

ESTUDIOS SOBRE LA REPRODUCCIÓN SEXUAL EN EL OLIVO

Juan de Dios Alché, Antonio Jesús Castro, Adela Olmedilla, José Carlos Jiménez-López, Cynthia Suárez, Irene Serrano, Sonia Morales, Madhi Fendri, Adoración Zafra, Juan David García y María Isabel Rodríguez-García
Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas
Estación Experimental del Zaidín. CSIC.
Profesor Albareda 1, 18008 Granada. España
Tel. 958181600

juandedios.alche@eez.csic.es
mariaisabel.rodriguez@eez.csic.es

Palabras clave: olivo, polen, reproducción, alergia

Resumen

El olivo es una planta de gran importancia agronómica en los países mediterráneos, y muy especialmente en nuestra región. Nuestro grupo viene tradicionalmente estudiando numerosos aspectos de la reproducción sexual de dicha especie, tales como el desarrollo del polen, sus características (viabilidad y capacidad de germinación), el desarrollo del gineceo, los procesos de fertilización, la formación y maduración del fruto, etc.

Para estos estudios utilizamos distintos métodos que incluyen desde la observación morfológica mediante técnicas de microscopía óptica, microscopía electrónica de transmisión, barrido y microscopía confocal, hasta técnicas de aislamiento y caracterización de proteínas y genes implicados en dichos procesos.

Todos estos estudios nos están ayudando a comprender el sistema de reproducción sexual del olivo, una planta en la que la presencia de mecanismos de autoincompatibilidad polen-pistilo con bases aparentemente genéticas y ambientales, está empezando a ser estudiada.

Otra línea de investigación en curso en nuestro grupo es aquella que se refiere al estudio de determinadas proteínas del grano de polen con funciones clave en su desarrollo y en la germinación y crecimiento del tubo polínico, y que además exhiben carácter alérgico para algunos individuos. Las características moleculares y el contenido de estos alérgenos varían significativamente entre cultivares de olivo, lo cual hace especialmente interesante su estudio en la fisiología del grano de polen, además de las implicaciones clínicas que de ello se derivan.

Introducción

A pesar de la gran importancia del olivo en la agricultura mundial, y especialmente en nuestra región, desconocemos muchos detalles sobre la Biología de esta especie. La reproducción del olivo se realiza tradicionalmente de forma vegetativa (estaquillas). Sin embargo, es la reproducción sexual de la planta la responsable en último caso de la formación del fruto, y por tanto tiene enorme importancia en la producción.

En nuestro grupo abordamos diferentes líneas de investigación relacionadas con la Reproducción Sexual de esta especie:

- Estudio de las bases fisiológicas y morfológicas de la capacidad de autofecundación y de fecundación cruzada del olivo. El olivo posee un sistema reproductivo de carácter alógamo (una variedad es fecundada preferentemente por polen de otra variedad diferente). Desconocemos en sus detalles moleculares este sistema de compatibilidad, que está controlado tanto por factores genéticos de la planta como ambientales. Como un paso previo para promover el conocimiento del proceso de polinización y las interacciones de compatibilidad en esta planta, realizamos estudios sobre la calidad y el vigor del polen en diferentes cultivares de olivo, caracterización del comportamiento del polen durante la germinación y el crecimiento del tubo polínico a través del pistilo, interacción polen-pistilo en diferentes estadios de la fase prográmica, y en plantas con diferentes grados de compatibilidad. Parte de estos estudios han sido considerados en el proyecto AGL2003-00719. La compañía Vitolive S.L. y la Fundación del Olivar han mostrado su interés en los resultados que están emergiendo de la realización de estos estudios.
- Determinación de la función biológica de diversos productos génicos tanto en el grano de polen como en el fruto del olivo. Para ello, realizamos análisis de la expresión génica de dichos productos: a) a lo largo del desarrollo del polen, b) durante la germinación del polen in vivo e in vitro, c) durante el desarrollo del fruto y de la semilla, y d) en diferentes cultivares de olivo con diferencias significativas en cuanto a su productividad, su contenido en aceite, características como polinizadores, resistencia a diversos factores etc. Los marcadores seleccionados incluyen proteínas de almacenamiento, desaturasas de ácidos grasos, genes de poliubiquitina, oleosinas, transportadores de azúcares, diversas

enzimas etc. Además de la Fundación del Olivar, existen varias compañías interesadas en los resultados de estos proyectos como Vitolive S.L., y el grupo de empresas Inmunal/ Applied Molecular Development S. A./Allergenome.

