

## Resumen

El olivo (*Olea europaea* L.) es el cultivo oleaginoso más importante de la región mediterránea. Durante la última década, ha habido un gran interés en el desarrollo de herramientas biotecnológicas para ser aplicadas a la mejora genética de este cultivo. El gen 13-hidroperóxido liasa (13-HPL) de olivo, está implicado en la síntesis de volátiles responsables del aroma del aceite de oliva, y nuestro grupo dispone de líneas transformadas que muestran una diferente expresión del gen: S7A (gen sobreexpresado), i11cd (gen silenciado mediante RNAi) y AS5F (gen silenciado mediante tecnología antisentido). Por tanto, el primer objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la expresión de este gen en la capacidad de micropropagación de las diferentes líneas transgénicas. La línea AS5F mostró una disminución de su capacidad de crecimiento *in vitro*, mientras que las líneas i11cd y S7A crecieron de manera casi similar al control P1.3. Tras 3 días de exposición al ácido indol-3-butírico, 10 mg/l, a excepción de la línea AS5F, que mostró una baja tasa de enraizamiento, las líneas i11cd y S7A enraizaron a una tasa muy alta, similar al control. El segundo objetivo de esta investigación fue desarrollar un protocolo de transformación de olivo con *Agrobacterium rhizogenes*, de manera que se puedan obtener plantas compuestas, parte aérea no transgénica y raíz transgénica, para su uso en la evaluación del efecto de genes implicados en la tolerancia a hongos de suelo. En estos experimentos se empleó fundamentalmente, la cepa k599 con el plásmido binario *pKGWFS7.0-35S*, que incluye el gen de *gfp* (fluorescencia verde), para evaluar su efecto sobre la capacidad de supervivencia y de enraizamiento de dos genotipos P1 y P138 del cv. "Picual". También se ensayó la combinación entre auxina (10 mg/l de IBA) y la cepa k599. Además de la cepa k599, se han utilizado otras tres cepas: LBA9402, A4 y C58C1, con el plásmido silvestre Ri. Todavía es necesario realizar más estudios para poner a punto esta metodología, pero como resultado de nuestros experimentos, podemos concluir que el uso de la cepa k599 indujo el enraizamiento de algunos brotes del genotipo P1, en ausencia de auxina. La combinación entre auxina y la cepa k599 no aumentó la capacidad de enraizamiento del genotipo P1, pero da lugar a la formación de algunas raíces transformadas. Tras la amplificación por PCR del gen *vir* (gen auxiliar en el proceso transformación), en las raíces obtenidas tras la inoculación con cuatro cepas distintas de *A. rhizogenes*, se observó la presencia de la bacteria en el caso de plantas previamente infectadas con las cepas A4 y C58C1.

## Abstract

The olive (*Olea europaea L.*) is the most important oleaginous crop in the mediterranean region. Within the last decade, there has been a growing interest in developing biotechnological tools to be applied on the genetic improvement of this crop. The olive 13-hydroperoxide lyase (13-HPL) gene is involved in the synthesis of volatiles responsible for the aroma of olive oil, and our group has transformed lines that show a different gene expression: S7A (overexpressed gene), i11cd (gene silenced by RNAi) and AS5F (gene silenced by antisense technology). Therefore, the first objective of this study was to evaluate the effect of the expression of this gene on the micropropagation capacity of the different transgenic lines. The AS5F line showed a decrease in its growth capacity *in vitro*, while the i11cd and S7A lines grew almost similarly to the P1.3 control. After 3 days of exposure to indole-3-butyric acid, 10 mg/l, with the exception of the AS5F line, which showed a low rooting rate, the i11cd and S7A lines rooted at a very high rate, similar to the control. The second objective of this research was to develop an olive transformation protocol with *Agrobacterium rhizogenes*, to produce composite plants, comprising a transgenic hairy root system attached to non-transformed shoots and leaves, that's can be used to evaluate the effect of genes involved in the tolerance to soil fungi. In these experiments, the k599 strain with the binary plasmid pKGWFS7.0-35S, which includes the *gfp* gene (green fluorescence), was used to evaluate its effect on the survival and rooting ability of two P1 and P138 genotypes of cv. "Picual". The combination between auxin (10 mg/l IBA) and strain k599 was also tested. In addition to strain k599, three other strains have been used: LBA9402, A4 and C58C1, with the wild-type plasmid Ri. Further studies are needed to fine-tune this methodology, but as a result of our experiments, we can conclude that the use of the strain k599 induced the rooting of some shoots of the P1 genotype, in the absence of auxin. The combination between auxin and strain k599 did not increase the rooting capacity of the P1 genotype, but it resulted in the formation of some transformed roots. After amplification by PCR of the *vir* gene (auxiliary gene in the transformation process), on the roots obtained after inoculation with four different strains of *A. rhizogenes*, the presence of the bacterium was observed in the case of plants previously infected with strains A4 and C58C1.

## Résumé

L'olivier (*Olea europaea L.*) est la culture oléagineuse la plus importante de la région méditerranéenne. Au cours de la dernière décennie, il y a eu un grand intérêt pour le développement des outils biotechnologiques afin d'être appliqués dans l'amélioration génétique de cette culture. Le gène d'olivier 13-hydroperoxy lyase (13-HPL) est impliqué dans la synthèse des composés volatiles responsables de la saveur de l'huile d'olive, et notre groupe a transformé les lignes qui montrent une différente expression du gène: S7A (gène surexprimé), i11cd (gène réduit au silence par ARNi) et AS5F (gène réduit au silence par la technologie antisens). Par conséquent, le premier objectif de cette étude était d'évaluer l'effet de l'expression de ce gène sur la capacité de micropropagation des différentes lignées transgéniques. La lignée AS5F a montré une diminution de sa capacité de croissance *in vitro*, tandis que les lignées i11cd et S7A ont augmenté presque de la même manière que la lignée témoin P1.3. Après 3 jours d'exposition à l'indole-3-butyrique, 10 mg/l, à l'exception de la ligne AS5F, qui a montré une baisse du taux d'enracinement, les lignes i11cd et S7A enracinèrent à un taux très élevé, comparativement au témoin. Le second objectif de cette recherche était de développer un protocole de transformation de l'olivier avec *Agrobacterium rhizogenes*, afin d'obtenir des plantes composites, partie aérienne non transgénique et racine transgénique, et aussi son utilisation dans l'évaluation de l'effet des gènes impliqués dans la tolérance aux champignons du sol. Dans ces expériences, on a utilisé essentiellement la souche K599 avec le plasmide binaire *pKGWFS7.0-35S*, qui inclut le gène *gfp* (la fluorescence verte), afin d'évaluer leur effet sur la capacité de survie et d'enracinement de deux génotypes P1 et P138 de cv. "Picual". La combinaison entre l'auxine (IBA 10 mg/l) et la souche k599 a également été testée. En plus de la souche K599, on a utilisé trois autres souches LBA9402, A4 et C58C1 avec le plasmide sauvage Ri. Encore on a besoin de réaliser d'autres études pour parfaire cette méthodologie, mais à la suite de nos expériences, nous concluons que l'utilisation de la souche k599 induit l'enracinement de certaines poussées du génotype P1, en l'absence d'auxine. La combinaison entre l'auxine et la souche k599 n'a pas augmenté la capacité d'enracinement du génotype P1, mais elle a entraîné la formation de certaines racines transformées. Après l'amplification par PCR du gène *vir* (gène auxiliaire dans le processus de transformation), des racines obtenues après l'inoculation avec quatre souches différentes, la présence de la bactérie a été observée dans le cas des plants préalablement infectés par les souches A4 et C58C1.