



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS DOCTORAL



**Regeneración y transformación genética
para la obtención de plantas de olivo
resistentes a patógenos fúngicos**

ISABEL NARVÁEZ JURADO

2018



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Departamento de Biología Vegetal
Área de Fisiología Vegetal

TESIS DOCTORAL

Regeneración y transformación genética para la obtención de plantas de olivo resistentes a patógenos fúngicos

Isabel Narváez Jurado

Directores

Fernando Pliego Alfaro

José Ángel Mercado Carmona

Facultad de Ciencias

Programa de Doctorado: Biotecnología Avanzada

Málaga, 2018


UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Isabel Narváez Jurado

 <http://orcid.org/0000-0001-7986-6541>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



D. FERNANDO PLIEGO ALFARO y D. JOSÉ ÁNGEL MERCADO CARMONA,
CATEDRÁTICOS DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL DE LA
UNIVERSIDAD DE MALAGA

Certifican que la memoria de Tesis Doctoral titulada “Regeneración y transformación genética para la obtención de plantas de olivo resistentes a patógenos fúngicos”, presentada por Dña. Isabel Narváez Jurado, para optar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo su dirección y supervisión en los Laboratorios del Área de Fisiología Vegetal, Departamento de Biología Vegetal y autorizan su presentación para su defensa en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga.

Para que así conste, firman el presente certificado en Málaga, 28 de Mayo de 2018.



Dr. Fernando Pliego Alfaro



Dr. José Ángel Mercado Carmona



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

El presente trabajo ha sido financiado por:

Proyecto de excelencia P11-AGR-7992, Junta de Andalucía

Como doctoranda disfruté de una Beca como Personal Investigador en Formación (PIF) asociada a dicho Proyecto.

Durante la realización de esta tesis doctoral he podido realizar tres estancias:

Mayo – Julio 2016: Laboratorio de Cultivo de tejidos y Biotecnología, bajo la supervisión de la Dra. Clara Pliego Prieto. Centro de investigación IFAPA, Churriana, Málaga (España). Proyecto de Excelencia P11-AGR-7992.

20 Septiembre – 19 Diciembre 2016: Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Wageningen, Wageningen (The Netherlands), liderado por el Dr. Bart P.H.J. Thomma. Subvención concedida por el programa de ayuda para Estancias en Centros de Investigación de Calidad, Servicio de Investigación, Plan Propio de la Universidad de Málaga.

Marzo – Septiembre 2017 (durante distintos periodos): Dpto. de Biotecnología-Biología Vegetal, ETS Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid (España), bajo la supervisión de la Dra. Carmen Martín Fernández. Proyecto de Excelencia P11-AGR-7992.

Parte de los resultados obtenidos se han publicado en:

Narvaez, I., Khayreddine, T., Pliego, C., Cerezo, S., Jiménez-Díaz, R. M., Trapero-Casas, J. L., López-Herrera, C., Arjona-Girona, I., Martín, C., Mercado, J. A., and Pliego-Alfaro, F. (2018). Usage of the heterologous expression of the antimicrobial gene *afp* from *Aspergillus giganteus* for increasing fungal resistance in olive. *Front. Plant Sci.* 9:680. doi: 10.3389/fpls.2018.00680

Y se han presentado en los siguientes congresos:

Narváez, I., Martín, C., Mercado, J. A., Jiménez-Díaz, R., Pliego-Alfaro, F. (2017). “Regeneración de plantas, vía embriogénesis somática, a partir de material adulto de olivo silvestre”. XII Reunión de la SECIVTV: Plantas in vitro para el futuro/ Plants in vitro for the future, Madrid, España. 2017

Narváez, I.; Mercado, J. A.; Jiménez-Díaz, R., Pliego-Alfaro, F., “Somatic embryogenesis in explants of adult wild olive trees”. VISCEA III. Plants In Vitro: Theory and Practice. Viena, Austria. 2016



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer enormemente a mis directores Fernando y Jose la oportunidad que me han dado. Ha sido una experiencia muy gratificante y siempre les estaré agradecida por su apoyo.

En segundo lugar, a mis compañeros del laboratorio Sergio, Candelas, Delia, Luis Toscano, Louis Fresta, Pablo, Elena, Rafa y Juan, les tengo muchísimo aprecio, y aunque cada uno siga su camino siempre les estaré agradecida y les echaré de menos. Anabel, mil gracias por mantener mis plantas cuando yo ya no podía. Gracias a Nieves y Gloria por sus ánimos y preocuparse por mí. A todos mis compañeros, a todo el Departamento, les agradezco mucho todo el apoyo que me han dado.

Mar, ¿qué hubiera sido de mí sin ti? Siempre estabas ahí para cualquier duda, enseñándome a usar el Mendeley, informándome del papeleo de la tesis... Hasta el último momento, no te puedo estar más agradecida.

Gracias a Clara, por ayudarme, enseñarme, por resolverme dudas fuera cuando fuera. Gracias a ti, Mamen, por darme la oportunidad de trabajar en tu laboratorio, me acogiste como una más y me has ayudado muchísimo.

Gracias a David, Luisa y José Manuel, tuve la suerte de trabajar con ellos y gracias a esa experiencia continué con lo que realmente me gustaba.

También les agradezco a Yin Song, Bezhad Rashidi, Javier, Patri y Olga que me ayudaran mucho durante la estancia en Wageningen. Les deseo lo mejor.

Y por supuesto, a las personas que tengo más cerca, Josemi, mi madre y mis hermanos; Lola, Susana y Andrés. A ellos les debo mucho y siempre han estado ahí.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

A ti, papá





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Índice



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Abreviaturas

Índice de figuras y tablas

Resumen	1
Summary	5
Capítulo I. Introducción	17
I.1. Descripción, origen y distribución del olivo	19
I.2. Importancia del cultivo.....	20
I.3. Amenazas del cultivo: enfermedades causadas por hongos de suelo	21
I.3.1. <i>Verticillium dahliae</i>	21
I.3.1.1. Síntomas	21
I.3.1.2. Ciclo de vida e infección.....	22
I.3.1.3. Mecanismos de invasión del patógeno.....	23
I.3.1.4. Mecanismos de defensa del hospedador	24
I.3.1.5. Métodos de control.....	25
I.3.2. <i>Rosellinia necatrix</i>	25
I.3.2.1. Síntomas	26
I.3.2.2. Métodos de control.....	26
I.4. Mejora del olivo	26
I.4.1. Mejora convencional	27
I.4.2. Mejora mediante técnicas biotecnológicas.....	27
I.4.2.1. Regeneración adventicia	27
I.4.2.1.1. Organogénesis	27
I.4.2.1.2. Embriogénesis somática	28
I.4.2.2. Variación somaclonal.....	29
I.4.2.2.1. Factores que influyen en la generación de variación somaclonal	29
I.4.2.2.2. Tipos de variación	29
I.4.2.2.3. Métodos de detección.....	30
I.4.2.2.4. Alteraciones producidas en plantas regeneradas vía embriogénesis somática.....	30
I.4.2.2.5. Variación somaclonal como herramienta para la mejora	30
I.4.2.3. Transformación genética en olivo	31

I.5. Transformación genética como herramienta para conferir resistencia frente a patógenos fúngicos	32
I.5.1. Transformación con genes que codifican para proteínas antifúngicas.....	32
I.5.2. Transformación con genes reguladores de las respuestas de defensa	33
I.5.3. Transformación con genes que codifican para proteínas de resistencia	33
Objetivos.....	35
Capítulo II. Embriogénesis somática en material adulto de olivo silvestre	39
II.1. Resumen.....	41
II.2. Introducción	43
II.3. Materiales y métodos	47
II.3.1. Material vegetal utilizado en la inducción de embriogénesis somática.....	47
II.3.2. Inducción de embriogénesis somática	47
II.3.2.1. Protocolo de Capelo et al. (2010)	48
II.3.2.2. Protocolo de Mazri et al. (2013)	48
II.3.2.3. Protocolo de Mazri et al. (2013) modificado	49
II.3.3. Multiplicación del callo embriogénico del genotipo StopVert.....	50
II.3.4. Maduración de embriones somáticos.....	50
II.3.5. Germinación de embriones	50
II.3.6. Análisis de la estabilidad genética	50
II.3.6.1. Material vegetal	50
II.3.6.2. Extracción de ADN genómico	53
II.3.6.2.1. Análisis por marcadores moleculares SSR	54
II.3.6.2.2. Análisis por marcadores moleculares RAPDs	56
II.4. Resultados	58
II.4.1. Inducción de embriogénesis somática	58
II.4.1.1. Protocolo de Capelo et al. (2010)	58
II.4.1.2. Protocolo de Mazri et al. (2013)	60
II.4.1.3. Protocolo de Mazri et al. (2013) modificado	65
II.4.2. Multiplicación del callo embriogénico del genotipo StopVert.....	67
II.4.3. Maduración de embriones somáticos.....	69
II.4.4. Germinación de embriones	69
II.4.5. Análisis de la estabilidad genética	70

II.4.5.1. Análisis por marcadores moleculares SSR	70
II.4.5.2. Análisis por marcadores moleculares RAPDs	78
II.5. Discusión	85
II.5.1. Inducción de embriogénesis somática a partir de material adulto de olivo silvestre.....	85
II.5.2. Análisis de estabilidad genética del material de olivo silvestre StopVert	88
Chapter III. Usage of the expression of the antimicrobial gene <i>afp</i> from <i>Aspergillus giganteus</i> for increasing fungal resistance in olive	91
III.1. Summary.....	93
III.2. Introduction	95
III.3. Materials and methods.....	96
III.3.1. Plant material.....	96
III.3.2. Binary vector	96
III.3.3. Olive genetic transformation	96
III.3.4. Phenotypical analysis of transgenic plants	97
III.3.4.1. Evaluation of multiplication capacity of AFP lines.....	97
III.3.4.2. Evaluation of rooting capacity of AFP lines	97
III.3.4.3. Characterization of <i>ex vitro</i> AFP plants	97
III.3.5. Molecular analysis of transgenic plants.....	98
III.3.5.1. PCR analysis.....	98
III.3.5.2. qRT-PCR analysis	98
III.3.5.3. RAPDs analysis	99
III.3.6. <i>Verticillium dahliae</i> infection assay	99
III.3.7. <i>Rosellinia necatrix</i> infection assay	100
III.3.8. Statistical analysis	101
III.4. Results	101
III.4.1. Generation of transgenic AFP olive plants.....	101
III.4.2. Molecular analysis of AFP plants.....	102
III.4.2.1. PCR analysis.....	102
III.4.2.2. qRT-PCR analysis	103
III.4.3. Phenotypical characterization of transgenic AFP plants	104
III.4.4. <i>Verticillium dahliae</i> infection assays.....	106
III.4.5. <i>Rosellinia necatrix</i> infection assay	110

III.4.6. RAPDs analysis of AFP13 genetic stability	111
III.5. Discussion.....	112
Capítulo IV. Transformación genética de olivo con el gen <i>AtNPR1</i>	117
IV.1. Resumen	119
IV.2. Introducción	121
IV.2.1. Mecanismos de defensa de las plantas frente a patógenos	121
IV.2.2. Respuesta SAR.....	122
IV.2.3. Papel del gen <i>AtNPR1</i> en la respuesta SAR.....	123
IV.2.4. Sobreexpresión del gen <i>AtNPR1</i> y sus homólogos	125
IV.3. Materiales y métodos	126
IV.3.1. Transformación de células embriogénicas de olivo con el gen <i>AtNPR1</i>	126
IV.3.1.1. Material vegetal y medio de cultivo	126
IV.3.1.2. Vector binario.....	126
IV.3.1.3. Cultivo bacteriano	127
IV.3.1.4. Transformación genética	127
IV.3.1.5. Selección de las líneas transgénicas	127
IV.3.1.6. Maduración de embriones somáticos	128
IV.3.1.7. Germinación de embriones.....	128
IV.3.1.8. Evaluación de la capacidad de multiplicación <i>in vitro</i> de las distintas líneas transgénicas <i>AtNPR1</i>	128
IV.3.1.9. Evaluación de la capacidad de enraizamiento <i>in vitro</i> de las distintas líneas transgénicas <i>AtNPR1</i>	129
IV.3.1.10. Aclimatación de las plantas.....	129
IV.3.1.11. Caracterización de las plantas <i>AtNPR1 ex vitro</i>	130
IV.3.2. Análisis molecular de las líneas <i>AtNPR1</i>	131
IV.3.2.1. Extracción de ADN genómico	131
IV.3.2.2. Amplificación por PCR de los genes <i>nptII</i> y <i>AtNPR1</i>	131
IV.3.2.3. Análisis de la expresión del gen <i>AtNPR1</i> por qRT-PCR.....	132
IV.3.2.3.1. Extracción de ARN	132
IV.3.2.3.2. Síntesis de cDNA	132
IV.3.2.3.3. Cuantificación de la expresión del gen <i>AtNPR1</i> por qRT-PCR	133
IV.3.3. Elicitación de las líneas embriogénicas <i>AtNPR1</i> y cuantificación de la actividad endoquitinasa.....	133

IV.3.3.1. Establecimiento del cultivo y tratamiento con los elicitores: AS y MeJA	133
IV.3.3.2. Obtención del extracto proteico y cuantificación de actividad endoquitinasa	134
IV.3.4. Análisis estadístico	134
IV.4. Resultados	135
IV.4.1. Transformación genética y regeneración de plantas	135
IV.4.1.1. Selección de las líneas embriogénicas transformadas	135
IV.4.1.2. Maduración y germinación de los embriones somáticos de las líneas seleccionadas	136
IV.4.2. Análisis molecular de las líneas <i>AtNPR1</i>	138
IV.4.2.1. Análisis de la inserción del transgén por PCR	138
IV.4.2.2. Análisis del nivel de transcrito mediante qRT-PCR	139
IV.4.3. Caracterización morfológica de las plantas <i>AtNPR1</i>	140
IV.4.3.1. Evaluación de la capacidad de multiplicación <i>in vitro</i> de las distintas líneas transgénicas <i>AtNPR1</i>	140
IV.4.3.2. Evaluación de la capacidad de enraizamiento <i>in vitro</i> de las distintas líneas transgénicas <i>AtNPR1</i>	142
IV.4.3.3. Aclimatación de las plantas	143
IV.4.3.4. Caracterización de las plantas <i>ex vitro</i>	144
IV.4.4. Elicitación de las líneas transformadas con el gen <i>AtNPR1</i>	145
IV.4.4.1. Tratamiento con AS	145
IV.4.4.2. Tratamiento con MeJA	146
IV.5. Discusión	147
V. Conclusions	153
VI. Bibliografía	157
VII. Anexos	183
VII.1. Publicaciones	185
VII.2. Transformación de células embriogénicas de olivo con el gen <i>Vel</i> de tomate	187
VII.2.1. Resumen	189
VII.2.2. Materiales y métodos	191
VII.2.2.1. Transformación de células embriogénicas de olivo con el gen <i>Vel</i> de tomate	191
VII.2.2.1.1. Material vegetal y medio de cultivo	191

VII.2.2.1.2. Plásmido binario	191
VII.2.2.1.3. Cultivo bacteriano	191
VII.2.2.1.4. Transformación genética	192
VII.2.2.1.5. Proceso de selección	192
VII.2.2.1.6. Maduración de embriones somáticos	192
VII.2.2.1.7. Germinación de embriones	192
VII.2.3. Resultados	193
VII.2.3.1. Transformación genética y regeneración de plantas	193
VII.2.3.1.1. Selección de las líneas embriogénicas transformadas	193
VII.2.3.1.2. Maduración y germinación de embriones somáticos	194

Abreviaturas



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

2,4-D: 2,4- ácido diclorofenoxiacético
2iP: N⁶-(2-Isopentenyl)adenine
AM: antimicrobial
ANA: ácido naftalenacético
ANOVA: análisis de la varianza
AS: ácido salicílico
AUDPC: areas under the disease progress curve
AAAu: aureomycin
AzA: ácido azelaico
BA(P): 6-bencilaminopurina
CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
CWDEs: enzimas que degradan compuestos de la pared celular
D: defoliante
DA: dehidroabietinal
DIR1: defective in induced resistance 1
ECO: embriogénesis cíclica de olivo
ES: embriogénesis somática
Et: etileno
ETI: inmunidad inducida por efectores
FT: factor de transcripción
G3P: glicerol-3-fosfato
IBA: ácido indol-3-butírico
JA: ácido jasmónico
LMS: lesion mimic spot
MeJA: metil jasmonato
MeSA: metil salicilato
MS: Murashige and Skoog
MU: 4-metilumbelliferona
MUC: 4-Methylumbelliferyl β -D-N, N', N''-triacetylchitotrioxide
ND: no defoliante
nptII: *neomicina fosfotransferasa II*
OM: olive medium
PLP: proteína-lipopolisacáridos
qRT-PCR: Quantitative real-time PCR
RAPDs: Random Amplified Polymorphic DNA
RH: relative humidity
SAR: Systemic Acquired Resistance
SSR: Simple Sequence Repeat
T-DNA: ADN de transferencia
TDZ: thidiazuron
VCG: grupo de compatibilidad vegetativa
VS: variación somaclonal
Zea: zeatina



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Índice de figuras y tablas



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Figura I.1. Ciclo de infección de <i>Verticillium dahliae</i>	23
Figura II.1. Aspecto de los genotipos de acebuche: Ac-18, OutVert, Ac-4, StopVert (resistentes a <i>V. dahliae</i>) y Ac-15 (susceptible) a las 8 semanas de cultivo en el medio de multiplicación de olivo RP modificado (Vidoy-Mercado et al., 2012).	47
Figura II.2. Explantos aislados y cultivados en el medio de inducción MS 12.25 μ M IBA - 4.56 μ M Zea de los genotipos de olivo silvestre: A) Ac-18 y B) Ac-15. Explantos: 1 y 2) Parte distal y basal, respectivamente, de las hojas del primer nudo, 3) Ápice caulinar, 4) Peciolos, 5 y 6) Parte distal y basal, respectivamente, de las hojas del segundo nudo. Barra: 5 mm.	48
Figura II.3. Explantos del genotipo Ac-18 empleados en la inducción de ES: 1) Meristemo apical con el primer par de primordios foliares (2 mm). 2) Hojas del primer nudo sin peciolo (4 mm). 3) Parte basal de las hojas del segundo nudo (5 mm). 4) Peciolo de las hojas del segundo nudo (1 mm). Barra: 5 mm.	49
Figura II.4. A) Planta de StopVert en el invernadero. B) Aspecto de las ramas. C) Aspecto de las hojas empleadas para la extracción de ADN genómico.	52
Figura II.5. Aspecto de los brotes micropropagados del genotipo StopVert empleados en la extracción de ADN genómico.	52
Figura II.6. Aspecto de uno de los callos embriogénicos del genotipo StopVert utilizados en la extracción de ADN genómico.	53
Figura II.7. Brotes axilares en proliferación procedentes de las plantas regeneradas a partir de distintos embriones somáticos del genotipo StopVert.	53
Figura II.8. Aspecto del callo formado sobre los diferentes explantos a las 4 semanas en medio de inducción MS 12.25 μ M IBA - 4.56 μ M Zea. A) Ac-18, B) Ac-15. Explantos: 1 y 2) Parte distal y basal, respectivamente, de las hojas del primer nudo, 3) Ápice caulinar, 4) Peciolos, 5 y 6) Parte distal y basal, respectivamente, de las hojas del segundo nudo. Barra: 5 mm.	58
Figura II.9. Aspecto del callo formado tras 3 meses en medio de inducción MS 12.25 μ M IBA - 4.56 μ M Zea. A) Ac-18 y B) Ac-15. Barra: 5 mm.	59
Figura II.10. Aspecto de algunos de los callos tras el 3º subcultivo en medio basal MS. A) Ac-18 y B) Ac-15. Explantos: 1 y 2) Parte distal y basal, respectivamente, de las hojas del primer nudo, 3) Ápice caulinar, 4) Peciolos, 5) Parte distal de las hojas del segundo nudo. Barra: 5 mm.	59
Figura II.11. Aspecto del callo de una yema caulinar del genotipo Ac-15 en medio de embriogénesis cíclica ECO después de 8 semanas de cultivo.	60
Figura II.12. Explantos del genotipo StopVert empleados en la inducción de ES y aspecto de los callos formados. A) Explantos cultivados en medio basal MS ½, tras 4 días de cultivo en medio de inducción líquido MS ½ 30 μ M TDZ - 0.54 μ M ANA. B) Callo a las 4 semanas de cultivo en medio basal MS ½. C) Callo aislado y cultivado en medio ECO suplementado con 0.25 μ M IBA, 0.5 μ M 2iP - 0.44 μ M BA y con 200 mg/L de cefotaxima tras 4 semanas de cultivo. D) Callo después del tercer subcultivo (12 semanas) en el mismo medio. Explantos: 1) Hojas completas del primer nudo, 2) Ápice caulinar, 3) Peciolos, 4) Parte basal de las hojas del segundo par. Barra: 5 mm.	61
Figura II.13. Porcentaje de explantos de los distintos genotipos que formaron callo a las 8 semanas de cultivo en el medio basal MS ½.	62

- Figura II.14.** Aspecto del callo obtenido a partir de ápice caulinar del genotipo de olivo silvestre StopVert. A) Callo cultivado durante 1 mes en medio ECO, tras 8 semanas de cultivo en medio basal MS 1/2. B, C) Presencia de nódulos con aspecto embriogénico formados tras 12-16 semanas de cultivo en medio ECO, respectivamente. D, E) Callo embriogénico obtenido tras sucesivos subcultivos en medio ECO. Barra: 5 mm.64
- Figura II.15.** Evolución del callo formado a partir de ápice caulinar del genotipo Ac-18. A) Presencia de masas embriogénicas (ME) en el callo cultivado en medio basal MS 1/2 a las 8 semanas. B) Estructuras globulares en el callo aislado y cultivado en medio ECO tras 3 subcultivos después del cultivo en medio basal MS 1/2. C) Embriones somáticos cultivados en medio ECO. D) Callo embriogénico cultivado en medio ECO después de 4 semanas de cultivo. Barra: 5 mm.65
- Figura II.16.** Aspecto de los callos formados en los explantos de los distintos genotipos, tras cultivarlos en el medio de inducción MS 1/2 30 μ M TDZ - 0.54 μ M NAA durante 4 semanas. A) Ac-18, B) Ac-15, C) Ac-4, D) OutVert y E) StopVert. Explantos: 1) Hojas completas del primer nudo, 2) Ápice caulinar, 3) Peciolos, 4) Parte basal de las hojas del segundo par. Barra: 5 mm.66
- Figura II.17.** Aspecto de los callos del genotipo Ac-4 cultivados en medio ECO suplementado con 0.25 μ M IBA, 0.5 μ M 2iP - 0.44 μ M BA y 200 mg/L de cefotaxima después de 12 semanas. A) Callo de una de las hojas del primer nudo. B) Callo procedente de una yema apical.67
- Figura II.18.** Aspecto del callo del genotipo StopVert. A) Fracción fina de callo cultivada en medio sólido ECO. B) Proliferación del callo después de un mes de cultivo en el mismo medio. C) Tras el primer subcultivo de 4 semanas en medio líquido ECO. D) Después del tercer subcultivo en el mismo medio. Barra: 5 mm.68
- Figura II.19.** Incremento medio de peso del callo embriogénico de la línea StopVert cultivada durante 4 subcultivos en medio sólido ECO suplementado con 0.25 μ M IBA, 0.5 μ M 2iP - 0.44 μ M BA y 200 mg/L de cefotaxima.68
- Figura II.20.** Aspecto de los embriones y de las plantas regeneradas a partir de embriones somáticos maduros del genotipo StopVert. A) Embriones somáticos cultivados en medio de maduración con membrana de acetato de celulosa. B) Embrión maduro en estadio cotiledonar cultivado en medio de germinación. C) Plántula regenerada tras 12 semanas en medio de germinación. D) Brotes axilares en proliferación a las 8 semanas de cultivo en medio de multiplicación RP (Vidoy-Mercado et al., 2012). Barra: 5 mm.69
- Figura II.21.** Proceso de regeneración de plantas, vía ES, a partir de material del genotipo StopVert.71
- Figura II.22.** Amplificaciones de los 7 locis: Oli1 (AJ279854), Oli2 (AJ279859), Oli3 (AJ279865), Oli4 (AJ279867), Oli5 (AJ416321), Oli6 (AJ416322) y Oli7 (AJ416323), en ADN genómico extraído de la planta donante StopVert.72
- Figura II.23.** Electroferograma de la amplificación del locus AJ279854 (Oli1) de la planta donante, brote axilar 1, callo embriogénico 1 y planta regenerada a partir del embrión somático 1. Tamaño de los alelos 236 pb.74
- Figura II.24.** Electroferograma de la amplificación del locus AJ279859 (Oli2) de la planta donante, brote axilar 1, callo embriogénico 1 y planta regenerada a partir del embrión somático 1. Tamaño de los alelos 165-173pb.75

- Figura II.25.** Electroferograma de la amplificación del locus AJ279867 (Oli4) de la planta donante, brote axilar 1, callo embriogénico 1 y planta regenerada a partir del embrión somático 1. Tamaño de los alelos 172 pb.76
- Figura II.26.** Electroferograma de la amplificación del locus AJ416322 (Oli6) de la planta donante, brote axilar 1, callo embriogénico 1 y planta regenerada a partir del embrión somático 1. Tamaño de los alelos 138 pb.77
- Figura II.27.** Electroferograma de la amplificación del locus AJ416323 (Oli7) de la planta donante, brote axilar 1, callo embriogénico 1 y planta regenerada a partir del embrión somático 1. Tamaño de los alelos 195 pb.78
- Figura II.28.** Perfil de marcadores RAPDs obtenido con el oligonucleótido A1 en las muestras D (planta donante StopVert), C1 – C10 (muestras de callo procedente de la línea de callo embriogénica establecida a partir de una yema apical de StopVert), M1 – M10 (brotes axilares procedentes de la micropropagación de la planta madre) y E1 – E15 (plantas regeneradas a partir de los embriones somáticos de la línea de callo embriogénico). M = marcador de peso molecular (100 – 2000 pb). La flecha indica la presencia de una banda de un tamaño aproximado de 650 pb presente en la muestra de callo número 10 y ausente en el resto de muestras analizadas.80
- Figura II.29.** Perfil de marcadores RAPDs obtenido con el oligonucleótido B7 en las muestras D (planta donante StopVert), C1 – C10 (muestras de callo procedente de la línea de callo embriogénica establecida a partir de una yema apical de StopVert), M1 – M10 (brotes axilares procedentes de la micropropagación de la planta madre) y E1 – E15 (plantas regeneradas a partir de los embriones somáticos de la línea de callo embriogénico). M = marcador de peso molecular (100 – 2000 pb).81
- Figura II.30.** Perfil de marcadores RAPDs obtenido con el oligonucleótido B15 en las muestras D (planta donante StopVert), C1 – C10 (muestras de callo procedente de la línea de callo embriogénica establecida a partir de una yema apical de StopVert), M1 – M10 (brotes axilares procedentes de la micropropagación de la planta madre) y E1 – E15 (plantas regeneradas a partir de los embriones somáticos de la línea de callo embriogénico). M = marcador de peso molecular (100 – 2000 pb).82
- Figura II.31.** Perfil de marcadores RAPDs obtenido con el oligonucleótido E19 en las muestras D (planta donante StopVert), C1 – C10 (muestras de callo procedente de la línea de callo embriogénica establecida a partir de una yema apical de StopVert), M1 – M10 (brotes axilares procedentes de la micropropagación de la planta madre) y E1 – E15 (plantas regeneradas a partir de los embriones somáticos de la línea de callo embriogénico). M = marcador de peso molecular (100 – 2000 pb).83
- Figura II.32.** Perfil de marcadores RAPDs obtenido con el oligonucleótido F10 en las muestras D (planta donante StopVert), C1 – C10 (muestras de callo procedente de la línea de callo embriogénica establecida a partir de una yema apical de StopVert), M1 – M10 (brotes axilares procedentes de la micropropagación de la planta madre) y E1 – E15 (plantas regeneradas a partir de los embriones somáticos de la línea de callo embriogénico). M = marcador de peso molecular (100 – 2000 pb).84
- Figure III.1.** Transformation of olive somatic embryos with *afp* gene from *Aspergillus giganteus*. A) Globular somatic embryos after two days of inoculation with *A. tumefaciens*. B) Transgenic *afp* callus growing in selection ECO medium supplemented with 200 mg/L paromomycin. C) Transgenic *afp* somatic embryos after the maturation phase. D) Micropropagated shoot from AFP9 line. E) Transgenic AFP9 shoots in RP

liquid medium with 10 mg/L IBA for rooting. F) From right to left, acclimated plants derived from non-transformed P1 line and transgenic AFP7, AFP9 and AFP10 lines, after 1 year of growth in the greenhouse. Barra: A-E: 0.5cm; F: 5 cm.102

Figure III.2. PCR analysis of *afp* transgenic olive plants. A) Amplification of a 700 bp DNA fragment from *nptII* gene. B) Amplification of a 200 bp DNA fragment from the *afp* gene. M: molecular weight marker; C+: pBIN61 binary plasmid; P1: DNA from non-transformed P1 line; AFP: DNA from transgenic *afp* lines.103

Figure III.3. qRT-PCR analysis of *afp* gene expression in leaves and roots of transgenic olive plants. Quantification was based on Ct values as described in Material and methods. The mRNA values were relative to the lowest values obtained in leaves and roots, AFP14 and AFP25, respectively, which were assigned an arbitrary value of 1. Data correspond to mean values \pm SD of three independent experiments.104

Figure III.4. Progress of *Verticillium* wilt symptoms over time in controls and transgenic olive plants transformed with *afp* gene from *Aspergillus giganteus*. P1: control non-transformed plants; GUS: pBINUbiGUSInt transformed plants; StopVert: wild olive resistant to *Verticillium*; AFP: *afp* transgenic lines.106

Figure III.5. Average values of area under the disease progress curve (AUDPC) in controls and transgenic olive plants inoculated with *Verticillium dahliae*, defoliant strain V-138. P1: control non-transformed plants; GUS: pBINUbiGUSInt transformed plants; AFP: *afp* transgenic lines. Data represent mean \pm SD of 10 plants. Columns with different letters indicate significant differences by LSD test at $P=0.05$107

Figure III.6. Aspect of controls and transgenic AFP13 plants after inoculation with the *Verticillium dahliae* non-defoliant strain V-1558 and defoliant strain V-1900. P1: control non-transformed plants; GUS: pBINUbiGUSInt transformed plants. Pictures were taken at the end of the experiment, after 120 days from pathogen inoculation. ..108

Figure III.7. Progress of *Verticillium* wilt symptoms over time in controls and transgenic olive AFP13 line inoculated with *Verticillium dahliae* non-defoliant strain V-1558 and defoliant strain V-1900. P1: control non-transformed plants; GUS: pBINUbiGUSInt transformed plants.109

Figure III.8. Average values of area under the disease progress curve (AUDPC) in controls and transgenic olive line AFP13 inoculated with *Verticillium dahliae* non-defoliant strain V-1558 and defoliant strain V-1900. P1: control non-transformed plants; GUS: pBINUbiGUSInt transformed plants. Data represent mean \pm SD of 10 plants. Columns with different letters indicate significant differences by LSD test at $P=0.05$109

Figure III.9. Progress of white root rot symptoms caused by *Rosellinia necatrix* over time in controls and transgenic olive plants transformed with *afp* gene from *Aspergillus giganteus*. P1: control non-transformed plants; GUS: pBINUbiGUSInt transformed plants; AFP: *afp* transgenic lines.110

Figure III.10. Average values of area under the disease progress curve (AUDPC) in controls and transgenic olive plants inoculated with *Rosellinia necatrix*. P1: control non-transformed plants; GUS: pBINUbiGUSInt transformed plants; AFP: *afp* transgenic lines. Data represent mean \pm SD of 10 plants. Columns with different letters indicate significant differences by LSD test at $P=0.05$111

- Figure III.11.** RAPD profile of DNA samples from controls (non-transformed P1 plants and pBINUbiGUSInt transformed plants) and AFP13 transgenic line. Amplification products were generated with primer A1. M: molecular weight marker. Arrows indicate the amplified bands that varied in controls and line AFP13.112
- Figura IV.1.** Modelo activación de SAR (Kachroo y Robin, 2013). C18 FA: ácidos grasos de 18 carbonos, AzA (AA): ácido azelaico, G3P: glicerol-3-fosfato, G3P*: derivado desconocido de G3P, Lys: lisina, Pip: ácido piperónico, DA: dehidroabietinal, DIR (DIR1 = defective in induced resistance 1): proteína putativa de transferencia de lípidos, SA: ácido salicílico, MeSA: metil salicilato, Ct: cutícula, CW: pared celular, NPR1: Non-expressor of PR1, NPR3 y 4: parálogos del gen *NPR1*, TGA: Factores de transcripción TGA, WRKY: Factores de transcripción WRKY.123
- Figura IV.2.** Mapa de la región T-DNA del plásmido binario pK7WG2.0, conteniendo el gen *AtNPR1* bajo el control del promotor *CaMV35S*.127
- Figura IV.3.** A) Brotes apicales de la línea NPR1 814 cultivados en el medio de enraizamiento tras el choque con auxina. B) Planta de la línea NPR1 224 tras 9 semanas de cultivo en el medio de enraizamiento. C) Plantas de la línea NPR1 224 tras 6 semanas en la cámara de aclimatación.130
- Figura IV.4.** Plantas de las líneas NPR1 780, 814 y 224, y P1 trasplantadas a maceta en invernadero de confinamiento después de 8 semanas en la cámara de aclimatación. ..130
- Figura IV.5.** Obtención de líneas embriogénicas transformadas con el gen *AtNPR1*. A) Embriones somáticos en estadio globular tras 2 días de cocultivo con *A. tumefaciens*. B) Callo de la línea NPR1 780 proliferando en medio de selección ECO suplementado con 150 mg/L de paromomicina. C) Aspecto del material resistente al antibiótico de selección, de la línea NPR1 780, tras el pase por medio líquido suplementado con 25 mg/L de paromomicina. D) Fracción fina de la línea NPR1 780 tras el primer pase en medio ECO suplementado con 25 mg/L de paromomicina. E) Grupos de 3-4 embriones cultivados tras el pase por medio líquido de la línea NPR1 780 en medio sólido ECO suplementado con 150 mg/L del antibiótico de selección. F) Aspecto del callo de la línea NPR1 780 después de 1 mes de cultivo en medio sólido ECO suplementado con 150 mg/L del antibiótico de selección. Barra: 5 mm.136
- Figura IV.6.** A) Aspecto de los embriones somáticos maduros de la línea NPR1 224 en el medio de maduración con membrana de acetato de celulosa. B) Embrión maduro de la línea NPR1 780 en el medio de germinación. C- F) Brotes aislados de los embriones germinados de las líneas *AtNPR1* y del control no transgénico en el medio RP. Barra (A): 5 mm, (C-F): 1 cm.137
- Figura IV.7.** Amplificación por PCR de un fragmento de 732 pb correspondiente al gen *AtNPR1* (A) y de 700 pb correspondiente al gen *nptII* (B) en el DNA genómico extraído de callo embriogénico. Líneas transgénicas *AtNPR1*: 780, 814 y 224; P1: control no transgénico; C-: control negativo (sin DNA); C+: plásmido pro35S:*AtNPR1*; M: marcador de peso molecular.139
- Figura IV.8.** Niveles de expresión del gen *AtNPR1* en las líneas embriogénicas de olivo medidos mediante qRT-PCR. Los valores de transcrito se calibraron con los de la línea embriogénica con menor expresión, NPR1 814, que toma el valor 1. Los valores se expresan como la media±SD de un triplicado.140
- Figura IV.9.** Número medio de brotes por explanto (A), longitud media de los brotes (B) y número medio de nudos por brote (C) de las líneas *AtNPR1* y del control no

transgénico (P1), a las 8 semanas de cultivo en medio de multiplicación. Los datos se representan como la media±SD de 3 subcultivos. El análisis estadístico se realizó por una prueba no paramétrica Kruskal-Wallis (A) y mediante ANOVA y posterior separación de medias mediante test de Tukey (B y C). Letras diferentes indican diferencias entre las líneas a $P=0.05$	141
Figura IV.10. Número medio de raíces por brote enraizado (A) y longitud media de la raíz principal (B) en los brotes enraizados de las líneas transgénicas <i>AtNPR1</i> y control no transgénico P1, después de 9 semanas de cultivo en el medio de enraizamiento. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, no observándose diferencias significativas entre las líneas a $P=0.05$	143
Figura IV.11. Tasa de supervivencia de las líneas transgénicas <i>AtNPR1</i> y control no transgénico P1 a las 8 semanas en la cámara de aclimatación. El análisis estadístico se realizó por una prueba Chi cuadrado. El asterisco indica diferencias significativas con el control no transgénico (P1) a $P=0.05$	144
Figura IV.12. Aspecto de las plantas transgénicas NPR1 tras 9 meses en el invernadero de confinamiento. De izquierda a derecha: NPR1 224, 780 y 814, y P1 (control no transformado). Barra: 5 cm.....	144
Figura IV.13. Longitud (A) y diámetro del tallo (B) en las líneas <i>AtNPR1</i> y control no transformado P1, tras 9 meses de crecimiento en el invernadero de aclimatación. Letras diferentes indican diferencias significativas mediante test de Tukey a $P=0.05$	145
Figura IV.14. Nivel de actividad endoquitinasa expresada como picomoles de 4-MU/h/μg de proteína total. Los valores se expresan como la media±SD de 3 réplicas independientes. El análisis estadístico se realizó por un ANOVA factorial y los contrastes entre medias, para cada muestreo en el tiempo, mediante el test de Bonferroni con $P=0.05$	146
Figura IV.15. Nivel de actividad endoquitinasa expresada como picomoles de 4-MU/h/μg de proteína total. Los valores se expresan como la media±SD de 3 réplicas independientes. El análisis estadístico se realizó por un ANOVA factorial y los contrastes entre medias, para cada muestreo en el tiempo, mediante el test de Bonferroni con $P=0.05$	147
Tabla II.1. Material seleccionado del genotipo StopVert para el análisis de estabilidad genética. Procedencia del material seleccionado, tiempo de cultivo (meses) y número de muestras analizadas por marcadores SSR.	51
Tabla II.2. Marcadores microsatélites utilizados en el análisis de estabilidad genética del material del genotipo StopVert obtenido vía embriogénesis somática.	55
Tabla II.3. Nombre, marcaje y color del fluoróforo de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación de microsatélites.	56
Tabla II.4. Condiciones de amplificación utilizadas para el análisis de marcadores SSR.	56
Tabla II.5. Nombre y secuencias de los oligonucleótidos empleados en el análisis RAPDs.	57
Tabla II.6. Condiciones de amplificación utilizadas para el análisis de marcadores RAPDs.	57

Tabla II.7. Porcentaje de explantos que formaron callo en los distintos genotipos. Se evaluó el porcentaje de superficie del explanto cubierta por callo empleando la siguiente escala visual: 0 = ausencia de callo, 1 = 1-40% (media-baja), 2 = 40-80% (media-alta), 3 = > 80% (alta), a las 8 semanas de cultivo en el medio basal MS ½.	63
Tabla II.8. Maduración y germinación de embriones somáticos del genotipo StopVert.	70
Tabla II.9. Tamaño de los alelos obtenidos en la amplificación de los 5 marcadores microsatelites utilizados.	73
Tabla II.10. Nombre del oligonucleótido (RAPD), número de bandas y rango de tamaños (pb).	79
Table III.1. <i>In vitro</i> characterization of transgenic AFP olive plants. Data correspond to mean±SD. Mean separation was performed by Kruskal-Wallis test at $P=0.05$. Different letters indicate significant differences between lines.	105
Table III.2. <i>Ex vitro</i> characterization of transgenic AFP olive plants. Data correspond to mean±SD. Mean separation was performed by Kruskal-Wallis test at $P=0.05$. Different letters indicate significant differences between lines.	105
Tabla IV.1. Secuencia a amplificar, oligonucleótidos (D: directo, R: reverso), tamaño del fragmento esperado y programa de amplificación, utilizados para la comprobación de la naturaleza transgénica del material recuperado.	132
Tabla IV.2. Eficiencia de transformación de la línea embriogénica de olivo P1 con la cepa de <i>A. tumefaciens</i> AGL1 portando el plásmido binario pro35S: <i>AtNPR1</i> . Datos tomados a las 31 semanas tras el proceso de selección en medio sólido y líquido con paromomicina.	135
Tabla IV.3. Número de embriones blanco-opacos empleados en la regeneración de plantas, número de embriones que formaron brote de las líneas <i>AtNPR1</i> y del control no transgénico, y porcentaje de germinación de brote. Los porcentajes de germinación se analizaron estadísticamente mediante el test de Chi cuadrado, comparando cada una de las líneas transgénicas con el control P1. El asterisco indica diferencias significativas con respecto al control no transgénico (P1), a $P=0.05$	138



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Resumen



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

RESUMEN

El objetivo global de esta tesis es el desarrollo de herramientas biotecnológicas para la obtención de plantas de olivo (*Olea europaea* L.) con mayor resistencia a patógenos fúngicos, en particular, *Verticillium dahliae*, agente causal de la Verticilosis, y *Rosellinia necatrix*, causante de la podredumbre blanca radicular, enfermedad emergente en las nuevas plantaciones de olivo.

Este objetivo global se ha abordado en tres objetivos parciales. En el primero, se ha establecido un protocolo de regeneración vía embriogénesis somática para material adulto de olivo silvestre. Para la inducción de embriogénesis, se testaron distintos medios de cultivo y tipos de explanto. Se obtuvieron cultivos embriogénicos en los genotipos StopVert y Ac-18, resistentes a Verticilosis, utilizando como explantos ápices caulinares de brotes micropropagados, cultivados durante 4 días en medio líquido MS ½ suplementado con 30 µM TDZ y 0.54 µM NAA, seguido del cultivo en el mismo medio sólido sin reguladores de crecimiento. Las plantas regeneradas a partir de callo embriogénico del genotipo StopVert no mostraron polimorfismos, en comparación con la planta donante, mediante marcadores SSR y RAPDs, así como tampoco variaciones fenotípicas con respecto a brotes micropropagados derivados de yemas laterales.

En el segundo objetivo, se evaluó la tolerancia a *V. dahliae* y *R. necatrix* en plantas de olivo que expresan el gen antifúngico *afp* de *Aspergillus giganteus*. Se transformaron cultivos embriogénicos de olivo, derivados de radícula, con un vector binario conteniendo el gen *afp* bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S. Se obtuvieron 6 líneas transgénicas, 5 de las cuáles integraron el transgén, mientras que una de ellas, línea AFP13, solo incorporó el gen de selección *nptII*. No se observaron diferencias morfológicas con respecto al control, a excepción de la línea AFP13 que mostró un menor crecimiento. Ninguna de las líneas que expresaban el gen *afp* mostró resistencia frente a *V. dahliae*; sin embargo, se observó una correlación positiva entre el nivel de expresión *afp* y resistencia parcial a *R. necatrix*. La línea AFP13, que no expresaba *afp*, mostró una alta resistencia a Verticilosis. La resistencia podría estar relacionada con una variación somaclonal inducida por el cultivo *in vitro*, aunque los mecanismos responsables se desconocen.

En el tercer objetivo, se obtuvieron y caracterizaron líneas embriogénicas de olivo que expresan el gen *AtNPRI*. Este gen está implicado en la respuesta SAR y su sobreexpresión incrementa la resistencia a patógenos en distintas especies. Se obtuvieron 3 líneas de callo embriogénico transgénicas y se regeneraron plantas a partir de ellas. La expresión del transgén no modificó el crecimiento de las plantas, tanto *in vitro* como en invernadero. Las líneas embriogénicas fueron elicidadas con ácido salicílico y metil jasmonato, cuantificándose la actividad endoquitinasa. El tratamiento con AS no ejerció ningún efecto significativo en la actividad; por el contrario, la

exposición a MeJA produjo un incremento de actividad a las 24h de exposición, siendo mayor este incremento en las líneas transgénicas que en el control. Actualmente se está evaluando la resistencia a Verticilosis en las plantas obtenidas.

Summary



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

SUMMARY

Olive (*Olea europaea* L.), the only species producing edible fruits within the *Oleaceae* family, is one of the most ancient cultured plants. It was probably domesticated from wild olive (*O. europaea* L. subsp. *sylvestris*) around 6000-5000 BC (López-Escudero and Mercado-Blanco, 2011). Nowadays, it is one of the most relevant fruit crops in the Mediterranean basin, with Spain and Italy being the most important producer countries worldwide (FAOSTAT, 2014). Most olive fruit is used for oil production, this crop ranking sixth in the world's production of vegetable oils (Conde et al., 2008). Olive oil is a main component of the Mediterranean diet having a high nutritional value due to its elevated content in secondary metabolites and unsaturated fatty acids (Pérez-Jiménez et al., 2007; Matthäus and Özcan, 2011).

In recent years, olive cultivation has been seriously threatened due to attack by several pathogens, among which *Verticillium dahliae* Kleb., the causal agent of the Verticillium wilt disease, is considered as the most devastating one (Keykhasaber et al., 2017). The disease syndromes caused by this pathogen are known as defoliating (D) and non-defoliating (ND) (Navas-Cortés et al., 2008; Jiménez-Díaz et al., 2012). The first one is characterized by early drop of asymptomatic green leaves from individual twigs and branches, which eventually leads to their complete defoliation and necrosis. The ND syndrome includes two forms differing in symptom's severity, namely the acute form, also known as apoplexy, and slow decline. Apoplexy consists of the rapid death of branches, or the entire plant in young trees, the necrotic leaves remaining attached to the symptomatic shoots. Slow decline is recognized mainly by flower mummification and necrosis of inflorescences together with chlorosis and necrosis of leaves that develop on individual branches. The severity and incidence is greater in young olive trees (2-10 years old), although it could infect more than 50 years old trees. *V. dahliae* is a hemibiotrophic pathogen that presents a parasitic phase within the host and a non-parasitic phase. During the non-parasitic stage, it survives in the soil by formation of resistant structures known as microsclerotia, or embedded in the root or stem tissues that have been colonized. Germination of microsclerotia is induced by root exudates released by host and non-host plants (Mol et al., 1995). Hyphae that grow out of the germinating structures can cross the endodermis, which acts as a physical barrier; after that, the fungus enters the vascular tissues where it can form conidia. Conidia are carried with the sap stream and trapped in pit cavities or at vessel end walls, where they germinate and penetrate adjacent vessel elements to achieve plant colonization. The molecular control and components involved in the pathogenicity of *Verticillium* species is largely unknown. In this line, hydrolytic enzymes produced by the fungus have an important role in plant cell wall degradation (Dobinson et al., 2004). In addition, the production of phytotoxins and other molecules that induce host cell death has been reported. The exact nature of these components is unknown; however, in crude extracts,

high-molecular weight protein-lipopolysaccharide (PLP) complexes, glycoproteins and/or cell-wall-degrading enzymes have been found (Fradin and Thomma, 2006).

The use of resistant genotypes is the best approach to control fungal diseases in woody plants. In olive, some cultivars have been identified that are highly resistant to the ND pathotype of *V. dahliae*, e.g. Changlot Real, Empeltre, Frantoio, Oblonga, and Koroneiki (Jiménez-Díaz et al., 2012); however, the most popular and economically important cultivars, e.g. Arbequina, Hojiblanca and Picual are susceptible or extremely susceptible (López-Escudero and Mercado-Blanco, 2011). Moreover, cultivars resistant to the ND pathotype are highly susceptible to the D one (López-Escudero et al., 2004) and conventional breeding for *Verticillium* resistance in olive has given rise to limited results (López-Escudero and Mercado-Blanco, 2011).

White root rot caused by the necrotrophic fungus *Rosellinia necatrix* is also a common disease of fruit trees that can be particularly damaging in the Mediterranean area because of prevailing favourable environmental conditions for the development of both, the fungus and susceptible crops (Sztejnberg et al., 1980; Pliego et al., 2012). This ascomycete attacks a large number of woody and semi-woody plants, and it has also been found in bulbs and rhizomes (Pérez-Jiménez, 2006). *R. necatrix* invades the plant through the root system forming typical white mycelial fans; later, the white mycelium turns greenish-grey or black, forms plaques on the bark and invades the whole root system causing a generalized rotting of tissues. The symptoms in the aerial part can evolve either quickly or slowly, leading to wilting of leaves, death of branches, and eventually death of the tree. This fungus has been isolated from olive roots in France (Guillaumin et al., 1982), Portugal (Roca et al., 2016) and Spain (García Figueras and Celada Brouard, 2001). In fact, it is an emerging pathogen in super-intensive olive plantations. According to Roca et al. (2016), soil solarization and treatment with fluazinam fungicide are the best control strategies for management of *R. necatrix* in olive.

The main goal of this thesis was to obtain olive plants resistant to fungal pathogens, in particular to *Verticillium dahliae*, the most important soil-borne pathogen in olive, and *R. necatrix*, an important emerging threat in new intensive plantations.

Olive is a recalcitrant species to *in vitro* culture; however, it is possible to micropropagate several interesting cultivars through axillary branching (Rugini, 1984; Roussos and Pontikis, 2002; Santos et al., 2003; Zacchini and De Agazio, 2004). Regeneration by adventitious morphogenesis can be carried out either by organogenesis or somatic embryogenesis; however, somatic embryogenesis is most commonly used. This process has been observed in cultivated (Rugini, 1988; Mitrakos et al., 1992; Leva et al., 1995; Trabelsi et al., 2003) and wild olive (Orinos and Mitrakos, 1991), using explants derived from immature zygotic embryos (Rugini 1988; Rugini and Baldoni, 2005), radicles of mature embryos (Mitrakos et al., 1992; Cerezo et al., 2011a), cotyledon fragments (Leva et al., 1995) or roots of seedlings (Rugini et al., 1995; Shibli et al., 2001). The main advantage of juvenile explants is their best response to growth

regulators since juvenile cells are at a lower degree of differentiation. Other investigations have addressed the obtainment of embryogenic lines from mature explants which would have genetic characteristics identical to donor plant. A few number of positive results have been obtained in cultivated (Rugini and Caricato, 1995; Mazri et al., 2013) and wild olive (Capelo et al., 2010).

In this investigation (**chapter II**), we have evaluated the embryogenic capacity of different genotypes of wild olive differing in their level of resistance to *Verticillium* wilt: Ac-4, Ac-18, StopVert and OutVert (all of them resistant to *Verticillium* wilt) and Ac-15 (susceptible). Different types of explant were used: apical shoots, first and second pair of leaves, and petioles from the second pair of leaves. All explants were isolated from micropropagated shoots maintained in modified RP medium (Vidoy-Mercado et al., 2012) with DKW (Driver and Kuniyuki, 1984) macro and microelements, as modified by Roussos and Pontikis (2002), RP vitamins (Roussos and Pontikis, 2002) and 2 mg/L of zeatin riboside. Two protocols were assayed; in the first one, protocol I (Capelo et al., 2010), explants were cultured in induction medium, i.e. MS (Murashige and Skoog, 1962) medium supplemented with 12.25 μ M IBA (indole-3-butyric acid) - 4.56 μ M Zea (zeatin), solidified with 6 g/L of agar, during 3 months, followed by transfer to MS basal medium without growth regulators for 12 weeks. Afterwards, calli were cultured in olive cyclic embryogenesis medium, i.e. ECO medium supplemented with 0.25 μ M IBA, 0.5 μ M 2iP (N^6 -(2-Isopentenyl)adenine) - 0.44 μ M BA (6-benzylaminopurine) (Pérez-Barranco et al., 2009), and 200 mg/L of cefotaxime, according to Rugini and Caricato (1995), for 3 subcultures. In protocol II (Mazri et al., 2013), explants were cultured in liquid medium containing $\frac{1}{2}$ MS mineral formulation, MS vitamins, 0.1 g/L myoinositol, 30 g/L sucrose and 30 μ M TDZ (thidiazuron) - 0.54 μ M NAA (1-naphthaleneacetic acid), during 4 days, at 80 rpm. Afterwards, explants were transferred to the same medium without growth regulators and solidified with 6 g/L of agar, for 2 months. Finally, calli were isolated and cultured in ECO solid medium for several subcultures. A modification of protocol II was also assayed, including an incubation on solid induction medium during 8 weeks, instead of culture in liquid medium for 4 days. All subcultures were carried out at 4 week intervals. Cultures were maintained in darkness at $25\pm 2^\circ\text{C}$.

A genotype dependent response was observed and only 2 of the 5 genotypes tested yielded embryogenic calli. In other cases, it has been reported that different genotypes from the same species could have a different response to the same culture conditions (Correia et al., 2011; Corredoira et al., 2015). Best results were obtained with protocol II with apical shoots explants from StopVert and Ac-18 genotypes. The percentage of embryogenic callus induction was 5%, a value lower than that obtained by Mazri et al. (2013) in cv. Dahbia, using leaf sections (10%). In wild olive, Capelo et al. (2010) also obtained better responses using apical sections from the second pair of leaves (27.6%) and petioles (13.15%); however, neither Mazri et al. (2013) nor Capelo et al. (2010) were able to regenerate plants.

Embryogenic calli from StopVert proliferated well in ECO medium during several subcultures; however, callus from Ac-18 showed a low proliferation rate in this medium. Hence, plants were recovered using embryogenic callus from StopVert genotype. Globular somatic embryos were matured following the protocol of Cerezo et al. (2011a); briefly, somatic embryos were cultured on ECO maturation medium (ECO basal medium without growth regulators and cefotaxime, supplemented with 1g/L activated charcoal) for 4 weeks and then, transferred to the same medium and cultured over a cellulose acetate membrane during 4 additional weeks. After that, matured embryos were cultured on germination medium (Clavero-Ramírez and Pliego-Alfaro, 1990), which consisted of modified MS medium with 1/3 MS macroelements, MS microelements, 10 g/L sucrose, for 3 months under $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ irradiance level. The maturation and germination rates were 59.3% and 35.4%, respectively, whereas in juvenile olive material, Cerezo et al. (2011a) obtained 18% maturation rate and 66.7% of shoots sprouted from germinating embryos. As far as we know, this is the first time in which regeneration of plants from somatic embryos derived from mature explants has been reported in wild olive. In cultivated olive, Rugini and Caricato (1995) were able to obtain plants from somatic embryos of cvs. Canino and Moraiolo.

Seventeen shoots were recovered from independent somatic embryos of StopVert. These plants were micropropagated by axillary branching following the protocol of Vidoy-Mercado et al. (2012), i.e. shoot segments with two nodes and deprived of the shoot apex, approximately 1.5 to 2 cm long, were cultured on modified RP medium (Vidoy-Mercado et al., 2012) with DKW macro and microelements (Driver and Kuniyuki, 1984) as modified by Roussos and Pontikis (2002), RP vitamins (Roussos and Pontikis, 2002) and a 2 mg/L zeatin riboside supplement, for 6 week intervals. Plants recovered from somatic embryos showed the same phenotype that micropropagated shoots *in vitro* proliferation.

In order to confirm the genetic fidelity of the material obtained, a genetic analysis by Simple Sequence Repeats (SSR) and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPDs) molecular markers was carried out. SSR are considered as very useful markers due to their higher mutation rate, as compared to other regions of the nuclear genome. By contrast, RAPDs analysis shows less reliability and transferability among laboratories, being considered as less reproducible. In a previous study, Lopes et al. (2009) did not detect DNA alterations in somatic embryos from mature olive by SSR markers. In our case, we analyzed the donor plant, micropropagated shoots derived from lateral buds of the donor plant, an embryogenic callus obtained from an apical bud and plants derived from this embryogenic callus. No differences among the different material analyzed were found when using 5 SSR markers previously described by Sefc et al. (2000) and De la Rosa et al. (2002). Similarly, the patterns of bands obtained with 5 different primers in the RAPDs assay were the same in the donor plant, micropropagated material from donor plants and plants regenerated from somatic embryos; however, one of the 10 samples of callus analyzed, amplified an additional band with one of the primers, not present in the other samples. The total percentage of

polymorphism was 0.07%. Similar results have been reported in calli of *Picea glauca* (De Verno et al., 1999) and *Q. robur* (Wilhelm et al., 2005), using RAPDs and SSR markers, respectively; as in the case of StopVert genotype, no differences in the regenerated plants could be observed with respect to the donor plant in these reports. Alterations in calli have been related with unstable cells, which have lost the regeneration capacity (De Verno et al., 1999; Miñano et al., 2014). In our case, RAPDs markers were most effective than SSR in the detection of genetic alterations.

The obtained embryogenic material from StopVert could be useful for functional genomic studies to unravel the molecular and genetic basis of Verticillium wilt resistance in this genotype. In addition, it would be interesting to develop new regeneration protocols for susceptible genotypes such as Ac-15, to assess the effect of overexpression of resistance genes in the disease response.

The second objective of this PhD Thesis was the evaluation of *afp* gene from *Aspergillus giganteus*, encoding an antifungal protein, in conferring resistance against two soil-borne diseases in olive, *V. dahliae* and *R. necatrix*.

Increased resistance against fitopathogenic fungi has been reported in several plant species through overexpression of plant antifungal genes, such as those encoding chitinase or glucanase (Ceasar and Ignacimuthu, 2012). However, main limitations of this strategy are the low level of resistance achieved with the introduction of a single gene and the narrow range of pathogens to which resistance is acquired (Dana et al., 2006). The use of genes from fungi or bacteria, such as those isolated from *Trichoderma harzianum* encoding for the antimicrobial (AM) proteins chitinase and glucanase, has proven to be a more successful strategy (Lorito et al., 1998; Bolar et al., 2001; Mercado et al., 2015). These AM proteins protect higher eukaryotes against invading pathogens, whereas in lower eukaryotes and prokaryotes they seem to have a role in competition for nutrients between species that share the same ecological niche (Hegedüs and Marx, 2013). The mould *Aspergillus giganteus* produces a small, basic and cysteine-rich AM protein that allows for antagonism against filamentous fungi. This protein, named antifungal protein or AFP, is secreted as a 91 amino acid inactive precursor containing a signal sequence for secretion and a prosequence that is removed by a protease during the process of secretion (Wnendt et al., 1994; Martínez-Ruiz et al., 1997). The mature AFP protein contains 51 amino acids and its structure is similar to the plant defensins and Y-thionins (Campos-Olivas et al., 1995; Lacadena et al., 1995). The antifungal mechanism of AFP is not fully understood; however, it seems to disturb the integrity of the plasma membrane and inhibits chitin biosynthesis in sensitive fungi (Leiter et al., 2017). The expression of the *afp* gene in transgenic plants enhanced resistance to diseases in rice (Coca et al., 2004; Moreno et al., 2005), wheat (Oldach et al., 2001; Li et al., 2008) and pearl millet (Girgi et al., 2006) caused by a broad range of fungal pathogens, e.g. *Magnaporthe grisea*, *Fusarium spp.*, *Blumeria (Erysiphe) graminis* f. *sp. graminis*, *Puccinia recondita*, *Puccinia substriata* and *Sclerospora graminicola*.

In this investigation (**chapter III**), 5 olive transgenic lines expressing the *afp* gene under the control of the constitutive promoter CaMV35S have been generated, following the protocol of Torreblanca et al. (2010), using globular somatic embryos derived from the embryogenic callus line P1. This line had been obtained from an excised radicle of a mature zygotic embryo of cv. Picual (Pérez-Barranco et al., 2009). Briefly, explants were incubated in a diluted *Agrobacterium* culture for 20 min under mild agitation. Then, explants were blotted dried on sterile filter paper and cultured on ECO solid medium at 25°C in darkness for 2 days. After that, explants were washed with 5 ml ECO liquid medium supplemented with 250 mg/L cefotaxime and timentin at 25°C for 2h, blotted dried on sterile filter paper and cultured on selection medium, i.e. ECO solid medium supplemented with 250 mg/L cefotaxime, 250 mg/L timentin and 200 mg/L paromomycin. Explants were incubated in darkness for at least four months with reculturing on fresh selection medium at weekly intervals during the first month and bi-weekly thereafter for two months. Later on, subculturing in the selection medium was performed every 4 weeks. Afterwards, explants that showed proliferation in the solid selection medium were cultured in liquid medium of the same composition supplemented with 50 mg/L paromomycin for 6 weeks. The transformation rate obtained was 1.5%. Globular somatic embryos of the different transgenic lines were matured and germinated using the protocols of Cerezo et al. (2011a) and Clavero-Ramírez and Pliego-Alfaro (1990), above described. Plantlets were micropropagated in DKW medium (Driver and Kuniyuki, 1984) as modified by Revilla et al. (1996). Later, 2 cm long apical shoots with one or two nodes from different transgenic lines and non-transformed control were cultured on tubes containing 3 ml of basal RP medium supplemented with 10 mg/L IBA for 3 days and then, transferred to RP solid medium without hormones but supplemented with 1 g/L activated charcoal for rooting. Rooted explants were acclimatized to *ex vitro* conditions in jiffy trays with peat moss:perlite (1:1).

To evaluate the effect of *afp* gene expression in plant growth, the *in vitro* behavior of transgenic plants, as well as shoot length and stem diameter of acclimated plants, were measured. For the *in vitro* measurements, shoot segments with two nodes and deprived of the shoot apex, approximately 1.5 to 2 cm long, were isolated and cultured on RP medium supplemented with 2 mg/L zeatin riboside (Vidoy-Mercado et al., 2012) during 3 subcultures at 8 week intervals. The number of axillary shoots and their length were measured over three subcultures. Twenty shoots per independent transgenic line were used and the experiment was performed by triplicate. In general, there were minor differences in the number of shoots per explant and the length of the main shoot between transgenic lines and the control, with the exception of line AFP13. This line showed a lower number of shoots per explant (1.8 ± 0.7) and a lower length of the main shoot (3.0 ± 1.0 cm). Rooting capacity was also evaluated. The number of roots and the length of the main root were measured after 9 weeks of culture. More than 88% of the control shoots rooted, producing 2.4 roots per explant. The percentage of rooted explants was also high in all transgenic lines, except for line AFP13 that showed a reduced ability to root (26.1%) and formed few roots per explant (1.5 ± 0.5). Line AFP7

also produced a low number of roots per explant (1.8 ± 0.8). The main root length varied greatly among the different genotypes, being larger in the control non-transformed line (2.6 ± 1.3 cm) and extremely short in the AFP13 line (0.4 ± 0.1 cm).

Plant height and the diameter of the main stem were measured in one year old plants growing in the confined greenhouse. Fifteen plants per transgenic and control lines were evaluated. No differences were found in shoot length and stem diameter between control and transgenic AFP plants, except for AFP13 line, which showed a stunted phenotype, being shorter and thinner than the rest of transgenic lines.

The transgenic nature of *afp* plants was confirmed by PCR amplification of 700 bp and 200 bp fragments of *nptII* and *afp* genes, respectively. All the lines showed correct amplification of both transgenes except the line AFP13. In that case, *nptII* fragment was amplified but not the *afp* gene. *afp* gene expression was quantified by qRT-PCR in RNA isolated from leaves and roots. Transgenic lines showed a variable level of *afp* expression; two lines, AFP7 and 9 showed the highest level of expression in both organs, whereas the rest of lines (AFP10, 14 and 25) showed low levels of transcript. As expected, no *afp* expression was observed neither in controls (non-transformed plants and plants transformed with the GUS gene) nor in AFP13 line.

Disease response against *Verticillium dahliae* was evaluated after inoculation with defoliating (D) pathotype V-138. None of the transgenic lines expressing *afp* gene showed resistance. This is not an unexpected result; although the antifungal activity of AFP at low concentration has been demonstrated against numerous filamentous ascomycetes, some species showed resistance, suggesting that AFP may operate in a species-specific manner (Theis et al., 2003). Oldach et al. (2001) also observed that the inoculum density influences the response of *afp* transformed wheat to different pathogens, i.e. the enhanced tolerance to *B. graminis* f. sp. *tritici* and *P. recondita* was lost at high doses of inoculum. Further experiments are needed to determine if the lack of resistance to *V. dahliae* in transgenic olive is due to the tolerance of this fungus to AFP protein or to an insufficient level of AFP accumulation in olive tissues.

Interestingly, AFP13 line, containing the *nptII* but not the *afp* gene showed resistance to ND and D pathotypes, in a similar manner as wild olive genotype StopVert (Jiménez-Fernández et al., 2016). The resistance to *V. dahliae* in olive has been related to the occlusion of vessels, limiting the expansion of the pathogen in the xylem; however, in AFP13 plants the mechanism is unknown. It might be related to an insertional effect of the integration of the uncompleted T-DNA in the olive genome, or, more probably, to a somaclonal variation induced by *in vitro* culture. Interestingly, this line showed a reduced growth rate and a RAPDs assay carried out using 11 primers showed a different amplification band pattern in the AFP13 line when compared to non-transformed and GUS transformed controls. However, more studies will be necessary to clarify the enhanced resistance of this line against *V. dahliae*.

The response of transgenic *afp* lines versus the emerging pathogen *R. necatrix* was also evaluated. In this case, lines with the higher level of *afp* expression (AFP7 and 9) showed a higher degree of resistance to the fungus when compared with non-transformed control or transgenic plants expressing the GUS gene. Furthermore, a positive correlation between level of transcript and resistance was observed, as reported in other species transformed with *afp* gene, e. g. wheat against *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* and *Puccinia recondite* (Oldach et al., 2001).

