

UNIVERSIDAD DE GRANADA



## ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA  
CELULAR Y MOLECULAR DE PLANTAS



---

CARACTERIZACIÓN DE LAS ENZIMAS ESTERASAS IMPLICADAS EN LA  
INTERACCIÓN POLEN-PISTILO EN EL OLIVO (*OLEA EUROPAEA* L.)

---

TESIS DOCTORAL

Juan David Rejón García  
Granada, 2012

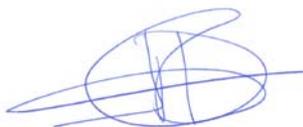
Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Juan David Rejón García  
D.L.: GR 223-2013  
ISBN: 978-84-9028-317-2



CARACTERIZACIÓN DE LAS ENZIMAS ESTERASAS IMPLICADAS EN LA  
INTERACCIÓN POLEN-PISTILO EN EL OLIVO (*OLEA EUROPAEA* L.)

CHARACTERIZATION OF ESTERASE ENZYMES INVOLVED IN POLLEN-  
PISTIL INTERACTION IN THE OLIVE TREE (*OLEA EUROPAEA* L.)

Memoria presentada por el Licenciado en Biología  
D. Juan David Rejón García para optar al grado de Doctor



Fdo.: Juan David Rejón García

VºBº

Los directores de la tesis doctoral



Fdo.: Dra. Mª Isabel Rodríguez-García  
Profesora de Investigación del CSIC



Fdo.: Dr. Antonio Jesús Castro López  
Científico Titular del CSIC



---

Este trabajo ha sido realizado en la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), en el grupo de investigación Biología de la Reproducción de Plantas gracias a la concesión de una beca predoctoral FPU del Ministerio de Innovación y Ciencia. El trabajo ha sido financiado a través de los proyectos de investigación AGL2008-00517AGR (Ministerio de Ciencia e Innovación) y P10-CVI-5767 (Proyecto de excelencia, Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía)

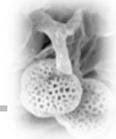


---

---

A mis padres y hermana  
A Carmen María





**“Tener gratitud y no expresarla es como envolver un regalo y no darlo”**

William Arthur Ward

Siempre he pensado que la vida es como un viaje en tren, un viaje lleno de embarques y desembarques, algunos accidentes, sorpresas agradables en algunos momentos y, en otros, grandes tristezas.

Recordando, me viene a la mente mi primera parada en la EEZ fue fugaz, emocionante y divertida, pero la verdad poco productiva ya que me fui igual que vine, sin saber cuantificar proteínas... ¡je, je, je! Agradezco el haber vivido esa experiencia a mi amigo Julio, ya que gracias a él conocí el CSIC, y a José Ángel, que me aconsejó cual era el vagón al que debía subir si quería formar parte de la familia de la EEZ.

Poquito tiempo después, llegó mi embarque definitivo al grupo de Biología Reproductiva de Plantas, en el cual he conocido las alegrías y los sinsabores de esta profesión, he visitado lugares inimaginables para mí, he cumplido sueños,..., y he conocido a gente maravillosa que ha hecho posible que mi ilusión de ser doctor sea ya una realidad. Por todo ello, quiero agradecer a la Dra. María Isabel Rodríguez García y al Dr. Antonio Jesús Castro López haber aceptado ser mis directores de tesis. A ti Maribel quiero que sepas que te estoy y te estaré eternamente agradecido por confiar en mí desde el principio, dándome tu apoyo y permitiéndome trabajar contigo, por darme mucho ánimo, cariño y sobre todo tu amistad y comprensión en los momentos difíciles. De ti Antonio qué voy a decir,..., GRACIAS, GRACIAS Y MIL GRACIAS por todo,..., por formarme, por aconsejarme,..., por tu paciencia, que a veces ha sido infinita, por tu implicación en el trabajo, por tu amistad, por los buenos momentos que hemos pasado juntos,... nunca olvidaré la semifinal del mundial y el gol de Puyol,... Puedo afirmar que la principal conclusión de esta tesis es vuestra amistad.

Al Dr. Juan de Dios Alché, mi “otro jefe”, por ser el culpable de que me apasione la microscopía ya que un buen maestro siempre logra captar el interés de sus alumnos, gracias por dejarme disfrutar de tu tiempo, algo impagable hoy en día, y de tus conocimientos. Siempre recordaré los bailes que nos marcamos en el congreso de Segovia con el amigo Juan....., er de la mochila.

A la conexión polaca, por su constante ayuda, apoyo y, sobre todo, paciencia, además de por su ejemplo como investigadores. Krzysztof, gracias por tus consejos “microscópicos” y “macroscópicos”, ha sido un honor conocerte y poder trabajar contigo y aprender de un tío grande de verdad. A ti Agiiitaa,..., o mejor,..., rubia de oro,... o tal vez,... agapedia,..., MUCHAS GRACIAS por todo. Por tu amistad, por tu amabilidad, por ofrecerme tus ideas y consejos, por aguantarme cada día,... y por hacer que esta tesis me haga candidato a la pipeta de oro, ¡je, je, je, je!, parte de ella también es tuya. Te echaré de menos donde vaya.

A mi Concha, por su apoyo, animo, cariño y por compartir conmigo muchos momentos tanto alegres como tristes y por darme una gran amistad. No te imaginas lo que te aprecio y lo que te voy a echar de menos.



A mis compañeras del laboratorio pequeño Dori y María José, echaré de menos nuestros baños de polen, los ratos de risas y los de no tanta risa, ha sido un honor contar con vuestro apoyo y cariño durante todo este tiempo.

Al chico “Plant Cell”, jje, je, je!, por sus consejos científicos y no científicos, por enseñarme que la gente auténtica todavía existe y por supuesto, por los buenos ratos.

No voy a olvidarme de toda aquella gente que encontré en el vagón cuando llegué ni de las que se han ido uniendo a él a lo largo del trayecto. A mi adorada Cintia, a mi querida Sonia, a la fugaz Elena, a Alicia y M<sup>a</sup> Carmen, a Estefanía y a mis amigos José Carlos y Mahdi. Gracias por compartir vuestras inquietudes y vuestro tiempo conmigo.

Por otra parte, quiero agradecer a las Dras. Dolores Garrido y Amada Pulido su cordialidad y asesoramiento con las gestiones administrativas para la presentación de esta tesis doctoral.

A mi amigo Manolo Casado, por ofrecerme su finca “El Llano” para la recolección de muestras y por su amabilidad con la que me recibía cada día.

A mi hermana, por darme las dos cositas más maravillosas que puede tener un tito. María y Paula sois unos torbellinos, pero os adoro. A mis padres, por su cariño, sacrificio, esfuerzo, enseñanzas, apoyo y ejemplo, por brindarme un hogar entrañable y enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr objetivos. No puedo expresar todo lo que siento por vosotros, solo digo GRACIAS, éste trabajo también es vuestro.

A Carmen María, mi amiga, mi compañera, mi ilusión, mi vida. Simplemente por ser como es. Con todas sus manías y defectos, con todas sus virtudes y bellezas. Gracias por inspirar mi vida, caminar a mi lado durante todo este tiempo y mostrarme con una sonrisa, que el amor de verdad puede existir. Esta tesis, en gran parte, es tuya.



El éxito de la fertilización en las Angiospermas depende en gran medida de la capacidad del polen para germinar y emitir un tubo polínico, el cuál transporta las espermátidas a través del pistilo hasta el saco embrionario. En este contexto, los objetivos de este proyecto fueron: 1) determinar la existencia de actividad esterolítica en el polen de olivo, 2) identificar y clasificar desde el punto de vista funcional las distintas enzimas estererasas, 3) determinar las funciones del exudado estigmático y el “pollen coat”, y 4) caracterizar a nivel bioquímico y molecular la enzima pectina metilesterasa del polen.

El polen de olivo contiene al menos 14 enzimas estererasas, agrupadas en tres clases: carboxilesterasas (2), acetilesterasas (6) y colinesterasas (6). Análisis funcionales mediante inhibidores químicos específicos mostraron un efecto adverso sobre la capacidad de germinar del polen y, en el caso del inhibidor DIFP, una disminución significativa de la longitud del tubo polínico. El polen de olivo también posee al menos 12 enzimas esterasa/lipasa capaces de hidrolizar ésteres de cadena larga. Las distintas enzimas presentaron una localización celular específica en el grano de polen y en el tubo polínico. Los datos obtenidos sugieren que las enzimas estererasas del polen están implicadas en la modificación selectiva de la pared celular del tubo polínico, en procesos de comunicación polen-estigma y en la movilización de los lípidos de reserva durante la germinación y el crecimiento del tubo polínico. Además, el perfil electroforético de actividades esterasa del polen varió de forma significativa entre distintos cultivares. Estas diferencias podrían traducirse en variaciones intervarietales en la propia funcionalidad del polen durante la germinación.

El análisis comparativo del proteoma de los exudados estigmáticos de olivo y *Lilium* permitió identificar un total de 576 proteínas, de las cuales 290 están presentes en el olivo y 286 en *Lilium*. Por otro lado, en el “pollen coat” se identificaron 162 proteínas. Entre las proteínas identificadas, destacan diversas enzimas estererasas implicadas en la modificación selectiva de los componentes polisacáridos de la pared del tubo polínico y en el catabolismo de los lípidos de reserva del polen. En términos generales, la composición del proteoma varía significativamente entre ambas especies. Este hecho parece reflejar profundas divergencias a nivel funcional, que en su mayor parte se podrían explicar por las propias características morfológicas y ecológicas de cada especie. Los datos obtenidos sugieren que el exudado estigmático es un sitio metabólicamente activo, y que participa directamente en la comunicación con el polen, la regulación del crecimiento del tubo polínico, y su adhesión y orientación en el estigma. La mayoría de las proteínas del exudado son secretadas a través del Golgi. Sin embargo, algunas de las proteínas identificadas no presentan un péptido señal, y podrían ser secretadas a través de la membrana plasmática mediante un mecanismo exocítico alternativo no regulado.



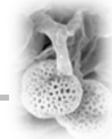
Finalmente, se clonó y caracterizó una enzima pectina metilesterasa (PME) de tipo I de 40 kDa en el polen de olivo, que se expresa durante su ontogenia y durante la germinación. En el polen, la actividad PME se localizó en vesículas presentes en el citoplasma de la célula vegetativa, así como en las aperturas del grano y la pared celular de la célula generativa. Este patrón de distribución de la actividad enzimática coincide con la localización subcelular de la proteína. Durante la germinación, la enzima se localizó principalmente en la capa pectocelulósica de la pared del tubo polínico y en el medio extracelular, donde es muy activa. La actividad PME se detectó en el citoplasma de las papilas y en el exudado estigmático. El patrón de expresión del gen y la proteína es idéntico lo que sugiere que la expresión de dicha proteína está probablemente regulada a nivel transcripcional. Esta enzima estaría implicada, a través de la degradación controlada de los compuestos pécticos, en la separación de las microsporas de la tétrada en la antera, y en la consolidación de la pared celular primaria del tubo polínico durante la germinación.



<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. La reproducción sexual en las Angiospermas.....	3
1.2. El polen.....	4
1.2.1. La pared del polen: estructura y función.....	5
1.2.2. La pared del tubo polínico: estructura y función.....	7
1.3. El pistilo.....	10
1.3.1. El exudado estigmático: origen, composición y función.....	11
1.3.2. La pared celular del pistilo.....	12
1.4. Estructura y composición de la pared celular vegetal.....	12
1.4.1. Pectinas.....	13
1.4.2. Enzimas estererasas implicadas en la modificación de pectinas.....	14
1.4.3. Otros enzimas estererasas implicadas en el crecimiento del tubo.....	17
1.5. El olivo.....	18
1.5.1. El ciclo reproductivo del olivo.....	19
1.5.2. Estudios sobre la reproducción sexual en el olivo.....	21
<b>CAPÍTULO 2: OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
<b>CAPÍTULO 3: MATERIAL y MÉTODOS</b>	<b>27</b>
3.1. Material vegetal.....	29
3.1.1. Polen maduro.....	29
3.1.2. Exudado estigmático.....	30
3.1.3. Anteras.....	30
3.2. Métodos.....	30
3.2.1. Ensayos de viabilidad del polen mediante el test FDA.....	30
3.2.2. Germinación <i>in vitro</i> del polen.....	31
3.2.3. Extracción de proteínas totales de polen maduro y germinado.....	32
3.2.4. Cuantificación de proteínas.....	34
3.2.5. Ensayos <i>in vitro</i> de la actividad esterasa no específica (NE).....	34
3.2.6. Inhibición <i>in vitro</i> de la actividad esterasa NE.....	35
3.2.7. Ensayos <i>in vitro</i> de la actividad pectina metilesterasa (PME).....	36
3.2.8. Electroforesis semi-nativa en geles de poliacrilamida.....	37
3.2.9. Ensayos <i>in gel</i> de la actividad esterasa NE.....	39
3.2.10. Inhibición <i>in gel</i> de la actividad esterasa NE.....	39
3.2.11. Ensayos <i>in gel</i> de la actividad esterasa/lipasa.....	40
3.2.12. Inhibición <i>in gel</i> de la actividad esterasa/lipasa.....	40



3.2.13. Electroforesis nativa en geles de poliacrilamida.....	41
3.2.14. Ensayos <i>in gel</i> de la actividad PME.....	42
3.2.15. Ensayos de inhibición durante la germinación <i>in vitro</i> del polen.....	43
3.2.16. Preparación de muestras para microscopía.....	44
3.2.16.1. Preparación de muestras para histoquímica.....	44
3.2.16.2. Preparación de muestras para inmunocitoquímica.....	45
3.2.16.3. Microtomía.....	47
3.2.16.4. Contrastado de cortes ultrafinos.....	47
3.2.16.5. Preparación de muestras para microscopía de barrido.....	48
3.2.17. Localización celular de la actividad esterasa NE en el polen.....	49
3.2.18. Localización celular de la actividad PME en el polen.....	51
3.2.19. Localización celular de la actividad esterasa/lipasa en el polen.....	52
3.2.20. Localización celular de la actividad acetilcolinesterasa en el polen....	53
3.2.21. Análisis de proteómica.....	54
3.2.21.1. Extracción de proteínas del exudado del estigma.....	54
3.2.21.2. Marcado y extracción de proteínas del “pollen coat”.....	54
3.2.21.3. Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE).....	56
3.2.21.4. Tinción de proteínas.....	57
3.2.21.5. Identificación de proteínas mediante LC-MS/MS.....	58
3.2.21.6. Identificación de proteínas por secuenciación <i>de novo</i> .....	59
3.2.22. Clonación de una pectina metilesterasa (PME) del polen.....	59
3.2.22.1. Aislamiento y cuantificación de ARN total.....	59
3.2.22.2. Síntesis de ADNc (transcripción reversa).....	60
3.2.22.3. Amplificación del ADNc mediante PCR.....	61
3.2.22.4. Amplificación de los extremos 3' y 5' mediante RACE.....	63
3.2.22.5. Clonación de los productos de PCR en <i>Escherichia coli</i> .....	65
3.2.22.6. Electroforesis en geles de agarosa.....	66
3.2.22.7. Purificación del ADN plasmídico (minipreps).....	67
3.2.22.8. Secuenciación del ADN.....	68
3.2.22.9. Análisis bioinformático.....	69
3.2.23. Análisis de expresión de la PME de polen de olivo.....	69
3.2.23.1. RT-PCR semicuantitativa.....	69
3.2.23.2. Western blot.....	70
3.2.24. Estudios de inmunolocalización de la PME de olivo.....	72
3.2.24.1. Inmunolocalización de la PME en anteras y estigmas.....	72



3.2.24.2. Inmunolocalización de la PME en el polen de olivo.....	73
3.2.24.3. Inmunolocalización de la PME a nivel ultraestructural.....	74
3.2.25. Análisis de densitometría.....	75
3.2.26. Análisis estadísticos.....	76
<b>CAPÍTULO 4: RESULTADOS</b>	<b>77</b>
<b>4.1. Detección de actividad esterolítica en el polen de olivo.....</b>	<b>79</b>
4.1.1. Detección de actividad esterasa no específica en el polen.....	79
4.1.2. Detección de actividad pectinolítica en el polen.....	83
<b>4.2. Perfil electroforético de actividades estererasas en el polen de olivo.....</b>	<b>86</b>
4.2.1. Análisis electroforético de la actividad esterasa NE del polen.....	86
4.2.2. Análisis electroforético de la actividad PME del polen.....	95
<b>4.3. Análisis funcional de las enzimas estererasas mediante inhibidores.....</b>	<b>97</b>
<b>4.4. Localización celular de la actividad esterasa en el polen de olivo.....</b>	<b>99</b>
4.4.1. Localización celular de la actividad esterasa NE.....	99
4.4.2. Localización celular de la actividad esterasa/lipasa.....	103
4.4.3. Localización celular de la actividad acetilcolinesterasa.....	105
4.4.4. Localización celular de la actividad PME.....	107
<b>4.5. Análisis de proteómica.....</b>	<b>109</b>
4.5.1. Análisis proteómico del exudado estigmático.....	109
4.5.2. Análisis proteómico del “pollen coat” del olivo.....	120
<b>4.6. Caracterización de una pectina metilesterasa del polen de olivo.....</b>	<b>126</b>
4.6.1. Clonación de una PME del polen de olivo.....	126
4.6.2. Análisis de expresión de la PME durante la ontogenia del polen.....	130
4.6.3. Análisis de expresión de la PME durante la germinación del polen....	134
4.6.4. Localización celular de la PME en el polen y el tubo polínico.....	135
<b>CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN</b>	<b>141</b>
<b>5.1. El polen de olivo contiene numerosas enzimas estererasas implicadas en la germinación.....</b>	<b>143</b>
<b>5.2. El perfil de actividades estererasas varía entre cultivares de olivo.....</b>	<b>147</b>
<b>5.3. El exudado estigmático es un sitio metabólicamente activo que muestra divergencias funcionales entre especies.....</b>	<b>149</b>
5.3.1. Diferencias en el perfil metabólico del exudado.....	149
5.3.2. Diferencias en los mecanismos de defensa y respuesta a estrés.....	151
5.3.3. Proteínas relacionadas con la autoincompatibilidad y la muerte celular programada (PCD) del estigma.....	153



<b>5.4. El exudado estigmático y el “pollen coat” contienen distintas enzimas esterazas.....</b>	<b>154</b>
5.4.1. Enzimas esterazas implicadas en la modificación de la pared celular..	154
5.4.2. Enzimas esterazas/lipasas implicadas en el metabolismo lipídico.....	155
<b>5.5. El exudado estigmático y el “pollen coat” están implicados en diversos procesos de interacción entre el polen y el estigma.....</b>	<b>156</b>
5.5.1. Modificación selectiva de la pared celular del tubo polínico.....	156
5.5.2. Comunicación polen-estigma.....	157
5.5.3. Adhesión y orientación del tubo polínico.....	159
5.5.4. Respuestas de defensa y frente a estrés.....	159
<b>5.6. El exudado estigmático y el “pollen coat” contienen algunas proteínas inesperadas.....</b>	<b>160</b>
<b>5.7. El polen de olivo expresa una PME durante el desarrollo.....</b>	<b>160</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>165</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>169</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>185</b>



# **INTRODUCCIÓN**

“En el fondo, los científicos somos gente con suerte:  
podemos jugar a lo que queremos durante toda la vida”

Lee Smolin

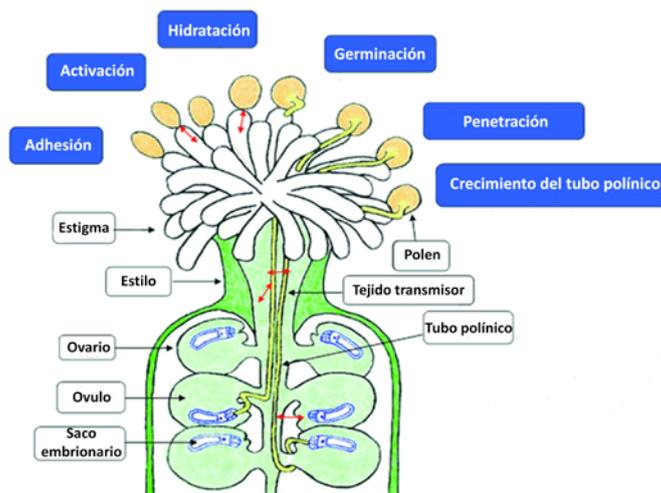




## 1.1. La reproducción sexual en las Angiospermas

La reproducción sexual es el proceso de creación de un nuevo organismo a partir de la combinación del material genético de dos organismos diferentes. La ventaja biológica de la reproducción sexual frente a la reproducción asexual proviene de la recombinación del material genético durante la meiosis y la fusión del material genético de ambos progenitores. Ambos procesos introducen variabilidad genética en una población y dan lugar a la aparición de nuevos caracteres fenotípicos sobre los que actúa la selección natural, favoreciéndose de este modo la evolución de la especie.

La reproducción sexual en las Angiospermas tiene lugar en estructuras especializadas denominadas flores, las cuales presentan uno o más estambres (órgano reproductor masculino) y un pistilo (órgano reproductor femenino) formado por uno o más carpelos. Comprende dos etapas principales: 1) la formación de los gametos haploides mediante meiosis, y 2) la fertilización y formación del cigoto diploide, como resultado de la fusión de los gametos femenino y masculino. Durante la polinización, el polen (gametofito masculino) es transportado desde la antera hasta la superficie del estigma, generalmente mediante el aire (polinización anemófila) o a través de insectos (polinización entomófila). La llegada del polen al estigma marca el inicio de la fase progámica, que comienza con la adhesión del polen a la superficie del estigma. Sobre él, el grano de polen quiescente se hidrata, se activa metabólicamente, y germina, emitiendo un tubo polínico a través de una de las aperturas de la pared del polen (Figura 1.1).



**Figura 1.1.** Etapas de la fase progámica en las Angiospermas (esquema adaptado de Feijó 2010).



Una vez germinado el grano, el tubo polínico penetra el estigma a través de los espacios intercelulares y crece a lo largo del estilo hacia el ovario. En el ovario, el tubo polínico penetra en el saco embrionario a través del micropilo y libera las dos células gaméticas, dando lugar a la doble fertilización característica de las Angiospermas. Uno de los núcleos gaméticos se fusiona con la ovocélula para dar lugar al embrión, mientras que el otro se une con los dos núcleos polares dando lugar al endospermo triploide. Este complejo proceso conlleva numerosas interacciones entre el grano de polen y el pistilo, todo ello bajo un estrecho control genético (Herrero y Hormaza 1996; de Graaf *et al.* 2001).

### 1.2. El polen

La ontogenia del grano de polen transcurre en el interior del lóculo de la antera, y se inicia a partir de una célula madre del polen (CMP) diploide, la cual se divide mediante meiosis dando lugar a cuatro microsporas haploides agrupadas en una tétrada (Figura 1.2).

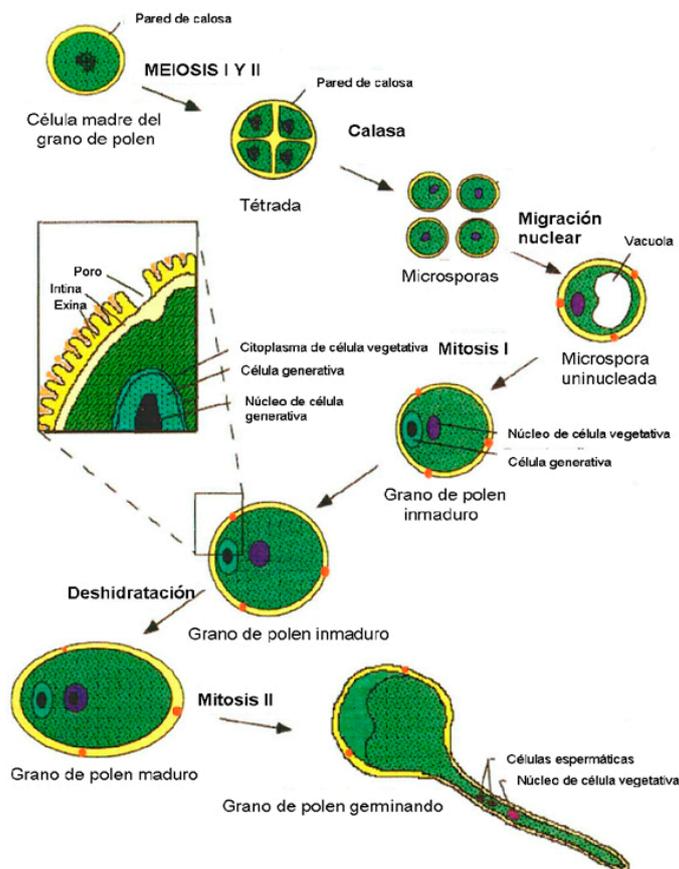


Figura 1.2. Formación y desarrollo del grano de polen (esquema adaptado de McCormick 2004).



Después de una larga interfase y un proceso de vacuolización del citoplasma, la microspora libre de la tétrada sufre una división mitótica asimétrica, que da lugar a dos células diferentes en tamaño, contenido genético y función: la célula vegetativa y la célula generativa (Knox 1984). El grano de polen maduro está constituido por 2 ó 3 células, según las especies. En las especies con polen tricelular (ej. *Arabidopsis thaliana*), la célula generativa se divide mediante mitosis en el citoplasma de la célula vegetativa y da lugar a dos células gaméticas, también llamadas espermatidas. En las especies con polen diploide (ej. olivo), la división mitótica de la célula generativa tiene lugar en el citoplasma del tubo polínico, una vez iniciada la germinación del polen. La función de la célula vegetativa es la de nutrir a la célula generativa y formar un tubo polínico para transportar a los gametos hasta el saco embrionario. Por su parte, las células gaméticas son las encargadas de llevar a cabo la fertilización (Higashiyama *et al.* 2001).

### 1.2.1. La pared del polen: estructura y función

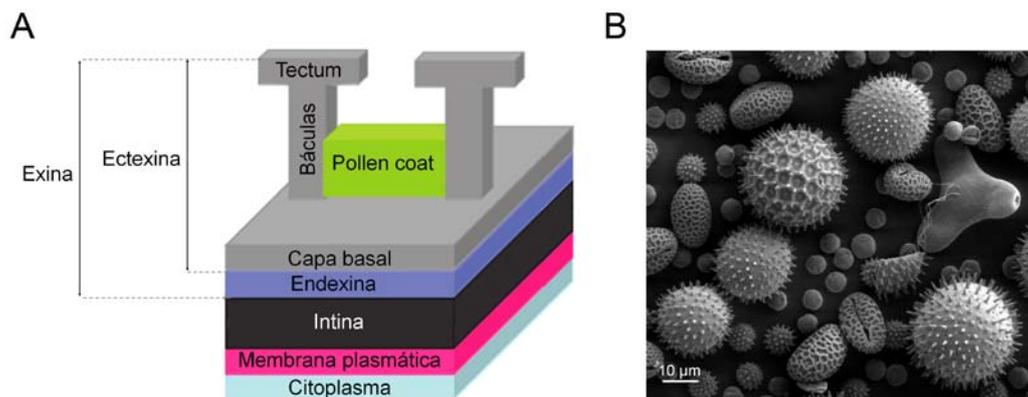
El grano de polen está rodeado por una pared celular compleja y muy resistente que protege al microgametofito durante su transporte desde la antera hacia el estigma (Knox 1984; Ariizumi y Toriyama 2011). Después de la meiosis, la tétrada de microsporas se encuentra englobada por una pared especial de calosa. A continuación, se forma la capa de primexina entre el plasmalema de la microspora y la pared de calosa de la tétrada. Esta capa de primexina está compuesta por microfibrillas de celulosa y actúa como un molde sobre el que se depositan y polimerizan los precursores de la esporopolenina, los cuales dan lugar a la formación de la exina (Heslop-Harrison 1968; Dickinson 1970; Horner y Pearson 1978; Fernández y Rodríguez-García 1988).

