

MARCADORES MOLECULARES QUE SE EXPRESAN EN EL FRUTO DEL OLIVO (CAO99-003)

María Isabel Rodríguez-García, Juan de Dios Alché, AbdelMounim Hamman-Khalifa, Rafal Butowt,
José Carlos Jiménez-López, Wei Wang, Antonio Jesús Castro

Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas.
Estación Experimental del Zaidín (CSIC). Granada

RESUMEN

Con objeto de establecer nuevos marcadores moleculares en el olivo con función determinada, se han aislado y caracterizado varios genes que se expresan durante la maduración del fruto del olivo, y se ha realizado un análisis temporal y espacial de la expresión de estos genes. Entre otros, se han analizado los siguientes marcadores: la Δ^9 -estearoyl-ACP- desaturasa, enzima clave en la biosíntesis de ácidos grasos; un posible translocador plastídico de glucosa (pGlcT), que se expresa en tejidos no fotosintéticos como es el fruto maduro del olivo; y finalmente, también se han identificado y caracterizado poliubiquitina y culina, componentes del sistema de degradación proteica mediado por ubiquitina. Paralelamente, se han preparado extractos crudos a partir de semillas de olivo con objeto de analizar sus perfiles proteicos mediante SDS-PAGE,. Los componentes mayoritarios de estos extractos corresponden a una familia de proteínas de almacenamiento tipo 11S. Después de obtener un suero específico para este tipo de proteínas, se hizo un seguimiento espacial y temporal de las mismas durante el desarrollo y germinación de las semillas. Por último, también se ha llevado a cabo la purificación de oleosinas a partir de semillas. El significado biológico atribuido a cada uno de estos marcadores, hace preveer que en un futuro puedan ser utilizados en programas de mejora del olivo. Pero antes se requiere una mayor información y profundizar en el conocimiento de estos genes y su expresión, por lo que es necesario continuar las investigaciones a nivel básico en el olivo.

Palabras clave: olivo, fruto, maduración, semilla, desarrollo, marcadores moleculares, biosíntesis de ácidos grasos, transportador de glucosa, ubiquitina, oleosinas, proteínas de reserva.

SUMMARY

With the aim of setting new molecular markers of certain function in the olive, several genes expressed during olive fruit ripening have been isolated and characterized, also analyzing temporal an spatial expression of such genes. Among other, the following marker genes have been analyzed: Δ^9 - stearoyl-ACP-desaturase, a key enzyme for fatty acid biosynthesis; a putative plastidic glucose translocator (pGlcT) expressed in non-photosynthetic tissues like the mature olive fruit; and finally, polyubiquitin and cullin, components of the ubiquitin-mediated protein degradation system. In a parallel way, protein extracts have been isolated from olive reach, in order to analyze their protein profiles by SDS-PAGE. The major protein component of such extracts corresponds to a family of storage proteins of the 11S-type. After raising a rabbit antiserum to these proteins, a spatial and temporal analysis of them was performed during seed development and germination. Finally, oleosin purification from olive seeds has been accomplished. The biological meaning attributed to each of these markers, forecast their future usage in olive improvement programmes. However, more information particularly concerning the knowledge of these genes and their expression is needed, and therefore, basic research on olive should be carried through.

Key words: olive, fruit, ripening, maturation, seed, development, molecular markers, fatty acid biosynthesis, glucose transporter, oleosins, storage proteins.

INTRODUCCIÓN

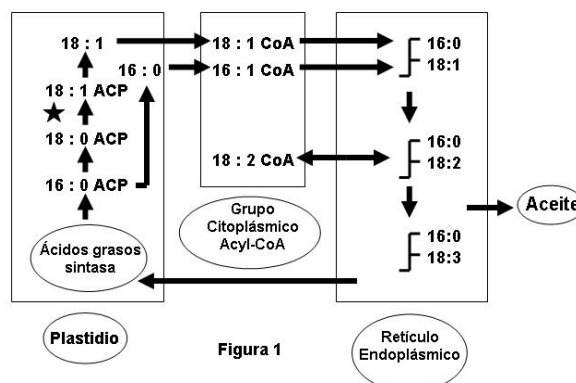
Debido a la larga fase juvenil del olivo, los programas clásicos de mejora vegetal en este cultivo son escasos y con resultados poco rentables. En lugar de hacer un esquema de selección de cultivares hoy en día se están aplicando técnicas más rápidas de selección genética e identificación varietal. Los caracteres morfológicos y fenotípicos han sido tradicionalmente utilizados en la identificación y diferenciación de cultivares de olivo (Barranco y Rallo 1984; Tous y Romero 1993; Cimato et al. 1993). Para la discriminación entre variedades cultivadas también han sido utilizadas las características pomológicas de las aceitunas (peso medio del fruto, relación pulpa/hueso y rendimiento graso del fruto) y las propiedades fisicoquímicas de los aceites extraídos (composición en ácidos grasos y polifenoles) (Fourati et al. 2003; El Antariet et al. 2003). Sin embargo, esto sólo no es suficiente, ya que la influencia de factores medioambientales limita su fiabilidad (Hamrick et al. 1992). La industria del olivo demanda cultivares bien caracterizados, con características agronómicas de calidad. Hoy día, se están adoptando nuevos procedimientos básicamente moleculares y bioquímicos para la identificación y la discriminación de variedades de olivo, aprovechando la ventaja que ofrece el polimorfismo existente en varios sistemas enzimáticos. La aplicación de marcadores moleculares para relacionar, identificar y distinguir diferentes cultivares o fenotipos del olivo se está llevando a cabo con éxito. Además los marcadores moleculares son prácticamente infinitos y permiten obtener en algunos casos información acerca del origen y diversidad del olivo, así como evaluar su germoplasma e identificar aquellos caracteres de interés agronómico. En apenas una década es notable el número de genes de olivo que han sido identificados y registrados en la base de datos GenBank, alcanzándose el número de 275 registros. Aunque algunas de estas secuencias corresponden a DNA altamente repetitivo, secuencias microsatélite, o marcadores de tipo RAPD o AFLP, sin significado biológico. Fue hace 10 años cuando se secuenció el primer gen de olivo, correspondiente a la proteína alergénica Ole e 1 (Villalba et al. 1994). En el año 2000 el número de secuencias era de 33, y en los últimos 4 años se ha incrementado en 240 secuencias más. De estas secuencias nuestro grupo ha contribuido con un número de 35, como resultado del aislamiento, caracterización y análisis de la expresión de genes implicados en diversos procesos biológicos en olivo.

En este trabajo se exponen los resultados obtenidos del clonaje y caracterización de ciertos genes que se expresan en el fruto del olivo. También se han aislado, caracterizado y localizado proteínas de reserva que se encuentran en las semillas de olivo en cantidades elevadas.

EXPRESIÓN DE STEAROYL-ACYL CARRIER PROTEIN-(ACP)-DESATURASA, Y SU INFLUENCIA EN LA CALIDAD DEL ACEITE DE OLIVA

El aceite de las plantas superiores contiene varias clases de ácidos grasos. Estos últimos determinan el valor de los aceites que pueden ser utilizados en la nutrición humana o como fuentes para la industria química (Murphy, 1994; Ohlrogge, 1994). Las rutas biosintéticas que conducen a la formación de ácidos grasos empiezan a ser bien conocidas (Sánchez et al. 2002), aunque se necesita progresar en el conocimiento de su regulación. En este sentido, consideramos importante determinar el papel de la expresión genética de una familia de enzimas relacionada con la primera etapa de la desaturación en la ruta de biosíntesis de ácidos grasos, denominada Acyl carrier protein desaturasas (Cahoon et al. 1997). Uno de los miembros más interesantes dentro de dicha familia es la Stearoyl-ACP desaturasa comúnmente conocida por Δ^9 desaturasa. Esta proteína cataliza la desaturación del ácido esteárico produciendo ácido oleico monoinsaturado (18:1) mediante la introducción de un doble enlace *cis* en la posición 9/10 de la cadena C-18 del ácido esteárico (Shanklin y Somerville, 1991; Thompson et al. 1991):

Figura 1. Ruta de biosíntesis de ácidos grasos en plantas. La primera etapa en la desaturación de los ácidos grasos en plantas es catalizada por el enzima Stearoyl-Acyl Carrier Protein (ACP) desaturasa (indicada por estrella). Modificado de Merlo et al (1998).