Our results indicate that the *afp* gene can be useful for enhancing resistance to *R. necatrix* in olive, but this gene does not protect against *V. dahliae* (Narvaez et al., 2018). Despite this negative result, a transgenic olive line containing a partially degraded T-DNA has been recovered which showed enhanced resistance to Verticillium wilt. The origin of this resistance phenotype seems to be related to a genetic variation induced through regeneration via somatic embryogenesis although a specific effect of the transformation procedure itself cannot be discarded.

The Arabidopsis *NPR1* (*AtNPR1*) gene encodes a key regulator of SAR (Cao et al., 1997). *AtNPR1* is constitutively expressed in Arabidopsis at low levels; the gene product is located as an inactive oligomeric complex in the cytosol (Mou et al., 2003). During pathogen infection, this complex is broken and the monomeric form is transported into the nucleus. Nuclear *AtNPR1* interacts with TGA family of basic leucine zipper transcription factors, which induces expression of *PR* (pathogenesis related) genes (Despres et al., 2000). Overexpression of this gene or their orthologs has conferred resistance to biotrophic and necrotrophic fungal, viral and bacterial pathogens. Thus, overexpression of *AtNPR1* in tomato (Lin et al., 2004) and wheat (Makandar et al., 2006) increased resistance against *Fusarium spp.*, and in cotton against *Thielaviopsis basicola* (Kumar et al., 2013). Orthologs of *AtNPR1* have also been cloned and characterized in other species, such as grapefruit, and its overexpression has conferred resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in the susceptible cultivar Duncan (Chen et al., 2013). Additionally, *AtNPR1* orthologs have also been overexpressed in different species; *NPR1* of *Brassica juncea* (*BjNPR1*) was overexpressed in rice plants (Sadumpati et al., 2013) conferring resistance to *Magnaporthe grisea*, *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

The third objective of this investigation was to generate transgenic olive plants expressing the *AtNPR1* gene with the final aim of obtaining Verticillium wilt resistant plants.

In this research (**chapter IV**), 3 transgenic lines expressing *AtNPR1* gene (NPR1 780, NPR1 814 and NPR1 224) under the control of the constitutive promoter CaMV35S were obtained following the protocol cited above (Torreblanca et al., 2010). The transformation rate was 0.28%, a percentage lower than that obtained in other transformation experiments using the same type of explant and *A. tumefaciens* strain. Transformation rates with *afp* gene from *Aspergillus giganteus* (Narvaez et al., 2018)

and *MtFta1* from *Medicago truncatula* (Haberman et al., 2017) were 1.5% and 2.56%, respectively.

After several cycles of selection in ECO solid medium using increasing concentrations of paromomycin (50-150 mg/L) and a period of culture in ECO liquid medium supplemented with 12.5-25 mg/L paromomycin, antibiotic resistant embryos were matured following the protocol of Cerezo et al. (2011a). Cotyledonary mature embryos were transferred to 1/3 MS germination medium (Clavero-Ramírez and Pliego-Alfaro, 1990) over 12 weeks. Plantlets were micropropagated in modified RP medium supplemented with 2 mg/L zeatin riboside. For rooting, 2 cm long apical shoots with one or two nodes were cultured in ECO liquid medium supplemented with 10 mg/L IBA for 3 days and transferred to RP solid basal medium with 1g/L activated carbon over 9 weeks. Afterwards, rooted explants were acclimatized to *ex vitro* conditions.

The transgenic nature of plants was confirmed by PCR amplification of 700 bp and 732 bp fragments from *nptII* and *AtNPR1* genes, respectively. The three transgenic lines recovered showed the correct amplification of both transgenes. qRT-PCR analysis was carried out in embryogenic callus from the three *AtNPR1* lines to quantify gene expression. The highest level of transcript was observed in the NPR1 780 line, whereas NPR1 814 and 224 showed similar levels between them, but significantly lower than NPR1 780.

When micropropagated *in vitro*, NPR1 814 plants showed the highest number of shoots per explant (2.07 ± 0.53) and the highest shoot length (5.15 ± 1.12 cm), while NPR1 780 line showed the lowest proliferation rate. As regard as rooting capacity, all lines showed a high rooting percentage, more than 85%, similar to non-transformed control P1 (92%). Number of roots per shoot and length of main root of different transgenic lines were similar to control non-transformed line, displaying NPR1 224 line the highest number of roots per shoot (3.2 ± 1.2), but the lowest root length (1.2 ± 0.7 cm), whereas NPR1 814 showed the highest length of main root (1.6 ± 1.1 cm).

After acclimatization, plant height and diameter of the main stem were measured in 9 months old plants growing in the confined greenhouse. Fourteen plants per transgenic and control lines were evaluated. NPR1 814 plants showed the longest stem (23.7 ± 4.3 cm), while the rest of lines displayed smaller values of length, between 18 (P1 and NPR1 224) and 20 cm (NPR1 780). As regard as stem diameter, NPR1 814 and 224 lines displayed a thicker stem (around 0.23 cm) than NPR1 780 and control line (0.18-0.20 cm).

In other investigations, transformation with *AtNPR1* gene caused either negative or positive effects in transgenic plants; e. g. negative effects were observed in transgenic rice: reduced growth, greater sensitivity to abiotic stress and a phenotype syndrome named LMS (lesions mimic spot) produced in the growth chamber under low light conditions (Quilis et al., 2008). By contrast, transgenic cotton plants showed a greater number of shoots of higher length, as well as a greater root biomass (Kumar et al.,

2013). In our case, no drastic effects were detected on the phenotype of *AtNPR1* lines under *in vitro* and *ex vitro* conditions suggesting that *AtNPR1* expression does not affect olive growth.

The elicitation of transgenic *AtNPR1* plants or cell suspensions with salicylic acid (SA) or methyl jasmonate (MeJA) induces *PR* genes expression (Meur et al., 2008; Wally et al., 2009). In this research, transgenic NPR1 embryogenic lines cultured in liquid medium were exposed to both elicitors and endochitinase activity, a PR protein, was quantified at different times after elicitation. Basal chitinase activity was significantly higher in NPR1 814 line when compared with control line, 6.7 vs. 4.2 picomoles 4-MU/h/ μ g of protein in NPR1 814 and control, respectively. By contrast, the two other transgenic lines showed lower levels than the control, 2.1 vs. 4.2 picomoles 4-MU/h/ μ g of protein in transgenic and control, respectively. No significant effect was detected in lines NPR1 780 and NPR1 224 after 48h of SA elicitation, being the chitinase activity similar to control line at the end of the experiment. In line NPR1 814, the activity initially decreased but it increased later, reaching at 48h a value similar to the initial one. The exposure of embryogenic calli to MeJA produced a transient increase in endochitinase activity after 24h in all lines, including non-transformed line P1; afterwards, chitinase activity decreased or remained at similar level, depending on the line. Interestingly, the transient increment in chitinase activity at 24h was higher in the transgenic lines than in the control, which might indicate a higher activation of defense proteins induced by MeJA as consequence of *AtNPR1* expression.

Few investigations have been carried out for evaluating the effect of *AtNPR1* gene or its orthologs in the resistance to *V. dahliae*. Parkhi et al. (2010a) showed that transgenic cotton plants were resistant to non defoliating pathotypes (ND), but susceptible to defoliating ones (Parkhi et al., 2010b). It would be possible that transgenic olive expressing *AtNPR1* might show resistance to ND pathotype. In any case, it will be necessary to inoculate olive *AtNPR1* plants with both pathotypes to confirm this hypothesis. The results obtained following elicitation with SA and MeJA merit further investigation. Additionally, NPR1 814 line showed the highest level of endochitinase activity and some researchers have related endochitinase activity with enhanced resistance to this fungus (Fradin and Thomma, 2006).

Currently, assays are in progress to evaluate the response of these transgenic lines to both ND and D pathotypes of *V. dahliae*.

Capítulo I. Introducción



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

I.1. Descripción, origen y distribución del olivo

El olivo (*Olea europaea* L.), pertenece a la familia *Oleaceae*; dentro del género *Olea* se encuentra la especie *Olea europaea* ssp. *europaea*, en la que se incluyen los olivos cultivados (var. *europaea*) y los silvestres o acebuches (var. *sylvestris*) (Green, 2002; Baldoni y Belaj, 2009). Además, *Olea europaea* incluye otras subespecies, agrupadas en base a su distribución geográfica y morfología: ssp. *cuspidata* en Asia y este de África, ssp. *laperrinei* en la Región del Sáhara, ssp. *maroccana* en Marruecos, ssp. *cerasiformis* en las Islas Canarias y Madeira y ssp. *guanchica* también localizada en las Islas Canarias (Rugini y Baldoni, 2005; Baldoni y Belaj, 2009).

El cultivo del olivo puede considerarse de los más antiguos de la cuenca mediterránea. Tiene su origen aproximadamente 6000 años A.C. en Asia Menor (Zohary y Spiegel-Roy, 1975) y se diseminó por las islas griegas como consecuencia de las migraciones de fenicios, y posteriormente, por el norte de África, Sicilia, sur de Italia y la Península Ibérica (Boskou, 2006; Baldoni y Belaj, 2009; Buendía Picornell y Melero Martínez, 2013). En Hispania, los árabes impulsaron su cultivo y a partir del siglo XV, con el descubrimiento de América, se expandió por América Latina, llegando a California (Estados Unidos) en el siglo XVIII. En la actualidad también se cultiva en China, Sudáfrica, Japón y Australia (Civantos, 2008; Rallo y Muñoz-Díez, 2010).

Se trata de un árbol longevo, perennifolio y de tamaño, en general, mediano (4-8 metros de altura, según la variedad); puede alcanzar hasta 15 m de altura y permanecer en producción durante cientos de años. Las plantas de semilla presentan una fase juvenil que puede durar más de 10 años (Rugini y Fedeli, 1990). El tronco es grueso, la corteza de color gris o verde grisáceo y la copa, en general, redondeada. Caracteres como la densidad de copa, porte, color de la madera y longitud de los entrenudos varían dependiendo de la variedad. Las hojas son simples, con forma lanceolada y normalmente sobreviven dos o tres años, aunque también permanecen hojas de mayor edad. La morfología del sistema radicular depende tanto del origen como de las condiciones del suelo; así, las raíces más jóvenes son de color blanco, adquiriendo una coloración marrón por la suberización de los tejidos al madurar. La floración se produce en primavera, siendo las flores pequeñas y actinomorfas. El fruto, la aceituna, es una drupa de forma elipsoidal a globosa y su tamaño depende del cultivar; presenta color verde durante su desarrollo y al madurar, negro. Está compuesta por tres tejidos principales: endocarpo, mesocarpo y exocarpo; el endocarpo es el hueso, el mesocarpo la pulpa o carne, y el exocarpo la piel o capa exterior.

Se considera una especie diploide ($2n = 2X = 46$) (Minelli et al., 2000); no obstante, algunos autores han descrito casos de poliploidía tanto en mutantes (Rugini et al., 1996) como en poblaciones naturales (Rallo et al., 2003; Besnard et al., 2008). El tamaño del genoma se estimó en torno a 1800 Mb tanto en olivo cultivado como silvestre (De la Rosa et al., 2003).

Se han identificado un total de 272 variedades distintas en España (Barranco et al., 2005), siendo Picual la de mayor importancia; de hecho, gran parte de la superficie cultivada en Andalucía es ocupada por este cultivar, especialmente, en Jaén (97%). Esta variedad se caracteriza por una morfología apuntada del fruto, fácil propagación por estaquillado y un elevado rendimiento graso. Destaca por su tolerancia a estrés abiótico, como baja temperatura, salinidad y exceso de humedad del suelo; sin embargo, muestra distinta respuesta a estrés biótico, siendo tolerante a la tuberculosis y la lepra causadas por *Pseudomonas savastanoi* y *Phlyctema vagabunda*, respectivamente, y muy susceptible a enfermedades fúngicas, como el repilo producida por *Spilocaea oleagina* (Cast.) y la Verticilosis (*Verticillium dahliae*) (Barranco et al., 2005).

I.2. Importancia del cultivo

El olivo es uno de los cultivos con mayor incidencia en la actividad agrícola de la cuenca mediterránea. La producción se destina principalmente a la elaboración de aceite, aunque existen variedades que proporcionan aceituna de mesa. El aceite de oliva virgen es esencial en la dieta mediterránea; se extrae por procesos físicos y es considerado el mejor aceite comestible gracias a sus características organolépticas: aroma, sabor y color, estabilidad oxidativa y propiedades nutricionales. Asimismo, destaca su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados y la presencia de componentes menores con capacidad antioxidante, como fenoles y tocoferoles (Pérez-Jiménez et al., 2007; Matthäus y Özcan, 2011).

Existen olivos cultivados en más de 40 países, entre los 30° y 45° de latitud en ambos hemisferios (Fernández-Escobar et al., 2012). En 2014 ocupaba 10.3 millones de hectáreas en todo el mundo (FAO, 2016); mayormente en los países de la cuenca mediterránea (97.9%), 1.3% en América, 0.4% en Oceanía y en Asia. España cuenta con más de 2.5 millones de hectáreas cultivadas (24.4% del total mundial), seguido de Túnez, con una superficie de 15.4%, e Italia, con un 11.2%. Países como Grecia, Turquía y Marruecos tienen alrededor de un 9% de superficie cultivada, mientras que Argelia, Portugal y Libia menos de un 4%. La producción media anual en el mundo se sitúa en torno a los 16 millones de toneladas de aceitunas, destinándose el 90% a la producción de aceite y alrededor de un 10% a la obtención de aceitunas de mesa (FAO, 2016). En la Unión Europea, los mayores productores son, por orden de importancia: España, Italia, Grecia y Portugal. Andalucía es la comunidad autónoma con mayor superficie y producción; de hecho, cuenta con 1.561.950 ha y una producción de aceituna estimada para la campaña 2017/2018 de 4.302.500 t y 884.900 t de aceite de oliva, según datos de la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural (Junta de Andalucía).

I.3. Amenazas del cultivo: enfermedades causadas por hongos de suelo

I.3.1. *Verticillium dahliae*

El olivo es un hospedador del hongo *V. dahliae*, un patógeno vascular de suelo, que pertenece a la familia de los Ascomicetos y muestra reproducción estrictamente asexual. Los mecanismos de defensa de la planta frente a este patógeno continúan siendo desconocidos, a pesar de que en los últimos años se han realizado importantes avances. Presenta un amplio rango de hospedadores, desde especies herbáceas como tomate, patata, berenjena, algodón, etc., (Bhat y Subbarao, 1999) a leñosas como el olivo (Jiménez-Díaz et al., 2012). Los últimos estudios reconocen 10 especies dentro del género *Verticillium* (Inderbitzin et al., 2011), siendo *V. dahliae* Klebahn y *V. albo-atrum* Reinke & Berthold las que más daños producen. Se considera más bien un adaptador al hospedador que huésped-específico, ya que aislados que infectan otros hospedadores, como por ejemplo, el algodón, también pueden ser patogénicos del olivo (Jiménez-Díaz et al., 2012).

Los aislados de *V. dahliae* se clasifican en lo que se denomina grupos de compatibilidad vegetativa (VCGs), perteneciendo al mismo grupo aquéllos que se pueden anastomosar y formar un heterocarionte estable (Katan, 2000). Se han identificado 6 VCGs (VCG1 – VCG6). Otra clasificación sería en función de la raza, 1 ó 2; asimismo, los aislados de olivo se clasifican en patotipo defoliante (D) o no defoliante (ND), siendo los aislados pertenecientes a la raza 2 todos los que son patotipo D (más virulentos) y algunos aislados patotipo ND, mientras que la raza 1 comprende solo aislados del patotipo ND, los cuales presentan el efector *Ave1*, avirulento en plantas que contienen el gen *Ve1* o sus homólogos.

Según estimaciones realizadas en Andalucía, más del 50% de los olivares estuvieron afectados por Verticilosis (Ruiz Torres, 2010). La extensión de la enfermedad se debe especialmente a la expansión del cultivo, así como a las innovaciones tecnológicas, como por ejemplo, el establecimiento de plantaciones intensivas y superintensivas, regadío, mecanización, etc. Asimismo, un estudio llevado a cabo por Jiménez-Díaz et al. (2008) mostró que el 78% de las ‘muestras’ (aislados) de *V. dahliae* recogidas de más de 400 olivos en 65 olivares muestreados al azar en las provincias de Jaén, Córdoba, Granada, Huelva y Sevilla, eran patotipo D, lo que puso de manifiesto su expansión.

I.3.1.1. Síntomas

Dado que *Verticillium* puede infectar a un amplio rango de hospedadores, no todos los síntomas son comunes en las plantas infectadas (Fradin y Thomma, 2006). En olivo, se han descrito dos síndromes distintos: defoliante (D) y no defoliante (ND) (Navas-Cortés et al., 2008; Jiménez-Díaz et al., 2012). El síndrome D se caracteriza por una caída temprana de hojas verdes sin presentar ningún síntoma y eventualmente, una

completa defoliación, necrosis y muerte de la planta. El segundo síndrome incluye dos formas que difieren en severidad; la forma aguda (apoplejía) y la crónica (decaimiento lento). Por un lado, la “apoplejía” consiste en una muerte rápida de las ramas o de la planta completa, especialmente, en árboles jóvenes, donde las hojas presentan necrosis. Por otro lado, la forma crónica se corresponde con el momificado y necrosis de las inflorescencias, teniendo lugar, además, la aparición de clorosis y necrosis de las hojas. La incidencia y severidad es mayor en olivos jóvenes (2-10 años), aunque también puede infectar a olivos de mayor edad (> 50 años). Asimismo, su detección es difícil debido a que otros patógenos como *Fusarium* spp. causan enfermedades con síntomas similares (Fradin y Thomma, 2006).

I.3.1.2. Ciclo de vida e infección

Es un patógeno hemibiotrofo que presenta una fase parasítica, dentro del hospedador, y otra no-parasítica. Durante la etapa no-parasítica, sobrevive en el suelo gracias a la formación de microesclerocios, o embebido en los tejidos de raíz o tallo que haya colonizado (Pegg y Brady, 2002). El proceso de infección en especies leñosas es similar al de herbáceas; así, cuando se produce la germinación de los microesclerocios debido a exudados de la raíz del hospedador o plantas vecinas no hospedadoras, las hifas penetran la epidermis de la raíz, a veces, a través de heridas producidas por nematodos y atraviesan el córtex, donde crecen inter e intracelularmente hasta alcanzar el xilema (fase parasítica) (Prieto et al., 2009). Las conidias producidas se desplazan a través del flujo del xilema y son atrapadas en los vasos donde germinan. Las nuevas hifas continúan penetrando en vasos adyacentes y es en esta fase, donde se producen ciclos de proliferación y eliminación del hongo, probablemente, debido a las respuestas de defensa del hospedador (Fradin y Thomma, 2006). Asimismo, la acumulación de hifas, de los compuestos producidos por la planta para impedir su expansión, y los procedentes de la degradación de las paredes celulares de los vasos del xilema por enzimas del patógeno, favorecen la oclusión (Baidez et al., 2007), lo que conlleva un menor flujo de agua provocando estrés hídrico y marchitamiento. Por último, los microesclerocios producidos en los tejidos senescentes y necrosados caen al suelo formando el nuevo inóculo, pudiendo sobrevivir en condiciones no favorables hasta 15 años (Vallad et al., 2006). La enfermedad producida por *V. dahliae* es monocíclica; solo ocurre un ciclo de enfermedad y producción de inóculo por sesión de crecimiento (Figura I.1) (Rowe y Powelson, 2002).

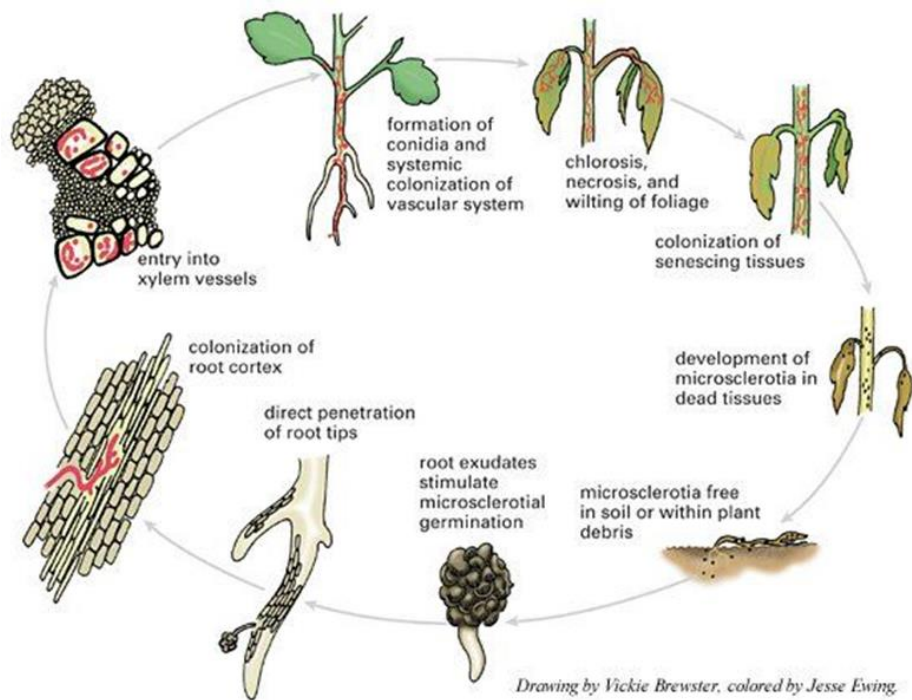


Figura I.1. Ciclo de infección de *Verticillium dahliae*. Figura tomada de Rowe y Powelson (2002).

I.3.1.3. Mecanismos de invasión del patógeno

V. dahliae cuenta con distintos mecanismos para invadir y colonizar la planta; así, produce un amplio rango de enzimas que degradan compuestos de la pared celular (CWDEs), como poligalacturonasas, pectinesterasas, pectin liasas (Klosterman et al., 2011; Chen et al., 2016) y celulasas (Novo et al., 2006). Otro mecanismo es la liberación de toxinas, cuya composición es desconocida (Fradin y Thomma, 2006); sin embargo, se han descrito algunos componentes de alto peso molecular, como los complejos proteína-lipopolisacáridos (PLP), glicoproteínas y CWDEs, y de bajo peso molecular, como pequeños péptidos, en los extractos crudos. Buchner et al. (1982) señalan que el efecto tóxico de los complejos PLP reside en una fracción polipeptídica de bajo peso molecular. Estos complejos se han relacionado con la interrupción del flujo de agua, lo que conllevaría el cierre de estomas y clorosis. Asimismo, hay autores que consideran que los síntomas producidos por este hongo estarían relacionados con la actividad de la toxina (Meyer et al., 1994), mientras que otros lo relacionan con la oclusión de los vasos.

I.3.1.4. Mecanismos de defensa del hospedador

Durante la infección en la planta se han descrito dos fases: prevascular y vascular. La primera tiene lugar antes de que el hongo haya alcanzado el xilema, pudiendo localizarse en el córtex. Las plantas cuentan con distintos mecanismos para hacer frente a la infección; así, inducen la síntesis de suberina, lignina y calosa para reforzar las paredes celulares, la deposición de geles y gomas para restringir el movimiento del patógeno (Chen et al., 2004), así como la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) y compuestos con propiedades antimicrobianas (fitoalexinas) (Daayf et al., 1997). En general, esta respuesta es generada en mayor grado en plantas resistentes; sin embargo, a pesar de que las plantas susceptibles también responden al ataque del patógeno, no parece ser suficiente para evitar su colonización.

En olivo, se han realizado algunos estudios para la detección de genes implicados en la defensa frente a este patógeno; así, Jiménez-Ruiz et al. (2017) mostraron que la mayoría de los genes putativamente implicados en el cultivar susceptible Picual, estaban relacionados con la degradación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como las enzimas glutatión S – transferasa y glutatión peroxidasa, mientras que Leyva-Pérez et al. (2017) observaron que, en general, en Frantoio (tolerante) no se inducían. Asimismo, en el cultivar susceptible tenía lugar un incremento de la expresión de genes que codificaban para endoquitinasas, mientras que en el patógeno, se incrementaba la producción de proteínas efectoras de unión a quitina. Otra proteína identificada en plantas del cultivar Picual fue una cinamil alcohol deshidrogenasa, también expresada en plantas de algodón durante la infección (Sun et al., 2013a). El análisis transcriptómico de los cultivares de olivo susceptibles y tolerantes mostró la inducción de los genes *Ve1*, *BAK1*, *EDS1*, *NDR1* y *MEK2*; sin embargo, algunos de los unigenes *Ve1* identificados presentaban bajos niveles de expresión, tanto basal como tras la infección con el patotipo D, en ambos cultivares, aunque los mayores niveles se detectaron en Frantoio (Leyva-Pérez et al., 2017). Igualmente, se inducían genes que actuarían aguas abajo del *Ve1*, como *BAK1* y *NHL1*, en Frantoio, pero no en Picual; sugiriendo que la baja capacidad de respuesta de la variedad susceptible podría deberse a su reducida expresión. Del mismo modo, al no observar diferencias significativas en la expresión de estos genes, propusieron que la resistencia en olivo, al menos frente al patotipo D, no estaría mediada por homólogos del *Ve1*, reforzando esta hipótesis el hecho de que los aislados pertenecientes a este patotipo carezcan del efector *Ave1*. Por otro lado, 2 factores de transcripción (FT) tipo NAC, implicados en la producción de nuevos elementos del xilema, se expresaban antes y en mayor grado en el cultivar tolerante, lo que se ha relacionado con la capacidad de recuperación del tejido tras la infección (Keykhasaber et al., 2017). Asimismo, Leyva-Pérez et al. (2017) identificaron una proteína perteneciente a la familia Bet v I, implicada en la defensa y específica de olivo, cuya expresión era reprimida en Picual (Jiménez-Ruiz et al., 2017), así como una proteína relacionada con la lignificación, *DIRIGENT*, cuya expresión era mayor en Frantoio. La sobreexpresión de esta proteína en plantas de algodón también

incrementaba la producción de lignina, restringiendo la invasión del patógeno (Shi et al., 2012). En olivo, tal y como ocurre en otras especies vegetales, la oclusión vascular podría ser clave en la resistencia; así, Birem et al. (2016) observaron que plantas de la variedad Picual infectadas presentaban mayor reducción del crecimiento y mayor defoliación que las de Frantoio, lo que sugería que las plantas de esta última variedad sobrevivían a la infección debido a que la oclusión de los vasos permitía el flujo de agua y la restricción del patógeno, así como el reinicio de crecimiento de nuevo tejido. Asimismo, Jiménez-Fernández et al. (2016) propusieron que la resistencia en olivo silvestre, posiblemente, estaría relacionada con los mecanismos de la planta para reducir la expansión del hongo, tales como el refuerzo de las paredes celulares por calosa y lignina, la oclusión de los vasos por gomas, geles y tálides, así como por la producción de compuestos fenólicos; de hecho, otros autores también han relacionado la síntesis de compuestos fenólicos con capacidad antifúngica (Del Río et al., 2003), como verbascósido (Markakis et al., 2010) u oleuropeína (Baídez et al., 2007), con la resistencia al patotipo D, tanto en olivo silvestre (Sanei y Razavi, 2017) como en cultivado (variedad Koroneiki) (Markakis et al., 2010).

Por otro lado, además de los diferentes patrones de expresión génica de los cultivares Frantoio y Picual tras la infección, ambos presentan diferencias en el sistema radicular; estando menos ramificado en el caso del cultivar Frantoio, tal y como se ha observado en la variedad tolerante Koroneiki (Chatzistathis et al., 2013).

I.3.1.5. Métodos de control

La aplicación de una estrategia de manejo integrado que incluya el uso de plantas libres de patógenos o plantas resistentes, es lo más adecuado para el control de la Verticilosis (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011). Así, uno de los objetivos de mejora ha sido la caracterización de genotipos de olivo silvestre resistentes que pudieran ser empleados como patrones. En esta línea, Jiménez-Fernández et al. (2016) mostraron la alta resistencia que presentaban 4 genotipos de acebuche, 2 españoles (Ac-13 y Ac-18) y 2 italianos (OutVert y StopVert), inoculados con un patotipo D. Por otro lado, la desinfección del suelo con productos fumigantes, rotación de cultivos, solarización, empleo de extractos de plantas y enmiendas de suelo son medidas que podrían utilizarse en caso de suelos infestados para la reducción del inóculo (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011), mientras que el uso de agentes de control biológico podría emplearse para proteger el material plantado (Markakis et al., 2016).

I.3.2. *Rosellinia necatrix*

Rosellinia necatrix es el agente causal de la podredumbre blanca; se trata de un ascomiceto que infecta un amplio rango de especies, pero principalmente, árboles frutales y forestales, y plantas ornamentales, en zonas de clima mediterráneo u oceánico (Pérez-Jiménez, 2006). Es un patógeno vascular necrotrofo, emergente en plantaciones

intensivas de olivo ubicadas en parcelas en las que anteriormente se cultivaban frutales, como melocotón, almendro y avellano. Esencialmente, afecta a árboles jóvenes; de hecho, en los últimos años se han observado olivos afectados en el Alentejo portugués (Roca et al., 2016), por lo que se han realizado estudios para determinar el grado de tolerancia a este patógeno en variedades de olivo. Así, García-Figueroes et al. (2009) observaron que todas las variedades utilizadas mostraban una alta sensibilidad al patógeno, a pesar de que algunas cepas eran más virulentas que otras; sin embargo, Empeltre y Corbella eran más susceptibles que Razzola y Frantoio.

El hongo, cuando penetra en las raíces, forma micelio algodonoso de color blanco que al madurar oscurece (Simons, 1997) y como consecuencia, las raíces pierden firmeza. Las hifas se extienden invadiendo células epidérmicas y del córtex, colapsando finalmente el sistema vascular.

I.3.2.1. Síntomas

En olivo, en la parte aérea, se ha observado retraso del crecimiento, amarillez, defoliación y seca de las ramas. En las raíces afecta al parénquima, cambium y floema, provocando debilitamiento progresivo y necrosis. Tal y como ocurre con el hongo *V. dahliae*, *R. necatrix*, también impide el transporte de agua a través del xilema produciendo estrés hídrico; asimismo, produce compuestos tóxicos, como citocalasina E (Kshirsagar et al., 2001) o diketopiperacinas (Edwards et al., 2001).

I.3.2.2. Métodos de control

Los principales métodos de control son, por un lado, los tratamientos de esterilización de suelo (Ruano-Rosa et al., 2007) mediante aplicaciones preventivas de bromuro de metilo (García-Velasco et al., 2012) y por otro, el uso de fungicidas específicos en cuanto aparecen los primeros síntomas (Tamayo, 2007). Asimismo, también se han empleado estrategias de biocontrol (Ruano-Rosa y López-Herrera, 2009); sin embargo, ninguno de los métodos es totalmente efectivo, por lo que los estudios más recientes se han dirigido a la identificación de cultivares tolerantes o resistentes al patógeno, que puedan ser empleados como patrones (García-Figueroes et al., 2009).

I.4. Mejora del olivo

Los objetivos en la mejora del olivo son, fundamentalmente, el incremento del contenido y calidad del aceite, reducción del periodo juvenil y del tamaño del árbol para facilitar la recogida, reducción de la vecería, así como el aumento de la resistencia frente a estreses bióticos (patógenos) (Baldoni y Belaj, 2009; Díaz, 2011) y abióticos (salinidad y bajas temperaturas) (Rugini y Gutiérrez-Pesce, 2006).

I.4.1. Mejora convencional

Se han obtenido algunas variedades interesantes mediante programas de selección clonal, como por ejemplo, Maalot, resistente a repilo (Lavee et al., 1999), Askal, con alto contenido en aceite (Lavee et al., 2003), Kadeshon, Sepoka y Masepo, alta producción de aceituna de mesa (Lavee et al., 2004) y las variedades italianas de pequeño porte Arno, Tevere y Basento, obtenidas mediante el cruzamiento de Picholine y Manzanillo, pero con alta producción y rendimiento (Bellini et al., 2002). Por otra parte, en el marco del programa de Mejora Genética del Olivo de Córdoba, se obtuvo la variedad Chiquitita, caracterizada por un alto contenido de aceite y rendimiento graso, así como por un menor vigor, pudiendo ser empleada en plantaciones en seto (Rallo et al., 2008).

I.4.2. Mejora mediante técnicas biotecnológicas

Las técnicas biotecnológicas tienen un papel fundamental en la mejora del olivo como suplemento a los métodos convencionales (Díaz, 2011).

I.4.2.1. Regeneración adventicia

Las células vegetales son totipotentes; tienen la capacidad de dividirse y regenerar una planta completa a partir de una única célula. El proceso de regeneración puede ocurrir mediante las vías organogénica o embriogénica. La primera consiste en la formación de una estructura unipolar; un primordio de brote o de raíz, cuyo tejido vascular está conectado al tejido materno (Thorpe, 1993), mientras que mediante embriogénesis somática (ES) la estructura resultante es un embrión somático, morfológicamente similar a un embrión cigótico (von Arnold, 2008). Ambos procesos pueden ocurrir de forma directa o indirecta; así, en el primer caso tendría lugar directamente a partir del explanto original, mientras que la forma indirecta implicaría una fase de callo.

I.4.2.1.1. Organogénesis

La organogénesis adventicia en olivo se ha llevado a cabo tanto a partir de explantos juveniles (Cañas y Benbadis, 1988) como adultos (Rugini y Caricato, 1995). Los primeros trabajos se centraron en la regeneración de brotes a partir de hipocótilos (Bao et al., 1980) y secciones de cotiledón (Cañas y Benbadis, 1988), mientras que Mencuccini y Rugini (1993), así como Rugini y Caricato (1995) utilizaron peciolos de brotes micropropagados de origen adulto. Estos últimos autores recomiendan, además, esta fase de regeneración adventicia como paso previo a la inducción de embriogénesis somática en material adulto.

1.4.2.1.2. Embriogénesis somática

El sistema de regeneración adventicia más empleado en esta especie es la embriogénesis somática (ES) (Baldoni y Belaj, 2009). Este proceso es dependiente de factores, como genotipo, tipo de explanto y estado ontogenético. En olivo, se ha llevado a cabo la regeneración vía ES tanto en olivo cultivado (Leva et al., 1995; Trabelsi et al., 2003) como silvestre (Orinos y Mitrakos, 1991), empleando como explantos embriones zigóticos inmaduros (Rugini, 1988), radícula de embrión maduro (Mitrakos et al., 1992; Cerezo et al., 2011a), fragmentos de cotiledón (Leva et al., 1995) o raíces de plántulas (Rugini et al., 1995; Shibli et al., 2001). No obstante, también ha sido posible la obtención de cultivos embriogénicos a partir de material adulto, lo que permite establecer líneas celulares con las mismas características genéticas que la planta donante; sin embargo, los explantos procedentes de este tipo de material poseen un menor potencial de regeneración. En esta línea, Rugini y Caricato (1995) y Mazri et al. (2013) obtuvieron cultivos embriogénicos de los cultivares Canino y Moraiolo, y Dahbia, respectivamente; sin embargo, solo Rugini y Caricato (1995) lograron regenerar plantas. Asimismo, también se ha inducido ES en material adulto de olivo silvestre pero la regeneración de plantas no se llevó a cabo (Capelo et al., 2010).

La formulación mineral también influye en este proceso; así, los medios más empleados para la inducción de embriones somáticos son OM (olive medium) (Rugini, 1984) y MS (Murashige y Skoog, 1962), o modificaciones de ambos (Rugini et al., 1995; Mazri et al., 2013). En relación con la fuente de carbono, la sacarosa es la que produce mejores resultados (Rugini, 1988; Brhadda et al., 2008).

Los reguladores de crecimiento juegan un papel fundamental y en especial, las auxinas, siendo necesario un suplemento de este tipo de hormonas en el medio de inducción, así como para el mantenimiento del callo embriogénico, mientras que se requiere una disminución o eliminación de la misma para la diferenciación de embriones somáticos. Sin embargo, en material adulto de olivo cultivado se han obtenido mejores resultados utilizando medios con una baja relación auxina/citoquinina, como en el cv. Dahbia (30 μM TDZ – 0.5 μM ANA) (Mazri et al., 2013) o en los cvs. Canino y Moraiolo (0.50 μM 2iP - 0.44 μM BA - 0.25 μM IBA) (Rugini y Caricato, 1995), contrariamente a lo observado en olivo silvestre, donde una alta relación auxina/citoquinina (12.25 μM IBA – 4.56 μM Zea) fue necesaria para la inducción del proceso (Capelo et al., 2010).

El proceso de maduración es clave para la obtención de un alto porcentaje de conversión de embriones (Benelli et al., 2001); así, en esta fase tiene lugar la acumulación de sustancias de reserva en los embriones, lo que favorece la germinación (Braybrook y Harada, 2008). En olivo, Cerezo et al. (2011a) aconsejan el uso de un precultivo en medio líquido y posterior transferencia de las estructuras globulares obtenidas por filtración a medio de embriogénesis cíclica de olivo (ECO) (Pérez-Barranco et al., 2009) sin reguladores de crecimiento y suplementado con 1 g/L de

carbón activo durante 4 semanas. Posteriormente, los embriones se cultivan sobre una membrana semipermeable de acetato de celulosa en el mismo medio para completar su maduración. En general, en la germinación se han empleado tanto medios basales con baja concentración de sales, MS 1/3-1/4 (Cerezo et al., 2011a) como con alta concentración, MS 1x (Shibli et al., 2001; Brhadda et al., 2003).

I.4.2.2. Variación somaclonal

I.4.2.2.1. Factores que influyen en la generación de variación somaclonal

El cultivo *in vitro* puede inducir alteraciones genéticas en las células, lo que se conoce como “variación somaclonal” (VS) (Larkin y Scowcroft, 1981). Estas alteraciones pueden ser útiles como fuente de variabilidad genética para la mejora vegetal, pero suponen un serio inconveniente cuando se quiere mantener la estabilidad genética, como en el caso de la transformación. El genotipo, nivel de ploidía, tipo de explanto, sistema de regeneración, tiempo y frecuencia de cultivo, así como el medio y condiciones de cultivo pueden influir en su inducción. En general, la regeneración a partir de estructuras preformadas, como yemas caulinares o segmentos nodales, es considerada más estable que los procesos de embriogénesis somática y organogénesis adventicia indirecta, ya que la formación de callo conlleva la desdiferenciación del tejido y división incontrolada de las células (Vázquez, 2001), lo que puede aumentar la ocurrencia de mutaciones. Asimismo, explantos que presentan un grado de diferenciación mayor de las células, como hojas, raíces y tallos, son más susceptibles a las alteraciones. En relación al balance y tipo de reguladores de crecimiento, altas concentraciones de auxinas y citoquininas pueden inducir poliploidía (Swartz, 1991); además, se han relacionado con cambios en los patrones de metilación del ADN, al igual que algunos antibióticos (cefotaxima o kanamicina) (Neelakandan y Wang, 2012). El número de ciclos de cultivo, así como la duración de éstos, también pueden inducir VS, especialmente, en cultivos de células en medio líquido. El factor más influyente podría ser el genotipo; de hecho, genotipos con componentes menos estables como, por ejemplo, elementos móviles, se consideran más propensos a las alteraciones (Lee y Phillips, 1988; Peschke y Phillips, 1992).

I.4.2.2.2. Tipos de variación

Durante el cultivo *in vitro* pueden tener lugar variaciones genéticas y/o epigenéticas, lo que implicaría, en el primer caso, cambios que se transmiten a la descendencia y que podrían ser, transmisibles o no, en el segundo. Las variaciones genéticas incluyen las mutaciones cromosómicas y génicas, sobrecruzamiento somático conocido también como recombinación mitótica, amplificación o reducción de secuencias de ADN y elementos móviles del genoma. Las mutaciones cromosómicas afectan a regiones de los cromosomas y pueden ser debidas a reordenamientos cromosómicos, aneuploidía y poliploidía. Las mutaciones génicas, en cambio, tienen

lugar en un gen, ya sea por sustitución, o por adición o delección de uno o más pares de bases. Los procesos que causan variación epigenética son la metilación y desmetilación del ADN, modificación de proteínas histonas y la presencia de ARN no codificante de pequeño tamaño (Neelakandan y Wang, 2012).

I.4.2.2.3. Métodos de detección

La detección de VS se puede llevar a cabo mediante el uso de marcadores morfológicos que permiten detectar variación en características fenotípicas, así como con marcadores moleculares, tipo SSR y RAPDs. Los SSR se han empleado debido a su alta tasa de mutación en comparación con otras zonas del genoma nuclear. Los polimorfismos generados en estas regiones se producen por cambios en el número de repeticiones; asimismo, se consideran más reproducibles que los marcadores RAPDs. Estos últimos generan patrones de fragmentos de ADN al azar, cuyos polimorfismos son detectados por electroforesis.

I.4.2.2.4. Alteraciones producidas en plantas regeneradas vía embriogénesis somática

En la mayoría de los estudios realizados para la detección de alteraciones en olivo regenerado vía embriogénesis somática, se ha utilizado la caracterización fenotípica; así, Shibli et al. (2001) no detectaron cambios en la morfología de las plantas regeneradas, mientras que Bradaï et al. (2016) observaron un fuerte efecto del genotipo en material de distintas líneas embriogénicas procedentes de semilla y una disminución de la capacidad de regeneración asociada a la edad del cultivo. Asimismo, Leva et al. (2012) observaron 2 fenotipos variantes en plantas somáticas del cultivar Fragivento, denominados BOS y COS; el primero presentaba fenotipo arbustivo y el segundo fuerte dominancia apical. Por otro lado, las plantas regeneradas a partir de embriones somáticos de origen adulto de los cvs. Canino y Moraiolo eran morfológicamente similares a los brotes propagados *in vitro* (Rugini y Caricato, 1995). Con respecto al uso de marcadores moleculares en material adulto, solo Lopes et al. (2009) mediante el estudio de regiones SSR observaron la ausencia de alteraciones en el material embriogénico obtenido con respecto a la planta madre, en un genotipo de olivo cultivado y otro de la especie *O. maderensis*.

I.4.2.2.5. Variación somaclonal como herramienta para la mejora

La VS se ha utilizado como herramienta para la mejora, ya que se ha observado que el cultivo *in vitro* puede generar cambios en el hábito de crecimiento o resistencia a estrés biótico o abiótico, haciendo posible la selección de aquéllos individuos que presentan los caracteres deseados, denominados variantes somaclonales. Los explantos más utilizados para la generación de alteraciones han sido tanto brotes micropropagados como embriones somáticos; así, algunos autores han inducido resistencia frente a

patógenos fúngicos, como *V. dahliae*, mediante la exposición de brotes *in vitro* al filtrado del hongo (Sowik et al., 2001). Estos variantes de fresa mostraron mayor resistencia al patógeno tanto *in vitro* como *ex vitro* (Sowik et al., 2003); asimismo, eran fenotípicamente distintos a la planta original, con peciolo más largos, hojas más grandes y un sistema radicular mejor desarrollado (Sowik et al., 2003). Además, estos mismos autores observaron que esta resistencia era estable y transferible (Sowik et al., 2015). No obstante, las alteraciones producidas durante el cultivo *in vitro* son espontáneas y se producen al azar, por lo que no son reproducibles.

I.4.2.3. Transformación genética en olivo

En olivo, se ha empleado tanto el bombardeo de micropartículas (Pérez-Barranco et al., 2009) como la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Torreblanca et al., 2010); sin embargo, esta última es la más utilizada debido a los inconvenientes que presenta la biobalística, como el alto número de copias y una mayor frecuencia de reordenamiento lo que podría provocar el silenciamiento del transgén. En ambos protocolos se han utilizado como explanto embriones somáticos derivados de radícula.

Los trabajos de transformación, llevados a cabo mediante *A. tumefaciens* en olivo, han ido encaminados a la modificación del hábito de crecimiento así como al incremento de tolerancia a estrés. Rugini et al. (2000) transformaron embriones somáticos del cv. Canino con la cepa de *A. tumefaciens* LBA 4404, portando los genes *rolABC* de *A. rhizogenes*, mostrando las plantas transgénicas el fenotipo típico de raíz en cabellera, junto a un prolongado crecimiento vegetativo y larga fase juvenil. Asimismo, se han evaluado genes implicados en la reducción del periodo juvenil; para ello se transformaron células embriogénicas con el gen *MtaFT1* de *Medicago truncatula* (Haberman et al., 2017), observándose formación de flores *in vitro*; sin embargo, la conversión repetitiva de los meristemos apicales en yemas florales produjo un continuo crecimiento de los brotes laterales, observándose un fenotipo arbustivo de las plantas transformadas en comparación con el control no transgénico (Haberman et al., 2017). Por otro lado, se ha abordado la transformación con genes implicados en la defensa frente a patógenos; en esta línea, Rugini et al. (2000) obtuvieron plantas que sobreexpresaban un gen de tabaco, que codifica para una osmotina, perteneciente a la familia de las proteínas PR5, expresada bajo estrés abiótico, principalmente, sequía, así como bajo estrés biótico.

I.5. Transformación genética como herramienta para conferir resistencia frente a patógenos fúngicos

I.5.1. Transformación con genes que codifican para proteínas antifúngicas

La transformación con genes que codifican para proteínas antifúngicas es una buena herramienta para la obtención de plantas resistentes a estos patógenos; en esta línea, se han llevado a cabo trabajos utilizando genes que codifican enzimas implicadas en la degradación de compuestos de la pared celular de hongos, como quitinasas o glucanasas, tanto aisladas de plantas (Tabaeizadeh et al., 1999) como de hongos (Emani et al., 2003; Mercado et al., 2015). Así, la sobreexpresión de una quitinasa aislada de plantas de arroz (RCG3) en plantas de tomate incrementó la resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Alternaria solani* (Jabeen et al., 2015). Esta aproximación también ha dado buenos resultados frente a *V. dahliae*; de hecho, plantas de tomate (Tabaeizadeh et al., 1999) y fresa (Chalavi et al., 2003) transformadas con una endoquitinasa de *Lycopersicon chilense* (*pcht28*) mostraron resistencia a este patógeno fúngico. Por otro lado, plantas de algodón transformadas con una quitinasa aislada de *Phaseolus vulgaris* presentaron menos síntomas que las plantas control tras la inoculación con *V. dahliae* (Tohidfar et al., 2012), mientras que la transformación con una endoquitinasa de *Trichoderma virens*, incrementó la resistencia frente a *Alternaria alternata* y *Rhizoctonia solani*, pero no a *F. oxysporum*, *Thielaviopsis basicola* y *V. dahliae* (Emani et al., 2003). Más recientemente, Cheng et al. (2017) observaron que una endoquitinasa aislada de la cepa Vd080, VDECH, inhibía la germinación de las esporas del hongo y expresada en plantas de algodón, inducía genes relacionados con las rutas de defensa del ácido salicílico (AS) y del ácido jasmónico/etileno (JA/Et).

Asimismo, se han llevado a cabo transformaciones con genes que codifican para glucanasas; en esta línea, Mercado et al. (2015) observaron que la sobreexpresión constitutiva de una β -1,3-glucanasa (*bgn13.1*), aislada del hongo *Trichoderma harzianum*, inducía tolerancia frente a *Colletotrichum acutatum* en plantas de fresa; asimismo, algunas de las líneas transgénicas también eran tolerantes a *R. necatrix*; sin embargo, las plantas transformadas mostraron alteraciones en el crecimiento y producción. Con respecto a *V. dahliae*, la transformación de plantas de berenjena con una glucanasa aislada de arroz, produjo un retraso en la producción de los síntomas con respecto a las plantas control (Singh et al., 2015).

Otros trabajos han abordado la transformación con genes que codifican para defensinas, como por ejemplo, *Dm-AMPI*, aislado de *Dahlia merckii*, y que expresado en *Solanum melongena* proporcionó resistencia frente a *Botrytis cinerea* (Turrini et al., 2004). Asimismo, la transformación de plantas de patata con una defensina, aislada de *Medicago sativa*, confirió resistencia frente a *V. dahliae* (Gao et al., 2000). Otro péptido con capacidad antimicrobiana es la proteína AFP producida por el hongo *Aspergillus giganteus*; esta proteína desestabiliza la membrana plasmática de otros hongos e inhibe la biosíntesis de quitina (Leiter et al., 2017). Su expresión en distintas especies

vegetales, como arroz (Coca et al., 2004; Moreno et al., 2005), trigo (Li et al., 2008; Oldach et al., 2001) y mijo (Girgi et al., 2006), incrementó la resistencia frente a un amplio rango de patógenos fúngicos.

I.5.2. Transformación con genes reguladores de las respuestas de defensa

El gen *AtNPR1* está implicado en la respuesta de defensa SAR (Systemic Acquired Resistance), así como en el cruce de señales de las rutas del AS y JA/Et en plantas. Este gen confiere resistencia frente a un amplio espectro de patógenos tanto fúngicos como bacterianos; así, la sobreexpresión en tomate (Lin et al., 2004) y trigo (Makandar et al., 2006) ha conferido resistencia frente a *Fusarium* sp., y en algodón a *Thielaviopsis basicola* (Kumar et al., 2013). Por otra parte, la expresión ectópica de ortólogos del *AtNPR1*, como en el caso de plantas de arroz transformadas con el *NPR1* de *Brassica juncea* (Sadumpati et al., 2013) proporcionó resistencia a *Magnaphorte grisea*, *Rhizoctonia solani* y *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. En relación con el patógeno fúngico *V. dahliae*, Parkhi et al. (2010a) observaron que plantas de algodón transformadas con el gen *AtNPR1* eran resistentes a cepas ND, pero no a las D (Parkhi et al., 2010b).

I.5.3. Transformación con genes que codifican para proteínas de resistencia

Las proteínas R (Leister et al., 1996) son receptores específicos de las células vegetales; estas proteínas detectan los factores de avirulencia (Avr) producidos por los patógenos generando la inmunidad inducida por efectores (ETI) (Jones y Dangl, 2006). La mayoría de las proteínas de resistencia son raza-específica, por lo que reconocen los genes de avirulencia de determinadas razas de patógenos. La ausencia de estos genes en la planta conlleva una interacción susceptible planta-patógeno, por lo que el patógeno es capaz de colonizarla y producir la enfermedad.

Estas proteínas se dividen en varios grupos, siendo uno de los más amplios, los receptores extracelulares ricos en repeticiones de leucina (eLRR-RLP), al que pertenecen las proteínas Cf que confieren resistencia en tomate a *Cladosporium fulvum* (Jones et al., 1994; Stergiopoulos et al., 2010) y sus homólogos en manzano (*Malus domestica*), HcrVf (Vinatzer et al., 2001; Belfanti et al., 2004), las proteínas LeEIX de tomate que reconocen al efector liberado por el hongo *Trichoderma* (Ron y Avni, 2004) y las proteínas AtRLP52 (Ramonell et al., 2005) y AtRLP30 (Wang et al., 2008) de Arabidopsis, que median la resistencia frente a *Erysiphe cichoracearum* y *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, respectivamente. También pertenece a este grupo, el gen *Ve1* de tomate; la proteína confiere resistencia frente a la raza 1 de *V. dahliae* y *V. albo-atrum*, pero no frente a la raza 2 (Fradin et al., 2009). El reconocimiento del gen de avirulencia *Ave1*, producido por las cepas ND de *V. dahliae* pertenecientes a la raza 1 (de Jonge et al., 2012), desencadena la respuesta de defensa en la planta mediada por este gen. Así, plantas de Arabidopsis transformadas con el *Ve1* de tomate mostraron un

incremento en la resistencia frente a la raza 1 de *V. dahliae* y *V. albo-atrum* (Fradin et al., 2011). Por su parte, Song et al. (2017) observaron que plantas de *N. tabacum* y algodón transformadas con este gen, eran resistentes a las cepas de *V. dahliae* que contenían el gen de avirulencia o a las que se les había insertado, mientras que eran susceptibles a las que carecían del mismo, de manera que, la resistencia mediada por el gen *Ve1* en algodón frente a este patógeno fúngico era dependiente del factor de avirulencia *Ave1*.

Objetivos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

OBJETIVOS

El objetivo global de esta tesis es el desarrollo de herramientas biotecnológicas para la obtención de olivos con mayor resistencia a patógenos fúngicos, en particular, al hongo hemibiotrofo *Verticillium dahliae*, agente causal de la Verticilosis y principal amenaza en las nuevas plantaciones. Paralelamente, también se ha evaluado la respuesta del material transformado a un patógeno emergente, el hongo necrotrofo *Rosellinia necatrix*, que causa la podredumbre blanca radicular.

Este objetivo global se ha dividido en los siguientes objetivos parciales:

1. Establecimiento de un protocolo de regeneración vía embriogénesis somática para material adulto de acebuche con distinta tolerancia a Verticilosis.
2. Evaluación de la tolerancia a *V. dahliae* y *R. necatrix* en plantas transgénicas de olivo que expresan el gen *afp* de *Aspergillus giganteus*.
3. Obtención y caracterización de líneas embriogénicas de olivo que expresan el gen *AtNPR1* de *Arabidopsis thaliana*.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Capítulo II. Embriogénesis somática en material adulto de olivo silvestre



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

II.1. RESUMEN

Se ha llevado a cabo la regeneración de plantas vía embriogénesis somática a partir de material adulto de un genotipo de olivo silvestre, StopVert, resistente a Verticilosis. Para la inducción de callo embriogénico, se emplearon metodologías previamente utilizadas tanto en olivo cultivado, empleando una alta relación citoquinina/auxina, como en silvestre, utilizando una baja relación citoquinina/auxina; sin embargo, solo se obtuvieron cultivos embriogénicos con el primer protocolo. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la importancia del genotipo, tipo de explanto, formulación mineral y balance hormonal en la inducción del proceso; así, el empleo de yema caulinar procedente de brotes axilares multiplicados *in vitro* y siguiendo la metodología de Mazri et al. (2013) (4 días de cultivo en medio líquido MS ½, 30 µM TDZ – 0.54 µM ANA, 8 semanas en medio basal MS ½ y posteriores subcultivos en medio ECO, 0.5 µM 2iP – 0.44 µM BA – 0.25 µM IBA) resultó ser adecuada para la obtención de embriones somáticos en dos de los genotipos utilizados, StopVert y Ac-18. Sin embargo, no se obtuvo respuesta embriogénica en los otros 3 genotipos testados. Se realizó un análisis de estabilidad genética en callo embriogénico, plantas regeneradas a partir de esos callos y brotes micropropagados del genotipo StopVert, mediante marcadores moleculares RAPDs y SSR. Solo se observó polimorfismo, con respecto a la planta donante, en el patrón de bandas generado por RAPDs con uno de los oligonucleótidos utilizados en una de las 10 muestras de callo analizadas, lo que supone una tasa de variación del 0.07%. Esta es la primera vez que se han obtenido embriones somáticos y regenerado plantas, a partir de ápice caulinar de origen adulto, en olivo silvestre.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

II.2. INTRODUCCIÓN

El olivo es una especie difícil de manipular *in vitro*; sin embargo, hoy día es posible la micropropagación de muchos cultivares de interés, a partir de yemas axilares (Rugini, 1984; Roussos y Pontikis, 2002; Santos et al., 2003; Zacchini y De Agazio, 2004). Asimismo, se han regenerado brotes de olivo mediante organogénesis adventicia a partir de explantos juveniles (Cañas y Benbadis, 1988) y adultos (Rugini y Caricato, 1995). Sin embargo, el método más ampliamente utilizado para la regeneración adventicia de olivo es la embriogénesis somática (ES). Este proceso se ha llevado a cabo tanto en olivo cultivado (Rugini, 1988; Mitrakos et al., 1992; Leva et al., 1995; Trabelsi et al., 2003) como silvestre (Orinos y Mitrakos, 1991), empleando explantos derivados de embriones zigóticos inmaduros (Rugini 1988; Rugini y Baldoni, 2005) o radícula de embrión maduro (Mitrakos et al., 1992; Cerezo et al., 2011a), así como fragmentos de cotiledón (Leva et al., 1995) o raíces de plántulas (Rugini et al., 1995; Shibli et al., 2001).

Se han utilizado diferentes formulaciones minerales para inducir el proceso de embriogénesis somática en explantos juveniles; así, mientras que para embriones inmaduros MS ½ era la adecuada (Rugini, 1988), para raíces de plántulas se utilizó MS 1x (Rugini, 1995; Shibli et al., 2001). En radícula de embrión maduro, tanto de olivo cultivado (Mitrakos et al., 1992) como silvestre (Orinos y Mitrakos, 1991), se recomienda el uso de la formulación OMc que contiene los microelementos OM (Rugini, 1984) y los macroelementos BN (Bourgin y Nitsch, 1967) con un suplemento de caseína hidrolizada. Cerezo et al. (2011a) también han utilizado esta formulación para inducir callo embriogénico, pero el proceso de proliferación mejoraba al utilizar la formulación ECO (¼ de los macroelementos OM, ¼ microelementos MS, ½ de las vitaminas OM y un suplemento de glutamina (550 mg/L)). En relación con los requerimientos hormonales, en general, se requiere un medio con una alta relación auxina/citoquinina para la fase de inducción y la posterior transferencia a medio sin auxina (Leva et al., 1995; Trabelsi et al., 2003) o con baja concentración de la misma (Orinos y Mitrakos, 1991; Mitrakos et al., 1992) para el desarrollo de los embriones.

Para mejorar el proceso de maduración de embriones, Cerezo et al. (2011a) han puesto de manifiesto la conveniencia de hacer un precultivo en medio líquido y posterior pase a través de una malla (3 x 3 mm) para seleccionar las estructuras de menor tamaño. Estas estructuras globulares se cultivan posteriormente sobre membrana semipermeable de acetato de celulosa para favorecer la maduración de los embriones. En general, el proceso de conversión en plantas se ha obtenido tanto en medio basal con baja concentración de sales, MS 1/3-1/4 (Rugini, 1995; Rugini et al., 1995; Cerezo et al., 2011a) como con alta concentración, MS 1x (Shibli et al., 2001; Bhradda et al., 2003). Algunos autores también recomiendan la incorporación de bajas concentraciones de citoquinina (Rugini, 1988; Rugini et al., 1995; Trabelsi et al., 2003).

La metodología desarrollada con el material juvenil ha servido de base para la inducción de embriogénesis somática en explantos de origen adulto, lo que permite establecer

líneas celulares con las mismas características genéticas que la planta donante. Rugini y Caricato (1995) obtuvieron cultivos embriogénicos y regeneraron plantas de los cultivares Canino y Moraiolo. Más tarde, Mazri et al. (2013) indujeron ES a partir de hojas procedentes de brotes micropropagados del cultivar marroquí Dahbia; sin embargo, no lograron regenerar plantas. Por otro lado, Capelo et al. (2010) obtuvieron líneas embriogénicas, utilizando hojas y peciolo de olivo silvestre, pero la recuperación de plantas no fue posible.

Durante el cultivo *in vitro* es posible la ocurrencia de alteraciones en los tejidos, lo que se conoce como “variación somaclonal” (VS) (Larkin y Scowcroft, 1981). Esta variación puede ser debida a que el cultivo *in vitro* actúa como un sistema mutagénico, ya que las células están expuestas a estrés e incluso pueden ser reprogramadas (Jain, 2001). Además, se producen divisiones mitóticas de manera incontrolada, generándose variaciones al azar (Karp, 1994). Los mecanismos por los que se genera VS son poco conocidos; no obstante, varios factores afectan a este fenómeno, como el genotipo, nivel de ploidía, tipo de explanto, sistema de regeneración, tiempo y frecuencia de cultivo, así como el medio y las condiciones de cultivo.

En general, se ha observado mayor estabilidad genética en la regeneración a partir de estructuras preformadas, como yemas caulinares o segmentos nodales, mientras que la formación de embriones somáticos y órganos adventicios de manera indirecta, son consideradas técnicas menos estables (Skirvin, 1978; Scowcroft, 1984). Esto es debido a que, en el primer caso, las células siguen un patrón de división normal, mientras que durante una fase de formación de callo tiene lugar la desdiferenciación del tejido y divisiones celulares incontroladas (Vázquez, 2001), lo que puede incrementar la ocurrencia de mutaciones (Zayova et al., 2010). En cualquier caso, el uso de tejidos meristemáticos en la morfogénesis adventicia reduce la posibilidad de variación (Sahijram et al., 2003), mientras que hojas, raíces y tallos, pueden generar más alteraciones debido al elevado grado de diferenciación de las células (Sharma et al., 2007).

El balance y tipo de reguladores de crecimiento empleados también pueden generar VS (D’Amato, 1985). Así, se ha observado que altas concentraciones de auxinas y citoquininas pueden inducir poliploidía (Swartz, 1991). Por otra parte, tanto las auxinas como las citoquininas se han relacionado también con cambios en los patrones de metilación del ADN, concretamente con la hipermetilación en el caso de las auxinas (Neelakandan y Wang, 2012) y la hipometilación con las citoquininas (Arnhold-Schmitt, 1993). Entre las auxinas más usadas, el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y el ANA (ácido naftalenacético) son consideradas altamente mutagénicas. De hecho, Sales y Butardo (2014) observaron que la adición de 2,4-D al medio producía metilación del ADN en cultivares de banana. Algunas citoquininas, a elevadas concentraciones, como por ejemplo, BAP (6-bencilaminopurina), también han causado incrementos en el número de cromosomas, como observaron Giménez et al. (2001) en el cultivar de banana Williams. No obstante, otros componentes del medio, como la fuente de nitrógeno y algunos antibióticos como la cefotaxima o kanamicina, muy empleados en el cultivo de células embriogénicas y en la selección de células transgénicas,

respectivamente, pueden causar alteraciones genéticas, particularmente, cambios en los patrones de metilación (Neelakandan y Wang, 2012).

Factores externos como la luz y temperatura pueden también influir en el ciclo celular de las plantas *in vivo*; por tanto, el control de estos factores es fundamental para lograr un adecuado ciclo celular *in vitro*, así como para disminuir la posibilidad de que ocurran alteraciones (Karp, 1994; Nwazoma y Jaja, 2013).

Por otro lado, tanto la duración como el número de ciclos de cultivo contribuyen a la aparición de VS, especialmente en cultivos de células en medio líquido, debido a la rápida multiplicación o proliferación del tejido (Bairu et al., 2006). Por consiguiente, cuanto mayor es el tiempo de cultivo, mayor puede ser la variación generada (Jevremovic et al., 2012; Sun et al., 2013b).

El genotipo, posiblemente, sea el factor más influyente en la producción de variación (Tican et al., 2008; Nwazoma y Jaja, 2013). De hecho, siendo las condiciones de cultivo *in vitro* altamente estresantes para las células, genomas distintos pueden responder de forma diferente, ya que puede existir en el genoma de esas células ciertos componentes menos estables como, por ejemplo, elementos móviles (Lee et al., 1988; Peschke y Philips, 1992). Asimismo, se ha observado que individuos poliploides pueden tolerar las alteraciones cromosómicas mejor que diploides o haploides, mientras que las mutaciones génicas se expresan mejor en haploides y diploides (Brar y Jain, 1998).

Mucha de la variabilidad que presentan los tejidos o plantas cultivadas *in vitro* también se ha relacionado con el estrés oxidativo producido durante dicho proceso (Cassells y Curry, 2001; Tanurdzic et al., 2008; Nivas y Dsouza, 2014). De hecho, las especies reactivas de oxígeno (ROS) podrían estar implicadas en la hiper e hipometilación del ADN (Wachsman, 1997) y en los cambios en el número y estructura de los cromosomas (Czene y Harms-Ringdahl, 1995).

Las variaciones producidas durante el cultivo *in vitro* pueden ser tanto genéticas, lo que implicaría cambios que serían genéticamente transmitidos, como epigenéticas, los cuales pueden ser, o no, transmisibles. Los procesos implicados en la VS y que estarían relacionados con cambios genéticos transmisibles son las mutaciones cromosómicas y génicas, el sobrecruzamiento somático también conocido como recombinación mitótica, la amplificación o reducción de secuencias de ADN y los elementos móviles del genoma. Los procesos que causan variación epigenética y que por tanto, producen cambios en la expresión génica pero no en las secuencias génicas son la metilación y desmetilación del ADN, modificación de proteínas histonas y la presencia de ARN no codificante de pequeño tamaño (Neelakandan y Wang, 2012). Así, López et al. (2010) observaron un aumento de metilación con la edad del cultivo, mientras que otros autores han mencionado además, la pérdida de potencial de regeneración de células altamente mutadas en cultivos de avanzada edad. Los cambios epigenéticos pueden, en muchos casos, ser temporales recuperando las plantas su fenotipo normal; sin embargo, a veces, pueden perdurar y ser heredados por la descendencia (Brettell y Dennis, 1991).

La estabilidad genética debe ser asegurada lo antes posible, existiendo distintos marcadores para la detección de variaciones en los tejidos cultivados. Los marcadores morfológicos son muy útiles para detectar variación de características fenotípicas como la altura de la planta, morfología de la hoja, forma y color del fruto, etc. (Israeli et al., 1991). Así, para la identificación de variaciones en plantas de olivo cultivado regeneradas vía embriogénesis somática, Leva et al. (2012) analizaron parámetros vegetativos y caracteres de los frutos e inflorescencias, perteneciendo al primer grupo la longitud de los brotes vegetativos, número de nudos y longitud de entrenudos, y al segundo, el tamaño del fruto, así como el peso fresco y seco del mismo. Las técnicas de conteo de cromosomas y la citometría de flujo se emplean como marcadores citogenéticos y permiten detectar cambios en el nivel de ploidía o alteraciones en el número de cromosomas (Leal et al., 2006; Orbović et al., 2008). A pesar de todas las técnicas disponibles, los marcadores moleculares, fundamentalmente Simple Sequence Repeat (SSR) y Random Amplified Polymorphic DNA (RAPDs), son comúnmente utilizados en la detección de VS.

