RESUMEN

El olivo (*Olea europaea* L.) es uno de los cultivos más antiguos y más importantes en la cuenca mediterránea. El tiempo que transcurre entre la realización del cruzamiento para generar variabilidad genética y la fijación del genotipo que se va a cultivar es uno de los factores que determinan las estrategias a seguir en un programa de mejora genética. Este factor es aún más importante en plantas leñosas, con ciclos vitales largos, como en el olivo. Por este motivo, en este trabajo se pretende analizar el uso de la haplo-diploidización a partir del cultivo de poliembriones como una herramienta que podría ser de utilidad en los programas de mejora de olivo, además de estudiar la influencia del genotipo en la respuesta a la embriogénesis somática en olivo.

Se han optimizado las técnicas de cultivo *in vitro* de embriones inmaduros de olivo y se ha realizado la evaluación del grado de poliembrionía en la colección mundial de olivo. Tan solo se detectó poliembrionía de forma espontánea en 27 de las 80 variedades estudiadas. Las plantas obtenidas a partir del cultivo *in vitro* de los poliembriones fueron evaluadas mediante citometría de flujo para determinar su nivel ploídico. Como resultado de este análisis, y en contra de lo esperado, no se obtuvo ninguna planta haploide, lo que puso de manifiesto que el cultivo de poliembriones no puede ser utilizado como herramienta para generar haploides de olivo, que serían de gran utilidad en programas de mejora.

Por otra parte se ha evaluado la influencia del genotipo del cultivar y se han optimizado también los medios y las condiciones de cultivo para la respuesta a la embriogénesis somática a partir de cotiledones y radículas de los distintos cultivares de la colección mundial de olivo. Cuando se cultivaron embriones maduros, 13 de las 33 variedades evaluadas dieron lugar a plántulas de olivo, siendo la radícula la zona del embrión con mayor capacidad embriogénica. Cuando se utilizaron embriones inmaduros, Picual fue la variedad que mejor respondió a la embriogénesis somática.

Los resultados de este trabajo han puesto de manifiesto la enorme dificultad de trabajar en condiciones de cultivo *in vitro* con una especie tan compleja y desconocida a nivel genético como el olivo, y pueden servir de base en posteriores aproximaciones encaminadas a la generación de haploides de olivo.

SUMMARY

Olive (*Olea europaea* L.) is one of the oldest crops in the mediterranean area. The time needed between the initial crosses and getting genetic variability and fix the genotype at the end is one of the factors in choosing the strategy in a plant breeding programme. Moreover it is crucial in a wooden plant with long life-cycle like olive. For this reason we aimed to use in this work the haploid-diploidisation as a helpful tool to be used in breeding programmes. We also studied the influence of the genotype in the response to the somatic embryogenesis in olive.

We set up the techniques for *in vitro* culture of olive immature embryos and the test of the poly-embryo degree in the world germoplasm bank of olive. We only detected spontaneous poly-embryos in 27 out of 80 olive varieties. These plants were evaluated by flow cytometry to quantify the ploidy level and they all were diploids. This means that the culture of olive poly-embryos cannot be used as a tool in plant breeding programmes to generate haploids, which will be an extraordinary tool in plant breeding programmes.

On the other hand we also evaluated the influence of the genotype and the culture conditions in the response to the somatic embryogenesis from cotyledons and roots using the olive germoplasm bank. In the case of using mature embryos, 13 out of 33 analysed varieties generated olive plants. Roots were the area of the mature embryo with a higher embryogenic potential. In the case of using immature embryos, Picual was the variety with a higher response to somatic embryogenesis.

Our results pointed the enormous difficulty of olive *in vitro* culture due to the fact that olive is a very complex and unknown at the genetic level, but they can still be taken into account for some other approaches to generate olive haploids for breeding programmes.

الملخص

يعد الزيتون واحدا من أقدم وأهم المحاصيل المزروعة في منطقة حوض البحر الأبيض المتوسط. يعتبرالوقت الذي التهجينات من أجل حدوث تغيرات وراثية و ثبات التركيب الوراثي الذي سيتم زراعته واحدا من يمر مابين حدوث العوامل التي تحدد الإستراتيجيات المستخدمة في برامج التربية و التحسين الوراثي. وهذا العامل مهم جدا في النباتات الخشبية ذات دورة الحياة الطويلة، مثل الزيتون. ومن أجل ذلك، في هذا البحث يرغب إستخدام النباتات أحادية العددالكروموسومي كوسيلة يمكنها المساعدة في برامج التربية و التحسين الوراثي في الزيتون، وكذلك دراسة تأثير التركيب الوراثي علي الإستجابة ل Somatic Embryogenesis في الزيتون.

تم تقييم نسبة الثمار عديدة الأجنة في 80 صنفا من البنك الدولي للجينات في قرطبة، ووجدت ثمار متعددة الأجنة في 27 صنفا من الأصناف التي تم دراستها. تمت زراعة الأجنة المتحصل عليها من الثمار المتعددة الأجنة بواسطة الإكثار المعملي بغرض معرفة إمكانية الحصول علي نباتات أحادية العدد الكروموسومي. تم تحليل النباتات المتحصل عليها من هذه الأجنة بواسطة Flow Cytometry.

وعلي غير المتوقع لم يتم الحصول علي أي نبات أحادي ووجد أن جميع النباتات المتحصل عليها هي نباتات ثنائية العدد الكروموسومي وبذلك وجد أن إستخدام الأجنة الناتجة من ثمار متعددة الأجنة لا يعطي النتائج المتوقعة للحصول علي نباتات أحادية العدد الكروموسومي في الزيتون وإن كانت لها أهمية كبير في برامج التربية والتحسين الوراثي.

ومن جانب أخر تم دراسة إستجابة الأصناف المختلفةSomatic Embryogenesis حيث تم إستخدام 33 صنفا كاملة النضج ووجد أن فقط 13 صنفا قد أعطوا نباتات كاملة، ومن ناحية أخري وجد أن الجذير له مقدرة علي تكوين نباتات كاملة أكثر من الأوراق الفلقية (الأوراق غير الحقيقية)، وكذلك وجد أن الأجنة الغير كاملة النضج لها إستجابة أكبر من الأجنة الناضجة. الصنف بيكوال أعطي أكبر إستجابة وأكبر عدد من النباتات عند أستخدام الأجنة غير الناضجة.

هذا العمل يوضح الصعوبات الضخمة التي تواجه الإكثار المعملي لصنف معقد وغير معروف علي المستوي الوراثي جيدا مثل الزيتون، وهذه النتائج يمكن أن تكون قاعدة للمساعدة في أعمال اخري مستقبلية للحصول علي نباتات أحادية العدد الكروموسومي في الزيتون.