

RESUMEN

Las pérdidas económicas ocasionadas por las enfermedades que afectan al cultivo del olivo son la base del interés en la mejora de la resistencia a patógenos. Para inducir tolerancia a patógenos fúngicos, se han utilizado dos estrategias biotecnológicas en este trabajo, transformación genética e inducción de variación somaclonal. Se han transformado embriones globulares derivados de una semilla del cv. Picual, con el gen *AtNPR1* procedente de *Arabidopsis thaliana* mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Se obtuvo una tasa de transformación de 0,2 %, habiéndose seleccionado 2 líneas embriogénicas independientes, que serán utilizadas para obtener embriones y posteriormente plantas transgénicas. Para la inducción de variación somaclonal, se han utilizado células embriogénicas cultivadas en presencia de filtrado de *Verticillium dahliae*, usado como agente de selección. Se han seleccionado algunas líneas celulares que han sobrevivido tras su exposición a distintas dosis de filtrado (20-60%).

En este trabajo, también se evaluó el efecto del filtrado crudo de *Verticillium dahliae* sobre brotes de acebuche micropropagados, habiéndose observado grandes diferencias entre la toxicidad de filtrados procedentes de distintos aislados, filtrados obtenidos en distintos periodos de cultivo del hongo, 7 o 21 días o, más sorprendente, filtrados del mismo periodo de cultivo, preparados en distintas fechas. Las variaciones en toxicidad se han encontrado al evaluar parámetros como longitud de brotes o número de hojas; sin embargo, todos los filtrados mostraron un efecto inhibitorio de la proliferación celular en la base de las estaquillas, así como en la proliferación de células embriogénicas. Estos resultados parecen indicar que la patogénesis del *Verticillium* en olivo no depende únicamente de la acción directa de las células del hongo bloqueando el sistema vascular de la planta, sino también de la toxina, capaz de expresar los síntomas de la Verticilosis *in vitro*; además, parece que la toxina no se difunde de manera uniforme a través del tejido, sino que debe estar en contacto directo con las células para ejercer su acción. Finalmente, se evaluó el efecto del cinamil acetato incorporado al medio de cultivo, obteniéndose efectos tóxicos sólo a altas concentraciones (200mg/l), aunque estos efectos eran similares a los obtenidos en el tratamiento control con la misma concentración de etanol.

SUMMARY

Improvement of fungal tolerance is one of the major goals of breeding programs in olive due to the high economic losses caused by fungal diseases. In this thesis, two biotechnological approaches have been assessed to improve fungal tolerance, genetic transformation and somaclonal variation. Globular somatic embryos derived from a seed of cv. Picual have been transformed with the *Arabidopsis thaliana* gene *AtNPR1* through *Agrobacterium tumefaciens* infection. A transformation rate of 0.2% has been obtained, and two independent transgenic callus lines have been selected. These transgenic calli will be used to obtain mature embryos and later transgenic plants. Olive embryogenic cells have been cultured in the presence of a filtrate of *Verticillium dahliae* culture, used as selective agent, to induce somaclonal variation. Several callus lines that survived following exposures to 20-60% filtrate have been recovered.

The effect of *Verticillium dahliae* filtrates on the growth of micropropagated wild olive shoots was also analyzed. The toxic effect of filtrates was significantly affected by the age of the fungal culture used, 7 or 21 days of culture, and, surprisingly, different culture filtrates at the same age yielded different effects on the shoots. Differences in the toxic effect of the different culture filtrates used were observed when analyzing length of shoots, number of developed axillary shoots and number of leaves per shoot. However, all filtrates analyzed displayed an inhibitory effect in the development of callus at the base of the microshoots, as well as in the proliferation of embryogenic cells. These results indicate that the effect of *Verticillium* in olive does not depend exclusively on the direct effect of the pathogen blocking the vascular system, but also on toxins excreted by the fungus. This toxin mimics the Verticilosis phenotype *in vitro*. Furthermore, it seems that the toxin does not diffuse uniformly through the olive tissue, and the cells should be in direct contact with the toxin to exert its effect. Finally, the toxicity of cinamil acetate was evaluated. This compound was toxic only at high concentration (200 mg/l) but the symptoms observed in the microshoots were similar to those exerted by a similar concentration of ethanol.