Los marcadores SSR han sido muy empleados debido a su alta tasa de mutación en comparación con otras zonas del genoma nuclear. Estos marcadores consisten en repeticiones cortas en tándem de 1 a 6 nucleótidos de longitud (Hajeer et al., 2000), son altamente variables y están ampliamente distribuidos por el genoma, generalmente en las zonas del centrómero y telómero de los cromosomas. Los polimorfismos generados en estas regiones se producen por cambios en el número de repeticiones, ya sea por ganancia o por pérdida y se asocian a fallos durante la replicación en lugar de a mutaciones en un nucleótido o a eventos de inserción o delección, los cuales son detectados principalmente por las técnicas Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) y RAPD (Powell et al., 1996). Son co-dominantes, lo que les permite la detección de un alto número de alelos por locus, pudiendo distinguir entre individuos homocigóticos y heterocigóticos. Además, se consideran más reproducibles que los marcadores RAPDs por el uso de secuencias de oligonucleótidos más largas (Vicente y Fulton, 2003). Fundamentalmente, se han empleado en estudios de identificación de cultivares (Doveri et al., 2008) y de diversidad genética (Omrani-Sabbaghi et al., 2007).

En el análisis por marcadores RAPDs se emplean oligonucleótidos de 10 pb y bajas temperaturas de hibridación, generando patrones de fragmentos de ADN al azar, cuyos polimorfismos son detectados por electroforesis. Esta técnica es considerada poco reproducible entre laboratorios. Sin embargo, se ha empleado extensamente debido a su bajo coste y a que no requiere ADN de buena calidad ni conocimiento previo de las secuencias de ADN. En olivo cultivado, autores como García-Férriz et al. (2002) y Leva et al. (2012) la han utilizado para la detección de variación en plantas micropropagadas. Asimismo, estos últimos autores también utilizaron esta técnica para la detección de alteraciones en plantas regeneradas vía ES.

Los objetivos del presente trabajo fueron el establecimiento de protocolos de regeneración vía ES a partir de material adulto de genotipos de olivo silvestre con distinta respuesta a Verticilosis, así como el estudio de la estabilidad genética del material obtenido mediante marcadores moleculares SSR y RAPDs.

II.3. MATERIALES Y MÉTODOS

II.3.1. Material vegetal utilizado en la inducción de embriogénesis somática

Se establecieron stocks de proliferación mediante brotes axilares de 5 genotipos de olivo silvestre: Ac-18, OutVert, Ac-4, StopVert y Ac-15, cedidos por el Dr. Rafael Jiménez-Díaz, Dpto. de Agronomía, (ETSIAM), UCO/IAS (CSIC) (Figura II.1). Los cuatro primeros son resistentes a *Verticillium dahliae*, mientras que Ac-15 muestra susceptibilidad al hongo. Los distintos genotipos se mantenían *in vitro* en medio RP modificado (Vidoy-Mercado et al., 2012) que contiene macronutrientes y micronutrientes DKW (Driver y Kuniyuki, 1984) modificados por Roussos y Pontikis (2002), vitaminas RP (Roussos y Pontikis, 2002) y un suplemento de 2 mg/L de ribósido de zeatina. Los subcultivos se realizaron a intervalos de 6-8 semanas, utilizando segmentos con 2 nudos como propágulo.

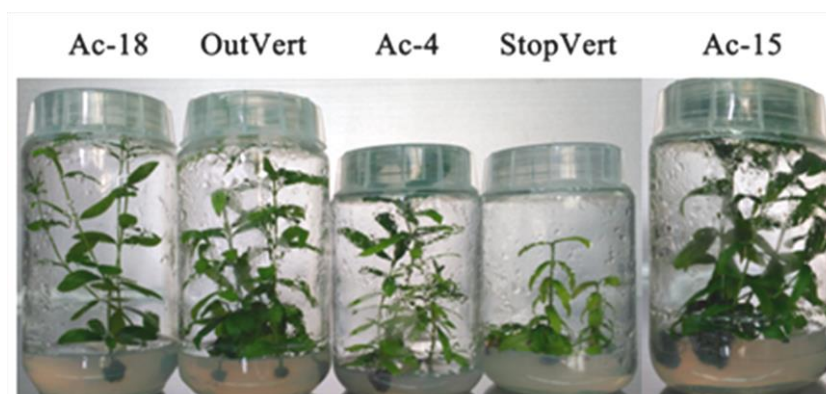


Figura II.1. Aspecto de los genotipos de acebuche: Ac-18, OutVert, Ac-4, StopVert (resistentes a *V. dahliae*) y Ac-15 (susceptible) a las 8 semanas de cultivo en el medio de multiplicación de olivo RP modificado (Vidoy-Mercado et al., 2012).

Para la inducción de ES se emplearon distintos tipos de explanto: 1) ápice caulinar, que incluía el primer par de primordios foliares con un tamaño de 2 mm, 2) parte basal y distal de las hojas del primer nudo, con un tamaño aproximado de 3-4 mm, 3) parte basal y distal del segundo par de hojas, con un tamaño aproximado de 4-5 mm y 4) peciolo del segundo par de hojas, con un tamaño aproximado de 1 mm. Las hojas se cultivaron con la cara adaxial hacia arriba.

II.3.2. Inducción de embriogénesis somática

Para la inducción de los cultivos embriogénicos se siguieron los protocolos de Capelo et al. (2010) y Mazri et al. (2013), así como una modificación de este último protocolo.

II.3.2.1. Protocolo de Capelo et al. (2010)

Para evaluar el protocolo de Capelo et al. (2010) en la inducción de ES en olivo silvestre, se utilizaron 2 genotipos, Ac-18 y Ac-15, y los tipos de explanto citados en el apartado II.3.1. Se emplearon 20 ápices caulinares, 40 partes basales y distales de las hojas del primer nudo, 40 partes basales y distales de las hojas del segundo nudo, y 40 peciolo, para cada uno de los genotipos utilizados. Los explantos se aislaron de brotes axilares tras 5 semanas en el medio de multiplicación de olivo RP (Vidoy-Mercado et al., 2012) y se cultivaron de acuerdo con la metodología de Capelo et al. (2010) en medio de inducción MS 12.25 μ M IBA - 4.56 μ M zeatina (Zea), solidificado con 6 g/L de agar, durante 3 meses con subcultivos a intervalos de 4 semanas en medio fresco (Figura II.2). Después, se transfirieron a medio basal MS sin reguladores de crecimiento durante 12 semanas, con subcultivos cada 4 semanas, tal y como recomienda Capelo et al. (2010). Las porciones de callo que mostraron aspecto embriogénico se cultivaron en medio de embriogénesis cíclica de olivo ECO conteniendo 0.25 μ M IBA, 0.5 μ M 2iP y 0.44 μ M BA (Pérez-Barranco et al., 2009), suplementado con 200 mg/L de cefotaxima, durante 3 subcultivos de 4 semanas cada uno. Los cultivos se incubaron a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y en oscuridad.

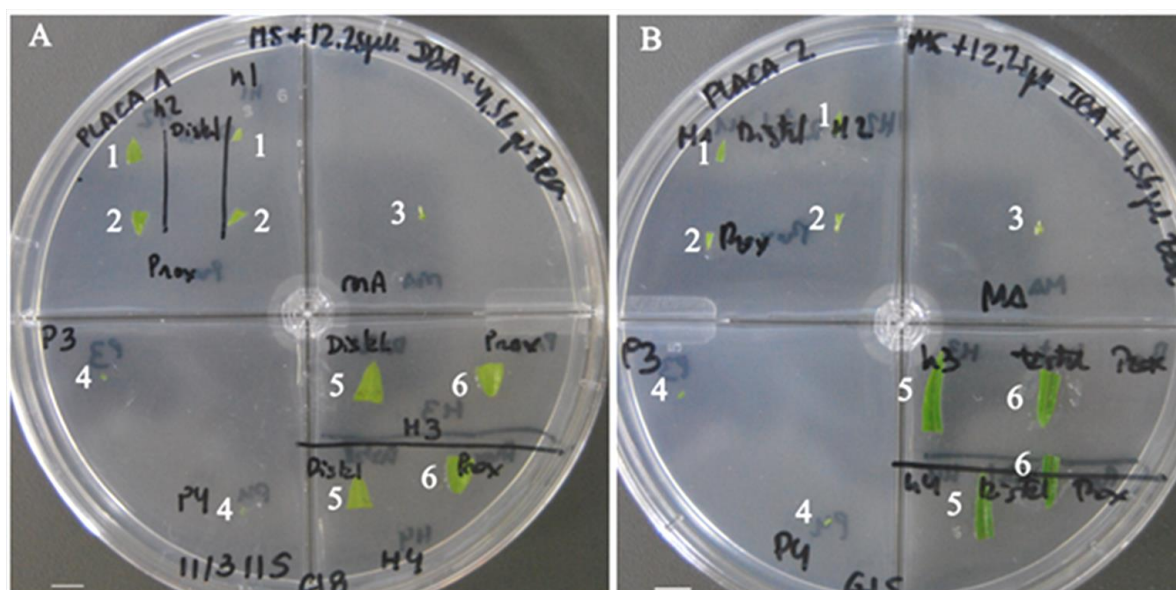


Figura II.2. Explantos aislados y cultivados en el medio de inducción MS 12.25 μ M IBA - 4.56 μ M Zea de los genotipos de olivo silvestre: A) Ac-18 y B) Ac-15. Explantos: 1 y 2) Parte distal y basal, respectivamente, de las hojas del primer nudo, 3) Ápice caulinar, 4) Peciolo, 5 y 6) Parte distal y basal, respectivamente, de las hojas del segundo nudo. Barra: 5 mm.

II.3.2.2. Protocolo de Mazri et al. (2013)

La evaluación de este protocolo se llevó a cabo mediante dos experimentos. En el primero, se emplearon además de los 2 genotipos anteriores (Ac-18 y Ac-15), otros 3 adicionales, StopVert, OutVert y Ac-4, mientras que en el segundo sólo se utilizó el genotipo

Ac-18. Se utilizaron como explantos, ápices caulinares y peciolo del segundo par de hojas, tal y como se ha indicado en el experimento anterior; además, y de acuerdo a la metodología de Mazri et al. (2013), se cultivaron las hojas completas del primer nudo y solamente la parte basal de las hojas del segundo par (Figura II.3). Los explantos se cultivaron en 5 ml de medio líquido MS ½, vitaminas MS, 0.1 g/L mioinositol, 30 g/L sacarosa y un suplemento con 30 µM TDZ y 0.54 µM ANA, en placas septadas, durante 4 días, a 80 rpm. Posteriormente, se cultivaron en el mismo medio sin reguladores de crecimiento y solidificado con 6 g/L de agar, durante 8 semanas, recultivando al mes en medio fresco. Finalmente, el callo formado se aisló y cultivó en el medio de embriogénesis cíclica ECO conteniendo 0.25 µM IBA, 0.5 µM 2iP - 0.44 µM BA (Pérez-Barranco et al., 2009), suplementado con 200 mg/L de cefotaxima durante varios subcultivos. Los cultivos se incubaron a 25±2°C y en oscuridad.

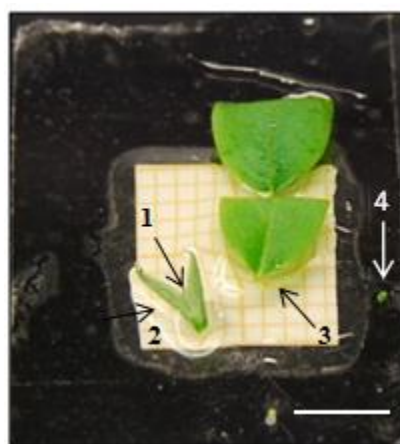


Figura II.3. Explantos del genotipo Ac-18 empleados en la inducción de ES: 1) Meristemo apical con el primer par de primordios foliares (2 mm). 2) Hojas del primer nudo sin peciolo (4 mm). 3) Parte basal de las hojas del segundo nudo (5 mm). 4) Peciolo de las hojas del segundo nudo (1 mm). Barra: 5 mm.

A las 8 semanas de cultivo en el medio basal MS ½ se caracterizó el callo formado en términos de superficie de explanto cubierta por callo mediante el uso de una escala visual (0-3; 0 = ausencia de callo, 1 = entre 1-40% de la superficie del explanto cubierta de callo, 2 = entre 40-80% y 3 = > 80%), color y compacidad.

II.3.2.3. Protocolo de Mazri et al. (2013) modificado

En este experimento, se utilizaron los mismos 5 genotipos y explantos indicados en el apartado anterior (II.3.2.2). La modificación con respecto al procedimiento descrito por Mazri et al. (2013) consistió en la incubación de los explantos en el medio de inducción de Mazri et al. (2013) solidificado con 6 g/L de agar durante 8 semanas, en lugar de los 4 días de incubación en medio líquido del protocolo original. Posteriormente, el callo obtenido se transfirió a medio ECO con suplemento hormonal (Pérez-Barranco et al., 2009) en lugar de a medio sin hormonas. Los explantos se cultivaron en ese medio durante 3 subcultivos de 4 semanas cada uno. Los cultivos se incubaron a 25±2°C y en oscuridad.

II.3.3. Multiplicación del callo embriogénico del genotipo StopVert

El callo embriogénico obtenido a partir de yemas apicales del genotipo StopVert siguiendo el protocolo de Mazri et al. (2013), se multiplicó en medio ECO conteniendo 0.25 μM IBA, 0.5 μM 2iP, 0.44 μM BA (Pérez-Barranco et al., 2009), suplementado con 200 mg/L de cefotaxima y se evaluó la capacidad de multiplicación en medio líquido y sólido. Para ello, se cultivaron 0.5 g de fracción fina de callo, con un tamaño menor de 3 mm, en matraces conteniendo 25 ml del medio líquido ECO, y en placas con 20 ml del mismo medio sólido. Se tomaron datos del peso del callo durante 4 subcultivos, a intervalos de 4 semanas, y se calculó el incremento de peso por placa.

II.3.4. Maduración de embriones somáticos

Los embriones globulares con un tamaño entre 1-3 mm se maduraron de acuerdo al protocolo de Cerezo et al. (2011a), cultivándolos durante 1 mes en medio basal de maduración ECO suplementado con 1 g/L de carbón activo y posteriormente, durante 1 mes adicional en el mismo medio sobre una membrana semipermeable de acetato de celulosa.

II.3.5. Germinación de embriones

Los embriones maduros blanco-opacos obtenidos se germinaron en el medio que contiene 1/3 de los macronutrientes del medio MS y 10 g/L de sacarosa (Clavero-Ramírez y Pliego-Alfaro, 1990) para la obtención de brotes durante 12 semanas. Los brotes desarrollados se aislaron y se cultivaron según se describe en Vidoy-Mercado et al. (2012), de manera independiente e identificando aquéllos que procedían de un mismo embrión.

II.3.6. Análisis de la estabilidad genética

II.3.6.1. Material vegetal

Para el análisis de estabilidad genética se utilizó el callo embriogénico obtenido del genotipo StopVert, así como plantas regeneradas a partir de embriones somáticos derivados de este callo. Como controles se utilizaron tanto material de la planta madre como brotes mantenidos *in vitro* mediante proliferación de axilares. El material utilizado así como el tiempo que se mantuvo en cultivo *in vitro* se recoge en la Tabla II.1.

Tabla II.1. Material seleccionado del genotipo StopVert para el análisis de estabilidad genética. Procedencia del material seleccionado, tiempo de cultivo (meses) y número de muestras analizadas por marcadores SSR.

Material	Procedencia	Tiempo de cultivo (meses)	Nº de muestras analizadas
Planta madre	Procedente de esqueje	-	1
Plantas <i>in vitro</i>	Micropropagadas a partir de yemas axilares	36 meses	10
Callo embriogénico	Obtenido a partir de yema apical de brote <i>in vitro</i>	20 meses	10
Plantas <i>in vitro</i>	Regeneradas a partir de embriones somáticos	20 meses en fase de callo + 3 meses en medio de proliferación de brotes	10

Se recogieron hojas jóvenes de la planta madre procedente de esqueje y mantenida en el invernadero (Figura II.4). La superficie de las hojas se desinfectó con un algodón empapado en etanol al 70%, se cortaron en pequeños trozos y se pesaron alrededor de 0.04-0.06 g por réplica. Finalmente, se congelaron 4 réplicas a -80°C hasta el momento de la extracción de ADN genómico.



Figura II.4. A) Planta de StopVert en el invernadero. B) Aspecto de las ramas. C) Aspecto de las hojas empleadas para la extracción de ADN genómico.

Los brotes micropropagados procedían de material iniciado a partir de secciones nodales con yema lateral según el protocolo de Vidoy-Mercado et al. (2012), los cuales se mantuvieron en el medio de proliferación RP (Vidoy-Mercado et al., 2012) durante 36 meses (Tabla II.1), cultivando segmentos de dos nudos con un tamaño entre 1.5-2 cm y con subcultivos a intervalos de 6-8 semanas (Figura II.5). Para la extracción de ADN genómico se cortaron unas 3-4 hojas de 10 brotes axilares de forma independiente, pesando alrededor de 0.04-0.06 g de hojas por brote y manteniéndolos a -80°C hasta el momento de la extracción.

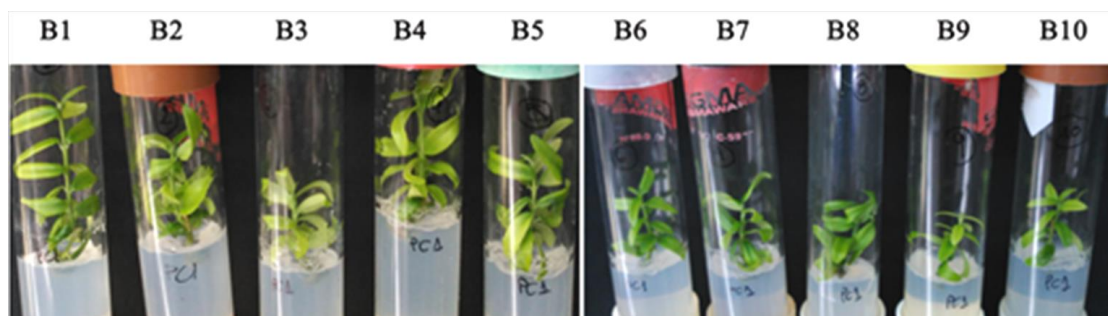


Figura II.5. Aspecto de los brotes micropropagados del genotipo StopVert empleados en la extracción de ADN genómico.

El callo embriogénico obtenido a partir de ápice caulinar del genotipo StopVert se cultivó durante aproximadamente 20 meses en medio de embriogénesis cíclica de olivo ECO conteniendo $0.25 \mu\text{M}$ IBA, $0.5 \mu\text{M}$ 2iP - $0.44 \mu\text{M}$ BA (Pérez-Barranco et al., 2009)

suplementado con cefotaxima (200 mg/L), con subcultivos cada 4-5 semanas (Figura II.6). Se congelaron 10 porciones (0.04-0.06 g) de 10 callos procedentes de distintos tubos a -80°C.



Figura II.6. Aspecto de uno de los callos embriogénicos del genotipo StopVert utilizados en la extracción de ADN genómico.

Los brotes procedentes de los embriones somáticos germinados se multiplicaron en medio RP (Vidoy-Mercado et al., 2012) con subcultivos cada 6 semanas (Figura II.7). Transcurridos 3 meses, este material se utilizó para la extracción de ADN genómico. Se emplearon hojas (0.04-0.06 g) de 10 brotes axilares procedentes de 10 embriones distintos y se congelaron a -80°C.

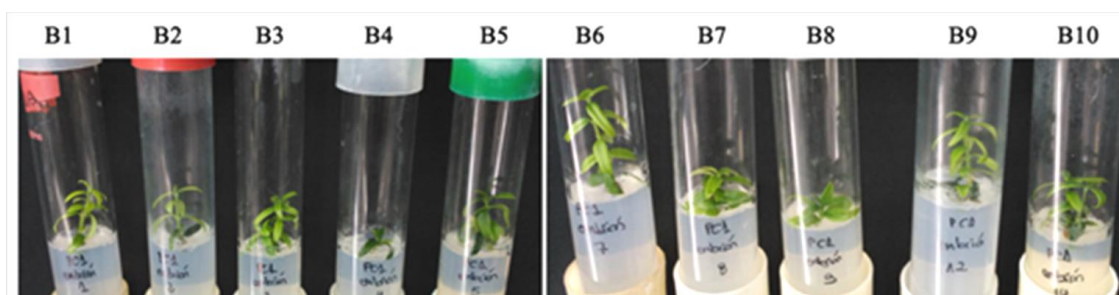


Figura II.7. Brotes axilares en proliferación procedentes de las plantas regeneradas a partir de distintos embriones somáticos del genotipo StopVert.

II.3.6.2. Extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN genómico de las muestras, el método empleado fue el de Gawel y Jarret (1991) ligeramente modificado. El material congelado se introdujo en nitrógeno líquido y se pulverizó con un dispositivo manual (TissyeLyser II, Qiagen) empleando una frecuencia de 30 segundos para cada placa. Inmediatamente, se añadieron 700 µl de tampón de extracción (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) al 2% (w/v), 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 3.8 g/L bisulfito de sodio, PVP 1%, 0.2% de β-mercaptoetanol) precalentado a 65°C. Los tubos se agitaron en un vórtex y se mantuvieron en incubación a esa misma temperatura en un baño durante 1 hora realizando inversiones cada 10 minutos aproximadamente. Posteriormente, se añadieron 600 µl de

cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, v/v) y se mezclaron las muestras por inversión durante 5 minutos. A continuación, se centrifugaron y el sobrenadante se transfirió a un eppendorf nuevo. A 500 µl del sobrenadante recuperado se le añadieron 500 µl de isopropanol frío y los eppendorf se mantuvieron a -20°C durante 2h. Después, se mezclaron las muestras por inversión y se centrifugaron de nuevo para precipitar el ADN. Se eliminó el isopropanol, se añadieron 300 µl de etanol al 70% a temperatura ambiente para lavar el precipitado de ADN y se volvieron a centrifugar los tubos. Nuevamente, se repitió el lavado con etanol y se dejó secar el pellet durante toda la noche. Finalmente, se resuspendieron los pellets en 100 µl de agua milliQ estéril y se llevó a cabo el tratamiento con RNasa añadiéndole a cada tubo 1 µl de RNasa (10 µg/ml) e incubándolos a 37°C durante 2h. Todas las centrifugaciones se realizaron a 12000 rpm durante 5 minutos y a temperatura ambiente.

La integridad y la concentración del ADN extraído se comprobó tras separar las muestras en un gel de agarosa al 0.8% y utilizando diluciones (12, 25 y 50 ng/µl) del marcador de peso molecular lambda (Takara). Finalmente, el ADN extraído se conservó a -20°C.

II.3.6.2.1. Análisis por marcadores moleculares SSR

Inicialmente, se evaluaron 7 parejas de oligonucleótidos (Tabla II.2) de los cuales se seleccionaron 5. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler (Eppendorf). La reacción de amplificación se realizó en un volumen de 20 µl conteniendo aproximadamente 10 ng de ADN total, 0.5 µM del oligonucleótido directo marcado con un fluoróforo (según Tabla II.3) y del reverso, y 1.25 U de polimerasa MyTaq, en el buffer de reacción de la polimerasa. El programa de amplificación empleado fue el de la polimerasa MyTaq (Tabla II.4).

Tabla II.2. Marcadores microsatélites utilizados en el análisis de estabilidad genética del material del genotipo StopVert obtenido vía embriogénesis somática.

Código	Locus	Nombre	Motivo repetido	Sentido	Secuencia (5'-3')	Tamaño esperado	Tª annealing (°C)	Fuente
Oli1	AJ279854	ssrOeUA-DCA03	(GA)19	F R	CCCAAGCGGAGGTGTATATTGTTAC TGCTTTTGTCTGTTTGAGATGTTG	228-250	50	Sefc et al. (2000)
Oli2	AJ279859	ssrOeUA-DCA09	(GA)23	F R	AATCAAAGTCTTCCTTCTCATTTCG GATCCTTCCAAAAGTATAACCTCTC	161-205	55	Sefc et al. (2000)
Oli3	AJ279865	ssrOeUA-DCA16	(GT)13(GA)29	F R	TTAGGTGGGATTCTGTAGATGGTTG TTTTAGGTGAGTTCATAGAATTAGC	120-178	50	Sefc et al. (2000)
Oli4	AJ279867	ssrOeUA-DCA18	(CA)4CT(CA)3(GA)19	F R	AAGAAAGAAAAGGCAGAATTAAGC GTTTTCTGCTCTCTACATAAGTGAC	168-184	50	Sefc et al. (2000)
Oli5	AJ416321	EMO03	(CA)7	F R	GGTGTAGCCCAAGCCCTTAT TGCATGACCGTGGTGTAAGT	205-215	60	De la Rosa et al. (2002)
Oli6	AJ416322	EMO13	(CT)4(CA)8	F R	AGGGTGGGGATAAAGAAGAAGTCAC TTTTACCCCATATACCCCGATTCATT	118-139	60	De la Rosa et al. (2002)
Oli7	AJ416323	EMO30	(AC)8	F R	GTCTCTGCCCAACAATG CATACATGAGTGTGTG	183-196	50	De la Rosa et al. (2002)

Tabla II.3. Nombre, marcaje y color del fluoróforo de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación de microsátélites.

<u>Nombre SSR</u>	<u>Marcaje</u>	<u>Color fluoróforo</u>
Oli1	HEX TM	verde
Oli2	6-FAM TM	azul
Oli4	6-FAM TM	azul
Oli6	6-FAM TM	azul
Oli7	HEX TM	verde

Tabla II.4. Condiciones de amplificación utilizadas para el análisis de marcadores SSR.

1 ciclo	Desnaturalización inicial	95°C	1 minuto
35 ciclos	Desnaturalización	95°C	15 segundos
	Hibridación	T _m (oligonucleótidos)	15 segundos
	Extensión	72°C	10 segundos
1 ciclo	Extensión final	72°C	10 minutos

Las amplificaciones realizadas de cada una de las muestras se analizaron en un gel de agarosa al 1.5% para comprobar la integridad del producto de PCR antes de enviarlas a secuenciar. Finalmente, se diluyeron a una concentración 1/50 en un volumen de 100 µl y se enviaron en una placa de 96 pocillos al servicio de secuenciación de SECUGEN (CIB/CSIC, Madrid). Los resultados se analizaron con el programa Peak Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems).

II.3.6.2.2. Análisis por marcadores moleculares RAPDs

Para la detección de variaciones genéticas en las muestras anteriormente descritas (Tabla II.1), se eligieron los 5 oligonucleótidos que generaron mayor número de bandas en el ADN de la planta donante, de entre un set de 11 oligonucleótidos procedentes de la colección de Operon Technologies (Tabla II.5).

Tabla II.5. Nombre y secuencias de los oligonucleótidos empleados en el análisis RAPDs.

<u>Nombre RAPD</u>	<u>Secuencia</u>
A1	5'- CAGGCCCTTC-3'
B7	5'- GGTGACGCAG-3'
B15	5'- GGAGGGTGTT-3'
E19	5'- ACGGCGTATG-3'
F10	5'- GGAAGCTTGG-3'

La reacción de PCR se llevó a cabo modificando el protocolo de la polimerasa MyTaq en un volumen final de 25 µl, conteniendo aproximadamente 10 ng de ADN total, 0.8 µM del oligonucleótido y 1.5 U de polimerasa MyTaq, en el buffer de reacción de la polimerasa. Las amplificaciones se realizaron al menos por duplicado, en un termociclador Mastercycler (Eppendorf), siguiendo el programa de PCR descrito en la Tabla II.6.

Tabla II.6. Condiciones de amplificación utilizadas para el análisis de marcadores RAPDs.

1 ciclo	Desnaturalización inicial	94°C	2 minutos
35 ciclos	Desnaturalización	92°C	45 segundos
	Hibridación	37°C	1 minuto
	Extensión	72°C	2 minutos
1 ciclo	Extensión final	72°C	10 minutos

La separación de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, cargando una alícuota de 12 µl del producto de PCR junto con el tampón de carga. Los productos de amplificación se visualizaron en un transiluminador Kodak EDAS 290, tras la tinción con bromuro de etidio y varios lavados con agua destilada.

II.4. RESULTADOS

II.4.1. Inducción de embriogénesis somática

Se utilizaron distintos protocolos para la inducción de embriogénesis somática a partir de material adulto de olivo silvestre mantenido *in vitro* mediante proliferación de brotes axilares.

II.4.1.1. Protocolo de Capelo et al. (2010)

En el procedimiento descrito por Capelo et al. (2010), los explantos eran incubados en medio de inducción MS 12.25 μ M IBA - 4.56 μ M Zea durante 12 semanas y transferidos posteriormente a medio basal MS sin hormonas. Transcurridas 4 semanas de cultivo en medio de inducción, el genotipo Ac-15 mostró la mayor proliferación de callo en todos los explantos, mientras que los callos formados en Ac-18 eran ligeramente más pequeños, especialmente en los explantos de peciolo (Figura II.8), los cuales, además, presentaron una alta mortalidad en ambos genotipos. El mayor porcentaje de formación de callo en Ac-18 se observó en la yema caulinar y en el primer par de hojas; de hecho, el explanto que mejor respondió en los 2 genotipos fue el ápice caulinar.

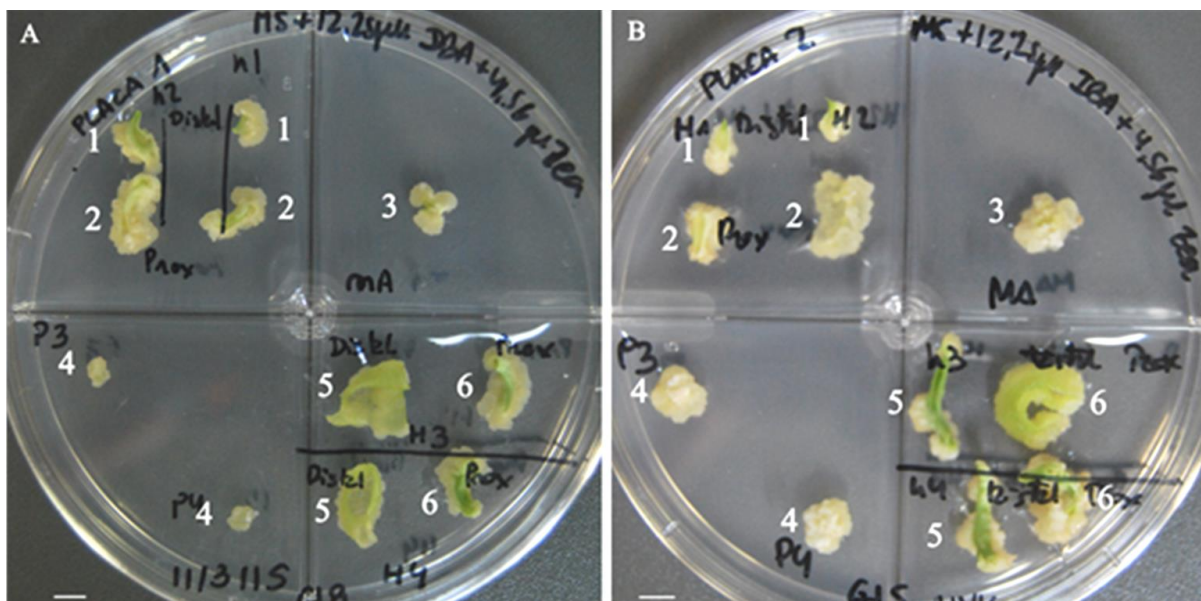


Figura II.8. Aspecto del callo formado sobre los diferentes explantos a las 4 semanas en medio de inducción MS 12.25 μ M IBA - 4.56 μ M Zea. A) Ac-18, B) Ac-15. Explantos: 1 y 2) Parte distal y basal, respectivamente, de las hojas del primer nudo, 3) Ápice caulinar, 4) Peciolo, 5 y 6) Parte distal y basal, respectivamente, de las hojas del segundo nudo. Barra: 5 mm.

Transcurridos 3 meses de cultivo en medio de inducción, se observaron callos de gran tamaño en todos los explantos y genotipos (Figura II.9). En general, los callos eran compactos y blancos, aunque se podían apreciar algunas zonas traslúcidas. Sin embargo, algunos callos eran fácilmente disgregables, especialmente, los del genotipo Ac-15.

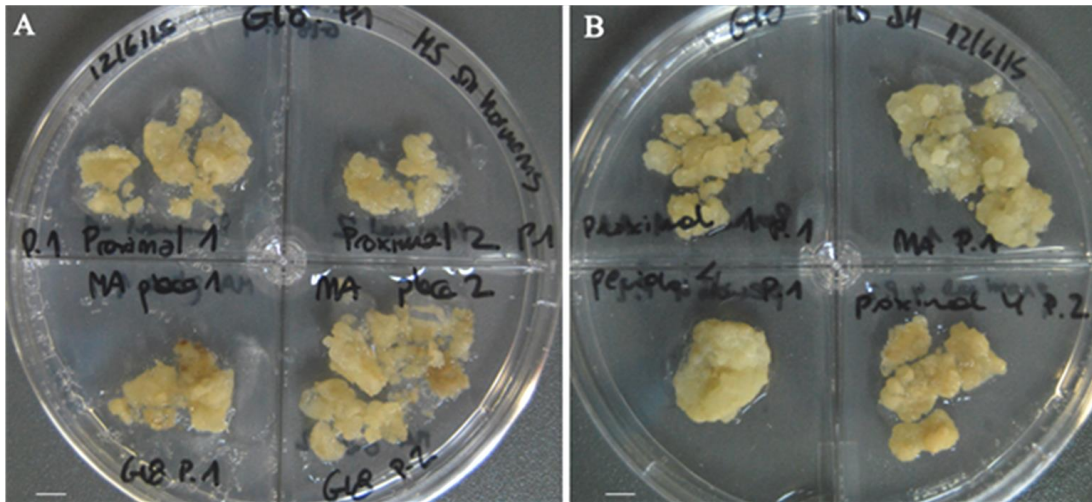


Figura II.9. Aspecto del callo formado tras 3 meses en medio de inducción MS 12.25 μ M IBA - 4.56 μ M Zea. A) Ac-18 y B) Ac-15. Barra: 5 mm.

Tras el periodo de inducción, los callos se transfirieron a medio basal MS durante otros 3 meses con recultivos a intervalos mensuales. Después de los 3 recultivos en estas condiciones, muchos de los callos tenían una coloración más oscura (Figura II.10). Asimismo, fue notable la aparición de raíces en algunos de los callos procedentes de yema caulinar y hoja.

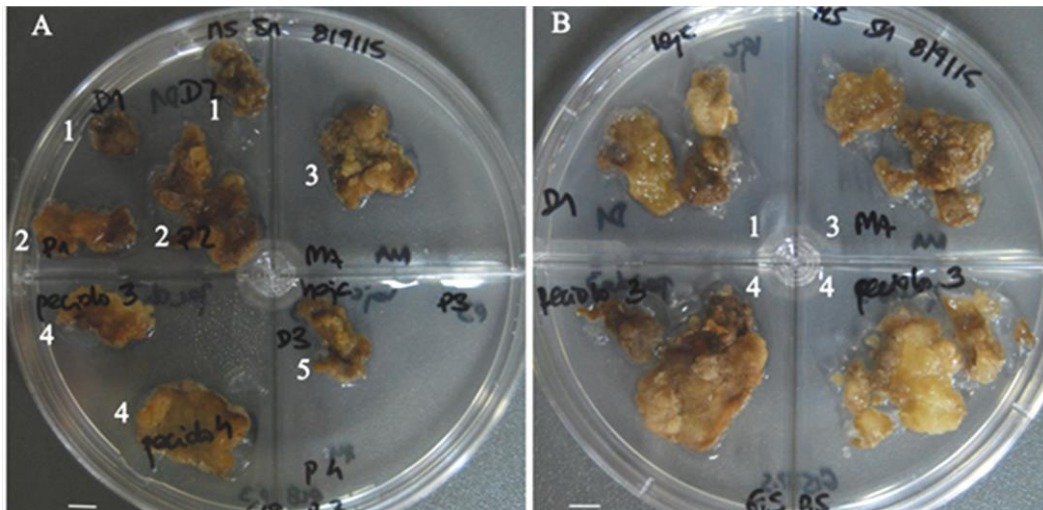


Figura II.10. Aspecto de algunos de los callos tras el 3º subcultivo en medio basal MS. A) Ac-18 y B) Ac-15. Explantos: 1 y 2) Parte distal y basal, respectivamente, de las hojas del primer nudo, 3) Ápice caulinar, 4) Peciolos, 5) Parte distal de las hojas del segundo nudo. Barra: 5 mm.

Los callos con aspecto embriogénico se transfirieron a medio de embriogénesis cíclica de olivo, medio ECO, suplementado con 0.25 μM IBA, 0.5 μM 2iP - 0.44 μM BA y 200 mg/L de cefotaxima. Después de 12 semanas de cultivo en este medio, todos los callos habían adquirido una tonalidad más oscura y mayor grado de disgregación. Sin embargo, a pesar de que algunos de ellos presentaban estructuras con aspecto embriogénico (Figura II.11), éstas acababan degenerando y no fue posible establecer cultivos embriogénicos viables.



Figura II.11. Aspecto del callo de una yema caulinar del genotipo Ac-15 en medio de embriogénesis cíclica ECO después de 8 semanas de cultivo.

II.4.1.2. Protocolo de Mazri et al. (2013)

En este protocolo, los explantos eran cultivados en medio de inducción líquido (MS $\frac{1}{2}$, 30 μM TDZ-0.54 μM ANA) durante 4 días y posteriormente transferidos a medio sólido MS $\frac{1}{2}$ sin reguladores de crecimiento (Figura II.12). Durante los 4 días de cultivo en el medio de inducción no se observaron cambios destacables en los explantos (Figura II.12A). Sin embargo, a las 2 semanas de cultivo en el medio basal MS $\frac{1}{2}$, todos los genotipos y la mayoría de los 4 tipos de explanto habían comenzado el proceso de dediferenciación, observándose callo en casi todos ellos, tras 4 semanas de cultivo y especialmente, en las zonas de corte (Figura II.12B).

El genotipo Ac-4 presentó el mayor porcentaje de formación de callo en todos los explantos a las 4 semanas de cultivo en el medio basal MS $\frac{1}{2}$, y especialmente, en el primer y segundo par de hojas. Algunos de los callos de este genotipo adquirieron coloración marrón, así como algunos procedentes de Ac-15, presentando este último una elevada proliferación de callo en yema caulinar y en las hojas del primer nudo, al igual que Ac-18. Los otros dos genotipos de acebuche, StopVert y OutVert, mostraron menor producción de callo en general; sin embargo, en el caso de StopVert, se observó una mayor proliferación en el primer par de hojas y en OutVert en el ápice caulinar. Además, fue notable el crecimiento de los explantos en el medio basal MS $\frac{1}{2}$, siendo más acentuado en las hojas, como puede observarse en la Figura II.12A y B.

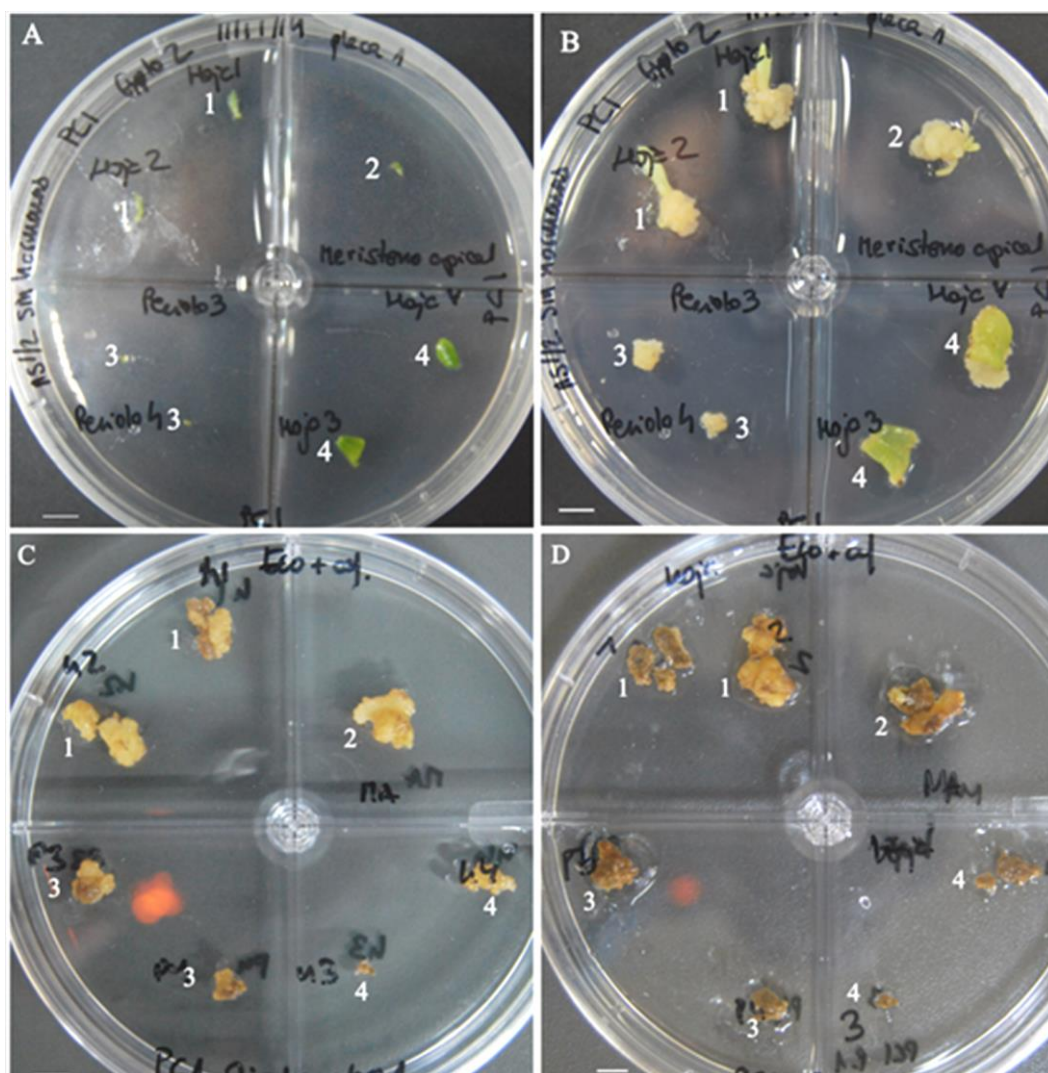


Figura II.12. Explantos del genotipo StopVert empleados en la inducción de ES y aspecto de los callos formados. A) Explantos cultivados en medio basal MS $\frac{1}{2}$, tras 4 días de cultivo en medio de inducción líquido MS $\frac{1}{2}$ 30 μ M TDZ - 0.54 μ M ANA. B) Callo a las 4 semanas de cultivo en medio basal MS $\frac{1}{2}$. C) Callo aislado y cultivado en medio ECO suplementado con 0.25 μ M IBA, 0.5 μ M 2iP - 0.44 μ M BA y con 200 mg/L de cefotaxima tras 4 semanas de cultivo. D) Callo después del tercer subcultivo (12 semanas) en el mismo medio. Explantos: 1) Hojas completas del primer nudo, 2) Ápice caulinar, 3) Peciolos, 4) Parte basal de las hojas del segundo nudo. Barra: 5 mm.

El porcentaje de callogénesis de los genotipos Ac-18, Ac-15 y Ac-4 fue del 100% a las 8 semanas en medio basal MS $\frac{1}{2}$. El menor porcentaje de respuesta se observó en OutVert y StopVert para algunos de los explantos, como en el caso de la parte basal del 2º par de hojas de StopVert (64.1%), y en los peciolos (82.5%), así como en el 1º y 2º par de hojas (85% y 87.5%, respectivamente) de OutVert (Figura II.13). Al finalizar el periodo de cultivo de 8 semanas en el medio basal MS $\frac{1}{2}$ se observó que el ápice caulinar fue el explanto con mayor porcentaje de inducción de callo (100%) en todos los genotipos (Figura II.13).

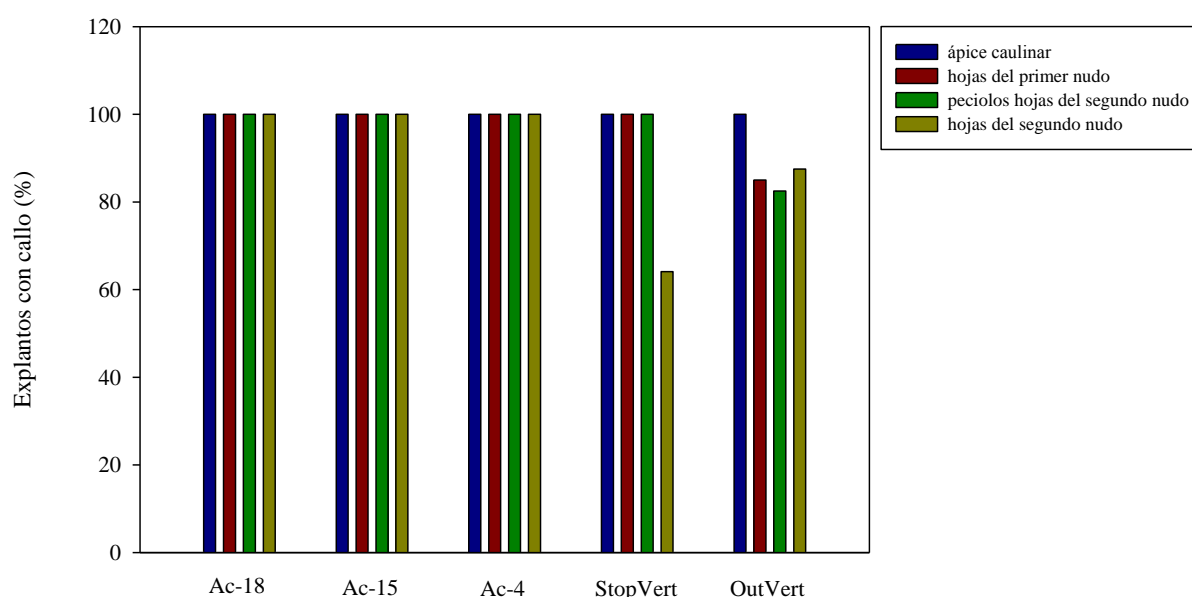


Figura II.13. Porcentaje de explantos de los distintos genotipos que formaron callo a las 8 semanas de cultivo en el medio basal MS ½.

El genotipo Ac-4 fue el que presentó mayor producción de callo por explanto; 100% de los peciolos, 93.7% de ápices caulinares, 25% de hojas del primer nudo y 19.3% del segundo par de hojas, mostraron más del 80% de la superficie del explanto recubierta por callo (Tabla II.7). En el caso de Ac-18 fueron los peciolos (83.8%) seguidos del ápice caulinar (65%) los que mostraron mayor respuesta, mientras que en Ac-15, el 100% de las yemas caulinares y el 56.4% de los peciolos presentaron valores de producción de callo superiores al 80% de la superficie del explanto (Tabla II.7). Los genotipos StopVert y OutVert mostraron el menor número de explantos cubiertos por callo. Como se puede observar en la Tabla II.7, el explanto que presentó mayor superficie cubierta por callo a las 8 semanas de cultivo en el medio basal MS ½ fue el ápice caulinar.

Tabla II.7. Porcentaje de explantos que formaron callo en los distintos genotipos. Se evaluó el porcentaje de superficie del explanto cubierta por callo empleando la siguiente escala visual: 0 = ausencia de callo, 1 = 1-40% (media-baja), 2 = 40-80% (media-alta), 3 = > 80% (alta), a las 8 semanas de cultivo en el medio basal MS ½.

Genotipo	Tipo de explanto	Explantos que formaron callo (%)			
		Ausencia (0)	Entre 1-40% de la superficie (1)	Entre 40-80% de la superficie (2)	Más del 80% de la superficie (3)
Ac-18	Ápice caulinar	0	0	35	65
	Peciolos	0	0	16.2	83.8
	Hojas del 1º nudo	0	32.5	67.5	0
	Hojas del 2º nudo (basal)	0	42.5	55	2.5
Ac-15	Ápice caulinar	0	0	0	100
	Peciolos	0	12.8	30.8	56.4
	Hojas del 1º nudo	0	30	70	0
	Hojas del 2º nudo (basal)	0	50	50	0
Ac-4	Ápice caulinar	0	0	6.3	93.7
	Peciolos	0	0	0	100
	Hojas del 1º nudo	0	3.1	71.9	25
	Hojas del 2º nudo (basal)	0	6.5	74.2	19.3
StopVert	Ápice caulinar	0	0	40	60
	Peciolos	0	72.2	11.1	16.7
	Hojas del 1º nudo	0	31.6	68.4	0
	Hojas del 2º nudo (basal)	36	53.8	10.2	0
OutVert	Ápice caulinar	0	15	70	15
	Peciolos	17.6	64.7	17.6	0
	Hojas del 1º nudo	10	77.5	12.5	0
	Hojas del 2º nudo (basal)	12.5	67.5	17.5	2.5

Después de 8 semanas de cultivo en el medio basal MS ½, el callo formado en todos los explantos de los genotipos empleados era, en general, blanco y con cierto grado de compacidad. Asimismo, se podía observar a la lupa binocular la existencia de algunas áreas translúcidas. Estos callos se aislaron y cultivaron en medio ECO suplementado con 0.25 µM IBA, 0.5 µM 2iP - 0.44 µM BA y 200 mg/L de cefotaxima, para el desarrollo de embriones somáticos, observándose un oscurecimiento general del callo y mayor disgregación tras sucesivos subcultivos (Figura II.14A, B). A las 4 semanas de cultivo en este medio, se podían observar algunas estructuras con apariencia embriogénica en el callo procedente de yema apical y hoja de los genotipos StopVert (Figura II.14A) y Ac-18. Sin embargo, su presencia fue más patente a las 12 semanas de cultivo solo en los procedentes de yema apical del genotipo StopVert (Figura II.14B). Este callo se fragmentó y se cultivó de manera independiente en el mismo medio hasta la obtención de un cultivo embriogénico (Figura II.14C-E). En ningún caso se observó la formación de órganos en los callos cultivados.

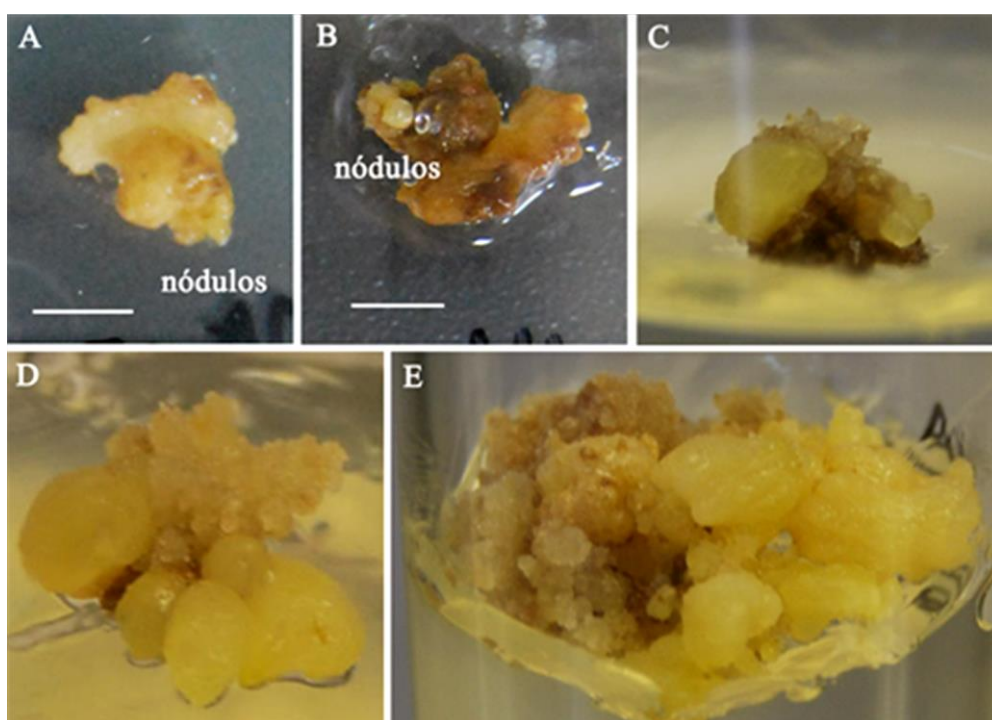


Figura II.14. Aspecto del callo obtenido a partir de ápice caulinar del genotipo de olivo silvestre StopVert. A) Callo cultivado durante 1 mes en medio ECO, tras 8 semanas de cultivo en medio basal MS ½. B, C) Presencia de nódulos con aspecto embriogénico formados tras 12-16 semanas de cultivo en medio ECO, respectivamente. D, E) Callo embriogénico obtenido tras sucesivos subcultivos en medio ECO. Barra: 5 mm.

Al finalizar el experimento solo se obtuvieron embriones somáticos a partir de yemas caulinares del genotipo StopVert (Figura II.14E), siendo el porcentaje de inducción de ES del 5%.

En un segundo experimento, empleando solo el genotipo Ac-18, se observó la aparición de masas embriogénicas a las 8 semanas de cultivo en medio basal MS ½ en callos derivados de yema apical (Figura II.15) y hojas. Después de 8 semanas de cultivo en medio ECO, el 10% y 8% de los callos formados a partir de yema caulinar y parte basal de las hojas del segundo nudo, respectivamente, tenían aspecto embriogénico. Sin embargo, solo se obtuvieron embriones somáticos a partir de callos derivados del ápice caulinar (Figura II.15), siendo el porcentaje final de inducción del 5%.

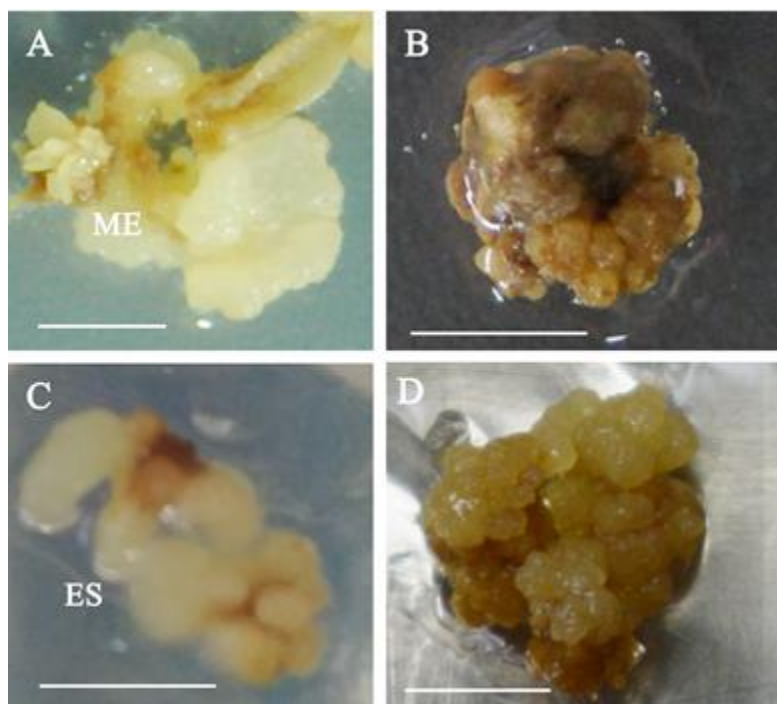


Figura II.15. Evolución del callo formado a partir de ápice caulinar del genotipo Ac-18. A) Presencia de masas embriogénicas (ME) en el callo cultivado en medio basal MS ½ a las 8 semanas. B) Estructuras globulares en el callo aislado y cultivado en medio ECO tras 3 subcultivos después del cultivo en medio basal MS ½. C) Embriones somáticos cultivados en medio ECO. D) Callo embriogénico cultivado en medio ECO después de 4 semanas de cultivo. Barra: 5 mm.

Siguiendo esta metodología se obtuvieron 2 líneas embriogénicas a partir de ápice caulinar tanto del genotipo StopVert como Ac-18. Sin embargo, la proliferación del callo del genotipo Ac-18 disminuyó tras varios subcultivos en medio ECO.

II.4.1.3. Protocolo de Mazri et al. (2013) modificado

En este experimento, se evaluó la formación de callo embriogénico tras el cultivo de los explantos en el medio de inducción de Mazri et al. (2013) solidificado con agar, durante 8 semanas. Transcurridas 4 semanas de cultivo en el medio de inducción, se observó formación de callo principalmente en las zonas de corte y bordes de las hojas del primer nudo, y en la parte basal del segundo par. En general, se observó una baja respuesta callogénica de los

distintos explantos y genotipos. No obstante, hubo una mayor formación de callo en Ac-15 y Ac-18, fundamentalmente en peciolo y hojas. También se observó una considerable formación de callo en la parte basal de las hojas de Ac-4, mientras que los explantos de los genotipos StopVert y OutVert apenas formaron callo (Figura II.16).

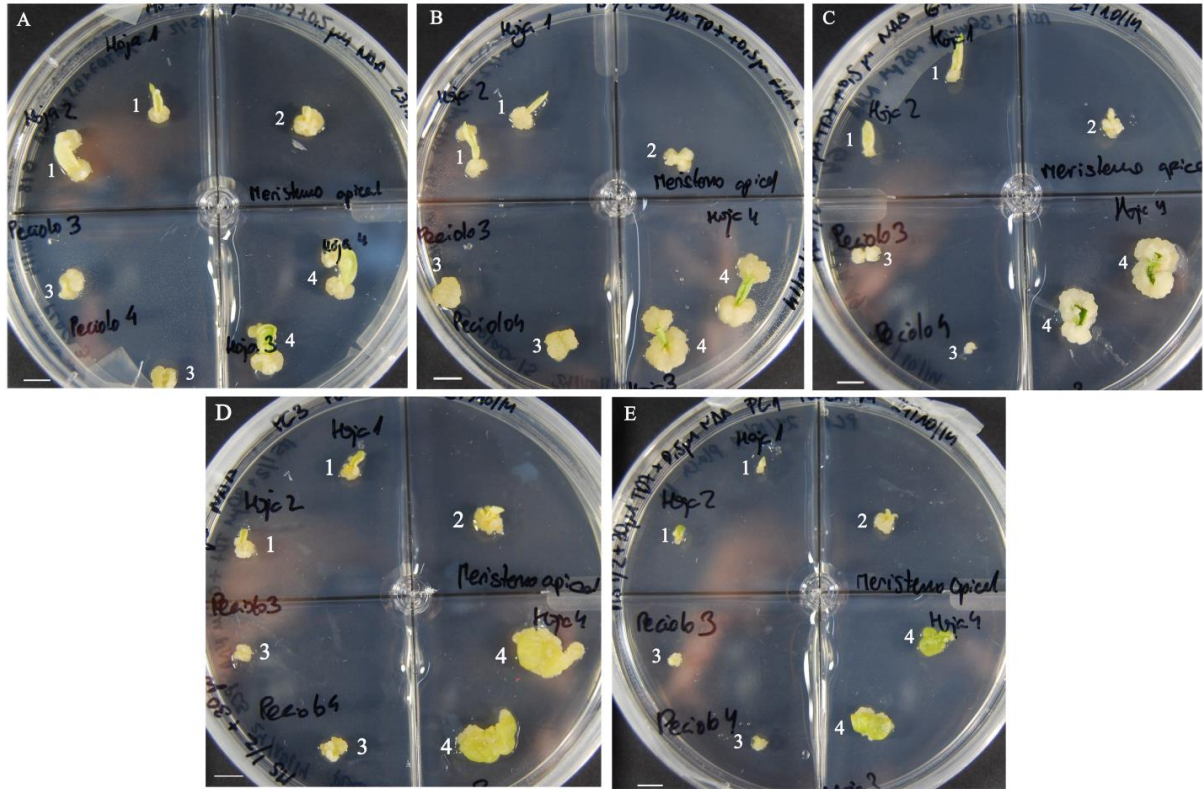


Figura II.16. Aspecto de los callos formados en los explantos de los distintos genotipos, tras cultivarlos en el medio de inducción MS $\frac{1}{2}$ 30 μ M TDZ - 0.54 μ M NAA durante 4 semanas. A) Ac-18, B) Ac-15, C) Ac-4, D) OutVert y E) StopVert. Explantos: 1) Hojas completas del primer nudo, 2) Ápice caulinar, 3) Peciolo, 4) Parte basal de las hojas del segundo par. Barra: 5 mm.

A las 8 semanas de cultivo en este medio se observó un incremento notable del tamaño de los callos formados. Estos se aislaron y cultivaron en medio de embriogénesis cíclica de olivo ECO suplementado con 0.25 μ M IBA, 0.5 μ M 2iP - 0.44 μ M BA y 200 mg/L de cefotaxima, durante varios subcultivos de 4 semanas cada uno, para la diferenciación de embriones somáticos. Los callos cultivados eran blancos, translúcidos y en su mayoría compactos. Sin embargo, a las 4 semanas de cultivo comenzaron a tornarse color marrón y perdieron compactidad. A pesar de que algunos presentaron nódulos a las 12 semanas de cultivo, tras 3 subcultivos adicionales en el medio de embriogénesis cíclica ECO no se observó la aparición de callo embriogénico (Figura II.17).

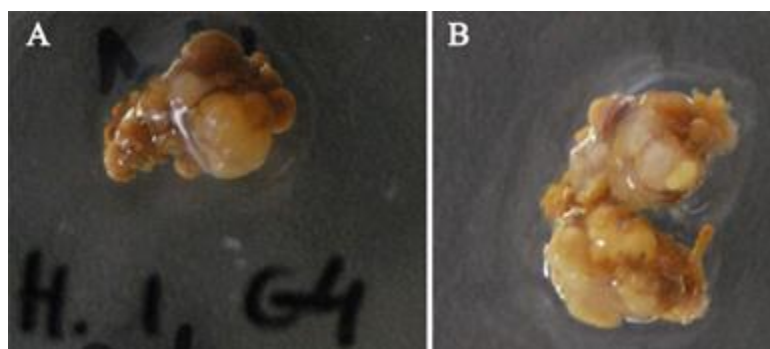


Figura II.17. Aspecto de los callos del genotipo Ac-4 cultivados en medio ECO suplementado con 0.25 μ M IBA, 0.5 μ M 2iP - 0.44 μ M BA y 200 mg/L de cefotaxima después de 12 semanas. A) Callo de una de las hojas del primer nudo. B) Callo procedente de una yema apical.

II.4.2. Multiplicación del callo embriogénico del genotipo StopVert

Se evaluó la tasa de multiplicación, tanto en medio sólido como líquido, del callo embriogénico obtenido de ápice caulinar del genotipo StopVert siguiendo el procedimiento de Mazri et al. (2013). En medio sólido, el material se multiplicó sin dificultad durante 4 subcultivos, obteniéndose un incremento medio de peso de 0.85 ± 0.12 g (Figura II.18A, B; Figura II.19). Sin embargo, en medio líquido, a pesar de que tras el primer subcultivo el callo mostró un incremento de peso superior al obtenido en medio sólido (1.64 ± 0.57 g vs. 0.99 ± 0.08 g en medio líquido y sólido, respectivamente), el peso se vio reducido en el segundo subcultivo (0.77 ± 0.29 g), y fue inferior al del inóculo inicial, tomando el callo un aspecto necrosado, en el tercer subcultivo (Figura II.18C, D).

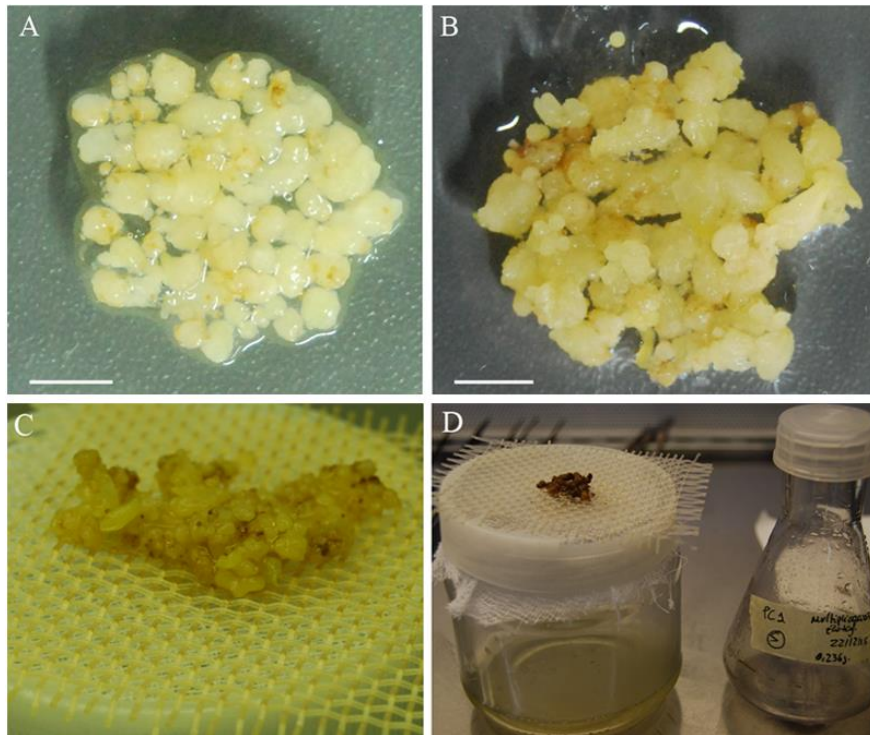


Figura II.18. Aspecto del callo del genotipo StopVert. A) Fracción fina de callo cultivada en medio sólido ECO. B) Proliferación del callo después de un mes de cultivo en el mismo medio. C) Tras el primer subcultivo de 4 semanas en medio líquido ECO. D) Después del tercer subcultivo en el mismo medio. Barra: 5 mm.