- La generación de cantidades ingentes de polen en la época de floración del olivo, debido a su carácter esencialmente anemófilo (dispersión del polen mediante el viento), produce efectos nocivos sobre la salud de los pacientes alérgicos (alrededor de un 20% de la población andaluza). Los síntomas de la alergia se deben a la presencia en el polen de proteínas denominadas alérgenos. Dichas proteínas desempeñan funciones muy importantes en la Biología del polen, y están probablemente relacionadas con el reconocimiento y compatibilidad entre variedades, la capacidad de germinación del polen, fertilización etc. Nuestros estudios integran todos esos factores, estableciendo cómo afectan a la producción y a la salud pública. Los resultados obtenidos en este campo se engloban en dos proyectos de investigación (AGL2003-00719 y BFU 2004-00601/BFI). El grupo de empresas Inmunal/ Applied Molecular Development S. A./Allergenome, tienen participación activa en dichos estudios.

El comportamiento reproductivo del olivar ecológico en relación al intensivo es por otra parte uno de nuestros tópicos de estudio con interés más inmediato.

Materiales y métodos

El grupo realiza un abordaje multidisciplinar al estudio del desarrollo y germinación del polen del olivo y al desarrollo del fruto. Dentro de este abordaje se incluyen:

Técnicas bioquímicas: análisis de extractos proteicos mediante electroforesis unidimensional y bidimensional. Determinaciones de actividades enzimáticas. Técnicas de proteómica: aislamiento de spots, análisis de huella peptídica y secuenciación. Western blotting. Generación de anticuerpos. ELISA.

Técnicas moleculares: aislamiento de genes implicados en el desarrollo reproductivo. Amplificación mediante (RT)PCR, clonación y secuenciación de productos génicos. Análisis de expresión. Northern y Southern blots. Análisis de polimorfismo. Métodos bioinformáticos de análisis y modelado 3-D de productos génicos.

Técnicas histológicas/citológicas: detección de productos génicos (proteínas y secuencias) in situ: microscopía óptica y electrónica de transmisión y barrido. Epifluorescencia y microscopía láser-confocal. Inmunocitoquímica y técnicas de hibridación in situ.

Métodos de diagnóstico clínico e inmunoterapia: El grupo colabora con diversos equipos clínicos que realizan técnicas de diagnóstico in vivo e in vitro como CAP, SPTs, provocaciones, e inmunoterapia desensibilizante (vacunas alérgicas).

Resultados y discusión

En cuanto a la caracterización de fenómenos clave durante el desarrollo y la germinación del polen, diversos trabajos del grupo han permitido ya desde la década de los 80 hasta la actualidad la descripción funcional de la ultraestructura del polen y sus cubiertas (Rodríguez-García y col., 1995), de la naturaleza y la disposición de la calosa, y diversos materiales polisacáridicos (Alché y Rodríguez-García, 1997), la presencia de inclusiones proteicas en el núcleo de las células de la hoja y células reproductivas (Alché y Rodríguez-García, 1987;1988) y la descripción del ciclo ribosómico en el polen (Alché y col., 1994; Olmedilla y col., 1997).