La estructura de la exina está totalmente consolidada cuando la pared de calosa se degrada y las jóvenes microsporas quedan libres en el interior del lóculo de la antera. Durante las etapas posteriores de desarrollo, se forma la capa interna de la pared del polen o intina. Finalmente, los restos celulares procedente de la degradación del *tapetum* se depositan sobre la superficie externa de la pared, rellenando las cavidades y huecos de la exina, y dando lugar a la formación de la cubierta del polen o “pollen coat”. La pared del polen maduro está constituida por dos capas bien diferenciadas en su composición y función: la capa externa o exina y la interna o intina.

La exina es la pared propiamente dicha del grano de polen. Se trata de una de las paredes celulares vegetales más complejas tanto por su estructura como por su composición. La exina está constituida en su mayor parte por esporopolenina, un politerpeno hidrofóbico y altamente resistente a la biodegradación y a los agentes químicos. Desde el punto de vista estructural, la



exina está compuesta por una capa interna en contacto con la intina conocida como endexina y una externa o ectexina (Erdtman 1960). Esta última es la parte estructurada de la exina y está compuesta por una capa basal o “footlayer”, sobre la que se encuentran elementos verticales a modo de bastones o columnas, denominados báculas o columelas, que pueden estar total o parcialmente cubiertas por una capa externa, más o menos gruesa, a modo de techo o *tectum*, el cual puede presentar elementos estructurales (Figura 1.3A). Todas estas estructuras y elementos ornamentales pueden estar o no presentes y confieren una gran diversidad estructural a la pared del polen, confiriéndole un gran valor taxonómico (Figura 1.3B). La función de la exina es la de proteger al grano frente a condiciones adversas, tales como períodos de desecación prolongada, altas temperaturas, exceso de radiación ultravioleta, y también frente a los daños mecánicos provocados por el ataque microbiano. La exina, de este modo mantiene la viabilidad de los granos de polen durante largos periodos de tiempo (Scott 1994).



**Figura 1.3.** A) Estructura de la pared del grano de polen (esquema adaptado de Erdtman 1960). B) Fotomicrografía a microscopía electrónica de barrido de granos de polen de varias especies de plantas en la que se observa la gran diversidad estructural de la pared del polen.

La intina está formada por una matriz amorfa, poco densa a los electrones y está compuesta mayoritariamente de pectinas y hemicelulosa. Debido a su semejanza en estructura y composición con la pared primaria de las células meristemáticas, la intina es considerada como la pared primaria del grano de polen, mientras la exina correspondería a la pared secundaria o terciaria.

Las aperturas o lugar de salida del tubo polínico durante la germinación del polen constituyen otra de la característica estructural de gran importancia de gran importancia es otro carácter importante dentro de la pared del polen. La ontogenia de las aperturas ocurre de forma paralela a la formación de la exina. En el estadio de tétrada, cuando en la primexina se depositan los



elementos estructurales precursores de la exina (probáculas), hay ciertas zonas en las que este proceso no ocurre debido a la presencia de pequeñas cisternas de RE que se sitúan paralelas al plasmalema, impidiendo que los determinantes de la estructura de la exina presentes en la microspora se establezcan en el plasmalema de dicha zona. Como consecuencia, en estas zonas se produce una desorganización del material de la exina y una disminución de su espesor. En las zonas de las aperturas se secreta una gran cantidad pectinas y otros componentes que hacen que la capa de intina en esta zona sea mucho más gruesa que el resto del grano. El número de aperturas en el polen es variable según las especies.

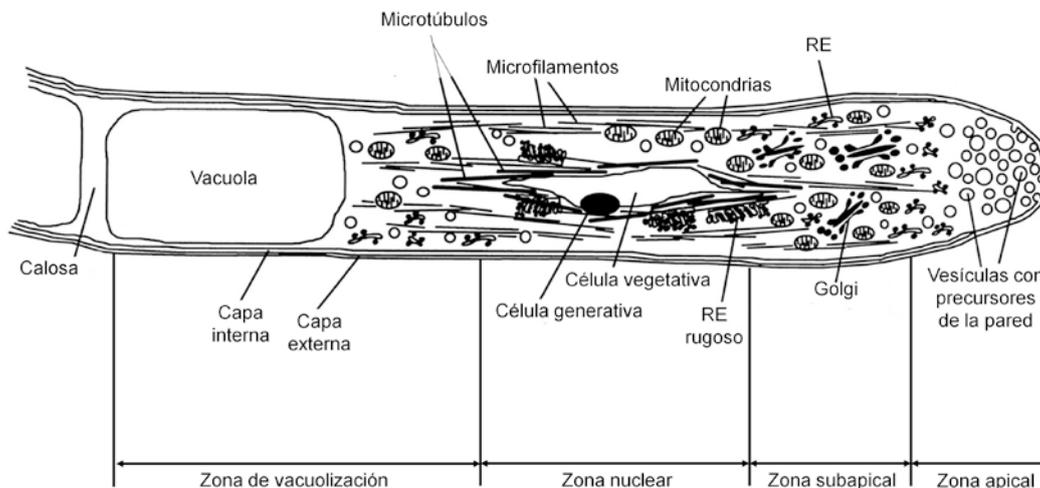
El “pollen coat” es la capa más externa del polen, y se forma a partir de los restos celulares del *tapetum*, los cuales se depositan sobre la exina, entre los elementos estructurales y en el interior de los orbículos (Piffanelli *et al.* 1997). Su composición es mayoritariamente de naturaleza lipídica, aunque también contiene proteínas, carbohidratos y compuestos aromáticos (Pacini 1997; Piffanelli *et al.* 1998; Dickinson *et al.* 2000; Edlund *et al.* 2004). Entre las funciones del “pollen coat”, destacan la de facilitar la polinización entomófila, debido a la presencia de 1) pigmentos (ej. carotenos y flavonoides) que le confieren al polen un color amarillo que atrae a los insectos (Pacini y Franchi 1993; Nepi *et al.* 2003), 2) compuestos que le confieren al polen un gran valor nutricional (Dobson y Bergström 2000), 3) compuestos orgánicos volátiles que actúan como atrayentes de determinados insectos (Robertson *et al.* 1993; Dobson *et al.* 1996), y 4) compuestos que le confieren al polen la capacidad de adherirse mediante uniones electrostáticas al cuerpo del insecto (Vaknin *et al.* 2000) con la fuerza suficiente y adecuada como para separarse de él cuando éste se posa sobre el estigma (Knoll 1930; Pacini y Franchi 1993). El “pollen coat” también desempeña una función protectora frente a la deshidratación y la radiación UV (Speranza *et al.* 1997; Nepi *et al.* 2001; Hsieh y Huang 2007). Además, en las especies con estigma seco, el “pollen coat” juega un papel clave en la adhesión del grano a la superficie del estigma y en la hidratación del polen (Edlund *et al.* 2004).

### 1.2.2. La pared del tubo polínico: estructura y función

El tubo polínico es una extensión del citoplasma de la célula vegetativa que emerge a través de una de las aperturas del grano, crece de forma apical (Bosch *et al.* 2005) y transporta los gametos masculinos hasta el gametofito femenino o saco embrionario (Williams 2008; Abercrombie *et al.* 2011). Desde el punto de vista ultraestructural, en el tubo polínico se diferencian 4 zonas funcionales (Figura 1.4). La zona apical o zona clara se caracteriza por la ausencia de orgánulos celulares y la presencia de un gran número de vesículas de Golgi que



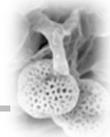
se fusionan con el plasmalema, liberando al exterior precursores de la pared (Malhó *et al.* 2005, Geitmann y Steer 2006). La región subapical es rica en mitocondrias, dictiosomas y retículo endoplasmático. La zona nuclear es donde se localiza el núcleo vegetativo y las células gaméticas. Finalmente, la zona vacuolada se caracteriza por la presencia de una vacuola, la cual se hace más grande a medida que el tubo polínico va creciendo. Durante el crecimiento continuo del tubo polínico, se forman tapones de calosa a intervalos de distancia regulares (Heslop-Harrison 1987) que separan la vacuolada del tubo y confinan el citoplasma del tubo en la zona de crecimiento del mismo.



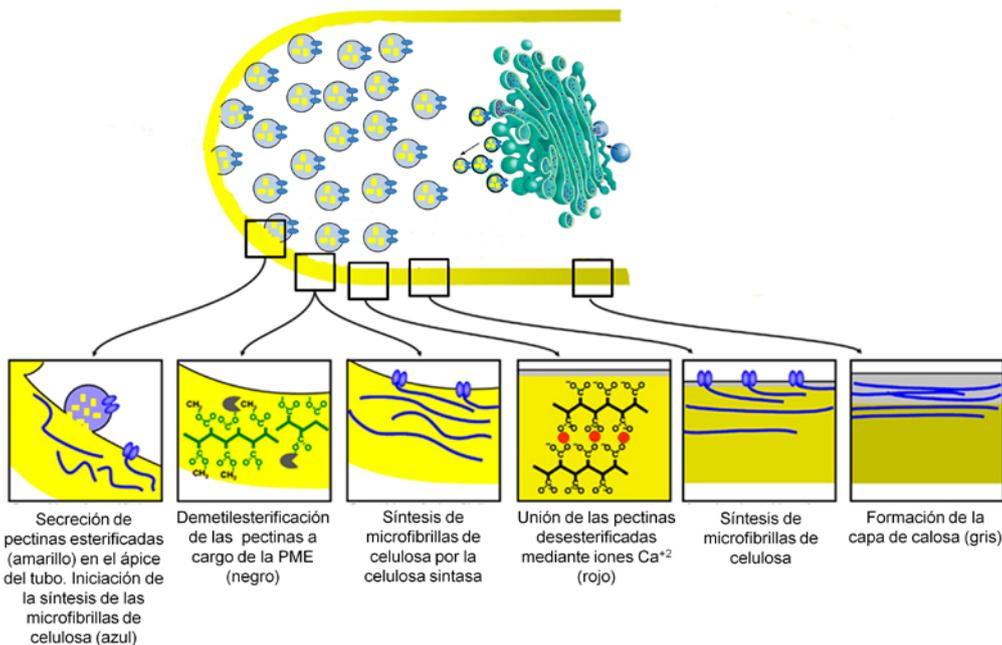
**Figura 1.4.** Esquema de zonación del tubo polínico (adaptado de Franklin-Tong 1999).

La pared del tubo polínico difiere significativamente de la pared de las células meristemáticas tanto en su estructura como en su función. Está formada por una pared primaria compuesta mayoritariamente de pectinas, y una pared secundaria más interna de calosa que se extiende a lo largo del tubo salvo en el ápice (Heslop-Harrison 1987, Steer y Steer 1989). En algunas especies, se ha descrito una pared terciaria de celulosa (Kroh y Knuiman 1982), aunque el contenido es bajo en relación al resto de polímeros que constituyen la pared del tubo, y no presenta la organización micro-fibrilar característica de este biopolímero (Schlupmann *et al.* 1994).

El crecimiento del tubo polínico es está restringido exclusivamente a su ápice (Bosch 2005), y es polar, dado que se produce en una sola dirección (Derksen 1996; Hepler *et al.* 2001; Parre y Geitmann 2005). La elongación del tubo está determinada por la secreción de vesículas derivadas del Golgi, que se fusionan con el plasmalema en el extremo apical del tubo, aportando componentes de la membrana plasmática y los distintos precursores de la pared celular necesarios para el crecimiento (Figura 1.5). La pared del tubo debe ser



suficientemente fuerte como para soportar la presión de turgor interna y, al mismo tiempo, tener la plasticidad necesaria para seguir creciendo (Steer y Steer, 1989). Por ello, la secreción de precursores de la pared tiene que ser rápida y continua a lo largo de todo el proceso (Geitmann y Steer 2006). En el ápice de la pared abundan las pectinas esterificadas que son sintetizadas en el Golgi (Figura 1.5) y secretadas mediante la vía exocítica clásica (Geitmann *et al.* 1995, 2005; Li *et al.* 2002). En la zona adyacente al ápice del tubo, estas pectinas sufren un proceso de demetilación a cargo de enzimas pectina metilesterasas (Figura 1.5). A continuación, las moléculas de pectinas se unen a iones  $\text{Ca}^{2+}$  y gelifican, formando pectatos que aumentan la rigidez de la pared.



**Figura 1.5.** Etapas en la formación de la pared celular del tubo polínico (esquema adaptado de Geitmann y Chebli 2011).

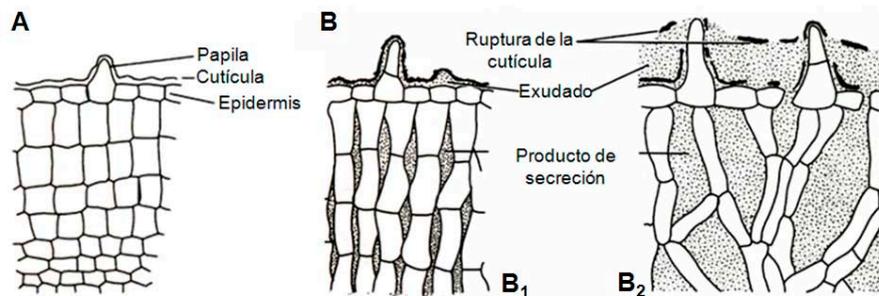
La pared del tubo polínico lleva a cabo múltiples funciones, entre las que destacan el control físico de la forma del tubo, la protección de la célula vegetativa y células espermáticas frente a daños mecánicos externos, y la protección frente a los cambios de presión osmótica de la propia célula vegetativa (Benkert *et al.* 1997; Geitmann y Steer 2006). También existen evidencias de que las pectinas y AGPs de la pared desempeñan un papel importante en la adhesión y orientación del tubo polínico en el tejido transmisor a su paso por el estilo (Jauh y Lord 1996; Lord 2000; Willats *et al.* 2001a). Finalmente, la pared del tubo polínico podría participar en reacciones de señalización celular y compatibilidad (Luu *et al.* 2000; Wheeler *et al.* 2001; McClure y Franklin-Tong 2006; Kumar y MacClure 2010).



### 1.3. El pistilo

El pistilo o gineceo es el órgano reproductor femenino de la flor. Está formado por uno (pistilo simple o monocarpelar) o varios carpelos fusionados (pistilo compuesto o pluricarpelar) y presenta una morfología muy variada según las especies. En general, suele tener forma de botella, con un ensanchamiento en la base, de forma más o menos ovoide, conocida como ovario que se prolonga con una estructura tubular en forma de cuello de botella, denominada estilo, que termina en una zona más o menos engrosada, denominada estigma.

El estigma se sitúa en la zona superior del pistilo y su morfología es variable dependiendo de la especie (Heslop-Harrison y Shivanna 1977; Heslop-Harrison 1981). Consta de un tejido basal interno parenquimático, rodeado por un tejido secretor, que suele terminar en unas extensiones a modo de papilas (Serrano *et al.* 2008). Existen dos tipos de estigma (Figura 1.6).



**Figura 1.6.** Tipos de estigma en las Angiospermas (esquema adaptado de Shivanna 2003). **A)** Esquema de un estigma seco (Ej. *Arabidopsis*). **B)** Esquema de un estigma húmedo (ej. *Lilium*) Al inicio del desarrollo, se observa una fina cutícula depositada sobre la superficie del estigma ( $B_1$ ). En la madurez, los productos de secreción se acumulan en los espacios intercelulares y en la superficie externa del estigma, provocando la ruptura de la cutícula ( $B_2$ ).

Los estigmas de tipo húmedo (ej. *Prunus*, *Lilium*, *Petunia*, etc.) se caracterizan por presentar papilas uni- o multicelulares, las cuales secretan al espacio inter- y extracelular un exudado rico en proteínas, lípidos y polisacáridos (Heslop-Harrison y Shivanna 1977). Los estigmas de tipo seco (ej. *Arabidopsis*, *Brassica*, *Cucurbita*) no producen exudado y están recubiertos por una cutícula cerosa impermeable y una delgada película de naturaleza proteica (Edlund *et al.* 2004; Hiscock y Allen 2008).

El estilo es una estructura tubular de dimensiones variables y que conecta el estigma con el ovario. Consta de un tejido externo o epidermis, un tejido intermedio o parénquima en el que se encuentran los vasos conductores y una zona central, que puede estar ocupada o no por el tejido transmisor. Se diferencian dos clases de estilos, según sea la estructura y organización de sus tejidos. En los estilos huecos, la zona central está formada por un canal hueco



denominado canal estilar cuya superficie está revestida por una epidermis de naturaleza secretora (ej. *Lilium*). En los estilos sólidos, la zona central está ocupada por el tejido trasmisor, también de naturaleza secretora (Knox 1984; Lord 2000; de Graaf *et al.* 2001).

El ovario es la parte inferior del pistilo. Su tamaño es variable y generalmente tiene una forma ovoide. En su interior hay una o varias cavidades (lóculos) donde se alojan los óvulos. Dependiendo de las especies, el saco embrionario puede desarrollarse en su totalidad y ser receptivo al inicio de la polinización, o bien completar su desarrollo durante dicho proceso. Este hecho es determinante en el tiempo que transcurre entre la polinización y la fecundación del saco embrionario, que puede ser de horas, días o semanas dependiendo de las especies.

### 1.3.1 El exudado estigmático: origen, composición y función

El exudado estigmático es una secreción acuosa más o menos viscosa (Shivanna y Owens 1989) que es producida en el interior de las papilas estigmáticas, secretada a las paredes celulares, y almacenada en los espacios intercelulares y el espacio extracelular (Dumas *et al.* 1978; Miki-Hirosige *et al.* 1987; Slater *et al.* 1990). En los estadios iniciales del desarrollo, no existe secreción de exudado y la superficie del estigma aparece cubierta por una fina cutícula (Figura 1.6B). En las etapas finales del desarrollo, se inicia la secreción del exudado que se acumula entre los espacios intercelulares y en la superficie del estigma, provocando la ruptura de la cutícula, y alcanzando el máximo cuando el estigma es receptivo (Konar y Linskens 1966; Dumas 1974).

El exudado estigmático está compuesto por agua, lípidos, polisacáridos, proteínas tales como esterasas, fosfatasa ácida y peroxidasas (Heslop-Harrison y Shivanna 1977; Ghosh y Shivanna 1982; Schou y Matsson 1985; Kandasamy y Kristen 1987; Luu *et al.* 1999; Nieuwland *et al.* 2005; McInnis *et al.* 2006; Shakya y Bhatla 2010), compuestos fenólicos (Konar y Linskens 1966; Martin 1969; Labarca *et al.* 1970), aminoácidos y azúcares libres (Punsey *et al.* 2008), iones (Bednarska *et al.* 2005) y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Zafra *et al.* 2010). La concentración de cada uno de estos compuestos varía mucho entre especies (Labarca *et al.* 1970; Portnoi y Horovitz 1977; Kristensen *et al.* 1979; Kandasamy y Vivekanandan 1983; Miki-Hirosige *et al.* 1987).

El exudado del estigma cumple un papel importante en la interacción polen-pistilo, siendo responsable de la adhesión del polen a la superficie estigmática, de controlar la hidratación del polen (Wolters-Arts *et al.* 2002), de proteger al pistilo frente a patógenos (Knox 1984; Kuboyama 1998; Carter *et al.* 2004; McInnis *et al.* 2006), y de nutrir al tubo polínico (Kroh y Loewus 1968; Kroh *et al.* 1970; Herrero y Dickinson 1980; Lord 2003; Sánchez *et al.* 2004).



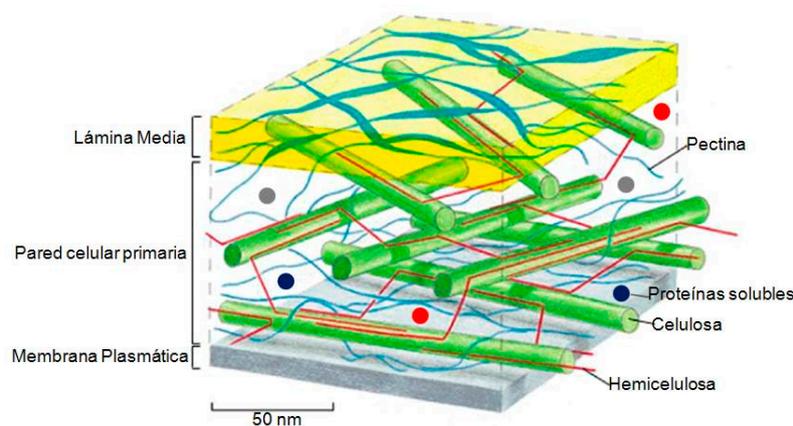
### 1.3.2. La pared celular del pistilo

Las células del pistilo, al igual que otros tejidos, están rodeadas por una estructura rígida, que se asienta externamente sobre la membrana plasmática, y a través de la cual se producen las interacciones entre unas células y otras. La pared celular del pistilo no difiere aparentemente en su estructura y composición de la de la mayoría de los tejidos de la planta.

En el pistilo, la pared celular está implicada, además de como soporte estructural, en la adhesión, nutrición, regulación del crecimiento y orientación del tubo polínico (Lord 2003; Sánchez *et al.* 2004), y en el mecanismo de autoincompatibilidad de tipo esporofítico, a través de las proteínas SRK y SLG, que determina el reconocimiento y la consiguiente aceptación o rechazo del polen (Hiscock y McInnis 2003).

### 1.4. Estructura y composición de la pared celular vegetal

En los animales, las células están en contacto directo a través de la membrana plasmática. En las plantas, esta interacción se produce a través de la pared celular y la matriz extracelular. La pared celular está estructurada como una red de microfibrillas largas y rígidas de celulosa unidas entre sí por otros polisacáridos no fibrilares como hemicelulosas (Figura 1.7). Esta red se halla inmersa en una compleja matriz gelificada formada por pectinas muy hidratadas, proteínas solubles (ej. peroxidasas) y proteínas estructurales como extensinas y AGPs, compuestos fenólicos (lignina), solutos de baja molaridad, y agua (Van Buren 1979, Waldron *et al.* 2003; Brummell 2006). Sin embargo, no existe ningún modelo que explique con claridad cómo son las uniones que se producen entre los distintos elementos de la matriz (Van Buren 1979; McCann y Roberts 1996; Brett y Waldron 1996; Mort 2002; Waldron *et al.* 2003; Mohnen 2008).



**Figura 1.7.** Estructura de la pared celular vegetal (esquema adaptado de McCann y Roberts 1996).



La pared celular proporciona la forma y el soporte a la planta, ayuda a regular procesos fisiológicos, incluyendo la respuesta de defensa frente a agentes externos, y actúa de barrera física a la invasión de patógenos y en numerosos procesos fisiológicos relacionados con el crecimiento y desarrollo (Carpita y McCann 2000).

#### 1.4.1. Pectinas

Las pectinas son polisacáridos complejos, muy hidratados y ricos en ácido D-galacturónico. Son sintetizadas y secretadas por el aparato de Golgi. Están presentes en la lámina media y la pared celular primaria, y representan el 30-35% del peso seco de la pared (Brummell 2006). Existen 3 clases de pectinas: homogalacturanos (HGA), ramnogalacturanos I (RGI), y ramnogalacturanos II (RGII) (Figura 1.8).

Los HGA son homopolisacáridos lineales de  $\leq 100$  residuos de ácido galacturónico (GalA), y representan el 60% del total de las pectinas que forman la pared celular (Thibault *et al.* 1993; Mohnen 2008; Caffall y Mohnen 2009; Wolf *et al.* 2009). Los residuos de GalA pueden estar metilados en el C6 y/o acetilados en el C2 o C3 (Ridley *et al.* 2001; Mohnen 2008). En los HGA también se pueden encontrar iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  o  $\text{NH}_4^+$  (Jayani *et al.* 2005).

Los RGI son heteropolisacáridos están formados por  $\geq 100$  repeticiones del disacárido (1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-ramnosa-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GalA. Los residuos de ramnosa pueden estar sustituidos en el C4 por cadenas laterales de azúcares neutros, tales como arabinanos, galactanos y arabinogalactanos (Vincken *et al.* 2003, Mohnen, 2008), y ácidos (Albersheim *et al.* 1996; Ridley *et al.* 2001). Los residuos de GalA pueden estar acetilados, pero la esterificación con grupos metilo no se ha demostrado aún (Voragen *et al.* 2009). Los RGII son heteropolisacáridos formados por polímeros de HGA con cadenas laterales de azúcares poco comunes (Ridley *et al.* 2001; Voragen *et al.* 2009).

Las pectinas desempeñan múltiples funciones (Van Buren 1979; Thaku *et al.* 1997; Willats *et al.* 2001a; Mohnen 2008; Voragen *et al.* 2009; Wolf *et al.* 2009). En primer lugar, contribuyen a la resistencia mecánica de la pared celular y a la adhesión entre células. Además, las pectinas influyen en otras propiedades de la pared celular como la porosidad, la superficie de carga, el pH y el equilibrio iónico, y por tanto, son importantes para el transporte de iones, y para la capacidad de retención del agua. Además, las pectinas pueden actuar como moléculas de señalización, y en la respuesta al ataque de patógenos durante el desarrollo de la planta.

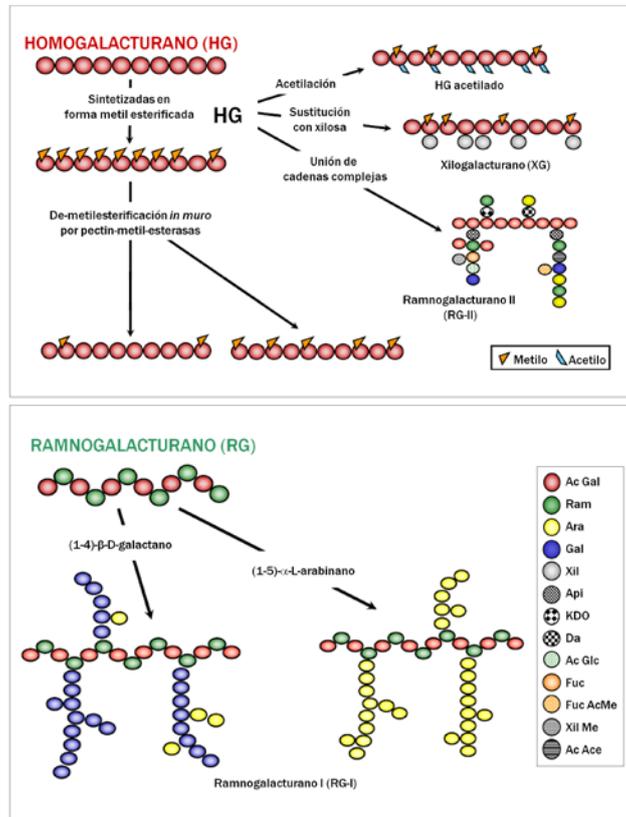
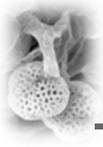


Figura 1.8. Tipos de pectinas presentes en la pared vegetal (esquema adaptado de <http://www.bmb.leeds.ac.uk/staff/jpk>).

### 1.4.2. Enzimas esterasas implicadas en la modificación de pectinas

Las pectina metilesterasas (PMEs) (E.C. 3.1.1.1) son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces metoxiéster del C6 de los residuos de GalA de las pectinas esterificadas, creando grupos carboxilo cargados negativamente y liberando metanol y H<sup>+</sup> en el proceso (Figura 1.9). La acción de estas enzimas provoca un cambio en el patrón de metilación de las pectinas, afectando a su funcionalidad (Rexova-Benkova y Markovic 1976; Ridley *et al.* 2001; Pelloux *et al.* 2007).