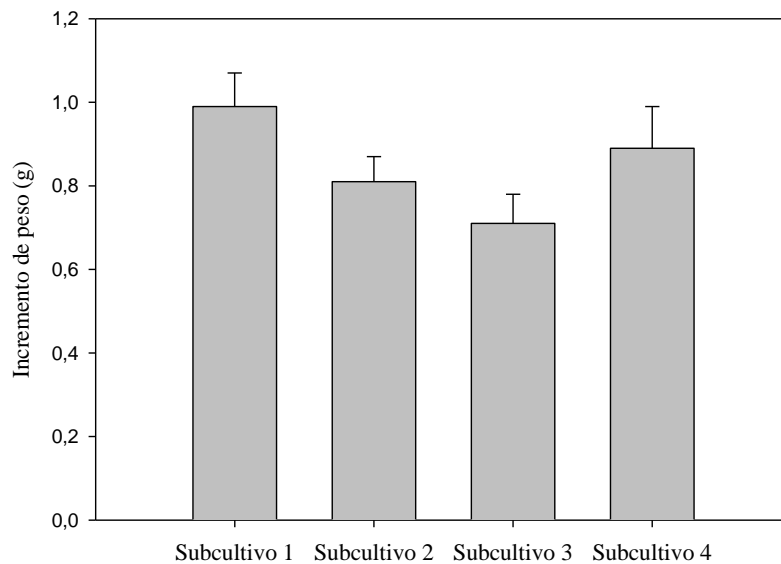


Figura II.19. Incremento medio de peso del callo embriogénico de la línea StopVert cultivada durante 4 subcultivos en medio sólido ECO suplementado con 0.25 μ M IBA, 0.5 μ M 2iP - 0.44 μ M BA y 200 mg/L de cefotaxima.

II.4.3. Maduración de embriones somáticos

Una vez establecido el cultivo embriogénico del genotipo StopVert, 81 embriones somáticos globulares se maduraron de acuerdo con el protocolo de Cerezo et al. (2011a), obteniéndose un total de 48 embriones maduros blanco-opacos (59.26%) (Tabla II.8). Los embriones maduros obtenidos mostraron diferentes morfologías; algunos de ellos presentaron un fenotipo normal, mientras que otros, por ejemplo, tenían uno o más de dos cotiledones. En uno de los embriones se observó también la presencia de la radícula (Figura II.20A).

II.4.4. Germinación de embriones

La germinación de los embriones se llevó a cabo en el medio de Clavero-Ramírez y Pliego-Alfaro (1990) (Figura II.20B), siendo apreciable la diferenciación del brote y de la radícula en muchos de ellos (Figura II.20C) a las 12 semanas de cultivo.

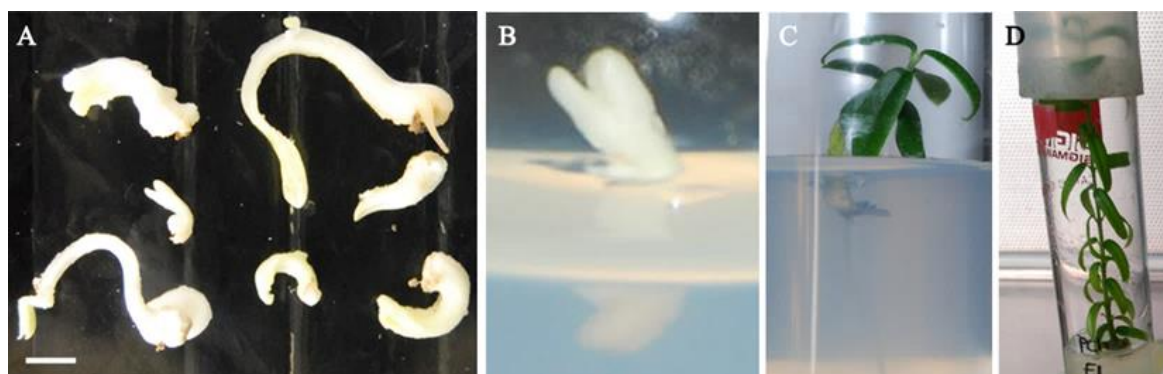


Figura II.20. Aspecto de los embriones y de las plantas regeneradas a partir de embriones somáticos maduros del genotipo StopVert. A) Embriones somáticos cultivados en medio de maduración con membrana de acetato de celulosa. B) Embrión maduro en estadio cotiledonar cultivado en medio de germinación. C) Plántula regenerada tras 12 semanas en medio de germinación. D) Brotes axilares en proliferación a las 8 semanas de cultivo en medio de multiplicación RP (Vidoy-Mercado et al., 2012). Barra: 5 mm.

Para la obtención del porcentaje de germinación solo se tuvieron en cuenta los embriones que habían desarrollado brote, independientemente de si presentaban, o no, raíz, obteniéndose un porcentaje de germinación del 35.42% (17 brotes independientes) (Tabla II.8). El brote de cada embrión germinado se aisló y se cultivó individualmente en el medio de multiplicación de olivo RP para la inducción de brotes axilares (Figura II.20D).

Tabla II.8. Maduración y germinación de embriones somáticos del genotipo StopVert.

Nº embriones globulares	Nº embriones maduros	Tasa de maduración (%)	Nº brotes obtenidos	Tasa de germinación de brote (%)
81	48	59.26	17	35.42

Las 17 líneas de plantas obtenidas a partir de distintos embriones somáticos presentaban el mismo fenotipo que los brotes propagados *in vitro* procedentes del cultivo de brotes axilares de la planta madre.

En la Figura II.21 se resume el protocolo optimizado para la obtención de plantas procedentes de cultivos embriogénicos de material adulto de olivo silvestre, genotipo StopVert.

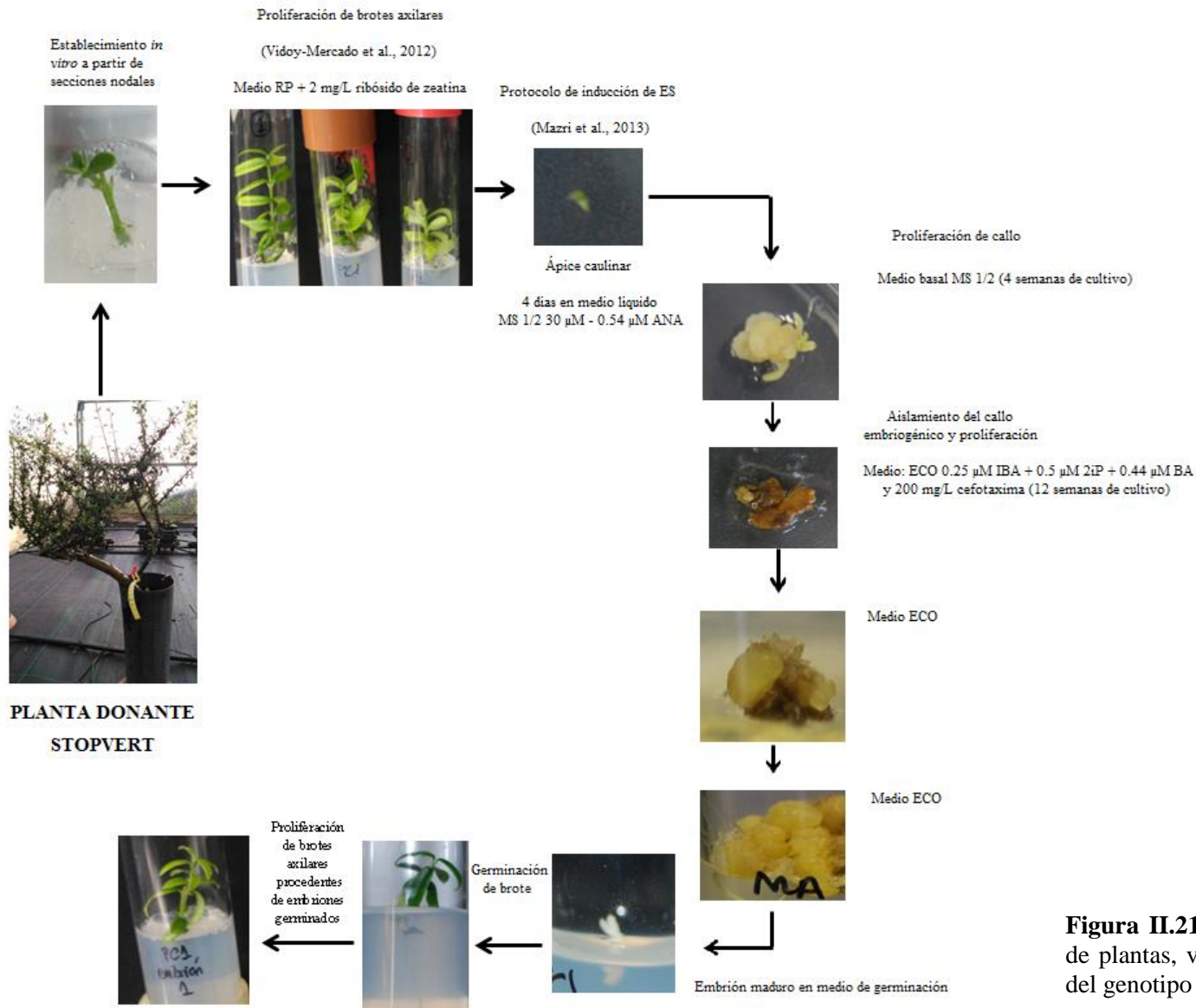


Figura II.21. Proceso de regeneración de plantas, vía ES, a partir de material del genotipo StopVert.

II.4.5. Análisis de la estabilidad genética

El análisis de estabilidad genética se llevó a cabo empleando 5 marcadores moleculares microsatélites y 5 RAPDs, con objeto de detectar la ocurrencia de alteraciones genéticas en plantas regeneradas vía ES. Se analizaron 10 muestras procedentes de una línea de callo embriogénico derivada de una yema apical de StopVert, así como plantas procedentes de la germinación de diferentes embriones somáticos. Como controles, además de la planta madre, se utilizaron plantas micropropagadas obtenidas a partir de yemas axilares procedentes de la planta madre.

II.4.5.1. Análisis por marcadores moleculares SSR

Para seleccionar los marcadores moleculares microsatélites se realizó una primera amplificación con 7 parejas de oligonucleótidos (Oli1, Oli2, Oli3, Oli4, Oli5, Oli6 y Oli7) (Sefc et al., 2000; De la Rosa et al., 2002), empleando como molde el ADN extraído de la planta donante, por duplicado. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.5%, siendo el tamaño de las bandas esperadas en torno a 118-250 pb (Figura II.22).

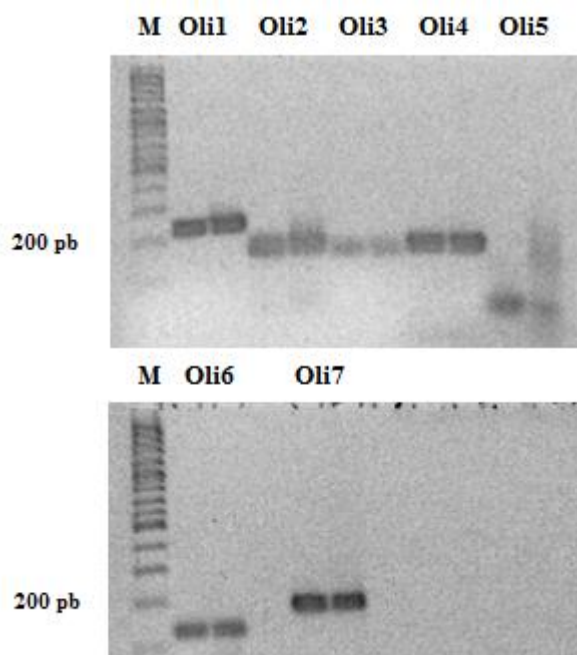


Figura II.22. Amplificaciones de los 7 locis: Oli1 (AJ279854), Oli2 (AJ279859), Oli3 (AJ279865), Oli4 (AJ279867), Oli5 (AJ416321), Oli6 (AJ416322) y Oli7 (AJ416323), en ADN genómico extraído de la planta donante StopVert.

Como se observa en la Figura II.22 las bandas obtenidas de las amplificaciones con las parejas de oligonucleótidos Oli3 y Oli5 eran menos intensas y definidas que el resto, por lo que ambos marcadores se descartaron en este estudio.

La amplificación de los 5 marcadores moleculares SSR seleccionados (Oli1, Oli2, Oli4, Oli6 y Oli7) produjo un total de 6 alelos o fragmentos y el rango de tamaño fue entre 138 y 236 pb (Tabla II.9).

Tabla II.9. Tamaño de los alelos obtenidos en la amplificación de los 5 marcadores microsatelites utilizados.

Locus	Tamaño alelos (pb)			
	Planta donante	Callo embriogénico	Brotos axilares micropropagados	Plantas regeneradas a partir de embriones somáticos
AJ279854 (Oli1)	236	236	236	236
AJ279859 (Oli2)	165/173	165/173	165/173	165/173
AJ279867 (Oli4)	172	172	172	172
AJ416322 (Oli6)	138	138	138	138
AJ416323 (Oli7)	195	195	195	195

Los fragmentos amplificados de la planta madre para cada locus se compararon con los obtenidos para cada uno de los callos embriogénicos, brotes axilares de las plantas micropropagadas y de las plantas regeneradas a partir de los embriones somáticos maduros germinados. Todos los marcadores analizados fueron monomórficos y presentaron un patrón homocigótico, excepto el marcador *ssrOeUA-DCA09* (Oli2), el cual fue heterocigótico (Tabla II.9).

A continuación, se muestran en las Figuras II.23 - 27 los electroferogramas para una de las muestras de cada tipo analizadas. El tamaño de los alelos obtenidos de las secuenciaciones se corresponde con el tamaño esperado para cada marcador SSR, siendo de 236 pb para *ssrOeUA-DCA03* (Oli1), 165-173 pb para *ssrOeUA-DCA09* (Oli2), 172 pb para *ssrOeUA-DCA18* (Oli4), 138 pb para *EMO13* (Oli6) y 195 pb para *EMO30* (Oli7).

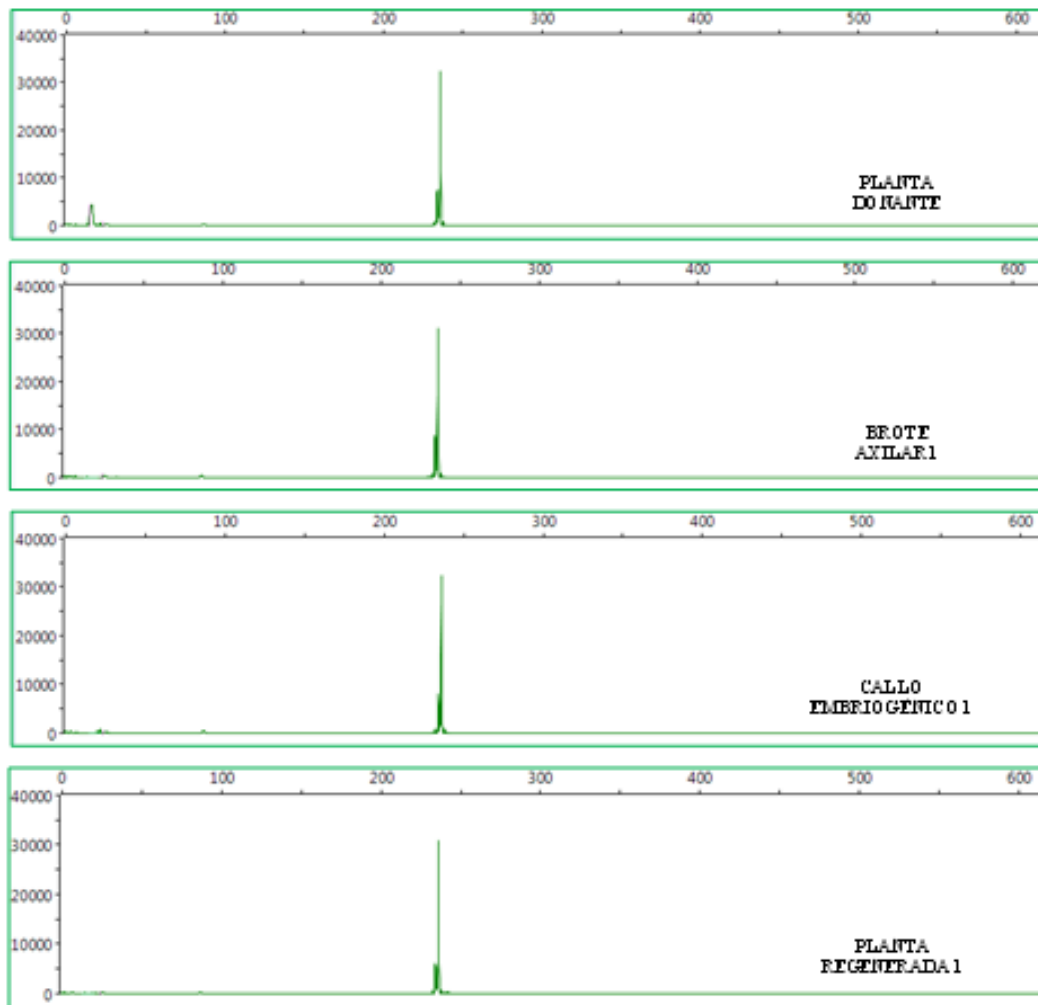


Figura II.23. Electroferograma de la amplificación del locus AJ279854 (Oli1) de la planta donante, brote axilar 1, callo embriónico 1 y planta regenerada a partir del embrión somático 1. Tamaño de los alelos 236 pb.

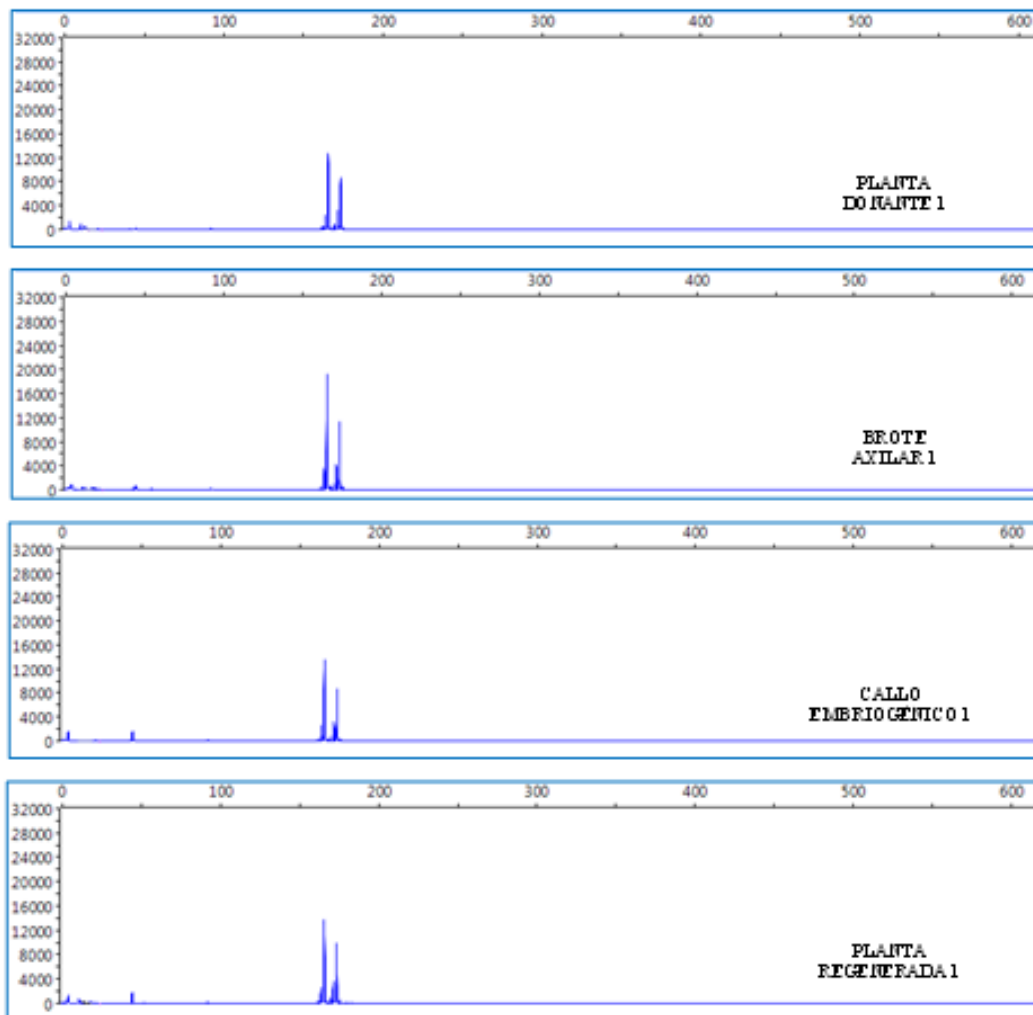


Figura II.24. Electroferograma de la amplificación del locus AJ279859 (Oli2) de la planta donante, brote axilar 1, callo embriónico 1 y planta regenerada a partir del embrión somático 1. Tamaño de los alelos 165-173pb.

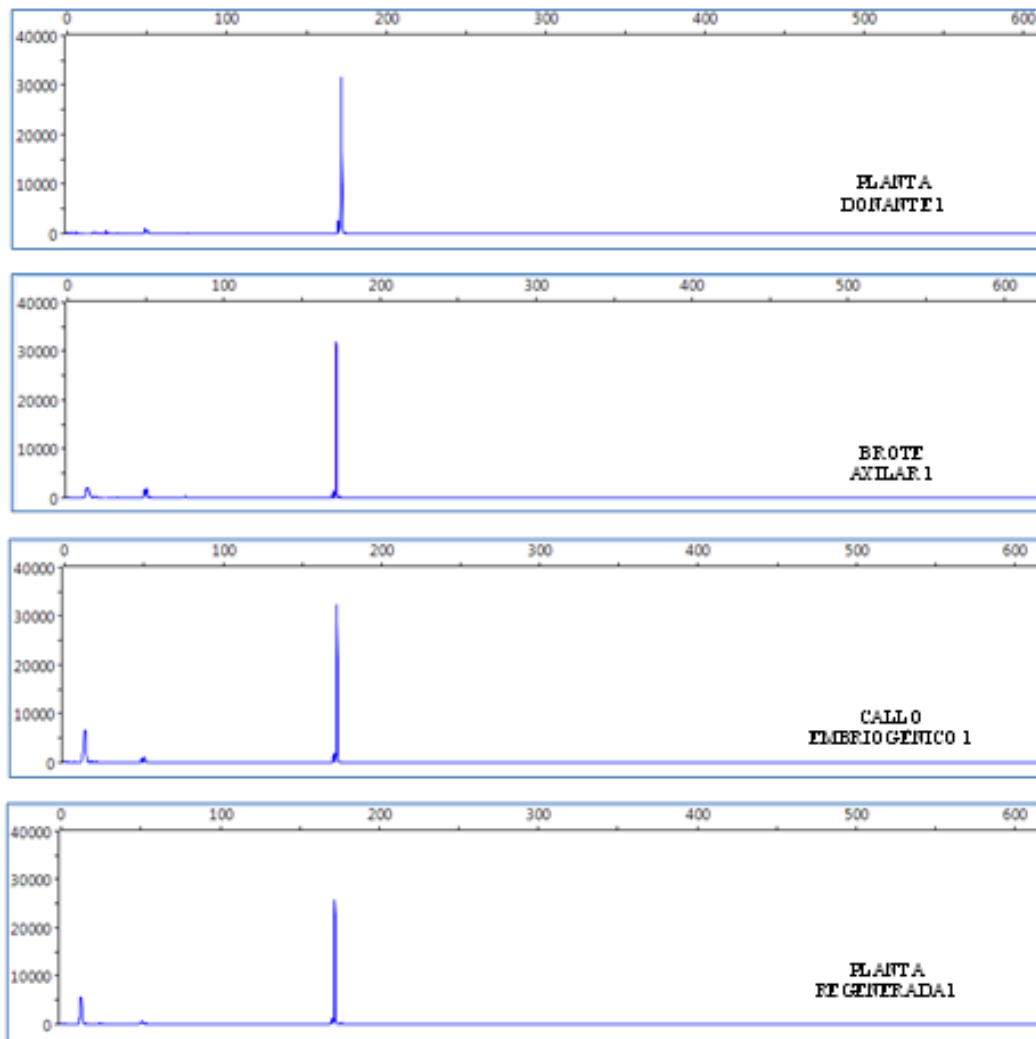


Figura II.25. Electroferograma de la amplificación del locus AJ279867 (Oli4) de la planta donante, brote axilar 1, callo embriogénico 1 y planta regenerada a partir del embrión somático 1. Tamaño de los alelos 172 pb.

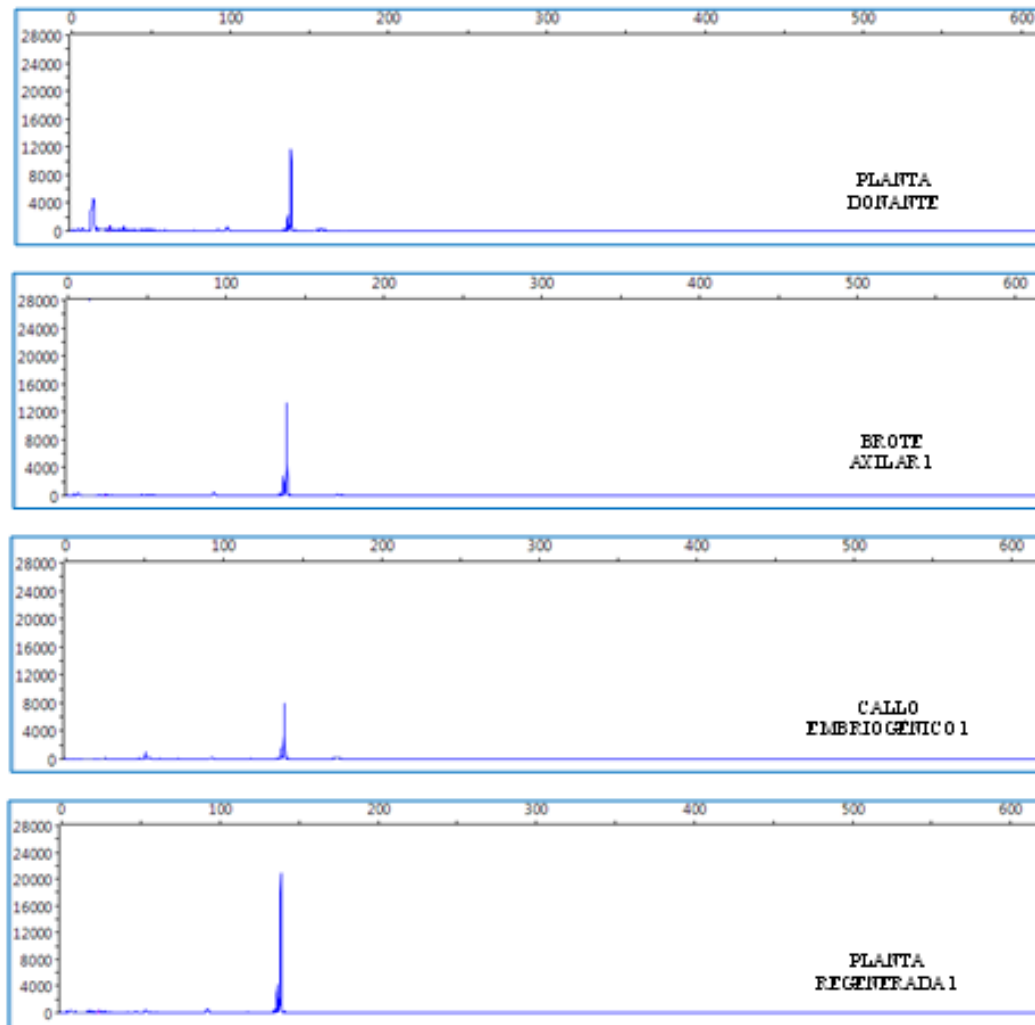


Figura II.26. Electroferograma de la amplificación del locus AJ416322 (Oli6) de la planta donante, brote axilar 1, callo embriogénico 1 y planta regenerada a partir del embrión somático 1. Tamaño de los alelos 138 pb.

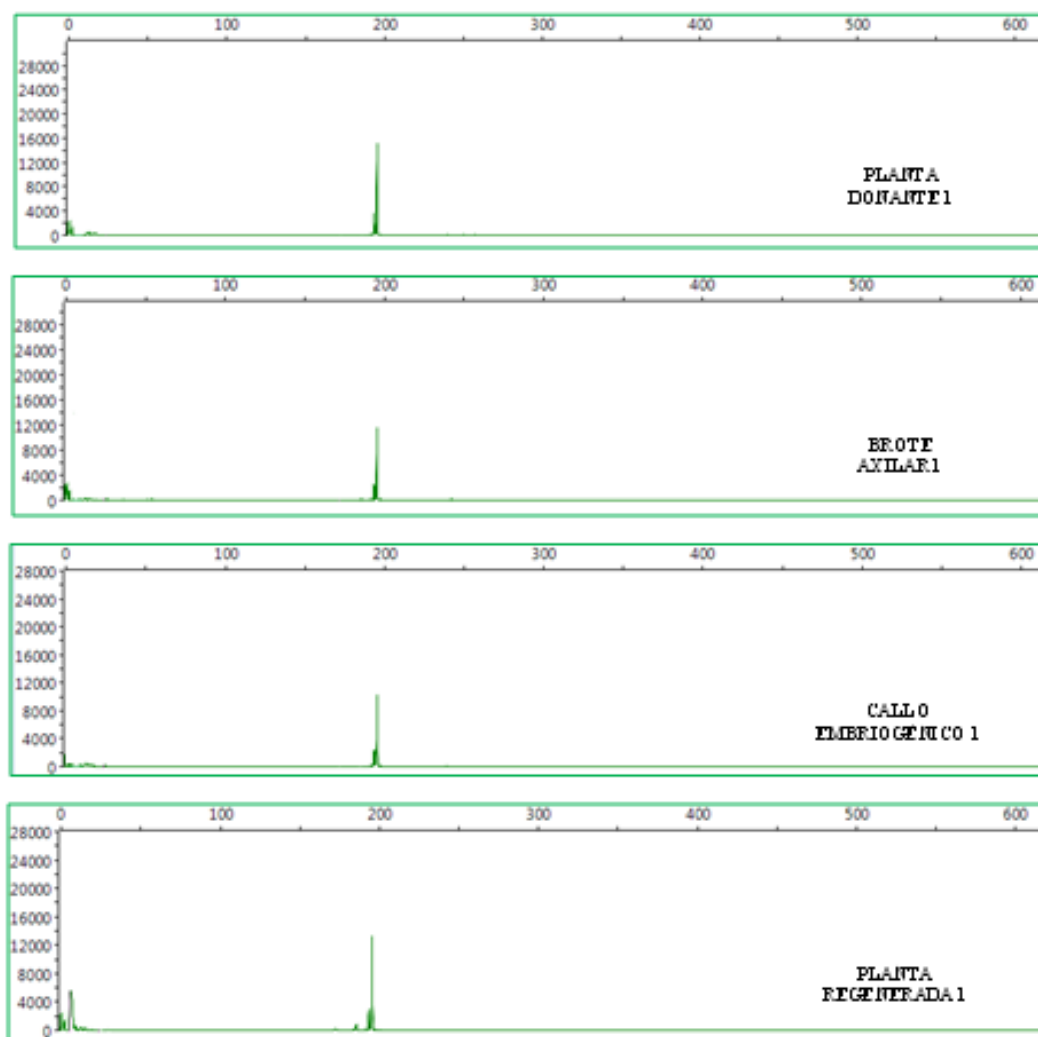


Figura II.27. Electroferograma de la amplificación del locus AJ416323 (Oli7) de la planta donante, brote axilar 1, callo embriogénico 1 y planta regenerada a partir del embrión somático 1. Tamaño de los alelos 195 pb.

Los resultados obtenidos en callos, plantas regeneradas y brotes micropropagados revelan que existe el 100% de fidelidad genética con respecto a la planta madre, mediante el estudio de estos 5 locis, ya que se observa el mismo tamaño de alelos que la planta donante.

II.4.5.2. Análisis por marcadores moleculares RAPDs

En este estudio se incluyeron todas las muestras analizadas previamente por marcadores SSR, a excepción de la planta regenerada a partir del embrión 4, ya que no fue posible la amplificación con los oligonucleótidos en las muestras de DNA extraídas de esta línea.

Los perfiles RAPDs se generaron usando 5 primers: A1, B7, B15, E19 y F10, los cuales amplificaban un gran número de bandas (Tabla II.10).

Tabla II.10. Nombre del oligonucleótido (RAPD), número de bandas y rango de tamaños (pb).

RAPD	Número de bandas amplificadas	Rango de tamaños (pb)
A1	11	200-1600
B7	10	250-1600
B15	11	500-1800
E19	9	300-1300
F10	9	250-1400

Se obtuvieron un total de 50 fragmentos, siendo el rango de bandas obtenidas por amplificación entre 9 y 11, y el tamaño entre 200 y 1800 pb (Tabla II.10).

Los perfiles obtenidos por oligonucleótido se presentan a continuación para cada una de las muestras analizadas (Figuras II.28 – 32).

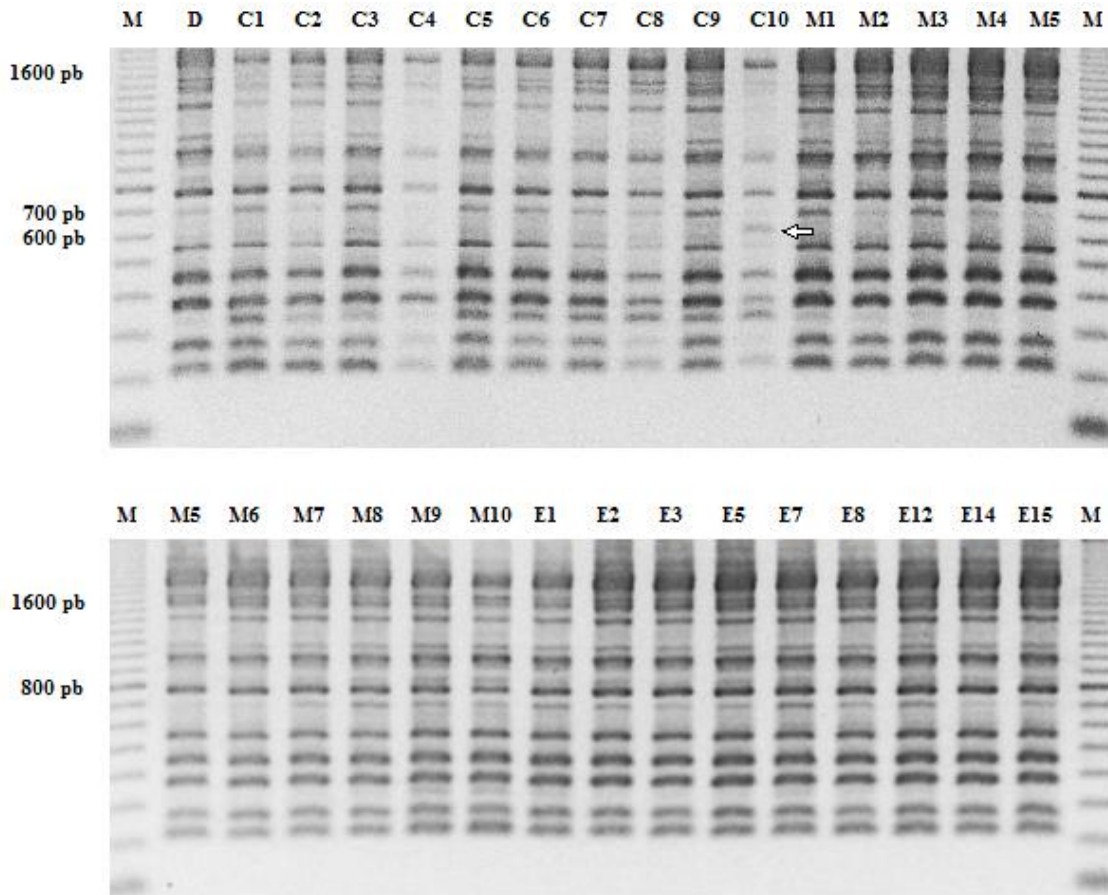


Figura II.28. Perfil de marcadores RAPDs obtenido con el oligonucleótido A1 en las muestras D (planta donante StopVert), C1 – C10 (muestras de callo procedente de la línea de callo embriogénica establecida a partir de una yema apical de StopVert), M1 – M10 (brotes axilares procedentes de la micropropagación de la planta madre) y E1 – E15 (plantas regeneradas a partir de los embriones somáticos de la línea de callo embriogénico). M = marcador de peso molecular (100 – 2000 pb). La flecha indica la presencia de una banda de un tamaño aproximado de 650 pb presente en la muestra de callo número 10 y ausente en el resto de muestras analizadas.

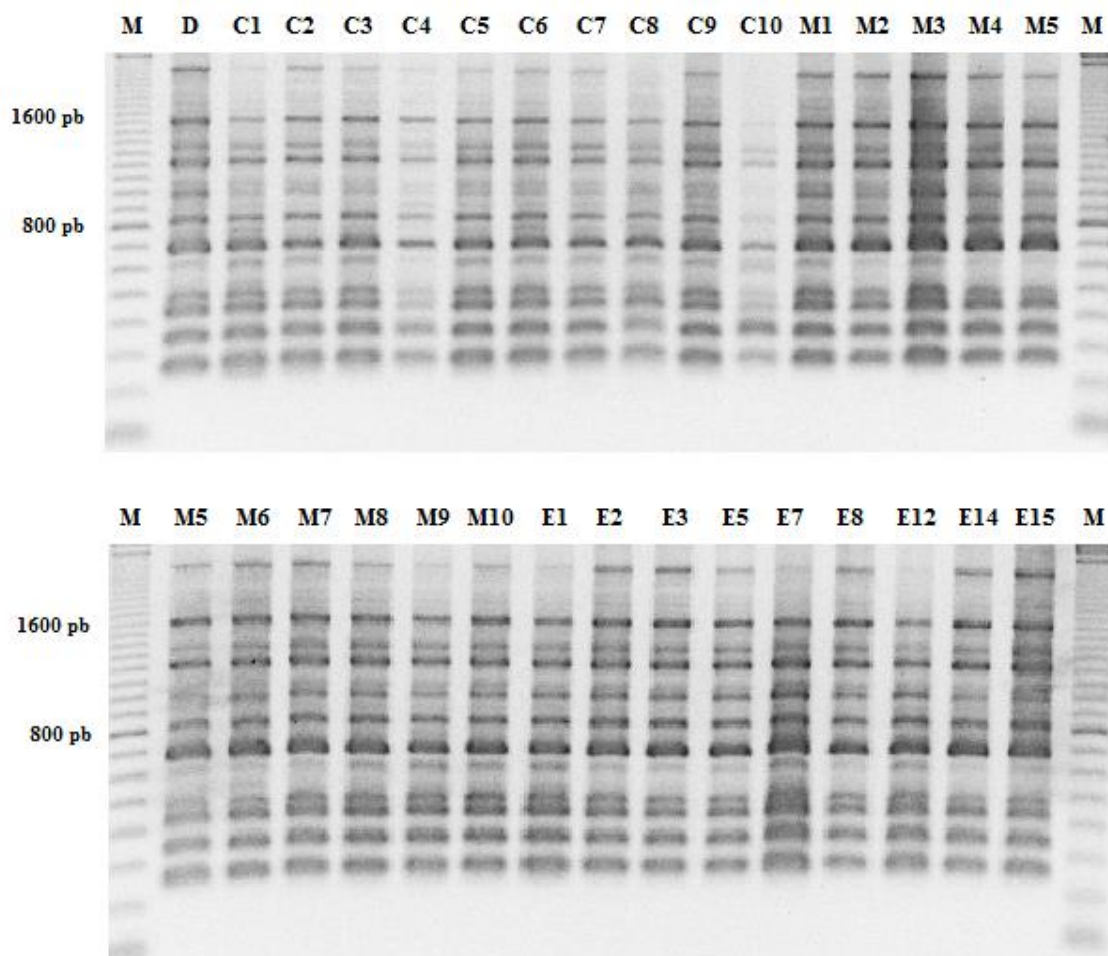


Figura II.29. Perfil de marcadores RAPDs obtenido con el oligonucleótido B7 en las muestras D (planta donante StopVert), C1 – C10 (muestras de callo procedente de la línea de callo embriogénica establecida a partir de una yema apical de StopVert), M1 – M10 (brotes axilares procedentes de la micropropagación de la planta madre) y E1 – E15 (plantas regeneradas a partir de los embriones somáticos de la línea de callo embriogénico). M = marcador de peso molecular (100 – 2000 pb).

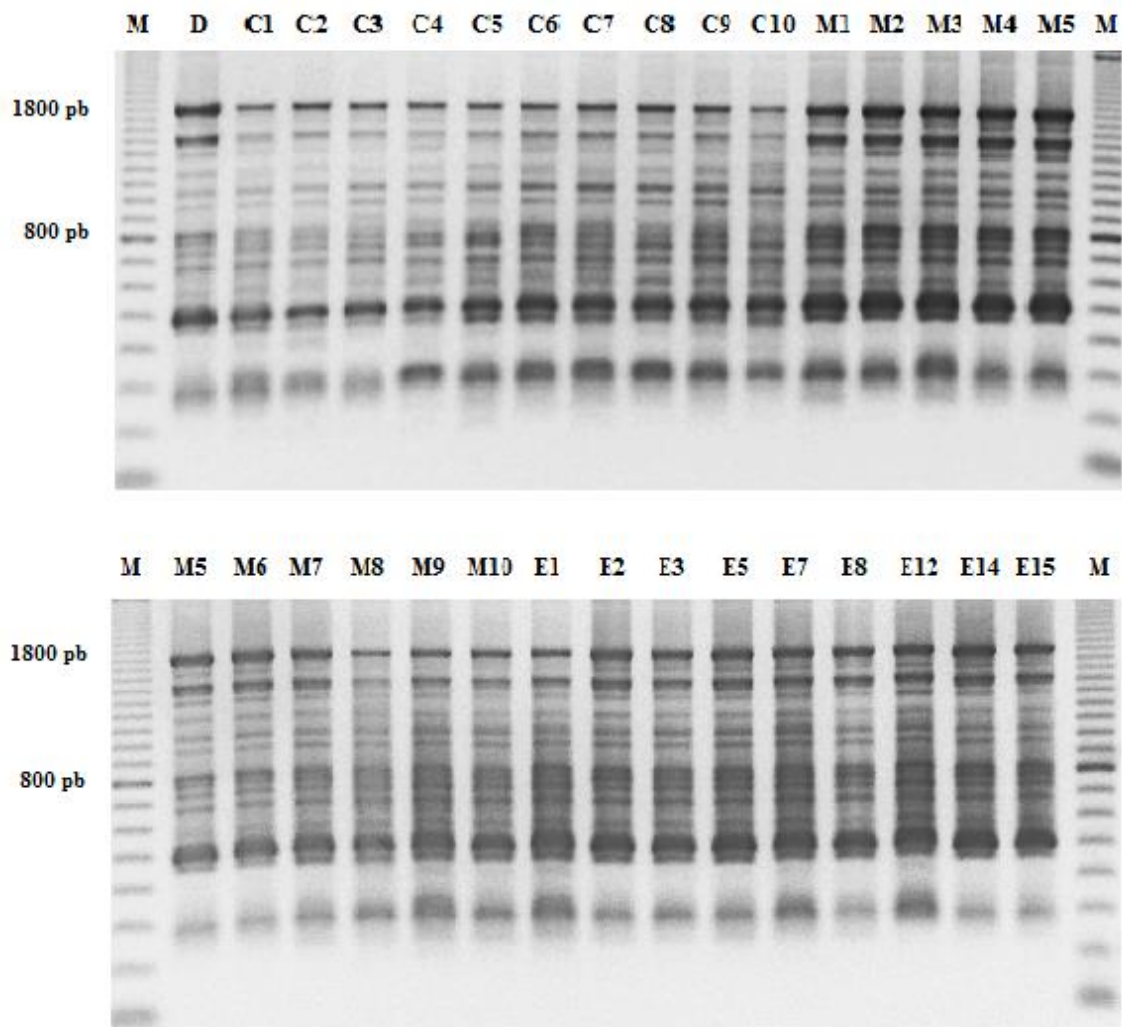


Figura II.30. Perfil de marcadores RAPDs obtenido con el oligonucleótido B15 en las muestras D (planta donante StopVert), C1 – C10 (muestras de callo procedente de la línea de callo embriogénica establecida a partir de una yema apical de StopVert), M1 – M10 (brotes axilares procedentes de la micropropagación de la planta madre) y E1 – E15 (plantas regeneradas a partir de los embriones somáticos de la línea de callo embriogénico). M = marcador de peso molecular (100 – 2000 pb).

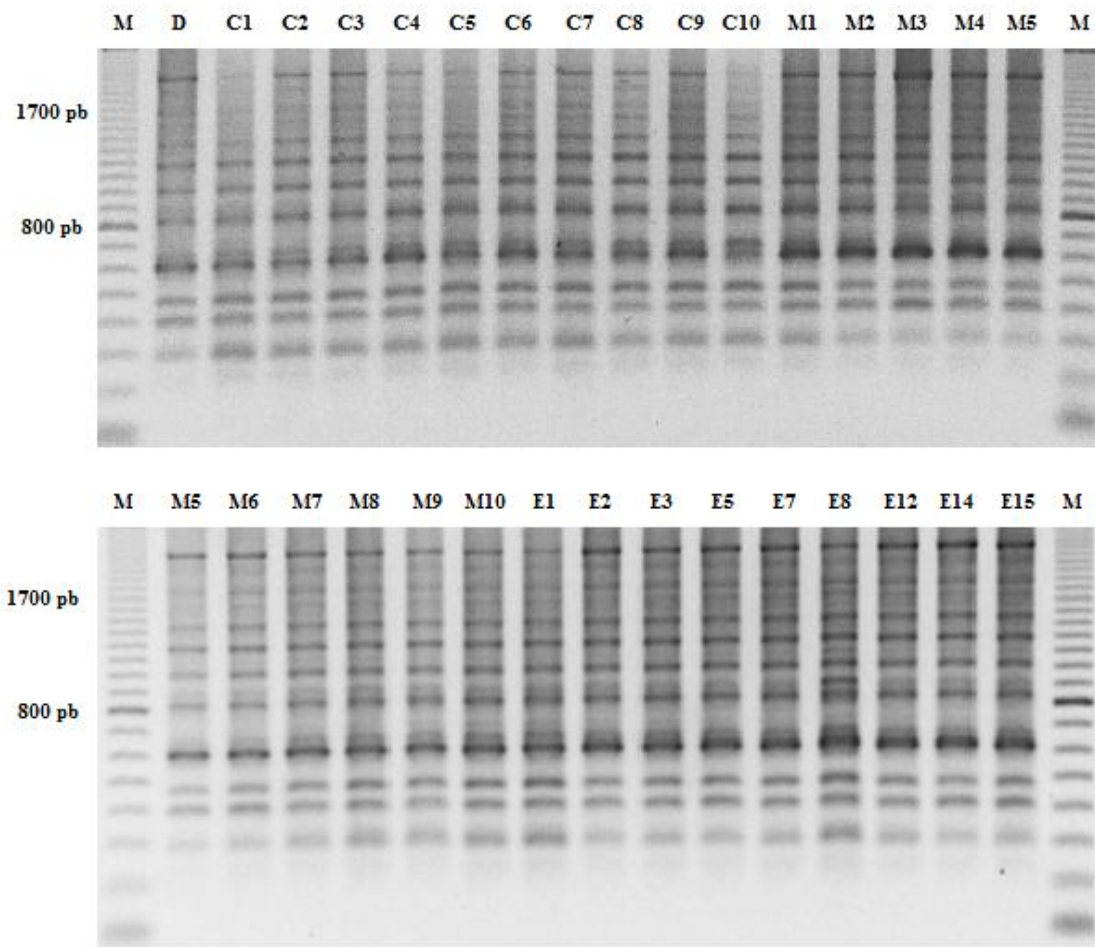


Figura II.31. Perfil de marcadores RAPDs obtenido con el oligonucleótido E19 en las muestras D (planta donante StopVert), C1 – C10 (muestras de callo procedente de la línea de callo embriogénica establecida a partir de una yema apical de StopVert), M1 – M10 (brotes axilares procedentes de la micropropagación de la planta madre) y E1 – E15 (plantas regeneradas a partir de los embriones somáticos de la línea de callo embriogénico). M = marcador de peso molecular (100 – 2000 pb).

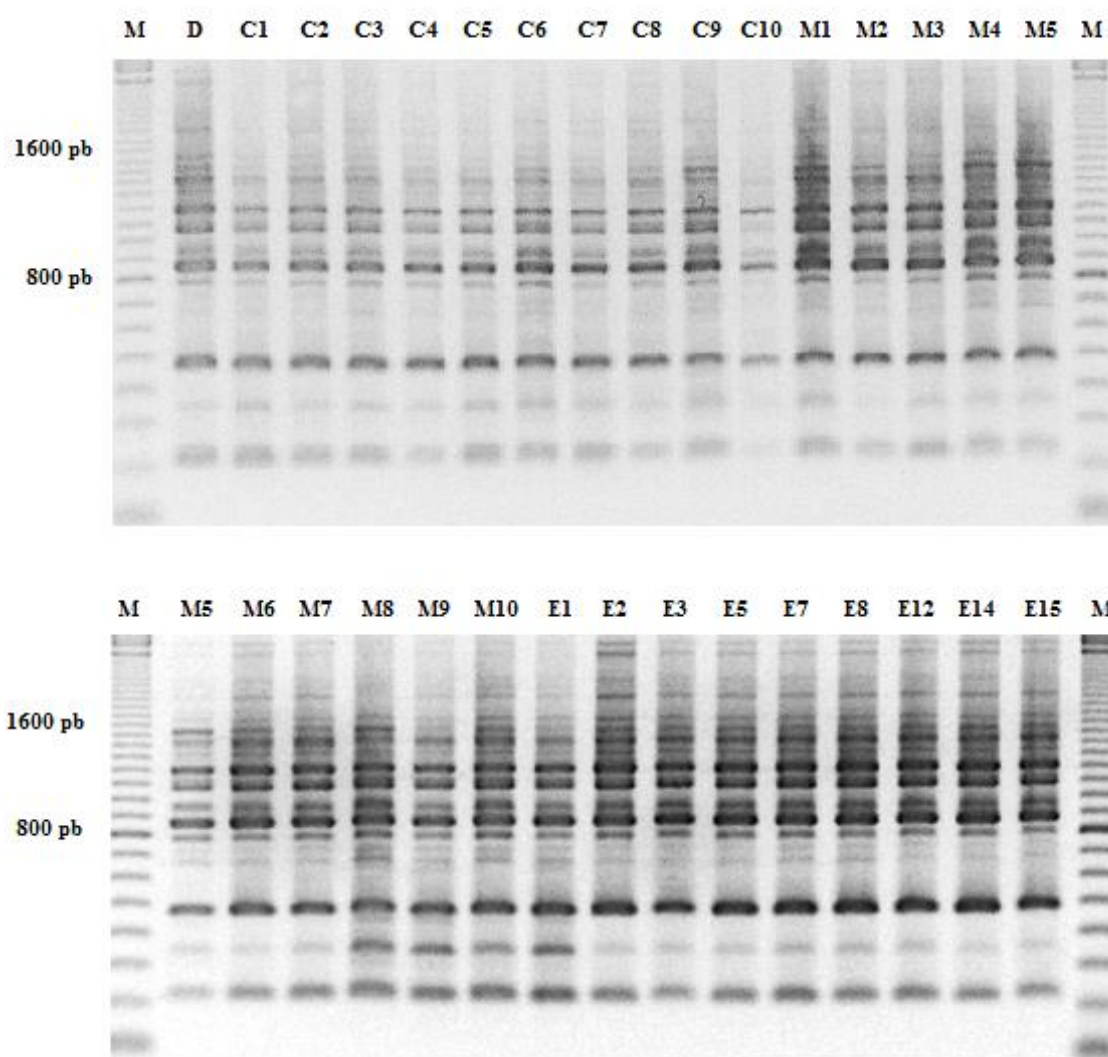


Figura II.32. Perfil de marcadores RAPDs obtenido con el oligonucleótido F10 en las muestras D (planta donante StopVert), C1 – C10 (muestras de callo procedente de la línea de callo embriogénica establecida a partir de una yema apical de StopVert), M1 – M10 (brotes axilares procedentes de la micropropagación de la planta madre) y E1 – E15 (plantas regeneradas a partir de los embriones somáticos de la línea de callo embriogénico). M = marcador de peso molecular (100 – 2000 pb).

El análisis de estabilidad genética realizado con estos 5 marcadores RAPDs mostró que el 100% de los brotes micropropagados y plantas regeneradas a partir de embriones somáticos, presentaban los mismos patrones de bandas generados que los de la planta donante. Sin embargo, se detectó un nivel de polimorfismo del 0.2% en las muestras de callo analizadas, concretamente, se observó una banda adicional de unos 650 pb en una de las muestras del callo embriogénico con el primer A1, siendo en total la tasa de variación, considerando todas las muestras analizadas, del 0.07% (Figura II.28).

II.5. DISCUSIÓN

II.5.1. Inducción de embriogénesis somática a partir de material adulto de olivo silvestre

La inducción de ES se ha observado en explantos de origen adulto tanto en olivo cultivado (Rugini y Caricato, 1995; Mazri et al., 2013) como en olivo silvestre (Capelo et al., 2010). Sin embargo, la capacidad embriogénica de este material es inferior a la del juvenil; de hecho, en embriones inmaduros, el proceso embriogénico puede observarse incluso en ausencia de reguladores del crecimiento (Rugini, 1988). La explicación a este hecho no está clara, se desconoce por qué las células de explantos adultos son menos propensas a la desdiferenciación y, por tanto, a ser reprogramadas, que las células juveniles; sin embargo, algunos autores indican que podría ser debido a procesos epigenéticos (Litz y Gray, 1995; von Arnold, 2008).

En la inducción del proceso embriogénico en material adulto, juegan un papel importante los siguientes factores: genotipo, pretratamiento de la planta madre, tipo de explanto, formulación mineral y relación auxina/citoquinina.

Dentro de una misma especie es posible que genotipos diferentes respondan de distinta manera a las mismas condiciones de cultivo; así, en nuestro caso, solo se obtuvo respuesta embriogénica en dos de los 5 genotipos testados, StopVert y Ac-18. En eucalipto, el porcentaje de inducción de ES varió entre los genotipos utilizados (Corredoira et al., 2015). No obstante, Correia et al. (2011) señalan que el efecto del genotipo debe interpretarse con cautela, ya que, aunque un genotipo en particular bajo las mismas condiciones de cultivo que otro responda en menor grado, esto no necesariamente indicaría que presenta una menor respuesta embriogénica, sino que en ese caso, es necesaria la optimización de las condiciones de cultivo. En cualquier caso, se puede afirmar que genotipos con alta capacidad embriogénica tienen requerimientos nutricionales y hormonales menos estrictos que genotipos con baja capacidad.

En relación al pretratamiento de la planta madre, en algunas especies, por ejemplo, tamarillo (Correia et al., 2011) y *Q. robur* (San-José et al., 2010), se ha empleado material rejuvenecido *in vitro* mediante proliferación de brotes axilares. En *Q. robur* se obtuvo una mayor respuesta empleando este tipo de material que al utilizar hojas procedentes de brotes de nuevo crecimiento en fitotrón (San-José et al., 2010). En olivo cultivado también se ha utilizado material micropropagado como fuente de explantos (Mazri et al., 2013). Rugini y Caricato (1995) recomendaron la utilización de hojas y peciolo procedentes de brotes regenerados por organogénesis adventicia a partir de peciolo, para inducir ES. Por el contrario, en olivo silvestre, Capelo et al. (2010) utilizaron explantos de brotes enraizados en invernadero, por lo que señalan que no es necesario el establecimiento previo del material *in vitro*. En nuestro trabajo, se emplearon explantos aislados de brotes de olivo silvestre que previamente habían sido establecidos *in vitro*, lo que presenta numerosas ventajas, como la no esterilización del material vegetal inmediatamente antes de su utilización, así como la

disponibilidad de explantos en cualquier momento del año, además de un mejor estado fisiológico que favorece la respuesta *in vitro*, confirmando las observaciones de Corredoira et al. (2015).

La elección del tipo de explanto es crucial en la inducción del proceso. En olivo cultivado, los explantos más utilizados son hojas y peciolo (Rugini y Caricato, 1995; Mazri et al., 2013), al igual que en olivo silvestre (Capelo et al., 2010). En el presente trabajo, en el que se emplearon 3 tipos de explanto distintos, hojas, peciolo y ápice caulinar, se observó un mejor aspecto de los cultivos derivados de ápice caulinar; de hecho, solo se logró obtener cultivos embriogénicos de los genotipos StopVert y Ac-18, a partir de este explanto, siendo la primera vez que se induce ES en olivo a partir de yema caulinar. En otras especies leñosas se han empleado hojas procedentes de material adulto (Pinto et al., 2002; Loureiro et al., 2005; San-José et al., 2010; Fernandes et al., 2011; Corredoira et al., 2015) o yemas caulinares (San-José et al., 2010; Corredoira et al., 2015). Estos últimos autores, observaron que, en eucalipto, el explanto más reactivo fue la yema apical, seguido de las hojas del primer y segundo nudo. Se ha sugerido que la yema apical y las hojas del primer nudo, las más cercanas al ápice, son los explantos más efectivos para la inducción de ES, debido posiblemente a la alta capacidad de proliferación y dediferenciación celular, además de su estado de crecimiento activo (Corredoira et al., 2015). Nuestros resultados confirman la mayor capacidad embriogénica de los ápices caulinares en olivo silvestre. Sin embargo, en cultivos embriogénicos de roble obtenidos a partir de yema caulinar, se ha observado que el meristemo apical no sobrevive en el medio de cultivo, por lo que posiblemente, las masas embriogénicas obtenidas deriven de los primordios foliares o de las yemas axilares (San-José et al., 2010).

En olivo cultivado, se ha utilizado la formulación mineral MS, con un alto contenido en amonio, con los macro y micronutrientes a la mitad (MS ½) (Mazri et al., 2013), así como la formulación OMc (Rugini y Caricato, 1995). De igual forma, en olivo silvestre también se ha utilizado MS (Capelo et al., 2010). En este trabajo, se emplearon ambas formulaciones; sin embargo, solo se obtuvieron resultados positivos con MS ½, en contraposición a los resultados de Capelo et al. (2010).

En la mayoría de las especies estudiadas, tanto las auxinas como las citoquininas, son necesarias para la inducción de la respuesta embriogénica. Después del tratamiento hormonal, algunas células adquieren capacidad embriogénica y ésta es expresada en un medio sin auxina o con baja concentración de la misma, dependiendo de la especie. En material juvenil tanto de olivo cultivado (Mitrakos et al., 1992) como silvestre (Orinos y Mitrakos, 1991), se ha logrado inducir el proceso en un medio con alta relación auxina/citoquinina (25 µM IBA – 2.5 µM 2iP). Sin embargo, en material adulto de olivo cultivado se ha observado inducción embriogénica en medios con mayor concentración de citoquinina que de auxina (30 µM TDZ – 0.5 µM ANA) en la variedad Dahbia (Mazri et al., 2013), así como en los cultivares Canino y Moraiolo (0.50 µM 2iP, 0.44 µM BA – 0.25 µM IBA) (Rugini y Caricato, 1995). En olivo silvestre, Capelo et al. (2010) obtuvieron los mejores resultados empleando una alta relación auxina/citoquinina (12.25 µM IBA – 4.56 µM Zea); de hecho, estos autores observaron que

una menor concentración de auxina producía un bajo porcentaje de respuesta embriogénica e incluso, concentraciones similares a las empleadas por Mazri et al. (2013) solo inducían la formación de callo en los explantos. En nuestro caso, solo se obtuvo callo embriogénico en el medio propuesto por Mazri et al. (2013), indicando que una elevada concentración de citoquinina (TDZ) y baja concentración de auxina (ANA) es necesaria para la inducción del proceso en los genotipos de olivo silvestre testados. En algunas especies, como *Arachis hypogaea*, se ha observado que el TDZ es más efectivo que las auxinas para la inducción de embriogénesis directa (Murthy et al., 1995). Asimismo, esta hormona se ha relacionado con la síntesis de auxinas endógenas (Murthy et al., 1998) o con la modificación de la membrana plasmática, así como con la asimilación, transporte y absorción de nutrientes en la célula; sin embargo, el mecanismo de acción de este compuesto no está claro (Guo et al., 2010).

Los porcentajes de inducción de ES a partir de material de origen adulto son muy variables y, en general, menores a los obtenidos con el empleo de tejido juvenil. En la variedad de olivo cultivado Dahbia, Mazri et al. (2013) lograron un porcentaje de inducción en torno al 10% empleando la parte basal de la hoja. Capelo et al. (2010), en olivo silvestre, obtuvieron un 27.6% a partir de explantos procedentes de la zona apical de la hoja, mientras que en peciolo y región intermedia de la hoja los porcentajes de inducción de callo embriogénico fueron del 13.15% y 2.28%, respectivamente. El éxito de inducción de ES en este trabajo, siguiendo la metodología empleada por Mazri et al. (2013), fue relativamente bajo, 5% en los genotipos StopVert y Ac-18; sin embargo, empleando el protocolo de Capelo et al. (2010) para olivo silvestre y utilizando el mismo tipo de explanto, no se obtuvieron resultados positivos. En nuestro caso, el empleo de una fase líquida de corta duración fue clave en la inducción del proceso; probablemente porque en medio líquido se favorece la absorción de los reguladores de crecimiento y de los nutrientes (Thorpe et al., 2008).

El cultivo de embriones somáticos en medio líquido permite incrementar la tasa de proliferación, así como una mejor sincronización del material; no obstante, el cultivo prolongado en estas condiciones puede inducir degeneración y pérdida de la capacidad embriogénica, así como un incremento de variación somaclonal (von Arnold, 2008). Cultivos embriogénicos de olivo de origen juvenil se mantuvieron proliferando en medio líquido durante más de un año, observándose una reducción de la capacidad de proliferación de callo después de 2 meses en estas condiciones junto a una disminución drástica en la tasa de conversión en plantas con el tiempo en cultivo (76% después de 2 meses y 24% transcurrido un año) (Cerezo et al., 2011b). En este trabajo, el cultivo en medio líquido de las células embriogénicas de olivo silvestre tuvo efectos muy negativos, de manera que el material degeneró tras el primer subcultivo y no fue posible su mantenimiento en estas condiciones, mientras que en medio sólido se obtuvo una tasa de proliferación estable.

En relación con la maduración de embriones somáticos, en material juvenil de olivo cultivado, Cerezo et al. (2011a) observaron que en torno al 18% de los embriones maduraron en medio ECO con membrana de acetato de celulosa y en presencia de carbón activo, mientras que en este trabajo, siguiendo el mismo protocolo, se obtuvo un porcentaje de maduración del 59.3%. En cuanto a la conversión de los embriones maduros, Cerezo et al.

(2011a) obtuvieron un porcentaje del 37.8%, mientras que el porcentaje de germinación de brote fue del 66.7%. En olivo adulto, únicamente Rugini y Caricato (1995) regeneraron plantas a partir de embriones somáticos de los cultivares Canino y Moraiolo, aunque no se indican los datos de germinación. En el genotipo StopVert de olivo silvestre se obtuvo un porcentaje de germinación de brotes del 35.4%. Hasta el momento, este es el primer trabajo donde ha sido posible la regeneración de plantas a partir de material de origen adulto en olivo silvestre vía ES.

II.5.2. Análisis de estabilidad genética del material de olivo silvestre StopVert

El sistema de regeneración juega un papel fundamental en la estabilidad genética del material obtenido. En el caso del olivo multiplicado *in vitro* mediante proliferación de axilares, se han obtenido resultados contradictorios; así, mientras que García-Férriz et al. (2002) y Leva y Petruccelli (2012) no observaron cambios ni en el fenotipo ni en el patrón de bandas mediante RAPDs en el material micropropagado de distintos cultivares españoles y el italiano Maurino, respecto al de partida, Peyvandi et al. (2009) y Farahani et al. (2011) obtuvieron resultados opuestos en algunos cultivares iraníes. En esta línea, Briccoli-Bati et al. (2006) también obtuvieron resultados diferentes en función del genotipo; así, en el cv. Carolea, las plantas micropropagadas mostraron muy baja producción durante los primeros 8 años de plantación en campo. En nuestro caso, el material del genotipo StopVert micropropagado mediante brotación de axilares y mantenido *in vitro* durante al menos 36 meses, utilizado como control, mostró el mismo patrón de bandas que la planta donante, tal y como se ha observado en otros genotipos de olivo silvestre y en la especie *O. maderensis* (Brito et al., 2010). En otras especies como *Ficus carica*, tampoco se han detectado alteraciones morfológicas en material obtenido mediante proliferación de axilares, pero sí se obtuvo un 5.5% de polimorfismo usando marcadores RAPDs (Dessoky et al., 2016).