En nuestro estudio, se ha podido establecer una relación directa entre la expresión de la Δ^9 desaturasa y los niveles de su producto (ácido oleico), mediante la determinación del porcentaje de este último en aceites de oliva procedentes de siete variedades de olivo *Olea europaea* y el análisis en fruto maduro de las mismas variedades de la expresión de Δ^9 desaturasa mediante técnicas de RT-PCR y Northern blot. Este trabajo se engloba entre los estudios que tienen como objetivo la búsqueda de nuevos factores genéticos que influyen en la calidad del aceite de oliva.

▪ **Métodos utilizados**

Se analizó la composición de ácidos grasos de aceites monovarietales clase extra-virgen extraídos a partir de fruto maduro de siete variedades: dos marroquíes (Picholine marocaine y Menara) y cinco de origen español (Lucio, Picual, Loaime, Hojiblanca y Arbequina). El análisis de ácidos grasos de las muestras se realizó en un cromatógrafo de gases HP 5890 Serie 2, según el método de determinación de ésteres metílicos de los ácidos grasos y sus isómeros *trans*.

Se extrajo RNA total a partir de fruto maduro en las variedades estudiadas. La transcripción inversa fue realizada a partir de 2 μ g de RNA total utilizando una Transcriptasa Reversa M-MLV (Promega) y un adaptador 5'-GACTCGAGTCGAACATCGA(T)17-3'. La fusión del adaptador T necesitó 10min a 70 °C en un termociclador. Después, se añadieron los siguientes componentes: (1mM dNTPs, 1x RT M-MLV buffer, 200 U RT M-MLV). La incubación de la reacción se realizó a 42°C durante una hora. Para las amplificaciones mediante PCR se utilizaron 100 ng de RNA transcrito de forma inversa (cDNA) con la adición de los componentes específicos de la mezcla de reacción: Ecotaq buffer 1x, 0.1 mM dNTPs, 100 ng de cada oligonucleótido, y 2.5 U Ecotaq DNA polimerasa (C.Viral). Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados en base a la secuencia de Δ^9 desaturasa de fruto de olivo que existe en la base de datos (Genbank U58141): se utilizó: 5'AT

GTCCAACCCGTCCAGAAAG3' como sense y 5'CCCATTCCTTAGCACCAGAA3' como antisense. La reacción de PCR necesitó 35 ciclos de 94 °C (1min), 58 °C (1 min) y 72 °C (1min).

De cada variedad estudiada fueron separados 15 μ g de RNA total de fruto maduro mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (formaldehído) en un gel de agarosa al 1%. Después de la electroforesis, se realizó la transferencia del gel a una membrana de nylon (Biodyne, PALL) mediante capilaridad. La membrana fue horneada a 80 °C durante 2 horas y luego probada con una sonda de Δ^9 desaturasa marcada con digoxigenina preparada mediante RT-PCR y diluida en un tampón de hibridación (7% SDS, 50% formamida, 5X SSC, 2% Blocking Reagent –Boehringer-, 50 mM fosfato monosódico, pH.7, 0.1% N-lauroylsarcosina). La concentración de la sonda en dicho tampón fue de 20 ng/ml. La hibridación se realizó a 50°C durante 16 horas. Después de dos etapas de lavado con un tampón 2x SSC + 0.1% SDS y un tampón 0.1x SSC + 0.1% SDS respectivamente, la membrana fue bloqueada con una solución 1% de blocking Reagent -Boehringer- preparado en un tampón maleico (150 mM NaCl, 100mM ácido maleico, pH 7.5) durante una hora y luego incubada con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (Boehringer) diluido 1:10.000 en la misma solución de bloqueo durante 30 min. Después de una etapa de lavado con tampón maleico, la membrana se incubó con un substrato quimioluminiscente (CDP-Star –Boehringer-) diluido 1:100 en tampón de detección (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂). Finalmente, la reacción quimioluminiscente se reveló utilizando una película de autoradiografía.

▪ **Composición del aceite de oliva de las variedades de estudio**

La tabla 1 muestra las proporciones de los ácidos grasos analizados en el aceite de las variedades estudiadas.

Tabla 1. Porcentajes determinados para diferentes ácidos grasos analizados en el aceite de oliva de las siete variedades estudiadas. C16:0 Palmítico, C16:1 Palmítoleico, C18:0 Estearico, C18:1 Oleico, C18:2 Linoleico, C18:3 Linolénico, C20:0 Aráquico.

Variedad	C16	C16'	C18	C18'	C18''	C18'''	C20
Picholine	10.2	0.5	2.9	71.3	13	0.98	0.34
Menara	9.9	0.7	2.9	71.0	12.9	0.96	0.26
Lucio	11.32	1.46	3.11	67.58	7.56	1.79	0.41
Picual	11.51	1.24	2.80	78.93	3.87	1.16	0.38
Loaime	13.51	1.50	2.65	76.30	4.23	0.82	0.39
Hojiblanca	11.72	0.99	3.05	69.04	12.76	1.68	0.31
Arbequina	14.8	1.4	1.9	70.0	10.1	0.58	0.34

Los ácidos grasos más abundantes corresponden a oleico, linoleico y palmítico. También se aprecia la existencia de niveles débiles pero significativos de esteárico, palmitoleico, linolénico y aráquico. Se observan variaciones significativas respecto a los porcentajes de la mayoría de los ácidos grasos analizados entre las siete variedades de estudio. Por ejemplo, el nivel del oleico es más alto en las variedades Picual (78.93%) y Loaime (76.30%) que en el resto (Picholine marocaine -71.3%-, Menara -71.0%-, Lucio -67.58%-, Hojiblanca -69.04%- y Arbequina -70.0%-), mientras que el nivel de linoleico es menor en las dos variedades Picual y Lucio en comparación con el resto de las variedades estudiadas.

▪ Análisis de la expresión de Δ^9 desaturasa en fruto maduro de las variedades de estudio

Los transcritos correspondientes a Δ^9 desaturasa fueron analizados mediante RT-PCR en fruto maduro de las siete variedades de estudio. Un producto amplificado de 400 pb que corresponde al tamaño esperado, ha sido detectado después de la amplificación. Dicho producto fue secuenciado y analizado mediante un Standard nucleotide-nucleotide Blast (blastn), mostrando una similitud de 98% en comparación con la secuencia Δ^9 desaturasa de fruto de olivo que existe en la base de datos (U58141) (resultados no mostrados). El gel mostrado a continuación muestra que dichos niveles son máximos en las dos variedades Picual y Loaime en comparación a los del resto variedades (Picholine marocaine, Menara, Lucio, Hojiblanca y Arbequina).