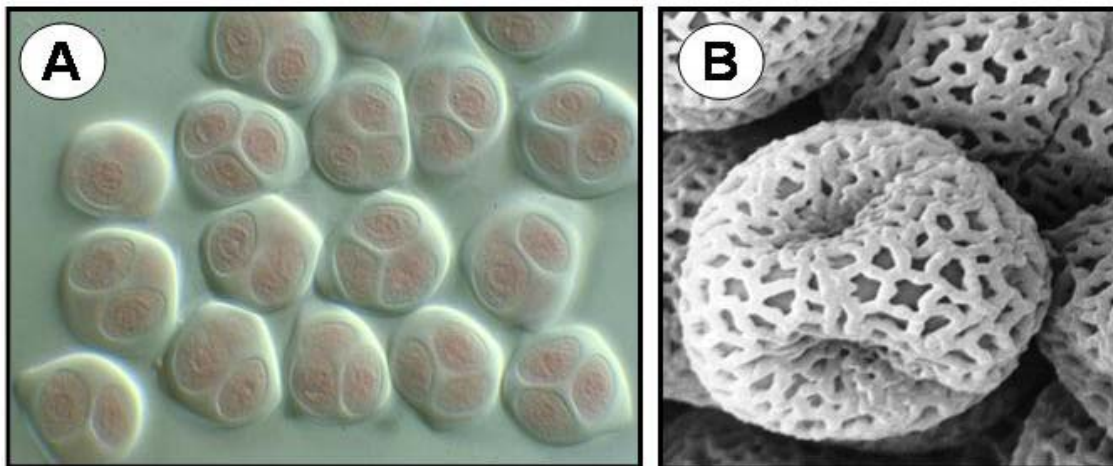


Figura 1: **A**, Tetradas resultantes de la división meiótica de las células madres del polen del olivo observadas mediante microscopía óptica. Tinción con orceína acética. **B**, Grano maduro de polen de olivo observado mediante microscopía electrónica de barrido.

El análisis de la expresión de diversos productos génicos tanto en el grano de polen como en el fruto del olivo incluye estudios sobre enzimas implicadas en la detoxificación celular (Alché y col., 1998), ubiquitina y proteínas ubiquitinadas (Alché y col., 2000; Alché y col., 1998), oleosinas (Alché y col., 1999; Rodríguez-García y Alché, 2002), proteínas de almacenamiento de semillas (Wei y col., 2001; Alché y col., 2006), y diferentes proteínas del grano de polen (Hamman-Khalifa y col., 2003; Jiménez-López y col., 2003) entre otros marcadores (Alché y col., 2003; Rodríguez-García y col., 2004).

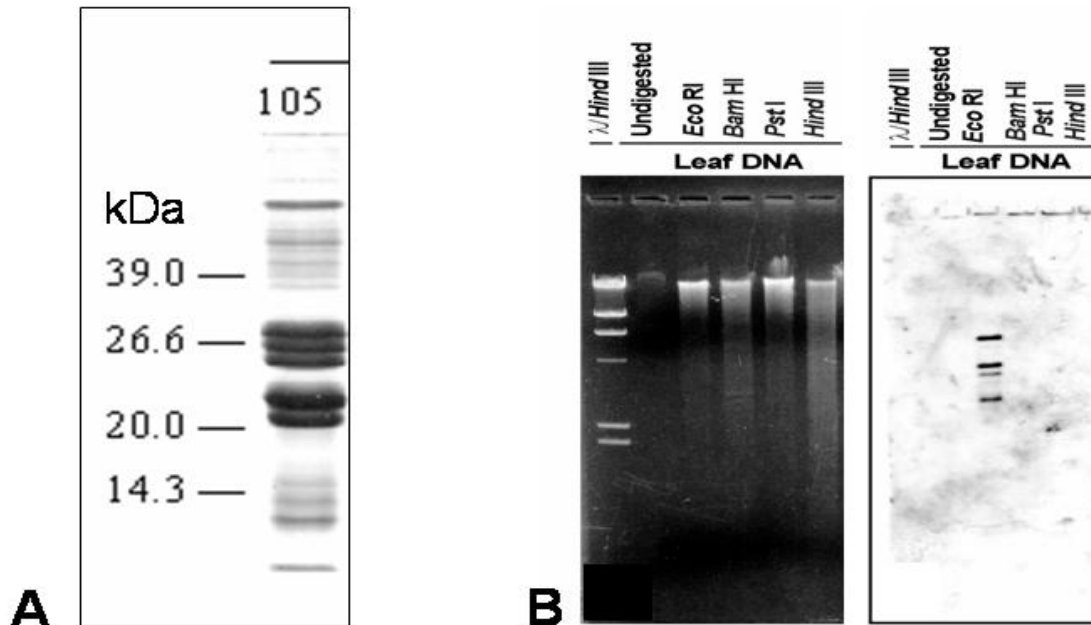


Figura 2: A, Perfil proteico del endospermo de la semilla del olivo. B, Southern blot probado con una sonda correspondiente a secuencias de oleosinas (proteínas que estabilizan la estructura de los cuerpos lipídicos).

