

## BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DEL OLIVO (BRO-EEZ-CSIC)

**Juan de Dios Alché<sup>a</sup>; Antonio Jesús Castro<sup>a</sup>; Krzysztof Zienkiewicz<sup>a</sup>; Agnieszka Zienkiewicz<sup>a</sup>; José Angel Traverso<sup>a</sup>; Amada Pulido<sup>b</sup>; Adoración Zafra<sup>a</sup>; M<sup>a</sup> José Jiménez<sup>a</sup>; Juan David Rejón<sup>a</sup>; Mahdi Fendri<sup>a</sup>; Sihem Ben Ali<sup>a</sup>; María Isabel Rodríguez-García<sup>a</sup>.**

Dirección postal: <sup>a</sup>Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas. Estación Experimental del Zaidín. CSIC. Profesor Albareda 1, 18008 Granada.

<sup>b</sup>Departamento de Fisiología Vegetal. Universidad de Granada, Facultad de Farmacia, Campus de Cartuja, 18071 Granada.

Emails: J.D. Alché (juandedios.alche@eez.csic.es); A.J. Castro (antoniojesus.castro@eez.csic.es); K. Zienkiewicz (krzysztof.zienkiewicz@eez.csic.es); A. Zienkiewicz (agnieszka.zienkiewicz@eez.csic.es); J.A. Traverso (traverso@eez.csic.es); A. Pulido (amadapulido@ugr.es); A. Zafra (dori.zafra@eez.csic.es); M.J. Jiménez (mariajose.jimenez@eez.csic.es); J.D. Rejón (juandavid.rejon@eez.csic.es); M. Fendri (fendrimahdi@yahoo.fr); S.B. Ali (ben\_ali.sihem@yahoo.fr); M.I. Rodríguez-García (mariaisabel.rodriguez@eez.csic.es).

Palabras clave: alérgenos, genómica, gineceo, olivo, polen, proteómica, reproducción.

### DESCRIPCIÓN DE LAS LÍNEAS DE TRABAJO

Línea 1. Caracterización de actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo del oxígeno en los órganos reproductivos del olivo.

La caracterización molecular y funcional de los principales sistemas enzimáticos antioxidantes y el estudio de la presencia y localización de ROS (especies reactivas del oxígeno) en los órganos florales está permitiendo abordar numerosas cuestiones abiertas sobre la Biología Reproductiva de las Angiospermas. El olivo es una especie muy adecuada para este estudio, al tratarse de una dicotiledónea, con caracteres peculiares en sus órganos reproductivos, y en la que se han descrito genotipos autoincompatibles. Su fertilización es preferentemente alógama y con un sistema de incompatibilidad de tipo gametofítico, no bien determinado aún. Los estudios en curso analizan el polimorfismo molecular y la posible presencia de diversas isoformas de SOD, catalasa, peroxidasa y NADPH oxidasa (NOX) en el grano de polen maduro y el pistilo de diferentes cultivares de olivo. Se están generando herramientas moleculares (anticuerpos, sondas, proteínas purificadas -bien nativas o de origen recombinante- y construcciones con “reporter genes”) correspondientes a las isoformas más relevantes de estas enzimas. Estas herramientas están siendo utilizadas para el análisis de la expresión génica y la determinación de la función biológica de dichos enzimas en el grano de polen y el pistilo del olivo durante su desarrollo, la germinación *in vitro* e *in vivo*.

Línea 2. Estudio de los enzimas pectinolíticos del olivo y su implicación en la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico en el pistilo.

El tubo polínico transporta las células espermáticas hasta el gametofito femenino en el saco embrionario, permitiendo que tenga lugar la doble fecundación que generará el fruto. El éxito de la fertilización depende en gran medida de la capacidad del grano de polen para germinar y emitir un tubo polínico, que debe ser capaz de penetrar el estigma y avanzar a través del estilo hacia el saco embrionario. Existen evidencias que sugieren que determinadas enzimas esterases con actividad pectinolítica presentes en el polen

juegan un papel clave en la entrada del tubo polínico a través de las papilas del estigma, así como en la regulación del crecimiento del tubo. En el caso del olivo, existe un buen conocimiento de la estructura y citoquímica del pistilo durante la fase progámica, así como de la composición y localización de los componentes de la pared celular del tubo polínico. Sin embargo, no existen pruebas de la existencia de actividad pectinolítica en el polen y el pistilo, por lo que la participación de estas enzimas en la reproducción de esta especie de gran importancia agronómica está por resolver. Actualmente estamos: 1) determinando la existencia de actividad pectinolítica en el polen y el estigma del olivo, 2) identificando y caracterizando las distintas enzimas pectinolíticas presentes en el polen y el estigma del olivo, y 3) estudiando la localización y el patrón de expresión de dichos enzimas en el contexto de la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico en el pistilo.