En el proceso de regeneración mediante organogénesis adventicia, algunos autores han detectado variaciones en el fenotipo de las plantas regeneradas como, por ejemplo, Wang et al. (2012) en *Clivia muniata*, mientras que en olivo cultivado, los brotes adventicios procedentes de callo originado de cotiledón mostraron dicotomía o presencia de hojas dobles (Cañas y Benbadis, 1988). Por su parte, Mencuccini y Rugini (1993) no encontraron diferencias morfológicas en las plantas regeneradas mediante organogénesis indirecta a partir de peciolo.

En relación con el material de olivo regenerado vía embriogénesis somática, también se han obtenido resultados contradictorios; así, mientras que Leva et al. (1995) y Shibli et al. (2001) no observaron cambios en el aspecto o la morfología de las plantas obtenidas, Bradaï et al. (2016) observaron un fuerte efecto del genotipo en material de las distintas líneas embriogénicas procedentes de semilla, con una disminución de la capacidad de regeneración asociada a la edad del cultivo. Las variaciones fenotípicas observadas (tallo fasciado, 3 brotes por verticilo, hojas dobles, flores con pétalos y sépalos alternados) eran más frecuentes en el material mantenido durante más tiempo en cultivo (8 años vs 2 años). Estos resultados

confirman observaciones previas de Karp (1994), sobre el importante efecto del genotipo y tiempo de cultivo en la VS; en particular, si tiene lugar una larga fase de proliferación de callo, lo que podría conllevar la aparición de alteraciones generadas por una rápida replicación del ADN y división celular *in vitro* (Wang y Wang, 2012). En esta línea, Leva et al. (2012) obtuvieron 2 fenotipos variantes, a partir de embriones somáticos derivados de cotiledón, en el cultivar Fragivento, denominados BOS y COS, con distinto hábito de crecimiento; BOS presentaba fenotipo arbustivo, mientras que COS mostraba una fuerte dominancia apical. Contrariamente, en nuestro caso, no se observaron alteraciones morfológicas del material procedente de ES del genotipo StopVert.

Los marcadores moleculares también se han utilizado, en ocasiones, como complemento a las observaciones morfológicas para dilucidar la ocurrencia de VS en el material regenerado vía ES. Lopes et al. (2009), en olivo cultivado y en la especie *O. maderensis*, no detectaron alteraciones entre el material embriogénico y la planta donante mediante el uso de marcadores SSR; en nuestro caso, tampoco se detectaron variaciones en el genotipo StopVert entre la planta donante, material micropropagado vía brotes axilares, callo embriogénico y brotes regenerados a partir de este callo empleando la misma técnica. Sin embargo, en otras especies, como por ejemplo, en alcornoque (Lopes et al., 2006) y *Q. robur* (Wilhelm et al., 2005), se ha obtenido un alto grado de polimorfismo, empleando marcadores SSR, en los embriones somáticos pero, curiosamente, no en las plantas derivadas de ellos.

Los marcadores RAPDs también han sido ampliamente utilizados para detectar VS. Jayanthi y Mandal (2001), Correia et al. (2011), Fernandes et al. (2011) y Singh et al. (2016) no detectaron variaciones en las plantas regeneradas de *Tylophora indica*, tamarillo, *Q. suber*, y *Sapindus mukorossi* Gaertn, respectivamente, al utilizar estos marcadores. Sin embargo, Peyvandi et al. (2010) sí observaron VS en plantas de olivo de la variedad Koroneiki regeneradas vía ES, a partir de material juvenil. En este trabajo, todos los perfiles RAPDs generados con los 5 oligonucleótidos eran monomórficos, excepto para una de las muestras de callo en la que se observó la presencia de una banda a la altura de 650 pb en la amplificación con el primer A1, ausente en el resto de muestras analizadas. La presencia de variaciones en callo pero no en las plantas regeneradas también se ha observado en otras especies como *Picea glauca* mediante marcadores RAPDs (De Verno et al., 1999). Una posible explicación a este hecho, sería la generación de mutaciones de novo durante los procesos de diferenciación-desdiferenciación *in vitro* (Jain et al., 1998; Rani y Raina, 2000). Los callos estarían formados por una mezcla de células estables y no estables, y solo aquellas que tienen un genoma no alterado podrían regenerar (De Verno et al., 1999; Miñano et al., 2014).

En este trabajo, la amplificación de fragmentos del genoma mediante la técnica RAPD resultó ser más eficiente en la detección de polimorfismos que el estudio de regiones microsatélites. Las plantas regeneradas mostraron uniformidad mediante el uso de ambos marcadores moleculares, por lo que el protocolo utilizado para la inducción de ES a partir de material de origen adulto no produjo alteraciones genéticas detectables por estos marcadores.

Aun así, no es posible asegurar la fidelidad genética total, ya que dichas técnicas analizan solo una parte del genoma. No obstante, es recomendable el uso de estos y otros marcadores junto a una exhaustiva caracterización morfológica para evaluar protocolos de regeneración vía ES y así detectar en fases tempranas la posible ocurrencia de alteraciones.

En resumen, se ha logrado la inducción de embriogénesis somática de material adulto de dos genotipos de olivo silvestre, StopVert y Ac-18, resistentes a Verticilosis, utilizando como explanto yemas apicales procedentes de tallos micropropagados. Asimismo, se han regenerado plantas a partir de embriones somáticos del genotipo StopVert y se ha analizado el material obtenido mediante marcadores moleculares. Aparentemente, la tasa de variación somaclonal en este sistema, estimada mediante marcadores moleculares SSR y RAPDs, es muy baja. El material embriogénico obtenido podrá utilizarse para estudios funcionales con el fin de descifrar las bases genéticas de la tolerancia de este genotipo a la Verticilosis. Asimismo, a pesar de que la eficiencia de inducción de callo embriogénico es baja, 5%, la transferencia de este protocolo a genotipos de olivo cultivado permitiría disponer de una herramienta de enorme valor para la posterior aplicación de técnicas biotecnológicas, como la transformación genética, ya puesta a punto para material juvenil, o la edición del genoma.

**Chapter III. Usage of the expression of
the antimicrobial gene *afp* from
Aspergillus giganteus for
increasing fungal resistance in
olive**



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

III.1. SUMMARY

The antifungal protein AFP produced by *Aspergillus giganteus*, encoded by the *afp* gene, has been used to confer resistance against a broad range of fungal pathogens in several crops. In this research, transgenic olive plants expressing the *afp* gene under the control of the constitutive promoter CaMV35S have been generated and their disease response against two root infecting fungal pathogens, *Verticillium dahliae* and *Rosellinia necatrix*, has been evaluated. Embryogenic cultures derived from a mature zygotic embryo of cv. Picual were used for *A. tumefaciens* transformation. Five independent transgenic lines were obtained, showing a variable level of *afp* expression in leaves and roots. None of these transgenic lines showed enhanced resistance to *Verticillium* wilt. However, some of the lines displayed a degree of incomplete resistance to white root rot caused by *R. necatrix* compared with disease reaction of non-transformed plants or transgenic plants expressing the GUS gene. The level of resistance to this pathogen correlated with that of the *afp* expression in root and leaves. A transgenic line, AFP13, that was resistant to kanamycin but did not contain the *afp* gene was also recovered. This line showed complete, symptomless resistance to and a degree of incomplete resistance to the non-defoliating and defoliating pathotypes of *V. dahliae*, respectively. A RAPD analysis of DNA from these plants showed a pattern of amplification different from that of controls, suggesting that resistance to *Verticillium* wilt in the AFP13 line might be due to a somaclonal variation induced during in vitro regeneration. Our results indicate that the *afp* gene can be useful for enhanced resistance to *R. necatrix* in olive, but this gene does not protect against *V. dahliae*.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

III.2. INTRODUCTION

Genetic transformation can be a useful approach for the development of resistance against several plant pathogens. Increased resistance against fitopathogenic fungi has been achieved in several plant species through overexpression of plant antifungal genes, such as those encoding chitinase or glucanase (Ceasar and Ignacimuthu, 2012). However, main limitations of this strategy are the low level of resistance achieved with the introduction of a single gene and the narrow range of pathogens to which resistance is acquired (Dana et al., 2006). The use of genes from fungi or bacteria encoding for antifungal activities, such as those isolated from *Trichoderma harzianum* encoding for the antimicrobial (AM) proteins chitinase and glucanase, has proven to be a more successful strategy (Lorito et al., 1998; Bolar et al., 2001; Mercado et al., 2015). These AM proteins protect higher eukaryotes against invading pathogens, whereas in lower eukaryotes and prokaryotes they seem to have a role in competition for nutrients between species that share the same ecological niche (Hegedüs and Marx, 2013). The mold *Aspergillus giganteus* produces a small, basic and cysteine-rich AM protein that allows for antagonism against filamentous fungi. This protein, named antifungal protein (AFP), is secreted as a 91-amino acid inactive precursor containing a signal sequence for secretion and a prosequence that is removed by a protease during the process of secretion (Wnendt et al., 1994; Martínez-Ruiz et al., 1997). The prosequence maintains the protein inactive until it has crossed the plasma membrane. The mature AFP protein contains 51 amino acids and its structure is similar to the plant defensins and γ -thionins (Campos-Olivas et al., 1995; Lacadena et al., 1995). The antifungal mechanism of AFP is not fully understood. The AFP protein disturbs the integrity of the plasma membrane and inhibits chitin biosynthesis in sensitive fungi (Leiter et al., 2017). Additionally, AFP may enter the host cell, binding to fungal nucleic acids and promoting charge neutralization and condensation of DNA (Martinez Del Pozo et al., 2002; Moreno et al., 2006). However, it is not yet clear whether the binding affinity of AFP to DNA contributes to its antifungal activity.

The expression of the *afp* gene in transgenic plants enhanced resistance to diseases in rice (Coca et al., 2004; Moreno et al., 2005), wheat (Oldach et al., 2001; Li et al., 2008) and pearl millet (Girgi et al., 2006) caused by a broad range of fungal pathogens, e.g., *Magnaporthe grisea*, *Fusarium* spp., *Blumeria (Erysiphe) graminis* f. sp. *graminis*, *Puccinia recondita*, *Puccinia substriata*, and *Sclerospora graminicola*. The aim of the present study was to investigate if the ectopic expression of the *afp* gene from *A. giganteus* enhances resistance to Verticillium wilt caused by the D V. *dahliae* pathotype and White root rot caused by *R. necatrix* in olive plants. To this purpose, embryogenic cultures derived from a seed of cv. Picual were transformed with the *afp* gene and the disease response against both pathogens of the transgenic plants recovered was assessed.

III.3. MATERIALS AND METHODS

III.3.1. Plant material

Olive (*Olea europaea* L.) embryogenic calli, line P1, were induced from an excised radicle of a mature zygotic embryo of cv. Picual, following the protocol described by Orinos and Mitrakos (1991). Embryogenic cultures were maintained in olive cyclic embryogenesis medium (ECO medium) in darkness at 25±2°C and transferred to fresh medium at 4 week intervals (Pérez-Barranco et al., 2009).

III.3.2. Binary vector

A DNA fragment containing a synthetic *afp* gene fused to a signal peptide from the secreted tobacco AP24 protein (Melchers et al., 1993) was isolated from the pCubi::synt-afp::nos plasmid (Coca et al., 2004) using appropriate restriction enzymes. This fragment was cloned in the pBIN61 plasmid, a pBIN19 derived plasmid, under the control of the constitutive promoter CaMV35S. This binary vector, containing the *nptII* gene for plant selection, was introduced into the disarmed *A. tumefaciens* strain AGL1 (Lazo et al., 1991) by the freeze-thaw method (Höfgen and Willmitzer, 1988).

III.3.3. Olive genetic transformation

Agrobacterium cultures were incubated at 28°C in LB medium supplemented with 10 mg/L rifampicin and 50 mg/L kanamycin, at 250 rpm. Before embryogenic callus inoculation, the bacterial suspension was centrifuged at 5000 g, the pellet washed with 10 mM MgSO₄ and finally diluted in ECO medium at 0.5-0.6 OD₆₀₀.

Globular somatic embryos from the embryogenic line P1 were transformed using the protocol described by Torreblanca et al. (2010). The explants were incubated in a diluted *Agrobacterium* culture for 20 min under mild agitation. Then, explants were blotted dried on sterile filter paper and cultured on ECO solid medium in Petri dishes at 25°C in darkness for 2 days. After that, explants were washed with 5 ml ECO liquid medium supplemented with 250 mg/L cefotaxime and timentin at 25°C for 2h, blotted dried gently on sterile filter paper and cultured on selection medium, i.e. ECO solid medium supplemented with 250 mg/L of cefotaxime, 250 mg/L of timentin and 200 mg/L of paromomycin. Explants were incubated in darkness for at least four months with reculturing on fresh selection medium at weekly intervals during the first month and bi-weekly thereafter. Later on, subculturing in the selection medium was performed every 4 weeks. Explants that showed proliferation in the solid selection medium were grown individually in 250 ml culture flasks containing 40 ml of ECO liquid medium supplemented with 250 mg/L of cefotaxime and 50 mg/L of paromomycin (Duchefa Biochemie) in an orbital shaker at 120 rpm for two cycles of 3 weeks. After that,

embryogenic calli were filtered through a 2 mm mesh and somatic embryos obtained were used for plant regeneration following the protocol of Cerezo et al. (2011a). Briefly, somatic embryos were cultured on maturation ECO medium, basal ECO medium without growth regulators and cefotaxime, supplemented with 1g/L activated charcoal and 200 mg/L of paromomycin for 8 weeks. Then, matured embryos were transferred to germination medium (Clavero-Ramírez and Pliego-Alfaro, 1990), modified MS with 1/3 MS macroelements, MS microelements, 10 g/L sucrose and supplemented with 200 mg/L paromomycin, for 3 months under 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ irradiance level. Plantlets were micropropagated in DKW medium (Driver and Kuniyuki, 1984) as modified by Revilla et al. (1996) for 9 weeks, and later acclimatized to *ex vitro* conditions in jiffy trays with peat moss:perlite (1:1). Plants were grown in a confined greenhouse with a cooling system, 30°C maximum temperature, under natural temperature and day light conditions. Plants recovered from an embryogenic line transformed with pBINUbiGUSInt plasmid (Torreblanca et al., 2010) expressing the GUS reporter gene, as well as those recovered from non-transformed embryogenic calli were used as controls.

III.3.4. Phenotypical analysis of transgenic plants

III.3.4.1. Evaluation of multiplication capacity of AFP lines

To evaluate the *in vitro* behaviour of transgenic AFP lines, shoot segments with two nodes and deprived of the shoot apex, approximately 1.5 to 2 cm long, were isolated and cultured on RP medium (DKW macro and micronutrients as modified by Roussos and Pontikis, (2002)), and vitamins of Roussos and Pontikis (2002), supplemented with 2 mg/L zeatin riboside (Vidoy-Mercado et al., 2012) for 8 weeks. The number of axillary shoots and their length were measured over three subcultures.

III.3.4.2. Evaluation of rooting capacity of AFP lines

To evaluate rooting capacity, 2 cm long apical shoots with one or two nodes were cultured on tubes containing 3 ml of basal RP medium supplemented with 10 mg/L IBA for 3 days. Then, shoots were cultured on RP solid medium without hormones but supplemented with 1 g/L activated charcoal. The number of roots and the length of the main root were measured after 9 weeks. Twenty shoots per independent transgenic line were used and the experiment was performed by triplicate.

III.3.4.3. Characterization of *ex vitro* AFP plants

Plant height and the diameter of the main stem were measured in one year old plants growing in the greenhouse under natural conditions. Fifteen plants per transgenic and control lines were evaluated.

III.3.5. Molecular analysis of transgenic plants

III.3.5.1. PCR analysis

The transgenic nature of *afp* transgenic plants was confirmed by PCR amplification of a 200 bp fragment from the *afp* gene and a 700 bp fragment from *nptII*. Genomic DNA was isolated from leaves of *in vitro* plants using the protocol of Healey et al. (2014). Primers for PCR assays were F: 5'-TCCTCCTTCGTCTTCTTCCT-3 and R: 5'-ACTTGCCCTTG TAGCTGTCG-3' for *afp*, and F: 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3' and R: 5'-ATCGGGAGCGGCGATAACCGTA -3 for *nptII*. All reactions were prepared in a final volume of 20 µl containing 0.5 µl of genomic DNA and 0.5 µM of each primer. Amplification conditions consisted in 4 min at 95°C, followed by 30 cycles of 45 s at 95°C, 45 s at 59°C and 1 min at 72°C, with a final extension step of 10 min at 72°C.

III.3.5.2. qRT-PCR analysis

Young leaves and roots from control and AFP plants were collected, frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until used for RNA extraction. Root tissue, 2 g, was powdered in liquid nitrogen and RNA extracted as described by Chang et al. (1993). After extraction, RNA was precipitated overnight with 10 M LiCl, washed with ethanol 70% and resuspended in RNase free water. RNA from leaves was extracted with the Spectrum™ Plant Total RNA kit (Sigma-Aldrich) following manufacturer's instructions. RNA concentration and purity was assessed using NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies Inc., Montchanin, DE, USA). The integrity of RNA samples was visualized on a 1.5% agarose gel under non-denaturing conditions. To remove genomic DNA, RNA was treated with DNase I recombinant, RNase free (Roche). cDNA synthesis was carried out with iScript™ cDNA synthesis kit (Bio-Rad), according to the manufacturer's instructions.

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed using iTaq™ Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) in a final reaction volume of 20 µl containing 0.5 µM of each primer and 1 µl of diluted cDNA, in a Bio-Rad CFX96™ (Bio-Rad). Primers for *afp* amplification were F: 5'-CCATCTGCAAGTGCTACGTC-3' and R: 5'-ACTTGCCCTTG TAGCTGTCG-3'. The olive Ubiquitin gene (F: 5'-ATGCAGATCTTTGTGAAGAC-3'; R: 5'-ACCACCACGAAGACGGAG-3') was used as housekeeping gene for normalization (Gómez-Jiménez et al., 2010). PCR conditions were 30 s at 95°C, 40 cycles of 5 s at 95°C and 30 s at 60°C, followed by a melting curve from 65 to 95°C with 0.5°C increment every 5 s. Relative *afp* expression levels in leaves and roots were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). Three biological replicates, with three technical replicates each, were analysed, and means±standard deviations were represented.

III.3.5.3. RAPDs analysis

For RAPDs analysis, genomic DNA was extracted from leaves of proliferating shoots from the non-transformed P1 line, transgenic GUS line, and AFP13 line, following the protocol of Gawel and Jarret (1991). RAPD profiles were generated using eleven arbitrary primers from Operon Technologies Inc. (Alameda/CA, USA): A1 (5'-CAGGCCCTTC-3'), A11 (5'-CAATCGCCGT-3'), B7 (5'-GGTGACGCAG-3'), B15 (5'-GGAGGGTGT-3'), E19 (5'-ACGGCGTATG-3'), F1 (5'-ACGGATCCTG-3'), F3 (5'-CCTGATCACC-3'), F4 (5'-GGTGATCAGG-3'), F10 (5'-GGAAGCTTGG-3'), O7 (5'-CAGCACTGAC-3') and O10 (5'-TCAGAGCGCC-3'). DNA amplification reactions were performed in a volume of 25 µl containing approximately 10 ng total DNA, 0.8 µM of single decanucleotide, 1.5 units MyTaqTM DNA Polymerase (5 U/µl) in MyTaq reaction buffer (Bioline) containing dNTPs and MgCl₂. Amplifications were performed in a DNA Mastercycler (Eppendorf) using one cycle of 2 min at 94°C, followed by 35 cycles of 45 s at 92°C, 1 min at 37°C and 2 min at 72°C, and a final cycle of 10 min at 72°C. Aliquots of 12 µl of amplification products were loaded onto 1.5% (w/v) agarose gels for electrophoresis using 1× TBE running buffer, followed by staining with ethidium bromide. Molecular weights were estimated by reference to a 100 Base-Pair Ladder (GE Healthcare). All of the amplifications were repeated at least twice, and only bands reproducible in several runs were considered for analysis.

III.3.6. *Verticillium dahliae* infection assay

Disease reaction of AFP transgenic lines to *Verticillium* wilt was assessed as previously described (Jiménez-Fernández et al., 2016; Palomares-Rius et al., 2016) using plants from P1 embryogenic callus (non-transgenic) and transgenic pBINUbiGUSInt (GUS) as controls. A wild olive genotype, StopVert, highly resistant to *Verticillium* wilt was also included in the assays (Jiménez-Fernández et al., 2016). All plants had been grown in 12 cm diameter plastic pots containing peat moss-perlite substrate at 1:1 ratio with 2 g of osmocote fertilizer, in a confined greenhouse under natural temperature and photoperiod for over 8 months before being used for disease reaction assays.

Monosporic *V. dahliae* isolate V-138 (D pathotype, lineage 1A, race 2; Milgroom et al., 2016; Jiménez-Díaz et al., 2017) was used in initial experiments. For inoculum preparation, 12 discs of 1 week old V-138 cultures grown on Potato Dextrosae Agar (PDA) were transferred to flasks containing 400 g of a sterilized (121°C for 2.5 h) sand:cornmeal:deionized water (9:1:2, w/w) mixture (AMA). Cultures were incubated at 24±1°C in the dark for 1 month, shaking the flasks at 7 days intervals to facilitate the homogeneous colonization of the substrate by the fungus. Then, the infested AMA was mixed with a pasteurized soil mixture (sand:peat moss, 2:1 v/v) (27.5% water holding capacity) at a rate of 10% (v/v). Inoculum density of *V. dahliae* in the infested soil mixture was estimated by serial dilutions on agar plates supplemented with 30 µg/L of

aureomycin (AAAu) incubated at $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ in the dark for 7 days. Mean density of inoculum in the soil mixture was 3.8×10^7 colony forming units (cfu) per g of soil.

For inoculation, 10-month-old plants were uprooted and the root system washed free of soil. Plants with the bare roots were transplanted to $13\times 13\times 12$ cm disinfested plastic pots containing the infested soil mixture. Non-inoculated control plants were transferred to a soil mixture containing sterile AMA. After transplanting, plants were grown in a greenhouse adjusted to $16\text{-}26^{\circ}\text{C}$ (mean 19.7°C) and 55-80% relative humidity (RH) (mean 61%) and a 14-h photoperiod of fluorescent light of $360 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ until most of them were dead by 63 days after inoculation. Plants were watered regularly and fertilized every 3 weeks with Hoagland's nutrient solution.

Disease reaction of inoculated and control plants was assessed by monitoring the severity of foliar symptoms on individual plants on a 0 to 4 rating scale according to the percentage of plant tissue affected by leaves chlorosis, leaves and shoots necrosis or defoliation (0= no symptoms; 1= 1-33%, 2= 34-66%, 3= 67-100%, 4= dead plant) at 3-4 days intervals. Disease ratings were plotted over time to obtain disease progress curves and the areas under the disease progress curve (AUDPC) were also calculated as described by Campbell and Madden (1990). At the end of the experiment, isolations on AAAu were carried out from shoot segments of inoculated plants to confirm infection by the pathogen.

In a subsequent experiment, the disease reaction of controls and AFP13 line to *V. dahliae* isolates V-1558 (ND pathotype, lineage 2A, race 1) and V-1900 (D pathotype, lineage 1A, race 2 (Milgroom et al., 2014; Jiménez-Díaz et al. 2017) was assessed using the same experimental procedures of above. The inoculum density of *V. dahliae* was 3.8×10^7 cfu per g of soil for isolate V-1900 and 1.8×10^7 cfu for isolate V-1558. After transplanting to the infested soil mixture, plants were grown in a growth chamber adjusted to $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ and 60-80% RH (mean 61%) and a 14h photoperiod of fluorescent light of $360 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ for 4 months. In all experiments, plants were arranged in a completely randomized design with 10 inoculated plants and 4 non-inoculated plants per line.

III.3.7. *Rosellinia necatrix* infection assay

Rosellinia necatrix assays were performed as described by Ruano Rosa and López Herrera (2009), using wheat seeds colonized by a single isolate of the fungus (Rn400) as inoculum. The wheat grains were soaked in distilled water for 24h, autoclaved at 121°C and 0.1 MPa for 40 min and inoculated with disks from colonies of Rn400 isolate, growing on PDA medium. The seeds were incubated for 15 days at 24°C in the dark. Six-month-old plants growing in the same substrate used for acclimatization were inoculated with colonized wheat seeds (1.05 g/L) and grew in greenhouse conditions at 25°C for two months.

Visual symptoms were observed twice a week, using the following scale: (1) healthy plant; (2) leaf chlorosis; (3) first symptoms of wilted and roll up/curl up in the leaves; (4) wilted plant with first symptoms of leaf desiccation; (5) dead plant. Areas under the disease progress curve (AUDPC) were calculated as described by Campbell and Madden (1990) and the different tolerance of transgenic olive lines was evaluated using a completely randomised experimental design, using 10 inoculated plants and 4 non-inoculated plants per line.

III.3.8. Statistical analysis

Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) using SPSS software version 23. The Levene test for homogeneity of variances was performed prior to ANOVA, and multiple mean comparisons were done by LSD. Kruskal–Wallis test was used for mean separation in case of non-homogeneous variances. All tests were performed at $P=0.05$.

III.4. RESULTS

III.4.1. Generation of transgenic AFP olive plants

More than 2400 globular somatic embryos (SE) from line P1 were inoculated with the *A. tumefaciens* AGL1 disarmed strain carrying the pBIN61 binary vector, in two independent experiments. After 2 months of selection in a medium supplemented with 200 mg/L paromomycin, all non-*Agrobacterium* inoculated embryos were necrotic while 94 inoculated explants showed some sectors of new callus growth. These calli were cultured individually in ECO liquid medium supplemented with 50 mg/L paromomycin for two cycles of 3 weeks. Then, calli were filtered and SE suspensions plated on solid selection medium. Thirty six callus lines showed a good proliferation rate after this additional selection phase, which represents a transformation rate of 1.5% based in the tolerance to paromomycin. Each callus line was considered an independent transgenic line.

For transgenic plant recovery, SE from selected transgenic callus lines were matured following the procedure of Cerezo et al. (2011a) and later germinated in the medium of Clavero-Ramírez and Pliego-Alfaro (1990). Plants from six independent callus lines were recovered. These plants were micropropagated in DKW medium and later acclimatized to greenhouse conditions (Figure III.1).

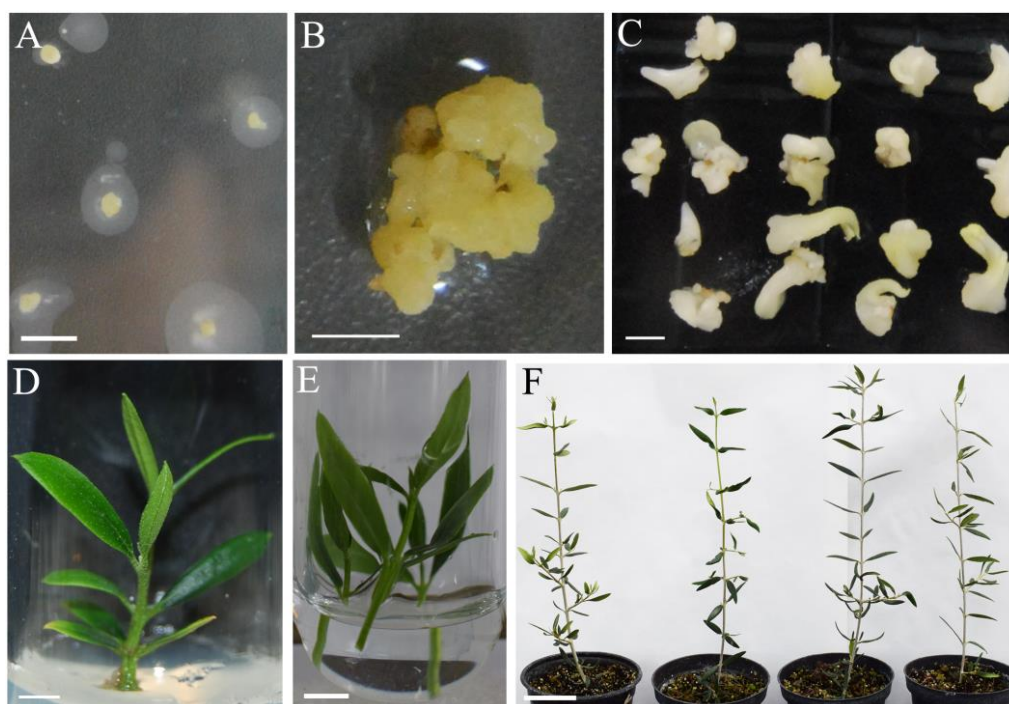


Figure III.1. Transformation of olive somatic embryos with *afp* gene from *Aspergillus giganteus*. A) Globular somatic embryos after two days of inoculation with *A. tumefaciens*. B) Transgenic *afp* callus growing in selection ECO medium supplemented with 200 mg/L paromomycin. C) Transgenic *afp* somatic embryos after the maturation phase. D) Micropropagated shoot from AFP9 line. E) Transgenic AFP9 shoots in RP liquid medium with 10 mg/L IBA for rooting. F) From right to left, acclimated plants derived from non-transformed P1 line and transgenic AFP7, AFP9 and AFP10 lines, after 1 year of growth in the greenhouse. Barra: A-E: 0.5cm; F: 5 cm.

III.4.2. Molecular analysis of AFP plants

III.4.2.1. PCR analysis

The transgenic nature of AFP plants was confirmed by PCR amplification of both, *nptII* and *afp* genes (Figure III.2). DNA from the non-transgenic control plants did not show any PCR amplification. The PCR signal corresponding to amplification of the 700 bp fragment from the *nptII* gene was detected in all transgenic lines (Figure III.2A). Regarding the *afp* gene, all transgenic lines except line AFP13 yielded the 200 bp DNA band corresponding to amplification of the *afp* gene fragment (Figure III.2B). The absence of *afp* gene in line AFP13 was confirmed with the qRT-PCR primers (results not shown).

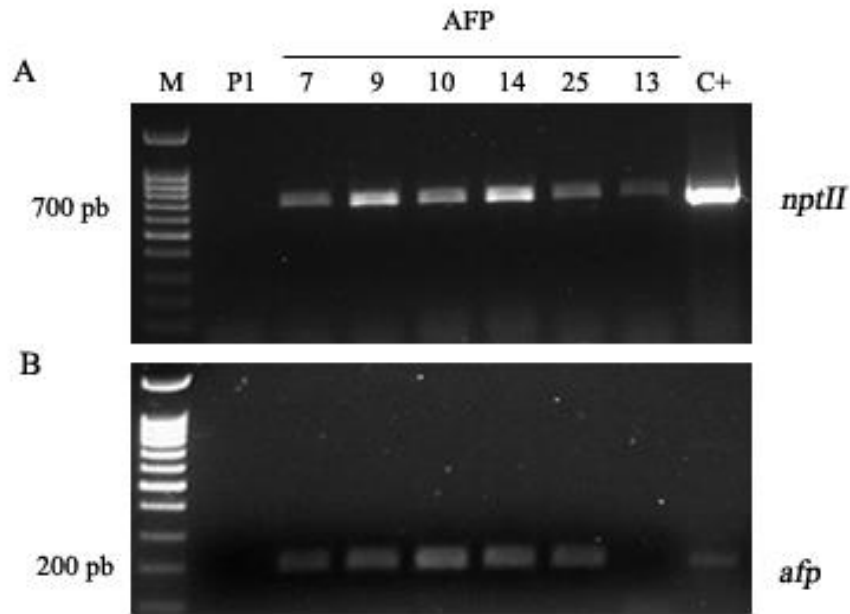


Figure III.2. PCR analysis of *afp* transgenic olive plants. A) Amplification of a 700 bp DNA fragment from *nptII* gene. B) Amplification of a 200 bp DNA fragment from the *afp* gene. M: molecular weight marker; C+: pBIN61 binary plasmid; P1: DNA from non-transformed P1 line; AFP: DNA from transgenic *afp* lines.

III.4.2.2. qRT-PCR analysis

The expression of *afp* gene in leaves and roots of transgenic plants was estimated by qRT-PCR (Figure III.3). The highest levels of transgene expression in both tissues were detected in line AFP7 followed by line AFP9. Line AFP10 showed moderate amount of *afp* mRNA in leaves but low levels in roots. Finally, AFP14 and AFP25 showed the lowest *afp* expression in both organs. As expected, *afp* mRNA was not detected either in controls or line AFP13, where the transgene had not been incorporated, as previously indicated.

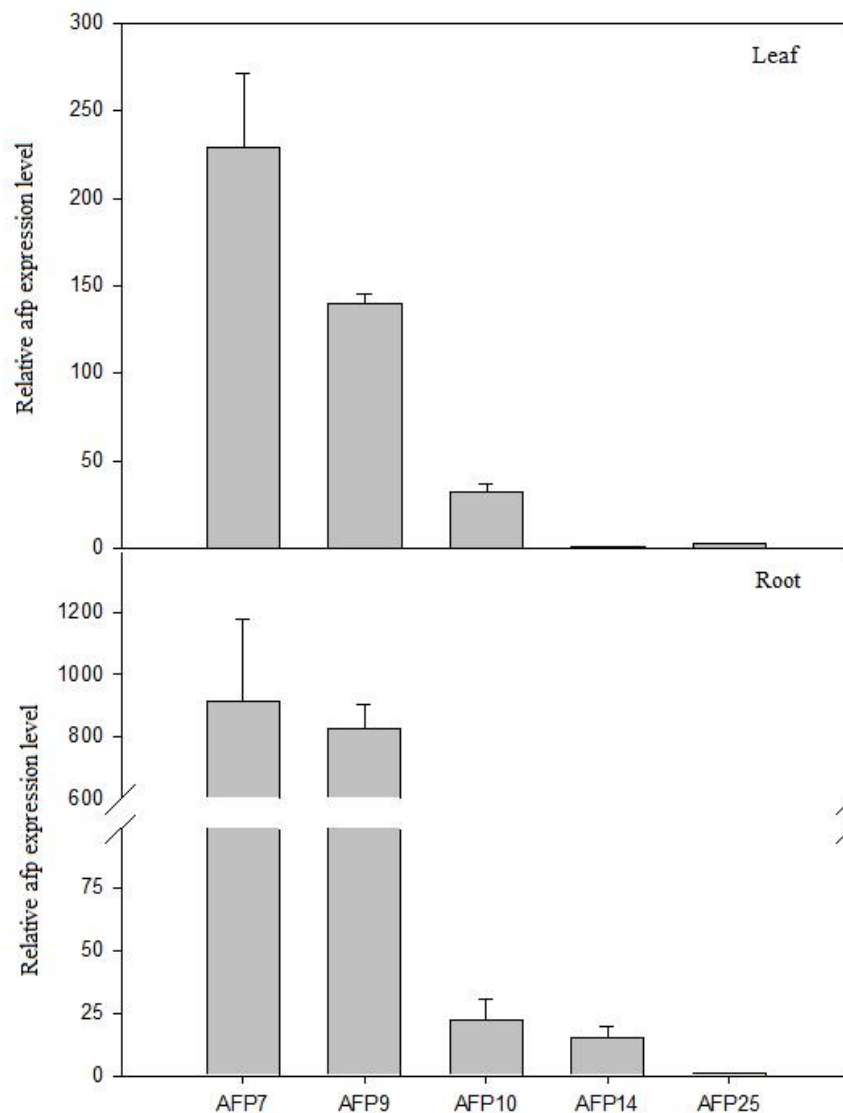


Figure III.3. qRT-PCR analysis of *afp* gene expression in leaves and roots of transgenic olive plants. Quantification was based on Ct values as described in Material and methods. The mRNA values were relative to the lowest values obtained in leaves and roots, AFP14 and AFP25, respectively, which were assigned an arbitrary value of 1. Data correspond to mean values \pm SD of three independent experiments.

III.4.3. Phenotypical characterization of transgenic AFP plants

The *in vitro* behavior, as well as shoot length and stem diameter of 1 year old acclimatized AFP plants was assessed to determine the effect of constitutive expression of the *afp* gene in olive growth. For the *in vitro* measurements, stem segments with two lateral nodes were cultured in proliferation RP medium and the developed shoots were evaluated after 8 weeks of culture (Table III.1). In general, there were minor differences in the number of shoots per explant and the length of the main shoot between transgenic lines and the control, with the exception of line AFP13 that showed a lower number of shoots per explant and a reduced shoot size compared with the control. Proliferated

shoots were exposed to IBA for 3 days and transferred afterwards to basal RP medium for root emergence. More than 88% of the control shoots rooted, producing 2.4 roots per explant (Table III.1). The percentage of rooted explants was also high in all transgenic lines except for line AFP13 that showed a reduced ability to root and formed few roots per explant. Line AFP7 also produced a low number of roots per explant. The main root length varied greatly among the different genotypes, being larger in the control non-transformed line and extremely short in the AFP13 line. The stunted phenotype of line AFP13 plants observed *in vitro* was maintained when 1-year-old plants grown in the greenhouse were evaluated. However, no differences were found in the shoot length and stem diameter between controls and the rest of transgenic AFP lines (Table III.2).

Table III.1. *In vitro* characterization of transgenic AFP olive plants. Data correspond to mean±SD. Mean separation was performed by Kruskal-Wallis test at $P=0.05$. Different letters indicate significant differences between lines.

Genotype	Shoots per explant	Length of shoot (cm)	Rooted explants (%)	Roots per explant	Length of main root (cm)
Control	2.1±0.7 ^{ab}	4.8±1.8 ^b	88.9	2.4±1.4 ^{bc}	2.6±1.3 ^a
GUS	1.9±0.5 ^{bc}	4.5±1.9 ^b	75.0	2.4±1.5 ^{bc}	1.2±0.9 ^{bc}
AFP7	2.0±0.5 ^{abc}	4.8±1.2 ^b	95.0	1.8±0.8 ^c	2.2±1.3 ^a
AFP9	2.3±0.7 ^a	5.3±1.7 ^{ab}	84.2	3.4±1.8 ^{ab}	1.9±0.9 ^{ab}
AFP10	2.2±0.6 ^{ab}	4.5±1.0 ^b	91.9	3.4±1.2 ^a	1.7±1.3 ^{abc}
AFP13	1.8±0.7 ^c	3.0±1.0 ^c	26.1	1.5±0.5 ^c	0.4±0.1 ^d
AFP14	2.0±0.5 ^{ab}	5.5±1.3 ^a	94.1	2.7±1.3 ^{abc}	1.9±1.3 ^{abc}
AFP25	2.0±0.5 ^{ab}	5.0±1.3 ^b	87.1	3.2±1.4 ^{ab}	1.2±0.7 ^c

Table III.2. *Ex vitro* characterization of transgenic AFP olive plants. Data correspond to mean±SD. Mean separation was performed by Kruskal-Wallis test at $P=0.05$. Different letters indicate significant differences between lines.

Genotype	Shoot length (cm)	Diameter of stem (cm)
Control	35.3±7.9 ^a	0.3±0.04 ^a
GUS	43.6±11.4 ^a	0.3±0.03 ^a
AFP7	43.5±15.1 ^a	0.33±0.06 ^a
AFP9	40.6±7.4 ^a	0.3±0.04 ^a
AFP10	44.0±7.8 ^a	0.33±0.04 ^a
AFP13	23.1±4.1 ^b	0.23±0.01 ^b
AFP14	46.5±9.9 ^a	0.32±0.05 ^a
AFP25	40.9±11.7 ^a	0.27±0.04 ^a

III.4.4. *Verticillium dahliae* infection assays

No symptoms occurred in non-inoculated plants. Plants of non-transformed P1 line as well as those of GUS and AFP transgenic lines showed symptoms characteristic of D pathotype (Navas-Cortés et al., 2008; Jiménez-Díaz et al., 2012) (not shown) although some differences were observed in their development (see below). As expected, the wild olive resistant genotype StopVert did not show any disease symptom.

Verticillium wilt symptoms in plants of lines P1, GUS and *afp* expressing AFP7, 9, 10, 14 and 25 started to develop by 32 days after inoculation and progressed steadily over time with minor differences. By 63 days after inoculation all plants of lines P1 and AFP7, 10, 14, and 25 were dead; and lines AFP9 and GUS were affected with 100% incidence and a mean severity of symptoms of 3.7 and 3.9, respectively, within the 0-4 rating scale (Figure III.4). Disease reaction of *afp*-expressing lines AFP7, 9, 10, 14 and 25, as indicated by AUDPC values, was similar to that in the non-transformed P1 and transgenic GUS lines, independently of the *afp* mRNA levels (Figures III.4 and 5).

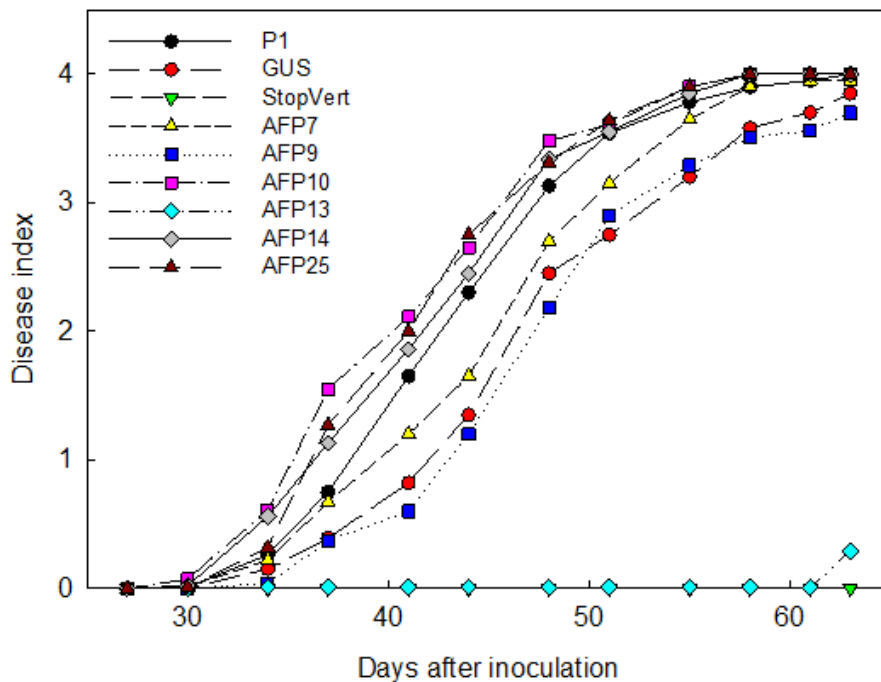


Figure III.4. Progress of *Verticillium* wilt symptoms over time in controls and transgenic olive plants transformed with *afp* gene from *Aspergillus giganteus*. P1: control non-transformed plants; GUS: pBINUbiGUSInt transformed plants; StopVert: wild olive resistant to *Verticillium*; AFP: *afp* transgenic lines.

Conversely, plants of line AFP13, containing an incomplete T-DNA lacking the *afp* gene, showed a disease resistant reaction after inoculation with *D. V. dahliae* 138, as did the StopVert genotype of wild olive. After 63 days of incubation only 50% of AFP13 plants depicted a sign of disease with a very low symptom severity and AUDPC values (Figures III.4 and 5). No symptoms developed on StopVert plants. Despite the

disease resistant phenotype, AFP13 plants were infected by *V. dahliae* with 60.7% of stem fragments from asymptomatic AFP13 plants rendering the pathogen in isolations on AAAs medium. By contrast, the pathogen was recovered only from 1.8% of stem segments from wild olive StopVert plants inoculated with D *V. dahliae*.

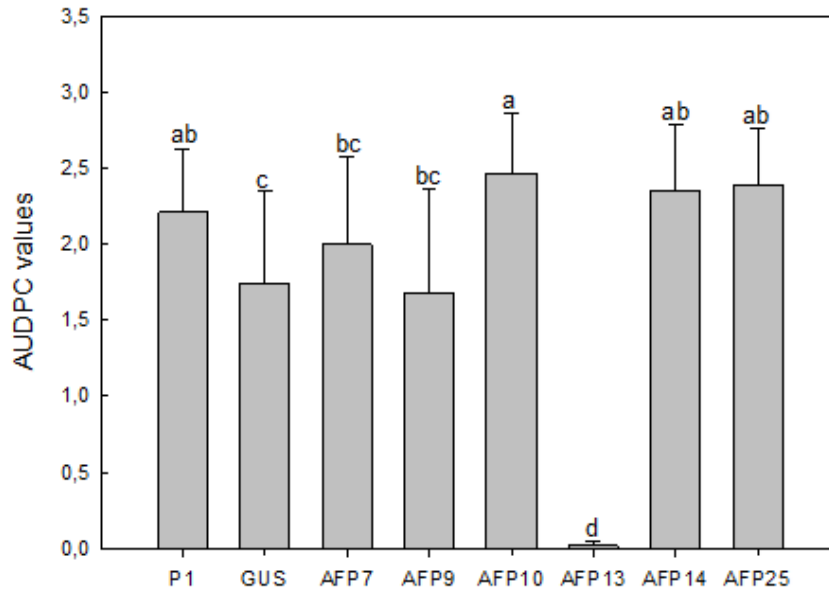


Figure III.5. Average values of area under the disease progress curve (AUDPC) in controls and transgenic olive plants inoculated with *Verticillium dahliae*, defoliant strain V-138. P1: control non-transformed plants; GUS: pBINUbiGUSInt transformed plants; AFP: *afp* transgenic lines. Data represent mean±SD of 10 plants. Columns with different letters indicate significant differences by LSD test at $P=0.05$.

To further confirm the disease resistance phenotype of line AFP13 to *V. dahliae*, a new assay was performed using two new *V. dahliae* isolates, isolate V-1558 (ND pathotype, lineage 2A, race 1) and V-1900 (D pathotype, lineage 1A, race 2 (Milgroom et al., 2014; Jiménez-Díaz et al. 2017) using the same experimental procedures of the former assay and lines P1, GUS as controls. Symptoms occurred neither in non-inoculated plants nor in those of line AFP13 inoculated with the race 1/ND *V. dahliae* isolate V-1558, which thus showed a complete resistance phenotype. Despite the complete resistant phenotype to race 1, *V. dahliae* infected 40% of the asymptomatic AFP13 plants. *Verticillium* wilt developed in all other experimental line-*V. dahliae* isolate combinations, the symptoms corresponding to the nature of D or ND pathotypes (Figure III.6). Disease reaction of lines P1 and GUS to the D isolate was significantly more severe than that to the ND isolate, but the two lines were similarly susceptible to a given pathotype (Figures III.7 and 8). All P1 and GUS plants died between the 8th and 9th weeks after inoculation with the D isolate. Comparatively, plants of those lines inoculated with the ND isolate survived to the end of the assay reaching a mean symptom severity of 2.5 to 3, and average AUDPC value 75% less than that reached in plants inoculated with the D isolate (Figure III.8)

Disease reaction of line AFP13 to race 2/D isolate V-1900 reproduced the symptomless reaction to D isolate V-138 up to 60 days postinoculation in the former assay. However, extending the incubation period for 2 additional months allowed disease to develop on 80% of plants with 3.2 mean symptom severity and AUDPC 55% less than that on P1 and GUS plants (Figures III.7 and 8). Therefore, line AFP13 shows an incomplete resistant phenotype to race 2/D *V. dahliae* with a significant and valuable increase in the incubation period and reduction in disease development.

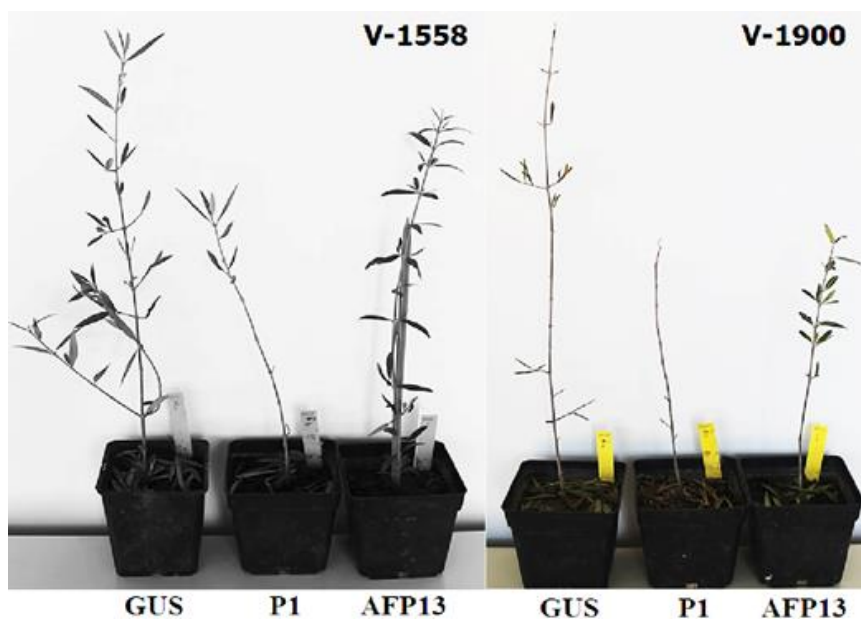


Figure III.6. Aspect of controls and transgenic AFP13 plants after inoculation with the *Verticillium dahliae* non-defoliant strain V-1558 and defoliant strain V-1900. P1: control non-transformed plants; GUS: pBINUbiGUSInt transformed plants. Pictures were taken at the end of the experiment, after 120 days from pathogen inoculation.

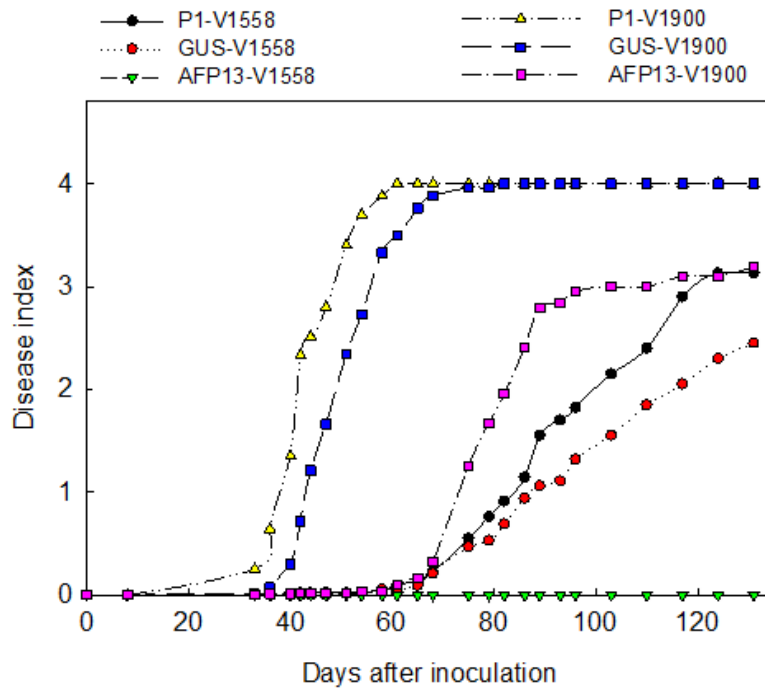


Figure III.7. Progress of *Verticillium* wilt symptoms over time in controls and transgenic olive AFP13 line inoculated with *Verticillium dahliae* non defoliant strain V-1558 and defoliant strain V-1900. P1: control non-transformed plants; GUS: pBINUbiGUSInt transformed plants.

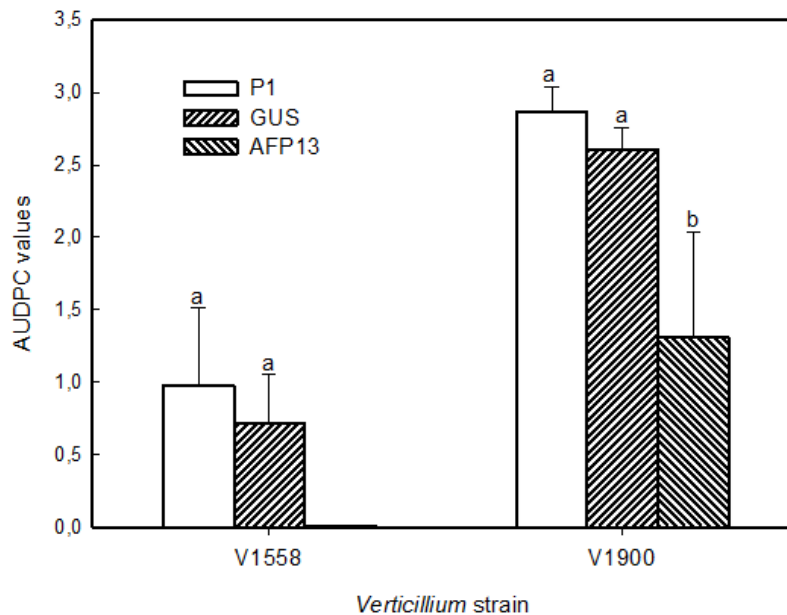


Figure III.8. Average values of area under the disease progress curve (AUDPC) in controls and transgenic olive line AFP13 inoculated with *Verticillium dahliae* non-defoliant strain V-1558 and defoliant strain V-1900. P1: control non-transformed plants; GUS: pBINUbiGUSInt transformed plants. Data represent mean \pm SD of 10 plants. Columns with different letters indicate significant differences by LSD test at $P=0.05$.

III.4.5. *Rosellinia necatrix* infection assay

No symptoms developed in non-inoculated plants. Disease symptoms in control plants of non-transformed P1 and transformed GUS lines appeared 6 days after inoculation with *R. necatrix* and all plants died by 44 days postinoculation (Figure III.9). Transgenic lines AFP7 and AFP9 that showed the highest level of *afp* expression displayed a degree of resistance to white root rot as indicated by an increase in the incubation period and significant reduction in AUDPC values (Figures III.9 and 10). By contrast, transgenic AFP lines 10, 14 and 25, which showed a low level of *afp* expression, displayed a level of susceptibility to *R. necatrix* similar to that of the control lines. Line AFP13 lacking the *afp* gene showed an AUDPC value higher, but not significantly different, than that of lines AFP7 and 9 (Figure III.10). At the end of the experiment, the final mean severity of symptoms was negatively correlated with the level of *afp* expression in roots (Pearson correlation coefficient of -0.968, significant at $P=0.01$) and leaves (Pearson correlation coefficient of -0.954, significant at $P=0.05$) of transgenic AFP plants.

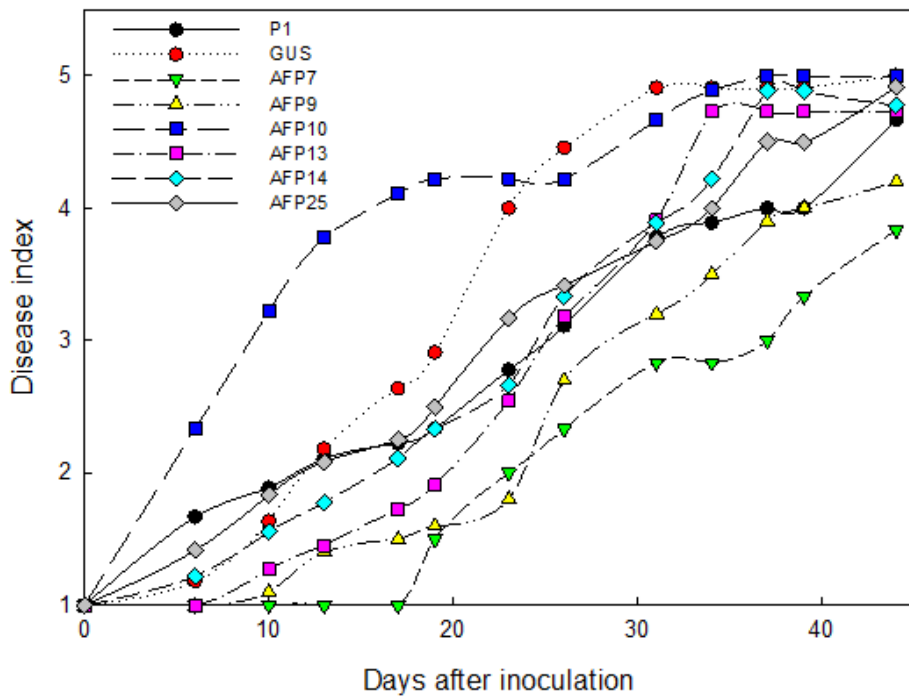


Figure III.9. Progress of white root rot symptoms caused by *Rosellinia necatrix* over time in controls and transgenic olive plants transformed with *afp* gene from *Aspergillus giganteus*. P1: control non-transformed plants; GUS: pBINUbiGUSInt transformed plants; AFP: *afp* transgenic lines.

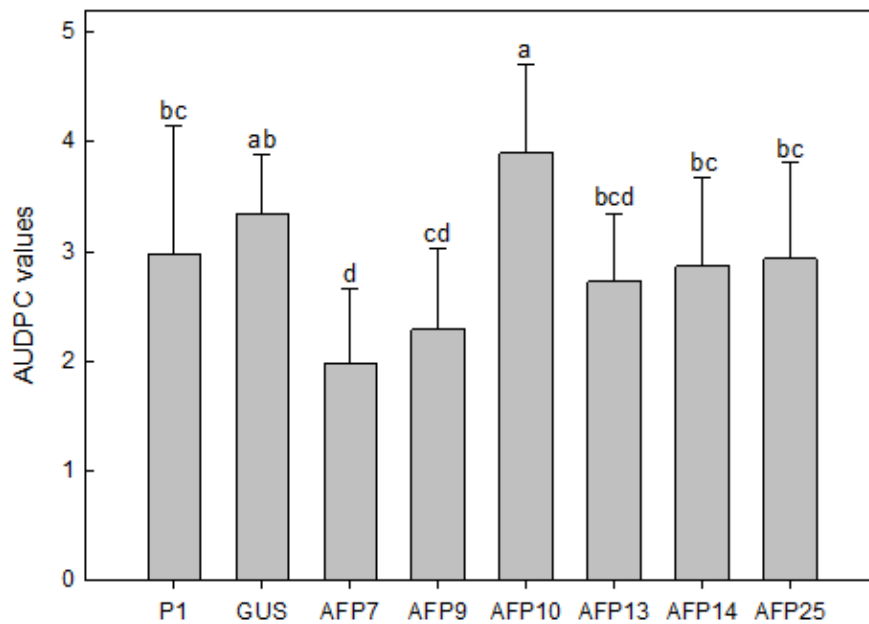


Figure III.10. Average values of area under the disease progress curve (AUDPC) in controls and transgenic olive plants inoculated with *Rosellinia necatrix*. P1: control non-transformed plants; GUS: pBINUbiGUSInt transformed plants; AFP: *afp* transgenic lines. Data represent mean \pm SD of 10 plants. Columns with different letters indicate significant differences by LSD test at $P=0.05$.

III.4.6. RAPDs analysis of AFP13 genetic stability

A total of 133 amplified fragments were obtained with the 11 RAPD primers used for this analysis, with 7-19 amplified fragments per primer ranging from 200 to 2000 bp. Amplifications were carried out at least twice and, in all cases, shoots of the transgenic line AFP13 showed the same band pattern as the GUS line (transgenic control) and the non-transformed control, P1 line. However, in the amplification carried out with oligonucleotide A1, an aprox. 650 bp fragment was present in both controls while it was absent in the AFP13 line. In addition, another fragment of aprox. 600 bp that was amplified from shoots of AFP13 line was absent in both controls (Figure III.11).

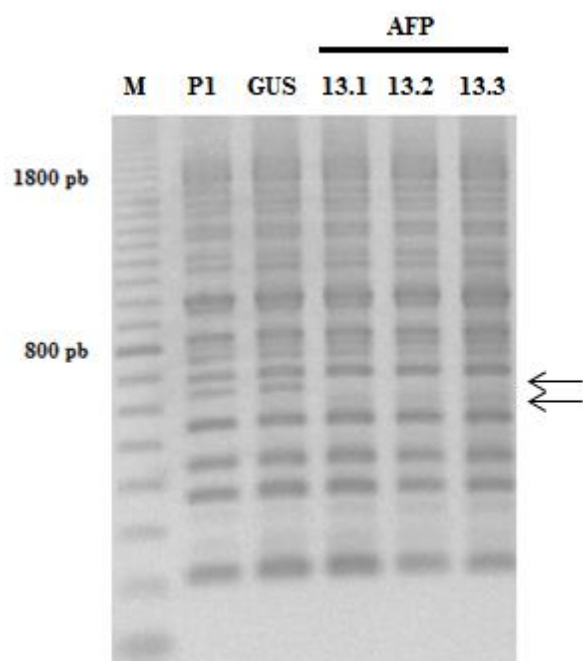


Figure III.11. RAPD profile of DNA samples from controls (non-transformed P1 plants and pBINUbiGUSInt transformed plants) and AFP13 transgenic line. Amplification products were generated with primer A1. M: molecular weight marker. Arrows indicate the amplified bands that varied in controls and line AFP13.

III.5. DISCUSSION

In this study, we have investigated whether or not of the ectopic expression of *afp* gene from *A. giganteus* in olive plants would increase its resistance to root-infecting fungal pathogens causing different pathogenesis; i.e. root necrosis (necrotrophic *R. necatrix*) and wilting (hemibiotrophic *V. dahliae*). This strategy has successfully been used in other crops, such as rice, wheat and pearl millet (Oldach et al., 2001; Moreno et al., 2005; Girgi et al., 2006; Li et al., 2008) to increase tolerance to diseases caused by different fungi. However, as far as we know, the antifungal effect of AFP against *V. dahliae* and *R. necatrix* has not been evaluated yet, neither in transgenic plants nor in *in vitro* assays using isolated AFP protein (Leiter et al., 2017).

Six independent transgenic olive lines were generated and five of them constitutively expressed the *afp* gene in both roots and leaves. As generally observed in most genetic transformation experiments, the level of transgene expression varied greatly among the different lines. This is due to the influence of the copy number as well as to other factors such as site of integration (Matzke and Matzke, 1998). The expression of *afp* did not affect the *in vitro* behavior or growth in the greenhouse of transgenic plants, as previously observed in other species (Oldach et al., 2001; Coca et al., 2004; Girgi et al., 2006). Similarly, external applications of AFP on plants did not

cause any detrimental effects, suggesting that AFP can be safely used in crop protection (Meyer, 2008).

One of the transgenic lines recovered, AFP13, expressed the *nptII* gene but we were unable to either amplify the *afp* gene by PCR assays or to detect *afp* mRNA in transgenic tissues. This result could be explained by a rearrangement of the transgene sequence or, more likely, by a partial deletion of the T-DNA. It has been shown that the patterns of T-DNA integration are complex (De Buck et al., 1999; Zhu et al., 2006). During *Agrobacterium* transformation, partial degradation of the T-DNA borders can occur in the plant cell nucleus before the integration of T-DNA, especially at its left border (Lacroix et al. 2006). In rice, more than 14% of transgenic plants contained only a part of the transforming T-DNA, most of them consisting of the mid to the right T-DNA border (Afolabi et al., 2004). Although the *afp* gene in the pBIN61 binary vector used for olive transformation is located close to the right border, a deletion of this part of the T-DNA cannot be excluded. Contrary to the other transgenic lines developed, AFP13 plants showed a reduced growth and a different response to fungal infection, as discussed later. This could be related to a position effect of the transgene insertion or to a somaclonal variation induced during *in vitro* regeneration.

The response of AFP transgenic plants to the two pathogens assayed was completely different. Constitutive expression of *afp* gene in olive enhanced a degree of incomplete resistance against white root rot caused by *R. necatrix*, with the level of *afp* expression being negatively correlated with susceptibility to the disease in the transgenic lines. This relationship agrees with that found in *afp* transgenic wheat, for which enhanced resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) and leaf rust (*Puccinia recondite*) was associated with the level of *afp* gene expression and the low *afp*-expressing lines showed same response as that of the wild type (Oldach et al., 2001).

Contrary to reaction to white root rot, transgenic olive plants expressing the *afp* antifungal gene were as susceptible to the highly virulent D pathotype of *V. dahliae* causing Verticillium wilt as the controls. This is not an unexpected result. Although the antifungal activity of AFP at low concentration has been demonstrated against numerous filamentous ascomycetes, some species showed resistant, suggesting that AFP may operate in a species-specific manner (Theis et al., 2003). The mechanisms of action of AFP seem to rely mainly on disruption of the plasma membrane integrity and inhibition of chitin biosynthesis in sensitive filamentous fungi (Leiter et al., 2017). However, some oomycetes, such as *Phytophthora infestans* and *Sclerospora graminicola*, whose cell wall does not contain chitin, are also susceptible to AFP (Vila et al., 2001; Girgi et al., 2006). AFP_{NN5353}, a different antifungal protein produced by *A. giganteus* that shares more than 90% sequence identity with AFP does interfere with cell wall integrity of sensitive fungi, but also increases cytosolic free Ca²⁺, thus disrupting calcium signaling pathways (Binder et al., 2011). The biochemical basis underlying AFP resistance in tolerant fungi are largely unknown. According to Theis et

al. (2003), resistance to AFP could be due to lack of a specific interacting partner of AFP in the resistant species or to vacuolar accumulation and degradation of the protein in resistant fungi. Oldach et al. (2001) also observed that the inoculum density influences the response of *afp* transformed wheat to different pathogens, i.e. the enhanced tolerance to *B. graminis* f. sp. *tritici* and *P. recondita* was lost at high doses of inoculum. Further experiments are needed to determine if the lack of resistance to *V. dahliae* in transgenic olive is due to the tolerance of this fungus to AFP protein or to an insufficient level of AFP accumulation in olive tissues.