El estudio sobre proteínas alergénicas del polen del olivo se inició en 1989 en colaboración con el Dr. Carlos Lahoz (Fundación Jiménez Díaz, Madrid), y las Dras. Rosalía Rodríguez y Mayte Villalba (Universidad Complutense de Madrid) responsables del análisis bioquímico y la clonación de la mayor parte de los alérgenos conocidos en esta planta. Como resultado de estos estudios han sido publicados numerosos artículos en revistas nacionales e internacionales que han tenido como objeto fundamental la localización de alérgenos mayoritarios en el grano de polen del olivo y otras oleáceas (Martín-Orozco y col., 1994; Rodríguez-García y col., 1995; Fernández y col., 1996) y el análisis de su expresión génica a lo largo del desarrollo y germinación del polen (Alché y Rodríguez-García, 1997; Alché y col., 1999; M'rani-Alaoui y col., 2002; Alché y col., 2004). De forma progresiva, el estudio sobre alérgenos del polen del olivo ha ido extendiéndose a otros alérgenos mayoritarios y minoritarios (Alché y col., 2003; Barral y col., 2005), así como al estudio de las implicaciones biológicas y clínicas del polimorfismo de dichas proteínas en el polen (Castro y col., 2003; Alché y col., 2004). En relación a este temas, el grupo ha elaborado varias patentes que están siendo explotadas por el grupo de empresas Inmunal/ Applied Molecular Development S. A./Allergenome, que están elaborando nuevos sistemas de diagnóstico e inmunoterapia de la alergia al polen del olivo basados en el uso de extractos de polen de diferentes variedades de olivo.

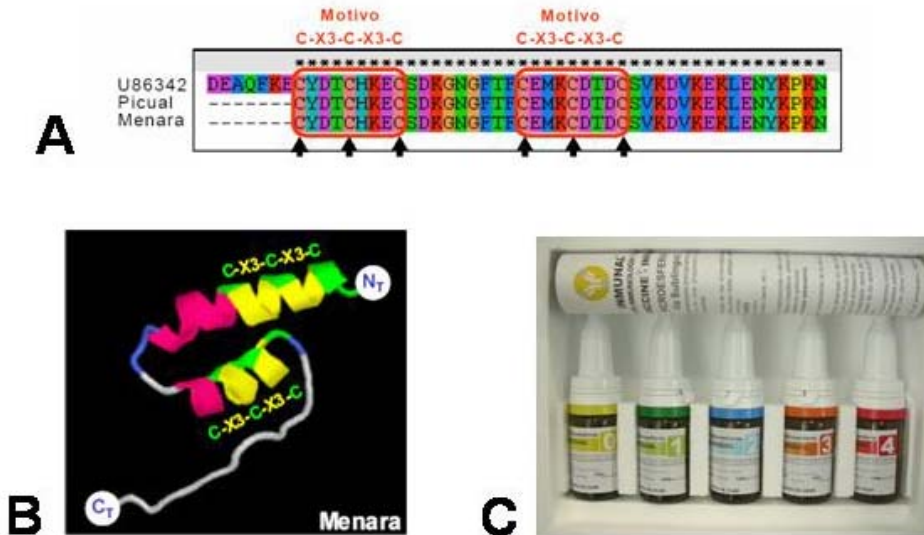


Figura 3: **A**, Alineamiento de secuencias obtenidas mediante RT-PCR correspondientes a uno de las proteínas alergénicas del polen del olivo. **B**, Modelo predictivo de la estructura 3-D de uno de los alérgenos del polen. **C**, nuevas vacunas para el tratamiento de alérgicos al polen del olivo basadas en el uso de variedades.

Los resultados obtenidos a lo largo de estos estudios tienen utilidad potencial en diversos aspectos biotecnológicos del desarrollo del cultivo, que incluyen la introducción de características deseables en éste, como el incremento de la eficacia reproductiva (germinabilidad y viabilidad del polen, aumento del cuajado...), la contribución de nuevos marcadores al desarrollo y caracterización de nuevas variedades, la mejora de la calidad del aceite del olivo y de su producción, el empleo de semillas como complemento para alimentación animal, y la selección de variedades con bajo nivel de alergenicidad entre otros.