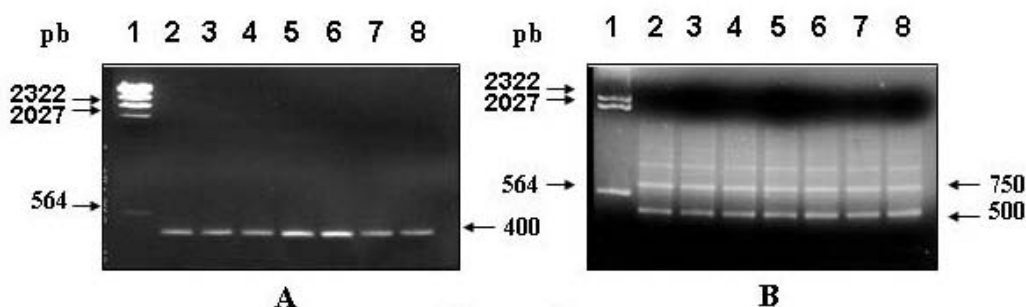


Figura 2. (A) Análisis en gel de agarosa al 1.5% en TBE de los niveles de transcritos correspondientes a Stearoyl-Acyl Carrier Protein (ACP) desaturasa en fruto maduro de las variedades de estudio: Calle 1: λ /Hind III, calle 2: Picholine marocaine, calle 3: Menara, calle 4: Lucio, calle 5: Picual, calle 6: Loaime, calle 7: Hojiblanca, calle 8: Arbequina. (B) Amplificación de transcritos de ubiquitina desde la forma monomérica hasta la forma pentamérica como control para ratificar la equivalencia de la cantidad de cDNA utilizada para cada muestra.

Para ratificar la equivalencia de la cantidad de cDNA utilizada para cada muestra amplificada, se analizaron los niveles de transcritos de ubiquitina amplificados mediante RT-PCR desde la forma monomérica hasta la forma pentamérica (Alché et al., 1999). Los niveles de dichos transcritos son similares en todas las variedades examinadas (Figura B). El patrón conseguido después del análisis de Δ^9 desaturasa mediante RT-PCR fue confirmado mediante un ensayo de Northern blot no radioactivo (siguiente figura, panel A). En este caso, se utilizó una tinción de los RNAs ribosómicos 18S y 28S con bromuro de etidio como control (panel B). El nivel de expresión para cada variedad fue cuantificado mediante el uso de un software -Quantity One- (panel 3C).

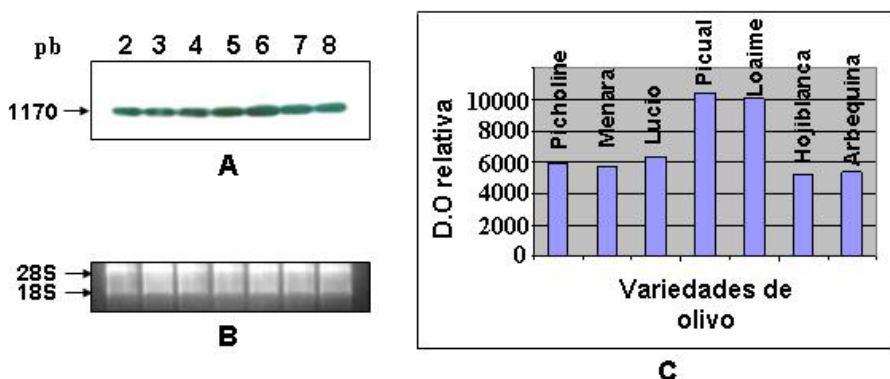


Figura 3. (A) Análisis mediante Northern blot no radioactivo de la expresión de Stearoyl-ACP desaturasa en fruto maduro de las variedades de estudio. 15 (g de RNA total han sido cargadas en cada calle. (B) Cuantificación de los niveles de transcritos mostrados en el gel A) (C) La tinción con bromuro de etidio de los RNA 18S y 28S sirve como control de la equivalencia de la cantidad de RNA total para cada muestra.

▪ Conclusiones

Nuestros resultados confirman que el nivel del ácido oleico, un parámetro muy importante en la definición de la calidad del aceite de oliva, presenta importantes variaciones en su porcentaje entre las variedades estudiadas. Los resultados obtenidos muestran además que existe una marcada correlación entre dicho porcentaje y la expresión en el fruto de olivo de un miembro de la familia de Acyl carrier protein (ACP) desaturasas (Stearoyl-ACP desaturasa). Las variedades de olivo (*Olea europaea* L.) donde la expresión de Stearoyl-ACP desaturasa es mayor, contienen igualmente en su aceite un nivel muy alto en ácido oleico. Este trabajo puede extenderse al estudio de otras enzimas relacionadas con la ruta de biosíntesis de ácidos grasos en el fruto de olivo y a otras variedades. Este tipo de marcadores podrían ser utilizados en el fruto como indicadores potenciales de la calidad del aceite obtenible.

EXPRESIÓN DE UN POSIBLE TRANSLOCADOR PLASTÍDICO DE GLUCOSA (pGlcT) EN EL FRUTO DE OLIVO

En la membrana interna de la cubierta plastidial se localizan transportadores específicos de metabolitos que facilitan su transporte entre los plastidios y otros compartimentos de la célula. Después de la degradación amilolítica del almidón que tiene lugar durante la noche en el mesófilo de hojas, se produce glucosa que es transportada desde el estroma de los cloroplastos hacia el citosol gracias a un translocador plastidial de glucosa (pGlcT) (Weber et al. 2000).

Nuestro grupo ha clonado un transportador pGlcT que se expresa en el fruto del olivo (*Olea europea* L.) (Nº de acceso al Gen Bank AY036055). Los resultados muestran una elevada expresión de pGlcT en tejidos heterotróficos del fruto. La expresión de pGlcT en el fruto fue mayor en comparación con las hojas y esta expresión continua hasta el estadio en que el fruto alcanza el color púrpura, hacia el final de la maduración (Fig.4)

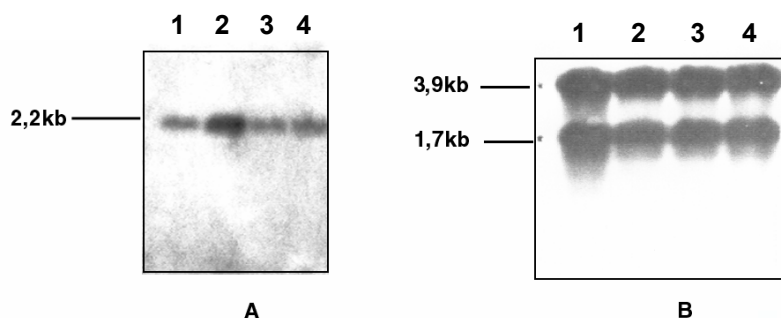


Figura 4. Analisis por Northern blot . (A) Nivel de expresión pGlcT durante la maduración del fruto de olivo. 1- fruto joven; 2-fruto verde antes del cambio de color; 3-fruto en cambio de color; 4-fruto maduro púrpura. (B) membranas de RNA teñidas con azul de metileno indicando que la cantidad total de RNA cargada en todas las calles es aproximadamente igual.

Mediante microscopía electrónica de transmisión, los estudios ultraestructurales de los cambios que tienen lugar en los plastidios durante la maduración del fruto, revelan una transición de los cloroplastos hacia plastos sin almidón y pocos tilacoides, hasta llegar a presentar una estructura típica de cromoplastos en el fruto de color negro.

▪ Conclusiones

Nuestros estudios en el olivo, documentan por primera vez la expresión de un posible pGlcT en el fruto durante la maduración. Todos estos resultados sugieren que el pGlcT del olivo es abundante en los cromoplastos y se aportan evidencias de que el pGlcT puede tener un papel fisiológico importante en la maduración del fruto diferente al que se le atribuye en los órganos fotosintéticos (Butowt et al. 2003)

POLYUBIQUITINA Y CULINA COMPONENTES DEPENDIENTES DEL SISTEMA DE PROTEOLISIS

El crecimiento y maduración del fruto es uno de los procesos de desarrollo de plantas mejor caracterizado a nivel molecular y bioquímico (Gyllaspy et al. 1993). La degradación de proteínas mediante el sistema dependiente de ubiquitina tiene un importante significado biológico para muchos procesos de desarrollo en plantas (ver reviews Calis and Vierstra, 2000; Bachmair et al, 2001). Sin embargo, no se conoce si el sistema de proteolisis dependiente de ubiquitina juega un papel regulatorio durante la maduración del fruto. Ubiquitin (ubi) es una de las proteínas más altamente conservadas en eucarióticas y siempre tiene 76 aminoácidos. El polipéptido de ubiquitina puede encontrarse como un monómero libre o bien unido covalentemente a varias proteínas.