Contrary to transgenic olive plants expressing *afp*, line AFP13 which does not contain the transgene, showed complete, symptomless resistant to mildly virulent race 1 *V. dahliae* of ND pathotype, and a valuable degree of incomplete resistance to the highly virulent D pathotype of race 2. It should be highlighted that those resistant reactions took place under a very high inoculum density and optimal conditions for Verticillium wilt, as indicated by the fast and severe disease that developed in susceptible control lines. This differential resistance according to pathotypes also occurs for olive cultivars (Jiménez-Díaz et al., 2012; López-Escudero et al., 2004) but complete, symptomless resistance to the two pathotypes and races can occur in wild olive genotypes (Jiménez-Díaz et al., 2017, Jiménez-Fernández et al., 2016).

The complete, symptomless resistance to D *V. dahliae* in wild olive genotypes was found to be associated with a high reduction in the quantitative stem colonization by *V. dahliae* and significant increase of plugging in stem xylem vessels occlusion which may contribute to avoiding the spread of the pathogen within the plant (Jiménez-Fernández et al., 2016; Jiménez-Díaz et al., 2017; Keykhasaber et al., 2017). Whether or not those defense mechanisms operate in the resistance shown by line AFP13 remains to be determined. However, it is unlikely that they may operate against the D pathotype because of the development of symptoms in AFP13 plants and the high frequency of isolation of the pathogen even from symptomless ones, compared with the symptomless reaction of resistant wild olive StopVert and very low percentage isolation of *V. dahliae*. Similarly, further research is needed to uncover the genetic nature of resistance to *V. dahliae* in AFP13 line. It could be speculated that it might be related to a positional effect of the integration of the uncompleted T-DNA in the olive genome, or, more probably, to a somaclonal variation induced by the tissue culture. This latter possibility is supported by results of RAPDs assays carried out in this research, in which different band patterns were found between AFP13 line and non-transformed and GUS transformed control. Along this line, Bradai et al. (2016) also detected somaclonal variations in olive plants regenerated from embryogenic cultures, which affected vegetative and reproductive development. Genetic variation induced by tissue culture has been found to produce *V. dahliae* tolerant plants in potato (Sebastiani et al., 1994) and strawberry (Sowik et al., 2015). Experiments are in progress to gain an insight into the mechanism underlying the Verticillium resistance of the AFP13 genotype.

In conclusion, heterologous expression of the *afp* gene from *A. giganteus* can be a useful approach to enhance incomplete resistance against some soil-borne fungi such as *R. necatrix*. However, this gene does not confer resistance to Verticillium wilt caused by *V. dahliae*, one of the most devastating and widespread olive diseases. Despite this negative result, a transgenic olive line containing a partially degraded T-DNA has been recovered which showed complete to incomplete resistance to Verticillium wilt depending upon the nature and virulence of the *V. dahliae* pathotype. The origin of this resistance phenotype seems to be related to a genetic variation induced by somatic embryogenesis although a specific effect of the transformation procedure itself cannot be discarded.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Capítulo IV. Transformación genética de olivo con el gen *AtNPR1*





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

IV.1. RESUMEN

El gen *AtNPR1* codifica para una proteína reguladora clave en la defensa mediada por el ácido salicílico (AS); asimismo, parece ser un regulador de la interconexión de las rutas de señalización en las que están implicados el AS (Resistencia Sistémica Adquirida, SAR) y el ácido jasmónico/etileno (JA/Et) (Resistencia Sistémica Inducida, ISR). Este gen y sus homólogos, se han sobreexpresado en otras especies vegetales confiriendo resistencia frente a un amplio rango de patógenos bacterianos y fúngicos. En este trabajo, se ha llevado a cabo la transformación de embriones somáticos de olivo con el gen *AtNPR1*, bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S. Las líneas transgénicas se obtuvieron empleando una estrategia de selección progresiva, utilizando concentraciones crecientes de paromomicina a lo largo del proceso (50-150 mg/L) e incluyendo un periodo de selección en medio líquido con 12.5-25 mg/L del antibiótico. En total, se seleccionaron 3 líneas transgénicas, siendo la eficiencia de transformación del 0.28%. La naturaleza transgénica del material recuperado se comprobó mediante PCR. El análisis de expresión por qRT-PCR, mostró que una de las líneas de callo embriogénico (NPR1 780) presentaba un alto nivel de transcrito, mientras que las otras dos (NPR1 224 y NPR1 814) mostraban niveles muy bajos. Se regeneraron plantas de las 3 líneas transgénicas y se evaluó el efecto del transgén en el crecimiento tanto *in vitro* como en invernadero, no observándose ningún efecto significativo sobre el fenotipo. La inducción del gen *AtNPR1* conlleva la expresión de los genes relacionados con la patogénesis (genes *PR*). Se evaluó la actividad endoquitinasa, una proteína *PR*, en los callos embriogénicos de las tres líneas transgénicas. La línea NPR1 814 mostró valores de actividad significativamente mayores que el control, sin embargo, las otras dos líneas dieron valores inferiores al control. La exposición de las líneas embriogénicas al AS no modificó la actividad quitinasa, mientras que la elicitación con MeJA produjo un incremento de la actividad a las 24h en todas las líneas, siendo el incremento mayor en las líneas transgénicas que en el control.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

IV.2. INTRODUCCIÓN

IV.2.1. Mecanismos de defensa de las plantas frente a patógenos

Las plantas cuentan con diversos sistemas de defensa frente a los ataques de patógenos. Estos mecanismos pueden ser constitutivos o inducidos como respuesta a la infección. Dentro de los mecanismos preexistentes, la cutícula, tricomas y células esclerenquimáticas, que presentan pared secundaria lignificada, constituyen la barrera estructural. Asimismo, las plantas producen metabolitos secundarios tóxicos como alcaloides y saponinas; sin embargo, en ocasiones, los patógenos son capaces de superar esta barrera, por lo que las plantas han desarrollado otras estrategias de defensa. Así, los receptores PRRs (pattern-recognition receptors), reconocen moléculas del patógeno como la flagelina, glucano o quitina, lo que se denomina patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs o MAMPs; pathogen-associated molecular patterns), desencadenando la respuesta PTI (PAMP-triggered immunity) (Zipfel, 2009). Estos receptores también reconocen los DAMPs (damage-associated molecular patterns) (Boller y Felix, 2009; Ranf et al., 2011), que son compuestos generados por la acción de enzimas hidrolíticas de los propios patógenos, como por ejemplo, los oligogalacturónidos, oligómeros de residuos α -1,4-galacturonosil liberados tras la degradación parcial del ácido poligalacturónico de las paredes celulares de plantas (Ferrari et al., 2013). Además, algunos cultivares de especies vegetales concretas cuentan con receptores específicos, que reconocen los efectores (proteínas de avirulencia, Avr) producidos por determinadas razas de patógenos, activando la respuesta ETI (effector-triggered immunity). Generalmente, esta respuesta lleva asociada la muerte celular programada o también conocida como respuesta hipersensible (HR) en el tejido infectado por el patógeno (Caplan et al., 2008). Otros tipos de respuestas en la interacción planta-patógeno son la respuesta SAR (Systemic Acquired Resistance) generada por un incremento de ácido salicílico (AS) en el sitio de infección y en tejidos distales (Métraux et al., 1990), y establecida frente al ataque de patógenos biotrofos y hemibiotrofos, o la respuesta ISR (Induced Systemic Resistance), en la que están implicados el ácido jasmónico (JA) y el etileno (Et), y producida en la planta, generalmente, para defenderse frente a patógenos necrotrofos, insectos herbívoros y rizobacterias (Pieterse y van Loon, 2004; Glazebrook, 2005; Wasternack, 2007). El alcance de estas respuestas conlleva la expresión de genes de defensa y algunos de ellos codifican para proteínas antimicrobianas (van Loon et al., 2006). Sin embargo, a pesar de que implican rutas de señalización distintas, existe un solapamiento entre ellas (Spoel et al., 2003; Pieterse et al., 2009).

IV.2.2. Respuesta SAR

La respuesta SAR confiere resistencia frente a un amplio rango de patógenos y proporciona a la planta tras el ataque, lo que se conoce como precondicionamiento o “*priming*”, memoria inmune frente a nuevas infecciones (Conrath et al., 2002, 2006). Esto consiste en una rápida y más fuerte inducción de la respuesta en caso de ser nuevamente amenazada por algún patógeno. Estudios recientes sugieren que debido al “*priming*”, SAR es transgeneracional, por lo que puede ser heredada por la descendencia (Luna et al., 2012; Rasmann et al., 2012; Slaughter et al., 2012).

En *Arabidopsis thaliana*, el AS es producido en los plastidios a través de 2 rutas a partir del corismato, un producto de la ruta del ácido shikímico. Una de las rutas es la de la isocorismato sintasa (ICS), que proporciona más del 90% del AS sintetizado (Wildermuth et al., 2001), mientras que la otra ruta, la de la fenilalanina amonio liasa (PAL), es minoritaria (Lee et al., 1995). La mayoría del AS se encuentra principalmente glucosilado (SAG) (Dean et al., 2005). Tras la invasión por el patógeno, es hidrolizado y convertido en AS. Otro metabolito también inactivo es el metil salicilato (MeSA) (Park et al., 2007). Esta forma es volátil, por lo que se reduciría la acumulación de AS y su efecto tóxico en la planta (Cronjé et al., 2004). Su conversión en AS requiere de una metil esterasa (Liu et al., 2011).

Los eventos producidos en la respuesta SAR podrían ser explicados según el modelo propuesto por Kachroo y Robin (2013) (Figura IV.1). Así, el ataque del patógeno, produciría la liberación de ácidos grasos de 18 carbonos con dobles enlaces, presentes en la membrana lipídica, que serían hidrolizados dando lugar al ácido azelaico (AzA) (Jung et al., 2009; Zoeller et al., 2012; Yu et al., 2013). Este actuaría aguas arriba del glicerol-3-fosfato (G3P) induciendo los genes de biosíntesis de este compuesto. G3P sería convertido en un derivado desconocido G3P*, que se enlazaría a DIR1 (defective in induced resistance 1), una proteína putativa de transferencia de lípidos (Maldonado et al., 2002) y se movería sistémicamente para la inducción de SAR. Como consecuencia de la infección, también se ha propuesto la acumulación de un derivado de la lisina, el ácido pipercolico (Pip), el cual induce una acumulación significativa de AS, por lo que se ha sugerido que podría servir como señal aguas arriba del AS. Además de Pip, el compuesto dehidroabietinal (DA) (Chaturvedi et al., 2012) también induce la acumulación de AS. Parte de DA y AzA se moverían sistémicamente para la inducción de la respuesta, así como el MeSA, donde sería posteriormente convertido en AS. Por tanto, se ha propuesto que MeSA, AzA, G3P y DA actuarían como señales móviles y requerirían DIR1 para llevar a cabo sus funciones (Dempsey y Klessig, 2012). Además de DIR1, también se ha propuesto para la regulación de la producción o translocación de la señal móvil de SAR, otra proteína denominada AZI1 (azelaic acid induced 1), la cual parece ser requerida para la señalización de AzA (Jung et al., 2009).

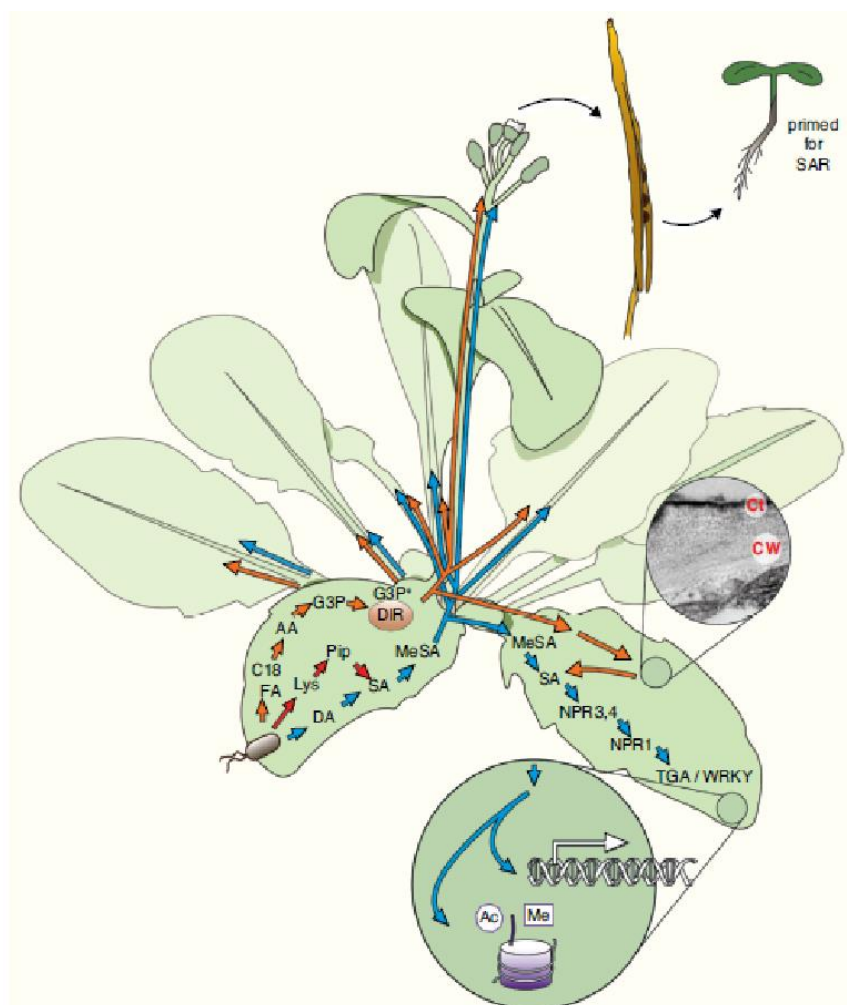


Figura IV.1. Modelo activación de SAR (Kachroo y Robin, 2013). C18 FA: ácidos grasos de 18 carbonos, AzA (AA): ácido azelaico, G3P: glicerol-3-fosfato, G3P*: derivado desconocido de G3P, Lys: lisina, Pip: ácido piperico, DA: dehidroabietinal, DIR (DIR1 = defective in induced resistance 1): proteína putativa de transferencia de lípidos, SA: ácido salicílico, MeSA: metil salicilato, Ct: cutícula, CW: pared celular, NPR1: Non-expressor of PR1, NPR3 y 4: parálogos del gen *NPR1*, TGA: Factores de transcripción TGA, WRKY: Factores de transcripción WRKY.

IV.2.3. Papel del gen *AtNPR1* en la respuesta SAR

La identificación de genes implicados en la respuesta SAR aguas abajo del AS, se ha llevado a cabo especialmente en *Arabidopsis*, siendo el *NPR1* el más estudiado. Este gen codifica para una proteína reguladora clave en la defensa mediada por el AS (Cao et al., 1997). Presenta dos dominios de interacción proteína-proteína conservados; uno de repeticiones ricas en ankirina, necesario para la interacción con los factores de transcripción (FT) TGA (Zhang et al., 1999) y otro, el dominio BTB/POZ (*Broad Complex, Tramtrack and Bric-à-brac/Poxvirus and Zinc-finger*) (Cao et al., 1997). Además, contiene 5 residuos de cisteína, Cys⁸², Cys¹⁵⁰, Cys¹⁵⁵, Cys¹⁶⁰ y Cys²¹⁶, necesarios para la transición del oligómero a su forma monomérica (Mou et al., 2003;

Tada et al., 2008) y una señal de localización para dirigirse al núcleo (Kinkema et al., 2000).

En *Arabidopsis*, el gen *NPR1*, en ausencia de patógenos, se encuentra en forma oligomérica inactiva en el citoplasma para evitar la inducción de SAR y mantener la homeostasis. El complejo oligomérico es mantenido por enlaces intermoleculares disulfuro y la reacción de S-nitrosilación a nivel de la cisteína 156 facilita su oligomerización (Tada et al., 2008). La acumulación de AS afecta al estado redox de las células, provocando la reducción de los enlaces disulfuro del oligómero por dos tiorredoxinas citoplasmáticas, TRX-h3 y TRX-h5 (Tada et al., 2008), y la migración de los monómeros liberados al núcleo para inducir la respuesta SAR (Kinkema et al., 2000; Mou et al., 2003).

Los monómeros *NPR1* en el núcleo se unen a la familia TGA de los FT b-ZIP (*basic leucine zipper*), los cuales interactúan con los elementos as-1 (TGACG) de los promotores de los genes *PR*, induciendo su expresión (Després et al., 2000). Además, también se ha demostrado que activa la expresión de FT de la familia WRKY, algunos de ellos activadores y otros supresores de SAR (Wang et al., 2006).

Además del gen *NPR1*, en *Arabidopsis* se han identificado otros 5 miembros de la familia NPR. *AtNPR2* es el que está más relacionado filogenéticamente con *AtNPR1*; sin embargo, no se conoce su función, aunque posiblemente sea un regulador positivo de SAR. *AtNPR3* y *AtNPR4* se cree que tienen un papel en la regulación negativa de la respuesta de defensa (Zhang et al., 2006), mientras que *AtNPR5* y *AtNPR6*, también llamados *AtBOP1* y *AtBOP2*, respectivamente, están implicados en el desarrollo de flores y hojas (Hepworth et al., 2005). Asimismo, han sido identificados otros miembros de la familia NPR en otras especies vegetales, como arroz (Yuan et al., 2007), *Populus trichocarpa* (Shao et al., 2013), aguacate (Backer et al., 2015) y manzano (Zhang et al., 2016).

El balance entre crecimiento y defensa es crítico para las plantas. Por ello, disponen de distintas rutas para defenderse, estableciendo una u otra, en función de las necesidades, para mantener el coste energético. La interacción entre las rutas de señalización puede ser sinérgica o antagónica. Precisamente, se ha descrito antagonismo entre las rutas del AS y JA, ya que altas concentraciones de AS priorizan la defensa hacia la inducción de SAR, reprimiendo los genes implicados en la ruta de señalización mediada por el JA. Por tanto, se cree que la defensa frente patógenos (hemi) biotrofos es mediada por el AS, mientras que los necrotrofos inducen los genes activados por la ruta del JA/Et (Glazebrook, 2005).

El gen *NPR1* parece ser un regulador de la interconexión de estas rutas de señalización (Spoel et al., 2003; El Oirdi et al., 2011). De hecho, Spoel et al. (2003) propusieron que llevaría a cabo dicha función en el citosol. Dinolfo et al. (2017) observaron que en mutantes de *Arabidopsis*, los genes de defensa *PDF1.2* (defensina),

CHI/PR3 (quitinasa) y *ERF1* (*ethylene-response factor 1*) implicados en la ruta del JA/Et, y los genes *NPR1* y *PR1* que participan en la señalización mediada por el AS, se expresaron tras la inoculación de las hojas con el hongo *Fusarium poae*, un patógeno necrotrofo. Sin embargo, el mutante *npr1-1* mostró muy pocos síntomas, por lo que a pesar de que los genes relacionados con el AS se expresaron, plantearon que la defensa frente a este hongo no requeriría la activación de la ruta del AS. Por otro lado, Makandar et al. (2010) evaluaron la implicación del AS y JA en la interacción *NPR1* y *Fusarium graminearum*, otro patógeno necrotrofo, proponiendo que la defensa mediada por AS-*NPR1* contribuiría al control de la enfermedad, mientras que la señalización del JA tendría un papel dicotómico en Arabidopsis. Por un lado, favorecería la enfermedad al restringir la activación de las defensas reguladas por el AS-*NPR1*, pero por otro, incrementaría la resistencia por un mecanismo independiente de *NPR1*, posiblemente mediante la implicación de *JARI* (*jasmonate resistant 1*). Muchos patógenos han desarrollado mecanismos para promover su virulencia mediante la secreción de toxinas como por ejemplo, la coronatina, producida por *Pseudomonas syringae*. Esta toxina imita al JA reprimiendo genes implicados en la ruta del AS e incrementando su virulencia (Brooks et al., 2005; Uppalapati et al., 2007; Zheng et al., 2012).

IV.2.4. Sobreexpresión del gen *AtNPR1* y sus homólogos

El gen *AtNPR1* se ha sobreexpresado en algunas especies vegetales, tanto mono como dicotiledóneas, induciendo resistencia a distintos patógenos; así en tomate (Lin et al., 2004) y trigo (Makandar et al., 2006), incrementó la resistencia frente a *Fusarium sp.*, mientras en algodón, indujo resistencia a *Thielaviopsis basicola* (Kumar et al., 2013). En Arabidopsis, la sobreexpresión de *AtNPR1* produjo una inducción más fuerte de los genes *PR* en las plantas transgénicas, en comparación con las plantas no transformadas, tras la exposición a *Pseudomonas syringae* y *Peronospora parasitica* (Cao et al., 1998). Sin embargo, no se detectó expresión constitutiva de los genes relacionados con la patogénesis en ausencia de patógenos. Asimismo, se han clonado y caracterizado ortólogos de *AtNPR1* en otras especies vegetales, como pomelo (Chen et al., 2013), *Brassica juncea* (Ali et al., 2017), *Vitis vinífera* (Le Henanff et al., 2009; 2011) y *Malus x domestica* (Malnoy et al., 2007), cuya sobreexpresión en esas mismas especies también ha conferido resistencia frente al ataque de un amplio rango de patógenos bacterianos, como *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Chen et al., 2013), y fúngicos, como *Alternaria brassicae* y *Erysiphe cruciferarum* (Ali et al., 2017), *Erysiphe necator* (Le Henanff et al., 2011) o *Venturia inaequalis* y *Gymnosporangium juniperi-virginiane* (Malnoy et al., 2007).

Por su parte, ortólogos de *AtNPR1* también han sido funcionales en distintas especies vegetales, como en el caso de plantas de arroz transformadas con el *NPR1* de *Brassica juncea* (Sadumpati et al., 2013) o plantas de trigo transformadas con el *NPR1* de centeno (Yu et al., 2017), las cuales mostraron resistencia a *Magnaporthe grisea*,

Rhizoctonia solani y *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, y *Fusarium spp.*, respectivamente.

En este trabajo se ha abordado la transformación genética de olivo con el gen *AtNPR1* con el fin último de obtener plantas resistentes a *Verticillium dahliae*. En el marco temporal de esta tesis se ha procedido a: a) obtener plantas transgénicas que sobreexpresan el gen *AtNPR1*; b) evaluar el efecto del transgén en la respuesta *in vitro*, así como durante la fase de crecimiento en invernadero, de las plantas obtenidas; y c) evaluar la inducción de la actividad quitinasa, una proteína PR, en los cultivos embriogénicos transformados tras la exposición a AS y MeJA. Finalmente, la evaluación de la respuesta a *V. dahliae* de las líneas transgénicas se llevará a cabo fuera del marco de esta tesis.

IV.3. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.3.1. Transformación de células embriogénicas de olivo con el gen *AtNPR1*

IV.3.1.1. Material vegetal y medio de cultivo

Para los experimentos de transformación se emplearon embriones somáticos globulares de 1-2 mm de diámetro procedentes de la línea embriogénica P1 de olivo, obtenida a partir de la radícula de un embrión zigótico maduro de la variedad Picual (Pérez-Barranco et al., 2009). El callo embriogénico se mantuvo en el medio de embriogénesis cíclica de olivo (ECO) (Pérez-Barranco et al. 2009), en oscuridad a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, con subcultivos cada 4 semanas. Este medio contiene $\frac{1}{4}$ de los macroelementos del medio de olivo (OM) (Rugini, 1984), $\frac{1}{4}$ de los micronutrientes MS (Murashige y Skoog, 1962), $\frac{1}{2}$ de las vitaminas OM, 50 mg/L myo-inositol, 20 g/L sacarosa, 550 mg/L glutamina, 0.5 μM 2-isopenteniladenina (2iP), 0.44 μM 6-benciladenina (BA), 0.25 μM ácido indol-3-butírico (IBA), suplementado con 1 g/L caseína hidrolizada y 200 mg/L de cefotaxima, de acuerdo a Rugini y Caricato (1995). El pH se ajustó a 5.74 y como solidificante se añadió phytigel (3 g/L). Los antibióticos utilizados en los experimentos de transformación mediada por *A. tumefaciens* fueron cefotaxima y timentina (250 mg/L) para eliminar la bacteria y paromomicina (50-150 mg/L) para la selección de las células transgénicas. Todos los antibióticos fueron esterilizados en frío y se añadieron al medio mantenido a 45°C .

IV.3.1.2. Vector binario

El gen *AtNPR1* de *Arabidopsis thaliana* (Cao et al., 1994) fue clonado en el plásmido binario pK7WG2.0 que incluye, para la selección del material transformado, el gen *neomicina fosfotransferasa II (nptII)*. La expresión de *AtNPR1* y *nptII* estaba

controlada por los promotores constitutivos CaMV35S y NOS (Nopalina sintasa), respectivamente (Figura IV.2).

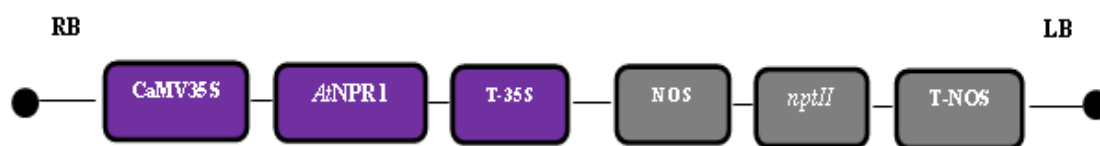


Figura IV.2. Mapa de la región T-DNA del plásmido binario pK7WG2.0, conteniendo el gen *AtNPR1* bajo el control del promotor CaMV35S.

El vector binario se introdujo en la cepa desarmada hipervirulenta de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 por el método de choque térmico (Höfgen y Willmitzer, 1988).

IV.3.1.3. Cultivo bacteriano

El medio de cultivo bacteriano empleado fue Luria-Broth (LB) suplementado con 10 mg/L de rifampicina y 100 mg/L de espectinomicina para la selección de la cepa y el plásmido, respectivamente. Se creció una colonia en medio líquido suplementado con ambos antibióticos. Después, los cultivos bacterianos se centrifugaron a 4000 g durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante, se lavó suavemente el pellet con 10 mM MgSO₄ y se resuspendió en medio líquido ECO sin antibióticos a DO_{600nm} de 0.5 para la infección.

IV.3.1.4. Transformación genética

La transformación se llevó a cabo según el protocolo descrito por Torreblanca et al. (2010). Se inocularon un total de 1064 embriones somáticos, en grupos de 60 con 10 ml del cultivo bacteriano durante 20 minutos, en un agitador rotatorio de plano inclinado. Posteriormente, se secaron en papel de filtro estéril y se cultivaron en medio ECO sólido sin antibióticos, en grupos de 15 explantos por placa, durante 48h. Tras el cocultivo, los embriones se lavaron con medio ECO líquido suplementado con cefotaxima y timentina (250 mg/L) durante 2h para frenar el crecimiento de la bacteria y se transfirieron a medio de selección, medio ECO sólido suplementado con los 3 antibióticos: cefotaxima (250 mg/L), timentina (250 mg/L) y paromomicina (50 mg/L). Todas las incubaciones se realizaron a 25±2°C y en oscuridad.

IV.3.1.5. Selección de las líneas transgénicas

Para la selección de las células transformadas, durante el primer mes, los explantos se recultivaron individualmente en medio fresco a intervalos semanales, los dos siguientes meses, cada 2 semanas y en sucesivos subcultivos cada 4 semanas. El material transformado se identificó empleando una estrategia de selección progresiva;

así, al inicio, se usó una baja concentración del antibiótico paromomicina, 50 mg/L, incrementándose gradualmente la concentración hasta 150 mg/L a la finalización del proceso, a las 24 semanas. Los controles no transformados se trataron de la misma forma que el material inoculado.

Las líneas embriogénicas que proliferaron en el medio ECO suplementado con 150 mg/L de paromomicina, se sometieron durante 3 semanas a otra selección en medio líquido, cultivando 0.5 g de fracción fina de callo, con un tamaño menor de 3 x 3 mm, en matraces con 25 ml de medio ECO suplementado con 12.5-25 mg/L de paromomicina junto a 250 mg/L de cefotaxima, a 120 rpm. El material embriogénico que superó esta exposición se filtró a través de una malla de nylon de 2 x 2 mm y los embriones recuperados se cultivaron en el medio ECO sólido suplementado con 150 mg/L de paromomicina durante varios subcultivos. En el proceso de selección, el control no transformado se trató de la misma manera que el material putativamente transgénico. Todas las incubaciones se realizaron a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y en oscuridad.

IV.3.1.6. Maduración de embriones somáticos

Los embriones globulares de 1-3 mm de diámetro de las 3 líneas seleccionadas y del control no transgénico P1 se maduraron siguiendo el protocolo de Cerezo et al. (2011a). Se emplearon 120-150 embriones globulares de cada línea transgénica y del control para inducir maduración. Los embriones se cultivaron en el medio ECO sin reguladores de crecimiento, suplementado con 1 g/L de carbón activo durante 4 semanas. Posteriormente, se pasaron al mismo medio y se cultivaron sobre una membrana semipermeable de acetato de celulosa (Sigma D9777), con un tamaño aproximado de 4 x 4 cm, durante 4 semanas adicionales para la obtención de embriones maduros blanco-opacos. El proceso se llevó a cabo a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y en oscuridad.

IV.3.1.7. Germinación de embriones

Los embriones maduros blanco-opacos se cultivaron en el medio basal MS modificado con 1/3 de los macroelementos y 10 g/L de sacarosa (Clavero-Ramírez y Pliego-Alfaro, 1990) durante 12 semanas, a una irradiancia de $40 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, de acuerdo con el protocolo de Cerezo et al. (2011a). Se estableció un stock de proliferación de cada línea a partir de los brotes obtenidos, siguiendo el protocolo de Vidoy-Mercado et al. (2012). La germinación y posterior multiplicación de brotes se realizó a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e irradiancia de $40 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

IV.3.1.8. Evaluación de la capacidad de multiplicación *in vitro* de las distintas líneas transgénicas *AtNPR1*

Para evaluar la tasa de multiplicación de las diferentes líneas transformadas, se cultivaron 20 segmentos de dos nudos, de aproximadamente 1.5-2 cm de longitud y sin

yema apical, de cada línea en el medio de proliferación RP suplementado con 2 mg/L de ribósido de zeatina (Vidoy-Mercado et al., 2012). Después de 8 semanas de cultivo, se tomaron datos del número y longitud de los brotes axilares y del número de nudos de cada brote. La longitud media de los brotes axilares se calculó como la media de la longitud de los brotes por explanto, teniendo en cuenta los que presentaban una longitud mayor de 1 cm, y al menos un nudo y la yema apical. El experimento se realizó por triplicado.

IV.3.1.9. Evaluación de la capacidad de enraizamiento *in vitro* de las distintas líneas transgénicas *AtNPR1*

Para la inducción de raíces, segmentos apicales con una longitud aproximada de 2 cm con 1-2 nudos, se cultivaron en grupos de 3 explantos por tubo, conteniendo 3 ml de medio RP líquido suplementado con 10 mg/L de IBA, durante 3 días. Posteriormente, se transfirieron en grupos de 6 explantos a frascos con medio basal RP suplementado con 1 g/L de carbón activo durante 9 semanas (Figura IV.3). Los cultivos se incubaron a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e irradiancia de $40\ \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Se tomaron datos del número de raíces y longitud de la raíz principal de las plantas de cada una de las líneas *AtNPR1*, así como del control P1. El número de plantas evaluadas osciló entre 29 (NPR1 224) y 41 (NPR1 814).

IV.3.1.10. Aclimatación de las plantas

Se enraizaron y aclimataron 20 plantas de cada línea transgénica y del control P1 no transformado. Los explantos enraizados se aclimataron individualmente en semilleros utilizando como sustrato 50% de perlita y 50% de turba rubia de sphagnum, fertilizado con osmocote. Se sellaron las bandejas con film transparente y después de 1-2 semanas se realizaron cortes para facilitar la entrada de aire quedando descubiertas a las 4 semanas. Tras 1 mes adicional, las plantas se trasplantaron a maceta en invernadero de confinamiento (Figura IV.4).

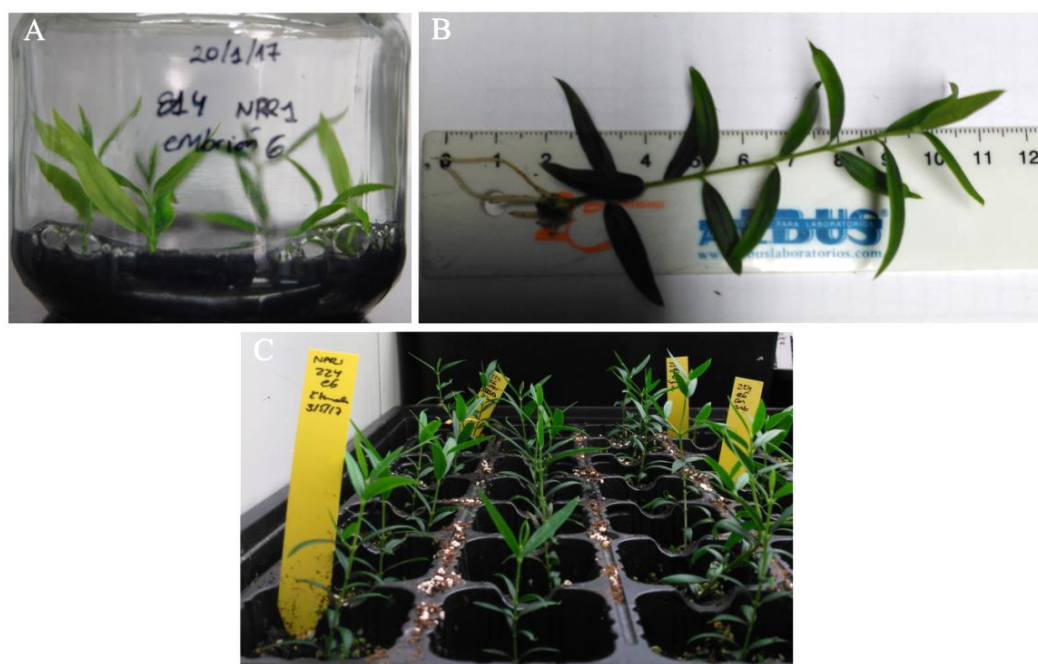


Figura IV.3. A) Brotes apicales de la línea NPR1 814 cultivados en el medio de enraizamiento tras el choque con auxina. B) Planta de la línea NPR1 224 tras 9 semanas de cultivo en el medio de enraizamiento. C) Plantas de la línea NPR1 224 tras 6 semanas en la cámara de aclimatación.

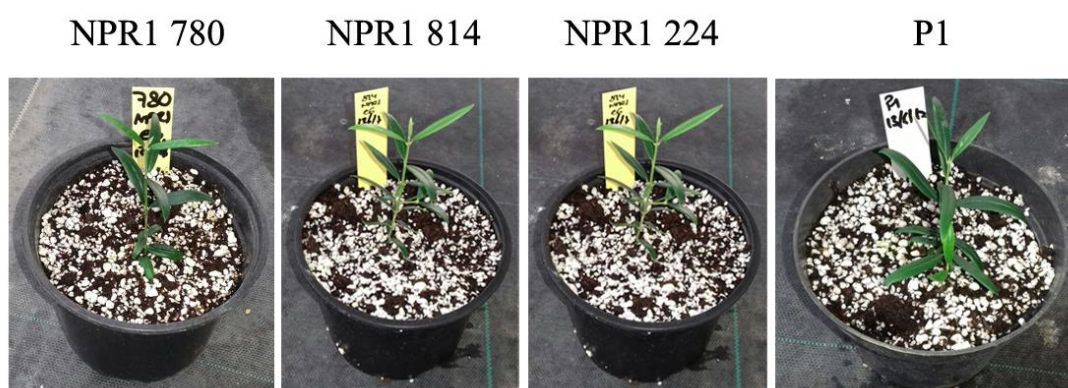


Figura IV.4. Plantas de las líneas NPR1 780, 814 y 224, y P1 trasplantadas a maceta en invernadero de confinamiento después de 8 semanas en la cámara de aclimatación.

Después de 8 semanas en la cámara de aclimatación se tomaron datos de las plantas que habían superado esta fase.

IV.3.1.11. Caracterización de las plantas *AtNPR1* *ex vitro*

Para evaluar el efecto del transgén en el fenotipo de las plantas transformadas, se tomaron datos morfológicos de las plantas aclimatadas después de 9 meses de crecimiento en el invernadero de confinamiento, bajo condiciones naturales de luz y temperatura. Para ello, se midió la longitud del tallo y el diámetro del mismo a 5 cm de la base de la planta, de un total de 14 plantas de cada línea.

IV.3.2. Análisis molecular de las líneas *AtNPR1*

IV.3.2.1. Extracción de ADN genómico

La extracción del ADN genómico de callo embriogénico de las 3 líneas transformadas con el gen *AtNPR1* y del control no transgénico P1 se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Healey et al. (2014) modificado. Tras 4 semanas de cultivo, se pesó 1 g de tejido de callo de cada línea, se pulverizó en un mortero con nitrógeno líquido y se congeló a -80°C hasta el momento de su uso. Para la extracción, se añadió 1 ml de tampón de extracción (CTAB al 2% (w/v), 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 25 mM EDTA, 1.5 M NaCl y mercaptoetanol al 0.5% (w/v)) al pulverizado, se agitó en un vórtex y se incubó durante 30 min a 65°C en un baño, invirtiendo los falcon cada 5 minutos. Se añadió 1 ml de cloroformo:isoamílico (24:1, v/v) y se agitó en un vórtex hasta la obtención de una emulsión blanquecina. Se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min y el sobrenadante (800 μl) se pasó a un eppendorf nuevo al que se añadió el mismo volumen de cloroformo:isoamílico (24:1, v/v), se agitó en un vórtex y se centrifugó nuevamente. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se mezcló con 2/3 de isopropanol. Los tubos se invirtieron varias veces y se guardaron a -20°C durante al menos 30 minutos para favorecer la precipitación del ADN. Posteriormente, se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 min y el sobrenadante se desechó. El pellet obtenido se lavó dos veces con etanol al 70% y, finalmente, se secó a temperatura ambiente, se resuspendió en 100 μl de agua milliQ estéril y se almacenó a -20°C .

Las muestras de ADN genómico se incubaron con RNasa (10 mg/ml) durante 20 min a 37°C . Posteriormente, se lavaron con fenol:cloroformo:isoamílico y se precipitó el ADN siguiendo los pasos descritos previamente. La concentración del ADN extraído se cuantificó en el Nanodrop ND-1000 y las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 0.7% para comprobar su integridad.

IV.3.2.2. Amplificación por PCR de los genes *nptII* y *AtNPR1*

Para comprobar la naturaleza transgénica de las líneas embriogénicas obtenidas, se llevó a cabo la amplificación de un fragmento de 732 pb del gen *AtNPR1* y de 700 pb del gen de selección *nptII*. Como molde para la reacción de amplificación se utilizaron entre 0.5-1 μl de ADN genómico extraído del callo, incluyendo como control positivo el ADN plasmídico extraído del cultivo bacteriano. Los oligonucleótidos y los programas de amplificación utilizados se muestran en la Tabla IV.1.

Tabla IV.1. Secuencia a amplificar, oligonucleótidos (D: directo, R: reverso), tamaño del fragmento esperado y programa de amplificación, utilizados para la comprobación de la naturaleza transgénica del material recuperado.

Secuencia a amplificar	Oligonucleótidos (5'-3')	Tamaño fragmento esperado	Programa de amplificación
<i>AtNPR1</i>	D: AATTGAAGATGACGCTGCTCG R: CGACGATGAGAGAGTTTACGG	732 pb	Desnaturalización inicial: 95°C-4 min 30 ciclos Desnaturalización: 95°C-1 min Hibridación: 59°C- 45 s Extensión: 72°C- 1 min Extensión final: 72°C- 10 min
<i>nptII</i>	D: GAGGCTATTCGGCTATGACTG R: ATCGGGAGCGGCGATACCGTA	700 pb	Desnaturalización inicial: 94°C-5 min 30 ciclos Desnaturalización: 95°C-45 s Hibridación: 59°C- 45 s Extensión: 72°C- 1 min Extensión final: 72°C- 10 min

IV.3.2.3. Análisis de la expresión del gen *AtNPR1* por qRT-PCR

IV.3.2.3.1. Extracción de ARN

Aproximadamente, 250-300 mg de callo de cada línea *AtNPR1*, incluyendo el control no transgénico P1, se trituraron con un pistilo en un eppendorf de 2 ml, previamente enfriado en nitrógeno líquido. El pulverizado se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta el momento de la extracción. El ARN se extrajo empleando el kit NucleoSpin® RNA Plant (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La concentración del ARN extraído se cuantificó en el Nanodrop ND-1000 y la integridad de las muestras se chequeó en un gel de agarosa al 1.5% preparado con agua DEPC (Dietilpirocarbonato).

IV.3.2.3.2. Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se llevó a cabo empleando el kit iScript™ cDNA Synthesis (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del cDNA se comprobó por PCR, empleando los oligonucleótidos utilizados en el análisis de expresión del gen por qRT-PCR que se describen en el siguiente apartado y el programa de amplificación: desnaturalización inicial: 95°C - 3 min, desnaturalización: 95°C - 35 s,

hibridación: 60°C - 45 s, extensión: 72°C – 45 s (30 ciclos), extensión final: 72°C - 10 min. Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 1.5%.

IV.3.2.3.3. Cuantificación de la expresión del gen *AtNPR1* por qRT-PCR

El análisis de expresión del gen *AtNPR1* se realizó usando los oligonucleótidos diseñados por Silva et al. (2015), D: 5'-ATCAGAAGCAACTTTGGAAGGTAGA-3' y R: 5'-ACCGCCATAGTGGCTTGTTT-3', los cuales amplifican un fragmento de 63 pb. Como molde para la reacción de amplificación se empleó 1 µl de una dilución 1/20 del cDNA sintetizado a partir de 1 µg de ARN y como gen de referencia se usó el gen de la Ubiquitina de olivo: D: 5'- ATGCAGATCTTTGTGAAGAC-3'/R: 5'-ACCACCACGAAGACGGAG-3' (Gómez-Jiménez et al., 2010).

Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo usando el kit iTaq™ Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad), en un volumen final de 20 µl conteniendo 0.5 µM de cada oligonucleótido y 1 µl de una dilución 1/20 del cDNA sintetizado, en el equipo Bio-Rad CFX96™ (Bio-Rad). Las condiciones de amplificación empleadas fueron: desnaturalización inicial 30 s a 95°C, 40 ciclos de 5 s a 95°C, 30 s a 60°C, seguidos de una curva de disociación desde 65 a 95°C con incrementos de 0.5°C cada 5 s. La eficiencia de la amplificación se chequeó con una curva de diluciones de cDNA de concentración conocida (1/10-1/200) con ambas parejas de oligonucleótidos. El gen constitutivo de olivo Ubiquitina (Gómez-Jiménez et al., 2010) se usó como referencia endógena para normalizar. Los datos de qRT-PCR se calibraron en relación al nivel de expresión de la línea que mostró menor expresión, asignando a ésta el valor 1. La cuantificación relativa se llevó a cabo usando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001). El análisis de expresión se realizó por triplicado y se presenta como media±SD.

IV.3.3. Elicitación de las líneas embriogénicas *AtNPR1* y cuantificación de la actividad endoquitinasa

IV.3.3.1. Establecimiento del cultivo y tratamiento con elicitores: AS y MeJA

Para la elicitación del material embriogénico de las 3 líneas *AtNPR1* y el control no transgénico P1, se pesaron 0.5 g de fracción fina de callo con un tamaño aproximado de 3 x 3 mm y se cultivó en un matraz Erlenmeyer conteniendo 25 ml de medio ECO, suplementado con 500 µM de ácido salicílico (AS) ó 100 µM de metil jasmonato (MeJA), en agitación (120 rpm) durante distintos tiempos de incubación: 3, 24 y 48h para la elicitación con AS, y 3, 24, 48 y 72h para la exposición a MeJA. Todas las incubaciones se hicieron a temperatura ambiente y en oscuridad.

IV.3.3.2. Obtención del extracto proteico y cuantificación de actividad endoquitinasa

Tras los tiempos de exposición, se filtró el material a través de una doble gasa, se secó en papel de filtro y se pulverizó en un mortero con nitrógeno líquido. El pulverizado se transfirió a un tubo falcon previamente enfriado en nitrógeno líquido y se congeló a -80°C hasta el momento de la realización de las medidas.

La cuantificación de actividad endoquitinasa se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Emani et al. (2003) modificado. Se extrajo el extracto proteico en 2 ml de tampón acetato de sodio 50 mM a pH 5.5. Tras la homogenización en frío con ultraturrax, se centrifugaron las muestras durante 20 minutos a 13000 rpm (4°C), recogiendo el sobrenadante. Un volumen de 50 μl del extracto se incubó con 12.5 μl del sustrato fluorescente 4-Methylumbelliferyl β -D-N, N', N''-triacetylchitotrioside (MUC) a una concentración de 250 μM , disuelto en tampón citrato 0.1 M, pH 3, a 37°C durante 1h y en oscuridad. Como control negativo, 50 μl del extracto de cada línea se incubó con 12.5 μl de tampón citrato sin sustrato MUC en las condiciones de ensayo descritas.

Para la cuantificación de la actividad endoquitinasa se realizó una curva patrón por triplicado con concentraciones conocidas (0.1-10 μM) del compuesto fluorescente 4-metilumbelliferona (MU), producto resultante de la hidrólisis del sustrato MUC por enzimas endoquitinasas. Tras la incubación de las muestras y de la curva patrón se paró la reacción con 500 μl de carbonato sódico 0.2 M y se midió la fluorescencia en un equipo Clariostar Monochromator Microplate Reader - BMG LABTECH, siendo la longitud de excitación empleada 350 y la de emisión 450.

El contenido total de proteína de cada extracto se cuantificó por el método Bradford (Bradford, 1976), utilizando el reactivo Bio-Rad Protein Assay, siguiendo las instrucciones del fabricante.

La actividad endoquitinasa específica se expresó como picomoles de 4-metilumbelliferona por hora producidos por μg de proteína total (picomoles 4-MU/h/ μg de proteína total). Se realizaron 3 extracciones independientes por línea transgénica.

IV.3.4. Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) usando el software SPSS versión 23. El test de Levene para la homogeneidad de varianzas se llevó a cabo antes del ANOVA. En los tests de ANOVA unifactorial, las comparaciones múltiples se realizaron por el test de Tukey. Para los tests de ANOVA factorial, se analizaron los efectos simples de cada factor, manteniendo el otro factor constante y ajustando el nivel de significación mediante el procedimiento de Bonferroni. El test

Kruskal-Wallis se usó para la separación de medias en caso de varianzas no homogéneas. Todos los test se realizaron a $P=0.05$.

IV.4. RESULTADOS

IV.4.1. Transformación genética y regeneración de plantas

IV.4.1.1. Selección de las líneas embriogénicas transformadas

La selección del material embriogénico inoculado con *A. tumefaciens* portando el plásmido binario con el gen *AtNPR1* se realizó empleando concentraciones crecientes de paromomicina (Figura IV.5A). Inicialmente, los embriones infectados se cultivaron en medio de selección con 50 mg/L de paromomicina. Posteriormente, la concentración de antibiótico se aumentó hasta llegar a 150 mg/L. Después de 24 semanas de cultivo, 10 líneas putativamente transgénicas proliferaban en el medio de selección suplementado con 150 mg/L de paromomicina (Figura IV.5B), mientras que el material no inoculado mostraba un aspecto necrosado en el mismo medio.

Para evitar la selección de material quimérico, las líneas embriogénicas que mostraron mayor proliferación en el medio de selección se cultivaron en medio ECO líquido suplementado con 12.5-25 mg/L de paromomicina. Solo 3 líneas embriogénicas, NPR1 780, 814 y 224, sobrevivieron y proliferaron en este medio líquido de selección. La eficiencia de transformación obtenida tras la fase de selección en medio líquido fue de 0.28% (Tabla IV.2).

Tabla IV.2. Eficiencia de transformación de la línea embriogénica de olivo P1 con la cepa de *A. tumefaciens* AGL1 portando el plásmido binario pro35S:*AtNPR1*. Datos tomados a las 31 semanas tras el proceso de selección en medio sólido y líquido con paromomicina.

Plásmido binario	Cepa	Nº embriones globulares inoculados	Nº líneas transgénicas seleccionadas	Tasa de transformación (%)
pro35S: <i>AtNPR1</i>	AGL1	1064	3	0.28

La fracción fina de las 3 líneas *AtNPR1* se filtró y se cultivó de nuevo en el medio de selección ECO sólido suplementado con 150 mg/L de paromomicina (Figura IV.5C-F). Tras varios subcultivos, los embriones somáticos de las líneas transgénicas se maduraron y se germinaron para la obtención de plantas.

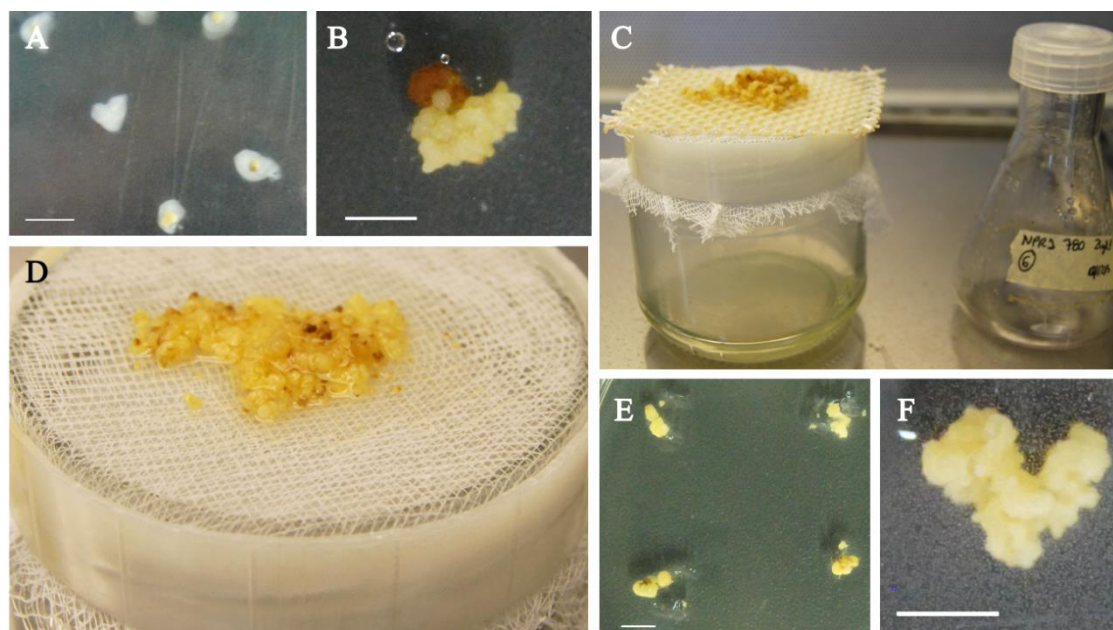


Figura IV.5. Obtención de líneas embriogénicas transformadas con el gen *AtNPR1*. A) Embriones somáticos en estadio globular tras 2 días de cocultivo con *A. tumefaciens*. B) Callo de la línea NPR1 780 proliferando en medio de selección ECO suplementado con 150 mg/L de paromomicina. C) Aspecto del material resistente al antibiótico de selección, de la línea NPR1 780, tras el pase por medio líquido suplementado con 25 mg/L de paromomicina. D) Fracción fina de la línea NPR1 780 tras el primer pase en medio ECO suplementado con 25 mg/L de paromomicina. E) Grupos de 3-4 embriones cultivados tras el pase por medio líquido de la línea NPR1 780 en medio sólido ECO suplementado con 150 mg/L del antibiótico de selección. F) Aspecto del callo de la línea NPR1 780 después de 1 mes de cultivo en medio sólido ECO suplementado con 150 mg/L del antibiótico de selección. Barra: 5 mm.

IV.4.1.2. Maduración y germinación de embriones somáticos

El porcentaje de maduración de las distintas líneas *AtNPR1* y de la línea no transformada P1 fue en torno al 30%. Durante este proceso, muchos de los embriones maduros blanco-opacos mostraron morfologías atípicas de embriones en estadio cotiledonar, presentando uno o más de 2 cotiledones (Figura IV.6).

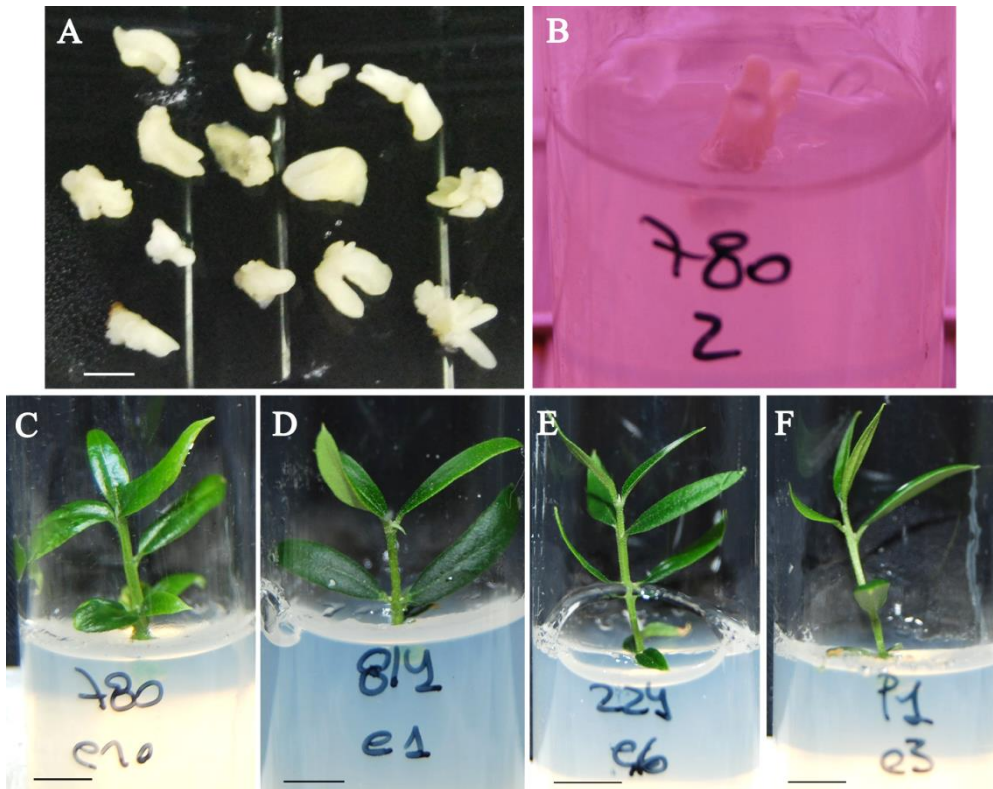


Figura IV.6. A) Aspecto de los embriones somáticos maduros de la línea NPR1 224 en el medio de maduración con membrana de acetato de celulosa. B) Embrión maduro de la línea NPR1 780 en el medio de germinación. C- F) Brotes aislados de los embriones germinados de las líneas *AtNPR1* y del control no transgénico en el medio RP. Barra (A): 5 mm, (C-F): 1 cm.

Los porcentajes de germinación de brote en las distintas líneas transgénicas variaron entre el 42 y el 53%; porcentajes ligeramente superiores al control, aunque las diferencias con el control solo fueron significativas para la línea NPR1 814 (Tabla IV.3).

Tabla IV.3. Número de embriones blanco-opacos empleados en la regeneración de plantas, número de embriones que formaron brote de las líneas *AtNPR1* y del control no transgénico, y porcentaje de germinación de brote. Los porcentajes de germinación se analizaron estadísticamente mediante el test de Chi cuadrado, comparando cada una de las líneas transgénicas con el control P1. El asterisco indica diferencias significativas con respecto al control no transgénico (P1), a $P=0.05$.

Líneas	Embriones blanco-opacos	Nº embriones que formaron brote	Tasa de germinación de brote (%)
NPR1 780	53	22	41.5
NPR1 814	34	18	52.9 *
NPR1 224	26	12	46.1
P1	35	8	22.7

De los brotes obtenidos en el proceso de germinación se seleccionó uno de cada línea y del control no transgénico, para el establecimiento de los stocks de proliferación.

IV.4.2. Análisis molecular de las líneas *AtNPR1*

IV.4.2.1. Análisis de la inserción del transgén por PCR

La comprobación del inserto en el genoma de las 3 líneas embriogénicas NPR1 seleccionadas (780, 814 y 224), se realizó mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos tanto para la secuencia *AtNPR1* como para el gen *nptII*. Todas las líneas seleccionadas amplificaron los fragmentos del tamaño esperado de 732 y 700 pb para *AtNPR1* (Figura IV.7A) y *nptII* (Figura IV.7B), respectivamente. No se observó amplificación en ADN de la línea P1 no transformada (Figura IV.7).

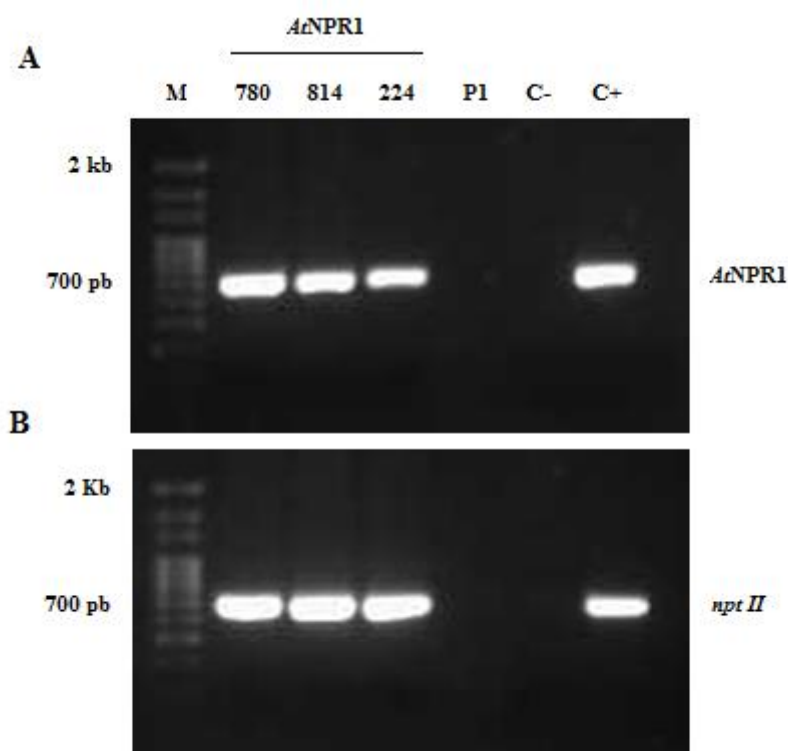


Figura IV.7. Amplificación por PCR de un fragmento de 732 pb correspondiente al gen *AtNPR1* (A) y de 700 pb correspondiente al gen *nptII* (B) en el DNA genómico extraído de callo embriogénico. Líneas transgénicas *AtNPR1*: 780, 814 y 224; P1: control no transgénico; C-: control negativo (sin DNA); C+: plásmido pro35S:*AtNPR1*; M: marcador de peso molecular.

IV.4.2.2. Análisis del nivel de transcrito mediante qRT-PCR

El análisis de expresión del gen *AtNPR1* en las líneas embriogénicas seleccionadas se llevó a cabo mediante qRT-PCR. Los niveles de transcrito se calibraron con los de la línea de menor expresión (*NPR1* 814) y la cuantificación relativa se llevó a cabo empleando el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Las 3 líneas mostraron expresión del gen *AtNPR1*; sin embargo, lo hicieron a diferentes niveles. Las líneas *NPR1* 224 y 814 mostraron bajos niveles de transcrito y muy similares entre sí, mientras que la línea *NPR1* 780 alcanzó el mayor nivel de expresión, muy superior al de las otras dos líneas transgénicas (Figura IV.8). No se observó expresión del gen en el control no transformado.

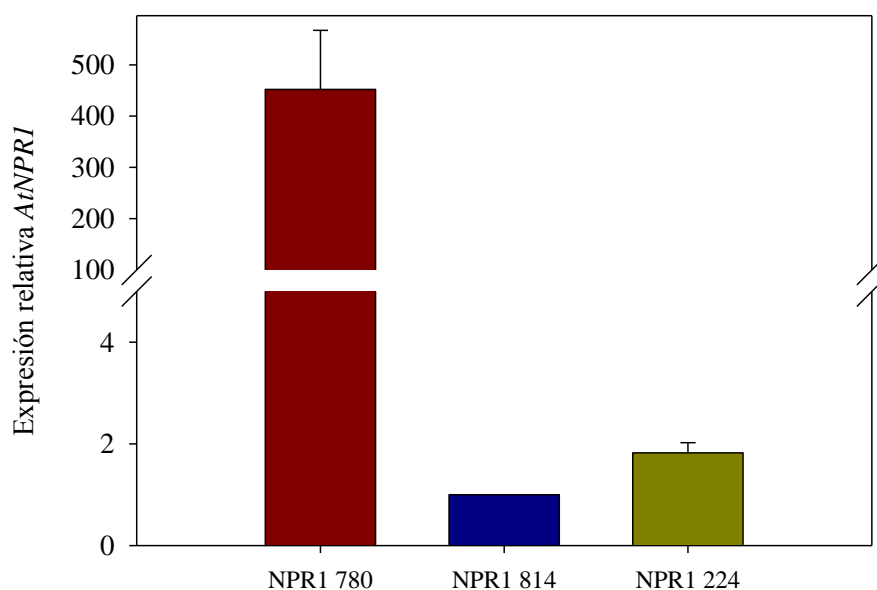


Figura IV.8. Niveles de expresión del gen *AtNPR1* en las líneas embriogénicas de olivo medidos mediante qRT-PCR. Los valores de transcrito se calibraron con los de la línea embriogénica con menor expresión, NPR1 814, que toma el valor 1. Los valores se expresan como la media \pm SD de un triplicado.

IV.4.3. Caracterización morfológica de las plantas *AtNPR1*

IV.4.3.1. Evaluación de la capacidad de multiplicación *in vitro* de las distintas líneas transgénicas *AtNPR1*

Se evaluó la tasa de multiplicación de los brotes de las distintas líneas transgénicas durante 3 subcultivos. La línea NPR1 814 presentó el mayor número medio de brotes por explanto (2.1 ± 0.5) junto con la mayor longitud (5.1 ± 1.1 cm) y número medio de nudos por brote (3.9 ± 0.8), mientras que las plantas de la línea NPR1 780 mostraron un porte más reducido, siendo el número medio de brotes inferior al de las otras líneas transgénicas y al control P1 (Figura IV.9).

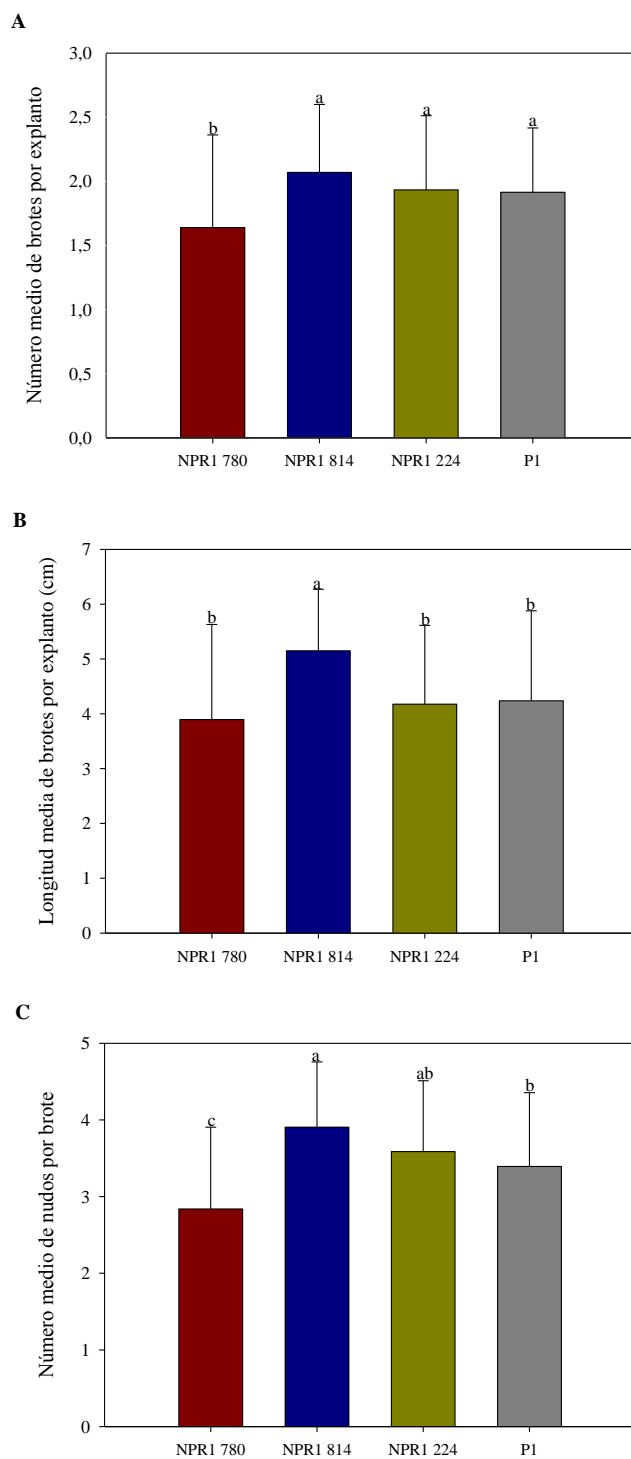


Figura IV.9. Número medio de brotes por explanto (A), longitud media de los brotes (B) y número medio de nudos por brote (C) de las líneas *AtNPR1* y del control no transgénico (P1), a las 8 semanas de cultivo en medio de multiplicación. Los datos se representan como la media±SD de 3 subcultivos. El análisis estadístico se realizó por una prueba no paramétrica Kruskal-Wallis (A) y mediante ANOVA y posterior separación de medias mediante test de Tukey (B y C). Letras diferentes indican diferencias entre las líneas a $P=0.05$.