#### Línea 3. Caracterización de proteínas de almacenamiento en la semilla del olivo y en subproductos de la extracción del aceite

Los subproductos del olivar representan para la cuenca del Mediterráneo un potencial industrial y forrajero considerable. Las semillas del olivo contienen grandes cantidades de proteínas y lípidos en los tejidos de reserva que las integran, especialmente en el cotiledón y el endospermo. Trabajos previos del grupo confirman que uno de los componentes proteicos mayoritarios de las semillas corresponde a proteínas de almacenamiento de semillas (SSPs) 11S de tipo leguminas. Otros componentes potencialmente presentes incluyen oleosinas, legumaínas, caleosinas y enzimas de las distintas rutas biosintéticas y degradativas. Estos trabajos también indican que los residuos sólidos procedentes de la extracción del aceite de oliva están altamente enriquecidos en proteínas. Por otra parte, se está poniendo de manifiesto la presencia de componentes proteicos en distintas proporciones en los aceites de oliva virgen y refinados. Actualmente estamos realizando estudios destinados a caracterizar en detalle la organización tisular de la semilla del olivo, así como la composición proteica y lipídica de sus distintos tejidos tanto en la aceituna madura como durante el desarrollo del fruto, y en el fruto maduro de distintos cultivares. Esta línea de trabajo incluye estudios aplicados en los que se determina la distribución de los componentes proteicos a lo largo de los procesos de elaboración del aceite, y el contenido y la composición de estos productos proteicos en los subproductos sólidos generados. Para ello se usa una aproximación multidisciplinaria que incluye la caracterización histológica de la semilla. Se están realizando igualmente análisis bioquímicos y moleculares de alta resolución. Estamos valorando el uso potencial de estos componentes como valor añadido del hueso, por ejemplo para su uso en alimentación animal.

#### Línea 4. Identificación y caracterización de proteínas implicadas en el reconocimiento polen-estigma mediante técnicas de proteómica.

Los resultados derivados de estudios sobre el grado de autocompatibilidad de distintos cultivares de olivo muestran los beneficios de la polinización cruzada. Por tanto, el conocimiento de la autocompatibilidad y la compatibilidad cruzada entre cultivares de olivo podría ser muy útil en diseños de polinización para mejorar la producción. Sin embargo, hasta la fecha no se conocen los mecanismos moleculares que regulan dicho sistema en esta especie. En este contexto, el grupo realiza estudios para identificar y llevar a cabo la caracterización preliminar de las proteínas implicadas en el reconocimiento polen-pistilo durante la fase progámica en el olivo, ampliamente basadas en el uso de técnicas de análisis proteómico.

Línea 5. Variabilidad genética y funcional de las proteínas alergénicas del polen del olivo

Algunas proteínas alergénicas del polen del olivo desempeñan papeles biológicos clave en la fisiología del grano de polen. Estas proteínas están implicadas en procesos como la hidratación y germinación, la modulación de la actividad del citoesqueleto, el control del  $Ca^{2+}$  citosólico, el metabolismo de polisacáridos, detoxificación celular etc. En el grupo se realizan numerosos estudios en relación con los alérgenos Ole e 1 y Ole e 2, que han demostrado que existen patrones de expresión diferenciales, diferente isoformas, y un amplio polimorfismo en las secuencias nucleotídica y aminoacídica de estos alérgenos en el polen de distintos cultivares de olivo. Empezamos a conocer que dicho polimorfismo posee importantes implicaciones tanto en la biología reproductiva del olivo como en el desarrollo de la respuesta alérgica. Actualmente se está caracterizando la variabilidad de otros alérgenos relevantes (Ole e 5, Ole e 9 y Ole e 10) en el polen de un número significativo de variedades cultivadas de olivo a distintos niveles (expresión, secuencia, modificaciones post-transcripcionales, estructura 3-D, actividad etc.). La información generada está permitiendo la creación de anticuerpos, sondas y proteínas purificadas bien nativas o de origen recombinante que serán utilizadas para incrementar nuestro conocimiento sobre las funciones biológicas de los alérgenos en el desarrollo y la germinación del grano de polen. Diversos ensayos *in vitro* la reactividad de sueros de pacientes atópicos están permitiendo la evolución y mejora de los métodos de diagnóstico y terapia de la alergia.

Línea 6. Discriminación varietal del polen mediante características morfológicas y SSRs.