Durante la maduración del fruto de olivo (*Olea europea*) se aislaron clones de cDNA que codifican para polyubiquitina y la proteína culina. Los genes de poliubiquitina OUB1 and OUB2 codifican 4 y 6 monómeros de ubiquitina respectivamente, con una secuencia aminoacídica idéntica y sin ninguna homología fuera de las regiones codificantes. La expresión de ambos genes de poliubiquitina es intensa durante la maduración del fruto. El gen OUB1 es específico del fruto, mientras que la expresión de OUB2 es también abundante en otros tejidos vegetativos (Fig.5).

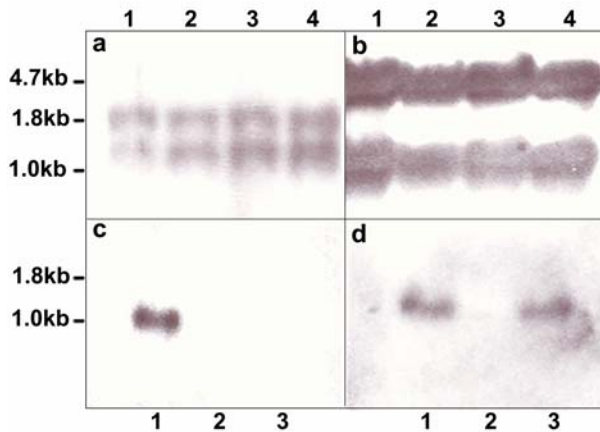


Figura 5. Análisis de la expresión de los genes OUB1 y OUB2 poliubiquitina mediante Northern blot durante la maduración del fruto (a, b) y en diferentes tejidos de olivo (c, d). (a,b): 1- fruto joven; 2-fruto verde antes del cambio de color; 3-fruto en cambio de color; 4-fruto maduro purpura; (c,d) 1-fruto maduro; 2-grano de polen maduro; 3-hojas adultas. (a) membrana hibridada con la sonda DNA-DIG específica para codificar regiones de ubiquitina. (b) representa RNA total de diferentes estadios del fruto teñidos con azul de metileno. La expresión de los genes de poliubiquitina incrementa moderadamente durante la maduración. La banda superior (1.7-1.8 kb) representa el gen OUB2 y la banda inferior (1.3-1.4 kb) representa el gen OUB1. (c) la membrana fue testada con la sonda específica de OUB1 y (d) con la sonda específica para OUB2. OUB1 se expresa fuertemente en fruto pero no en el polen maduro. En OUB2 se expresa de manera similar en fruto y hoja.

Cambios en la expresión de estos genes (mRNA) también se correlacionan con los cambios que tienen lugar a nivel de ubiquitina y de proteínas ubiquitinadas, como se indican en los blots (Fig.6).

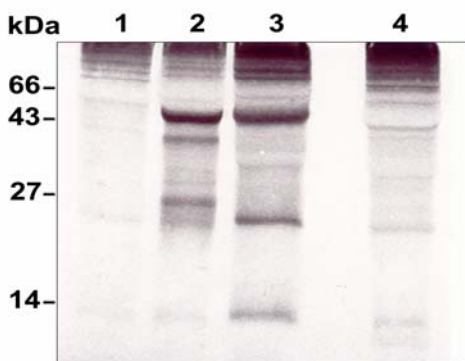


Figura 6. Inmunoblot de ubiquitina y proteínas ubiquitinadas durante diferentes estadios de maduración del fruto y hojas de olivo, usando un anticuerpo policlonal anti-ubiquitina. 1 fruto verde joven; 2 fruto en cambio de color; 3 fruto maduro; 4 hojas. Cuando se comparan estadios de frutos jóvenes y frutos maduros se observa un incremento de ubiquitina (banda de unos 10kDa) y diferentes proteínas ubiquitinadas.

Mediante la técnica de hibridación *in situ* se localizaron los transcritos de OUB1, mostrando un diferente nivel de expresión en células adyacentes del mesocarpo de frutos jóvenes (Fig.7). La culina, una proteína reguladora del sistema proteolítico dependiente de ubiquitina, está también regulada desde el inicio de la maduración.

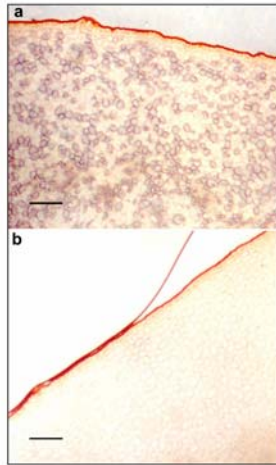


Figura 7 Hibridación in situ del gen OUB1 en secciones de parafina de tejido de fruto verde joven.
 (a) Reacción con la sonda DNA antisen marcada con DIG. Se observa un intenso marcado en algunas células del mesocarpo, mientras otras células adyacentes se marcan solo débilmente. (b) Control: no se observa marcado con la sonda DNA sense

▪ Conclusiones

Estos resultados sugieren que la ubiquitinación de proteínas está implicada en la regulación o mantenimiento de al menos algunos de los elementos del proceso de maduración del fruto.

ACUMULACIÓN DE PROTEÍNAS DE RESERVA DE TIPO 11-S DURANTE LA MADURACIÓN DEL FRUTO DEL OLIVO

Uno de los posibles marcadores moleculares seleccionados como posible herramienta de selección en los programas de mejora genética del olivo lo constituyen las proteínas de almacenamiento. Las proteínas de almacenamiento se sintetizan en las semillas en desarrollo [Herman y Larkins 1999,]. Entre los diversos tipos de estas proteínas figuran las proteínas de tipo 11-S como una de las familias más prominentes. Estas proteínas se almacenan como grandes complejos (estructuras hexaméricas) en cuerpos proteicos. Cada una de las subunidades del hexámero está a su vez compuesta por un polipéptido ácido y un polipéptido básico, derivados de un único precursor, y unidos por un puente disulfuro [Higgins 1984, Wang et al 2001]. La capacidad de las proteínas 11S de ser separadas en dos subunidades unidas por puentes disulfuro, a través de endoproteinasas es una característica conservada evolutivamente en coníferas, monocotiledóneas y dicotiledóneas (Hayashi et al 1988). La presencia de cuerpos proteicos tanto el embrión como el endospermo de la semilla madura del olivo había sido previamente descrita (Ross et al. 1993). Sin embargo, se conoce muy poco sobre las características bioquímicas y moleculares de las proteínas de almacenamiento en esta planta. Un trabajo realizado en nuestro grupo ha confirmado mediante SDS-PAGE y secuenciación amino-terminal que las proteínas tipo 11S en el olivo aparecen como dos precursores de 41 kDa y 47.5 kDa, unidos por puentes de hidrógeno *in vivo* (Wang et al. 2001).

