

Resumen

El olivo (*Olea europaea* L.) enfrenta una grave amenaza debido a *Xylella fastidiosa*, bacteria fitopatógena asociada al síndrome de decaimiento rápido, que provoca necrosis foliar, pérdida de productividad y mortalidad de árboles. La limitada resistencia de la mayoría de los cultivares comerciales frente a este patógeno hace prioritaria la incorporación de herramientas biotecnológicas que aceleren los programas de mejora genética y permitan incrementar la resistencia del cultivo. Entre las herramientas biotecnológicas, la embriogénesis somática (ES) destaca como una plataforma para la mejora genética, al permitir la regeneración de plantas a partir de material adulto y facilitar la selección de genotipos más resistentes. En este trabajo se ha desarrollado un protocolo para establecer *in vitro* 5 cultivares de olivo con distinta respuesta a este patógeno: cuatro susceptibles ('Arbequina', 'Oliana', 'Canino' y 'Ogliarola') y uno resistente ('Leccino'), utilizando como explanto secciones nodales de material adulto revigorizado. Este material se ha usado como fuente de explantos para experimentos de inducción de embriogénesis. Así, se evaluó la capacidad embriogénica de los cultivares 'Arbequina' 'Canino' en comparación con la del genotipo de olivo silvestre 'StopVert' (control) utilizando dos fuentes de material: (1) brotes previamente iniciados *in vitro* y (2) brotes obtenidos de plantas en invernadero. Se utilizaron explantos con meristemas (ápices y secciones nodales) así como secciones foliares y peciolo, analizando la influencia del genotipo, el origen y tipo de explanto en la respuesta embriogénica. En micropropagación, siguiendo la metodología de Vidoy et al. (2012), en la fase de establecimiento (iniciación y elongación) con el medio RV, se obtuvo una respuesta eficaz en 'Arbequina', 'Oliana', 'Canino' y 'Ogliarola'. Por el contrario, 'Leccino' requirió usar el medio ½ RP suplementado con 0,5 mg/L de ribósido de zeatina (RZ) para la iniciación de brotes y ½ RP con 1 mg/L de RZ para la elongación. En la fase de multiplicación, el medio RP con 2 mg/L de RZ mostró los mejores resultados, mostrando una tasa de multiplicación en 'Oliana' de 1,30 u.m., seguido de una respuesta intermedia en 'Canino', 0,97 u.m., y un resultado limitado en 'Ogliarola', 0,4 u.m.. El sistema de cultivo en doble fase con 0,1 mg/L de RZ no produjo mejoras consistentes en ningún cultivar. En 'Leccino', ni el medio ½ RP con 2 mg/L de RZ ni su combinación con ácido giberélico (GA₃, 1,5 mg/L) mejoraron la tasa de multiplicación. Actualmente, se continúa con la optimización de la fase de multiplicación para los cultivares 'Ogliarola' y 'Leccino'. En la fase de enraizamiento, 'Oliana' fue evaluada en un protocolo en dos fases, consistente en inmersión en medio RP líquido con 10 mg/L de ácido indol butírico (IBA) durante 3 días, seguido de transferencia a medio RP sólido sin hormonas y suplementado con 1 g/L de carbón activado durante 6 semanas, con el que se

produjo un 52% de enraizamiento, con un promedio de 3 raíces por brote. Para la inducción de ES, se aplicó el tratamiento desarrollado para el genotipo StopVert (Narváez et al., 2019) que incluye un tratamiento en medio líquido ½ MS suplementado con 30 µM de tidiazurón (TDZ) y 0,54 µM de ácido naftalenacético (ANA) durante 4 días en oscuridad, seguido de 8 semanas de cultivo en medio ½ MS basal sólido sin reguladores de crecimiento. El cultivar ‘StopVert’ formó embriones somáticos a partir de meristemos de brotes iniciados *in vitro* en medio RV durante 4 semanas. ‘Canino’ generó callos con morfología embriogénica clara a partir de meristemos y secciones nodales de ambos orígenes de explanto (*in vitro* e invernadero), lo que constituye el primer reporte para este genotipo utilizando este protocolo y material revigorizado. ‘Arbequina’ mostró la menor competencia embriogénica. Los explantos con yemas (ápices y secciones nodales N1–N2) superaron consistentemente a los explantos foliares. Como línea futura, se prevé optimizar la proliferación de estos callos embriogénicos, impulsar la maduración y germinación de los embriones y completar el proceso de conversión en plantas.