La mayor parte de los métodos de discriminación varietal han sido optimizados en materiales vegetativos como las hojas. La identificación varietal del polen tiene potencialmente numerosas aplicaciones agronómicas, biotecnológicas, médicas, evolutivas y agroalimentarias. Esta línea aborda el desarrollo y evaluación de distintos métodos de clasificación varietal del polen del olivo a partir de caracteres morfológicos del polen y de los marcadores microsátélites (SSRs) en polen.

## REFERENCIAS DE INTERÉS

Alché, J.D., Jiménez-López, J.C., Wang, W., Castro, A.J., Rodríguez-García, M.I. 2006. Biochemical characterization and cellular localization of 11S-type storage proteins in olive (*Olea europaea* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 54: 5562-5570.

Alché, J.D., Castro, A.J., Jiménez-López, J.C., Morales S., Zafra, A., Hamman-Khalifa, A.M., Rodríguez-García, M.I. 2007. Differential characteristics of the olive pollen from different cultivars and its biological and clinical implications. *J. Invest. Allerg. Clin. Immunol.*, 17 (Suppl. 1 «Trends in olive pollen allergy»): 69-75.

Castro, A.J., Bednarczyk, A., Schaeffer-Reiss, C., Rodríguez-García, M.I., Van Dorselaer, A., Alché, J.D. 2010. Screening of Ole e 1 polymorphism among olive cultivars by peptide mapping and N-glycopeptide analysis. *Proteomics*, 10: 1-10.

Fendri, M., Trujillo, M., Trigui, A., Rodríguez-García, M.I., Alché, J.D. 2010. Simple Sequence Repeat identification and endocarp characterization of olive tree accessions in a Tunisian germplasm collection. *HortScience*, 45(10): 1429-1436.

Hamman-Khalifa, A.M., Castro-López, A.J., Jiménez-López, J.C., Rodríguez-García M.I. and Alché, J.D. 2008. Olive cultivar origin is a major cause of polymorphism for Ole e 1 pollen allergen. BMC Plant Biol., 8: 10.

Morales, S., Jiménez-López, J.C., Castro, A.J., Rodríguez-García, M.I., Alché, J.D. 2008. Olive pollen profilin (Ole e 2 allergen) co-localizes with highly active areas of the actin cytoskeleton and is released to the culture medium during in vitro pollen germination. J. Microscopy-Oxford, 231(2): 332-342.

Zafra, A., Rodríguez-García, M.I., Alché, J.D. 2010. Cellular localization of ROS and NO in olive reproductive tissues during flower development. BMC Plant Biol., 10: 36.

Zienkiewicz, A., Jiménez-López, J.C., Zienkiewicz, K., Alché, J.D., Rodríguez-García, M.I. 2010. Development of the cotyledon cells during olive (*Olea europaea* L.) in vitro seed germination and seedling growth. Protoplasma, On-line first. DOI 10.1007/s00709-010-0242-5.

## OTROS DATOS DE INTERÉS

Los proyectos actualmente vigentes del grupo incluyen:

- Caracterización molecular y funcional de enzimas relacionadas con el metabolismo del oxígeno en órganos reproductivos del olivo. MCINN BFU2008-00629.
- Estudio de los enzimas pectinolíticos del olivo (*Olea europaea* L.) y su implicación en la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico en el pistilo. MCINN AGL2008-00517/AGR.
- Identificación y caracterización de proteínas implicadas en el reconocimiento polen-estigma en el olivo (*Olea europaea* L.) mediante técnicas de proteómica. Junta de Andalucía, Proyecto de Excelencia CVI5767.
- Caracterización de proteínas de almacenamiento en la semilla del olivo y en subproductos de la elaboración del aceite. Junta de Andalucía. Proyecto de Excelencia. Línea específica del olivar y el aceite de oliva. Ref. AGR-6274.

El grupo posee un amplio historial de transferencia de tecnología, que incluye las siguientes patentes actualmente en explotación por la compañía Allergenome S.L.:

- Kit para el diagnóstico de hipersensibilidad frente a alérgenos del polen del olivo y su utilización”. Patente de Invención. Publicación OEPM: 2 196 952.
- Perfeccionamientos introducidos en el objeto de solicitud de patente española N° P200100995. Patente de Invención. Publicación OEPM 2 326 399.
- Ácidos nucleicos y alérgenos del polen de olivo de variedades definidas de olivo y aplicaciones. Patente de Invención y PCT correspondiente. Boletín Oficial de la Propiedad Industrial de 6 de julio de 2010.
- Método y kit para la identificación varietal del origen del polen del olivo. Solicitud OEPM P201130568. Fecha de prioridad: 11 abril 2011.