IV.4.3.2. Evaluación de la capacidad de enraizamiento *in vitro* de las distintas líneas transgénicas *AtNPR1*

Se evaluó la capacidad de enraizamiento de las líneas *AtNPR1* a las 9 semanas; todas las líneas mostraron un elevado porcentaje de explantos enraizados, entre el 85% de la línea NPR1 814 y 89% para la línea NPR1 780. Asimismo, no hubo diferencias entre las distintas líneas transgénicas con respecto al control P1, que dio un porcentaje de enraizamiento del 92%.

Se caracterizaron los explantos enraizados *in vitro*, siendo la línea NPR1 224 la que presentó el mayor número medio de raíces por brote (3.2 ± 1.2), pero de menor longitud (1.2 ± 0.7 cm), mientras que la línea con el menor número medio de raíces por brote fue NPR1 780 (2.3 ± 1.3) (Fig. IV.10A). Asimismo, la línea NPR1 814 mostró la mayor longitud de la raíz principal (1.6 ± 1.1 cm) (Figura IV.10B). No obstante, no se observaron diferencias significativas entre los valores medios obtenidos de las diferentes líneas transgénicas y el control P1, para ninguno de los dos parámetros evaluados.

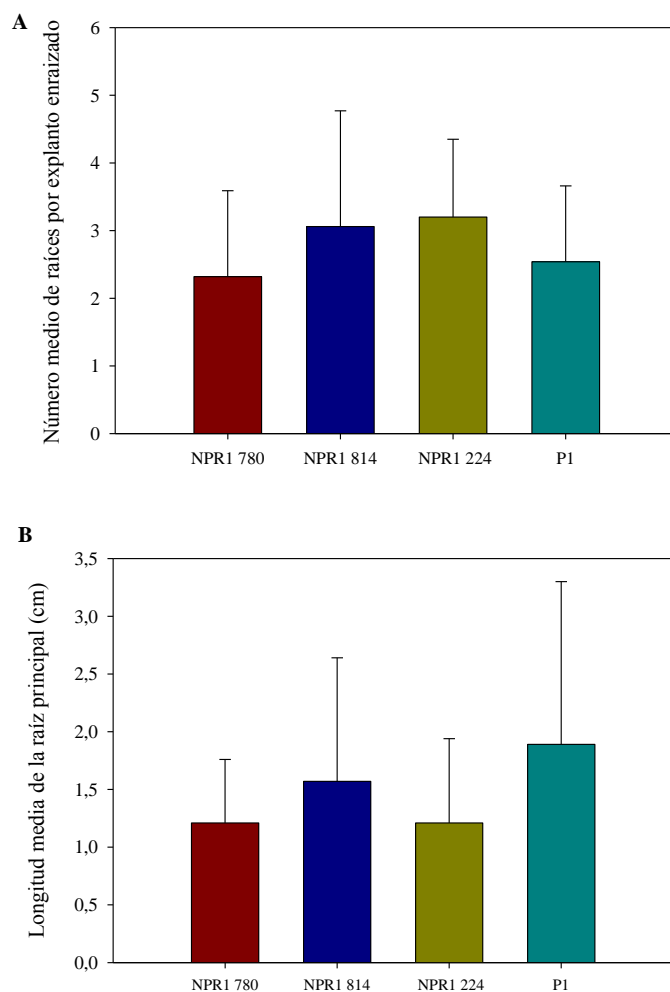


Figura IV.10. Número medio de raíces por brote enraizado (A) y longitud media de la raíz principal (B) en los brotes enraizados de las líneas transgénicas *AtNPR1* y control no transgénico P1, después de 9 semanas de cultivo en el medio de enraizamiento. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, no observándose diferencias significativas entre las líneas a $P=0.05$.

IV.4.3.3. Aclimatación de las plantas

Como se puede observar en la Figura IV.11, después de 8 semanas en la cámara de aclimatación, las líneas *AtNPR1* mostraron elevados porcentajes de supervivencia, siendo superiores al 70%, mientras que de la línea P1 sobrevivieron el 63% de las plantas. Las tasas de supervivencia de las líneas transgénicas NPR1 814 y 224 fueron significativamente superiores a la obtenida en el control no transformado P1.

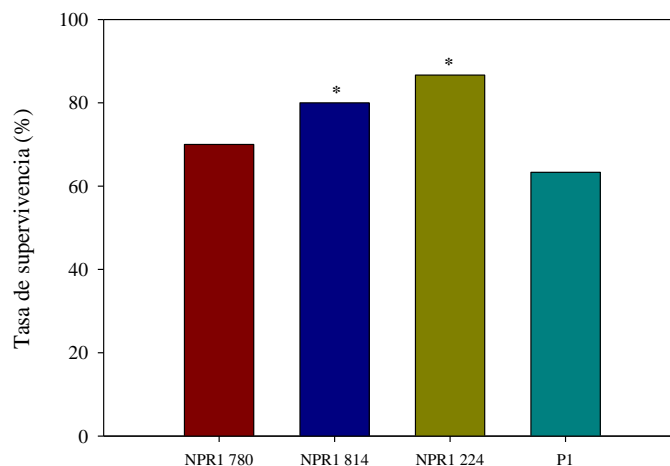


Figura IV.11. Tasa de supervivencia de las líneas transgénicas *AtNPR1* y control no transgénico P1 a las 8 semanas en la cámara de aclimatación. El análisis estadístico se realizó por una prueba Chi cuadrado. El asterisco indica diferencias significativas con el control no transgénico (P1) a $P=0.05$.

IV.4.3.4. Caracterización de las plantas *ex vitro*

Después de 9 meses en el invernadero de confinamiento, se tomaron datos de la longitud y diámetro del tallo de 14 plantas de cada línea (Figura IV.12). Los valores medios fueron homogéneos; no obstante, el tallo de las plantas NPR1 814 presentaba mayor longitud (23.7 ± 4.3 cm), mientras que el resto rondaba los 18 (P1 y NPR1 224) y 20 cm (NPR1 780) (Figura IV.13A). Respecto al diámetro medio del tallo, el análisis estadístico mostró que existían diferencias significativas entre las líneas, siendo NPR1 814 y 224, las de mayor diámetro de tallo, alrededor de 0.23 cm (Figura IV.13B).



Figura IV.12. Aspecto de las plantas transgénicas NPR1 tras 9 meses en el invernadero de confinamiento. De izquierda a derecha: NPR1 224, 780 y 814, y P1 (control no transformado). Barra: 5 cm.

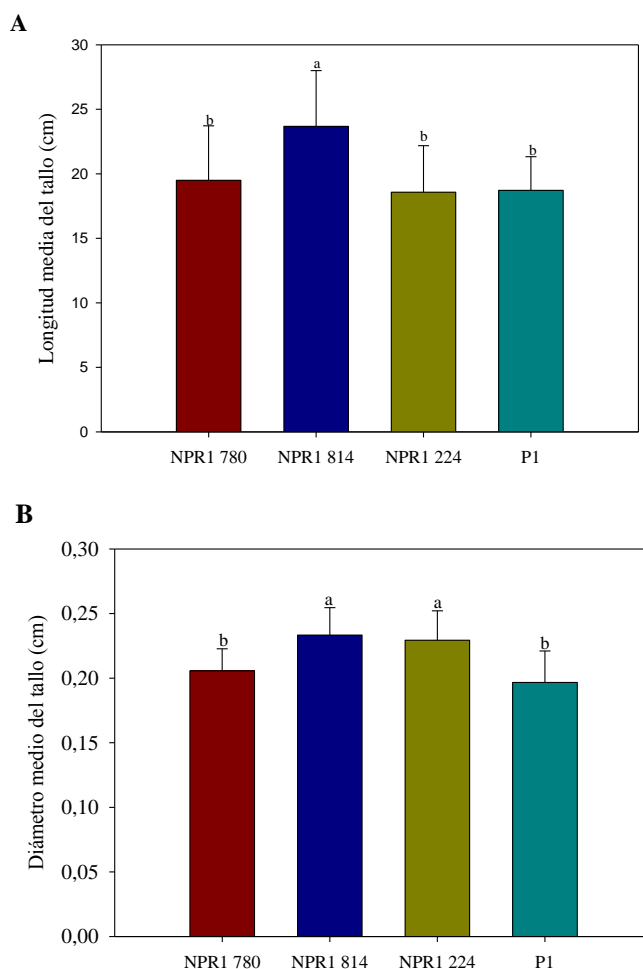


Figura IV.13. Longitud (A) y diámetro del tallo (B) en las líneas *AtNPR1* y control no transformado P1, tras 9 meses de crecimiento en el invernadero de aclimatación. Letras diferentes indican diferencias significativas mediante test de Tukey a $P=0.05$.

IV.4.4. Elicitación de las líneas transformadas con el gen *AtNPR1*

Se llevaron a cabo dos experimentos de elicitación del callo embriogénico de las líneas transgénicas *AtNPR1* con 500 μM de AS y 100 μM de MeJA, cuantificándose la actividad quitinasa a diferentes tiempos tras los tratamientos hormonales.

IV.4.4.1. Tratamiento con AS

El análisis estadístico de los datos mediante ANOVA factorial mostró que los dos factores, genotipo y tiempo de incubación en AS, así como la interacción entre ambos afectaban significativamente a la actividad quitinasa ($P<0.01$). La actividad endoquitinasa basal fue significativamente mayor en la línea NPR1 814 que en el control sin transformar, 6.7 vs. 4.2 picomoles 4-MU/h/ μg de proteína total en NPR1 814 y control, respectivamente. Por el contrario, las otras dos líneas transgénicas presentaron una actividad similar entre ellas, pero menor que el control (Figura IV.14), 2.1 vs. 4.2

picomoles 4-MU/h/ μ g de proteína total en transgénicas y control, respectivamente. En la línea NPR1 780 no se observó variación significativa de la actividad durante todo el tratamiento. Por el contrario, en las otras líneas, la actividad disminuyó significativamente a las 3 horas de la transferencia del callo al medio líquido y aplicación del tratamiento de AS, disminución que fue más acusada cuanto mayor era la actividad inicial. A las 24h del tratamiento, los valores de actividad no variaron en el caso de la línea sin transformar, P1, o aumentaron en el caso de las líneas NPR1 224 y 814. Posteriormente, en la línea NPR1 814, la actividad se incrementó a las 48h de tratamiento hasta alcanzar valores ligeramente inferiores a los obtenidos en esta línea antes del tratamiento. Por el contrario, en el resto de genotipos, la actividad a 48h no sufrió cambios significativos.

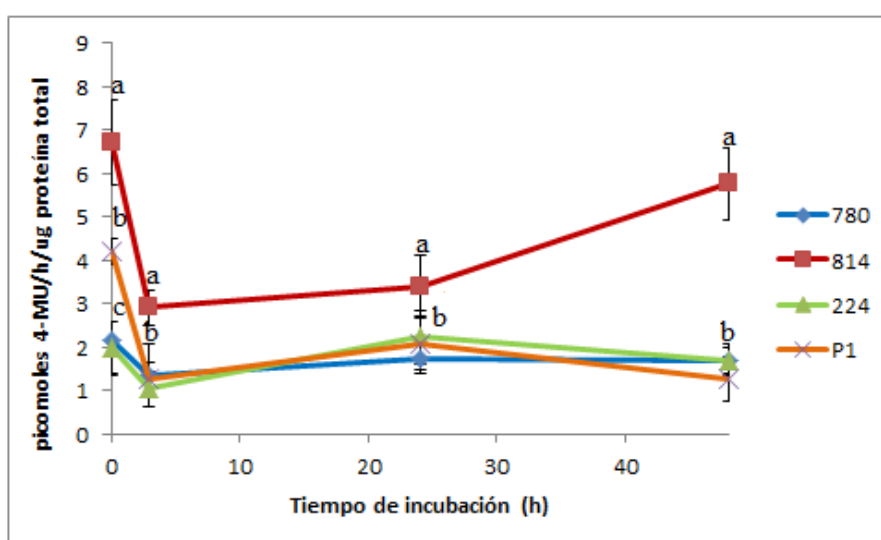


Figura IV.14. Nivel de actividad endoquitinasa expresada como picomoles de 4-MU/h/ μ g de proteína total. Los valores se expresan como la media \pm SD de 3 réplicas independientes. El análisis estadístico se realizó por un ANOVA factorial y los contrastes entre medias, para cada muestreo en el tiempo, mediante el test de Bonferroni con $P=0.05$.

IV.4.4.2. Tratamiento con MeJA

El análisis estadístico de los datos mediante ANOVA factorial mostró que los dos factores, genotipo y tiempo de incubación en MeJA, así como la interacción entre ambos afectaban significativamente a la actividad quitinasa ($P<0.01$). A las 3h de cultivo del callo en el medio líquido suplementando con MeJA, se observó una disminución de la actividad endoquitinasa en las líneas NPR1 814 y P1, mientras que la actividad no varió prácticamente en el caso de las otras 2 líneas transgénicas (Figura IV.15). Sin embargo, a las 24h de tratamiento la actividad se incrementó de manera significativa en todos los genotipos, manteniéndose ese nivel de actividad a las 48h en el caso de las líneas NPR1 780 y 224, o disminuyendo en el caso de NPR1 814 y P1. A las 72h el nivel de actividad endoquitinasa basal se mantuvo en valores similares en las

líneas P1 y NPR1 224, aumentó ligeramente en la línea NPR1 814 y disminuyó en la línea NPR1 780. Los mayores incrementos de actividad quitinasa a las 24h del tratamiento de MeJA, con respecto al valor de actividad inicial, se observaron en las 3 líneas NPR1, valores de incremento de actividad de 3.4, 3.0 y 1.8 en las líneas NPR1 814, 780 y 224, respectivamente, frente a un incremento de 1.7 en el control P1 sin transformar.

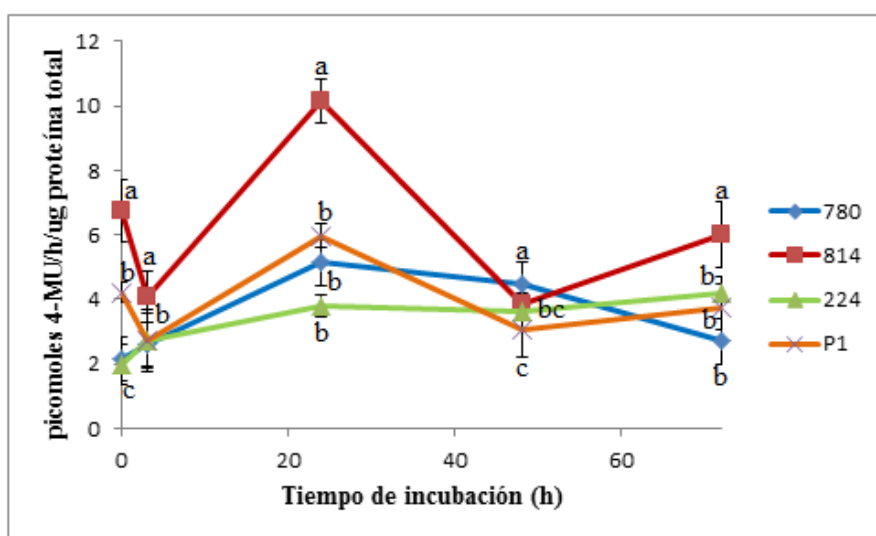


Figura IV.15. Nivel de actividad endoquitinasa expresada como picomoles de 4-MU/h/μg de proteína total. Los valores se expresan como la media±SD de 3 réplicas independientes. El análisis estadístico se realizó por un ANOVA factorial y los contrastes entre medias, para cada muestreo en el tiempo, mediante el test de Bonferroni con $P=0.05$.

IV.5. DISCUSIÓN

La transformación con genes reguladores de rutas implicadas en la defensa frente a un amplio espectro de patógenos es una buena herramienta para la mejora genética de plantas (Lin et al., 2004). En esta línea, se ha llevado a cabo la sobreexpresión en olivo del gen *AtNPR1*, implicado en la respuesta SAR y en el cruce de señales de las rutas del AS y JA/Et.

El protocolo de transformación genética utilizado que incluía una exposición progresiva al antibiótico paromomicina, resultó ser adecuado para seleccionar células embriogénicas putativamente transformadas. El uso de bajas concentraciones al inicio y su incremento durante el proceso, tal y como recomienda Fresta (2014), podría ser una ventaja frente a la selección con alta concentración desde el inicio, sin suponer un mayor estrés a las células después de la inoculación con *A. tumefaciens*. Esta estrategia permite una mejor identificación de líneas embriogénicas viables putativamente

transformadas, ya que favorece una rápida proliferación y mejor apariencia de los callos.

La eficiencia de transformación obtenida fue del 0.28%, mientras que en otras transformaciones llevadas a cabo en olivo con el mismo tipo de explanto y la cepa de *Agrobacterium* AGL1 se han obtenido porcentajes más altos; 1.5% para la transformación con el gen *afp* de *Aspergillus giganteus* (Narvaez et al., 2018) y 2.56% con el gen *MtFta1* de *Medicago truncatula* (Haberman et al., 2017). Sin embargo, Torreblanca et al. (2010) utilizando los plásmidos binarios pBinUbiGUSint y pGUSint obtuvieron alrededor de un 17% de líneas transformadas. Una posible explicación a las diferencias observadas en los porcentajes de transformación, podría ser el tamaño del transgén, ya que en las transformaciones con el gen *afp* y *MtFta1*, las secuencias de cDNA eran inferiores a 1 kb, mientras que el tamaño del gen *AtNPR1*, conteniendo las regiones no codificantes, se sitúa en torno a 2 kb. En el plásmido pK7WG2.0, el gen de selección *nptII* está situado junto al borde izquierdo del T-DNA, el extremo menos protegido (Lacroix et al., 2006); por tanto, el mayor tamaño del gen *AtNPR1*, situado junto al borde derecho, podría dificultar la inserción del gen *nptII* y en consecuencia, la recuperación de un menor número de embriones transgénicos en el medio de selección. Tampoco se puede descartar que la sobreexpresión constitutiva del gen *AtNPR1* impacte negativamente sobre el crecimiento de los embriones transgénicos, dando lugar a una menor tasa de transformación.

En otras especies, la transformación con el gen *AtNPR1* u homólogos de éste causaron efectos negativos sobre el crecimiento o desarrollo de la planta. Así, la sobreexpresión de un gen ortólogo en uva, *VvNPR1.1*, provocó la pérdida de dominancia apical en las plantas transformadas (Le Henanff et al., 2011). Por otro lado, Quilis et al. (2008) detectaron que plantas de arroz transformadas con *AtNPR1* presentaban un retraso en el crecimiento, mayor sensibilidad a estreses abióticos (salinidad y sequía), así como a infecciones virales, y lesiones necróticas cuando se cultivaban en cámara de crecimiento en condiciones de baja intensidad de luz, fenotipo denominado LMS (*lesion mimic spot*). La sobreexpresión de su ortólogo en arroz, *OsNHI*, provocó enanismo y sensibilidad a la luz en cámara de crecimiento, y, al contrario de lo observado con *AtNPR1*, las plantas en el invernadero desarrollaban el fenotipo LMS (Chern et al., 2005). Asimismo, estas plantas crecidas en invernadero también presentaron menores niveles de AS que el control, mientras que en aquellas mantenidas en cámara de cultivo los niveles eran más altos. Pese a que la transformación en arroz utilizando promotores constitutivos generaba efectos deletéreos, el uso de un promotor específico de tejido verde (Molla et al., 2016) no tuvo ninguna consecuencia negativa sobre el crecimiento. Del mismo modo, la transformación con este gen en otras especies vegetales ha generado efectos positivos en las plantas transformadas; así, Kumar et al. (2013) observaron que plantas de algodón transformadas con el gen *AtNPR1* bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S presentaban más brotes y de mayor longitud, y mayor biomasa radicular que las plantas control. Asimismo, se observó un incremento del tamaño de las plantas y del número de

semillas, entre otros parámetros agronómicos, en plantas de arroz con mayor nivel de expresión del gen *NPR1* de *Brassica juncea* (Sadumpati et al., 2013), al contrario de lo observado en transformaciones con *AtNPR1*. Las secuencias aminoacídicas de *AtNPR1* y *BjNPR1* comparten solo el 67% de homología (Meur et al., 2006), por lo que es posible que los FT que se activan con *AtNPR1* sean distintos a los que interactúan con *BjNPR1*. De hecho, Niggeweg et al. (2000) propusieron que podría haber diferencias, dependiendo de la especie, en la interacción *NPR1*-FT.

En olivo, la sobreexpresión constitutiva del gen *AtNPR1*, aparentemente, no produjo ningún efecto remarcable en el fenotipo de las plantas regeneradas, ni en la fase de cultivo *in vitro* ni durante el crecimiento en invernadero. Sin embargo, la línea *NPR1* 780 presentó un menor número de brotes y más cortos que el resto de líneas transgénicas y control no transformado P1 en condiciones *in vitro*, aunque en el invernadero de confinamiento estas plantas mostraron valores de longitud y diámetro medio del tallo similares al control P1. Silva et al. (2015) encontraron que en plantas de fresa transformadas con el gen *AtNPR1*, las líneas de mayor expresión se correspondían con las de menor tamaño. Asimismo, estos autores señalan que los efectos negativos en el crecimiento y desarrollo podrían deberse a la activación constitutiva de la defensa; sin embargo, los valores de AS en plantas transgénicas y control eran similares, mientras que sí detectaron una expresión constitutiva del gen *PR5* (taumatina), sugiriendo que los mecanismos de activación de SAR en Arabidopsis y fresa podrían ser distintos, ya que plantas de Arabidopsis sobreexpresando *AtNPR1* no expresaban constitutivamente los genes *PR*.

La sobreexpresión de *AtNPR1* y de sus ortólogos induce una mayor tolerancia a patógenos en las plantas transgénicas. Por tanto, es posible que las rutas de defensa estén relativamente conservadas y el gen pueda unirse a los FT TGA de especies vegetales diferentes y activar los genes *PR*. En este sentido, se ha observado que tras la sobreexpresión constitutiva de *AtNPR1* en especies, como Arabidopsis (Cao et al., 1998), trigo (Makandar et al., 2006) o algodón (Parkhi et al., 2010a,b; Kumar et al., 2013) no se inducen los genes *PR* en ausencia de patógenos o de elicitors como el AS o análogos de este, mientras que en otras especies, distintos genes *PR* se expresaban constitutivamente, *PR1b* y *PBZ1/PR10* en arroz (Chern et al., 2005), *PR1* y genes que codificaban para glucanasas (*PR2*) y quitinasas (*PR3*) ácidas y básicas en tomate (Lin et al., 2004) y *PR1* y *PR2* en naranjo dulce (Dutt et al., 2015; Boscariol-Camargo et al., 2016).

En nuestro caso, la línea transgénica de menor expresión (*NPR1* 814) presentaba mayor actividad endoquitinasa basal que el control sin transformar; por el contrario, en las otras dos líneas transgénicas, incluyendo la de mayor expresión del transgén (*NPR1* 780), la actividad era inferior a la del control. La elicitación con AS no tuvo ningún efecto destacable en las líneas transgénicas *NPR1* 780 y *NPR1* 224, ya que los valores de actividad endoquitinasa no se modificaron significativamente durante los tiempos de exposición en el caso de la línea *NPR1* 780, o se incrementaron muy ligeramente a las

24h en el caso de NPR1 224. Además, los valores de actividad fueron muy similares a los de P1. En la línea NPR1 814, tras una disminución inicial de la actividad, ésta se recuperó a las 48h hasta alcanzar valores similares a la actividad inicial. A las 72h, todas las líneas mostraron un aspecto necrótico en el medio líquido conteniendo 500 μM de AS. De hecho, el efecto tóxico de exposiciones prolongadas (2 días) a AS ya había sido anteriormente descrito por Ward et al. (1991) en plantas de tabaco, tras la aplicación de una solución 50 mM. En otros trabajos, la exposición de suspensiones celulares a elicitors produjo un incremento de expresión de los genes *PR*, como en el caso de suspensiones celulares de zanahoria tratadas con 500 μM INA (ácido 2,6-dicloroisonicotínico), análogo del AS y menos tóxico que éste, donde se observó un aumento de la expresión de los genes *PR1*, *PR2* y *PR5* durante el tratamiento y en general, mayor en las líneas transgénicas con respecto al control no transformado (Wally et al., 2009). Por otro lado, la elicitación de plántulas de algodón con 3 mM AS produjo un incremento de actividad endoquitinasa y β -1.3-glucanasa en las líneas transgénicas con respecto a las plantas control (Parkhi et al., 2010a), mientras que plantas de tabaco tratadas con 1 mM AS, presentaron un aumento de la expresión de los genes *PR1* y *PR2*, pero no de quitinasa ácida, en las líneas transgénicas (Meur et al., 2008). En *Arabidopsis*, las quitinasas no se consideran marcadores de la respuesta SAR; de hecho, estarían implicadas en la ruta de señalización del JA (Thomma et al., 1998). No obstante, en otras especies vegetales se ha observado una inducción de estas enzimas por la sobreexpresión de *AtNPR1* o de sus ortólogos, como es el caso de plantas de tabaco transformadas con *MhNPR1*, aislado de *Malus hupehensis* (Zhang et al., 2012).

Contrariamente a lo observado con el AS, la elicitación con MeJA produjo un incremento significativo de la actividad endoquitinasa específica a las 24h en todas las líneas, incluido el control no transformado. Sin embargo, a partir de ese momento se mantuvo o disminuyó hasta el final del tratamiento dependiendo de la línea. Es destacable el hecho de que en las 3 líneas transgénicas NPR1 el incremento de actividad a las 24h de tratamiento fue superior al observado en el control P1, lo que podría indicar una mayor activación de las defensas tras la exposición con MeJA como consecuencia de la sobreexpresión de *AtNPR1*. En suspensiones celulares de zanahoria transformadas con el gen *AtNPR1* el tratamiento con 100 μM MeJA produjo un incremento de *PR2* (glucanasa) en las líneas transgénicas comparadas con el control sin transformar, pero no tuvo un efecto en el resto de los genes *PR* estudiados (Wally et al., 2009).

Algunos autores han relacionado al gen *NPR1* con el cruce de señales de las rutas AS-JA (Spoel et al., 2003; El Oirdi et al., 2011). Así, experimentos de elicitación con JA o MeJA en *B. juncea* (Meur et al., 2006) y aguacate (Backer et al., 2015), respectivamente, no provocaron cambios en la expresión de *NPR1* ni de los genes *PR*. Sin embargo, en arroz (Yuan et al., 2007), manzano, especialmente en raíz, (Zhang et al., 2012) y banana (Endah et al., 2008), sí se han observado cambios, pero en menor grado que con AS (Yuan et al., 2007; Endah et al., 2008; Zhang et al. 2012). Por tanto, se ha sugerido que la variación en la respuesta podría deberse al grado de implicación

de *NPR1* en el cruce de señales de AS y JA/Et en las distintas especies vegetales (Pieterse y van Loon, 1999).

En general, una alta expresión del transgén *AtNPR1* implicaría elevados niveles de expresión de los genes *PR* tras la elicitación o infección por el patógeno y mayor resistencia. En esta línea, Molla et al. (2016) observaron que la línea de arroz con mayor expresión de *AtNPR1*, presentó asimismo mayor nivel de transcritos de los genes *PR* analizados (*PR1b*, *PR3=RC24* y *PR10A*) y más resistencia frente a *Rhizoctonia solani*. Sin embargo, es posible que plantas con una elevada expresión sean menos resistentes a las infecciones, como se observó en tomate, donde las líneas transformadas con *AtNPR1*, presentaron distinto grado de resistencia dependiendo del patógeno. Así, plantas con mayor nivel de transcrito eran más resistentes frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, mientras que aquéllas con nivel intermedio o bajo lo eran a *Stemphylium solani*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* y *Ralstonia solanacearum* (Lin et al., 2004). En nuestro caso, no se observó una correlación directa entre el nivel de expresión y la actividad endoquitinasa. En tomate, también se observó falta de correlación entre nivel de expresión *NPR1*, proteína *NPR1* y expresión de genes *PR* (Lin et al., 2004), de tal forma que algunas líneas mostraban una alta concentración de proteína *NPR1* y alta inducción de genes *PR* a pesar de tener niveles de expresión *NPR1* bajos. Es posible, por tanto, que en la línea *NPR1* 814, a pesar de ser la de menor expresión del transgén, el nivel de proteína *NPR1* sea lo suficientemente alto como para activar los genes de defensa que codifican para endoquitinasas ácidas.

Como se ha descrito en otros estudios, la expresión heteróloga de *AtNPR1* o de sus ortólogos ha conferido resistencia frente a numerosos patógenos. Dutt et al. (2015) observaron que plantas de naranjo dulce de las variedades Hamlin y Valencia portando el gen *AtNPR1* eran más resistentes a la bacteria causante del Huanglongbing. Por otro lado, plantas de *Pennisetum glaucum* transformadas con *BjNPR1* mostraron resistencia frente a *Sclerospora graminicola* (Ramineni et al., 2014), mientras que la sobreexpresión de *AtNPR1* o de su ortólogo en *B. napus* confirió resistencia frente a *Pseudomonas syringae* (Potlakayala et al., 2007). Por otra parte, Joshi et al. (2017) observaron que plantas transgénicas de algodón tenían una menor progresión de *Fusarium oxysporum* que las plantas control. Este hongo era considerado un patógeno necrotrofo, por lo que se creía que inducía los genes dependientes del JA/Et; sin embargo, Berrocal-Lobo y Molina (2004) demostraron que en *Arabidopsis* la resistencia a este patógeno estaba mediada por Et, JA y AS, y requería la implicación del gen *NPR1*.

El objetivo de este trabajo era la obtención de plantas transgénicas de olivo resistentes a *V. dahliae*, patógeno fúngico hemibiotrofo. Dado que el gen *NPR1* podría estar implicado en el cruce de señales entre las rutas del AS y JA/Et, es posible que su sobreexpresión pudiera conferir resistencia frente a este hongo. Sin embargo, se han realizado pocos trabajos de transformación genética en esta dirección. Así, Parkhi et al. (2010a) sobreexpresaron constitutivamente el gen *AtNPR1* observando que

proporcionaba resistencia a *F. oxysporum*, *R. solani*, *Alternaria alternata* y frente a nematodos reniformes, así como a cepas no defoliantes del hongo *V. dahliae*, pero no a las defoliantes en plantas de algodón (Parkhi et al., 2010b). Por otro lado, Deng-Wei et al. (2014) sobreexpresaron una secuencia polimórfica de cDNA-AFLP, *StoNPR1*, aislada de una especie silvestre de *Solanum torvum* resistente a *Verticillium* (Wang et al., 2010), en plantas de patata del cultivar susceptible Désirée, relacionando el incremento de la resistencia con la inducción de genes implicados en la ruta del AS, *PR1a* e *ICSI* (isocorismato sintasa 1), tras la infección. Por tanto, si tal y como se ha visto anteriormente, el gen *AtNPR1* puede unirse a los FT TGA de otras especies vegetales e inducir los genes *PR*, posiblemente se una a los de olivo y si en esta especie la resistencia frente a *V. dahliae* estuviera mediada por el AS y el gen *NPR1* estuviera implicado, esperaríamos un aumento de la resistencia frente a este hongo en las plantas transformadas. En la actualidad están en marcha los ensayos para probar esta hipótesis.

En resumen, se han obtenido 3 líneas de olivo transformadas con el gen *AtNPR1*. Las plantas regeneradas sobreexpresando constitutivamente el gen no mostraron efectos negativos en su crecimiento *in vitro* o en invernadero. En una de las líneas transgénicas se observó una mayor actividad quitinasa que en el control, lo que indicaría la activación constitutiva de genes *PR*. Sin embargo, no se ha observado correspondencia entre el grado de expresión del gen *AtNPR1* y la actividad de esta proteína *PR*. La elicitación con AS no modificó la actividad quitinasa ni en las líneas transgénicas ni en el control; por el contrario, el tratamiento con MeJA sí provocó un incremento transitorio de actividad a las 24h de exposición, siendo el incremento de actividad mayor en las líneas transgénicas que en el control. Actualmente, se encuentran en marcha los experimentos de infección con *V. dahliae* para determinar el nivel de resistencia de estas plantas.

V. Conclusions



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

V. CONCLUSIONS

1. Plant regeneration via somatic embryogenesis has been obtained from the wild olive genotypes StopVert and Ac-18, resistant to *Verticillium dahliae*. The nature of explant, shoot apex, and the genotype are critical factors for the success of the process.
2. The analysis of plants of the genotype StopVert, regenerated via somatic embryogenesis from 20 months old callus, by SSR and RAPDs molecular markers shows that these plants are true-to-type to the mother plant. This is important to undertake transformation studies with this genotype.
3. Transformation with *afp* gene from *Aspergillus giganteus* is an useful strategy to increase resistance against the soil-borne fungus *Rosellinia necatrix*; however, it has no effect in the plant response to *V. dahliae*. The expression of this gene in olive does not alter the phenotype of the plants.
4. Regeneration and transformation process in olive may result in occasional somaclonal variation. The AFP13 line recovered in the transformation experiments with *afp* gene showed resistance to *V. dahliae* although it does not have a functional copy of the transgene. This phenotype could be due to occurrence of somaclonal variation or to an insertional effect of the selection marker gene.
5. The heterologous expression of *AtNPR1* gene from *Arabidopsis thaliana* in olive does not have strong phenotypic effects on the transgenic plants, since no morphological differences could be observed following acclimation in confined greenhouse.
6. Elicitation with MeJA increases endochitinase activity in embryogenic olive cells, being the increase higher in *AtNPR1* transformed lines; hence, it could be an interesting strategy to enhance fungal resistance.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

VI. Bibliografía



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

VI. Bibliografía

- Afolabi, A. S., Worland, B., Snape, J. W., and Vain, P. (2004). A large-scale study of rice plants transformed with different T-DNAs provides new insights into locus composition and T-DNA linkage configurations. *Theor. Appl. Genet.* 109, 815–826. doi: 10.1007/s00122-004-1692-y
- Ali, S., Mir, Z. A., Tyagi, A., Mehari, H., Meena, R. P., Bhat, J. A., Yadav, P., Papalou, P., Rawat, S., and Grover, A. (2017). Overexpression of *NPR1* in *Brassica juncea* confers broad spectrum resistance to fungal pathogens. *Front. Plant Sci.* 8, 1–16. doi: 10.3389/fpls.2017.01693
- Arnhold-Schmitt, B. (1993). Rapid changes in amplification and methylation pattern of genomic DNA in cultured carrot root explants (*Daucus carota* L.). *Theor. Appl. Genet.* 85, 793–800. doi: 10.1007/BF00225021
- Backer, R., Mahomed, W., Reeksting, B. J., Engelbrecht, J., Ibarra-Laclette, E., and Berg, N. V. D. (2015). Phylogenetic and expression analysis of the *NPR1* -like gene family from *Persea americana* (Mill.). *Front. Plant Sci.* 6, 1–15. doi:10.3389/fpls.2015.00300
- Báidez, A. G., Gómez, P., Del Río, J. A., and Ortuño, A. (2007). Dysfunctionality of the xylem in *Olea europaea* L. Plants associated with the infection process by *Verticillium dahliae* Kleb. Role of phenolic compounds in plant defense mechanism. *J. Agric Food Chem.* 55(9), 3373–3377. doi: 10.1021/jf063166d
- Bairu, M. W., Fennell, C. W., and van Staden, J. (2006). The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. 'Zelig'). *Sci. Hortic.* 108, 347–351.
- Baldoni, L., and Belaj, A. (2009). Olive. In: Oil crops. Vollmann, J., and Rajean, I. (eds). Springer, New York. pp 397–421. doi: 10.1007/978-0-387-77594-4_13
- Bao, Z. H., Ma, Y. F., Liu, J. F., Wang, K. J., Zhang, P. F., Ni, D. X., and Yang, W. Q. (1980). The induction of plantlets from the hypocotyl of *Olea europaea* *in vitro*. *Acta Bot. Sin.* 22, 96–97.
- Barranco, D., Trujillo, I., and Rallo, L. (2005). Elaiografía Hispánica. In: Variedades de Olivo en España (Libro I). Rallo, L., Barranco, D., Caballero, J. M., Del Río, C., Martín, A., Tous, J., and Trujillo, I. (eds). Mundi-Prensa, Madrid. pp 47–231.
- Belfanti, E., Silfverberg-Dilworth, E., Tartarini, S., Patocchi, A., Barbieri, M., Zhu, J., Vinatzer, B. A., Gianfranceschi, L., Gessler, C., and Sansavini, S. (2004). The *HcrVf2* gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 886–890. doi: 10.1073/pnas.0304808101
- Bellini, E., Giordani, E., Parlanti, M. V., and Pandolfi, S. (2002). Olive genetic improvement: thirty years of research. *Acta Hortic.* 586, 105–108. doi: 10.17660/ActaHortic.2002.586.13
- Benelli, C., Fabbri, A., Grassi, S., Lambardi, M., and Rugini, E. (2001). Histology of somatic embryogenesis in mature tissues of olive (*Olea europaea* L.). *J. Hort. Sci. Biotech.* 76(1), 112–119. doi: 10.1080/14620316.2001.11511336
- Berrocal-Lobo, M., and Molina, A. (2004). *Ethylene response factor 1* mediates Arabidopsis resistance to the soilborne fungus *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17, 763–770. doi: 10.1094/MPMI.2004.17.7.763
- Besnard, G., Garcia-Verdugo, C., Rubio De Casas, R., Treier, U. A., Galland, N., and Vargas, P. (2008). Polyploidy in the olive complex (*Olea europaea*): Evidence from flow cytometry and nuclear microsatellite analyses. *Ann. Bot.* 101, 25–30. doi:

- 10.1093/aob/mcm275
- Bhat, R. G., and Subbarao, K. V. (1999). Host range specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 89, 1218–1225. doi: 10.1094/PHYTO.1999.89.12.1218
- Binder, U., Bencina, M., Eigentler, A., Meyer, V., and Marx, F. (2011). The *Aspergillus giganteus* antifungal protein AFP_{NN5353} activates the cell wall integrity pathway and perturbs calcium homeostasis. *BMC Microbiol.* 11, 209. doi: 10.1186/1471-2180-11-209
- Birem, F., Alcántara-Vara, E., and López-Escudero, F. J. (2016). Water consumption and vegetative growth progress in resistant and susceptible olive cultivars infected by *Verticillium dahliae*. *Agric. Sci.* 7, 230–238. doi: 10.4236/as.2016.74023
- Bolar, J. P., Norelli, J. L., Harman, G. E., Brown, S. K., and Aldwinckle, H. S. (2001). Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*) against the pathogenic fungus (*Venturia inaequalis*) in transgenic apple plants. *Transgenic Res.* 10, 533–543. doi: 10.1023/A:1013036732691
- Boller, T., and Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 379–406. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346
- Boscariol-Camargo, R. L., Takita, M. A., and Machado, M. A. (2016). Bacterial resistance in *AtNPR1* transgenic sweet orange is mediated by priming and involves *EDS1* and *PR2*. *Trop. Plant Pathol.* 41(6), 341–349. doi: 10.1007/s40858-016-0108-2
- Boskou, D. (2006). Olive Oil 2nd Edition. Chemistry and Technology. ISBN: 9781893997882. Academic Press and AOCS Press.
- Bourgin, J. P., and Nitsch, J. P. (1967). Obtention de Nicotiana haploïdes a partir d'étamines cultivées *in vitro*. *Ann. Physiol. vég.* 9, 377–382.
- Bradaï, F., Pliego-Alfaro, F., and Sánchez-Romero, C. (2016). Somaclonal variation in olive (*Olea europaea* L.) plants regenerated via somatic embryogenesis: Influence of genotype and culture age on phenotypic stability. *Sci. Hortic.* 213, 208–215. doi: 10.1016/j.scienta.2016.10.031
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 7, 248–54.
- Brar, D. S., and Jain, S. M. (1998). Somaclonal variation: mechanism and application in crop improvement. In: Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement. Jain, S. M., Brar, D. S., and Ahloowalia, B. S. (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp 15–37.
- Braybrook, S. A., and Harada, J. J. (2008). LECs go crazy in embryo development. *Trends Plant Sci.* 13, 624–630. doi: 10.1016/j.tplants.2008.09.008
- Brettell, R. I. S., and Dennis, E. S. (1991). Reactivation of a silent *Ac* following tissue culture is associated with heritable alterations in its methylation pattern. *Mol. Gen. Genet.* 229, 365–372. doi: 10.1007/BF00267457
- Brhadda, N., Abousalim, A., Walali Loudiyi, D. E., and Benali, D. (2003). Effet du milieu de culture sur le microbouturage de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv. Picholine marocaine. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 7, 177–182.
- Brhadda, N., Elmacane, D., Loudiyi, W., and Abousalim, A. (2008). Effet du sucre sur l'embryogenèse somatique de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv. 'Picholine marocaine'. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12, 245–250.
- Briccoli-Bati, C., Godino, G., Monardo, D., and Nuzzo, V. (2006). Influence of

- propagation techniques on growth and yield of olive trees cultivars 'Carolea' and 'Nocellara Etnea'. *Sci. Hort.* 109, 173–182. doi: 10.1016/j.scienta.2006.03.013
- Brito, G., Lopes, T., Loureiro, J., Rodriguez, E., and Santos, C. (2010). Assessment of genetic stability of two micropropagated wild olive species using flow cytometry and microsatellite markers. *Trees* 24, 723–732. doi: 10.1007/s00468-010-0442-9
- Brooks, D. M., Bender, C. L., and Kunkel, B. N. (2005). The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Pathol.* 6, 629–639. doi: 10.1111/j.1364-3703.2005.00311.x
- Buchner, V., Nachmias, A., and Burstein, Y. (1982). Isolation and partial characterization of a phytotoxic glycopeptide from a proteinlipopolysaccharide complex produced by a potato isolate of *Verticillium dahliae*. *FEBS Lett.* 138, 261–264. doi: 10.1016/0014-5793(82)80456-0
- Buendía Picornell, M., and Melero Martínez, J. M. (2013). The history of oil and the growing of olive tree; as expressed in the bible. *Rev. la Fac. Educ. Albacete* N° 28, 155–181.
- Campbell, C. L., and Madden, L. V. (1990). Introduction to Plant Disease Epidemiology. New York: John Wiley and Sons Inc.
- Campos-Olivas, R., Bruix, M., Santoro, J., Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Gavilanes, J. G., and Rico, M. (1995). NMR solution structure of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus*: evidence for cysteine pairing isomerism. *Biochemistry* 34, 3009–3021. doi: 10.1021/bi00009a032
- Cañas, L. A., and Benbadis, A. (1988). *In vitro* plant regeneration from cotyledon fragments of the olive tree (*Olea europaea* L.). *Plant Sci.* 54, 65–74.
- Cao, H., Bowling, S. A., Gordon, A. S., and Dong, X. (1994). Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell* 6, 1583–1592. doi: 10.1105/tpc.6.11.1583
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J. D., Volko, S., and Dong, X. (1997). The *Arabidopsis NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* 88, 57–63. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81858-9
- Cao, H., Li, X., and Dong, X. (1998). Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Plant Biol.* 95, 6531–6536.
- Capelo, A. M., Silva, S., Brito, G., and Santos, C. (2010). Somatic embryogenesis induction in leaves and petioles of a mature wild olive. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 103, 237–242. doi: 10.1007/s11240-010-9773-x
- Caplan, J., Padmanabhan, M., and Dinesh-kumar, S. P. (2008). Plant NB-LRR immune receptors: from recognition to transcriptional reprogramming. *Cell Host Microbe* 3(3), 126–135. doi: 10.1016/j.chom.2008.02.010
- Cassells, A. C., and Curry, R. F. (2001). Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 64, 145–157.
- Cesar, S. A., and Ignacimuthu, S. (2012). Genetic engineering of crop plants for fungal resistance: Role of antifungal genes. *Biotechnol. Lett.* 34, 995–1002. doi: 10.1007/s10529-012-0871-1
- Cerezo, S., Mercado, J. A., and Pliego-Alfaro, F. (2011a). An efficient regeneration system via somatic embryogenesis in olive. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 106, 337–344. doi: 10.1007/s11240-011-9926-6
- Cerezo, S., Mercado, J. A., and Pliego-Alfaro, F. (2011b). Efecto del cultivo en medio

- líquido sobre la producción de embriones somáticos de olivo y su conversión en plantas. IX Reunión de la SECIVTV. Abstract nº BII-P25.
- Chalavi, V., Tabaeizadeh, Z., and Thibodeau, P. (2003). Enhanced resistance to *Verticillium dahliae* in transgenic strawberry plants expressing a *Lycopersicon chilense* chitinase gene. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 128, 747–753.
- Chang, S., Puryear, J., and Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11, 113–116. doi: 10.1007/BF02670468
- Chaturvedi, R., Venables, B., Petros, R. A., Nalam, V., Li, M., Wang, X., Takemoto, L. J., and Shah, J. (2012). An abietane diterpenoid is a potent activator of systemic acquired resistance. *Plant J.* 71, 161–172. doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.04981.x
- Chatzistathis, T., Orfanoudakis, M., Alifragis, D., and Therios, I. (2013). Colonization of Greek olive cultivars root system by arbuscular mycorrhiza fungus: root morphology, growth, and mineral nutrition of olive plants. *Sci. Agric.* 70, 185–194. doi: 10.1590/S0103-90162013000300007
- Chen, P., Lee, B., and Robb, J. (2004). Tolerance to a non-host isolate of *Verticillium dahliae* in tomato. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 64, 283–291.
- Chen, J. Y., Xiao, H. L., Gui, Y. J., Zhang, D. D., Li, L., Bao, Y. M., and Dai, X. F. (2016). Characterization of the *Verticillium dahliae* exoproteome involves in pathogenicity from cotton-containing medium. *Front. Microbiol.* 7, 1–15. doi: 10.3389/fmicb.2016.01709
- Chen, X., Barnaby, J. Y., Sreedharan, A., Huang, X., Orbović, V., Grosser, J. W., Wang, N., Dong, X., and Song, W. Y. (2013). Over-expression of the citrus gene *CtNHL* confers resistance to bacterial canker disease. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 84, 115–122. doi: 10.1016/j.pmp.2013.07.002
- Cheng, X. X., Zhao, L. H., Klosterman, S. J., Feng, H. J., Feng, Z., Wei, F., Shia, Y. Q., Lia, Z. F., and Zhu, H. Q. (2017). The endochitinase VDECH from *Verticillium dahliae* inhibits spore germination and activates plant defense responses. *Plant Sci.* 259, 12–23.
- Chern, M., Fitzgerald, H. A., Canlas, P. E., Navarre, D. A., and Ronald, P. C. (2005). Overexpression of a rice *NPRI* homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18, 511–520. doi: 10.1094/MPMI-18-0511
- Civantos, L. (2008). La olivicultura en el mundo y en España. In: El Cultivo del Olivo. Barranco, D., Fernández-Escobar, R., and Rallo, L., (eds.). 6ª ed. revisada y ampliada. Junta de Andalucía y Ediciones Mundiprensa, Madrid. pp. 17-36.
- Clavero-Ramírez, I., and Pliego-Alfaro, F. (1990). Germinación *in vitro* de embriones maduros de olivo (*Olea europaea*). *Actas de Horticultura* 1, 512–516.
- Coca, M., Bortolotti, C., Rufat, M., Peñas, G., Eritja, R., Tharreau, D., Martínez del Pozo, A. M., Messeguer, J., and San Segundo, B. (2004). Transgenic rice plants expressing the antifungal AFP protein from *Aspergillus giganteus* show enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Mol. Biol.* 54, 245–259. doi: 10.1023/B:PLAN.0000028791.34706.80
- Conde, C., Delrot, S., and Gerós, H. (2008). Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *J. Plant Physiol.* 165, 1545–1562. doi: 10.1016/j.jplph.2008.04.018
- Conrath, U., Pieterse, C. M. J., and Mauch-mani, B. (2002). Priming in plant–pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* 7, 210–216.
- Conrath, U., Beckers, G. J. M., Flors, V., García-agustín, P., Jakab, G., Mauch, F.,

- Newman, M. A., Pieterse, C. M. J., Poinssot, B., Pozo, M. J., Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L., and Mauch-Mani, B. (2006). Priming: getting ready for battle. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19, 1062–1071.
- Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. <http://www.juntadeandalucia.es/organismos/agriculturapescayderollorural.html> (accessed Marzo 2018)
- Corredoira, E., Ballester, A., Ibarra, M., and Vieitez, A. M. (2015). Induction of somatic embryogenesis in explants of shoot cultures established from adult *Eucalyptus globulus* and *E. saligna* × *E. maidenii* trees. *Tree Physiol.* 35, 678–690. doi: 10.1093/treephys/tpv028
- Correia, S., Lopes, M. L., and Canhoto, J. M. (2011). Somatic embryogenesis induction system for cloning an adult *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (tamarillo). *Trees* 25, 1009–1020. doi: 10.1007/s00468-011-0575-5
- Cronjé, M. J., Weir, I. E., and Bornman, L. (2004). Salicylic acid-mediated potentiation of *Hsp70* induction correlates with reduced apoptosis in tobacco protoplasts. *Cytometry* 61, 76–87. doi: 10.1002/cyto.a.20036
- Czene, M., and Harms-Ringdahl, M. (1995). Detection of single-strand breaks and formamidopyrimidine-DNA glycosylase-sensitive sites in DNA of cultured human fibroblasts. *Mutat Res.* 336, 235–242.
- D'Amato, F. (1985). Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 3, 73-112.
- Daayf, F., Schmitt, A., and Bélanger, R. R. (1997). Evidence of phytoalexins in cucumber leaves infected with powdery mildew following treatment with leaf extracts of *Reynoutria sachalinensis*. *Plant Physiol.* 113, 719–27. doi: 10.1104/pp.113.3.719
- Dana, M. de las M., Pintor-Toro, J. A., and Cubero, B. (2006). Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. *Plant Physiol.* 142, 722–730. doi: 10.1104/pp.106.086140
- De Buck, S., Jacobs, A., Van Montagu, M., and Depicker, A. (1999). The DNA sequences of T-DNA junctions suggest that complex T-DNA loci are formed by a recombination process resembling T-DNA integration. *Plant J.* 20, 295–304. doi: 10.1046/j.1365-313X.1999.00602.x
- de Jonge, R., Peter van Esse, H., Maruthachalam, K., Bolton, M. D., Santhanam, P., Saber, M. K., Zhanga, Z., Usamid, T., Lievense, Bart., Subbarao, K. V. and Thomma, B. P. H. J. (2012). Tomato immune receptor *Ve1* recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 5110–5115. doi: 10.1073/pnas.1119623109
- De la Rosa, R., James, C. M., and Tobutt, K. R. (2002). Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the Oleaceae. *Mol. Ecol. Notes* 2, 265–267. doi: 10.1046/j.1471-8278
- De la Rosa, R., Angiolillo, A., Guerrero, M., Pellegrini, M., Rallo, L., Besnard, G., Bervillé, A., Martin, A., and Baldoni, L. (2003). A first linkage map of olive (*Olea europaea* L.) cultivars using RAPD, AFLP, RFLP and SSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 106, 1273-1282. doi: 10.1007/s00122-002-1189-5
- Dean, J. V., Mohammed, L. A., and Fitzpatrick, T. (2005). The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta* 221, 287–296. doi: 10.1007/s00425-004-1430-3
- Del Río, J. A., Báidez, A. G., Botía, J. M., and Ortuño, A. (2003). Enhancement of

- phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea* L.) and their influence on resistance against *Phytophthora* sp. *Food Chem.* 83, 75–78. doi: 10.1016/S0308-8146(03)00051-7
- Dempsey, D. M. A., and Klessig, D. F. (2012). SOS – too many signals for systemic acquired resistance? *Trends Plant Sci.* 17, 538–545. doi: 10.1016/j.tplants.2012.05.011
- Deng-wei, J., Liu, Y., Ce, S., Min, C., and Qing, Y. (2014). Cloning and characterization of a *Solanum torvum* NPR1 gene involved in regulating plant resistance to *Verticillium dahliae*. *Acta Physiol. Plant.* 36, 2999–3011. doi: 10.1007/s11738-014-1671-0
- Després, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E., and Fobert, P. R. (2000). The Arabidopsis NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell* 12, 279–290. doi: 10.2307/3870928
- Dessoky, E. S., Attia, A. O., and Mohamed, E. A. M. (2016). An efficient protocol for *in vitro* propagation of Fig (*Ficus carica* sp) and evaluation of genetic fidelity using RAPD and ISSR markers. *J. Appl. Biol. Biotechnol.* 4, 57–63. doi: 10.7324/JABB.2016.40406
- De Verno, L. L., Park, Y. S., Bonga, J. M., and Barret, J. D. (1999). Somaclonal variation in cryopreserved embryogenic clones of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss). *Plant Cell Rep.* 18, 948–953. doi: 10.1007/s002990050689
- Díaz, A. (2011). Olive. In: Technological Innovations in Major World Oil Crops. Gupta, S. K. (ed). Springer, New York. pp 267–291.
- Dinolfo, M. I., Castañares, E., and Stenglein, S. A. (2017). Resistance of *Fusarium poae* in *Arabidopsis* leaves requires mainly functional JA and ET signaling pathways. *Fungal Biol.* 121, 841–848. doi: 10.1016/j.funbio.2017.06.001
- Dobinson, K. F., Grant, S. J., and Kang, S. (2004). Cloning and targeted disruption, via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, of a *trypsin protease* gene from the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*. *Curr. Genet.* 45, 104–110. doi: 10.1007/s00294-003-0464-6
- Doveri, S., Sabino Gil, F., Díaz, A., Reale, S., Busconi, M., da Câmara Machado, A., Martín, A., Fogher, C., Donini, P., and Lee, D. (2008). Standardization of a set of microsatellite markers for use in cultivar identification studies in olive (*Olea europaea* L.). *Sci. Hort.* 116, 367–373. doi: 10.1016/j.scienta.2008.02.005
- Driver, J. A., and Kuniyuki, A. H. (1984). *In vitro* propagation of *Paradox* walnut rootstock. *HortScience* 19, 507–550.
- Dutt, M., Barthe, G., Irely, M., and Grosser, J. (2015). Transgenic citrus expressing an *Arabidopsis* NPR1 gene exhibit enhanced resistance against Huanglongbing (HLB; Citrus greening). *PLoS One* 10(9):e0137134. doi: 10.1371/journal.pone.0137134
- Edwards, R. L., Maitland, D. J., Scowen, I. J., Teixeira de Sousa, A. J. and Whalley, A. J. S. (2001). Metabolites of the higher fungi. Part 32. Rosnecatrone, a phytotoxic bicyclo[4.1.0.]hept-3-en-2-one from the fungus *Rosellinia necatrix* Prill. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1, 537–542.
- El Oirdi, M., El Rahman, T. A., Rigano, L., El Hadrami, A., Daayf, F., Vojnov, A., and Bouaraba, K. (2011). *Botrytis cinerea* manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. *Plant Cell* 23, 2405–2421. doi: 10.1105/tpc.111.083394
- Emani, C., Garcia, J. M., Lopata-Finch, E., Pozo, M. J., Uribe, P., Kim, D. J., Sunilkumar, G., Cook, D. R., Kenerley, C. M., and Rathore, K. S. (2003). Enhanced fungal resistance in transgenic cotton expressing an endochitinase gene from

- Trichoderma virens*. *Plant Biotechnol. J.* 1, 321–336. doi: 10.1046/j.1467-7652.2003.00029.x
- Endah, R., Beyene, G., Kiggundu, A., van den Berg, N., Schlüter, U., Kunert, K., and Chikwamba, R. (2008). Elicitor and Fusarium-induced expression of *NPR1*-like genes in banana. *Plant Physiol. Biochem.* 46, 1007–1014. doi: 10.1016/j.plaphy.2008.06.007
- FAO (2016). www.fao.org (accessed Marzo 2018)
- FAOSTAT (2014). <http://faostat.fao.org/> (accessed Enero 2018)
- Farahani, F., Yari, R., and Masoud, S. (2011). Somaclonal variation in Dezful cultivar of olive (*Olea europaea* subsp. *europaea*). *Geneconserve* 40, 216–233.
- Fernandes, P., Costa, A., Rocha, C., and Santos, C. (2011). Genetic stability evaluation of *Quercus suber* L. somatic embryogenesis by RAPD analysis. *Pakistan J. Bot.* 43, 2727–2731.
- Fernández-Escobar, R., García-Novelo, J. M., Molina-Sorina, C., and Parra, M. A. (2012). An approach to nitrogen balance in olive orchards. *Sci. Hortic.* 135, 219–226. doi: org/10.1016/j.scienta.2011.11.036
- Ferrari, S., Savatin, D. V., Sicilia, F., Gramegna, G., Cervoneand, F. and DeLorenzo, G. (2013). Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular pattern and regulators of growth and development. *Front. Plant Sci.* 4, 49. doi: org/10.3389/fpls.2013.00049
- Fradin, E. F., and Thomma, B. P. H. J. (2006). Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Mol. Plant Pathol.* 7, 71–86. doi: 10.1111/J.1364-3703.2006.00323.X
- Fradin, E. F., Abd-El-Haliem, A., Masini, L., van den Berg, G. C. M., Joosten, M. H. J., and Thomma, B. P. H. J. (2011). Interfamily transfer of tomato *Ve1* mediates *Verticillium* resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 156, 2255–2265. doi: 10.1104/pp.111.180067
- Fradin, E. F., Zhang, Z., Juárez Ayala, J. C., Castroverde, C. D. M., Nazar, R. N., Robb, J., Liu, C. M., and Thomma, B. P. H. J. (2009). Genetic dissection of *Verticillium* wilt resistance mediated by tomato *Ve1*. *Plant Physiol.* 150, 320–332. doi: 10.1104/pp.109.136762
- Fresta, L. (2014). Biotechnological approaches to obtain olive embryogenic cell-lines with enhanced tolerance to the fungal pathogen *Verticillium dahliae*. Master Thesis. IAMZ, Zaragoza.
- Gao, A. I., Hakimi, S. M., Mittanck, C. A., Wu, Y., Woerner, B. M., Stark, D. M., Shah, D. M., Liang, J., and Rommens, C. M. T. (2000). Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nat. Biotechnol.* 18, 1307–1310. doi: 10.1038/82436
- Gawel, N. J., and Jarret, R. L. (1991). A modified CTAB DNA extraction procedure of *Musa* and *Ipomoea*. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9, 262–266. doi: 10.1007/BF02672076
- García-Férriz, L., Ghorbel, R., Ybarra, M., Marí, A., Belaj, A., and Trujillo, I. (2002). Micropropagation from adult olive trees. *Acta Hortic.* 586, 879–882. doi: 10.17660/ActaHortic.2002.586.191
- García Figueras, F., and Celada Brouard, B. (2001). Incidencia de *Dematophora necatrix* en olivo. *Frutic. Prof.* 120, 51–54.
- García-Figueras, F., Calvet, C., Camprubí, A., Estaún, V., Ninot, A., and Tous, J. (2009). Evaluación de la sensibilidad de diferentes variedades de olivo a *Rosellinia* (ana. *Dematophora necatrix*). II Jornadas Nacionales de Olivicultura de la SECH. Tarragona, 2 y 3 de Marzo de 2009. Pág. 17.