Bibliografía

- Alché, J.D., Butowt, R., Castro, A.J. and Rodríguez-García, M.I.: "Could ubiquitin and ubiquitinated proteins be used as molecular markers for embryogenesis induction of pollen? In: Gametic Embryogenesis (ed. Magnor Hansen, European Commission, EUR 18423 EN) pp 208-210 (1998).
- Alché, J.D., Castro, A.J., Butowt, R. and Rodríguez-García, M.I.: "Ubiquitin and ubiquitin-conjugated proteins in the olive (*Olea europaea*) pollen". *Sex. Plant Reprod.* 12, 285-291. 2000).
- Alché, J.D., Castro-López, A.J., Hamman-Khalifa, A.M., Romero-Palacios, P.J., Jiménez-López, J.C., Rodríguez-García, M.I.: "Alergenicidad diferencial del polen en variedades cultivadas del olivo. Implicaciones clínicas". *Alergol. Inmunol. Clin.* 19 (Ext. 2):308 (2004).
- Alché, J.D., Castro, A.J., Olmedilla, A., Fernández, M.C., Rodríguez, R., Villalba, M. and Rodríguez-García, M.I.: "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. *J. Cell Sci.* 112(15), 2501-2509. 1999.
- 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
- Alché, J.D., Castro, A.J. and Rodríguez-García, M.I.: "Localization of transcripts corresponding to the major allergen from olive pollen (Ole e I) by electron microscopic non-radioactive in situ RT-PCR". *Micron.* 33, 33-37, 2002.
- Alché, J.D., Castro, A.J. and Rodríguez-García, M.I.: "Non-radioactive TEM in situ-PCR techniques applied to the detection of pollen allergen mRNAs". En: "Science, Technology and Education of Microscopy: an overview" (Ed. A. Méndez-Vilas. Formatex Microscopy Book Series). Badajoz. pp 431-436. 2003.
- Alché, J.D., Corpas, F.J., Rodríguez-García, M.I. and del Río, L.A.: "Superoxido dismutase isoenzymes of olive pollen". *Physiol. Plantarum* 104, 772-776. 1998.
- Alché, J.D., Cismondi, I.A., Castro, A.J., Hamman-Khalifa, A.M. and Rodríguez-García, M.I.: "Temporal and spatial gene expression of Ole e 3 allergen in olive (*Olea europaea* L.) pollen.". *Acta Biol. Cracov. Bot.* 45, 89-96 (2003).

