M. C.; Abril, N., Sánchez-Lucas, R.; Jorrín-Novo, J. V.; 2015. Multiplex staining of 2-DE gels for an initial phosphoproteome analysis of germinating seeds and early grown seedlings from a non-orthodox specie: *Quercus ilex* L. subsp. *ballota* [Desf.] Samp. *Front. Plant Sci.* 6 620.

Romero-Rodríguez, M. C.; Jorrín-Novo, J. V.; Castillejo, M. A.; 2019. Toward characterizing germination and early growth in the non-orthodox forest tree species *Quercus ilex* through complementary gel and gel-free proteomic analysis of embryo and seedlings. *J. Proteom.* 197 60-70.

Ruiz Gómez, F. J.; Pérez-de-Luque, A.; Sánchez-Cuesta, R.; Quero, J. L.; Navarro-Cerrillo, R. M.; 2018. Differences in the response to acute drought and *Phytophthora cinnamomi* Rands Infection in *Quercus ilex* L. seedlings. *Forests* 9 634.

Sánchez, M. E.; Navarro, R. M.; Trapero, A.; Fernández, P.; 2000. La “seca” de encinas y alcornoques: una visión histórica. *Montes* 62 29-39.

Sánchez, M. E.; Caetano, P.; Ferraz, J.; Trapero, A.; 2002. *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in south-western Spain. *For. Pathol.* 32 5-18.

San-Eufrasio, B.; Sánchez-Lucas, R.; López-Hidalgo, C.; Guerrero-Sánchez, V. M.; Castillejo, M. A.; Maldonado-Alconada, A. M.; Jorrín-Novo, J. V.; Rey, M. D.; 2020. Responses and differences in tolerance to water shortage under climatic dryness conditions in seedlings from *Quercus* spp. and Andalusian *Q. ilex* populations. *Forests*, 11 707.

San-Eufrasio, B.; Castillejo, M. Á.; Labella-Ortega, M.; Ruiz-Gómez, F. J.; Navarro-Cerrillo, R. M.; Tienda-Parrilla, M.; Jorrín-Novo, J. V.; Rey, M. D.; 2021(a). 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.

San-Eufrasio, B.; Bigatton, E. D.; Guerrero-Sánchez, V. M.; Chaturvedi, P.; Jorrín-Novo, J. V.; Rey, M. D.; Castillejo, M. Á.; 2021(b). Proteomics data analysis for the identification of proteins and derived proteotypic peptides of potential use as putative drought tolerance markers for *Quercus ilex*. *Int. J. Mol. Sci.* 22 3191.

Sghaier-Hammami, B.; Valero-Galván, J.; Romero-Rodríguez, M. C.; Navarro-Cerrillo, R. M.; Abdelly, C.; Jorrín-Novo, J. V.; 2013. Physiological and proteomics analyses of Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota* [Desf.] Samp.) responses to *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Physiol. Biochem.* 71 191-202.

Sghaier-Hammami, B.; Redondo-López, I.; Valero-Galván, J.; Jorrín-Novo, J. V.; 2016. Protein profile of cotyledon, tegument, and embryonic axis of mature acorns from a non-orthodox plant species: *Quercus ilex*. *Planta* 243 369-396.

Sghaier-Hammami, B.; Hammami, S.; Baazaoui, N.; Gómez-Díaz, C.; Jorrín-Novo, J. V.; 2020. Dissecting the seed maturation and germination processes in the Non-Orthodox *Quercus ilex* species based on protein signatures as revealed by 2-DE coupled to MALDI-TOF/TOF proteomics strategy. *Int. J. Mol. Sci.* 21 4870.

Sghaier-Hammami, B.; Castillejo, M. Á.; Baazaoui, N.; Jorrín-Novo, J. V.; Escandón, M.; 2021. GeLC-Orbitrap/MS and 2-DE-MALDI-TOF/TOF comparative proteomics analysis of seed cotyledons from the non-orthodox *Quercus ilex* tree species. *J. Proteom.* 233 104087.

Sork, V. L.; Fitz-Gibbon, S. T.; Puiu, D.; Crepeau, M.; Gugger, P. F.; Sherman, R.; Stevens, K.; Langley, C. H.; 2016. First draft assembly and annotation of the genome of a California endemic oak *Quercus lobata* Née (Fagaceae). *G3-Genes Genom. Genet.* 6 3485-3495.

Soto, A.; Lorenzo, Z.; Gil, L.; 2007. Differences in fine-scale genetic structure and dispersal in *Quercus ilex* L. and *Q. suber* L.: consequences for regeneration of Mediterranean open woods. *Heredity* 99 601-607.

Tejerina, D.; García-Torres, S.; de Vaca, M. C.; Vázquez, F. M.; Cava, R.; 2011. Acorns (*Quercus rotundifolia* Lam.) and grass as natural sources of antioxidants and fatty acids in the “montanera” feeding of Iberian pig: Intra-and inter-annual variations. *Food Chem.* 124 997-1004.

Thiebaut, F.; Hemerly, A. S.; Ferreira, P. C. G.; 2019. A role for epigenetic regulation in the adaptation and stress responses of non-model plants. *Front. Plant Sci.* 10 246.

Tienda-Parrilla, M.; 2021. La metabolómica en el análisis fitoquímico y búsqueda de compuestos bioactivos en *Quercus*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Córdoba.

Turgut-Kara, N.; Arikan, B.; Celik, H.; 2020. Epigenetic memory and priming in plants. *Genetica* 148 47-54.

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.

Valero-Galván, J.; Sghaier-Hammami, B.; Navarro-Cerrillo, R. M.; Jorrín-Novo, J. V.; 2012. Natural variability and responses to stresses in Andalusia Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota*) populations. *Oak: Ecology, Types and Management*; Chuteira, CA, Grão, AB, Eds, 193-206.

Valero-Galván, J.; González-Fernández, R.; 2013. Physiological and proteomic analyses of drought stress response in Holm oak provenances. *J. Proteome Res.* 12 5110-5123.

Valero-Galván, J.; Fernández, R. G.; Valledor, L.; Navarro-Cerrillo, R. M.; Jorrín-Novo, J. V.; 2014. Proteotyping of Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota*) provenances through proteomic analysis of acorn flour. In *Plant Proteomics* (pp. 709-723). Humana Press, Totowa, NJ.

Vivas, M.; Hernández, J.; Corcobado, T.; Cubera, E.; Solla, A.; 2021. Transgenerational induction of resistance to *Phytophthora cinnamomi* in Holm oak. *Forests* 12 100.

Zhang, H.; Lang, Z.; Zhu, J. K.; 2018. Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19 489-506.

## Figuras



*Figura 1. Ejemplo de un individuo de encina localizado en una dehesa de Andalucía.*