- García-Velasco, R., González-Díaz, J. G., Domínguez-Arizmendi, G., Ayala-Escobar, V., and Aguilar-Medel, S. (2012). *Rosellinia necatrix* en *Rosa* sp. y su evaluación a sensibilidad de fungicidas. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 18(1), 39–54.
- Giménez, C., De García, E., De Enrech, N. X., and Blanca, I. (2001). Somaclonal variation in banana: Cytogenetic and molecular characterization of the somaclonal variant CIEN BTA-03. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37, 217–222. doi: 10.1007/s11627-001-0038-6
- Girgi, M., Breese, W. A., Lörz, H., and Oldach, K. H. (2006). Rust and downy mildew resistance in pearl millet (*Pennisetum glaucum*) mediated by heterologous expression of the *afp* gene from *Aspergillus giganteus*. *Transgenic Res.* 15, 313–324. doi: 10.1007/s11248-006-0001-8
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 205–227. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923
- Gómez-Jiménez, M. C., Paredes, M. A., Gallardo, M., Fernández-García, N., Olmos, E., and Sánchez-Calle, I. M. (2010). Tissue-specific expression of olive *S-adenosyl methionine decarboxylase* and *spermidine synthase* genes and polyamine metabolism during flower opening and early fruit development. *Planta* 232, 629–647. doi: 10.1007/s00425-010-1198-6
- Green, P. S. (2002). A revision of *Olea* L. (Oleaceae). *Kew Bull* 57, 91–140.
- Guillaumin, J. J., Mercier, S., and Dubos, B. (1982). Les pourridiés à *Armillariella* et *Rosellinia* en France sur vigne, arbres fruitiers et cultures florales I. Etiologie et symptomatologie. *Agronomie* 2, 71–80. doi: 10.1051/agro:19820110
- Guo, B., Abbasi, B. H., Zeb, A., Xu, L. L., and Wei, Y. H. (2011). Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. *African J. Biotechnol.* 10, 8984–9000. doi: 10.5897/AJB11.636
- Haberman, A., Bakhshian, O., Cerezo-Medina, S., Paltiel, J., Adler, C., Ben-Ari, G., Mercado, J. A., Pliego-Alfaro, F., Lavee, S., and Samach, A. (2017). A possible role for flowering locus T-encoding genes in interpreting environmental and internal cues affecting olive (*Olea europaea* L.) flower induction. *Plant Cell Environ.* 40, 1263–1280. doi: 10.1111/pce.12922
- Hajeer, A. H., Lear, J. T., Ollier, W. E. ., Naves, M., Worthington, J., Bell, D. A., Smith, A. G., Bowers, W. P., Jones, P. W., Strange, R. C., and Fryer, A. A. (2000). Preliminary evidence of an association of tumour necrosis factor microsatellites with increased risk of multiple basal cell carcinomas. *Br. J. Dermatol.* 142, 441–445.
- Healey, A., Furtado, A., Cooper, T., and Henry, R. J. (2014). Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant Method* 10, 21–28. doi: 10.1186/1746-4811-10-21
- Hegedüs, N., and Marx, F. (2013). Antifungal proteins: More than antimicrobials? *Fungal Biol. Rev.* 26, 132–145. doi: 10.1016/j.fbr.2012.07.002
- Hepworth, S. R., Zhang, Y., McKim, S., Li, X., and Haughn, G. W. (2005). BLADE-ON-PETIOLE-dependent signaling controls leaf and floral patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17, 1434–1448. doi: 10.1105/tpc.104.030536
- Höfgen, R., and Willmitzer, L. (1988). Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res.* 16, 9877. doi: 10.1093/nar/16.20.9877
- Inderbitzin, P., Bostock, R. M., Davis, R. M., Usami, T., Platt, H. W., and Subbarao, K. V. (2011). Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. *PLoS One* 6:e28341. doi:

- 10.1371/journal.pone.0028341
- Israeli, Y., Reuveni, O., and Lahav, E. (1991). Qualitative aspects of somaclonal variations in banana propagated by *in vitro* techniques. *Sci. Hortic.* 48, 71–88.
- Jabeen, N., Chaudhary, Z., Gulfraz, M., Rashid, H., and Mirza, B. (2015). Expression of rice chitinase gene in genetically engineered tomato confers enhanced resistance to Fusarium Wilt and early blight. *Plant Pathol. J.* 31, 252–258. doi: 10.5423/PPJ.OA.03.2015.0026
- Jain, M. S. (2001). Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118, 153–166. doi: 10.1023/A:1004124519479
- Jain, S. M., Brar, D. S., and Ahloowalia, B. S. (1998). Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 293-309.
- Jayanthi, M., and Mandal, P. K. (2001). Plant regeneration through somatic embryogenesis and RAPD analysis of plants in *Tylophora indica* (Burm. F. Merrill.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37, 576–580. doi: 10.1079/IVP2001211
- Jevremovic, S., Subotic, A., Miljkovic, D., Trifunovic, M., Petric, M., and Cingel, A. (2012). Clonal fidelity of *Chrysanthemum* cultivars after long term micropropagation by stem segment culture. *Acta Hortic.* 961, 211–216. doi: 10.17660/ActaHortic.2012.961.25
- Jiménez-Díaz, R. M., Olivares, C., Navas-Cortés, J. A., Landa, B. B., and Jiménez-Gasco, M. M. (2008). A region-wide analysis of genetic diversity in *Verticillium dahliae* infecting olive in Andalusia, southern Spain. *Phytopathology* 98: S75.
- Jiménez-Díaz, R. M., Cirulli, M., Bubici, G., Jiménez-Gasco, M. M., Antoniou, P., and Tjamos, E. (2012). Verticillium wilt, a major threat to olive production current status and future prospects for its management. *Plant Dis.* 96, 304–329. doi: 10.1094/PDIS-06-11-0496
- Jiménez-Díaz, R. M., Olivares-García, C., Trapero-Casas, J. L., Jiménez-Gasco, M. M., Navas-Cortés, J. A., Landa, B. B., and Milgroom, M. G. (2017). Variation of pathotypes and races and their correlations with clonal lineages in *Verticillium dahliae*. *Plant Pathol.* 66, 651–666. doi: 10.1111/ppa.12611
- Jiménez-Fernández, D., Trapero-Casas, J. L., Landa, B. B., Navas-Cortés, J. A., Bubici, G., Cirulli, M., and Jiménez-Díaz, R. M. (2016). Characterization of resistance against the olive-defoliating *Verticillium dahliae* pathotype in selected clones of wild olive. *Plant Pathol.* 65, 1279–1291. doi: 10.1111/ppa.12516
- Jiménez-Ruiz, J., Leyva-Pérez, M. de la O., Schilirò, E., Barroso, J. B., Bombarely, A., Mueller, L., Mercado-Blanco, J., and Luque, F. (2017). Transcriptomic analysis of *Olea europaea* L. roots during the early infection process. *Plant Genome* 10, 1–15. doi: 10.3835/plantgenome2016.07.0060
- Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329. doi: 10.1038/nature05286
- Jones, D. A., Thomas, C. M., Hammond-Kosack, K. E., Balint-Kurti, P. J., and Jones, J. D. G. (1994). Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 266, 789–793.
- Joshi, S. G., Kumar, V., Janga, M. R., Bell, A. A., and Rathore, K. S. (2017). Response of *AtNPR1*-expressing cotton plants to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* isolates. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 23, 135–142. doi: 10.1007/s12298-016-0411-x
- Jung, H. W., Tschaplinski, T. J., Wang, L., Glazebrook, J., and Greenberg, J. T. (2009). Priming in systemic plant immunity. *Science* 324, 89–91. doi: 10.1126/science.1170025

- Kachroo, A., and Robin, G. P. (2013). Systemic signaling during plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16, 527–533. doi: 10.1016/j.pbi.2013.06.019
- Karp, A. (1994). Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. In: *Plant Cell and Tissue Culture*. Vasil, I. K., and Thorpe, T. A. (eds.). Kluwer Academic publishers, Dordrecht. pp 139–152.
- Katan T, 2000. Vegetative compatibility in populations of *Verticillium* – An overview. In: *Advances in Verticillium Research and Disease Management*. Tjamos, E. C., Rowe, R. C., Heale, J. B., and Fravel, R. D., (eds). St Paul, M. N, USA: APS Press. pp 69–86.
- Keykhasaber, M., Thomma, B. P. H. J., and Hiemstra, J. A. (2017). *Verticillium* wilt caused by *Verticillium dahliae* in woody plants with emphasis on olive and shade trees. *Eur. J. Plant Pathol.* 150, 21–37. doi: 10.1007/s10658-017-1273-y
- Kinkema, M., Fan, W., and Dong, X. (2000). Nuclear localization of NPR1 is required for activation of *PR* gene expression. *Plant Cell* 12, 2339–2350.
- Klosterman, S. J., Subbarao, K. V., Kang, S., Veronese, P., Gold, S. E., Thomma, B. P. H. J., Chen, Z., Henrissat, B., Lee, Y. H., Park, J., Garcia-Pedrajas, M. D., Barbara, D. J., Anchieta, A., de Jonge, R., Santhanam, P., Maruthachalam, K., Atallah, Z., Amyotte, S. G, Paz, Z., Inderbitzin, P., Hayes, R. J., Heiman, D. I., Young, S., Zeng, Q., Engels, R., Galagan, J., Cuomo, C. A., Dobinson, K. F., and Ma, L. J. (2011). Comparative genomics yields insights into niche adaptation of plant vascular wilt pathogens. *PLoS Pathog* 7(7): e1002137. doi: 10.1371/journal.ppat.1002137
- Kshirsagar, A., Reid, A. J., McColl, S. M., Saunders, V. A., Whalley, A. J. S. and Evans, E. H. (2001). The effect of fungal metabolites on leaves as detected by chlorophyll fluorescence. *New Phytol.* 151, 451-457.
- Kumar, V., Joshi, S. G., Bell, A. A., and Rathore, K. S. (2013). Enhanced resistance against *Thielaviopsis basicola* in transgenic cotton plants expressing *Arabidopsis NPR1* gene. *Transgenic Res.* 22, 359–368. doi: 10.1007/s11248-012-9652-9
- Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Gasset, M., Patiño, B., Campos-Olivas, R., Vázquez, C., Martínez-Ruiz, A., Mancheno, J. M., Onaderra, M., and Gavilanes, J. G. (1995). Characterization of the antifungal protein secreted by the mold *Aspergillus giganteus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 324, 273–281. doi: 10.1006/abbi.1995.0040
- Lacroix, B., Li, J. X., Tzfira, T., and Citovsky, V. (2006). Will you let me use your nucleus? How *Agrobacterium* gets its T-DNA expressed in the host plant cell. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 84, 333–345. doi: 10.1139/y05-108
- Larkin, P. J., and Scowcroft, W. R. (1981). Somaclonal variation- a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60, 197–214.
- Lavee, S., Avidan, B., and Meni, Y. (2003). ‘Askal’, a new high-performing oil variety for intensive and super-intensive olive orchards. *Olivae* 97, 53–59.
- Lavee, S., Avidan, B., Meni, Y., Kaskal, A., and Wodner, M. (2004). Three new varieties of semi-dwarf table olives. *Olivae* 102, 33–41.
- Lavee, S., Harshemesh, H., Haskal, A., Meni, V., Wodner, M., Ogradovitch, O., Avidan, B., Wiesman, Z., Avidan, N., and Trapero-Casas, A. (1999). ‘Maalot’, un nuevo cultivar resistente al repilo en olivar (*Spilocaea oleagina* Cast.). *Olivae* 78, 51–59.

- Lazo, G. R., Stein, P. A., and Ludwig, R. A. (1991). A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology* 9, 963–967. doi: 10.1038/nbt1091-963
- Le Henanff, G., Farine, S., Kieffer-Mazet, F., Miclot, A. S., Heitz, T., Mestre, P., Mutterer, J., Walter, B., and Chong, J. (2011). *Vitis vinifera* VvNPR1.1 is the functional ortholog of AtNPR1 and its overexpression in grapevine triggers constitutive activation of PR genes and enhanced resistance to powdery mildew. *Planta* 234, 405–417. doi: 10.1007/s00425-011-1412-1
- Le Henanff, G., Heitz, T., Mestre, P., Mutterer, J., Walter, B., and Chong, J. (2009). Characterization of *Vitis vinifera* NPR1 homologs involved in the regulation of pathogenesis-related gene expression. *BMC Plant Biol.* 9, 54. doi: 10.1186/1471-2229-9-54
- Leal, F., Loureiro, J., Rodriguez, E., Pais, M. S., Santos, C., and Pinto-Carnide, O. (2006). Nuclear DNA content of *Vitis vinifera* cultivars and ploidy level analyses of somatic embryo-derived plants obtained from anther culture. *Plant Cell Rep.* 25, 978–985. doi: 10.1007/s00299-006-0162-1
- Lee, M., and Phillips, R. L. (1988). The chromosomal basis of somaclonal variation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 39, 413–437.
- Lee, H. I., Leon, J., and Raskin, I. (1995). Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 4076–4079.
- Leister, R. T., Ausubel, F. M., and Katagiri, F. (1996). Molecular recognition of pathogen attack occurs inside of plant cells in plant disease resistance specified by the *Arabidopsis* genes RPS2 and RPM1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 15497–15502. doi: 10.1073/pnas.93.26.15497
- Leiter, É., Gáll, T., Csernoch, L., and Pócsi, I. (2017). Biofungicide utilizations of antifungal proteins of filamentous ascomycetes: current and foreseeable future developments. *BioControl* 62, 125–138. doi: 10.1007/s10526-016-9781-9
- Leva, A. R., and Petruccelli, R. (2012). Monitoring of cultivar identity in micropropagated olive plants using RAPD and ISSR markers. *Biol. Plant.* 56, 373–376. doi: 10.1007/s10535-012-0102-6
- Leva, A., Muleo, R., and Petruccelli, R. (1995). Long-term somatic embryogenesis from immature olive cotyledons. *J. Hortic. Sci.* 70, 417–421. doi: 10.1080/14620316.1995.11515311
- Leva, A. R., Petruccelli, R., and Rinaldi, L. M. R. (2012). Somaclonal variation in tissue culture: a case study with olive. In: *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. IntechOpen. pp. 123-129. doi: 10.5772/50367
- Leyva-Pérez, M. de la O., Jiménez-Ruiz, J., Gómez-Lama Cabanás, C., Valverde-Corredor, A., Barroso, J. B., Luque, F., and Mercado-Blanco, J. (2017). Tolerance of olive (*Olea europaea*) cv. Frantoio to *Verticillium dahliae* relies on both basal and pathogen-induced differential transcriptomic responses. *New Phytol.* 217, 671–686. doi: 10.1111/nph.14833
- Li, H. P., Zhang, J. B., Shi, R. P., Huang, T., Fischer, R., and Liao, Y. C. (2008). Engineering Fusarium head blight resistance in wheat by expression of a fusion protein containing a *Fusarium*-specific antibody and an antifungal peptide. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21, 1242–1248.
- Lin, W., Lu, C. F., Wu, J. W., Cheng, M. L., Lin, Y. M., Black, L., Green, S. K., Wang, J. F., and Cheng, C. P. (2004). Transgenic tomato plants expressing the *Arabidopsis* NPR1 gene display enhanced resistance to a spectrum of fungal and bacterial diseases. *Transgenic Res.* 13, 567–581.

- Litz, R. E. and Gray, D. J. (1995). Somatic embryogenesis for agricultural improvement. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11, 416-425.
- Liu, P. P., von Dahl, C. C., Park, S. W., and Klessig, D. F. (2011). Interconnection between methyl salicylate and lipid-based long-distance signaling during the development of systemic acquired resistance in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Physiol.* 155, 1762–1768. doi: 10.1104/pp.110.171694
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$. *Methods* 25, 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Lopes, T., Capelo, A., Brito, G., Loureiro, J., and Santos, C. (2009). Genetic variability analyses of the somatic embryogenesis induction process in *Olea* spp. using nuclear microsatellites. *Trees* 23, 29–36. doi: 10.1007/s00468-008-0251-6
- Lopes, T., Pinto, G., Loureiro, J., Costa, A., and Santos, C. (2006). Determination of genetic stability in long-term somatic embryogenic cultures and derived plantlets of cork oak using microsatellite markers. *Tree Physiol.* 26, 1145–1152.
- López, C. M. R., Wetten, A. C., and Wilkinson, M. J. (2010). Progressive erosion of genetic and epigenetic variation in callus-derived cocoa (*Theobroma cacao*) plants. *New Phytol.* 186, 856–868 doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03242.x
- López-Escudero, F. J., and Mercado-Blanco, J. (2011). Verticillium wilt of olive: A case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. *Plant Soil* 344, 1–50. doi: 10.1007/s11104-010-0629-2
- López-Escudero, F. J., del Río, C., Caballero, J. M., and Blanco-López, M. A. (2004). Evaluation of olive cultivars for resistance to *Verticillium dahliae*. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 79–85. doi: 10.1023/B:EJPP.0000010150.08098.2d
- López-Escudero, F. J., Mercado-Blanco, J., Roca, J. M., Valverde-Corredor, A., Blanco-López, M. A. (2010). Verticillium wilt of olive in the Guadalquivir Valley (southern Spain): relation with some agronomical factors and spread of *Verticillium dahliae*. *Phytopathologia Mediterranea* 49, 370–380.
- Lorito, M., Woo, S. L., García-Fernandez, I., Colucci, G., Harman, G. E., Pintor-Toro, J. A., Filippone, E., Muccifora, S., Lawrence, C. B., Zoina, A., Tuzun, S., and Scala, F. (1998). Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 7860–7865. doi: 10.1073/pnas.95.14.7860
- Loureiro, J., Pinto, G., Lopes, T., Doležel, J., and Santos, C. (2005). Assessment of ploidy stability of the somatic embryogenesis process in *Quercus suber* L. using flow cytometry. *Planta* 221, 815–822. doi: 10.1007/s00425-005-1492-x
- Luna, E., Bruce, T. J. A., Roberts, M. R., Flors, V., and Ton, J. (2012). Next-generation Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiol.* 158, 844–853. doi: 10.1104/pp.111.187468
- Makandar, R., Essig, J. S., Schapaugh, M. A., Trick, H. N., and Shah, J. (2006). Genetically engineered resistance to Fusarium head blight in wheat by expression of *Arabidopsis NPR1*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19, 123–129.
- Makandar, R., Nalam, V., Chaturvedi, R., Jeannotte, R., Sparks, A. A., and Shah, J. (2010). Involvement of salicylate and jasmonate signaling pathways in *Arabidopsis* interaction with *Fusarium graminearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23, 861–870.
- Maldonado, A. M., Doerner, P., Dixon, R. A., Lamb, C. J., and Cameron, R. K. (2002). A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 419, 399–403. doi: 10.1038/nature01063.1

- Malnoy, M., Jin, Q., Borejsza-Wysocka, E. E., He, S. Y., Aldwinckle, H. S. (2007). Over-expression of the apple *MpNPR1* gene confers increased disease resistance in *Malus x domestica*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20, 1568–1580. doi: 10.1094/MPMI-20-12-1568
- Markakis, E. A., Tjamos, S. E., Antoniou, P. P., Paplomatas, E. J., and Tjamos, E. C. (2016). Biological control of Verticillium wilt of olive by *Paenibacillus alvei*, strain K165. *BioControl* 61(3), 229-303.
- Markakis, E. A., Tjamos, S. E., Antoniou, P. P., Roussos, P. A., Paplomatas, E. J., and Tjamos, E. C. (2010). Phenolic responses of resistant and susceptible olive cultivars induced by defoliating and nondefoliating *Verticillium dahliae* pathotypes. *Plant Dis.* 94, 1156–1162. doi: 10.1094/PDIS-94-9-1156
- Martínez del Pozo, Á., Lacadena, V., Mancheño, J. M., Olmo, N., Oñaderra, M., and Gavilanes, J. G. (2002). The antifungal protein AFP of *Aspergillus giganteus* is an oligonucleotide/oligosaccharide binding (OB) fold-containing protein that produces condensation of DNA. *J. Biol. Chem.* 277, 46179–46183. doi: 10.1074/jbc.M207472200
- Martínez-Ruiz, A., Martínez Del Pozo, A., Lacadena, J., Mancheño, J. M., Oñaderra, M., and Gavilanes, J. G. (1997). Characterization of a natural larger form of the antifungal protein (AFP) from *Aspergillus giganteus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1340, 81–87. doi: 10.1016/S0167-4838(97)00038-1
- Matthäus, B., and Özcan, M. M. (2011). Determination of fatty acid, tocopherol sterol contents and 1,2- and 1,3-diacylglycerols in four different virgin olive oil. *J. Food Process. Technol.* 2, 117–220. doi: 10.4172/2157-7110.1000117
- Matzke, A. J. M., and Matzke, M. A. (1998). Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 142–148 doi: 10.1016/S1369-5266(98)80016-2
- Mazri, M. A., Belkoura, I., Pliego-alfaro, F., and Belkoura, M. (2013). Somatic embryogenesis from leaf and petiole explants of the Moroccan olive cultivar Dahbia. *Sci. Hort.* 159, 88–95. doi: 10.1016/j.scienta.2013.05.002
- Melchers, L. S., Sela-Buurlage, M. B., Vloemans, S. A., Woloshuk, C. P., van Roekel, J. S. C., Pen, J., van den Elzen, P. J. M., and Cornelissen, B. J. C. (1993). Extracellular targeting of the vacuolar tobacco proteins AP24, chitinase and β -1,3-glucanase in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 21, 583–593.
- Mencuccini, M., and Rugini, E. (1993). *In vitro* shoot regeneration from olive cultivar tissues. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 32(3), 283–288. doi: 10.1007/BF00042290
- Mercado, J. A., Barceló, M., Pliego, C., Rey, M., Caballero, J. L., Muñoz-Blanco, J., Ruano-Rosa, D., López-Herrera, C., de los Santos, B., Romero-Muñoz, F., and Pliego-Alfaro, F. (2015). Expression of the β -1,3-glucanase gene *bgn13.1* from *Trichoderma harzianum* in strawberry increases tolerance to crown rot diseases but interferes with plant growth. *Transgenic Res.* 24, 979–989. doi: 10.1007/s11248-015-9895-3
- Métraux, J. P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W., and Inverard, B. (1990). Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250, 1004–1006.
- Meur, G., Budatha, M., Dutta Gupta, A., Prakash, S., and Kirti, P. B. (2006). Differential induction of *NPR1* during defense responses in *Brassica juncea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 68, 128–137. doi: 10.1016/j.pmpp.2006.09.003
- Meur, G., Budatha, M., Srinivasan, T., Rajesh Kumar, K. R., Dutta Gupta, A., and Kirti, P. B. (2008). Constitutive expression of *Arabidopsis NPR1* confers enhanced

- resistance to the early instars of *Spodoptera litura* in transgenic tobacco. *Physiol. Plant.* 133, 765–775. doi: 10.1111/j.1399-3054.2008.01098.x
- Meyer, V. (2008). A small protein that fights fungi: AFP as a new promising antifungal agent of biotechnological value. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 17–28. doi: 10.1007/s00253-007-1291-3
- Meyer, R., Slater, V., and Dubery, L. A. (1994). A phytotoxic protein-lipopolysaccharide complex produced by *Verticillium dahliae*. *Phytochemistry* 35, 1449–1453.
- Milgroom, M. G., del Mar Jiménez-Gasco, M., Olivares-García, C., and Jiménez-Díaz, R. M. (2016). Clonal expansion and migration of a highly virulent, defoliating lineage of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 106, 1038–1046. doi: 10.1094/PHYTO-11-15-0300-R
- Milgroom, M. G., Jiménez-Gasco, M. D. M., Olivares-García, C., Drott, M. T., and Jiménez-Díaz, R. M. (2014). Recombination between clonal lineages of the asexual fungus *Verticillium dahliae* detected by genotyping by sequencing. *PLoS One* 9:e106740. doi: 10.1371/journal.pone.0106740
- Minelli, S., Maggini, F., Gelati, M. T., Angiolillo, A., and Cionini, P. G. (2000). The chromosome complement of *Olea europaea* L.: characterization by differential staining of the chromatin and in situ hybridization of highly repeated DNA sequences. *Chromosom. Res.* 8, 615–619.
- Miñano, H. S., Ibáñez, M. A., González-Benito, M. E., and Martín, C. (2014). Sequential study of the genetic stability of callus and regenerated shoots in *Chrysanthemum*. *Propag. Ornament. Plants* 14, 57–67.
- Mitrakos, K., Alexaki, A., and Papadimitriou, P. (1992). Dependence of olive morphogenesis on callus origin and age. *J. Plant Physiol.* 139, 269–273.
- Mol, L., Scholte, K. and Vos, J. (1995) Effects of crop rotation and removal of crop debris on the soil population of two isolates of *Verticillium dahliae*. *Plant Pathol.* 44, 1070–1074.
- Molla, K. A., Karmakar, S., Chanda, P. K., Sarkar, S. N., Datta, S. K., and Datta, K. (2016). Tissue-specific expression of *Arabidopsis NPR1* gene in rice for sheath blight resistance without compromising phenotypic cost. *Plant Sci.* doi: 10.1016/j.plantsci.2016.06.005
- Moreno, A. B., Martínez Del Pozo, A. and San Segundo, B. (2006). Antifungal mechanism of the *Aspergillus giganteus* AFP against the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 883–895 doi: 10.1007/s00253-006-0362-1
- Moreno, A. B., Peñas, G., Rufat, M., Bravo, J. M., Estopa, M., Messeguer, J., and San Segundo, B. (2005). Pathogen-induced production of the antifungal AFP protein from *Aspergillus giganteus* confers resistance to the blast fungus *Magnaporthe grisea* in transgenic rice. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18, 960–972. doi: 10.1094/MPMI-18-0960
- Mou, Z., Fan, W., and Dong, X. (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113, 935–944. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00429-X
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497.
- Murthy, B. N. S., Murch, S. J., and Saxena, P. K. (1995). Thidiazuron-induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): Endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. *Physiol. Plant* 94(2), 268–276. doi: org/10.1111/j.1399-3054.1995.tb05311.x

- Murthy, B. N. S, Murch, S .J. and Saxena, P. K. (1998). Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 34, 267. doi: org/10.1007/BF02822732
- Narvaez, I., Khayreddine, T., Pliego, C., Cerezo, S., Jiménez-Díaz, R. M., Trapero-Casas, J. L., López-Herrera, C., Arjona-Girona, I., Martín, C., Mercado, J. A., and Pliego-Alfaro, F. (2018). Usage of the heterologous expression of the antimicrobial gene *afp* from *Aspergillus giganteus* for increasing fungal resistance in olive. *Front. Plant Sci.* 9:680. doi: 10.3389/fpls.2018.00680
- Navas-Cortés, J. A., Landa, B. B., Mercado-Blanco, J., Trapero-Casas, J. L., Rodríguez-Jurado, D., and Jiménez-Díaz, R. M. (2008). Spatiotemporal analysis of spread of infections by *Verticillium dahliae* pathotypes within a high tree density olive orchard in southern Spain. *Phytopathology* 98, 167–180. doi: 10.1094/PHYTO-98-2-0167
- Neelakandan, A. K., and Wang, K. (2012). Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Rep.* 31, 597–620. doi: 10.1007/s00299-011-1202-z
- Nivas, S. K., and Dsouza, L. (2014). Genetic fidelity in micropropagated plantlets of *Anacardium occidentale* L. (Cashew) an important fruit tree. *Int J. Sci. Res.* 3, 2142–2146.
- Niggeweg, R., Thurow, C., Weigel, R., Pfitzner, U., and Gatz, C. (2000). Tobacco TGA factors differ with respect to interaction with *NPR1*, activation potential and DNA binding properties. *Plant Mol. Biol.* 42, 775–788.
- Novo, M., Pomar, F., Gayoso, C., and Merino, F. (2006). Cellulase activity in isolates of *Verticillium dahliae* differing in aggressiveness. *Plant Dis.* 90, 155–160. doi: 10.1094/PD-90-0155
- Nwazoma, A. B., and Jaja, E. T. (2013). A review of somaclonal variation in plantain (*Musa* spp): mechanisms and applications. *J. Appl. Biosci.* 67, 5252–5260.
- Oldach, K. ., Becker, D., and Lörz, H. (2001). Heterologous expression of genes mediating enhanced fungal resistance in transgenic wheat. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14, 832–838. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.7.832
- Omrani-Sabbaghi, A., Shahriari, M., Falahati-Anbaran, M., and Mohammadi, S. A. (2007). Microsatellite markers based assessment of genetic diversity in Iranian olive (*Olea europaea* L.) collections. *Sci. Hortic.* 112, 439–447. doi: 10.1016/j.scienta.2006.12.051
- Orbović, V., Calovic, M., Vilorja, Z., Nielsen, B., Gmitter Jr, F. G., Castle, W. S., Grosser, J. W. (2008). Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry. *Euphytica* 161, 329–335. doi: 10.1007/s10681-007-9559-3
- Orinos, T., and Mitrakos, K. (1991). Rhizogenesis and somatic embryogenesis in calli from wild olive (*Olea europaea* var. *sylvestris* (Miller) Lehr) mature zygotic embryos. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 27, 183–187. doi: 10.1007/BF00041288
- Palomares-Rius, J. E., Castillo, P., Trapero-Casas, J. L., and Jiménez-Díaz, R. M. (2016). Infection by *Meloidogyne javanica* does not breakdown resistance to the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in selected clones of wild olive. *Sci. Hortic.* 199, 149–157. doi: 10.1016/j.scienta.2015.12.038
- Park, S., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., and Klessig, D. F. (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant Systemic Acquired Resistance. *Science* 318, 113–116.
- Parkhi, V., Kumar, V., Campbell, L. M., Bell, A. A., Shah, J., and Rathore, K.S.

- (2010a). Resistance against various fungal pathogens and reniform nematode in transgenic cotton plants expressing *Arabidopsis NPR1*. *Transgenic Res.* 19, 959–975. doi: 10.1007/s11248-010-9374-9
- Parkhi, V., Kumar, V., Campbell, L. A. M., Bell, A. A., and Rathore, K. S. (2010b). Expression of *Arabidopsis NPR1* in transgenic cotton confers resistance to non-defoliating isolates of *Verticillium dahliae* but not the defoliating isolates. *J. Phytopathol.* 158, 822–825. doi: 10.1111/j.1439-0434.2010.01714.x
- Pegg, G. F., and Brady, B. L. (2002). *Verticillium wilts*. Wallingford, United Kingdom: CABI Publishing. ISBN: 0–85199–529–2.
- Pérez-Barranco, G., Torreblanca, R., Padilla, I. M. G., Sánchez-Romero, C., Pliego-Alfaro, F., and Mercado, J. A. (2009). Studies on genetic transformation of olive (*Olea europaea* L.) somatic embryos: I. Evaluation of different aminoglycoside antibiotics for *nptII* selection; II. Transient transformation via particle bombardment. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 97, 243–251. doi: 10.1007/s11240-009-9520-3
- Pérez-Jiménez, R. M. (2006). A review of the biology and pathogenicity of *Rosellinia necatrix* - The cause of white root rot disease of fruit trees and other plants. *J. Phytopathol.* 154, 257–266. doi: 10.1111/j.1439-0434.2006.01101.x
- Pérez-Jiménez, F., Ruano, J., Perez-Martinez, P., Lopez-Segura, F., and Lopez-Miranda, J. (2007). The influence of olive oil on human health: Not a question of fat alone. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 1199–1208. doi: 10.1002/mnfr.200600273
- Peschke, V. M., and Phillips, R. (1992). Genetic implications of somaclonal variation in plants. *Adv. Genet.* 30, 41–75. doi: org/10.1016/S0065-2660(08)60318-1
- Peyvandi, M., Farahzadi, H. N., Arbabian, S., and Hosseini-Mazinani, M. (2010). Somaclonal variation among somatic-embryo derived plants of *Olea europaea* L cv. 'Koroneiki.' *J. Sci. I. R. Iran* 21, 7–14.
- Peyvandi, M., Noormohammadi, Z., Banihashemi, F., Farahani, F., and Majd, A. (2009). Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of *Olea europaea* L. (cv. Dezful). *Asian J. Plant Sci.* 8, 146–152.
- Pieterse, C. M. J., and Van Loon, L. C. (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* 4, 52–58. doi: 10.1016/S1360-1385(98)01364-8
- Pieterse, C. M. J., and Van Loon, L. C. (2004). NPR1: The spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 456–464. doi: 10.1016/j.pbi.2004.05.006
- Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., Van Der Ent, S., and Van Wees, S. C. M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* 5, 308–316. doi: 10.1038/nchembio.164
- Pinto, G., Valentim, H., Costa, A., Castro, S., and Santos, C. (2002). Somatic embryogenesis in leaf callus from a mature *Quercus suber* L. Tree. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38, 569–572. doi: 10.1079/IVP2002352
- Pliego, C., López-Herrera, C., Ramos, C., and Cazorla, F. M. (2012). Developing tools to unravel the biological secrets of *Rosellinia necatrix*, an emergent threat to woody crops. *Mol. Plant Pathol.* 13, 226–239. doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00753.x
- Potlakyayala, S. D., DeLong, C., Sharpe, A., and Fobert, P. R. (2007). Conservation of *Non-expressor of pathogenesis-related genes1* function between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 71, 174–183. doi: 10.1016/j.pmpp.2008.01.003
- Powell, W., Gordon, C., Machray, J., and Provanm, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci.* 1, 215–222.

- Prieto, P., Navarro-Raya, C., Valverde-Corredor, A., Amyotte, S. G., Dobinson, K. F., and Mercado-Blanco, J. (2009). Colonization process of olive tissues by *Verticillium dahliae* and its in planta interaction with the biocontrol root endophyte *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *Microb. Biotechnol.* 2, 499–511. doi: 10.1111/j.1751-7915.2009.00105.x
- Quilis, J., Peñas, G., Messeguer, J., Brugidou, C., and San Segundo, B. (2008). The *Arabidopsis AtNPR1* inversely modulates defense responses against fungal, bacterial, or viral pathogens while conferring hypersensitivity to abiotic stresses in transgenic rice. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21, 1215–1231.
- Rallo, L., and Munoz-Díez, C. (2010). Olive growing in a time of change. Soils, Plant Growth and Crop Production. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS). Vol.III.
- Rallo, L., Barranco, D., de la Rosa, R., and León, L. (2008). ‘Chiquitita’ olive. *HortScience* 43, 529–531.
- Rallo, P., Tenzer, I., Gessler, C., Baldoni, L., Dorado, G., and Martini, A. (2003). Transferability of olive microsatellite loci across the genus *Olea*. *Theor. Appl. Genet.* 107, 940–946.
- Ramineni, R., Sadumpati, V., Khareedu, V. R., and Vudem, D. R. (2014). Transgenic pearl millet male fertility restorer line (ICMP451) and hybrid (ICMH451) expressing *Brassica juncea Nonexpressor of pathogenesis related genes 1 (BjNPR1)* exhibit resistance to downy mildew disease. *PLoS One* 9, 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0090839
- Ramonell, K., Berrocal-Lobo, M., Koh, S., Wan, J., Edwards, H., Stacey, G., and Somerville, S. (2005). Loss-of-function mutations in chitin responsive genes show increased susceptibility to the powdery mildew pathogen *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiol.* 138, 1027–1036.
- Ranf, S., Eschen-lippold, L., Pecher, P., Lee, J., and Scheel, D. (2011). Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence responses to microbe- or damage-associated molecular patterns. *Plant J.* 68, 100–113. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04671.x
- Rani, V., and Raina, S. N. (2000). Genetic fidelity of organized meristem derived micropropagated plants: a critical reappraisal. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 36, 319–330.
- Rasmann, S., De Vos, M., Casteel, C. L., Tian, D., Halitschke, R., Sun, J. Y., Agrawal, A. A., Felton, G. W., and Jander, G. (2012). Herbivory in the previous generation primes plants for enhanced insect resistance. *Plant Physiol.* 158, 854–863. doi: 10.1104/pp.111.187831
- Revilla, M. A., Pacheco, J., Casares, A., and Rodríguez, R. (1996). *In vitro* reinvigoration of mature olive trees (*Olea europaea* L.) through micrografting. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 32, 257–261.
- Roca, L. F., Romero, J., Raya, M. C., and Trapero, A. (2016). Decaimiento y muerte de olivos por *Rosellinia necatrix* en el Alentejo portugués. XVIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, 20-23 Septiembre 2016, Palencia. R-0133
- Ron, M., and Avni, A. (2004). The receptor for the fungal elicitor ethylene inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *Plant Cell* 16, 1604–1615.
- Roussos, P. A., and Pontikis, C. A. (2002). *In vitro* propagation of olive (*Olea europaea* L.) cv. Koroneiki. *Plant Growth Regul.* 37, 295–304. doi:10.1023/A:1020824330589

- Rowe, R. C., and Powelson, M. L. (2002). Potato Early Dying: Management Challenges in a Changing Production Environment. *Plant Dis.* 86, 1184–1193. doi: 10.1094/PDIS.2004.88.11.1172
- Ruano Rosa, D., and López Herrera, C. J. (2009). Evaluation of *Trichoderma* spp. as biocontrol agents against avocado white root rot. *Biol. Control* 51, 66–71. doi: 10.1016/j.biocontrol.2009.05.005
- Ruano Rosa, D., Schena, L., Ippolito, A., and López Herrera, C. J. (2007). Comparison of conventional and molecular methods for the detection of *Rosellinia necatrix* in avocado orchards in southern Spain. *Plant Pathol.* 56, 251–256.
- Rugini, E. (1984). *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Sci. Hort.* 24, 123–134. doi: 10.1016/0304-4238(84)90143-2
- Rugini, E. (1988). Somatic embryogenesis and plant regeneration in olive (*Olea europaea* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 14, 207–214.
- Rugini, E. (1995). Somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.). In: Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Jain, S., Gupta, P., and Newton, R. (eds.), Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. pp 171–189.
- Rugini, E., and Fedeli, E. (1990). Olive (*Olea europaea* L.) as an Oilseed Crop. Book Legumes and Oilseed Crops I. Bajaj, Y. P. S. (ed.). Springer, The Netherlands. pp. 593–641. doi: 10.1007/978-3-642-74448-8_29
- Rugini, E., and Caricato, G. (1995). Somatic embryogenesis and plant recovery from mature tissues of olive cultivars (*Olea europaea* L.) ‘Canino’ and ‘Moraiolo’. *Plant Cell Rep.* 9. 257–260.
- Rugini, E., and Baldoni, L. (2005). *Olea europaea* Olive In: Biotechnology of Fruit and Nut Crops. Litz, R. E. (ed.). CABI Publishing, Cambridge. pp 404–428.
- Rugini, E., and Gutierrez-Pesce, P. (2006). Genetic improvement of olive. *Pomologia croatica* 12, 43-74.
- Rugini, E., Biasi, R., and Muleo, R. (2000). Olive (*Olea europaea* var. *sativa*) transformation. In: Molecular Biology of Woody Plants. Vol. 2. Jain, S. M., and Minocha, S. C. (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 245-279.
- Rugini, E., Pannelli, G., Ceccarelli, M., and Muganu, M. (1996). Isolation of triploid and tetraploid olive (*Olea europaea* L.) plants from mixoploid cv. ‘Frantoio’ and ‘Leccino’ mutants by *in vivo* and *in vitro* selection. *Plant Breed* 115, 23–27.
- Ruiz Torres, M. J. (2010). Situación fitosanitaria y control del olivar andaluz en la pasada campaña. *Vida Rural* 304, 44–47.
- Sadumapati, V., Kalambur, M., Vudem, D. R., Kirti, P. B., and Khareedu, V. R. (2013). Transgenic indica rice lines, expressing *Brassica juncea Nonexpressor of pathogenesis-related genes 1 (BjNPR1)*, exhibit enhanced resistance to major pathogens. *J. Biotechnol.* 166, 114–121. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.04.016
- Sahijram, L., Soneji, J. R., and Bollamma, K. T. (2003). Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 39, 551–556. doi: 10.1079/IVP2003467
- Sales, E. K., and Butardo, N. G. (2014). Molecular analysis of somaclonal variation in tissue culture derived bananas using MSAP and SSR markers. *Int. Sch. Sci. Res. Innov.* 8, 615–622.
- San-José, M. C., Corredoira, E., Martínez, M. T., Vidal, N., Valladares, S., Mallón, R., and Vieitez, A. M. (2010). Shoot apex explants for induction of somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* L. trees. *Plant Cell Rep.* 29, 661–671. doi:

- 10.1007/s00299-010-0852-6
- Sanei, S. J., and Razavi, S. E. (2017). Sources of *Verticillium* wilt resistance in wild olive germplasm from the Mediterranean region. *J. Crop Prot.* 6, 457–470. doi: 10.1111/j.1365-3059.2007.01785.x
- Santos, C. V., Brito, G., Pinto, G., and Fonseca, H. M. A. C. (2003). *In vitro* plantlet regeneration of *Olea europaea* ssp. *maderensis*. *Sci. Hortic.* 97, 83–87. doi: 10.1016/S0304-4238(02)00148-6
- Scowcroft, W. R. (1984). Genetic variability in tissue culture: impact on germplasm conservation and utilization. International board for plant genetic resources (IBPGR) technical report AGPGIBPGR/84/152, Rome; 1984.
- Sebastiani, L., Lenzi, A., Pugliesi, C., and Fambrini, M. (1994). Somaclonal variation for resistance to *Verticillium dahliae* in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated from callus. *Euphytica* 80, 5–11.
- Sefc, K. M., Lopes, M. S., Mendoca, D., Rodrigues dos Santos, M., Laimer da Câmara Machado, M., and Da Câmara Machado, A. (2000). Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Mol. Ecol.* 9, 1171–1193.
- Shao, Y., Zhang, H., He, H., Cheng, B., and Xiang, Y. (2013). Molecular cloning and characterization of orthologues of *NPR1* gene from poplar. *J. Phytopathol.* 161, 35–42. doi: 10.1111/jph.12002
- Sharma, S., Bryan, G., Winfield, M., and Millam, S. (2007). Stability of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated via somatic embryos, axillary bud proliferated shoots, microtubers and true potato seeds: a comparative phenotypic, cytogenetic and molecular assessment. *Planta* 226, 1449–1458.
- Shi, H., Liu, Z., Zhu, L., Zhang, C., Chen, Y., Zhou, Y., Li, F., and Li, X. (2012). Overexpression of cotton (*Gossypium hirsutum*) *dirigent1* gene enhances lignification that blocks the spread of *Verticillium dahliae*. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 44, 555–564. doi: 10.1093/abbs/gms035.Advance
- Shibli, R. A., Shatnawi, M., Ein, A., and Al-juboory, K. H. (2001). Somatic embryogenesis and plant recovery from callus of 'Nabali' Olive (*Olea europaea* L.). *Sci. Hortic.* 88, 243–256.
- Silva, K. J. P., Brunings, A., Peres, N. A., Zhonglin, M., and Folta, K. M. (2015). The *Arabidopsis NPR1* gene confers broad-spectrum disease resistance in strawberry. *Transgenic Res.* 24, 693–704. doi: 10.1007/s11248-015-9869-5
- Simons, S. A. (1997). Root and tuber crops. In: *Soilborne Diseases of Tropical Crops*. Hillocks, R. J., and Waller, J. M. (eds.). Cab International. New York, USA. pp. 109-149.
- Singh, D., Haicour, R., Sihachakr, D., and Rajam, M. V. (2015). Expression of rice chitinase gene in transgenic eggplant confers resistance to fungal wilts. *Indian J. Biotechnol.* 14, 233–240.
- Singh, R., Kashyap, S. P., Kumari, N., and Singh, M. (2016). Regeneration of soapnut tree through somatic embryogenesis and assessment of genetic fidelity through ISSR and RAPD markers. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 22, 381–389. doi: 10.1007/s12298-016-0364-0
- Skirvin, R. M. (1978). Natural and induced variation in tissue culture. *Euphytica* 27, 241–266.
- Slaughter, A., Daniel, X., Flors, V., Luna, E., Hohn, B., and Mauch-mani, B. (2012). Descendants of primed *Arabidopsis* plants exhibit resistance to biotic stress. *Plant Physiol.* 158, 835–843. doi: 10.1104/pp.111.191593

- Song, Y., Liu, L., Wang, Y., Valkenburg, D. J., Zhang, X., Zhu, L., and Thomma, B. P. H. J. (2017). Transfer of tomato immune receptor *Ve1* confers *Ave1*-dependent *Verticillium* resistance in tobacco and cotton. *Plant Biotechnol. J.* 16, 638–648. doi: 10.1111/pbi.12804
- Sowik, I., Bielenin, A., and Michalczyk, L. (2001). *In vitro* testing of strawberry resistance to *Verticillium dahliae* and *Phytophthora cactorum*. *Sci. Hortic.* 88, 31–40.
- Sowik I., Wawrzyńczak D., and Michalczyk L. (2003). *Ex vitro* establishment and greenhouse performance of somaclonal variants of strawberry selected for resistance to *Verticillium dahliae*. *Acta Hortic.* 616, 497–500. doi: 10.17660/ActaHortic.2003.616.78
- Sowik, I., Markiewicz, M., and Michalczyk, L. (2015). Stability of *Verticillium dahliae* resistance in tissue culture-derived strawberry somaclones. *Hortic. Sci.* 42, 141–148. doi: 10.17221/360/2014-HORTSCI
- Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M. C., Korzelius, J. P., Van Pelt, J. A., Mueller, M. J., Buchala, A. J., Métraux, J. P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L. C., Dong, X., and Pieterse, C. M. J. (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 15, 760–770. doi: 10.1105/tpc.009159
- Spoel, S. H., Mou, Z., Tada, Y., Spivey, N. W., Genschik, P., and Dong, X. (2009). Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. *Cell* 137, 860–872. doi: 10.1016/j.cell.2009.03.038
- Stergiopoulos, I., van den Burg, H. A., Okmen, B., Beenen, H. G., van Liere, S., Kema, G. H. J., and de Wit, P. J. G. M. (2010). Tomato Cf resistance proteins mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 7610–7615. doi: 10.1073/pnas.1002910107
- Sun, Q., Jiang, H., Zhu, X., Wang, W., He, X., Shi, Y., Yuan, Y., Du, X. and Cai, Y. (2013a). Analysis of sea-island cotton and upland cotton in response to *Verticillium dahliae* infection by RNA sequencing. *BMC Genomics* 14, 852–864. doi: 10.1186/1471-2164-14-852
- Sun, S., Zhong, J., Li, S., and Wang, X. (2013b). Tissue culture-induced somaclonal variation of decreased pollen viability in torenia (*Torenia fournieri* Lind.). *Bot. Stud.* 54, 36.
- Swartz, H. J. (1991). Post culture behavior: genetic and epigenetic effects and related problems. In: Micropropagation: Technology and Application. Debergh, P. C., and Zimmerman, R. H. (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp 95-122.
- Sztejnberg, A., Madar, Z., and Chet, I. (1980). Induction and quantification of microsclerotia in *Rosellinia necatrix*. *Phytopathology* 70, 525–527. doi: 10.1094/Phyto-70-525
- Tada, Y., Spoel, S. H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J., and Dong, X. (2008). *Science* 321, 1–9. doi: 10.1126/science.1156970.Plant
- Thomma, B. P. H. J., Eggermont, K., Penninckx, I. A. M. A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P. A., and Broekaert, W. F. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 15107–15111. doi: 10.1073/pnas.95.25.15107

- Tabaeizadeh, Z., Agharbaoui, Z., and Harrak., H. (1999). Transgenic tomato plants expressing a *Lycopersicon chilense* chitinase gene demonstrate improved resistance to *Verticillium dahliae* race 2. *Plant Cell Rep.* 19, 197–200.
- Tamayo, M. P. J. (2007). Enfermedades del aguacate. *Revista Politécnica* 4, 51–70.
- Tanurdzic, M., Vaughn, M. W., Jiang, H., Lee, T. J., Slotkin, R. K., Sosinski, B., Thompson, W. F., Doerge, R. W., and Martienssen, R. A. (2008). Epigenomic consequences of immortalized plant cell suspension culture. *PLoS Biol.* 6(12), 2880–2895. doi: org/10.1371/journal.pbio.0060302
- Theis, T., Wedde, M., Meyer, V., and Stahl, U. (2003) The antifungal protein from *Aspergillus giganteus* causes membrane permeabilization. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 588–593. doi: 10.1128/AAC.47.2.588-593.2003
- Thorpe, T. (1993). *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis: Physiological and biochemical aspects. In: Morphogenesis in Plants. Roubelakis-Angelakis, K., and Van, T. T. (eds.). Plenum Press, New York. pp 19–38.
- Thorpe, T., Stasolla, C., Yeung, E. C., de Klerk, G. J., Roberts, A., and George, E. F. (2008). The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd edn volume 1, The Background. George, E. F., Hall, M. A., and De klerk, G. J. (eds). Springer, Dordrecht, The Netherlands. pp 115–173. doi: 10.1007/978-1-4020-5005-3_4
- Tican, A., Câmpeanu, G., Chiru, N., and Ivanovici, D. (2008). Using of unconventional methods for obtaining somaclonal variations, having as goal making of new potato varieties with resistance at diseases and pests. *Rom Biotechnol. Lett* 13, 3791–3798.
- Tohidfar, M., Hossaini, R., Shokhandan Bashir, N., and Meisam, T. (2012). Enhanced resistance to *Verticillium dahliae* in transgenic cotton expressing an endochitinase gene from *Phaseolus vulgaris*. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 48, 33–41.
- Torreblanca, R., Cerezo, S., Palomo-Ríos, E., Mercado, J. A., and Pliego-Alfaro, F. (2010). Development of a high throughput system for genetic transformation of olive (*Olea europaea* L.) plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 103, 61–69. doi: 10.1007/s11240-010-9754-0
- Trabelsi, E. B., Bouzid, S., Bouzid, M., Elloumi, N., Belfeleh, Z., Benabdallah, A., Ghezal, R. (2003). *In vitro* regeneration of olive tree by somatic embryogenesis. *J. Plant Biol.* 46, 173–180. doi: 10.1007/BF03030446
- Turrini, A., Sbrana, C., Pitto, L., Ruffini Castiglione, M., Giorgetti, L., Briganti, R., Bracci, T., Evangelista, M., Nuti, M. P., and Giovannetti, M. (2004). The antifungal Dm-AMP1 protein from *Dahlia merckii* expressed in *Solanum melongena* is released in root exudates and differentially affects pathogenic fungi and mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 163, 393–403. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01107.x
- Uppalapati, S. R., Ishiga, Y., Wangdi, T., Kunkel, B. N., Anand, A., Mysore, K. S., and Bender, C. L. (2007). The phytotoxin coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of salicylic acid accumulation in tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20, 955–965. doi: 10.1094/MPMI-20-8-0955
- Vallad, G. E., Qin, Q. M., Grube, R., Hayes, R. J., and Subbarao, K. V. (2006). Characterization of race-specific interactions among isolates of *Verticillium dahliae* pathogenic on lettuce. *Phytopathology* 96, 1380–1387. doi: 10.1094/PHYTO-96-1380

- Van Loon, L., Rep, M., and Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 135–162. doi: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425
- Vázquez, A. M. (2001). Insight into somaclonal variation. *Plant Biosyst.* 135, 57–62. doi: 10.1080/11263500112331350650
- Vicente, M. C., and Fulton, T. (2003). Using Molecular Marker Technology in Studies on Plant Genetic Diversity. IPGRI, Cornell.
- Vidoy-Mercado, I., Imbroda-Solano, I., Barceló-Muñoz, A., and Pliego-Alfaro, F. (2012). Differential in vitro behaviour of the Spanish olive (*Olea europaea* L.) cultivars 'Arbequina' and 'Picual'. *Acta Hortic.* 949, 27–30. doi: 10.17660/ActaHortic.2012.949.1
- Vila, L., Lacadena, V., Fontanet, P., Martínez del Pozo, A., and San Segundo, B. (2001). A protein from the mold *Aspergillus giganteus* is a potent inhibitor of fungal plant pathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14, 1327–1331. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.11.1327
- Vinatzer, B. A., Patocchi, A., Gianfranceschi, L., Tartarini, S., Zhang, H. B., Gessler, C., and Sansavini, S. (2001). Apple contains receptor-like genes homologous to the *Cladosporium fulvum* resistance gene family of tomato with a cluster of genes cosegregating with Vf apple scab resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14, 508–515.
- von Arnold, S. (2008). Somatic embryogenesis. In: Plant Propagation by Tissue Culture. George, E. F. Hall, M. A., and Klerk, G. J. D. (eds.). Springer, Dordrecht. pp 335–354.
- Wachsman, J. T. (1997). DNA methylation and the association between genetic and epigenetic changes: relation to carcinogenesis. *Mutat. Res.* 375, 1–8.
- Wally, O., Jayaraj, J., and Punja, Z. K. (2009). Broad-spectrum disease resistance to necrotrophic and biotrophic pathogens in transgenic carrots (*Daucus carota* L.) expressing an *Arabidopsis NPR1* gene. *Planta* 231, 131–141. doi: 10.1007/s00425-009-1031-2
- Wang, Q. M., and Wang, L. (2012). An evolutionary view of plant tissue culture: Somaclonal variation and selection. *Plant Cell Rep.* 31, 1535–1547. doi: 10.1007/s00299-012-1281-5
- Wang, D., Amornsiripanitch, N., and Dong, X. (2006). A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathog.* 2(11):e123. doi: 10.1371/journal.ppat.0020123
- Wang, Z., Guo, J. L., Zhang, F., Huang, Q. S., Huang, L. P., and Yang, Q. (2010). Differential expression analysis by cDNA-AFLP of *Solanum torvum* upon *Verticillium dahliae* infection. *Russ. J. Plant Physiol.* 57, 676–684. doi: 10.1134/S1021443710050110
- Wang, Q. M., Gao, F. Z., Gao, X., Zou, F. Y., Sui, X., Wang, M., Hui, Y. J., and Wang, L. (2012). Regeneration of *Clivia miniata* and assessment of clonal fidelity of plantlets. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 109, 191–200. doi: 10.1007/s11240-011-0085-6
- Wang, G., Ellendorff, U., Kemp, B., Mansfield, J. W., Forsyth, A., Mitchell, K., Bastas, K., Liu, C. M., Woods-Tör, A., and Zipfel, C. (2008). A genome-wide functional investigation into the roles of receptor-like proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 147, 503–517. doi: org/10.1104/pp.108.119487
- Ward, E. R., Uknes, S. J., Williams, S. C., Dincher, S. S., Wiederhold, D. L., Alexander, D. C., Ahl-Goy, P., Métraux, J. P., and Ryals, J. A. (1991). Coordinate

- gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3, 1085–1094.
- Wasternack, C. (2007). Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann. Bot.* 100, 681–697. doi: 10.1093/aob/mcm079
- Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G., and Ausubel, F. M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414, 562–571.
- Wilhelm, E., Hristoforoglu, K., Fluch, S., and Burg, K. (2005). Detection of microsatellite instability during somatic embryogenesis of oak (*Quercus robur* L.). *Plant Cell Rep.* 23, 790–795. doi: 10.1007/s00299-004-0891-y
- Wendt, S., Ulbrich, N., and Stahl, U. (1994). Molecular cloning, sequence analysis and expression of the gene encoding an antifungal-protein from *Aspergillus giganteus*. *Curr. Genet.* 25, 519–523.
- Yu, G., Zhang, X., Yao, J., Zhou, M., and Ma, H. (2017). Resistance against Fusarium head blight in transgenic wheat plants expressing the *ScNPR1* gene. *J. Phytopathol.* 165, 223–231. doi: 10.1111/jph.12553
- Yu, K., Soares, J. M., Mandal, M. K., Wang, C., Chanda, B., Gifford, A. N., Fowler, J. S., Navarre, D., Kachroo, A., and Kachroo, P. (2013). A feedback regulatory loop between G3P and lipid transfer proteins DIR1 and AZI1 mediates azelaic-acid-induced systemic immunity. *Cell Reports* 3, 1266–1278. doi: 10.1016/j.celrep.2013.03.030
- Yuan, Y., Zhong, S., Li, Q., Zhu, Z., Lou, Y., Wang, L., Wang, J., Wang, M., Li, Q., Yang, D., and He, Z. (2007). Functional analysis of rice *NPR1*-like genes reveals that *OsNPR1/NH1* is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. *Plant Biotechnol. J.* 5, 313–324. doi: 10.1111/j.1467-7652.2007.00243.x
- Zacchini, M., and De Agazio, M. (2004). Micropropagation of a local olive cultivar for germplasm preservation. *Biol. Plant.* 48, 589–592. doi: 10.1023/B:BIOP.0000047156.57328.27
- Zayova, E., Vassilevska-Ivanova, R., Kraptchev, B., and Stoeva, D. (2010). Somaclonal variation through indirect organogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Biol. Divers. Conserv.* 3, 1–5.
- Zhang, Y., Fan, W., Kinkema, M., Li, X., and Dong, X. (1999). Interaction of *NPR1* with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the *PR-1* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 6523–6528.
- Zhang, Y., Cheng, Y. T., Qu, N., Zhao, Q., Bi, D., and Li, X. (2006). Negative regulation of defense responses in *Arabidopsis* by two *NPR1* paralogs. *Plant J.* 48, 647–656. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02903.x
- Zhang, J., Jiao, P., Zhang, C., Tong, X., Wei, Q., and Xu, L. (2016). Apple *NPR1* homologs and their alternative splicing forms may contribute to SA and disease responses. *Tree Genet. Genomes* 12: 92 doi: 10.1007/s11295-016-1050-7
- Zhang, J. Y., Qiao, Y. S., Lu, D., Gao, Z. H., Qu, S. C., and Zhang, Z. (2012). *Malus hupehensis NPR1* induces pathogenesis-related protein gene expression in transgenic tobacco. *Plant Biol.* 14, 46–56. doi: 10.1111/j.1438-8677.2011.00483.x
- Zhang, X., Francis, M. I., Dawson, W. O., Graham, J. H., Orbović, V., Triplett, E. W., and Mou, Z. (2010). Over-expression of the *Arabidopsis NPR1* gene in citrus increases resistance to citrus canker. *Eur. J. Plant Pathol.* 128, 91–100. doi:

- 10.1007/s10658-010-9633-x
- Zheng, X. Y., Spivey, N. W., Zeng, W., Liu, P. P., Fu, Z. Q., Klessig, D. F., He, S. Y., and Dong, X. (2012). Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell Host Microbe* 11, 587–596. doi: 10.1016/j.chom.2012.04.014
- Zhu, Q. H., Ramm, K., Eamens, A. L., Dennis, E. S., and Upadhyaya, N. M. (2006). Transgene structures suggest that multiple mechanisms are involved in T-DNA integration in plants. *Plant Sci.* 171, 308–322. doi: 10.1016/j.plantsci.2006.03.019
- Zipfel, C. (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 414–420. doi: 10.1016/j.pbi.2009.06.003
- Zoeller, M., Stingl, N., Krischke, M., Fekete, A., Waller, F., Berger, S., and Mueller, M. J. (2012). Lipid profiling of the Arabidopsis hypersensitive response reveals specific lipid peroxidation and fragmentation processes: biogenesis of pimelic and azelaic acid. *Plant Physiol.* 160, 365–378. doi: 10.1104/pp.112.202846
- Zohary, D., and Spiegel-Roy, P. (1975). Beginnings of fruit growing in the old world. *Science* 187(4174), 319–327. doi: 10.1126/science.187.4174.319

VII. Anexos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

VII.1. Publicaciones



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

VII.2. Transformación de células embriogénicas de olivo con el gen *Vel* de tomate





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

VII.2.1. RESUMEN

Se ha llevado a cabo la transformación de células embriogénicas de olivo de la línea P1, obtenida a partir de radícula de una semilla del cv. Picual. Se ha utilizado la cepa AGL1 de *A. tumefaciens*, con el plásmido pMK40 portando el gen *Ve1* de tomate. Se inocularon embriones globulares, y tras varios ciclos de selección en medio sólido y empleando concentraciones crecientes de kanamicina, se obtuvieron un total de 3 líneas independientes que proliferaban en el medio de embriogénesis cíclica de olivo ECO suplementado con 150 mg/L de kanamicina. Después, se maduraron y germinaron los embriones para la obtención de brotes, los cuales están actualmente en fase de proliferación *in vitro*. Posteriormente, se enraizarán y aclimatarán varias tandas de plantas en el invernadero de confinamiento para testar su resistencia frente al patógeno fúngico *V. dahliae*. Asimismo, se llevarán a cabo los análisis moleculares para la comprobación de su naturaleza transgénica.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

VII.2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.2.2.1. Transformación de células embriogénicas de olivo con el gen *Ve1* de tomate

VII.2.2.1.1. Material vegetal y medio de cultivo

Para los experimentos de transformación se emplearon embriones globulares con un tamaño de 1-2 mm procedentes de la línea P1 de olivo, obtenida previamente a partir de la radícula de un embrión zigótico maduro de la variedad Picual (Pérez-Barranco et al., 2009). El callo embriogénico se mantuvo en el medio de embriogénesis cíclica de olivo (ECO) (Pérez-Barranco et al. 2009), en oscuridad a $25\pm 2^\circ\text{C}$, con subcultivos cada 4 semanas. Este medio contiene $\frac{1}{4}$ de los macroelementos del medio de olivo (OM) (Rugini, 1984), $\frac{1}{4}$ de los micronutrientes MS (Murashige y Skoog, 1962), $\frac{1}{2}$ de las vitaminas OM, 50 mg/L myo-inositol, 20 g/L sacarosa, 550 mg/L glutamina, 0.5 μM 2-isopentenil adenina (2iP), 0.44 μM 6-benciladenina (BA), 0.25 μM ácido indol-3-butírico (IBA), suplementado con 1 g/L caseína hidrolizada y 200 mg/L de cefotaxima, de acuerdo a Rugini y Caricato (1995). El pH se ajustó a 5.74 y como solidificante se añadió phytigel (3 g/L). Los antibióticos bactericidas utilizados, cefotaxima y timentina (250 mg/L), y el antibiótico de selección kanamicina, se esterilizaron en frío y se añadieron al medio mantenido a 45°C .

VII.2.2.1.2. Plásmido binario

El gen *Ve1* de tomate está clonado en el vector binario pMK40 que incluye para la selección del material embriogénico transformado el gen de la *neomicina fosfotransferasa II (nptII)*. La expresión de *Ve1* está controlada por el promotor constitutivo CaMV35S. El vector binario se introdujo en la cepa desarmada hipervirulenta AGL1 de *A. tumefaciens* por el método de choque térmico (Höfgen y Willmitzer, 1988).

VII.2.2.1.3. Cultivo bacteriano

El medio de cultivo bacteriano empleado fue Luria-Broth (LB), suplementado con los antibióticos de selección para la cepa y el plásmido, rifampicina (10 mg/L) y kanamicina (50 mg/L), respectivamente. Se creció una colonia en 5 ml de medio LB líquido suplementado con los antibióticos y después, se inocularon varios tubos conteniendo el mismo medio, con el cultivo bacteriano crecido, para la transformación. El cultivo líquido fue incubado durante 24h a 28°C y 250 rpm. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 4000 g durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante, se lavó suavemente el pellet con 10 mM MgSO_4 y se resuspendió en medio líquido ECO sin antibióticos a una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0.5 para la infección.

VII.2.2.1.4. Transformación genética

El protocolo llevado a cabo para la transformación fue el de Torreblanca et al. (2010). Se inocularon 519 embriones somáticos, en grupos de 60, con 10 ml de cultivo bacteriano durante 20 minutos en un agitador rotatorio de plano inclinado. Después, se secaron en papel de filtro estéril y se cultivaron en medio sólido ECO sin antibióticos, en grupos de 15 explantos por placa, durante 48h. Tras el cocultivo, se lavaron durante 2h con medio líquido ECO suplementado con timentina y cefotaxima (250 mg/L) para frenar el crecimiento de la bacteria y se cultivaron en medio sólido ECO suplementado con los 3 antibióticos, cefotaxima y timentina (250 mg/L) y kanamicina (50 mg/L). Todas las incubaciones se realizaron a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y en oscuridad.

VII.2.2.1.5. Proceso de selección

Para la selección del material transformado, los embriones somáticos inoculados se cultivaron en el medio sólido ECO conteniendo 250 mg/L de cefotaxima y timentina, y 50 mg/L de kanamicina durante el primer mes, recultivándolos individualmente en medio fresco a intervalos semanales, los dos meses siguientes cada 2 semanas y en sucesivos subcultivos cada 4 semanas. El material transformado se identificó empleando una estrategia de selección progresiva; así, al inicio se usó una baja concentración del antibiótico kanamicina, incrementándola gradualmente hasta la finalización del proceso a las 24 semanas. Los controles no transformados se trataron de la misma forma que el material inoculado. El rango de concentraciones de antibiótico de selección empleado fue 50-150 mg/L. Todas las incubaciones se realizaron a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y en oscuridad.

VII.2.2.1.6. Maduración de embriones somáticos

Los embriones globulares de 1-3 mm de diámetro de las 3 líneas seleccionadas y del control no transgénico P1, se maduraron siguiendo el protocolo de Cerezo et al. (2011a), cultivándose durante 1 mes en el medio de maduración ECO sin reguladores de crecimiento suplementado con 1 g/L de carbón activo y después, 4 semanas adicionales en el mismo medio con membrana semi-permeable de acetato de celulosa, con un tamaño aproximado de 4 x 4 cm (Sigma D9777), para la obtención de embriones maduros blanco-opacos. El proceso se llevó a cabo a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y en oscuridad.

VII.2.2.1.7. Germinación de embriones

Los embriones maduros blanco-opacos se cultivaron en el medio basal MS modificado con 1/3 de los macroelementos y 10 g/L de sacarosa (Clavero-Ramírez y Pliego-Alfaro, 1990) durante 12 semanas, a una irradiancia de $40 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, de acuerdo a Cerezo et al. (2011a). Se aislaron los brotes obtenidos de cada embrión y se micropropagaron siguiendo el protocolo de Vidoy-Mercado et al. (2012). La

germinación y posterior multiplicación de brotes se realizó a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e irradiancia de $40\ \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

VII.2.3. RESULTADOS

VII.2.3.1. Transformación genética y regeneración de plantas

VII.2.3.1.1. Selección de las líneas embriogénicas transformadas

En el experimento de transformación de embriones somáticos de la línea P1 llevado a cabo con la cepa AGL1 de *A. tumefaciens*, portando el plásmido pro35S:Ve1, la eficiencia de transformación fue del 0.58% (Tabla 1).

La selección del material embriogénico inoculado se realizó empleando concentraciones crecientes de kanamicina (Figura 1). Después de 24 semanas de cultivo, 3 líneas putativamente transgénicas proliferaban en el medio de selección sólido ECO suplementado con 150 mg/L del antibiótico de selección, mientras que el material no inoculado mostraba un aspecto necrosado en el mismo medio.

Tabla 1. Eficiencia de transformación de la línea embriogénica de olivo P1 con la cepa de *A. tumefaciens* AGL1 portando el plásmido binario pro35S:Ve1. Datos tomados a las 24 semanas tras el proceso de selección en medio sólido con kanamicina.

Plásmido binario	Cepa	Nº embriones globulares inoculados	Nº líneas transgénicas seleccionadas	Tasa de transformación (%)
pro35S:Ve1	AGL1	519	3	0.58

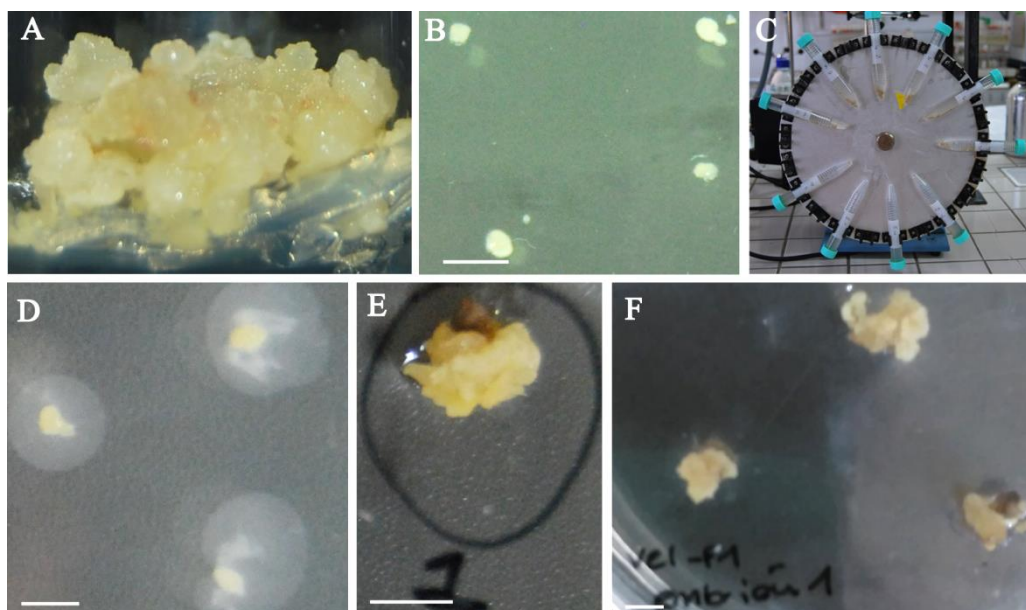


Figura 1. Transformación mediante *A. tumefaciens* y obtención de líneas embriónicas transformadas con el gen *Ve1* de tomate. A) Aspecto del callo P1 en el medio de mantenimiento de callo embriónico de olivo ECO. B) Embriones globulares utilizados en la transformación. C) Inoculación de los embriones somáticos con el cultivo bacteriano en un rotor. D) Embriones globulares tras 48h de cocultivo con la bacteria. E) Callo embriónico formado a partir del embrión 1, proliferando en el medio de selección conteniendo 50 mg/L de Kanamicina, tras 16 semanas. F) Aspecto del callo embriónico procedente del embrión 1, cultivado en el medio de selección ECO suplementado con 150 mg/L de kanamicina tras 6 meses. Barra: 5 mm.

VII.2.3.1.2. Maduración y germinación de embriones somáticos

Los porcentajes de maduración fueron 17.86%, 45.45% y 70%, para las líneas procedentes de los embriones 1, 2 y 5, respectivamente, mientras que para el control no transformado fue del 25% (Figura 2).

Los porcentajes de germinación oscilaron entre 14.3% (E5) y 22.2% (E2), mientras que del control germinaron un 20% de los embriones. Los brotes se aislarán y cultivarán en medio RP suplementado con 2 mg/L de ribósido de zeatina para el establecimiento de un stock de plantas *in vitro* de cada una de las líneas putativamente transformadas y se llevará a cabo la extracción de ADN genómico de cada una de ellas para comprobar su naturaleza transgénica mediante PCR.



Figura 2. A) Aspecto de los embriones somáticos blanco-opacos en el medio de maduración ECO sobre membrana semipermeable de acetato de celulosa, tras 4 semanas. B) Aspecto de un embrión maduro cultivado en el medio de germinación. C) Brote obtenido a partir un embrión maduro en medio de germinación. Barra: 5 mm.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA