

## RESUMEN

En este trabajo, se han aplicado dos estrategias biotecnológicas sobre cultivos embriogénicos de olivo con el fin de mejorar su tolerancia a patógenos fúngicos.

En la primera se han transformado genéticamente embriones globulares del cultivar Picual, con el gen *afp* procedente del hongo *Aspergillus giganteus* mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Se obtuvieron varias líneas independientes cuya naturaleza transgénica ha sido confirmada mediante análisis molecular. Se obtuvo una tasa de transformación media del orden del 2 % y se han regenerado plantas de siete líneas independientes. Asimismo, se intentó establecer un sistema de selección con el herbicida fosfotricina (PPT). Los resultados obtenidos indicaron un efecto significativo del PPT a concentraciones de 2,5-10 mg/l sobre la proliferación celular del callo. La selección en medio líquido suplementado con PPT fue más efectiva que la selección en medio sólido. Sin embargo, la concentración de PPT más alta testada, 10 mg/l, no fue suficiente para inhibir totalmente del crecimiento del callo.

La segunda estrategia fue la inducción de variación somaclonal en cultivos embriogénicos usando un filtrado del hongo patógeno *Rosellinia necatrix* como agente de selección. Los resultados obtenidos mostraron que la selección es más eficaz en medio líquido que en sólido; así, se consiguió proliferación celular tras el cultivo del callo en un medio líquido suplementado con 40 y 60 % de filtrado crudo del hongo y posteriormente se han regenerado plantas.

Finalmente, se evaluó el potencial embriogénico de algunas líneas nuevas de callo embriogénico de olivo, cv. Picual. Este potencial embriogénico varía mucho entre las líneas y con la duración del cultivo en medio de mantenimiento.

## SUMMARY

In this investigation, two biotechnological strategies were applied to embryogenic olive cultures to improve its tolerance to fungal pathogens.

In the first one, globular embryos of cultivar Picual were transformed with the *afp* gene from the fungus *Aspergillus giganteus* by *Agrobacterium tumefaciens*. Several transgenic independent lines were obtained whose transgenic nature was confirmed by molecular analysis. An average transformation rate of around 2 % has been obtained and plants were regenerated from seven independent lines. Also, we attempted to establish a selection system with the herbicide phosphinothricin (PPT). The results indicate a significant effect of PPT at concentrations of 2,5-10 mg/l on callus proliferation. The selection with PPT was more effective in liquid than in solid medium. However, the highest PPT concentration tested, 10 mg/l, was not sufficient to completely inhibit callus growth.

The second strategy was the induction of somaclonal variation in embryogenic cultures using a filtrate of the pathogenic fungus *Rosellinia necatrix* as selection agent. The results obtained showed that the selection is more effective in liquid than in solid medium. Cell proliferation was achieved after culturing the callus in liquid medium supplemented with 40 and 60 % of fungal filtrate and plants, subsequently, have been regenerated.

Finally, the embryogenic potential of several new embryogenic cell lines of olive, cv. Picual, has been evaluated. The embryogenic potential varies considerably among the lines and with time in culture in the maintenance medium.

## RÉSUMÉ

Dans ce travail, deux stratégies biotechnologiques ont été appliquées sur des cultures embryogéniques d'olivier en vue d'améliorer sa tolérance aux pathogènes fongiques.

Dans la première, des embryons globulaires du cultivar Picual ont été transformés avec un gène *aff* provenant du champignon *Aspergillus giganteus* à l'aide d'*Agrobacterium tumefaciens*. Plusieurs lignées transgéniques indépendantes ont été obtenues dont la nature transgénique a été confirmée par analyse moléculaire. Un taux de transformation moyen de l'ordre de 2 % a été obtenu et des plantes de sept lignées indépendantes ont été régénérées. De plus, on a essayé d'établir un système de sélection par l'herbicide phosphinothricine (PPT). Les résultats obtenus indiquent un effet significatif du PPT à des concentrations de 2,5-10 mg/l sur la prolifération cellulaire du cal. La sélection dans le milieu liquide additionné de PPT était plus efficace que la sélection sur milieu solide. Cependant, la concentration du PPT testée la plus élevée, 10 mg/l, n'a pas été suffisante pour inhiber totalement la croissance du cal.

La deuxième stratégie a été l'induction de la variation somaclonale sur des cultures embryogènes en utilisant un filtrat d'un champignon pathogène *Rosellinia necatrix* comme agent de sélection. Les résultats obtenus ont montré que la sélection est plus efficace dans un milieu liquide que solide, par conséquent, une prolifération cellulaire a été obtenue après la culture du cal dans un milieu liquide additionné de 40 et 60 % du filtrat brut du champignon et postérieurement des plantes ont été régénérées.

Finalement, on a évalué le potentiel embryogénique de certaines nouvelles lignées de cals embryogènes d'olivier, cv. Picual. Ce potentiel varie considérablement entre les lignées et avec la durée de culture en milieu de maintenance.