- Alché, J.D., Fernández, M.C. and Rodríguez-García, M.I.: "Cytochemical features common to nucleoli and cytoplasmic nucleoloids of *Olea europaea* meiocytes: detection of rRNA by *in situ* hybridization". J. Cell Sci. 107:621-629. 1994.
- Alché, J.D., Jiménez-López, J.C., Wang, W., Castro, A.J. and Rodríguez-García, M.I.: "Biochemical characterization and cellular localization of 11S-type storage proteins in olive (*Olea europaea* L.)" J. Agric. Food Chemistry 45:5562-5570 (2006).
- Alché, J.D., M'rani-Alaoui M., Castro, A.J. and Rodríguez-García, M.I.: "Ole e 1, the major allergen from olive (*Olea europaea* L.) pollen, is newly synthesized and released to the culture medium during *in vitro* germination" Plant Cell Physiol 45(8), 1149-1157 (2004).
- Alché, J.D. and Rodríguez-García, M.I.: "Ultrastructural and cytochemical observations on intranuclear inclusions in *Olea europaea*". Inst. Phys. Conf. Ser. 93 (3): 65-66. 1988.
- Alché, J.D. and Rodríguez-García, M.I.: "Application of X-Ray microanalysis, diffraction and cytochemical techniques in the study of the structure and chemical composition of inclusions in *Olea europaea* leaves". Inst. Phys. Conf. Ser. 98: 759-762. 1989.
- Alché, J.D. y Rodríguez-García, M.I.: "El polen como vector responsable de alergias". Polen 8:5-23. 1997
- Alché, J.D. and Rodríguez-García, M.I.: "Fluorochromes for detection of callose in meiocytes of olive (*Olea europaea* L.)". Biotechnics & Histochemistry 72(6):285-290. 1997.
- Barral, P., C. Suárez, C., Batanero, E., Alfonso, C., Alché, J.D., Rodríguez-García, M.I., Villalba, M., Rivas, G. and Rodríguez, R.: "An olive pollen protein with allergenic activity, Ole e 10, defines a novel family of carbohydrate-binding modules and is potentially implicated in pollen germination". Biochemical J. 390, 77-84 (2005).
- Castro, A. J., Alché, J.D. Cuevas, J., Romero, P.J., Alché, V. and Rodríguez-García, M.: "Pollen from different olive tree cultivars contains varying amounts of the major allergen Ole e 1". Int. Arch. Allergy Clin Immunol 131, 164-173 (2003).
- Fernández, M.C., Olmedilla, A., Alché, J.D., Palomino, P., Lahoz, C. and Rodríguez-García, M.I.: "Immunogold probes for light and electron microscopic localization of Ole e I in several Oleaceae pollens": J. Histochem. Cytochem. 44(2):151-158. 1996.
- Hamman-Khalifa, A.M.; Alché, J.D. y Rodríguez-García, M.I.: "Discriminación molecular en el polen de variedades españolas y marroquíes de olivo (*Olea europaea* L.)". Polen 13, 219-225 (2003).
- Jiménez-López, J.C., Alché, J.D. y Rodríguez-García, M.I.: "Análisis preliminar del perfil proteico del polen de variedades principales de olivo (*Olea europaea* L.) cultivadas en España. Diferencias en el contenido del alérgeno mayoritario Ole e 1". Polen 13, 211-217 (2003).
- Martín-Orozco, E., Cárdbaba, B., del Pozo, V., de Andres, B., Villalba, M., Gallardo, S., Rodriguez-Garcia, M.I., Fernandez, M.C. Alché, J.D., Rodriguez, R., Palomino, P. and Lahoz, C.: "Ole e I: Epitope mapping, cross-reactivity with other Oleaceae pollens and ultrastructural localization". Int. Arch. Allergy Immunol. 104:160-170. 1994.
- M'rani Alaoui, M., Castro, A.J., Alché, J.D., Wang, W., Fernández, M.C. and Rodríguez-García, M.I.: "Expresión of Ole e 1, the major olive pollen allergen during *in vitro* pollen germination". Acta Horticulturae. 586, 465-468, 2002.
- Olmedilla, A.; Alché, J.D. and Rodríguez-García, M.I.: "Nucleolar evolution and coiled bodies during meiotic prophase in *Olea europaea*: differential localization of nucleic acids." Eur. J Cell Biol. 74:181-189. 1997.
- Rodríguez-García, M.I y Alché, J.D.: "Utilización de oleosinas como marcadores moleculares en la identificación de variedades y mejora del olivo" Cuadernos MERCACEI. Especial I+D: "Mejora, agronomía y protección del cultivo" 30, 203-205, 2002.
- Rodríguez-García, M.I., Alché, J.D., Hamman-Khalifa, A.M., Butowt, R., Jiménez-López, J.C. Wang, W., Castro, A.J.: "Marcadores moleculares que se expresan en el fruto del olivo". En: "Difusión de resultados de investigación del programa de mejora de la calidad de la producción del aceite de oliva". Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, MEC. Madrid. Pp 205-211 (2004).
- Rodríguez-García, M.I., Fernández, M.C. and Alché, J.D.: "Immunocytochemical localization of allergenic protein (*Ole e I*) in the Endoplasmic Reticulum of the developing pollen grain of olive (*Olea europaea* L.)". Planta 196:558-563. 1995.
- Rodríguez-García, M.I., Fernández, M.C., Alché, J.D. and Olmedilla, A.: "Endoplasmic reticulum as a storage site for allergenic proteins in pollen grains of several Oleaceae". Protoplasma 197:111-116. 1995.
- Wei, W., Alché, J.D., Castro, A.J. and Rodríguez-García, M.I.: "Characterization of seed storage proteins and their synthesis during seed development in *Olea europaea*". Int. J. Dev. Biol. 45: 63-64. 2001.

AGRADECIMIENTOS

Los resultados descritos han sido obtenidos gracias a la financiación de diversas instituciones públicas, esencialmente, los proyectos del Plan Nacional de I+D+i mencionados anteriormente y varios planes de formación de personal investigador de dicho programa, así como de la AEI y del programa I3P-CSIC. Los autores agradecen a Matilde Garrido (*in memoriam*) y a Concepción Martínez Sierra su contribución técnica.