Palabras clave: *Olea europaea*, *Xylella fastidiosa*, micropropagación, embriogénesis somática, formulación de medios, genotipos, materiales adultos.

Abstract

The olive tree (*Olea europaea* L.) faces a serious threat due to *Xylella fastidiosa*, a phytopathogenic bacterium associated with olive quick decline syndrome, which causes leaf necrosis, loss of productivity, and tree mortality. The limited resistance of most commercial cultivars to this pathogen makes it a priority to incorporate biotechnological tools that accelerate breeding programs and allow increasing crop resistance. Among biotechnological tools, somatic embryogenesis (SE) stands out as a platform for genetic improvement, as it enables the regeneration of plants from adult material and facilitates the selection of more resistant genotypes. In this work, a protocol was developed to establish *in vitro* five olive cultivars with different responses to this pathogen: four susceptible ('Arbequina', 'Oliana', 'Canino', and 'Ogliarola') and one resistant ('Leccino'), using nodal sections from rejuvenated adult material as explants. This material was used as the explant source for embryogenesis induction experiments. Thus, the embryogenic capacity of the cultivars 'Arbequina' and 'Canino' was evaluated in comparison with the wild olive genotype 'StopVert' (control) using two sources of material: (1) shoots previously initiated *in vitro* and (2) shoots obtained from greenhouse plants. Explants with meristems (apices and nodal sections) as well as leaf and petiole sections were used, analyzing the influence of genotype and of explant origin and type on the embryogenic response. In micropropagation, following the methodology of Vidoy et al. (2012), in the establishment phase (initiation and elongation) with RV medium, an effective response was obtained in 'Arbequina', 'Oliana', 'Canino', and 'Ogliarola'. By contrast, 'Leccino' required ½ RP medium supplemented with 0.5 mg/L zeatin riboside (RZ) for shoot initiation and ½ RP with 1 mg/L RZ for elongation. In the multiplication phase, RP medium with 2 mg/L RZ showed the best results, with a multiplication rate in 'Oliana' of 1,30 u.m., followed by an intermediate response in 'Canino', 0,97 u.m., and a limited result in 'Ogliarola', 0,40 u.m. The two-phase culture system with 0.1 mg/L RZ did not produce consistent improvements in any cultivar. In 'Leccino', neither ½ RP with 2 mg/L RZ nor its combination with gibberellic acid (GA₃, 1.5 mg/L) improved the multiplication rate. Optimization of the multiplication phase for the cultivars 'Ogliarola' and 'Leccino' is currently ongoing. In the rooting phase, 'Oliana' was evaluated with a two-step protocol consisting of immersion in liquid RP medium with 10 mg/L indole-3-butyric acid (IBA) for 3 days, followed by transfer to solid RP medium without hormones and supplemented with 1 g/L activated charcoal for 6 weeks, with which 52% rooting was obtained, with an average of 3 roots per shoot. For SE induction, the treatment developed for the 'StopVert' genotype (Narváez et al., 2019) was applied, which includes treatment in liquid

½ MS medium supplemented with 30 µM thidiazuron (TDZ) and 0.54 µM naphthaleneacetic acid (NAA) for 4 days in darkness, followed by 8 weeks of culture on solid basal ½ MS medium without growth regulators. The ‘StopVert’ genotype formed somatic embryos from meristems of shoots initiated *in vitro* on RV medium for 4 weeks. ‘Canino’ generated calli with clear embryogenic morphology from meristems and nodal sections from both explant origins (*in vitro* and greenhouse), constituting the first report for this genotype using this protocol and rejuvenated material. ‘Arbequina’ showed the lowest embryogenic competence. Explants with buds (apices and nodal sections N1–N2) consistently outperformed leaf explants. As a future line, it is planned to optimize the proliferation of these embryogenic calli, promote embryo maturation and germination, and complete the conversion to plants.

Keywords: *Olea europaea*, *Xylella fastidiosa*, micropropagation, somatic embryogenesis, medium formulation, genotypes, adult material.