A lo largo de este proyecto, hemos conseguido la purificación de los componentes individuales, y la determinación de las características de solubilidad de las proteínas 11S del olivo. Igualmente hemos analizado mediante inmunoblotting la síntesis y acumulación temporal de las proteínas de almacenamiento 11S utilizando un anticuerpo desarrollado frente al polipéptido de 20 kDa a lo largo de la maduración de la semilla. Mediante inmunocitoquímicas se han localizado estas proteínas durante el desarrollo y germinación de la semilla. Previamente se ha realizado estudios a nivel de microscopía óptica y electrónica con objeto de conocer la organización histológica y las características de los diferentes tipos de células en la semilla del olivo

▪ Purificación de los componentes individuales de las proteínas 11S

Los patrones proteicos obtenidos en endospermo y embriones fueron muy similares, por lo que se muestran resultados de semillas completas. En la figura 8 se muestra la purificación de los componentes individuales, mientras que la figura

9 muestra un diagrama esquemático de las distintas subunidades de proteínas 11S presentes en semillas maduras de olivo.

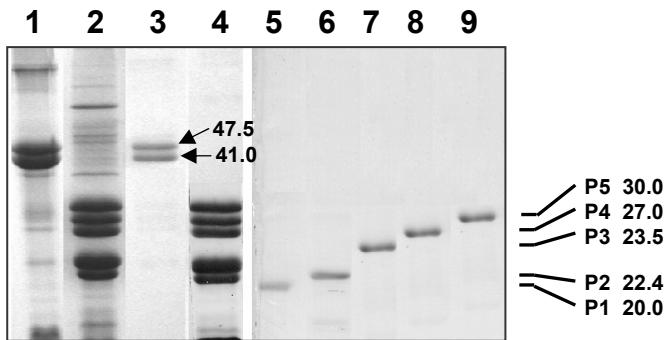
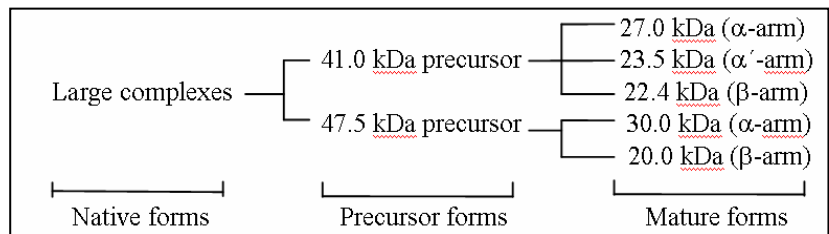


Figura 8: SDS-PAGE teñido con Azul Coomassie mostrando la purificación de P1-P5. Calle 1: extracto proteico crudo en condiciones no reductoras. Calle 2: extracto proteico crudo en condiciones reductoras. Calle 3: precursores no reducidos (41 and 47.5 kD) de las proteínas 11S. Calle 4: formas reducidas, maduras de las proteínas 11S. Calles 5 a 9: componentes individuales purificados de las proteínas 11S, denominados P1-P5 respectivamente.

Figura 9: esquema representativo de las distintas formas de proteínas 11S en la semilla de olivo.



▪ Secuenciación amino-terminal de los componentes 20 kDa y 22 kDa.

La secuenciación N-terminal de los polipéptidos 20 kDa (P1) y 22.4 kDa (P2) produjo las secuencias GLEETLLTLRLLEN y GLEESLCTNKIR, respectivamente. La búsqueda de homología en la base de datos SWALL usando el programa FASTA 33 (Pearson y Lipman 1988) reveló una elevada similitud con proteínas de la familia de proteínas de almacenamiento 11S (Wang et al. 2001)

▪ Características de solubilidad de las proteínas 11S

Las figura 10 muestra la solubilidad de las proteínas de tipo 11S en semillas maduras de olivo tras la extracción secuencial (panel A) o individualmente (panel B) en distintos medios de extracción y tras condiciones reductoras de electroforesis.

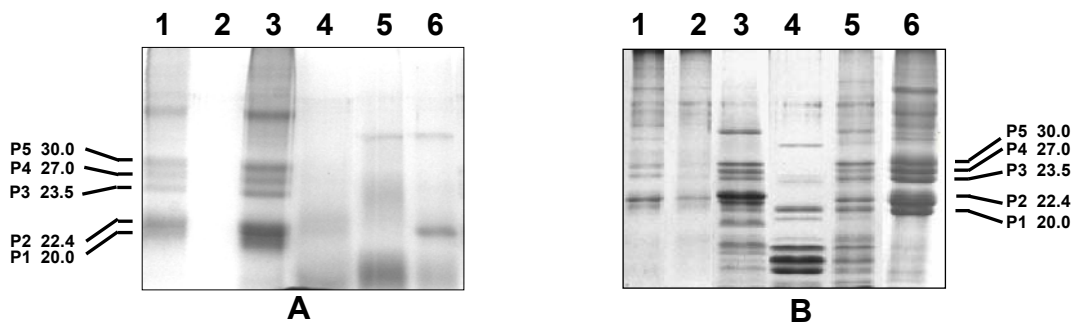


Figura 10: geles SDS-PAGE teñidos con azul Coomassie, mostrando la solubilidad de las proteínas 11S en semillas maduras de olivo tras extracción secuencial (panel A) o respectivamente (panel B) en distintos medios de extracción y tras condiciones reductoras de electroforesis. Calle 1: agua destilada. Calle 2: 0.5 M sodium chloride. Calle 3: 70% 2-propanol. Calle 4: 60% acetic acid. Calle 5: 0.1 M sodium hydroxide. Calle 6: 0.1 M sodium borate plus 1% SDS.

- Determinación de la selectividad de un anticuerpo policlonal frente a P1

Tras la inoculación de varios conejos con el polipéptido purificado P1, se procedió a la extracción del suero y la determinación de la selectividad de éste, como muestra la figura 11.

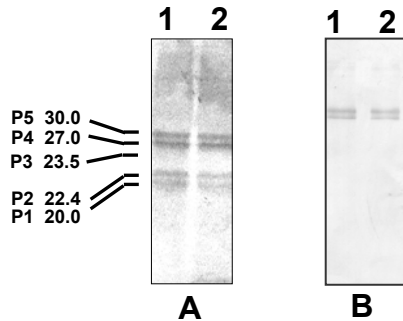


Figura 11 Inmunoblots correspondientes a geles SDS-PAGE de extractos crudos de semillas (calles 1) y a los polipéptidos P1-P5 purificados (calle 2) tras electroforesis en condiciones reductoras (panel A) y no reductoras (panel B) tras ser probado con el antisero desarrollado frente a P1. El suero policlonal reconoce al antígeno P1, P2, P4 y P5 en extractos crudos o sus formas purificadas, así como a las proteínas no reducidas. También hay una débil reactividad cruzada con P3. El suero pre-immune no reacciona con ningún polipéptido de los extractos (no mostrado):

- Inmunolocalización de las proteínas de almacenamiento de semillas tipo 11S en los tejidos de la semilla madura del olivo

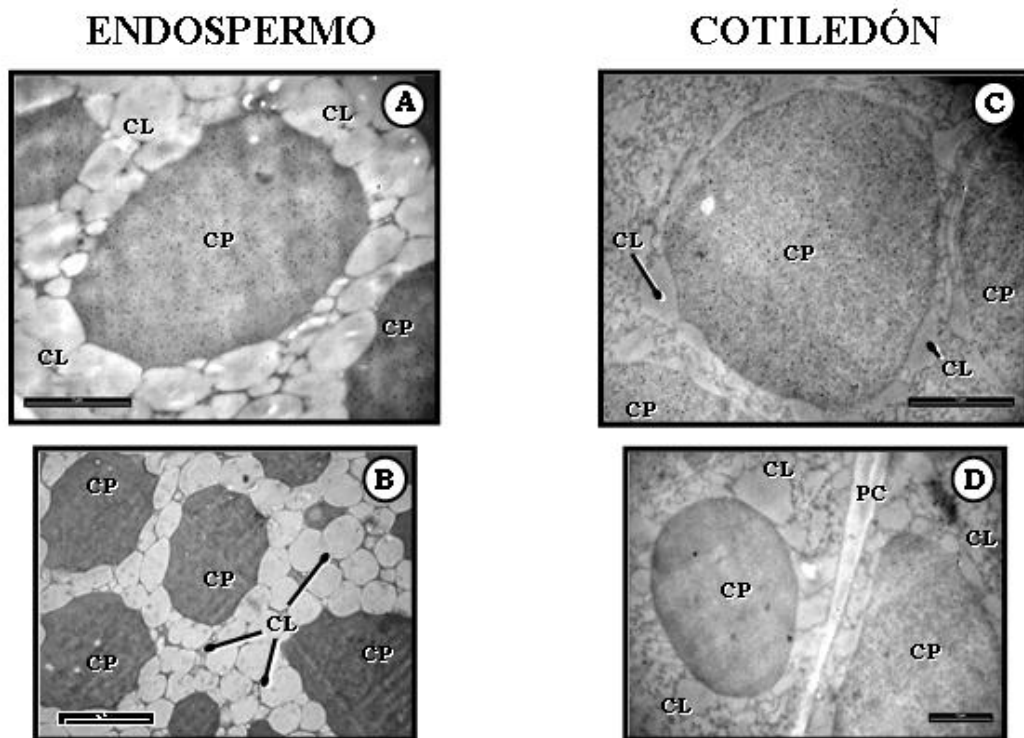


Figura 12. inmunolocalizaciones a microscopía electrónica de transmisión (M.E.T.) de proteínas de almacenamiento 11 S en endospermo y cotiledón de semillas de olivo. A, Inmunolocalización a MET en endospermo (A) y cotiledón (B). Se observa que las partículas de oro se localizan en los cuerpos proteicos casi exclusivamente. Control negativo de endospermo (C) y cotiledón (D) (omisión de anticuerpo primario) no muestra marcado ninguno en los cuerpos proteicos. PC: pared celular; CP: cuerpos proteicos; CL: cuerpos lipídicos.

▪ Comparación preliminar de los perfiles proteicos y familia 11S en semillas de distintas variedades de olivo

La comparación de los perfiles proteicos (panel A) y de la reactividad al antisero P1 en inmunoblots de los extractos proteicos (panel B) obtenidos de semillas de distintas variedades se muestra en la siguiente figura (13). No se aprecian diferencias significativas.

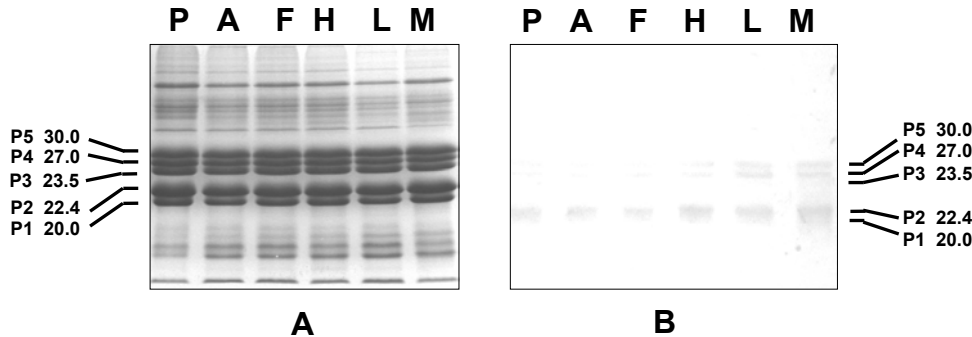


Figura 13: SDS-PAGE de extractos proteicos crudos obtenidos de semillas de olivo de distintas variedades, teñido con azul Coomassie (A) y el correspondiente inmunoblot probado con el antisero P1 (B). P: Picual; A: Arbequina; F: Frantoio; H: Hojiblanca; L: Lucio; M: Manzanilla.

▪ El antisero P1 reconoce proteínas de almacenamiento de tipo 11S en semillas de distintas oleaginosas.

La figura 14 muestra geles SDS-PAGE de extractos crudos (panel A) e inmunoblots utilizando el suero policlonal anti-P1 (panel B) correspondientes a semillas maduras de olivo y otras oleaginosas. En todos los casos se presenta reacción cruzada en varios polipéptidos.

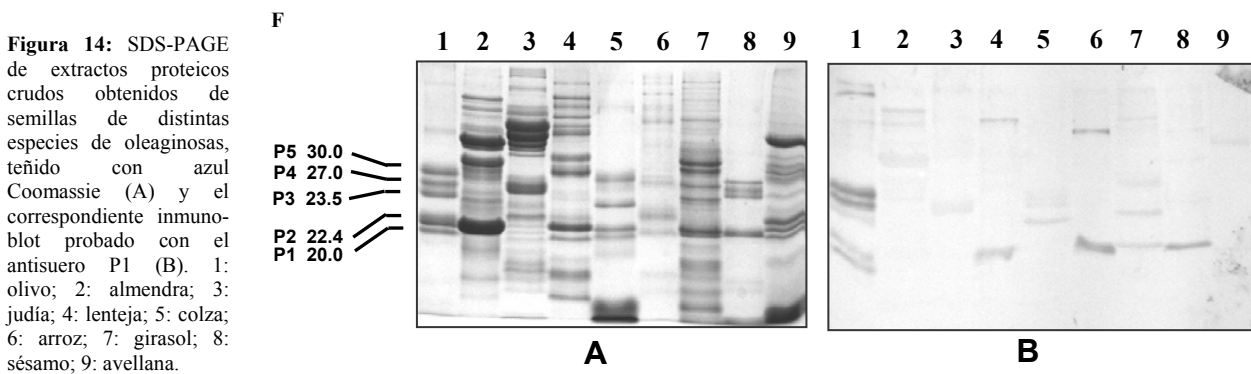


Figura 14: SDS-PAGE de extractos proteicos crudos obtenidos de semillas de distintas especies de oleaginosas, teñido con azul Coomassie (A) y el correspondiente inmunoblot probado con el antisero P1 (B). 1: olivo; 2: almendra; 3: judía; 4: lenteja; 5: colza; 6: arroz; 7: girasol; 8: sésamo; 9: avellana.

▪ Acumulación de proteínas de almacenamiento durante la maduración de la semilla. La figura 15 muestra los perfiles proteicos (panel A) y el correspondiente inmunoblot probado con el antisero anti-P1 (panel B) correspondientes a extractos crudos de semillas procesadas a lo largo de su desarrollo. Pueden observarse importantes cambios en los distintos polipéptidos a través de la maduración de la semilla.

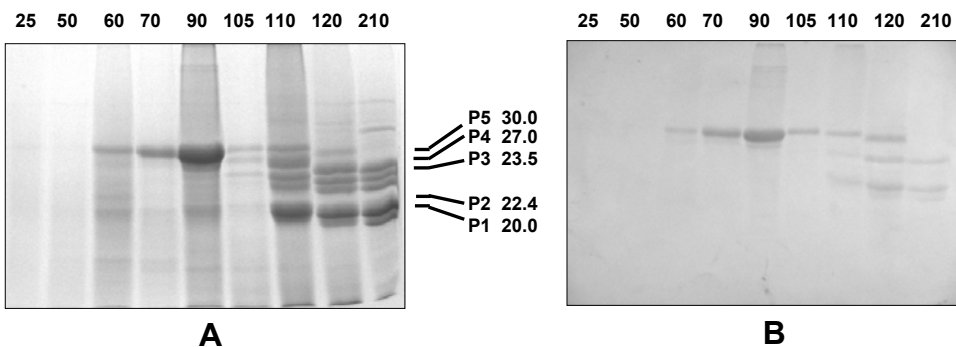


Figura 15: SDS-PAGE de extractos proteicos crudos obtenidos de semillas de olivo 25, 50 60, 70 90, 105 110, 120 and 210 días tras la antesis, teñido con azul Coomassie (A) y el correspondiente inmunoblot probado con el antisero P1 (B).

- Conclusiones

Las proteínas más abundantes en las semillas de olivo maduras pertenecen a la familia 11S, y corresponden aproximadamente a un 70% de las proteínas totales de la semilla. Las proteínas de almacenamiento de la semilla del olivo son similares a prolaminas en solubilidad, al contrario que la mayoría de las dicotiledóneas que poseen globulinas mayoritariamente (Higgins 1984).

Las proteínas de reserva de las semillas de olivo están ampliamente conservadas en las variedades analizadas, no habiendo sido detectada variabilidad, al contrario que en otras especies.

No se han encontrado proteínas similares a esta familia 11S en extractos de hoja, mesocarpo o polen.

Los cambios en la composición y en la cantidad absoluta de proteínas de almacenamiento 11S en la semilla del olivo a través de su desarrollo son similares a los descritos en otras especies, lo que indica que dichos cambios están sujetos a un estricto control genético

PURIFICACIÓN DE OLEOSINAS DE SEMILLAS DE OLIVO Y OTRAS OLEAGINOSAS

Las plantas almacenan triacilglicéridos (TGs) como fuentes de energía para la germinación y el crecimiento inicial de las plántulas. Los TGs se localizan en organelas denominadas cuerpos lipídicos formados por una matriz de TGs rodeada de una capa de fosfolípidos y proteínas denominadas oleosinas (Huang 1996, Murphy 1993). Dichas oleosinas son proteínas abundantes, de pequeño peso molecular (4-26 kDa). Cada molécula de oleosina contiene tres dominios estructurales que incluyen un dominio N-terminal anfipático, un dominio central hidrofóbico (con estructura β antiparalela) y un dominio C-terminal anfipático (α -hélice). Las oleosinas son proteínas estructurales que mantienen a los cuerpos lipídicos como entidades individualizadas (Tzen and Huang 1992). Estas proteínas también pueden tener funciones adicionales como lugares receptores de lipasas (Huang 1996).

Las oleosinas son insolubles en agua independientemente del pH y de las condiciones de fuerza iónica utilizadas, aunque pueden ser solubilizadas en soluciones que contienen SDS. El olivo es una de las plantas oleaginosas más importantes en numerosos países debido a su productividad y a la calidad de su aceite. Consecuentemente, el estudio de las oleosinas en esta especie puede considerarse un tópico de gran importancia (Alché et al 1999). Un estudio previo realizado con fracciones de cuerpos lipídicos de olivo asignó a un polipéptido de 22 kDa el carácter de oleosina únicamente en base a su localización en la superficie de cuerpos lipídicos (Ross et al 1993). Aunque han sido purificadas oleosinas de distintas semillas, en el caso del olivo la purificación de oleosinas ha venido aparejada con la contaminación por parte de proteínas de almacenamiento de tipo SSP (11S), no descartables en el caso del trabajo pionero de Ross et al. (1993) ya que no se realizó secuenciación de los polipéptidos aislados.

A lo largo de la realización de este proyecto, hemos puesto a punto los métodos de aislamiento de cuerpos lipídicos a partir de semillas maduras de olivo, y la posterior purificación de oleosinas utilizando procedimientos de extracción con cloroformo/metanol (2:1).

- Procedimiento básico de extracción de cuerpos lipídicos y oleosinas.

Las semillas maduras fueron homogenizadas a 4 °C en 50 % (v/v) glicerol (1.0 g/4 ml) con mortero y pistilo. Tras filtrar el homogenado, y centrifugar a 10,000 g durante 15 min, se recolectó el sobrenadante graso, que fue lavado secuencialmente en 50 % glicerol, 0.1 M Na₂CO₃. Los cuerpos lipídicos fueron resuspendidos en 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl (pH 7.5). Para purificar las oleosinas, las fracciones de cuerpos lipídicos fueron homogenizadas directamente en cloroformo/metanol (2/1, v/v) usando mortero y pistilo. Tras centrifugar a 3000 g durante 5 min, la fase orgánica fue recuperada y precipitada con 2 vol. de acetona preenfriada. La mezcla fue centrifugada a 10,000 g durante 10 min, y las proteínas precipitadas fueron disueltas en 125 mM Tris-HCl, 1 % (p/v) SDS, 1% (v/v) 2-mercaptoethanol (pH 6.8).

- Perfiles proteicos de los cuerpos proteicos de las semillas de olivo con métodos clásicos.

Las proteínas obtenidas de los cuerpos proteicos fueron resueltas mediante SDS-PAGE utilizando condiciones reductoras y no reductoras (Fig.16). Bajo condiciones no reductoras, fueron detectados varios polipéptidos (calle 2 panel B), aunque sólo los polipéptidos de 22.4, 50 y <10 kDa mostraron enriquecimiento con respecto a los extractos crudos de semillas (calle 1, panel A). Es probable que en dichos geles, el polipéptido de 22.4 kDa se trate exclusivamente de una oleosina mientras que la mayor intensidad de dicha banda de 22.4 kDa bajo condiciones

reductoras (calle 2, panel A) sea consecuencia de la mezcla de dicha oleosina junto con el polipéptido P2 correspondiente a una proteína de almacenamiento de tipo 11S, ya que casualmente ambas proteínas poseen casi el mismo peso molecular. Se estima que dicha presunta oleosina puede representar un 5% de la proteína total de la semilla.

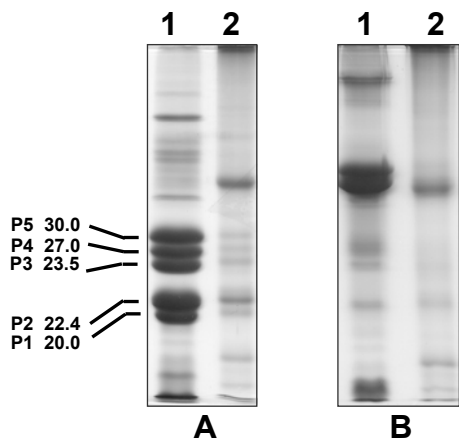


Figura 16: geles SDS-PAGE correspondientes a extractos crudos (calle 1) y a las fracciones proteicas de cuerpos lipídicos obtenidos mediante métodos clásicos (calle 2) teñidos con azul Coomassie, utilizando condiciones reductoras (A) y no reductoras (B).

▪ Optimización del método de purificación de oleosinas.

La figura 17 muestra los resultados obtenidos tras utilizar un nuevo método para la purificación de oleosinas a partir de cuerpos lipídicos. El panel A muestra los geles correspondientes al extracto crudo de semilla (calle 1) y la oleosina purificada (calle 2). El panel B corresponde a un inmunoblot probado con un antisuero anti-p1. En el panel C se muestra un inmunoblot equivalente al central, en este caso probado con un anticuerpo anti-oleosina (Ross et al. 1993). En este caso, el anticuerpo anti-P1 (panel 2) no reconoce el polipéptido de la calle 4 (considerada realmente una oleosina), mientras que el anticuerpo anti-oleosina de Ross et al (1993) reconoce en el panel 3 tanto la banda considerada una oleosina como a P2, un componente de la familia de proteínas de almacenamiento 11S de olivo.

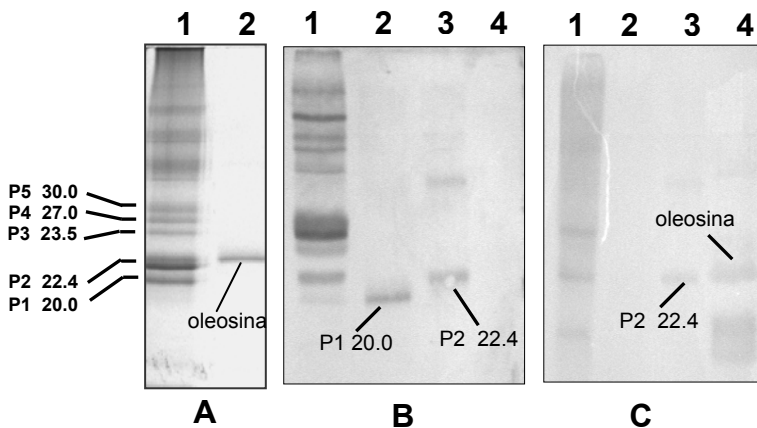


Figura 17: A: gel teñido con azul Coomassie correspondiente a extractos crudos de semilla (calle 1) y a la oleosina purificada (calle 2). B: inmunoblot correspondiente a extractos crudos de semilla (calle 1), polipéptidos P1 y P2 (calles 2 y 3), y oleosina purificada (calle 4) probado con el antisuero anti-P1. C: inmunoblot idéntico al panel 2, probado con un antisuero frente a oleosina.

▪ Conclusiones

La utilización de un método de purificación con cloroformo/metanol (2:1), que fue sugerido inicialmente para la purificación de lípidos y fosfolípidos, permite la separación de componentes proteicos de semillas considerados como oleosinas. Este método elimina la contaminación con proteínas de almacenamiento de tipo 11S presentes en las semillas y que, como demuestran los resultados presentados, son comunes con los métodos de aislamiento y purificación de cuerpos lipídicos y oleosinas anteriormente empleados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a Conchita Martínez Sierra y Rosa Luque Reinoso. Este trabajo fue financiado por el proyecto INIA-CAO99-003

REFERENCIAS

- ALCHÉ J. D., CASTRO A. J., OLMEDILLA A., FERNÁNDEZ M. C., RODRÍGUEZ R., VILLALBA M. & RODRÍGUEZ-GARCÍA M. I. (1999). The major olive pollen allergen (Ole e I) shows both gametophytic and sporophytic expression during anther development, and its synthesis and storage takes place in the RER. *Journal of Cell Science*. 112: 2501-2509.
- ALCHÉ J. D., CASTRO A. J. AND RODRÍGUEZ-GARCÍA M. I.: " Expression of oleosin genes in the olive (*Olea europaea* L.) anther". En: "Anther and pollen: from Biology to Biotechnology" (Clements, C., Pacini, E. And Audran, J.-C. Eds.) Springer-Verlag. 1999. Pp. 91-99
- BACHMAIR A., NOVATCHKOVA M., POTUSCHAK T. & EISENHABER F. (2001) Ubiquitilation in plants: a post-genomic look at a post-translational modification. *Trends Plant Sci* 6: 463-470
- BARRANCO D. & RALLO L. (1984). Las variedades de olivo cultivadas en Andalucía. Ministerio de Agricultura-Junta de Andalucía, Madrid. 387 pp.
- BUTOWT R., GRANOT D. & RODRÍGUEZ-GARCÍA M.I. (2003) A putative plastidic glucosa translocator is expressed in heterotrophic tissues that do not contain starch, during olive (*Olea europaea* L) fruit ripening. *Plant Cell Physiol* 44: 1152-1161
- CAHOON E.B., LINDQVIST Y., SHNEIDER G. & SHANKLIN J. (1997). Redesign of soluble fatty acid desaturases from plants for altered substrate specificity and double bond position. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 4872-4877.
- CALIS J. & VIERSTRA R. D. (2000) Proteins degradation in signaling. *Curr Opin Plant Biol* 3: 381-386
- CIMATO A., CANTINI C., SANI G. & MARRANCI M. (1993). Il germoplasma dell'olivo in Toscana. Ed. Regione Toscana, Florence. Italy.
- EL ANTARI A., EL MOUDNI H., AJANA H. & CERT A. (2003). Estudio de la composición lipídica de dos compartimentos de la aceituna (pulpa y almendra) de seis variedades de olivo cultivadas en Marruecos. *Olivae*. 98: 20-28.
- FOURATI H., KHLIF M. & COSSENTINI M. (2003). Estudio comparativo de las características pomológicas y fisicoquímicas de treinta variedades de olivo. *Olivae*. 96: 33-37.
- GYLLASPY G., BEN-DAVID H. & GRUISSEM W. (1993) Fruit a developmental perspective. *Plan Cell* 5:1479-1461
- HAMRICK J.L., GODT M.J & SHERMAN-BROYLES S.L. (1992). Factors influencing levels of genetic diversity in Woody plant species. *New Forests*. 6: 95- 124
- HERMAN E. M. & LARKINS B. A. (1999). Protein storage bodies and vacuoles. *Plant Cell* 11: 601-614
- HIGGINS T J V. (1984) Synthesis and regulation of major proteins in seeds. *Ann Rev Plant Physiol* 35: 191-221
- HUANG A H C (1996). Oleosins in seeds and other organs. *Plant Physiol* 110: 1055-1061
- MURPHY D.J. (1994). Manipulation of lipid metabolism in transgenic plants: Biotechnological goals and biochemical realities. *Biochem. Soc. Trans* 22: 926-931.
- OHLROGGE J.B. (1994). Design of new plant products: engineering of fatty acid metabolism. *Plant. Physiol* 104: 821-826.
- PEARSON W R & LIPMAN D J (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2444-2448
- SÁNCHEZ J. & HARWOOD J.L. (2002). Biosynthesis of triacylglycerols and volatiles in olives. *Eur. J. Lipid Sci. Technol* 104:564-573.
- SHANKLIN J. & SOMERVILLE C.R. (1991). Stearoyl-acyl carrier protein desaturase from higher plants is structurally unrelated to the animal and fungal homologs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88: 2510-2514.
- THOMPSON G.A., SCHERER D.E., FOXALL-VAN AKEN S., KENNY J.W., YOUNG H.L., SHINTANI D.K., KRIDL J.C. & KNAUF V.C. (1991). Primary structures of the precursor and mature forms of stearoyl-acyl carrier protein desaturase from safflower embryos and requirement of ferredoxin for the enzyme activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88: 2578-2582.
- ROSS J.H.E., SANCHEZ J., MILLAN F. & MURPHY D.J. (1993) Differential presence of oleosins in oleogenic seed and mesocarp tissue in olive (*Olea europaea*) and avocado (*Persea Americana*). *Plant Sci*. 93:203-210
- TOUS J. & ROMERO A. (1993). Variedades de olivo. Fundación "La Caixa", 172 pp.
- VILLALBA M., BATANERO E., MONSALVE R.I., GONZÁLEZ DE LA PENA M.A., LAHOZ C. & RODRÍGUEZ R. (1994). Cloning and expression of Ole e I, the major allergen from olive tree pollen. Polymorphism analysis and tissue specificity. *J. Biol. Chem*. 269:15217-15222.
- TZEN JT, LIE G.C. & HUANG A.H. (1992) Characterization of the charged components and their topology on the surface of plant seed oil bodies. *J Biol Chem*. 267(22):15626-34.
- WANG W. ALHÉ J.D. & RODRÍGUEZ-GARCÍA M.I. (2001). Characterization of seed storage proteins and their síntesis during seed development in *Olea europaea*. *Int. J. Dev. Biol*. 45: S63-S64.
- WEBER A., SERVAITES J. C., GEIGER D. R., KOFLER H., HILLE D., GRONER F., HEBBEKER U. & FLUGGE U.-I. (2000) identification, purification and molecular cloning of a putative plastidic glucose transporter. *Plant Cell* 12: 787-801