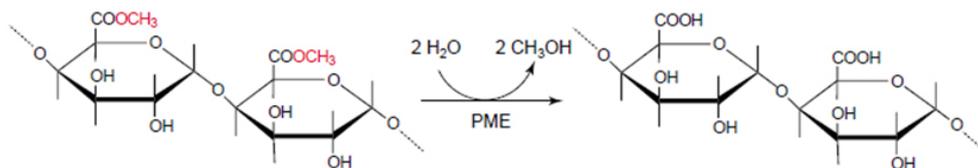
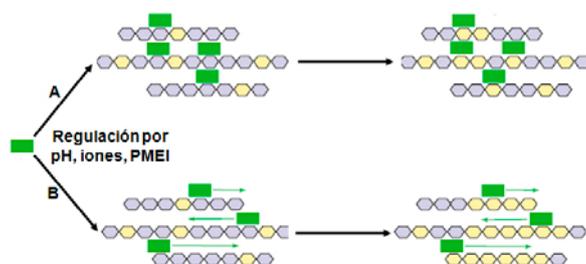


Figura 1.9. Reacción de demetilación de los residuos GalA de las pectinas por la acción enzimática de la PME (Micheli 2001).



Las PME's son enzimas ubicuas de tamaño medio (25-54 kDa), y codificadas por familias multigénicas (Bordenave 1996; Benen *et al.* 2003; Pelloux *et al.* 2007). En las plantas, están presentes en frutos, hojas, tallos, raíces y polen (Rexova-Benkova y Markovic 1976; Li *et al.* 2002; Markovic *et al.* 2002; Benen *et al.* 2003, Bosch *et al.* 2005). Las PME's de plantas están asociadas a la pared celular (Rexova-Benkova y Markovic 1976; Bordenave 1996), aunque también se han detectado algunas formas solubles (Bordenave 1996; Benen *et al.* 2003; Ciardiello *et al.* 2004). La actividad de las PME's de plantas es muy sensible a la concentración de cationes (Nari *et al.* 1991), cuya concentración óptima depende de la naturaleza del catión, el pH de la pared celular y el grado de metilesterificación de las pectinas (Micheli 2001). Algunas isoformas se expresan constitutivamente (Gaffe *et al.* 1994; Giovane *et al.* 1994; Micheli 2001), mientras que otras son específicas de un tejido, o se expresan en un estadio concreto del desarrollo (Bordenave 1996; Micheli *et al.* 2000; Markovic y Janecek 2004) o en respuesta a estímulos ambientales (Pelloux *et al.* 2007).

El mecanismo de acción de las PME's aún no está claro (Micheli 2001). Las PME's ácidas podrían ejercer su actividad esterasa al azar, dando lugar a una distribución aleatoria de los residuos de GalA desesterificados en las pectinas (Figura 1.10A). Las PME's alcalinas eliminan los enlaces metoxiéster de forma lineal desde el extremo reductor de la pectina, dando lugar a largas cadenas de residuos de GalA desesterificados (Figura 1.10B).

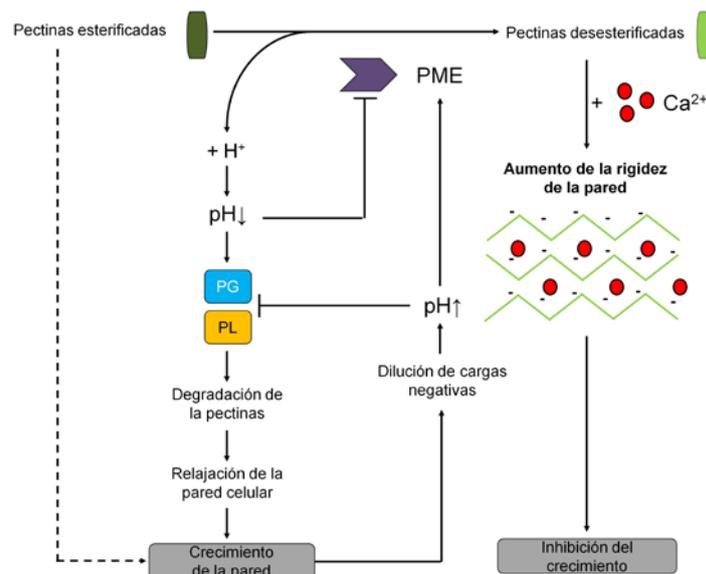


**Figura 1.10.** Mecanismos de acción propuestos para las PME's. Dependiendo de las propiedades de la pared celular, las PME's (cuadrados verdes) pueden actuar desesterificando las moléculas de ácido D-galacturónico (GalA) al azar (A) o de forma lineal (B). Las moléculas de GalA metilesterificadas se representan de color violeta y las desesterificadas de amarillo (esquema adaptado de Micheli 2001).

El mecanismo de regulación de la actividad de las PME's en plantas podría implicar una expresión diferencial, tanto temporal como espacial de las diferentes isoformas de las PME's (Markovic y Janecek 2004; Louvet *et al.* 2006). La acción de las PME's produce una liberación de  $H^+$  que dan lugar a una disminución local del pH de la pared celular (Figura 1.11). Se ha propuesto que



esta acidificación podría inhibir la actividad de ciertas PME y activar a otras enzimas hidrolasas de la pared (ej. poligalacturonasas y pectato liasas) dependientes del pH, las cuales contribuirían a la relajación de la pared celular, facilitando así su crecimiento (Moustacas *et al.* 1991; Bordenave 1996; Brummell y Harpster 2001, Wakabayashi *et al.* 2003; Bosch y Hepler 2005).



**Figura 1.11.** Mecanismo de regulación de la actividad PME en la zona apical del tubo polínico (esquema adaptado de Bosch y Hepler 2005).

Al crecer la pared, la concentración de H<sup>+</sup> disminuye y aumenta el pH, inhibiendo las enzimas poligalacturonasas y pectato liasas y estimulando nuevamente la actividad de las PMEs (Figura 1.11). Como consecuencia, los grupos carboxilo libres de los residuos de GalA desesterificados pueden interactuar con el Ca<sup>2+</sup> formando pectatos los cuales contribuyen a incrementar la rigidez de la pared celular (Willats *et al.* 2001; Chen 2007). Determinadas hormonas vegetales (ej. auxinas) podrían estar también implicadas en la regulación de las PMEs (Micheli 2001). Finalmente, se han identificado y caracterizado unas proteínas en varias especies (ej. kiwi), denominadas proteínas inhibidoras de PMEs (PMEIs), que se unen al centro activo del enzima e inhiben su actividad (Balestrieri *et al.* 1990, Giovane *et al.* 2004, Bosch y Hepler 2005, Wolf *et al.* 2009).

La PMEs endógenas de plantas están involucradas en el metabolismo de las pectinas de la pared celular y, por tanto, participan en importantes procesos fisiológicos asociados con el desarrollo vegetativo (ej. pérdida de rigidez de las paredes celulares durante la maduración del fruto) (Pelloux *et al.* 2007; Wolf *et al.* 2009), y reproductivo (ej. microsporogénesis) (Tieman y Handa 1994; Wen *et al.* 1999; Micheli 2001; Bosch *et al.* 2005; Pelloux *et al.* 2007). Las PMEs de



plantas también están asociadas con respuestas de defensa frente al estrés biótico o abiótico, ya sea directamente a través de la interacción con los factores de virulencia (ej. unión de las PME a las proteínas de movimiento de algunos virus) o, indirectamente, a través de los productos (ej. metanol, H<sup>+</sup>, oligogalacturonidos) de las reacciones que catalizan (Dorokhov *et al.* 1999; Ridley *et al.* 2001; Pelloux *et al.* 2007).

Las pectina acetilsterasas (PAEs) (E.C 3.1.1.6) son enzimas que catalizan la eliminación de grupos acetilo presentes en los grupos hidroxilo de los átomos C2 o C3 de las pectinas esterificadas, liberando grupos acetato (Williamson 1991; Bordenave *et al.* 1995). Estos enzimas han sido aisladas de bacterias (Shevchik y Hugouvieux-Cotte-Pattat 1997, 2003), hongos (Kauppinen *et al.* 1995; Bonnin *et al.* 2008), y plantas (Williamson 1991; Bordenave *et al.* 1995; Christensen *et al.* 1996). Las pectinas podrían ser acetiladas en las vesículas de Golgi, para ser después incorporadas a la pared celular mediante exocitosis (Liners *et al.* 1994; Pauly y Scheller 2000; Scheller y Ulvskov 2010). Los niveles de expresión de las PAEs varían en función del estadio de desarrollo (Gou *et al.* 2008) y en respuesta a cambios de las condiciones ambientales (Liners *et al.* 1994; Vercauteren *et al.* 2002).

Las PAEs podrían desempeñar un papel crucial en la regulación de la estructura biofísica de los polímeros de pectina, dado que la hidrólisis parcial de los ésteres de acetilo mejora las propiedades de gelificación de la pared (Williamson *et al.* 1990, Ralet *et al.* 2003). Además, la desacetilación de las pectinas disminuye la hidrofobicidad del esqueleto de las mismas, incrementando su solubilidad en el agua (Rombouts y Thibault 1986). También, se ha demostrado que los ésteres de acetilo protegen a los polisacáridos de la digestión enzimática (Biely *et al.* 1986; Schols y Voragen 1994; Chen y Mart 1996; Benen *et al.* 1999; Bonnin *et al.* 2003), de modo que la eliminación de estos hace a las pectinas más accesibles a otras enzimas hidrolíticas como las pectato liasas (Vercauteren *et al.* 2002). Estudios recientes muestran que las PAEs modulan la extensibilidad de las paredes celulares de los tejidos reproductivos y disminuyen la digestibilidad de las pectinas cuando se producen la desacetilación (Gou *et al.* 2012).

### **1.4.3. Otras enzimas esterasas implicadas en el crecimiento del tubo polínico**

Además de PME y PAEs, existen otras enzimas esterasas, tales como cutinasas, lipasas y otras esterasas no específicas, que están implicadas en la reproducción sexual de las plantas Angiospermas (Lavithis y Bhalla 1995).

Las cutinasas (EC 3.1.1.74) son esterasas que catalizan la hidrólisis de enlaces ésteres de los ácidos carboxílicos de la cutina, un componente de



naturaleza lipídica que forma parte de la cutícula de las plantas (Baker y Bateman 1978). Se han caracterizado cutinasas activas en el polen de distintas especies como *Brassica napus* (Hiscock *et al.* 1994), *Tropaeolum majus* (Sheij *et al.* 1977, Maiti *et al.* 1979) y *Arabidopsis* (Takakashi *et al.* 2010). Aunque en algunas especies con estigmas secos, la ruptura de la cutícula se lleva a cabo por fenómenos mecánicos (Elleman *et al.* 1992), en la mayoría la penetración de la cutícula por parte del tubo polínico está mediada por enzimas cutinasas presentes en la pared del polen (Hiscock *et al.* 2002; Hiscock y Allen 2008; Takakashi *et al.* 2010).

Las lipasas (EC 3.1.1.3) son enzimas estererasas que catalizan la hidrólisis de los enlaces éster presentes en los acilgliceroles. Además, también pueden catalizar la hidrólisis de un grupo amplio de ésteres carboxílicos (Bornscheuer *et al.* 1994). Se ha descrito la presencia de varias enzimas estererasas/lipasas extracelulares en el polen de *Arabidopsis thaliana* (Mayfield *et al.* 2001) y girasol (Shakya y Bhatla *et al.* 2010).

Además de cutinasas y lipasas, en el polen existen otras enzimas estererasas no específicas, incluyendo tiol estererasas y serina estererasas (Makinen y Brewbaker 1967; Knox y Heslop-Harrison 1970; Lavithis y Bhalla 1995, Hiscock *et al.* 2002). Aunque parece probado que una o varias enzimas del tipo serina esterasa podrían facilitar el paso del tubo polínico a través de las paredes celulares de las papilas (Hiscock *et al.* 2002), se desconocen los mecanismos que subyacen a esta función.

## 1.5. El olivo

El olivo es una de las plantas cultivadas más antiguas. Existen referencias históricas que sitúan el origen del cultivo del olivo en Persia, en el valle del Nilo (Egipto), y en el valle del Jordán (Jordania), aunque la idea más aceptada sitúa su origen en la antigua Mesopotamia. Recientemente se han descubierto restos de fósiles de ancestros del olivo en Italia de un millón de años de antigüedad lo que sugiere la posibilidad de que el origen de esta especie esté también en esta región del mundo (Kapellakis *et al.* 2007).

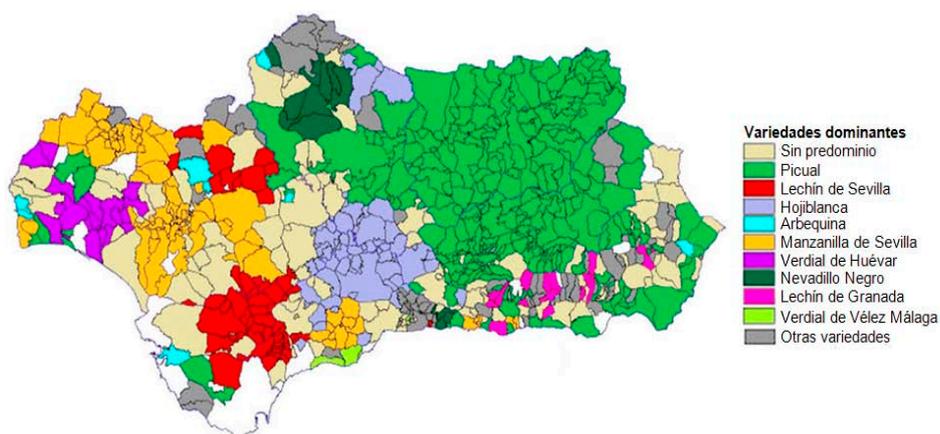
El olivo (*Olea europaea* subsp. *sativa*) pertenece a la familia de las Oleáceas, que incluye 29 géneros y 35 especies, y es la única especie que posee un fruto comestible dentro de la familia. Su cultivo se extiende por todas las regiones tropicales y templadas del mundo, encontrándose en la actualidad en países como Australia, Canadá, China, Perú, Nueva Zelanda, Argentina, Sudáfrica y Estados Unidos, entre otros (Barranco *et al.* 2008).

El olivar representa el sistema agrario productor de aceite por excelencia en la cuenca mediterránea, siendo España el principal país productor con 1.375.000 toneladas (45% de la producción mundial), seguido de



Italia, Grecia, Túnez, Siria, Turquía y Marruecos (datos del COI 2011). Dentro de España, Andalucía es la región con mayor patrimonio oleícola, el cual representa el 62 % del olivar español, y concentra el 75% de la producción nacional y el 30% de la producción europea (IEA, [www.juntadeandalucia.es](http://www.juntadeandalucia.es)). Jaén y Córdoba son las principales comarcas olivareras, concentrando el 61,8% de la superficie olivarera en Andalucía (MAPA, 2005).

En España existen 272 variedades de olivo, que se clasifican en varias categorías en función de su importancia y de la extensión de cultivo que ocupan. Las categorías “principal”, que agrupa a 24 variedades, y “secundaria”, constituida por 50 variedades, forman la categoría de “variedad difundida”. Las restantes 174 variedades se incluyen en la categoría “local” (Rallo *et al.* 2005). Picual, con 857.746 ha (58.2% del olivar), representa la variedad más cultivada en Andalucía (Figura 1.13), seguida de Hojiblanca, con 237.199 ha (18.2%), y Manzanilla de Sevilla, con 73.766 ha (5%).



**Figura 1.12.** Distribución geográfica de las variedades de olivo principales dominantes en Andalucía (esquema adaptado de Ramírez 2001).

### 1.5.1. El ciclo reproductivo del olivo

El olivo es un árbol polimórfico, con fases juvenil y adulta. La capacidad reproductiva está limitada a la etapa adulta, que se alcanza cabo de 5-8 años, dependiendo de la variedad. Presenta un ciclo bienal de fructificación, en el que se solapan el crecimiento vegetativo y reproductor (Figura 1.13). El crecimiento vegetativo se produce en primavera, donde aparecen los brotes terminales y axilares que originarán los ramos de madera del año siguiente, y en menor medida en otoño. En años de descarga se puede apreciar un crecimiento vegetativo continuo e irregular desde Marzo a Octubre. También hay crecimiento vegetativo durante el otoño e invierno, cuando la temperatura es suave y coincidiendo con periodos de lluvia.

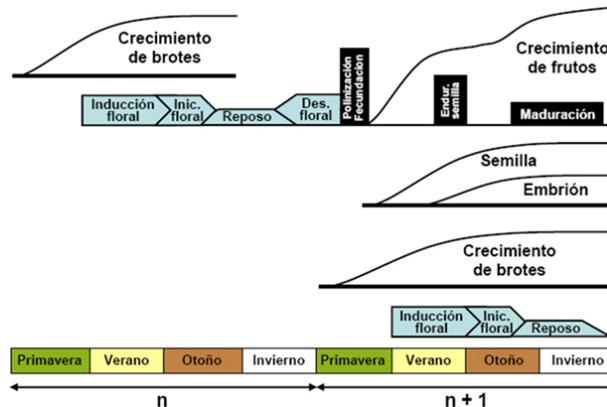


Figura 1.13. Ciclo reproductivo bienal del olivo (esquema adaptado de Rallo y Cuevas 2001).

El crecimiento reproductor se completa en dos años consecutivos. El primer año se producen las yemas y la inducción floral de las mismas. Tras una etapa de latencia, en el segundo año se completa la floración, fecundación y desarrollo de los frutos (Rallo y Cuevas 2001). La floración y la reproducción transcurren en un periodo de tiempo de 5-6 semanas, variando ligeramente según las condiciones climatológicas de cada año (Rodríguez-García *et al.* 2011). El periodo más largo es el que corresponde al desarrollo floral, el cual dura aproximadamente un mes, y que culmina con la formación de los órganos reproductores (Figura 1.14). El inicio del desarrollo de las anteras es anterior al desarrollo del pistilo, el cual comienza una vez completada la meiosis de las células madres del polen. La polinización se inicia tras la antesis o apertura de la flor, y dura entre 5 y 7 días. Tras la fecundación se produce la caída de los pétalos, degeneración del estigma y estilo, y engrosamiento del ovario.

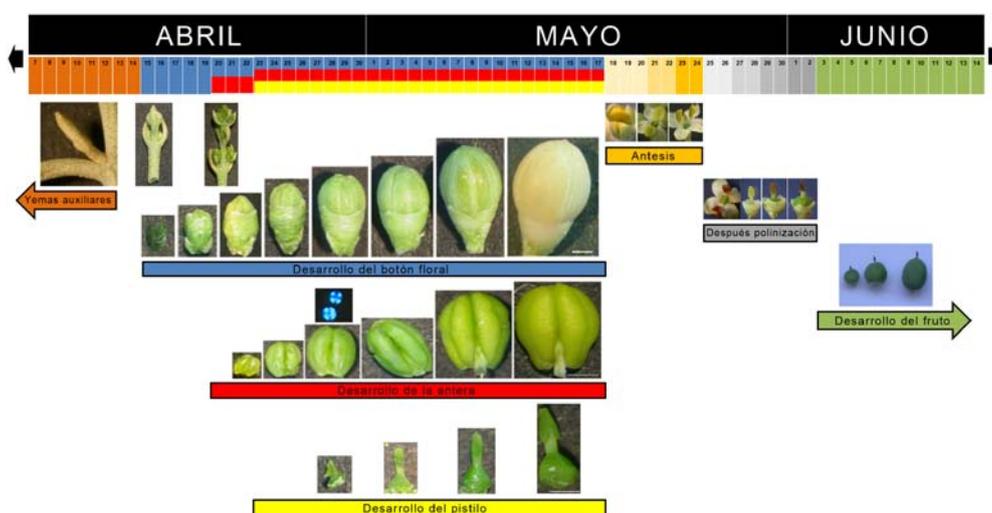


Figura 1.14. Cronograma de la reproducción del olivo (Rodríguez García *et al.* 2011).



### 1.5.2. Estudios sobre la reproducción sexual en el olivo

Los estudios sobre la biología reproductiva del olivo han sido realizados principalmente desde una perspectiva agronómica. Así, se ha estudiado los factores fisiológicos y ambientales que influyen en el tiempo de floración (Lavee 1986; Fernández-Escobar *et al.* 1992; Dos Santos Ramos 2000), la variabilidad temporal del desarrollo floral entre cultivares (Barranco y Rallo 1984; Barranco *et al.* 1994; Rallo *et al.* 2005), las relaciones de autoincompatibilidad entre cultivares (Bradley y Giggs 1963; Sedgley 1994; Bartolini y Guerriero 1995; Cuevas *et al.* 2001; Lavee *et al.* 2002; Moutier 2002; Cuevas 2005; De la Rosa *et al.* 2004; Moorkerjee *et al.* 2005; Díaz *et al.* 2006), diferentes aspectos de la polinización cruzada (Fernández-Escobar y Rallo 1981; Fernández-Escobar y Gómez-Valledor 1985), y la etapa de post-antesis de la flor y la abscisión del fruto (Rapoport y Rallo 1991).

Los estudios a nivel básico también han avanzado notablemente gracias a programas de investigación específicos del olivo. A nivel celular, se ha estudiado las etapas claves de la ontogenia del polen en la antera (Pacini y Juniper 1979a, b; Fernández y Rodríguez-García 1994) con especial énfasis en el desarrollo de la pared celular y las aperturas (Fernández y Rodríguez-García 1988, 1989, 1995), la formación de la pared de calosa (Alché y Rodríguez-García 1997), la diferenciación del retículo endoplasmático y su función como lugar de síntesis y almacenamiento de proteínas (Rodríguez-García y Fernández 1990, Rodríguez-García *et al.* 1995a, 1995b, Fernández *et al.* 1996), el ciclo ribosómico (Rodríguez-García y Fernández 1897, Alché *et al.* 1994), los cuerpos nucleares (Olmedilla *et al.* 1997) y los lípidos de reserva (Rodríguez-García *et al.* 2003; Zienkiewicz *et al.* 2010, 2011). También se ha puesto a punto un sistema de germinación *in vitro* y la obtención de protoplastos a partir del tubo polínico (M'rani-Alaoui 2000; Majewska-Sawka *et al.* 2002) que han permitido estudiar la organización del citoesqueleto (De la Flor *et al.* 2003), la dinámica nuclear (Rodríguez-García *et al.* 2003), la movilización de los lípidos de reserva (Rodríguez-García *et al.* 2003; Zienkiewicz *et al.* 2010), y la formación de la pared del tubo polínico (Majewska-Sawka *et al.* 2002). Más recientemente, se ha estudiado en profundidad el desarrollo del pistilo (Suárez 2009; Serrano *et al.* 2008; Suárez *et al.* 2012) y se ha determinado la importancia que tiene el calcio en el desarrollo del pistilo del olivo (Zienkiewicz *et al.* 2011). También se ha estudiado la formación del saco embrionario (Altamura-Betti *et al.* 1982) y los tejidos del ovario (Rallo y Rapoport 2001; Rapoport 2004; Martins *et al.* 2006; Reale *et al.* 2006).

A nivel bioquímico, se han identificado y caracterizado varios productos génicos del polen, algunos de los cuales intervienen en procesos de interacción polen-pistilo, tales como las proteínas Ole e 1 (Alché *et al.* 1999, 2004; Castro



*et al.* 2003, 2010), Ole e 10 (Barral *et al.* 2005) y las profilinas (Morales *et al.* 2008), proteínas relacionadas con el metabolismo de los lípidos de reserva (Zienkiewicz *et al.* 2010, 2011), y enzimas relacionadas con el metabolismo oxidativo (Alché *et al.* 1998; Zafra *et al.* 2010). No obstante, la información disponible sobre los genes/proteínas implicados en la interacción polen-pistilo en esta especie es muy escasa.

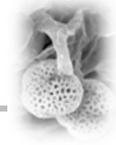


## **OBJETIVOS**

“Probamos a través de la lógica pero descubrimos con la imaginación”

Aristóteles



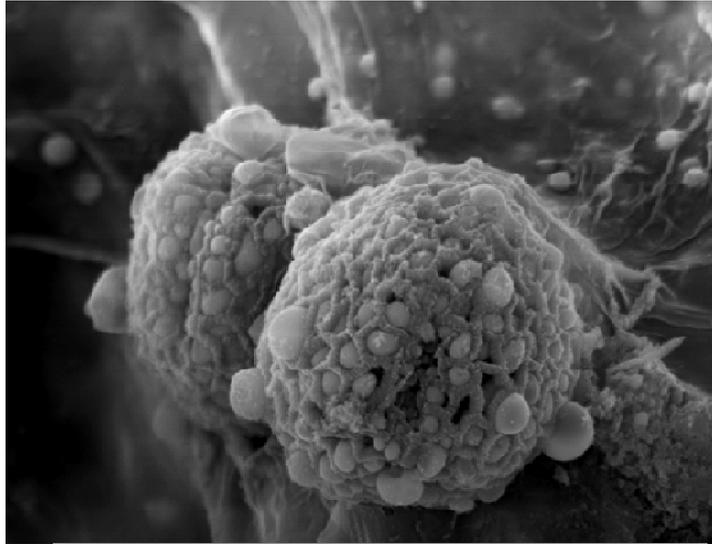


Los estudios sobre la reproducción sexual son claves desde un punto de vista agronómico para las especies cultivadas con fruto. El olivo es un cultivo de gran impacto económico debido a la importancia de su fruto, por lo que el estudio de los procesos que garantizan el éxito de la fertilización tiene un elevado interés.

El objetivo general de este trabajo de tesis doctoral es profundizar en el conocimiento de los mecanismos que permiten al grano de polen germinar y al tubo polínico crecer a través de los diferentes tejidos del pistilo hasta alcanzar el saco embrionario en el olivo. Para ello, es imprescindible disponer de un buen conocimiento de las diferentes enzimas y proteínas que están implicadas en el crecimiento del tubo polínico y en su interacción con el pistilo. En este contexto, los objetivos específicos de este trabajo de tesis doctoral son los siguientes:

- 1) Determinar la existencia de actividad esterolítica en el polen de olivo en el contexto de la germinación y el crecimiento del tubo polínico.
- 2) Identificar y clasificar las distintas enzimas estererasas del polen de olivo en base a su función biológica.
- 3) Determinar las funciones del exudado estigmático y el “pollen coat” en la interacción polen-estigma mediante el análisis de ambos proteomas.
- 4) Caracterizar las enzimas estererasas relacionadas con la regulación del crecimiento de la pared celular del tubo polínico en el contexto de la germinación.



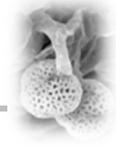


## **MATERIAL y MÉTODOS**

“En principio la investigación necesita más cabeza que medios”

Severo Ochoa



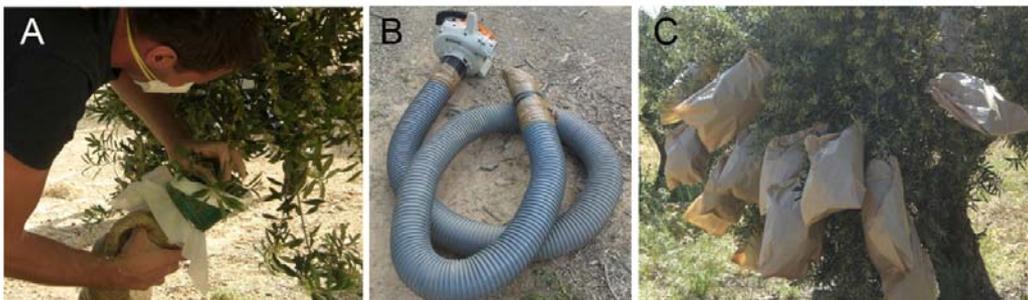


### 3.1. Material vegetal

#### 3.1.1. Polen maduro de olivo

Se recolectó polen maduro de olivo (*Olea europaea* L.) durante los meses de floración (Mayo y Junio) del período comprendido entre 2008 y 2011, a partir de árboles genotipados procedentes del banco de germoplasma de olivo del Centro de Investigación y Formación Agraria (CIFA) “Venta del Llano” (Menjíbar, Jaén, España). Las variedades utilizadas en este trabajo fueron las siguientes: 'Arbequina', 'Bella de España', 'Blanqueta', 'Cornicabra', 'Empeltre', 'Galega', 'Gordal', 'Hojiblanca', 'Lechín de Granada', 'Loaime', 'Lucio', 'Manzanilla de Sevilla', 'Picual' y 'Picudo'.

La recolección del polen se realizó siguiendo dos métodos diferentes. En plantaciones monovarietales, el polen se recolectó mediante aspiración directa de las inflorescencias tras la dehiscencia de las anteras (Figura 3.1A). Para ello, se utilizó una aspiradora industrial (Stihl, Alemania), a la cual se acopló un tubo flexible de 12 cm de diámetro y 3 m de longitud con un dispositivo de filtrado selectivo en su extremo libre, compuesto por tres mallas de nylon Saatilene® Hitech® (SAATI, Italia) con un diámetro de poro de 150, 50 y 20  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Figura 3.1B).



**Figura 3.1.** Métodos de recolección del polen de olivo. **A)** Recolección mediante aspiración selectiva de las inflorescencias. **B)** Dispositivo utilizado en la aspiración. **C)** Recolección mediante embolsado de las inflorescencias.

En la plantación correspondiente a la colección de variedades de olivo del CIFA “Venta del Llano”, la recolección del polen se llevó a cabo mediante embolsado de las inflorescencias, antes de la apertura floral (Figura 3.1.B). Tras la antesis, se retiraron las bolsas de papel y el polen depositado en las mismas fue aspirado, y filtrado mediante un tamiz con un diámetro de poro de 50  $\mu\text{m}$  con objeto de eliminar los restos florales y otras impurezas.



### 3.1.2. Exudado estigmático de olivo

La recolección del exudado estigmático de olivo se realizó a partir de flores de árboles de la variedad 'Picual' procedentes de una plantación genotipada en Pinos Puente (Granada, España). Las flores se recolectaron en el estadio fenológico no. 5 (Suárez *et al.* 2012), para minimizar la contaminación del estigma con el polen. El exudado estigmático se recolectó a partir de 250 flores, utilizando un pincel de punta extrafina de pelo sintético (Golden Sable, Japón) humedecido en una solución de fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0) con Tween 20 al 0,1% (v/v) y ditiotreitól (DTT) 20 mM.

### 3.1.3. Exudado estigmático de azucena blanca

La recolección del exudado estigmático de *L. longiflorum* cv. 'White heaven' se llevó a cabo a partir de 50 tallos florales adquiridos en una floristería. Los tallos o varas florales se sumergieron en una solución VIVEFLOR® Complet (Agrosport SL, Barcelona, España) y se mantuvieron a 25°C y 60% de humedad bajo iluminación artificial hasta que se produjo la antesis natural de las flores. Las flores abiertas fueron emasculadas para evitar la contaminación del estigma con el polen. Las gotas de exudado formadas en la superficie del estigma se recolectaron mediante succión con una pipeta durante los 7 días posteriores a la antesis y las muestras se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso.

### 3.1.4. Anteras de olivo

La recolección de anteras de olivo se realizó a partir de flores de la variedad 'Picual' en distintos estadios de desarrollo. Las anteras fueron diseccionadas bajo una lupa binocular usando un escalpelo y unas pinzas de punta fina. Tras la disección, la antera es aplastada en orceína para definir el estadio concreto en el que se encuentra.

Para los estudios bioquímicos, el material vegetal recolectado se utilizó inmediatamente, tal y como se describe a continuación, o bien se congeló en N<sub>2</sub> líquido y se almacenó a -80°C hasta su posterior uso con objeto de disponer de material todo el año. Para los estudios de microscopía, el material fue procesado fresco, tal y como se describe más adelante.

## 3.2. Métodos de laboratorio

### 3.2.1. Ensayos de viabilidad del polen mediante la prueba FCR

Con objeto de evaluar la viabilidad del polen se llevó a cabo la prueba de la reacción fluorocromática (FCR), a partir del protocolo descrito por Heslop-Harrison y Heslop Harrison (1970).



### Reactivos

- Solución de diacetato de fluoresceína (FDA) a una concentración final de 2 mg/ml en acetona.
- Solución de sacarosa al 15 % (p/v).

### Procedimiento

1. Mezclar 0.01 g de polen maduro con 1.5 ml de la solución de sacarosa y 45 µl de la solución de FDA.
2. Incubar en cámara húmeda a temperatura ambiente y en oscuridad durante 5–15 minutos.
3. Colocar una gota de la mezcla sobre un portaobjetos.
4. Observar en un microscopio óptico de fluorescencia (ej. Axioplan, Carl Zeiss Inc., Thornwood, NY, EEUU) con el filtro azul LP450-490.
5. Calcular el porcentaje de viabilidad mediante la siguiente fórmula: % viabilidad= número de granos fluorescentes x 100/número total de granos. Para calcular la media, se seleccionaron al azar varias zonas de la muestra en el portaobjetos y se contaron un total 500 granos de polen.

### 3.2.2. Germinación *in vitro* del polen

La germinación *in vitro* de polen (cv. Picual) se lleva a cabo según el método descrito por M' rani-Alaoui (2000), tal y como se describe a continuación.

### Reactivos

- Medio de germinación (pH 5,5-6,5), que se prepara según se indica en la tabla 3.1:

Tabla 3.1

Reactivo <sup>1</sup>	Función	Conc. final
(1) Ácido bórico	Estabiliza las membranas de los tubos	0,03%
(2) Nitrato potásico	Permite el funcionamiento de las bombas de Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	0,01%
(3) Sulfato magnésico	Permite el funcionamiento de las bombas de Na <sup>+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	0,02%
(4) Nitrato cálcico	Mejora el crecimiento de los tubos polínicos	0,03%
(5) Sacarosa	Necesaria para la síntesis de calosa	10%
(6) PEG 8000	Incrementa la viscosidad del medio	5%



<sup>1</sup> El medio de cultivo se debe preparar en el orden indicado en la tabla para evitar la formación de cristales provenientes de las sales, que impidan el crecimiento de los tubos polínicos.

### Procedimiento

1. Pesar 0,2 g de polen maduro.
2. Extender el polen sobre papel de aluminio e incubar en una cámara húmeda<sup>1</sup> durante 1 h a 30°C en oscuridad.
3. Transferir el polen a una placa de Petri que contiene 50 ml de medio de cultivo. Homogenizar bien el polen con una espátula evitando que se formen grumos.
4. Incubar a 25°C en oscuridad y con agitación suave durante el tiempo que estimemos conveniente. Se considera que el polen ha germinado cuando la longitud del tubo polínico es el doble del diámetro del grano (Pinney y Polito 1990).
5. Calcular el porcentaje de germinación, según la siguiente fórmula: % germinación= (número de granos germinados x 100)/número total de granos. Para calcular la media, se seleccionaron al azar varias zonas de la muestra en el portaobjetos, y se contaron un total de 500 granos de polen.

Tras la germinación del polen, se procedió a la separación de cada una de las fracciones que existen en la mezcla: polen germinado, polen no germinado y medio de cultivo. Para ello, las muestras fueron filtradas a través de membranas de nylon de 75 y 5 µm de diámetro de poro. El polen germinado fue separado del resto de fracciones mediante el filtro de 75 µm, mientras que el polen no germinado se separó del medio de cultivo con el filtro de 5 µm.



<sup>1</sup> La cámara húmeda se prepara con una placa de Petri en cuyo interior se introducen varias capas de papel absorbente humedecido con agua destilada.

### **3.2.3. Extracción de proteínas totales de polen maduro, polen germinado y medio de cultivo**

Los ensayos de actividad enzimática se realizaron a partir de extractos de proteínas de polen fresco.

### Reactivos

- Solución de extracción para actividad esterasa: fosfato sódico 0,05 M (pH 7,0). Guardar a 4°C.



- Solución de extracción para actividad PME: fosfato disódico 0,2 M (pH 5,0), citrato sódico 0,1 M y cloruro sódico 1 M. Guardar a 4°C.
- Columnas PD-10 Sephadex G-25M (GE Healthcare BioSciences AB, Upsala, Suecia)
- Tubos concentradores Amicon®Ultra-15 (Millipore Inc., Billerica, MA, EEUU)

*a) Procedimiento para el polen maduro*

1. Pesar en un vial de cristal 0,1 g de polen y añadir 1,5 ml de solución de extracción<sup>1</sup>.
2. Agitar durante 1 h a 4°C en un agitador magnético.
3. Centrifugar a 13.500 rpm durante 30 min a 4°C.
4. Recuperar el sobrenadante con una pipeta y transferirlo a un tubo de centrífuga de 2 ml.
5. Desalar el extracto proteico mediante filtración por gravedad a través de una columna PD-10, siguiendo el protocolo que se adjunta en el manual del fabricante.
6. Concentrar las proteínas mediante un dispositivo Amicon®Ultra-15 mediante centrifugación a 6.500 rpm durante 15-90 min a 4°C, siguiendo el protocolo que se adjunta en el manual del fabricante.

*b) Procedimiento para el polen germinado*

1. Después de germinar el polen, homogenizar el material (0,1 g) en un mortero con N<sub>2</sub> líquido hasta obtener un polvillo fino.
2. Transferir el polvillo a un tubo de centrífuga de 2 ml y añadir 1,5 ml de solución de extracción<sup>1</sup>.
3. A partir de aquí, continuar con el paso 2 del protocolo descrito para el polen maduro.

*c) Procedimiento para el medio de cultivo*

1. Separar el medio de cultivo del polen filtrando a través de una membrana de nylon de 5 µm de diámetro de poro.
2. Añadir 9 volúmenes de solución de precipitación y dejar precipitar las proteínas durante 6 h a -20°C.
3. Centrifugar a 13.500 rpm durante 30 min a 4°C y eliminar el sobrenadante.
4. Añadir la solución de lavado y centrifugar a 4°C durante 15 min a 13.500 rpm. Retirar el sobrenadante.
5. Repetir el paso anterior dos veces.



6. Dejar secar el precipitado en una campana de extracción durante 3-5 min y resuspender las proteínas en tampón de muestras.



<sup>1</sup> Para optimizar el proceso de extracción es necesario que la solución de extracción esté a 4°C antes de ser utilizada.

### 3.2.4. Cuantificación de proteínas

La concentración de las proteínas en los extractos de polen y en el exudado del estigma se cuantificó con el método de Bradford (1976).

#### Reactivos

- Reactivo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU): solución de azul de Coomassie G250 en ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) y metanol. Guardar a 4°C.
- Solución de seroalbúmina bovina (BSA) 1 µg/µl. Guardar a -20°C.

#### Procedimiento<sup>1</sup>

1. Preparar la siguiente mezcla de cada una de las muestras que van a ser cuantificadas: 2 µl del extracto proteico y 798 µl de H<sub>2</sub>O destilada.
2. Preparar una curva patrón con muestras de 1, 2, 4, 8, 16 y 25 µg de la proteína estándar (BSA) a partir de una solución de 1 µg/µl y completar con H<sub>2</sub>O destilada hasta un volumen de 800 µl.
3. Añadir 200 µl del colorante Bradford y mezclar invirtiendo los tubos.
4. Incubar a temperatura ambiente durante 10 min.
5. Medir la DO<sub>595</sub> de las diferentes concentraciones estándar de BSA y determinar la curva patrón. A partir de los valores de densidad óptica obtenidos para las diferentes muestras, extrapolar los valores de concentración.



<sup>1</sup> El procedimiento descrito ha sido tomado del manual de instrucciones del producto (Bio-Rad).

### 3.2.5. Ensayos *in vitro* de la actividad esterasa no específica (NE)

La detección *in vitro* de actividad esterasa en el polen de olivo se determinó midiendo a DO<sub>405</sub> la cantidad de *p*-nitrofenol liberado a partir de la hidrólisis del butirato de *p*-nitrofenilo (PNB) en presencia del enzima (Purdy y Kolattukudy 1973). Se realizaron 5 experimentos independientes x 3 réplicas (N= 15), y se calculó la media y la desviación estándar.



### Reactivos

- Tampón fosfato sódico 0,05 M (pH 8,0).
- Solución de Triton X-100 al 0,4% (v/v) en tampón fosfato sódico 0,05 M (pH 8,0).
- Solución de PNB al 1,76% (p/v) en acetonitrilo. Guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Procedimiento

1. Preparar la siguiente mezcla de reacción:

Tabla 3.2

Reactivo	Volumen
Solución de Tritón X-100 al 0,4%	100 $\mu\text{l}$
Extracto proteico (30 $\mu\text{g}$ )	<sup>1</sup> $\mu\text{l}$
Solución de PNB al 1,76%	10 $\mu\text{l}$
Tampón fosfato sódico 0,05 M (pH 8,0) hasta un volumen final de	1 ml

2. Incubar a temperatura ambiente durante 30 min.
3. Medir la absorbancia a 405 nm ( $\text{DO}_{405}$ ) en un espectrofotómetro<sup>2</sup> (ej. UV-1800, Shimadzu Co., Tokio, Japón).
4. Realizar controles calentando el extracto proteico a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 10 min.



<sup>1</sup> El volumen de la muestra que se añade a la mezcla de reacción depende de la concentración del extracto proteico.

<sup>2</sup> Si hay actividad esterasa en el extracto, éste cambia de color y se torna amarillo.

### 3.2.6. Inhibición *in vitro* de la actividad esterasa NE

Se realizaron 5 experimentos independientes x 3 réplicas (N=15), y se calculó la media y la desviación estándar.

### Reactivos

- Tampón fosfato sódico 0,05 M (pH 8,0).
- Solución de Triton X-100 al 0,4% (v/v) en tampón fosfato sódico 0,05 M (pH 8,0).
- Solución de PNB al 1,76 % (p/v) en acetonitrilo. Guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Solución del inhibidor ebelactona-B 10 mM en etanol:H<sub>2</sub>O (1:1).
- Solución del inhibidor DIFP (fluorofosfato de diisopropilo) 200 mM en isopropanol.



- Solución del inhibidor p-CMB (benzoato de p-cloromercurio) 50 mM en etanol:H<sub>2</sub>O (1:1).
- Solución del inhibidor bromuro de neostigmina 100 mM en H<sub>2</sub>O.
- Solución del inhibidor eserina 100 mM en etanol:H<sub>2</sub>O (1:1).

### Procedimiento

1. Preparar la siguiente mezcla de reacción:

Tabla 3.3

Reactivo	Volumen
Solución de Tritón X-100 al 0,4%	100 $\mu$ l
Extracto proteico (30 $\mu$ g)	<sup>1</sup> __ $\mu$ l
Solución con el inhibidor	<sup>2</sup> __ $\mu$ l
Tampón fosfato sódico 0,05 M (pH 8,0) hasta un volumen final de	990 $\mu$ l

2. Incubar a temperatura ambiente durante 30 min.
3. Añadir 10  $\mu$ l de la solución de PNB.
4. Incubar a temperatura ambiente durante 30 min.
5. Medir la absorbancia a 405 nm (DO<sub>405</sub>) en un espectrofotómetro.



<sup>1</sup> El volumen de la muestra que se añade a la mezcla de reacción depende de la concentración del extracto proteico.

<sup>2</sup> El volumen del inhibidor que se añade a la mezcla de reacción depende de la concentración inicial de la solución madre del inhibidor, y de la concentración final a la que se utiliza el inhibidor.

### 3.2.7. Ensayos *in vitro* de la actividad pectina metilesterasa (PME)

La detección *in vitro* de la actividad PME se determinó midiendo a DO<sub>534</sub> la cantidad de pectina desesterificada liberada a partir de la hidrólisis de pectina esterificada, en presencia del enzima (Lixi *et al.* 2005). Se realizaron 5 experimentos independientes x 3 réplicas (N=15), y se calculó la media y la desviación estándar.

### Reactivos

- Solución de pectina esterificada de cáscara de naranja (Sigma-Aldrich, San Luis, EEUU) al 0,1% (p/v) en tampón fosfato disódico 0,2 M (pH 6,3).
- Solución de rojo de rutenio al 0,05% (p/v).
- Solución de cloruro cálcico 0,6 M.



### Procedimiento

1. Añadir 30 µg de proteína total de polen a 1 ml de la solución de pectina.
2. Incubar la mezcla a 37°C durante 15 h.
3. Agregar 0,2 ml de la solución de rojo rutenio, mezclar bien e incubar durante 10 min a temperatura ambiente.
4. Añadir 0,5 ml de la solución de CaCl<sub>2</sub>, mezclar bien y centrifugar a 13.500 rpm durante 15 min.
5. Medir la densidad óptica a 534 nm (DO<sub>534</sub>) en un espectrofotómetro.
6. Realizar los controles negativos correspondientes calentando el extracto proteico a 100°C durante 10 min.

### 3.2.8. Electroforesis semi-nativa en geles de poliacrilamida

El perfil electroforético de actividad esterasa no específica (NE) del polen se analizó mediante electroforesis semi-nativa en geles de poliacrilamida.

### Reactivos

- Solución de acrilamida/bis-acrilamida (30% T, 2,67% C).
- Solución Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8).
- Solución Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8).
- Solución de SDS al 10% (p/v).
- Solución de persulfato amónico al 10% (p/v).
- N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina (TEMED).
- N-butanol saturado en H<sub>2</sub>O destilada.
- Para 2 minigeles (sistema de electroforesis MiniPROTEAN® de Bio-Rad o equivalente) de 1 mm de grosor, preparar las siguientes mezclas:

Tabla 3.4

Reactivo	Gel concentrador (4%)	Gel separador (12%)
Acrilamida/bis-acrilamida <sup>1</sup>	0,5 ml	3,0 ml
Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)	-	2,5 ml
Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8)	1,25 ml	-
SDS al 10% (p/v)	0,05 ml	0,1 ml
H <sub>2</sub> O destilada	3,2 ml	4,4 ml
Volumen final	5 ml	10 ml
Persulfato amónico al 10% (p/v)	25 µl	50 µl
TEMED	5 µl	10 µl



- Marcadores de peso molecular (ej. Precision Plus Protein™ Standards, Bio-Rad).
- Tampón de electroforesis 10x: Tris-HCl 100 mM (pH 8,3), glicina 100 mM y SDS al 0,1% (p/v).
- Tampón de muestras 5x: Tris-HCl 50 mM (pH 6,8), SDS al 10% (p/v), glicerol al 50% (v/v) y azul de bromofenol al 0,05% (p/v).
- Solución de renaturalización: Tritón X-100 al 2,5% (v/v) en tampón fosfato sódico 0,05 M (pH 7,0).

### Procedimiento

1. Ensamblar los moldes de cristal (a modo de sándwich).
2. Preparar las soluciones del gel concentrador y el gel separador según se especifica en la tabla 3.4. Aplicar vacío a ambas soluciones<sup>2</sup>.
3. Llenar los moldes con la solución correspondiente al gel separador<sup>3</sup>. Añadir 100 µl de N-butanol saturado en H<sub>2</sub>O y dejar polimerizar<sup>4</sup>.
4. Una vez polimerizado el gel, eliminar el N-butanol con H<sub>2</sub>O destilada. Repetir el paso 3 con la solución correspondiente al gel concentrador. Colocar los peines, cuidando que no queden atrapadas burbujas de aire y dejar polimerizar.
5. Retirar los peines y eliminar los restos de acrilamida de los pocillos con H<sub>2</sub>O destilada.
6. Para preparar las muestras, poner 30 µg del extracto crudo, añadir 4 µl de tampón de muestras 5x y completar con H<sub>2</sub>O destilada hasta obtener un volumen final de 20 µl. Es importante NO hervir las muestras<sup>5</sup>.
7. Cargar las muestras en los pocillos sin llegar a rebasar la altura de éstos, y llenar el tanque con tampón de electroforesis 1x. En uno de los pocillos, cargar los marcadores de peso molecular.
8. Aplicar un voltaje constante de 90 V durante los primeros 20 min, y a continuación 180 V hasta que el frente de azul de bromofenol alcance el final del gel separador.
9. Incubar el gel en 50 ml de solución de renaturalización durante 30 min a temperatura ambiente y en agitación.
10. Repetir el paso anterior dos veces.
11. Lavar el gel con H<sub>2</sub>O destilada durante 1 min.



<sup>1</sup> Es necesario llevar guantes durante todo el proceso debido a que la acrilamida y bisacrilamida son agentes neurotóxicos que se absorben a través de la piel.

<sup>2</sup> El O<sub>2</sub> inhibe la polimerización de la acrilamida.

<sup>3</sup> Dejar aproximadamente 1,5 cm para añadir el gel concentrador.

<sup>4</sup> El N-butanol crea una película aislante, evitando que entre el aire mientras el gel polimeriza. Por otro lado, permite que la superficie de polimerización sea absolutamente plana.

<sup>5</sup> Al hervir las muestras, las proteínas se desnaturalizan y pierden su actividad enzimática.



### 3.2.9. Ensayos *in gel* de la actividad esterasa NE

La detección de la actividad esterasa no específica (NE) en geles de poliacrilamida está basada en la capacidad de las esterases de hidrolizar un éster derivado del naftaleno y liberar  $\alpha$ -naftol, el cual se acopla a una sal diazónica (Fast Blue RR) produciendo un precipitado de color negrozco. La reproducibilidad de los resultados se confirmó realizando 3 experimentos independientes y 3 réplicas para cada experimento (N= 9 geles).

#### Reactivos

- Solución de detección A<sup>1</sup>: 30 mg de acetato de  $\alpha$ -naftilo (Sigma-Aldrich) en 500  $\mu$ l de acetona, 100 mg de la sal Fast Blue RR (Sigma-Aldrich) y 50 ml de tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0).

#### Procedimiento

1. Tras la electroforesis semi-nativa y la renaturalización de las proteínas (protocolo 3.2.9), incubar<sup>2</sup> el gel en la solución de detección correspondiente durante 3 h, a 37°C y en agitación.
2. Lavar el gel con H<sub>2</sub>O destilada.
3. Documentar el gel con un escáner.



<sup>1</sup> La solución final se filtra mediante un embudo y papel absorbente, se envuelve con papel de aluminio y se guarda a 4°C hasta su uso. Se recomienda calentar la solución de detección a 37°C antes de su uso.

<sup>2</sup> La incubación se realiza en un recipiente de cristal (ej. cubeta de tinción), el cual es sellado con parafilm, y protegido de la luz con papel de aluminio.

### 3.2.10. Inhibición *in gel* de la actividad esterasa NE

Para los ensayos de inhibición enzimática, se prepararon extractos proteicos de polen maduro siguiendo el protocolo 3.2.3, pero añadiendo al tampón de extracción el inhibidor correspondiente a una concentración final de 2 mM (Tabla 3.5).

Tabla 3.5

Inhibidor	Tipo de inhibición	Tampón de extracción
p-CMB	Irreversible	60 $\mu$ l de p-CMB 50 mM y 1440 $\mu$ l de tampón fosfato sódico 0,05 M (pH 7,0)
DIFP	Irreversible	15 $\mu$ l de DIFP 200 mM, y 1485 $\mu$ l de tampón fosfato sódico 0,05 M (pH 7,0)
Neostigmina	Reversible	30 $\mu$ l de neostigmina 100 mM y 1470 $\mu$ l de tampón fosfato sódico 0,05 M (pH 7,0)



A continuación, las proteínas se separaron electroforéticamente en condiciones semi-nativas (protocolo 3.2.9) y se detectó la actividad esterasa NE (protocolo 3.2.10, solución de detección A). La reproducibilidad de los resultados se confirmó realizando 3 experimentos independientes y 3 réplicas para cada experimento (N= 9 geles). En paralelo, se realizó un control positivo en ausencia de inhibidores.

### 3.2.11. Ensayos *in gel* de actividad esterasa/lipasa

La detección de la actividad lipasa en geles de poliacrilamida está basada en la capacidad de estas enzimas de hidrolizar ésteres de cadena larga derivados del naftaleno y liberar  $\alpha$ -naftol, el cual se acopla a una sal diazónica (Fast Blue BB) produciendo un precipitado de color marrón-amarillento. La reproducibilidad de los resultados se confirmó realizando 3 experimentos independientes y 3 réplicas para cada experimento (N= 9 geles).

#### Reactivos

- Solución de detección<sup>1</sup>: 2,5 mg de palmitato de  $\beta$ -naftilo (Sigma-Aldrich) en 1 ml de N,N-dimetilformamida, 30 mg de la sal Fast Blue BB (Sigma-Aldrich) y 50 ml de tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0).

#### Procedimiento

1. Tras la electroforesis semi-nativa y la renaturalización de las proteínas, (protocolo 3.2.9), incubar<sup>2</sup> el gel en la solución de detección durante 75 min, a 37°C y en agitación.
2. Lavar el gel con H<sub>2</sub>O destilada.
3. Documentar el gel con un escáner.



<sup>1</sup> La solución final se filtra mediante un embudo y papel absorbente, se envuelve con papel de aluminio y se guarda a 4°C hasta su uso. Se recomienda calentar la solución de detección a 37°C antes de su uso.

<sup>2</sup> La incubación se realiza en un recipiente de cristal (ej. cubeta de tinción), el cual es sellado con parafilm, y protegido de la luz con papel de aluminio.

### 3.2.12. Inhibición *in gel* de la actividad esterasa/lipasa

Para los ensayos de inhibición de la actividad esterasa/lipasa del polen, se preparó un extracto proteico de polen maduro (protocolo 3.2.3) mediante un tampón de extracción con el inhibidor ebelactona-B a una concentración final de 2 mM (300  $\mu$ l de ebelactona-B 10 mM y 1200  $\mu$ l de tampón fosfato sódico 0,05 M, pH 7,0).

A continuación, las proteínas se separaron electroforéticamente en condiciones semi-nativas (protocolo 3.2.9) y se detectó la actividad



esterasa/lipasa (protocolo 3.2.11). La reproducibilidad de los resultados se confirmó realizando 3 experimentos independientes y 3 réplicas para cada experimento (N= 9 geles). En paralelo, se realizó un control positivo en ausencia del inhibidor.

### 3.2.13. Electroforesis nativa en geles de poliacrilamida

Para determinar el perfil electroforético de actividades pectinolíticas del polen se realizaron experimentos mediante electroforesis en condiciones nativas, tal y como se describe a continuación.

#### Reactivos

- Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)
- Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8)
- Solución de persulfato amónico al 10% (p/v)
- TEMED
- Tampón de electroforesis 10x: Tris-HCl 0,025 M y glicina 0,195 M (pH 8,3).
- Tampón de muestras 5x: Tris-HCl, 0,5 mM (pH 6,8), glicerol al 30% (v/v), y azul bromofenol al 0,01% (p/v).
- Para 2 minigeles (sistema de electroforesis MiniPROTEAN® de Bio-Rad o equivalente) de 1 mm de grosor, preparar las siguientes mezclas:

Tabla 3.6

Reactivo	Gel concentrador (4%)	Gel separador (12%)
Acrilamida/bis-acrilamida <sup>1</sup>	0,5 ml	3,0 ml
Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)	-	2,5 ml
Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8)	1,25 ml	-
H <sub>2</sub> O destilada	3,25 ml	4,5 ml
Volumen final	5 ml	10 ml
Persulfato amónico al 10% (p/v)	25 µl	50 µl
TEMED	5 µl	10 µl

#### Procedimiento

1. Ensamblar los moldes de cristal (a modo de sándwich) y polimerizar los geles tal y como se ha descrito anteriormente (protocolo 3.2.9).



2. Para preparar las muestras, poner 30  $\mu\text{g}$  del extracto crudo, añadir 4  $\mu\text{l}$  de tampón de muestras 5x y completar con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada hasta obtener un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ .
3. Cargar las muestras en los pocillos sin llegar a rebasar la altura de éstos y llenar el tanque con tampón de electroforesis 1x. En uno de los pocillos, cargar los marcadores de peso molecular.
4. Aplicar un voltaje constante de 80 V durante 180 min a 4°C.



<sup>1</sup> Es necesario llevar guantes durante todo el proceso debido a que la acrilamida y bisacrilamida son agentes neurotóxicos que se absorben a través de la piel.

### 3.2.14. Ensayos *in gel* de actividad pectinolítica

La actividad pectinolítica del polen en geles nativos de poliacrilamida se determinó utilizando pectina esterificada de cáscara de naranja como sustrato. La reproducibilidad de los resultados se confirmó realizando 3 experimentos independientes y 3 réplicas para cada experimento (N= 9 geles).

#### Reactivos

- Solución de PBS 10x (pH 7,4):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  80 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  15 mM, NaCl 1,3 mM y KCl 30 mM.
- Solución de PBS 1x (pH 7,4): 10 ml de solución de PBS 10x y 900 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.
- Solución de rojo de rutenio al 0,05% (p/v).
- Para 2 minigeles (sistema de electroforesis MiniPROTEAN® de Bio-Rad o equivalente) de 1 mm de grosor, preparar las siguientes mezclas:

Tabla 3.7

Reactivo	Gel concentrador (4%)	Gel separador (12%)
Acrilamida/bis-acrilamida <sup>1</sup>	0,5 ml	3,0 ml
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	-	2,5 ml
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	1,25 ml	-
Pectina esterificada de cáscara de naranja	-	0,05 g
$\text{H}_2\text{O}$ destilada	3,25 ml	4,5 ml
Volumen final	5 ml	10 ml
Persulfato amónico al 10% (p/v)	25 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$
TEMED	5 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$



### Procedimiento

1. Preparar los geles de poliacrilamida como se describe en la tabla 3.7 y correr una electroforesis en condiciones nativas.
2. Lavar el gel en H<sub>2</sub>O destilada durante 15 s.
3. Incubar el gel en 50 ml de solución de PBS 1x durante 2 h a 37°C en agitación y oscuridad.
4. Lavar el gel durante 30 s en H<sub>2</sub>O destilada.
5. Revelar el gel en 50 ml de solución de rojo de rutenio durante 1 h a 25°C y en agitación.
6. Desteñir el gel con agua destilada. El tiempo de decoloración dependerá del grosor del gel.



<sup>1</sup> Es necesario llevar guantes durante todo el proceso debido a que la acrilamida y bis-acrilamida son agentes neurotóxicos que se absorben a través de la piel.

### **3.2.15. Ensayos de inhibición durante la germinación *in vitro* del polen**

Los efectos de la inhibición de las enzimas esterasas sobre la germinación *in vitro* del polen se analizaron utilizando distintos inhibidores.

### Reactivos

- Medio de germinación (ver tabla 3.1).
- Inhibidores de esterasas, según la siguiente tabla:

**Tabla 3.8**

Inhibidor	Concentración final
p-CMB	0,5 mM
DIFP	2 mM
Neostigmina	5 mM
Ebelactona-B	0,25 mM

- Solución de Carnoy: ácido acético y etanol (3:1).

### Procedimiento

1. Germinar polen de olivo (protocolo 3.2.2) incorporando al medio de cultivo el inhibidor correspondiente (Tabla 3.8).
2. Añadir fijador de Carnoy al medio de cultivo (1:1, v/v).
3. Tomar una muestra de 100 µl del medio (réplica) y depositarla sobre un portaobjetos.



4. Cubrir la muestra con un cubreobjetos y seleccionar aleatoriamente varias áreas.
5. Tomar imágenes de cada una de las áreas (se utilizó el software de libre acceso ImageJ v.1.46.)
6. Calcular el porcentaje de germinación, según la fórmula:  
$$\% \text{ germinación} = (\text{número de granos germinados} \times 100) / \text{número total de granos}$$
Para cuantificar el porcentaje de germinación se realizaron 5 experimentos de germinación independientes y se tomaron 3 muestras ó réplicas de cada uno. En cada réplica, se contaron 200 granos de polen (N= 2.250) y se calculó la media y desviación estándar. Se consideró como polen germinado a aquellos cuya longitud del tubo polínico era  $\geq 2x$  diámetro del grano (Pinney y Polito 1990).
7. Cuantificar la longitud del tubo polínico a las 6 h de germinación. Para ello, se realizaron 5 experimentos independientes y se tomaron 3 muestras o réplicas cada uno. En cada réplica, se midieron 50 tubos polínicos (N= 750) mediante la herramienta “NeuronJ” del programa ImageJ v.1.46 y se calculó la media y desviación estándar.
8. Realizar controles negativos sin el inhibidor correspondiente. En cada caso, se añadió al medio de germinación el mismo volumen del disolvente en el cual se preparó el inhibidor (ej. 1 ml de etanol:H<sub>2</sub>O (1:1) en el caso de la ebelactona-B y el p-CMB).

### 3.2.16. Preparación de muestras para microscopía

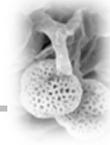
#### 3.2.16.1. Preparación de muestras para histoquímica

##### Reactivos

- Solución de fijación: 9 ml de tampón cacodilato sódico 0,1 M (pH 7,2) y 1 ml de glutaraldehído<sup>1</sup> al 25% (v/v).
- Solución de lavado: tampón cacodilato 0,05 M (pH 7,2).
- Solución de tetróxido de osmio<sup>2</sup> (OsO<sub>4</sub>) al 1% (p/v) en tampón cacodilato sódico 0,05 M (pH 7,2). Guardar a 4°C.
- Etanol a distintas concentraciones (30, 50, 70, 90 y 100% v/v).
- Resina Epon<sup>3</sup> (Epoxy Embedding Kit, Sigma-Aldrich). Conservar a -20°C.
- Óxido de propileno.

##### Procedimiento

1. Pesar 0,1 g del material vegetal (ej. polen) en un tubo de 1,5 ml.
2. Añadir 0,5 ml de solución de fijación e incubar a 4°C durante 1 h.



3. Tras dejar reposar el polen unos minutos, retirar con cuidado el fijador con una pipeta Pasteur y lavar las muestras con solución de lavado durante 30 min a temperatura ambiente.
4. Repetir el paso anterior dos veces.
5. Retirar el tampón de lavado y añadir 0,1 ml de solución de post-fijación e incubar a 25°C durante 1 h.
6. Retirar la solución de osmio con una pipeta Pasteur y lavar la muestra con solución de lavado 3 x 30 min a temperatura ambiente.
7. Deshidratar las muestras mediante cambios en alcohol:
  - Etanol al 30% (v/v) durante 1 h a 25°C.
  - Etanol al 50% (v/v) durante 1 h a 25°C.
  - Etanol al 70%<sup>4</sup> (v/v) durante 2-12 h a 4°C.
  - Etanol al 90% (v/v) durante 1 h a 25°C.
  - Etanol al 100% (v/v) durante 2 h a 25°C.
8. Retirar el etanol, e infiltrar las muestras en resina Epon<sup>5</sup> de la siguiente forma:
  - Óxido de propileno (OP) durante 5 min a 25°C.
  - OP/Epon (3:1) durante 1 h a 25°C.
  - OP/Epon (1:1) durante 12 h a 4°C.
  - OP/Epon (1:3) durante 1 h a 25°C.
  - Epon durante 48 h a 4°C.
9. Colocar las muestras en cápsulas de gelatina y rellenar con la resina Epon. Polimerizar la resina a 60°C durante 2-3 días.



<sup>1</sup> El glutaraldehído puede ocasionar sensibilización e irritación de la piel y mucosas, por lo que hay que extremar las precauciones cuando se trabaja con él (usar guantes, trabajar en una campana de extracción, etc.)

<sup>2</sup> Esta solución debe almacenarse en un frasco de color topacio (para evitar su oxidación), de boca ancha (para permitir el manejo de la ampolla de osmio) y de cierre hermético (para evitar la salida de vapores tóxicos). El OsO<sub>4</sub> es un agente potencialmente cancerígeno por lo que hay que extremar las precauciones cuando se trabaja con él (usar guantes, trabajar en una campana de extracción, etc.).

<sup>3</sup> La preparación de la resina es muy importante pues de su calidad depende la dureza de las inclusiones y la obtención final de buenos cortes. La resina se prepara siguiendo las indicaciones descritas por el fabricante.

<sup>4</sup> Podemos almacenar las muestras en etanol al 70% (v/v) a 4°C durante largos períodos de tiempo.

<sup>5</sup> El número de cambios en resina y el tiempo de infiltración depende de las características del tejido. Las condiciones indicadas son las óptimas para el material utilizado en este trabajo.

### 3.2.16.2. Preparación de muestras para inmunocitoquímica

#### Reactivos

- Solución de fijación (tabla 3.9):



Tabla 3.9

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Paraformaldehído <sup>1</sup>	5 g	2,5% (p/v)
Glutaraldehído al 25% (v/v)	50 µl	0,2% (v/v)
NaOH 1 N	1-3 gotas	-
H <sub>2</sub> O destilada hasta un volumen final de	25 ml	
<i>Procedimiento</i>		
1) Disolver el paraformaldehído en el tampón cacodilato con la ayuda del NaOH.		
2) Enfriar la solución resultante a 4°C.		
3) Añadir el glutaraldehído y ajustar el pH hasta 7,4.		
4) Completar con H <sub>2</sub> O destilada hasta un volumen final de 25 ml.		

- Solución de lavado: tampón cacodilato 0,05 M (pH 7,2).
- Etanol a distintas concentraciones (30, 50, 70, 90 y 100% v/v).
- Resina Unicryl (British BioCell, Cardiff, Reino Unido)

#### Procedimiento

1. Pesar 0,1 g del material vegetal (ej. polen) en un tubo de 1,5 ml.
2. Añadir 0,5 ml de solución de fijación e incubar durante 1–6 h<sup>2</sup> a 4°C.
3. Cambiar el fijador e incubar las muestras durante 12 h a 4°C.
4. Realizar tres lavados de 30 min cada uno a temperatura ambiente con tampón cacodilato sódico 0,05 M (pH 7,2).
5. Deshidratar las muestras mediante cambios en alcohol:
  - Etanol al 30% (v/v) durante 1 h a 25°C.
  - Etanol al 50% (v/v) durante 1 h a 25°C.
  - Etanol al 70%<sup>3</sup> (v/v) durante 12 h a 4°C.
  - Etanol al 90% (v/v) durante 6 h a 25°C.
  - Etanol al 100% (v/v) durante 96 h a 25°C.
6. Retirar el etanol e infiltrar las muestras en resina Unicryl<sup>4</sup> mediante cambios sucesivos en:
  - Etanol 100%:Unicryl (1:1) durante 2 días a –20°C.
  - Repetir el paso anterior.
  - Unicryl durante 1 semana a –20°C.
  - Unicryl durante 1 día a –20°C.
7. Colocar las muestras en cápsulas de gelatina y rellenar con la resina Unicryl.



8. Polimerizar la resina Unicryl a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 3 días bajo una lámpara de luz UV.



<sup>1</sup> El paraformaldehído es un agente cancerígeno, por lo que hay que extremar las precauciones cuando se trabaja con él (usar guantes, trabajar en una campana de extracción, etc.)

<sup>2</sup> El tiempo de fijación depende del material vegetal. En el caso del polen, 1-2 h de incubación con el fijador son suficientes. En otros tejidos (ej. anteras) es necesario prolongar el tiempo de incubación para que el fijador penetre bien en todos los tejidos.

<sup>3</sup> Podemos almacenar las muestras en etanol al 70% (v/v) a  $4^{\circ}\text{C}$  durante largos períodos de tiempo.

<sup>4</sup> El número de cambios en resina y el tiempo de infiltración depende de las características del tejido. Las condiciones indicadas son las óptimas para el material utilizado en este trabajo.

### 3.2.16.3. Microtomía

#### Procedimiento

1. Fijar en el portamuestras del micrótopo el bloque de resina con la muestra que queremos cortar.
2. Tallar una pirámide trapezoidal en el extremo de la cápsula donde se halla la muestra.
3. Fijar el portamuestras en el brazo del micrótopo (Ultracut E, Reichert-Jung, Alemania).
4. Montar y alinear la cuchilla de vidrio respecto a la muestra. Aproximar manualmente la pieza a la cuchilla con pasos de  $1-3\ \mu\text{m}$  hasta que se produzca el primer corte.
5. Realizar las secciones semifinas ( $1\ \mu\text{m}$  de grosor), que se depositan sobre una gota de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada en un portaobjetos tratado con 3-aminopropyltriethoxyxilane (APES). Los cortes se fijan al portaobjetos en una placa calefactora a  $38^{\circ}\text{C}$ .
6. Para realizar secciones ultrafinas ( $80\ \text{nm}$  de grosor) es necesario retallar de nuevo la pirámide, centrándola en la zona del tejido que se desea estudiar. Los cortes se depositan por contacto sobre rejillas de níquel de 200 agujeros recubiertas con una fina película de Formvar para facilitar la adhesión de los mismos.

### 3.2.16.4. Contrastado de cortes ultrafinos

Para aumentar el contraste de los tejidos vegetales se realiza una doble tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo, según se describe a continuación.

#### Reactivos

- Solución de acetato de uranilo al 5% (p/v). La solución se filtra y se almacena en oscuridad a  $4^{\circ}\text{C}$ .



- Solución de citrato de plomo. Mezclar 10 ml de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  80 mM y 10 ml de citrato sódico ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ ) 113 mM, y dejar reposar durante 30 minutos. Añadir 4 ml de NaOH 1 M y completar con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada hasta 25 ml. Hacer alícuotas de citrato de plomo:hidróxido sódico 0,01 M (1v:8v).

### Procedimiento

1. Colocar un trozo de parafilm en una placa de Petri y dispensar una gota de acetato de uranilo para cada rejilla que se va a teñir.
2. Colocar cada rejilla en la gota de modo que los cortes estén en contacto con la solución e incubar durante 15 min y en oscuridad<sup>1</sup>.
3. Lavar cada rejilla con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada durante 5 min.
4. Repetir el lavado dos veces.
5. Dejar secar las rejillas a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 min.
6. Poner un nuevo trozo de parafilm y añadir una gota de la solución de citrato de plomo para cada rejilla que se va a teñir<sup>2</sup>.
7. Colocar cada rejilla en la gota de modo que los cortes estén en contacto con la solución e incubar durante 5 min en oscuridad.
8. Lavar las rejillas con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada durante 5 min.
9. Repetir el lavado dos veces.
10. Dejar secar las rejillas sobre papel secante.



<sup>1</sup> La luz provoca la formación de cristales de acetato de uranilo que precipitan sobre los cortes. Para evitarlo, es conveniente centrifugar la solución a 13.500 rpm durante 2 min antes de su uso, y cubrir la placa de Petri con papel de aluminio para evitar la exposición a la luz.

<sup>2</sup> El  $\text{CO}_2$  puede provocar que el citrato de plomo precipite en forma de carbonato de plomo. Para evitarlo, se colocan lentejas de NaOH que absorben el  $\text{CO}_2$  en el interior de la placa de Petri, y ésta se sella con parafilm y se cubre con papel de aluminio para evitar la exposición a la luz. Es conveniente centrifugar la solución de citrato de plomo a 13.500 rpm durante 2 min antes de su uso con objeto de eliminar los precipitados.

### **3.2.16.5. Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido**

#### Reactivos

- Solución de fijación: 9 ml de tampón cacodilato sódico 0,1 M (pH 7,2) y 1 ml de glutaraldehído<sup>1</sup> al 25% (v/v).
- Solución de lavado: tampón cacodilato 0,05 M (pH 7,2).
- Solución de tetróxido de osmio<sup>2</sup> ( $\text{OsO}_4$ ) al 1% (p/v) en tampón cacodilato sódico 0,05 M (pH 7,2). Guardar a 4°C.
- Etanol a distintas concentraciones (30, 50, 70, 90 y 100% v/v).
- Pegamento conductor de carbón Leit-C™ (SPI Supplies, USA)



### Procedimiento

1. Fijar la muestra biológica con 0,5 ml de solución de fijación e incubar a 4°C durante 12 h.
2. Retirar con cuidado el fijador con una pipeta Pasteur y lavar las muestras con solución de lavado durante 30 min a temperatura ambiente.
3. Repetir el paso anterior dos veces.
4. Retirar el tampón de lavado y añadir 0,1 ml de solución de post-fijación e incubar a 4°C durante 2 h.
5. Retirar la solución de osmio con una pipeta Pasteur y lavar la muestra con solución de lavado 3 x 30 min a temperatura ambiente.
6. Deshidratar las muestras en series de etanol creciente (protocolo 3.2.16.1).
7. Desechar las muestras por el método del punto crítico (Anderson 1951) con dióxido de carbono en un desecador Polaron CPD 7501 (Polaron Equipment Ltd., Reino Unido).
8. Montar las muestras utilizando el pegamento conductor de carbón.
9. Recubrir las muestras con carbón y con oro de 20 nm en un evaporador/metalizador Balzers SCD 004 (Bal-Tec AG, Fürstentum, Liechtenstein).
10. Observar y fotografiar las muestras en un microscopio electrónico de barrido FEI QUANTA 400 FEG ESEM/EDAX PEGASUS X4 (Zeiss, Alemania) operando a 15 kV.



<sup>1</sup> El glutaraldehído puede ocasionar sensibilización e irritación de la piel y mucosas, por lo que hay que extremar las precauciones cuando se trabaja con él (usar guantes, trabajar en una campana de extracción, etc.)

<sup>2</sup> Esta solución debe almacenarse en un frasco de color topacio (para evitar su oxidación), de boca ancha (para permitir el manejo de la ampolla de osmio) y de cierre hermético (para evitar la salida de vapores tóxicos). El OsO<sub>4</sub> es un agente potencialmente cancerígeno por lo que hay que extremar las precauciones cuando se trabaja con él (usar guantes, trabajar en una campana de extracción, etc.).

### **3.2.17. Localización celular de la actividad esterasa NE en el polen**

#### Reactivos

- Tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0).
- Solución de la sal Fast Blue RR<sup>1</sup> 2 mg/ml en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0).
- Solución de acetato de  $\alpha$ -naftilo 60 mg/ml en acetona.



### Procedimiento para microscopía óptica

1. Pesar 0,01 g de polen (maduro y germinado) o, en su defecto poner un pistilo en un tubo de 1,5 ml.
2. Preparar la siguiente mezcla de reacción:

Tabla 3.10

Reactivo	Polen	Pistilo
Fast Blue RR 2 mg/ml	40 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0)	100 $\mu$ l	940 $\mu$ l
Acetato de $\alpha$ -naftilo 60 mg/ml	20 $\mu$ l	10 $\mu$ l

3. Incubar durante 4 min a 37°C en agitación muy suave.
4. Tomar una muestra de 20  $\mu$ l de polen y depositarla en un portaobjetos. Observar en un microscopio Axioplan (Carl Zeiss Inc.). La actividad enzimática se visualizó como una coloración marrón-negrusca. Las imágenes se obtuvieron con un cámara digital ProGres C3 y el programa ProGres CapturePro v2.6 (Jenoptik AG, Jena, Alemania).
5. Observar las muestras de pistilos en un estereomicroscopio M165FC (Leica Microsystems GmbH, Alemania). La actividad enzimática se visualizó como una coloración marrón-negrusca. Las imágenes se tomaron con una cámara DFC de Leica y el programa Leica Imaging (Leica Microsystems, Bensheim, Alemania).
6. Realizar controles negativos sin el sustrato y sin la sal.

### Procedimiento para secciones semi-finas

1. Preparar la siguiente mezcla de reacción:

Tabla 3.11

Reactivo	Volumen
Tampón fosfato sódico 0,1M (pH 7,0)	940 $\mu$ l
Fast Blue RR 2 mg/ml	50 $\mu$ l
Acetato de $\alpha$ -naftilo 60 mg/ml	10 $\mu$ l

2. Colocar una gota (150  $\mu$ l) de mezcla de reacción sobre las secciones semi-finas en un portaobjetos e incubar en una cámara húmeda<sup>2</sup> durante 20 min a 37°C en oscuridad.



3. Lavar las secciones con H<sub>2</sub>O destilada hasta eliminar cualquier resto de mezcla de reacción.
4. Poner un cubreobjetos y montar en un medio adhesivo (ej. Merckoglass, Merck, Whitehouse Station, NJ, EEUU).
5. Observar en un microscopio óptico Axioplan (Carl Zeiss Inc.). La actividad se visualizó en forma de un precipitado de color marrón-negruzco. Las imágenes se obtuvieron con un cámara digital ProGres C3 y el programa ProGres CapturePro v2.6 (Jenoptik AG).
6. Realizar controles negativos sin el sustrato y sin la sal.

#### Procedimiento para microscopía electrónica de transmisión

1. Pesar 0,01 g de polen (maduro y germinado) en un tubo de 1,5 ml.
2. Preparar la siguiente mezcla de reacción:

Tabla 3.12

Reactivo	Volumen
Tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0)	1410 µl
Fast Blue RR 2 mg/ml	60 µl
Acetato de α-naftilo 60 mg/ml	30 µl

3. Incubar durante 30 min a 37°C en agitación muy suave y en oscuridad.
4. Fijar e incluir las muestras en Epon (protocolo 3.2.16.1).
5. Realizar cortes ultrafinos (protocolo 3.2.16.3) y contrastar las muestras (protocolo 3.2.16.4).
6. Observar las muestras en un microscopio electrónico de transmisión JEM-1011 (Jeol Ltd., Tokio, Japón) operando a 80 kV. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital MegaView III, con ayuda del programa iTEM v5.0 (Olympus Soft Image Solutions GmbH, Múnich, Alemania).
7. Realizar controles negativos sin el sustrato y sin la sal.



<sup>1</sup> Una vez preparada la solución se filtra mediante un embudo y papel absorbente y se envuelve con papel de aluminio. Preparar la solución inmediatamente antes de su uso.

<sup>2</sup> La cámara húmeda se prepara con una placa de Petri en cuyo interior se introducen varias capas de papel absorbente humedecido con H<sub>2</sub>O destilada. La placa se envuelve en papel de aluminio para evitar la exposición a la luz.

### 3.2.18. Localización celular de la actividad pectinolítica en el polen

#### Reactivos

- Tampón fosfato sódico dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 0,2 M (pH 6,3).



- Solución de pectina esterificada de cáscara de naranja (Sigma-Aldrich Co., San Luis, EEUU) al 0,1% (p/v) en fosfato sódico dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 0,2 M (pH 6,3).

### Procedimiento

1. Pesar 0,01 g de polen (maduro y germinado durante 3 h) en un tubo de 1,5 ml.
2. Incubar con la solución de pectina esterificada durante 15-30 min a 37°C en agitación muy suave y en oscuridad.
3. Fijar e incluir las muestras en Epon (protocolo 3.2.16.1).
4. Realizar cortes ultrafinos (protocolo 3.2.16.3) y contrastar las muestras (protocolo 3.2.16.4).
8. Observar las muestras en un microscopio electrónico de transmisión JEM-1011 (Jeol Ltd.). Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital MegaView III, con ayuda del programa iTEM v5.0 (Olympus).
5. Realizar controles negativos sin el sustrato y sin la sal



<sup>1</sup> Una vez preparada la solución se filtra mediante un embudo y papel absorbente y se envuelve con papel de aluminio. Preparar la solución inmediatamente antes de su uso.

### **3.2.19. Localización celular de la actividad esterasa/lipasa en el polen**

#### Reactivos

- Solución de detección: 25  $\mu\text{l}$ /ml del éster de resorufina (Sigma-Aldrich) en etanol absoluto.
- Solución de PBS 10x (pH 7,4):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  80 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  15 mM, NaCl 1,3 mM y KCl 30 mM.
- Solución de PBS 1x (pH 7,4): 10 ml de solución de PBS 10x y 900 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

#### Procedimiento

1. Pesar 0,01 g de polen (maduro y germinado) en un tubo de 1,5 ml.
2. Añadir 150  $\mu\text{l}$  de solución de detección, mezclar e incubar a 25°C durante 10-15 min en oscuridad.
3. Lavar el polen con PBS 1x durante 10 min.
4. Repetir el lavado dos veces.
5. Colocar una gota de la muestra (30  $\mu\text{l}$ ) entre dos cubreobjetos y sellar los lados con cinta adhesiva creando una cámara estanca.
6. Observar en un microscopio de barrido láser confocal (ej. C1-Eclipse, Nikon Co., Tokio, Japón). Las imágenes de campo claro se obtuvieron mediante la opción de luz transmitida y las de fluorescencia con la línea



de láser 488 nm. Las imágenes fueron capturadas con el programa EZ-C1 Gold versión 2.1 build 240 (Nikon).

- Realizar controles negativos sin el sustrato.

### 3.2.20. Localización celular de la actividad acetilcolinesterasa en el polen

#### Reactivos

- Solución de acetato sódico 0,1 M (pH 6,0).
- Solución de citrato sódico 0,1 M.
- Solución de sulfato de cobre 30 mM. Guardar a 4°C protegida de la luz.
- Solución de ferrocianuro potásico 5 mM. Guardar a 4°C protegida de la luz.
- Ioduro de acetiltiocolina<sup>1</sup> (Sigma-Aldrich).

#### Procedimiento

- Pesar 0,01 g de polen (maduro y germinado) en un tubo de 1,5 ml.
- Preparar la siguiente mezcla de reacción:

Tabla 3.14

Reactivo	Volumen
Acetato sódico 0,1 M (pH 6.0)	975 $\mu$ l
Ioduro de acetiltiocolina	2 mg
Citrato sódico 0,1 M	75 $\mu$ l
Sulfato de cobre 30 mM	150 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O destilada	150 $\mu$ l
Ferrocianuro potásico 5 mM	150 $\mu$ l

- Añadir la mezcla al polen e incubar durante 40 min a 25°C en agitación muy suave.
- Fijar e incluir las muestras en Epon (protocolo 3.2.16.1).
- Realizar cortes ultrafinos (protocolo 3.2.16.3) y contrastar las muestras (protocolo 3.2.16.4).
- Observar las muestras en un microscopio electrónico de transmisión JEM-1011 (Jeol Ltd.). Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital MegaView III, con ayuda del programa iTEM v5.0 (Olympus).
- Realizar controles negativos sin el sustrato.



<sup>1</sup> Reactivo muy tóxico. Extremar las precauciones durante su utilización (guantes, mascarilla, etc.).

### 3.2.21. Análisis de proteómica

#### 3.2.21.1. Extracción de proteínas del exudado del estigma

##### Reactivos

- Solución de precipitación: TCA al 20% (p/v) y DTT al 0,2% (p/v) en acetona. Guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Solución de lavado: DTT al 0,2% (p/v) en acetona. Guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Tampón de muestras 5x: Tris-HCl (pH 6,8) 50 mM, SDS al 10% (p/v), glicerol al 50% (v/v), DTT al 1% (p/v) y azul de bromofenol al 0,05% (p/v).

##### Procedimiento

1. Añadir a la muestra (exudado estigmático) 9 volúmenes de solución de precipitación y dejar precipitar las proteínas durante 6 h a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
2. Centrifugar a 13.500 rpm durante 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y eliminar el sobrenadante.
3. Añadir la solución de lavado y centrifugar a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 15 min a 13.500 rpm. Retirar el sobrenadante.
4. Repetir el paso anterior dos veces.
5. Dejar secar el precipitado en una campana de extracción durante 3-5 min y resuspender las proteínas en tampón de muestras.
6. Medir la concentración de proteínas mediante el kit comercial 2D Quant Kit (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suecia) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 3.2.21.2. Marcado y extracción de las proteínas del “pollen coat”

##### Reactivos

- Kit comercial “Amersham™ CyDye™ DIGE Fluor Labelling Kit for Scarc Samples” (GE Healthcare Bio-Sciences AB).
- Tampón Tris-HCl 30 mM (pH 8,0). Guardar a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Solución de NaOH 50 mM.
- Solución de reducción: Tris-(2-carboxietilo)-fosfina (TCEP, Sigma-Aldrich) 200 mM. Guardar a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Solución stock de Cy3 20 mM. Reconstituir el fluorocromo en 5  $\mu\text{l}$  de dimetilformamida. Esta solución es estable durante 8 semanas a  $-20^{\circ}\text{C}$  y en oscuridad.



- Solución de trabajo de Cy3 2 mM. Añadir 1  $\mu$ l de la solución stock de Cy3 y 9  $\mu$ l de dimetilformamida. Guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$  y en oscuridad.
- Tiras indicadoras de pH de rango 4,5-10,0 (Sigma-Aldrich).
- Ciclohexano.
- Tampón de extracción: Tris-HCl 30 mM (pH 8,0), urea 7 M, tiourea 2 M y 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propano sulfonato (CHAPS, Sigma-Aldrich) al 4% (p/v). Guardar a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Solución de precipitación: TCA al 20% (p/v) y DTT al 0,2% (p/v) en acetona. Guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Solución de lavado: DTT al 0,2% (p/v) en acetona. Guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Tampón de muestras 5x: Tris-HCl (pH 6,8) 50 mM, SDS al 10% (p/v), glicerol al 50% (v/v), DTT al 1% (p/v) y azul de bromofenol al 0,05% (p/v).

### Procedimiento 1

1. Pesar 0,01 g de polen y añadir 80  $\mu$ l de tampón Tris-HCl 30 mM (pH 8,0).
2. Medir el pH de la solución, el cual debe estar comprendido entre 7,8 y 8,2. En caso contrario, ajustar el pH con unas gotas de NaOH.
3. Añadir 2  $\mu$ l de la solución de reducción y mezclar bien.
4. Incubar durante 40 min a  $37^{\circ}\text{C}$  y en oscuridad.
5. Añadir 4  $\mu$ l de solución de Cy3 2 mM e incubar durante 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$  y en oscuridad.
6. Centrifugar a 1.000 rpm durante 10 s y retirar el fluorocromo con una pipeta.
7. Lavar el polen con 100  $\mu$ l de tampón Tris-HCl 30 mM (pH 8,0) durante 15 s y en oscuridad.
8. Repetir el paso anterior dos veces.
9. Retirar el tampón de lavado y añadir 50  $\mu$ l de ciclohexano.
10. Centrifugar a 2.500 rpm durante 30 s a temperatura ambiente y en oscuridad. Transferir el ciclohexano a un tubo de 1,5 ml.
11. Evaporar el ciclohexano en un dispositivo "Speed vacuum" a  $4^{\circ}\text{C}$  y en oscuridad.
12. Resuspender el pellet en 50  $\mu$ l de tampón de muestras 1x. Guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
13. Medir la concentración de proteínas mediante el kit comercial 2D Quant Kit (Amersham Biosciences AB) siguiendo las instrucciones del fabricante.



### Procedimiento 2

1. Procesar las muestras tal y como se indica arriba (pasos 1-8).
2. Retirar el tampón de lavado y homogeneizar el polen en un mortero con N<sub>2</sub> líquido y en oscuridad hasta obtener un polvillo fino.
3. Transferir el polvillo a un tubo de 1,5 ml y añadir 50 µl de tampón de extracción.
4. Agitar durante 3 h a 4°C en un agitador magnético.
5. Centrifugar a 13.500 rpm durante 30 min a 4°C y en oscuridad.
7. Añadir a la muestra 9 volúmenes de solución de precipitación y dejar precipitar las proteínas durante 6 h a -20°C.
8. Centrifugar a 13.500 rpm durante 30 min a 4°C y eliminar el sobrenadante.
9. Añadir la solución de lavado y centrifugar a 4°C durante 15 min a 13.500 rpm. Retirar el sobrenadante.
10. Repetir el paso anterior dos veces más.
11. Dejar secar el precipitado en una campana de extracción y resuspender las proteínas en tampón de muestras 1x. Guardar a -20°C.
6. Medir la concentración de proteínas mediante el kit comercial 2D Quant Kit (Amersham Biosciences AB) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **3.2.21.3. Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)**

#### Reactivos

- Ver protocolo 3.2.8

#### Procedimiento

1. Preparar los geles de poliacrilamida según se especifica en la tabla 3.4 (protocolo 3.2.8).
2. Preparar las muestras en tubos de 1,5 ml, añadiendo 30 µg de proteína, 5 µl de tampón de muestras 5x y H<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 25 µl.
3. Hervir las muestras a 95°C durante 10 min.
4. Transferir los tubos con las muestras a hielo y enfriar durante 5 min.
5. Cargar las muestras en los pocillos del gel y llenar el tanque con tampón de electroforesis 1x. En uno de los pocillos, cargar los marcadores de peso molecular.
6. Conectar a voltaje constante de 90 V durante los primeros 30 min seguido de 180 V hasta que el frente de azul de bromofenol alcance el final del gel separador.



### 3.2.21.4. Tinción de proteínas

#### a) Tinción con Azul de Coomassie

##### Reactivos

- Solución de tinción: ácido acético al 10% (v/v), etanol al 30% (v/v) y azul de Coomassie R250 al 0,25% (p/v).
- Solución para desteñir: etanol al 25% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v).

##### Procedimiento

1. Sumergir el gel en la solución de tinción (50 ml) durante 1 h, a temperatura ambiente y en agitación suave.
2. Lavar con H<sub>2</sub>O destilada unos segundos para eliminar los restos del colorante.
3. Eliminar el exceso de colorante en el gel mediante uno o varios lavados en 50 ml de la solución para desteñir.
4. Lavar el gel con H<sub>2</sub>O destilada.
5. Documentar el gel con un escáner.

#### b) Tinción con Deep Purple

##### Reactivos

- Solución “Amersham Deep Purple Total Protein Stain” (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Guardar a -20°C.
- Solución de fijación: etanol al 15% (p/v) y ácido cítrico al 1% (p/v).
- Solución de borato sódico 100 mM (pH 10,5). Ajustar el pH con NaOH 50 mM.
- Solución de tinción: Deep Purple en borato sódico 100 mM (1v:200v). Preparar antes de usar.
- Solución de lavado: etanol al 15% (v/v).
- Solución de ácido cítrico al 1% (p/v) en H<sub>2</sub>O destilada.

##### Procedimiento

1. Transferir el gel a 50 ml de la solución de fijación y agitar durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad.
2. Teñir las proteínas durante 1 h en 50 ml de solución de tinción a temperatura ambiente y en oscuridad.
3. Lavar el gel durante 30 min mediante agitación en 50 ml de solución de lavado a temperatura ambiente y en oscuridad.
4. Lavar el gel durante 5 min en 50 ml de solución de ácido cítrico al 1% (p/v).



5. Escanear el gel con un escáner dotado de un láser azul como fuente de excitación (ej. Pharos FX Molecular Imager, Bio-Rad).

### 3.2.21.5. Identificación de proteínas mediante LC-MS/MS

La identificación de las proteínas presentes en el exudado y el “pollen coat” se llevó a cabo mediante espectrometría de masas, según el protocolo que se detalla a continuación.

1. Escindir las bandas proteicas de los geles de poliacrilamida con ayuda de un escalpelo.
2. Lavar los fragmentos resultantes con una solución de bicarbonato amónico ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) 25 mM:acetonitrilo (1:1, v:v). Repetir el lavado dos veces.
3. Realizar la reducción de los residuos de cisteína (Cys) incubando a 57°C los fragmentos del gel de poliacrilamida con 50  $\mu\text{l}$  de una solución de DTT 10 mM.
4. Realizar la alquilación de los residuos de Cys incubando a temperatura ambiente con 50  $\mu\text{l}$  de iodoacetamida 55 mM.
5. Deshidratar el gel de poliacrilamida con acetonitrilo (CAN).
6. Digerir las proteínas a temperatura ambiente durante 12 h en 15  $\mu\text{l}$  de una solución de tripsina porcina modificada (Promega, Madison, WI, EEUU) a una concentración final de 12.5 ng/ $\mu\text{l}$ , preparada en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM.
7. Extraer los péptidos resultantes de la digestión incubando primero con una solución de ACN al 60% (v/v) en ácido fórmico al 5% (v/v) y, a continuación, con ACN al 100% (v/v).
8. Analizar los péptidos mediante nano-LC-MS/MS en un sistema de cromatografía líquida capilar CapLC system (Micromass, Manchester, Reino Unido) acoplado a un espectrómetro de masas en tándem Q-TOF II (Micromass). La separación cromatográfica de los péptidos se realizó en una columna capilar de fase reversa Pepmap<sup>TM</sup> C18 (LC Packings, Sunnyvale, CA, EEUU) a una tasa de flujo de 200 nl/min. Se realizó una calibración externa utilizando una solución de GFP ([Glu1]-Fibrinopéptido B) a una concentración final de  $\mu\text{M}$  pmol/ adquisición de los datos de masas se llevó a cabo con ayuda del programa MassLynx 4 (Micromass) utilizando una conmutación automática entre el modo MS y MS/MS.
9. Identificar la proteína por homología mediante búsqueda en la base de datos Viridiplantae con ayuda del servidor local Mascot<sup>TM</sup> (Matrix Science, Londres, Reino Unido). El error máximo permitido en la



búsqueda fue de menos de 100 ppm sobre el patrón de masa iónica y las secuencias de péptidos fueron inspeccionadas manualmente. Las búsquedas de proteínas se realizaron teniendo en cuenta varias modificaciones, tales como la carbamidometilación de los residuos de Cys y oxidación de los residuos de Met. Además, las búsquedas se realizaron sin ninguna limitación de peso molecular y punto isoelectrico y se permitió un salto en los sitios de escisión de la tripsina por cada péptido.

### 3.2.21.6. Identificación de proteínas mediante secuenciación *de novo*

Las búsquedas por homología en Mascot no siempre condujeron a una identificación positiva de las proteínas debido a que el genoma de *Olea europaea* no está aún secuenciado en su totalidad. En estos casos, se llevó a cabo una identificación mediante secuenciación *de novo* con ayuda de la herramienta PepSeq del programa MassLynx 4 (Micromass) y con el programa PEAKS Studio (Bioinformatics Solutions, Waterloo, Canadá). A continuación, se llevó a cabo la búsqueda de homología de las secuencias peptídicas mediante el programa BLAST (<http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/msblast.html>) en la base de datos Viridiplantae.

### 3.2.22. Clonación de una pectina metilesterasa (PME) del polen

La clonación de una PME de polen y estigma de olivo se realizó mediante una estrategia de RT-PCR y RACE, tal y como se describe a continuación.

#### 3.2.22.1. Aislamiento y cuantificación del ARN total

Para la extracción de ARN total de polen y estigma de olivo se utilizó el kit comercial “RNeasy® Plant Total RNA Kit” (Qiagen, Hilden, Alemania).

#### Reactivo

- RNeasy® Plant Total RNA Kit (Qiagen). Guardar a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- H<sub>2</sub>O-DEPC<sup>1</sup>: dietilpirocarbonato (DEPC) al 0,1% (p/v) en H<sub>2</sub>O destilada. Autoclavar para eliminar el DEPC.

#### Procedimiento

1. Homogenizar 0,1 g de material (ej. polen) en un mortero con N<sub>2</sub> líquido hasta reducir el material a un polvillo fino.
2. Transferir el polvillo a un tubo de 1,5 ml y añadir 500 µl de tampón de lisis RLT y 5 µl de β-mercaptoetanol. Incubar a 56°C durante 1-3 min.
3. Aplicar el homogenado a una columna “QIAshredder” y centrifugar a 14.000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente.



4. Transferir la fracción filtrada a un nuevo tubo de 1,5 ml y añadir 225  $\mu$ l de etanol.
5. Aplicar la muestra a una columna "RNeasy spin" y centrifugar a 10.000 rpm durante 15 s a temperatura ambiente.
6. Desechar la fracción filtrada.
7. Añadir 700  $\mu$ l de tampón de lavado RW1 en la columna y centrifugar a 10.000 rpm durante 15 s a temperatura ambiente.
8. Desechar la fracción filtrada y transferir la columna a un tubo nuevo de 2 ml. Añadir 500  $\mu$ l de tampón de lavado RPE y centrifugar a 10.000 rpm durante 15 s a temperatura ambiente.
9. Repetir el paso anterior dos veces.
10. Desechar la fracción filtrada.
11. Eluir el ARN con 30-50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O-DEPC centrifugando a 10.000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente.
12. Guardar el ARN obtenido a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso.
13. Cuantificar la cantidad de ARN midiendo la absorbancia a 260 nm ( $\text{DO}_{260}$ ) en un espectrofotómetro (ej. NanoDropR ND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EEUU). Para determinar la pureza, se determinó el valor del cociente  $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ , cuyo valor es próximo a 1 en muestras muy puras.



<sup>1</sup> El ARN es degradado por enzimas ribonucleasas, muy estables y activas. El DEPC es un inhibidor de ARNasas.

### 3.2.22.2. Síntesis de ADNc (transcripción reversa)

#### Reactivos

- Transcriptasa reversa M-MLV (Fermentas, Vilnius, Lituania). Guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Tampón del enzima 5x. Guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Mezcla de dNTPs 10 mM. Guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Adaptador-oligo dT 1  $\mu\text{M}$ . Guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- H<sub>2</sub>O-DEPC<sup>1</sup>: DEPC al 0,1% (p/v) en H<sub>2</sub>O destilada. Autoclavar para eliminar el DEPC.

#### Procedimiento

1. Preparar la siguiente mezcla de reacción (Tabla 3.15):



Tabla 3.15

Reactivo	Volumen
1-5 µg de ARN total	– µl <sup>2</sup>
1-50 µmol del adaptador-oligo dT	– µl <sup>3</sup>
H <sub>2</sub> O-DEPC hasta un volumen final de	20 µl

2. Incubar la mezcla anterior a 70°C durante 10 min y enfriar en hielo durante 5 min.
3. A la mezcla anterior, añadir los siguientes componentes:

Tabla 3.16

Reactivo	Volumen
Tampón del enzima RT M-MLV 5x	8 µl
Mezcla de dNTPs 10 mM	2 µl
H <sub>2</sub> O-DEPC hasta un volumen final de	37,5-39,5 µl

4. Centrifugar a 10.000 rpm unos segundos e incubar los tubos a 37°C durante 2 min.
5. Añadir 0,5-2,5 µl del enzima transcriptasa reversa M-MVL<sup>4</sup> e incubar la mezcla final durante 1 h a 37°C en un termociclador.



<sup>1</sup> El ARN es degradado por enzimas ribonucleasas, muy estables y activas. El DEPC es un inhibidor de ARNasas.

<sup>2</sup> El volumen dependerá de la concentración de ARN en la muestra.

<sup>3</sup> Añadir 10 µmol de adaptador-oligo dT por cada µg de ARN total.

<sup>4</sup> Añadir 100 unidades (U) del enzima por cada µg de ARN total. Se define la unidad como la cantidad de enzima que incorpora 1 nanomol de dNTPs en forma de ácido insoluble después de una incubación durante 10 min a 37°C, utilizando poli (rA)-oligo (dT)<sub>50</sub> como cebador.

### 3.2.22.3. Amplificación del ADNc mediante PCR

Para llevar a cabo la amplificación del ADNc se diseñaron cebadores degenerados y específicos (Tabla 3.17) a partir del alineamiento múltiple de varias secuencias nucleotídicas de PMEs de plantas presentes en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para el diseño de los cebadores, se utilizaron los programas Clustal W2 y Primers.



Tabla 3.17

Nombre	Secuencia de los cebadores	Tm (°C)	% GC	Tamaño (pb)
PME1s	5'-ACYRTWGAYTWCATYTTTGG-3'	45	40	400
PME1a	5'-CCNGGNCCTNTRTT-3'	46	57	
PME2s	5'-CGGAGGGGCAAGCCAAGGTG-3'	63.5	70	543
PME2a	5'-CCCCGGGGACGGCATGTAAC-3'	62.9	66	

### Reactivos

- Mezcla de dNTPs 10 mM. Guardar a -20°C.
- MgCl<sup>+2</sup> 50 mM. Guardar a -20°C.
- EcoTaq ADN polimerasa (EcoGen, Madrid, España). Guardar a -20°C.
- Tampón del enzima EcoTaq ADN polimerasa 10x.
- Oligos PME1s, PME1a, PME2s y PME2a 10 mM.
- H<sub>2</sub>O-DEPC<sup>1</sup>: DEPC al 0,1% (p/v) en H<sub>2</sub>O destilada. Autoclavar para eliminar el DEPC.

### Procedimiento

1. Preparar la siguiente mezcla de reacción:

Tabla 3.18

Reactivo	Volumen
Tampón de la Taq ADN polimerasa 10x	5 µl
Mezcla de dNTPs 10 mM	1 µl
MgCl <sup>+2</sup> 50 mM	1,5 µl
Oligo PME1s (ó PME2s) 10 mM	1 µl
Oligo PME1a (ó PME2a) 10 mM	1 µl
ADNc procedente de la reacción RT (50 ng)	_µl
H <sub>2</sub> O destilada hasta un volumen final de	50 µl

2. Incubar a 94°C durante 3 min en un termociclador (ej. T-Gradient Thermoblock, Biometra GmbH, Göttingen, Alemania) y disminuir la temperatura a 80°C<sup>2</sup>. Añadir 0,5 µl del enzima EcoTaq ADN polimerasa (EcoGen)<sup>3</sup>.
3. Aplicar el programa de amplificación siguiente durante 30 ciclos:
  - Desnaturalización a 94°C durante 1 min.
  - Hibridación a 50-60°C durante 1-2 min<sup>4</sup>.
  - Elongación a 72°C durante 1 min.



#### 4. Incubar las muestras a 72°C durante 10 min y mantener a 4°C.



<sup>1</sup> El ARN es degradado por enzimas ribonucleasas, muy estables y activas. El DEPC es un inhibidor de ARNasas.

<sup>2</sup> Protocolo de amplificación “Hot Start”.

<sup>3</sup> El enzima EcoTaq ADN polimerasa se suministra a una concentración de 5 U/μl. Se define la unidad como la cantidad de enzima que incorpora 10 nanomoles de dNTPs en forma de ácido insoluble después de una incubación durante 30 min a 72°C.

<sup>4</sup> La temperatura y el tiempo de hibridación fueron determinados empíricamente.

#### 3.2.22.4. Amplificación de los extremos 3' y 5' mediante RACE

La amplificación de los extremos 5' y 3' de la PME se realizó mediante RACE, utilizando el kit comercial “Smart™ Race cDNA Amplification Kit” (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Francia).

##### Reactivos

- Kit comercial “Smart™ Race cDNA Amplification Kit” (Clontech). Guardar a –20°C.
- Oligos PME3s y PME3a 10 mM. Guardar a –20°C.
- Tampón Tricina-KOH 10 mM (pH 8,5).
- Solución de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 1 mM.
- Solución TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1mm).

##### Procedimiento

1. Preparar la mezcla de reacción 5' (tabla 3.19) y 3' (tabla 3.20) en tubos de centrífuga de 0,5 ml:

Tabla 3.19

Reactivo	Volumen
ARNm (1 μg)	1 μl
5'-CDS primer A	1 μl
Oligo SMART II A	1 μl
H <sub>2</sub> O destilada hasta un volumen final de	5 μl

Tabla 3.20

Reactivo	Volumen
ARNm (1 μg)	1 μl
3'-CDS primer A	1 μl
H <sub>2</sub> O destilada hasta un volumen final de	5 μl



2. Incubar ambas mezclas de reacción a 70°C en un termociclador T-Gradient Thermoblock (Biometra GmbH) durante 2 min.
3. Enfriar los tubos en hielo durante 2 min.
4. Añadir a cada tubo los siguientes reactivos:

Tabla 3.21

Reactivo	Volumen
First strand buffer 5x	2 µl
DTT 20 mM	1 µl
Mezcla de dNTPs 10 mM	1 µl
Transcriptasa reversa M-MLV	1 µl

5. Mezclar bien con la pipeta e incubar a 42°C durante 90 min en el termociclador.
6. Diluir el producto de la reacción añadiendo 100 µl de tampón TE.
7. Calentar los tubos a 72°C durante 7 min y enfriar los tubos en hielo durante 2 min para detener la reacción.
8. Preparar el siguiente medio de reacción por duplicado en dos tubos de 0,5 ml:

Tabla 3.22

Reactivo	Volumen
Tampón 10x Advantage 2 PCR	5 µl
Mezcla de dNTPs 10 mM	1 µl
Mezcla 50x Advantage 2 Polymerase	1 µl
H <sub>2</sub> O	34,5 µl

9. Mezclar con cuidado de no producir burbujas, y centrifugar unos segundos.
10. Añadir los siguientes reactivos a una de las mezclas de reacción anterior:



Tabla 3.23

Reactivo	Volumen
Mezcla de reacción	41,5 µl
cDNA 5'-RACE	2,5 µl
Oligo UPM 10x	5 µl
Oligo PME2a (5'-CCCCGGGGACGGCATGTAAC-3') 10 mM	1 µl
Volumen final	50 µl

11. Añadir los siguientes reactivos a la segunda mezcla de reacción:

Tabla 3.24

Reactivo	Volumen
Mezcla de reacción	41,5 µl
cDNA 3'-RACE	2,5 µl
Oligo UPM 10x	5 µl
Oligo PME2s (5'-CGGAGGGGCAAGCCAAGGTG-3') 10 mM	1 µl
Volumen final	50 µl

12. Aplicar con el programa de amplificación siguiente:

Tabla 3.25

Programa	Ciclos
Desnaturalización a 94°C durante 30 s Hibridación a 72°C durante 3 min	5
Desnaturalización a 94°C durante 30 s Hibridación a 70°C durante 30 s Elongación a 72°C durante 3 min	5
Desnaturalización a 94°C durante 30 s Hibridación a 68°C durante 30 s Elongación a 72°C durante 3 min	27

### 3.2.22.5. Clonación de los productos de PCR en *Escherichia coli*

Los distintos productos de PCR fueron clonados en el vector comercial pGEM®-T Easy (Promega, Fitchburg, WI, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la ligación, el vector con el inserto fue incorporado a *E. coli*



JM109 mediante transformación por medio de choque térmico (42°C durante 50 s) siguiendo el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). La detección de las colonias recombinantes con el inserto se efectuó mediante sembrado en placas con medio de cultivo LB con agar y ampicilina (100 µg/ml). Las placas se incubaron toda la noche a 37°C, tras lo cual se picaron 5 colonias transformadas (colonias blancas) que se crecieron de forma individualizada en 3 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml).

### 3.2.22.6. Electroforesis en geles de agarosa

Los fragmentos resultantes de las distintas amplificaciones por PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa. La purificación de las bandas de ADN a partir de los geles se llevó a cabo utilizando el kit comercial “MBL-Agarosa QuickClean”, tal y como se describe a continuación.

#### Reactivos

- Kit comercial “MBL-Agarosa QuickClean” (Dominion-MBL Córdoba, España) Guardar a 4°C.
- Agarosa.
- Tampón Tris/ácido acético/EDTA (TAE): Tris-base 50 mM (pH 8,2), ácido acético 20 mM y EDTA 2,5 mM.
- Tampón de muestras 6x: glicerol al 18% (v/v), verde de bromofenol al 0,15% (p/v), xileno cianol al 0,25% (p/v), EDTA 6 mM y NaOH 300 mM.
- Solución de GelRed™ (Biotium Inc., Hayward, CA, EEUU) al 1% (p/v).

#### Procedimiento

1. Preparar el gel de agarosa como se describe a continuación:
  - a. Añadir 0,5 g de agarosa en 50 ml de tampón TAE.
  - b. Disolver en el microondas y dejar enfriar unos minutos.
  - c. Añadir 1 µl de solución de gel red.
  - d. Verter la mezcla en una bandeja y dejar solidificar<sup>1</sup> durante 30 min.
2. Preparar las muestras<sup>2</sup> mezclando 10 µl de la reacción de PCR con 2 µl del tampón de muestras 6x.
3. Una vez solidificada la agarosa, retirar el peine y llenar la cubeta de electroforesis (ej. Minisub ADN Cell, Bio-Rad) con el tampón TAE.
4. Cargar las muestras y correr el gel a voltaje constante (80 V) durante 1 h.
5. Documentar el gel en un equipo GelDoc 1000/2000 (Bio-Rad) con ayuda del programa Quantity One v4.6.2 (Bio-Rad).



6. Transferir el gel a un transiluminador UV y cortar la banda de ADN con un bisturí, eliminando la mayor cantidad posible de agarosa. Pesar el fragmento en un tubo de 0,5 ml.
7. Añadir 3  $\mu$ l de tampón QG por cada mg de gel<sup>3</sup>.
8. Incubar a 50°C en un baño durante 10 min o hasta que la agarosa se disuelva totalmente<sup>4</sup>.
9. Añadir la mezcla anterior a una columna “Minispín” y colocar la columna en un tubo de centrífuga de 2 ml.
10. Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min.
11. Eliminar la fracción filtrada, y añadir 700  $\mu$ l de tampón PE a la columna “Minispín”.
12. Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min.
13. Eliminar la fracción filtrada y centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min para eliminar los restos de tampón PE.
14. Colocar la columna “Minispín” en un tubo de centrífuga de 1,5 ml.
15. Añadir 30  $\mu$ l de tampón EB<sup>5</sup> o H<sub>2</sub>O destilada (pH 7– 8,5), incubar durante 1 min a temperatura ambiente y centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min.
16. Recuperar la fracción filtrada con el ADN.



<sup>1</sup> Colocar el peine en el gel cuidando que no toque con el fondo de la cubeta, con el objeto de evitar fugas al cargar las muestras en los pocillos.

<sup>2</sup> Tratar los marcadores moleculares de tamaño (ej. Hyper Ladder I) como una muestra más.

<sup>3</sup> Para geles al 2% (p/v) añadir 6  $\mu$ l de tampón QG por cada mg de gel.

<sup>4</sup> Para fragmentos menores de 500 pb y mayores de 4 kb añadir un volumen de isopropanol una vez fundido el gel en el tampón QG y mezclar.

<sup>5</sup> Para incrementar la recuperación del ADN, calentar el tampón EB o el H<sub>2</sub>O destilada a 65°C antes de añadirlo a la columna.

### 3.2.22.7. Purificación del ADN plasmídico (minipreps)

El aislamiento del ADN plasmídico se llevó a cabo a través del kit comercial “Real Miniprep Turbo” (Real Biotech Co., Banqiao City, Taiwan) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### Reactivos

- Kit comercial “Real Miniprep Turbo” (Real Biotech Co., Banqiao City, Taiwan).
- Etanol 70% (v/v).
- Isopropanol.
- Enzima de restricción EcoRI (Fermentas)



### Procedimiento

1. Centrifugar 1,5 ml del cultivo a 10.000 rpm durante 1 min.
2. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 200  $\mu$ l de la solución EPO1.
3. Añadir 200  $\mu$ l de la solución EPO2 e incubar durante 1-2 min hasta que la mezcla se clarifique.
4. Añadir 100  $\mu$ l de la solución EPO4 y 150  $\mu$ l de la solución EPO3. Mezclar invirtiendo el tubo varias veces.
5. Centrifugar a 13.500 rpm durante 5 min.
6. Traspasar el sobrenadante a otro tubo de 1,5 ml.
7. Precipitar el ADN con 450  $\mu$ l de isopropanol. Mezclar mediante en un agitador de tipo vórtex.
8. Centrifugar a 13.500 rpm durante 3 min.
9. Retirar el sobrenadante y dejar secar el pellet a temperatura ambiente.
10. Añadir 100  $\mu$ l de la solución EPO5. Mezclar bien y centrifugar a 13.500 rpm durante 3 min.
11. Lavar el ADN con 750  $\mu$ l de etanol al 70% (v/v) y centrifugar a 13.500 rpm durante 2 min.
12. Repetir el paso anterior.
13. Resuspender el ADN en 25  $\mu$ l de tampón de extracción o H<sub>2</sub>O destilada.
14. Preparar la siguiente mezcla de reacción:

Tabla 3.26

Reactivo	Volumen
Producto de PCR (0,1-0,5 $\mu$ g)	_ $\mu$ l
H <sub>2</sub> O sin nucleasas	18 $\mu$ l
Tampón EcoRI 10x	2 $\mu$ l
Enzima EcoRI	1 $\mu$ l

15. Incubar durante toda la noche a 37°C.
16. Separar los fragmentos de restricción mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), según se describe en el protocolo 3.2.22.6.

#### **3.2.22.8. Secuenciación del ADN**

Los distintos fragmentos de la PME amplificados mediante PCR fueron secuenciados en el Servicio de Secuenciación de ADN de la Estación Experimental del Zaidín (<http://www.eez.csic.es/?q=es/node/4110>), utilizando un equipo ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Life Technologies/Applied



Biosystems, Carlsbad, CA, EEUU). En las secuenciaciones, se utilizaron entre 0,4-1 µg de ADN plasmídico y 6,4 pmol de los oligos SP6 (5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3') y T7 (5'-TAATACGAGTCACTATAGGG-3').

### 3.2.22.9. Análisis bioinformático

Las búsquedas de homología y alineamientos de las secuencias nucleotídica y aminoacídica de la PME de olivo se realizaron con ayuda de los programas BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y ClustalW ([www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw)), respectivamente. El análisis filogenético de las secuencias se realizó mediante el programa Phylogeny ([www.phylogeny.fr](http://www.phylogeny.fr)), siguiendo el método NJ (Neighbour Joining) de Saitou y Nei (1986), basado en matrices tipo BLOSUM (Henikoff y Henikoff, 1992).

Las secuencias nucleotídicas completas fueron caracterizadas *in silico* mediante distintos programas bioinformáticos. Se analizaron los siguientes parámetros: 1) las características físico-químicas (pI, peso molecular, perfil hidropático etc.), mediante las herramientas ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) y ProtScale (<http://expasy.org/tools/protscale.html>), 2) la existencia de posibles modificaciones postraduccionales, mediante las herramientas ScanProsite (<http://expasy.org/tools/scanprosite.html>) y NetPhos v.2.0 ([www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos)), 3) la existencia de péptido señal, mediante el programa SignalP v.4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), y 4) la existencia de puentes disulfuro, con ayuda del programa Dipro (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu>).

### 3.2.23. Análisis de expresión de la PME del polen de olivo

#### 3.2.23.1. RT-PCR semi-cuantitativa

Se llevaron a cabo análisis de expresión del gen PME del polen de olivo durante su desarrollo y durante la germinación *in vitro*. También se determinó el perfil de expresión de dicho gen en el estigma de olivo a lo largo de su desarrollo y durante la polinización.

#### Reactivos

- Reactivos para RT-PCR (ver protocolos 3.2.22.2 y 3.2.22.3)

#### Procedimiento

1. La RT-PCR se llevó a cabo a partir de los oligos PME2s y PME2a (tabla 3.17) siguiendo los protocolos 3.2.22.2 y 3.2.22.3.
2. Para determinar la equivalencia en la cantidad de ARN inicial de cada muestra, amplificar 10 µl de ADNc procedente de la reacción RT de



cada una de dichas muestras mediante 10, 20 y 30 ciclos de PCR (con objeto de asegurar una tasa de amplificación exponencial) de 94°C durante 1 min, 60°C durante 1 min y 72°C durante 1,5 min cada uno, utilizando 25 ng de los oligos<sup>1</sup> Ubi1s y Ubi1a.

Tabla 3.27

Nombre	Secuencia de los cebadores	T <sub>m</sub> (°C)	% GC	Tamaño (pb)
Ubi1s	5'-ATGCAGAT(C/T)TTTGTGAAGAC-3'	50,9	38	250
Ubi1a	5'-ACCACCACG(G/A)AGACGGAG-3'	58,9	63	



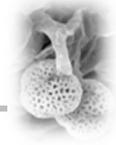
<sup>1</sup> Los oligos Ubi1s y Ubi1a fueron diseñados para amplificar el gen de la ubiquitina (Watts y Moore, 1989), una proteína muy conservada que se expresa de forma constitutiva. Los oligos fueron sintetizados en el Servicio de Síntesis de Oligonucleótidos del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra (CSIC, Granada) mediante un Oligo 1000 ADN Synthesizer (Beckman).

### 3.2.23.2. Western blot

Se llevaron a cabo análisis de expresión de la enzima PME en el polen durante su ontogenia en la antera y durante la germinación *in vitro*. También se determinó el perfil de expresión de dicha proteína en el estigma de olivo a lo largo de su desarrollo y durante la polinización.

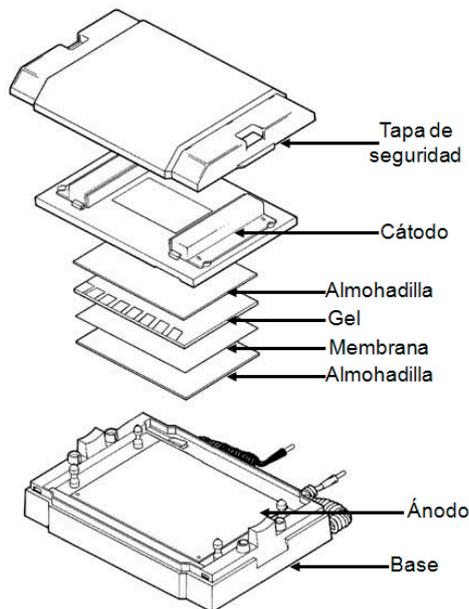
#### Reactivos

- Reactivos para SDS-PAGE (ver protocolo 3.2.8).
- Tampón de transferencia: Tris-HCl 25 mM (pH 8,1-8,4), glicina 192 mM y metanol al 20% (v/v).
- Tampón salino Tris-Tween 20 (TBST): Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), cloruro sódico 150 mM y Tween 20 al 0,3% (v/v).
- Solución de bloqueo: leche en polvo (Nestlé) al 5% (p/v) en tampón TBST.
- Anticuerpo primario de gallina anti-PME de olivo. Dicho anticuerpo fue preparado mediante inmunización de 3 gallinas con el péptido sintético EKRAKFKRLSDAEAKOS, presente en la secuencia aminoacídica de la PME de olivo (Davids Biotechnologie GmbH, Regensburg, Alemania).
- Anticuerpo secundario anti-IgG de gallina conjugado con Dylight 488 nm (Agrisera, Vännäs, Suecia).



Procedimiento

1. Preparar los geles de poliacrilamida según se especifica en la tabla 3.4 (protocolo 3.2.8).
2. Llevar a cabo la electroforesis (protocolo 3.2.21.3).
3. Incubar el gel en tampón de transferencia durante 30 min.
4. Pre-tratamiento de la membrana de fluoruro de polivinilideno<sup>1</sup> (Biotrace PVDF™, PALL Co., Port Washington, NY, EEUU):
  - Mojar la membrana en metanol (5-10 s).
  - Eliminar el metanol y lavar con H<sub>2</sub>O durante 3-5 min.
  - Equilibrar en tampón de transferencia durante 20 min.
5. Montar los casetes de transferencia como se indica en la figura 3.2:



**Figura 3.2.** Esquema de transferencia de proteínas en un Trans-Blot SD Transfer Cell (Bio-Rad).

6. Transferir las proteínas a la membrana de PVDF a 20 V durante 1 h.
7. Bloquear la membrana en solución de bloqueo durante 6 h.
8. Incubar la membrana con el anticuerpo de gallina anti-PME de olivo (diluido 1:5.000 en solución de bloqueo) durante 12 h.
9. Lavar la membrana con TBST durante 20 min.
10. Repetir el paso anterior dos veces.
11. Incubar con un anticuerpo secundario anti-IgG de gallina (Agrisera) conjugado con Dylight 488 nm (diluido 1:2.000 en TBST) durante 2 h en oscuridad.
12. Lavar la membrana con TBST durante 15 min.



13. Escanear la membrana en un escáner de equipado con un sistema de láseres capaces de excitar el fluorocromo Dylight 488 nm (ej. Pharos FX Molecular Imager, Bio-Rad).



<sup>1</sup> La membrana de PVDF es muy hidrófoba y es necesario hidratarla. Usar siempre guantes y evitar tocar la membrana con los dedos.

### 3.2.24. Estudios de inmunolocalización de la PME de polen de olivo

#### 3.2.24.1. Inmunolocalización de la PME en anteras y estigmas de olivo

La localización de la PME en los tejidos de la antera y el estigma se realizó mediante microscopía de fluorescencia a partir de secciones semifinas de anteras y pistilos de olivo incluidos en resina Unicryl (protocolo 3.2.16.2).

#### Reactivos

- Solución de PBS 10x (pH 7,4):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  80 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  15 mM, NaCl 1,3 mM y KCl 30 mM.
- Solución de PBS 1x (pH 7,4): 10 ml de solución de PBS 10x y 900 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.
- Solución de bloqueo: BSA al 1% (p/v) en tampón PBS 1x.
- Solución de Citifluor (Ted Pella Inc., Redding, CA, EEUU).
- Anticuerpos (ver protocolo 3.2.23.2).

#### Procedimiento

1. Depositar una gota del anticuerpo primario anti-PME de olivo (diluido 1:30 en la solución de bloqueo) sobre las secciones de anteras (previamente fijadas a un portaobjetos). Proteger con un cubreobjetos e incubar durante 12 h a 4°C.
2. Lavar los portaobjetos con tampón PBS 1x durante 10 min.
3. Repetir el paso anterior dos veces.
4. Incubar las secciones con un anticuerpo secundario anti-IgG de gallina conjugado con Dylight 488 (dilución 1:200 en PBS 1x) durante 1 h en oscuridad.
5. Lavar con PBS 1x durante 10 min y en oscuridad.
6. Repetir el paso anterior dos veces.
7. Dejar secar los portaobjetos durante 5 min en oscuridad.
8. Añadir una gota de la solución de Citifluor en cada sección y cubrir con un cubreobjetos.
9. Observar las muestras en un microscopio de fluorescencia (ej. Axioplan, Carl Zeiss Inc.) dotado de un filtro de  $\lambda$  de excitación de 488 nm y de  $\lambda$



de emisión 500-530 nm. Las imágenes se obtuvieron con un cámara digital ProGres C3 y el programa ProGres CapturePro v2.6 (Jenoptik AG).

10. Llevar a cabo un control negativo omitiendo el anticuerpo primario de la reacción.

### 3.2.24.2. Inmunolocalización de la PME en el polen de olivo

La localización de la PME en el polen maduro de olivo y el tubo polínico del polen germinado se llevó a cabo mediante microscopía de barrido láser confocal a partir de muestras completas y fijadas.

#### Reactivos

- Solución de fijación: paraformaldehído al 4% (v/v) y glutaraldehído al 0,2% (v/v) en tampón cacodilato sódico 0,1 M (pH 7,2).
- Solución de PBS 10x (pH 7,4):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  80 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  15 mM, NaCl 1,3 mM y KCl 30 mM.
- Solución de PBS 1x (pH 7,4): 10 ml de solución de PBS 10x y 900 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.
- Solución de citrato sódico 0,01 M (pH 4,8).
- Solución de digestión: celulasa R10 (Sigma-Aldrich) al 1% (p/v) y 27 U de pectinasa (Sigma-Aldrich) en 1 ml de tampón citrato sódico 0,01 M (pH 4,8).
- Solución de bloqueo: BSA al 5% (p/v) en tampón PBS 1x.
- Solución de Citifluor (Ted Pella Inc.).
- Anticuerpos (ver protocolo 3.2.23.2)

#### Procedimiento

1. Germinar 0,1 g de polen durante 3 h (protocolo 3.2.2).
2. Centrifugar a 500 rpm durante 10 s. Eliminar el sobrenadante.
3. Añadir 1 ml de la solución de fijación e incubar durante 2 h.
4. Eliminar la solución de fijación. Lavar el polen con tampón PBS 1x durante 10 min.
5. Repetir el paso anterior dos veces.
6. Lavar la muestra en tampón citrato sódico 0,01 M (pH 4,8) durante 5 min.
7. Repetir el paso anterior.
8. Añadir 0,5 ml de la solución de digestión e incubar a 37°C durante 25 min.
9. Centrifugar a 6.000 rpm durante 30 s.
10. Lavar con tampón citrato sódico 0,01 M (pH 4,8) durante 5 min.



11. Repetir el paso anterior.
12. Lavar el polen con tampón PBS 1x durante 10 min.
13. Repetir el paso anterior dos veces.
14. Incubar la muestra con 100 µl el anticuerpo primario anti-PME de olivo (diluido 1:30 en la solución de bloqueo) durante 12 h a 4°C.
15. Lavar con tampón PBS 1x durante 10 min a 4°C.
16. Repetir el paso anterior dos veces.
17. Incubar con 100 µl del anticuerpo secundario anti-IgG de gallina conjugado con Dylight 488 (dilución 1:200 en tampón PBS 1x) durante 1 h y en oscuridad.
18. Lavar con PBS 1x durante 10 min.
19. Repetir el paso anterior dos veces.
20. Añadir una gota de solución de Citifluor.
21. Colocar una gota de la muestra entre dos cubreobjetos y sellar el contorno con cinta adhesiva.
22. Observar las muestras de polen en un microscopio de barrido láser confocal (ej. C1 Eclipse, Nikon). Las imágenes de campo claro se realizaron mediante la opción de luz transmitida y las de fluorescencia con la línea de láser 488 nm. Las imágenes fueron capturadas con el programa EZ-C1 Gold versión 2.1 build 240.
23. Llevar a cabo un control negativo omitiendo el anticuerpo primario de la reacción.

### 3.2.24.3. Inmunolocalización de la PME a nivel ultraestructural

La localización a nivel ultraestructural de la PME en el polen maduro y germinado durante 3 h se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión a partir de muestras de polen incluidas en resina Unicryl (protocolo 3.2.16.2).

#### Reactivos

- Solución de PBS 10x (pH 7,4): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 80 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15 mM, NaCl 1,3 mM y KCl 30 mM.
- Solución de PBS 1x (pH 7,4): 10 ml de solución de PBS 10x y 900 ml de H<sub>2</sub>O destilada.
- Solución de bloqueo: BSA al 2,5% (p/v) en tampón PBS 1x.
- Anticuerpo primario de gallina anti-PME de olivo (Davids Biotechnologie GmbH).
- Anticuerpo secundario anti-IgG de gallina conjugado con oro coloidal de 15 nm (Aurion, Wageningen, Holanda).



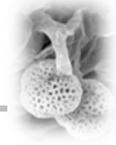
- Solución de acetato de uranilo al 5% (p/v) y solución de citrato de plomo (ver protocolo 3.2.16.4).

### Procedimiento

1. Colocar la rejilla (con las secciones hacia abajo) sobre una gota de H<sub>2</sub>O destilada durante 1 min.
2. Colocar la rejilla sobre una gota con la solución de bloqueo e incubar durante 3 h.
3. Colocar la rejilla sobre una gota con el anticuerpo primario anti-PME de olivo (dilución 1:30 en solución de bloqueo) e incubar durante 12 h a 4°C.
4. Lavar la rejilla con tampón PBS 1x durante 10 min.
5. Repetir el paso anterior dos veces.
6. Colocar la rejilla sobre una gota con un anticuerpo secundario anti-IgG de gallina conjugado con oro coloidal de 15 nm (dilución 1:100 en solución de bloqueo) e incubar durante 1 h.
7. Lavar la rejilla con tampón PBS 1x durante 10 min.
8. Repetir el paso anterior dos veces.
9. Lavar la rejilla con H<sub>2</sub>O destilada durante unos segundos.
10. Dejar secar las rejillas sobre un papel secante en el interior de una caja de Petri.
11. Contrastar las rejillas con acetato de uranilo y citrato de plomo (protocolo 3.2.16.4).
12. Visualizar las muestras en un microscopio electrónico de transmisión (ej. JEM-1011, Jeol Ltd.) operando a 80 kV. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital MegaView III, con ayuda del programa iTEM v5.0 (Olympus).
13. Llevar a cabo un control negativo omitiendo el anticuerpo primario de la reacción.

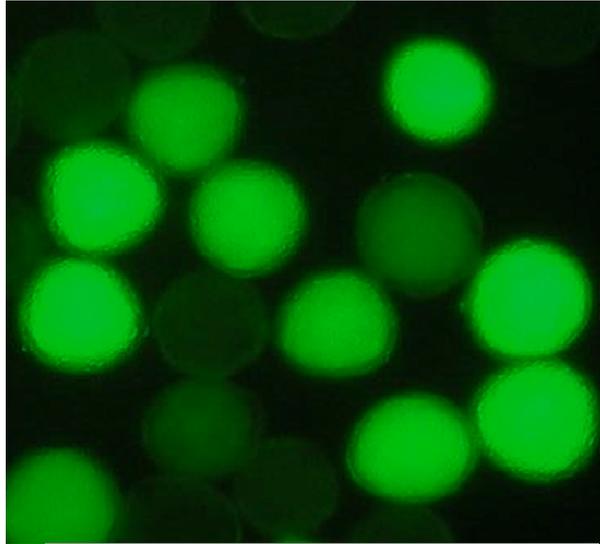
### **3.2.25. Análisis de densitometría**

Los perfiles densitométricos de los geles de proteínas se obtuvieron con la herramienta “Plot lane” del programa Quantity One v4.6.2 (Bio-Rad). La cuantificación de las bandas de transcritos y proteínas se realizó mediante la herramienta “Volume Analysis Report” del mismo programa. Los datos obtenidos, expresados inicialmente en valores de densidad (intensidad/mm<sup>2</sup>), se representaron gráficamente en forma de porcentajes relativos referidos al mayor valor de la serie con ayuda del programa Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corp., EEUU).



### **3.2.26. Análisis estadísticos**

Los análisis estadísticos de los resultados obtenidos en el presente trabajo se llevaron a cabo mediante el programa SPSS Statistics v19.0 para Windows (SPSS Inc., EEUU). Se determinó la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro-Wilks. Los análisis de correlación se llevaron a cabo mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Se consideraron significativas las correlaciones con valores de  $p < 0,05$ . Las comparaciones de las medias de variables continuas para tres o más grupos se llevaron a cabo mediante el test de Kruskal-Wallis. Las comparaciones entre dos grupos se realizaron mediante el test de Mann-Whitney. Se consideraron significativos valores de  $p < 0,05$ .



## **RESULTADOS**

“El genio es un uno por ciento de inspiración y un noventa y nueve por ciento de sudor”

Thomas Edison

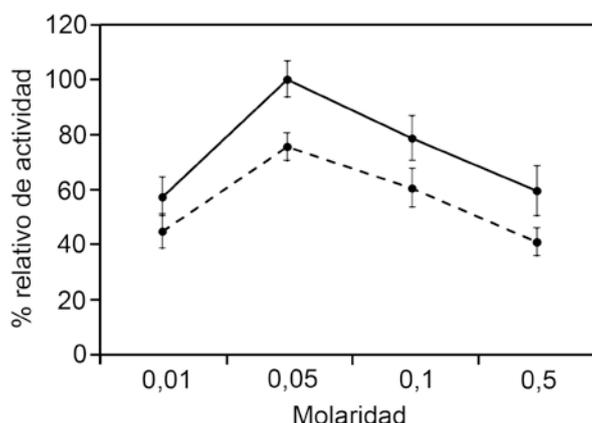




#### 4.1. Detección de actividad esterolítica en el polen de olivo

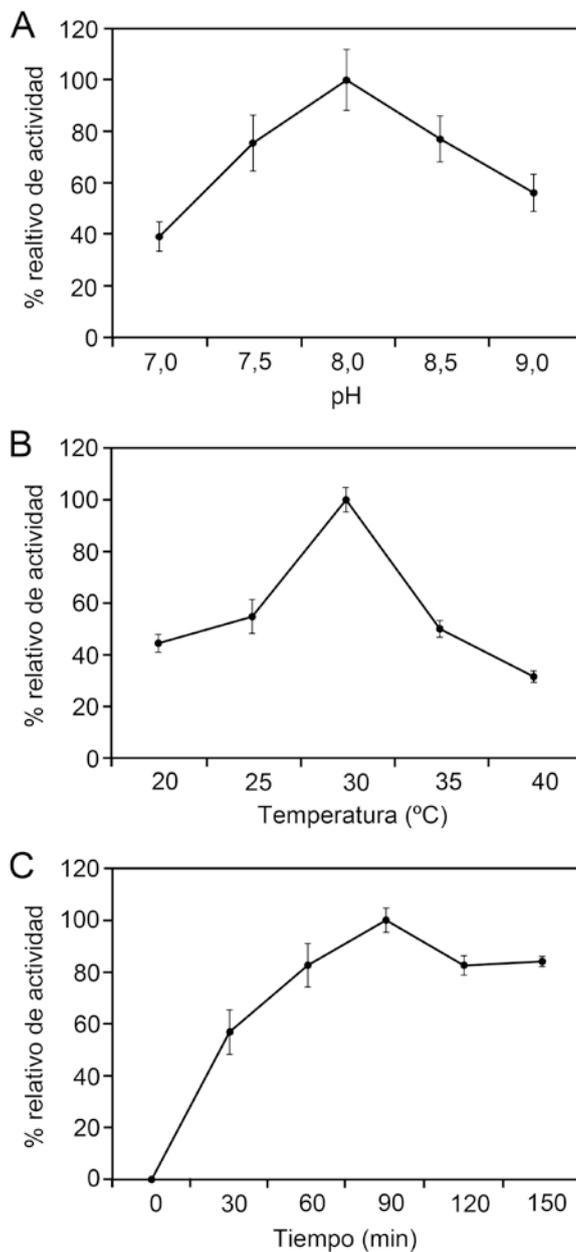
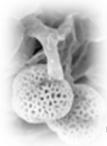
##### 4.1.1. Detección de actividad esterasa no específica en el polen

En primer lugar, se prepararon extractos proteicos a partir de polen maduro de olivo (cv. 'Lechín de Granada') utilizando dos tampones acuosos de extracción (tampón fosfato sódico pH 7,0 y tampón Tris-HCl pH 7,0) a distintas concentraciones (0,05 M–0,1 M). Los extractos se realizaron mediante agitación continua del polen en suspensión (ver protocolo 3.2.3). La actividad esterasa NE se determinó *in vitro* midiendo la cantidad de *p*-nitrofenol liberado a partir de la hidrólisis del éster butirato de *p*-nitrofenilo (PNB) en presencia del extracto proteico (protocolo 3.2.5). Los resultados muestran que la actividad esterasa NE es máxima cuando la concentración del tampón es de 0,05 M (Figura 4.1). Además, los niveles de actividad observados fueron significativamente más elevados cuando la extracción de proteínas se realizó en tampón fosfato, independientemente de la molaridad del mismo (Figura 4.1).



**Figura 4.1.** Efecto de la molaridad del tampón de extracción sobre la actividad esterasa NE en el polen de olivo (cv. 'Lechín de Granada'). La extracción de proteínas se realizó en condiciones nativas, con objeto de preservar la actividad enzimática, utilizando tampón fosfato sódico, pH 7,0 (línea continua), ó tampón Tris-HCl, pH 7,0 (línea discontinua), a diferentes concentraciones (0,01 M–0,5 M). La actividad se determinó incubando las muestras (30  $\mu$ g de proteína total) con el sustrato (PNB) durante 30 min a 25°C.

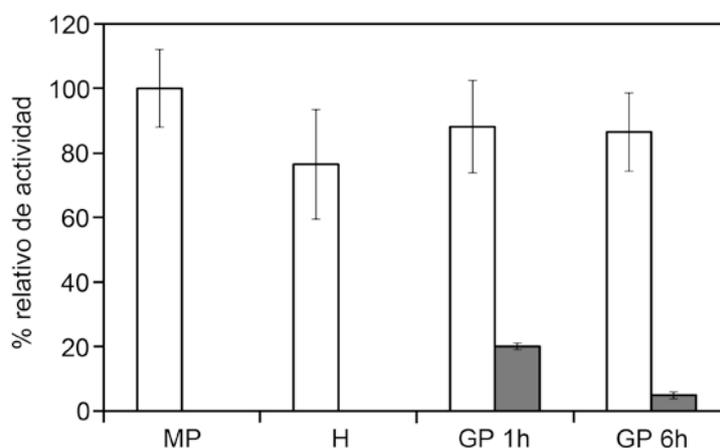
A continuación, se determinó el efecto del pH, la temperatura y el tiempo de incubación sobre los niveles de actividad esterasa NE del polen. Los resultados (Figura 4.2A, B) muestran que la actividad enzimática es máxima cuando la reacción transcurre en tampón fosfato sódico 0,05 M (pH 8,0) a 30°C. Por otra parte, la actividad esterasa se incrementa de forma lineal durante los primeros 90 minutos de incubación, y a partir de ese momento la curva se estabiliza (Figura 4.2C). No se detectó actividad esterasa NE después de calentar el extracto proteico a 100°C durante 10 min.



**Figura 4.2.** Efecto de distintos parámetros sobre la actividad esterasa no específica (NE) del polen de olivo (cv. 'Lechín de Granada'). **A)** Efecto del pH. La extracción de proteínas se realizó en tampón fosfato 0,05 M a diferentes pHs. La actividad se determinó incubando las muestras (30  $\mu$ g de proteína total) con el sustrato (PNB) durante 30 min a 25°C. **B)** Efecto de la temperatura. Las proteínas se extrajeron en tampón fosfato 0,05 M (pH 8,0). La actividad enzimática se determinó incubando las muestras (30  $\mu$ g) con el sustrato durante 30 min a distintas temperaturas. **C)** Efecto del tiempo de incubación. La extracción de proteínas se realizó como en B. La actividad se determinó incubando las muestras (30  $\mu$ g) con el sustrato a 30°C y durante distintos tiempos.



Tras la optimización del método para determinar la actividad esterasa NE *in vitro*, se midieron los niveles de actividad enzimática en el polen durante la germinación *in vitro*. Durante el proceso de germinación se observó que los niveles de actividad esterasa varían ligeramente, aunque los cambios no son significativos (Figura 4.3, barras blancas). También se detectó actividad esterasa NE en el medio de cultivo a partir de 1 h de cultivo, pero los valores fueron significativamente más bajos que en el polen (Figura 4.3, barras grises). Después de 6 h de germinación, la actividad esterasa disminuyó hasta niveles casi indetectables. La presencia de actividad esterasa NE en el medio de germinación sugiere que ciertas enzimas del polen podrían ser liberadas al medio extracelular durante la germinación y el crecimiento del tubo polínico.

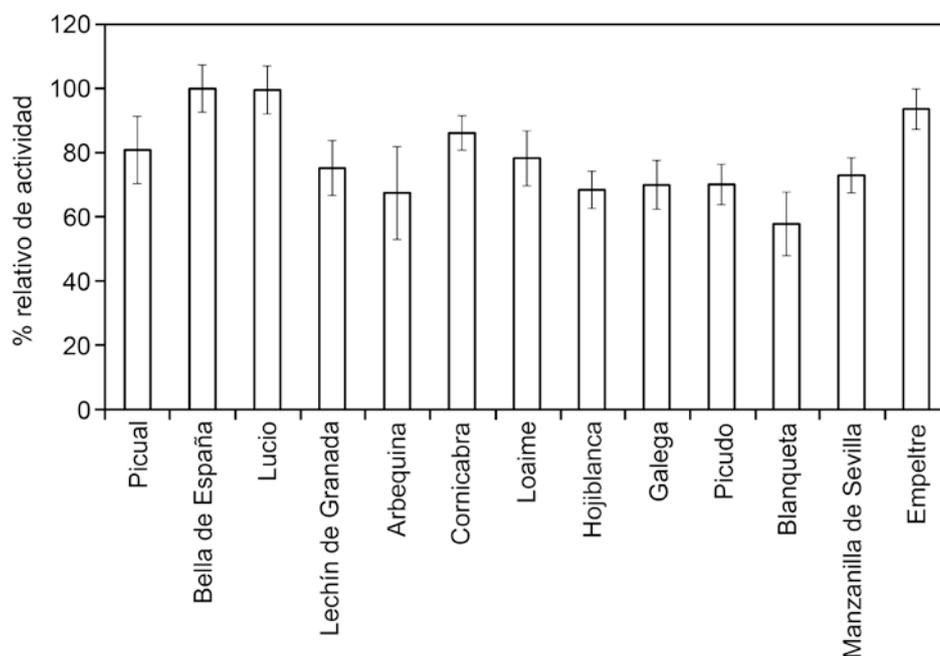


**Figura 4.3.** Detección de la actividad esterasa NE en el polen (barras blancas) de olivo (cv. 'Lechín de Granada') y el medio de cultivo (barras grises) durante la germinación *in vitro*. Cada dato representa el valor medio de 9 experimentos independientes (N= 9). MP, polen maduro; H, polen hidratado; GP 1h, polen germinado durante 1 h; GP 6h, polen germinado durante 6 h.

Dada la amplitud del germoplasma de olivo, que en España está compuesto de unas 250 variedades, se determinaron los niveles de actividad esterasa NE en el polen maduro de 13 cultivares diferentes (8 variedades principales y 5 variedades secundarias). Los resultados mostraron la existencia de diferencias cuantitativas significativas entre cultivares (Kruskal-Wallis  $\chi^2=89,952$ ;  $p=0,000$ ). Bella de España (100%), Lucio (99,6%) y Empeltre (93,6%) presentaron los niveles de actividad esterasa NE más elevados mientras que Blanqueta (57,8%) exhibió los niveles más bajos, con una disminución de más de un 40% respecto a Bella de España (Figura 4.4.). No se observó una correlación significativa entre los valores de actividad esterasa NE *in vitro*, y los valores de viabilidad (Rho de Spearman=0,027,  $p=0,929$ ) ó germinabilidad



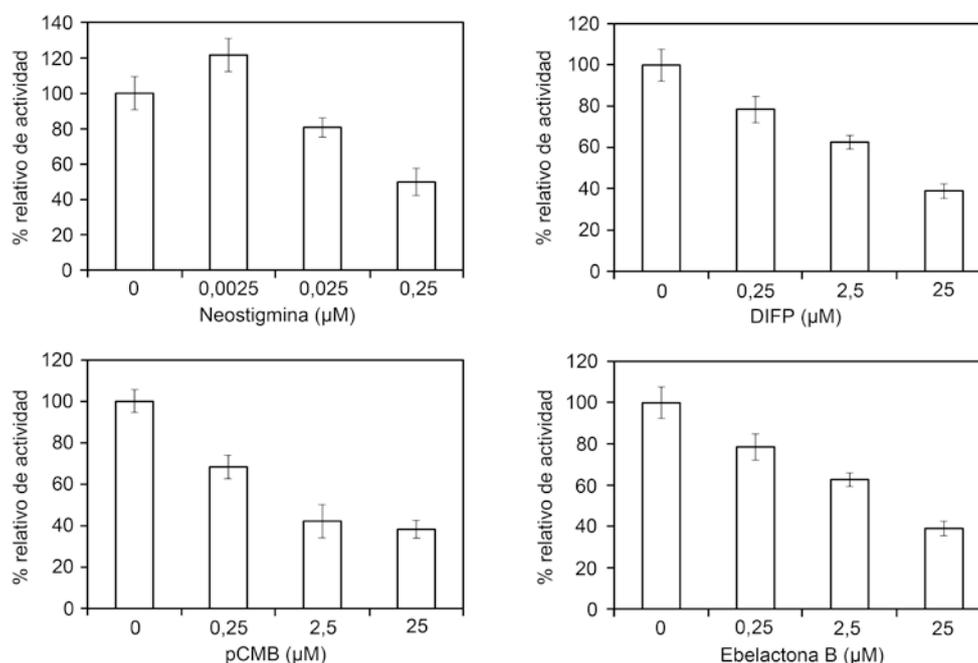
(Rho de Spearman=0,143, p=0,642) del polen de los distintos cultivares analizados.



**Figura 4.4.** Valores relativos (%) de actividad esterasa NE *in vitro* en extractos proteicos de polen de olivo de 13 cultivares diferentes.

Con objeto de determinar qué tipo de enzimas esterazas existen en el polen de olivo, se llevaron a cabo ensayos de inhibición *in vitro* de la actividad esterasa NE (protocolo 3.2.6). En presencia de distintos inhibidores específicos (DIFP, ebelactona-B, p-CMB y neostigmina), se observó una disminución significativa de la actividad esterasa NE (Figura 4.5). Esta caída de los niveles de actividad enzimática fue directamente proporcional a la concentración del inhibidor en el caso del DIFP, la ebelactona-B y el p-CMB. En los ensayos con la neostigmina, se observó que concentraciones muy bajas (0,0025  $\mu\text{M}$ ) de inhibidor producían un ligero aumento de la actividad esterasa NE (Figura 4.5A), mientras que a dosis mayores la actividad enzimática era inhibida. Este patrón de inhibición se repitió con otros inhibidores de la familia de los carbamatos tales como la eserina (datos no mostrados).

La disminución de la actividad esterasa NE en presencia de estos 4 inhibidores específicos sugiere la existencia de acetilesterazas, serina esterazas, esterazas/lipasas y colinesterazas entre la batería de enzimas esterazas del polen de olivo.

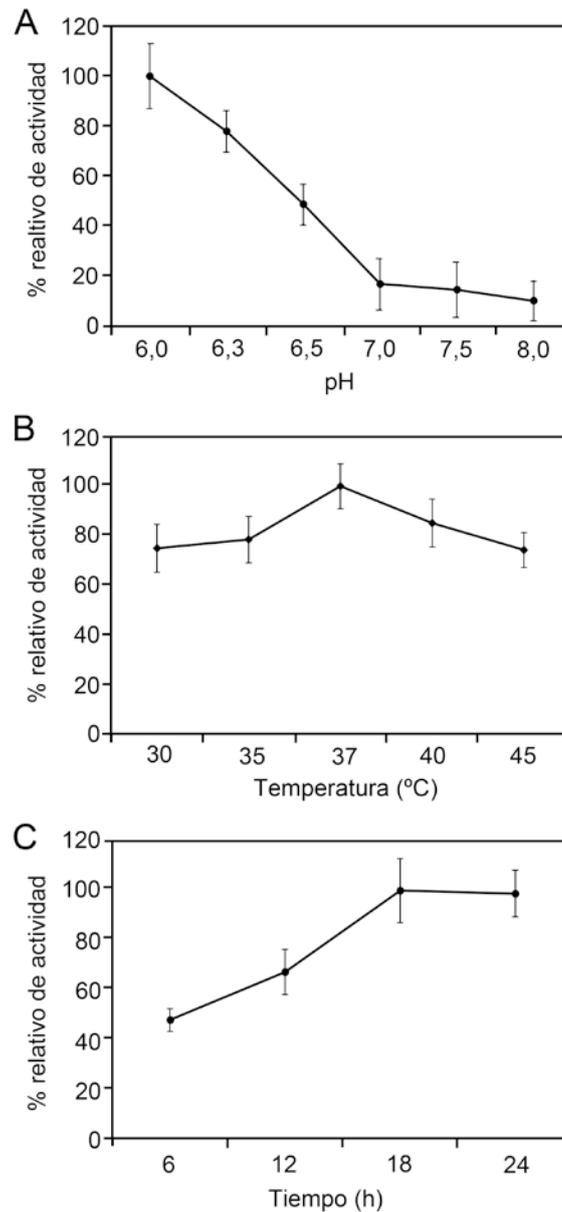


**Figura 4.5.** Efecto de la acción de los inhibidores neostigmina, DIFP, p-CMB y ebelactona-B sobre la actividad esterasa NE del polen de olivo.

#### 4.1.2. Detección de actividad pectinolítica en el polen

Con objeto de determinar la existencia de actividad pectina metilesterasa (PME) en el polen maduro de olivo (cv. 'Lechín de Granada') se prepararon extractos de proteína total mediante agitación continua del polen en suspensión en un tampón acuoso (protocolo 3.2.3). La actividad PME se determinó *in vitro* midiendo la cantidad de pectina desesterificada liberada a partir de la hidrólisis de pectina esterificada de cáscara de naranja, en presencia del extracto proteico (protocolo 3.2.7).

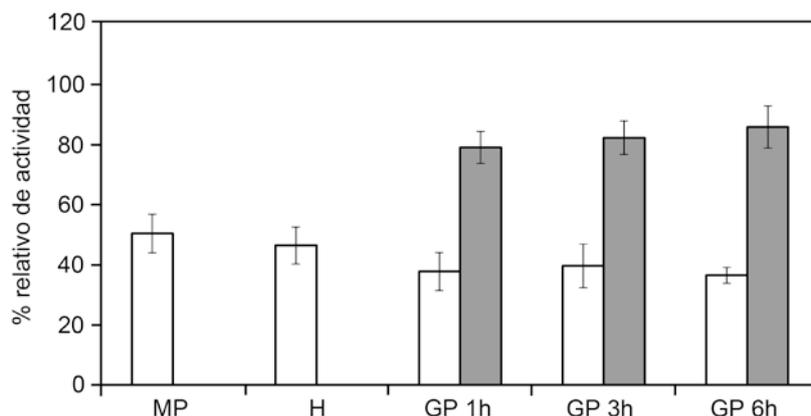
A continuación, se determinó el efecto del pH, la temperatura y el tiempo de incubación sobre los niveles de actividad PME del polen. Los resultados muestran que la actividad enzimática PME es máxima cuando la reacción transcurre en tampón fosfato sódico dibásico 0,2 M (pH 6,3) a 37°C (Figura 4.6A, B). Por otra parte, la actividad PME se incrementó de forma lineal durante las primeras 18 h de incubación, y a partir de ese momento la curva se estabilizó (Figura 4.6C). No se detectó actividad PME después de calentar el extracto proteico a 100°C durante 10 min.



**Figura 4.6.** Efecto de distintos parámetros sobre la actividad pectina metilesterasa (PME) *in vitro* del polen de olivo. **A)** Efecto del pH. La extracción de proteínas se realizó en un tampón acuoso (fosfato sódico dibásico 0,2 M, pH 5,0, citrato sódico 0,1 M y cloruro sódico 1 M). La actividad se determinó incubando las muestras (30  $\mu$ g de proteína total) con el sustrato (pectina esterificada de cáscara de naranja) al 0,1% (p/v) en tampón fosfato sódico dibásico 0,2 M a distintos pHs, durante 30 min a 25°C. **B)** Efecto de la temperatura. Las proteínas se extrajeron en un tampón acuoso como en A. La actividad enzimática se determinó incubando las muestras (30  $\mu$ g) con el sustrato al 1% en tampón fosfato sódico dibásico 0,2 M (pH 6,3), durante 30 min a distintas temperaturas. **C)** Efecto del tiempo de incubación. La extracción de proteínas se realizó como en A. La actividad PME se determinó incubando las muestras (30  $\mu$ g) con el sustrato como en B a 37°C y durante distintos tiempos.



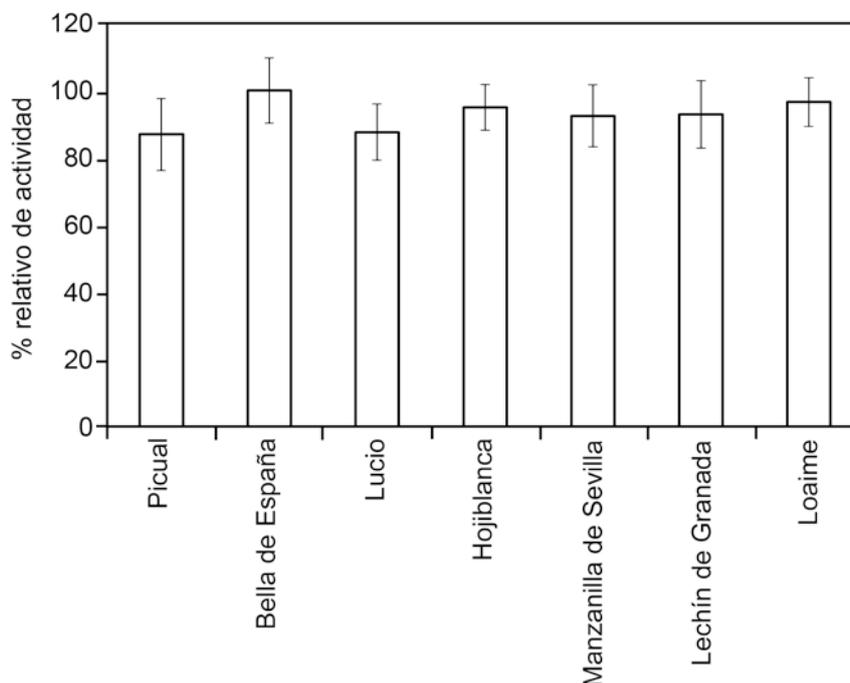
Tras la puesta a punto del método de detección de actividad PME *in vitro* se midieron los niveles de actividad PME presentes en el polen durante la germinación *in vitro*. Los resultados obtenidos muestran que la actividad PME decrece ligeramente durante la germinación, de forma que tras 6 h de cultivo se aprecia una disminución significativa de la actividad enzimática en torno al 20% respecto al polen maduro (Figura 4.7, barras blancas).



**Figura 4.7.** Niveles relativos (%) de actividad PME *in vitro* en el polen de olivo (barras blancas) y el medio de cultivo (barras grises) durante la germinación *in vitro*. MP, polen maduro; H, polen hidratado; GP 1h, polen germinado durante 1 h; GP 3h, polen germinado durante 3 h; GP 6h, polen germinado durante 6 h.

Simultáneamente se realizaron ensayos de actividad PME a partir del medio de germinación. Para ello, se filtró el medio de cultivo a través de una malla de nylon de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro que retiene los granos de polen. Los datos obtenidos muestran que los niveles de actividad PME en el medio de germinación son significativamente más altos que en el polen maduro y el polen germinado, siendo aproximadamente el doble (Figura 4.8, barras grises). La presencia de actividad PME en el medio de cultivo sugiere que esta enzima es secretada al espacio extracelular durante el proceso de germinación.

Por otro lado, se evaluaron los niveles de actividad PME *in vitro* en extractos proteicos de polen de olivo de siete variedades. Los cultivares analizados fueron Bella de España, Hojiblanca, Lechín de Granada, Loaime, Lucio, Manzanilla de Sevilla y Picual (Figura 4.8). Los resultados obtenidos mostraron que todos los cultivares presentaban niveles de actividad similares, no existiendo diferencias significativas entre ellos (Kruskal-Wallis  $\chi^2 = 13,898$ ;  $p = 0,061$ ).

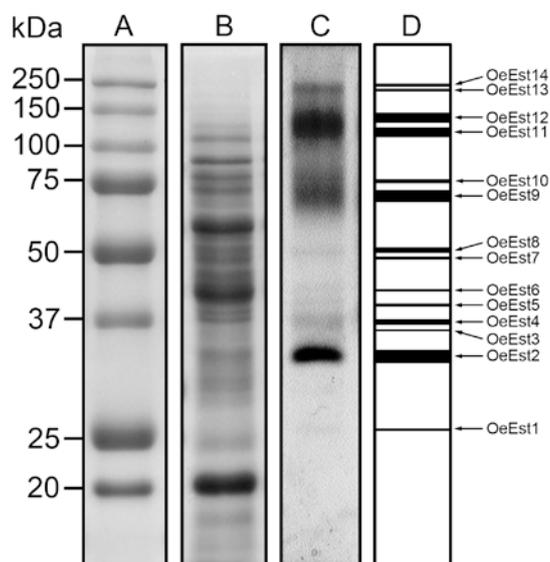


**Figura 4.8.** Valores relativos (%) de actividad PME *in vitro* en extractos proteicos de polen de olivo de 7 cultivares diferentes.

## 4.2. Perfil electroforético de actividades esterasas en el polen del olivo

### 4.2.1. Análisis electroforético de la actividad esterasa NE del polen

Con objeto de determinar el perfil electroforético de actividades esterasa NE en el polen de olivo, se llevaron a cabo ensayos de actividad en geles de poli(acrilamida) en condiciones semi-nativas (protocolo 3.2.8) a partir de extractos proteicos de polen 'Lechín de Granada'. Se utilizó como sustrato del enzima acetato de  $\alpha$ - ó  $\beta$ -naftilo y butirato de  $\alpha$ -naftilo (protocolo 3.2.9). Los resultados obtenidos en polen maduro mostraron la presencia de 14 bandas esterolíticas diferentes (Figura 4.9), las cuales fueron nombradas genéricamente como OeEst (Olea europaea Esterasa). Las bandas fueron numeradas consecutivamente desde el extremo anódico del gel. Las 14 bandas detectadas mostraron un peso molecular que osciló entre 26 y 245 kDa (Tabla 4.1). El perfil de actividades fue idéntico independientemente del isómero ( $\alpha$  ó  $\beta$ ) y del número de átomos de C (2 ó 4) del sustrato utilizado (datos no mostrados).



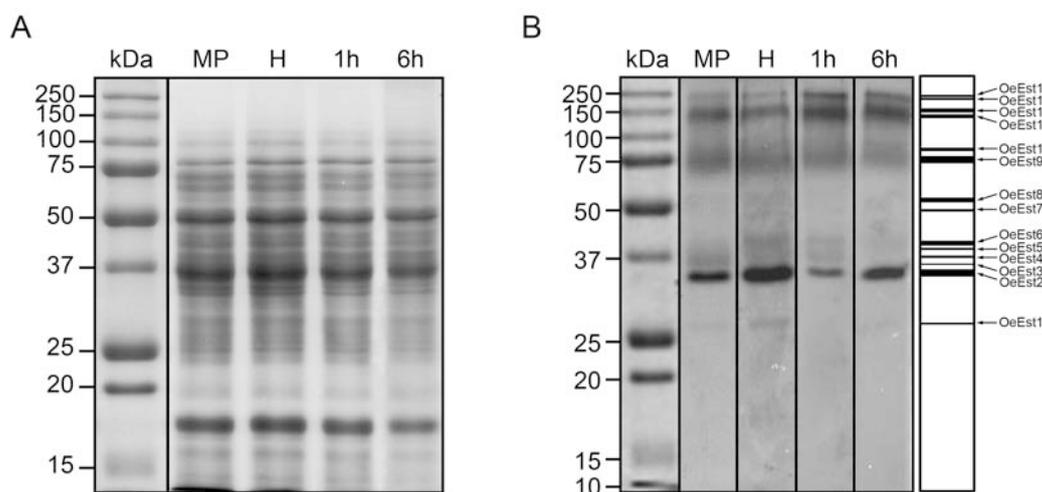
**Figura 4.9.** Perfil de actividades esterasa NE en geles de poliacrilamida a partir de extractos proteicos de polen maduro de olivo de la variedad 'Lechín de Granada'. **A)** Marcadores proteicos de peso molecular. **B)** Análisis electroforético mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de las proteínas totales (30  $\mu$ g) del polen. **C)** Perfil electroforético de actividades esterasa NE en el polen. La reacción se llevó a cabo utilizando acetato de  $\alpha$ -naftilo. **D)** Zimograma de actividades esterasa NE en el polen a partir del gel C. El grosor de cada banda indica la intensidad de la actividad de cada isoenzima esterasa.

**Tabla 4.1.** Peso molecular (kDa) de las bandas esterolíticas presentes en polen maduro de olivo, calculadas a partir de la figura 4.9C.

Banda	Peso molecular (kDa)
OeEst1	25,7
OeEst2	32,8
OeEst3	35,7
OeEst4	38,8
OeEst5	39,7
OeEst6	42,4
OeEst7	49,3
OeEst8	51,6
OeEst9	70,6
OeEst10	78,0
OeEst11	117,4
OeEst12	136,6
OeEst13	218,4
OeEst14	242,6



El análisis del perfil de actividades esterasa NE en el polen durante la germinación mostró diferencias en comparación con el polen maduro en cuanto al número de bandas e intensidad de las mismas (Figura 4.10). Durante la hidratación, antes de comenzar la germinación propiamente dicha, el nivel de actividad enzimática de las bandas esterolíticas OeEst1-OeEst8 se incrementó significativamente, mientras que los niveles de actividad de OeEst9-OeEst14 fueron similares al polen maduro. Tras 1 h de germinación, los niveles de actividad enzimática de las bandas OeEst1 y OeEst2 disminuyeron, mientras que las bandas OeEst11-OeEst14 incrementaron significativamente su intensidad. A las 6 h de germinación, se observó que las bandas esterolíticas OeEst3-OeEst6 disminuían su actividad hasta niveles casi indetectables, mientras que los valores de OeEst11-OeEst14 se mantuvieron estables. Las bandas OeEst9 y OeEst10 mostraron valores de intensidad similares a lo largo de todo el proceso de germinación.

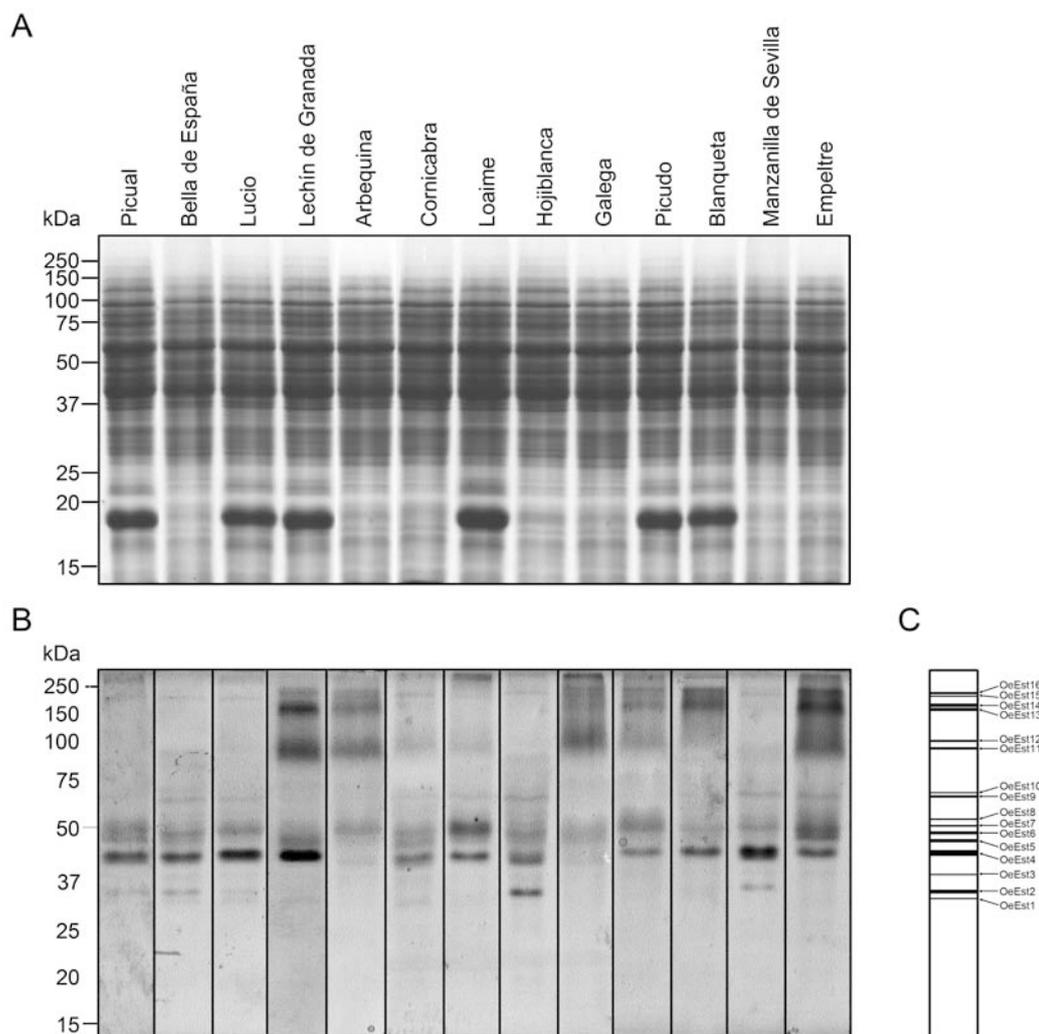


**Figura 4.10.** Perfil de actividades esterasa NE en geles de poliacrilamida a partir de extractos proteicos de polen de la variedad 'Lechín de Granada' durante distintos estadios de la germinación *in vitro*. **A)** Análisis electroforético mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de las proteínas totales (30  $\mu$ g) del polen durante la germinación *in vitro*. **B)** Perfil electroforético de actividades esterasa NE del polen durante la germinación. A la derecha de la figura se muestra el zimograma de actividades esterasa NE del polen. MP, polen maduro; H, polen hidratado; 1h, polen germinado durante 1h; 6h, polen germinado durante 6 h.

Tras la obtención del perfil de actividad esterasa NE en la variedad 'Lechín de Granada', se llevaron a cabo ensayos de actividad enzimática a partir de extractos proteicos del polen de 13 cultivares diferentes (8 variedades principales y 5 variedades secundarias), con objeto de determinar si el perfil electroforético era el mismo para todos. Se observó que el perfil electroforético



de actividades esterasa NE del polen varía significativamente entre las distintas variedades de olivo estudiadas (Figura 4.11).



**Figura 4.11.** Perfil de actividades esterasa NE en geles de poliacrilamida a partir de extractos proteicos de polen maduro de 13 cultivares de olivo. **A)** Análisis electroforético mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de las proteínas totales (30  $\mu$ g) del polen de los distintos cultivares. **B)** Perfil electroforético de actividades esterasa NE del polen de las distintas variedades. **C)** Zimograma del total de actividades esterasa NE del polen de las 13 variedades de olivo analizadas. El grosor de cada banda indica la intensidad de la actividad de cada isoenzima esterasa.

Los resultados mostraron un gran polimorfismo entre cultivares tanto en el número de bandas esterolíticas como en la intensidad de las mismas (Tabla 4.2). Además, se detectaron dos nuevas bandas esterolíticas de 23,2 y 31,1 kDa, respectivamente, en las variedades Bella de España, Blanqueta, Empeltre, Cornicabra, Hojiblanca, Lucio y Manzanilla de Sevilla. Debido a ello,



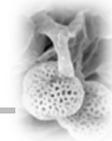
las 16 bandas esterolíticas del polen fueron reenumeradas desde el extremo anódico del gel, tal y como se ha descrito anteriormente.

**Tabla 4.2.** Perfil de actividades esterasa NE en el polen de 13 variedades de olivo.

Cultivar	Banda esterolítica (OeEst)																No. de bandas
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
Picual	ND	-	ND	++	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	6
Bella de España	--	+	--	++	+	+	--	--	-	--	-	ND	ND	ND	-	ND	12
Lucio	--	--	--	+++	--	+	--	--	-	--	--	ND	ND	ND	-	ND	12
Lechín de Granada	ND	--	ND	+	+	+	--	--	--	--	+++	+++	+++	+++	+	+++	14
Arbequina	ND	ND	ND	-	--	+	--	ND	ND	ND	++	++	++	++	-	+	10
Cornicabra	-	ND	--	++	+	+	--	ND	--	ND	-	-	ND	ND	-	ND	10
Loaime	ND	ND	ND	++	+	++	--	ND	-	ND	-	-	ND	ND	-	ND	8
Hojiblanca	ND	++	--	++	-	+	-	--	+	--	ND	ND	ND	ND	-	ND	10
Galega	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	ND	ND	++	++	-	-	-	+	9
Picudo	ND	ND	ND	+	--	+	--	--	ND	ND	+	+	+	+	-	+	11
Blanqueta	ND	--	--	++	--	+	--	--	--	ND	ND	ND	++	++	+	++	12
Manzanilla de Sevilla	ND	+	--	+++	--	+	--	ND	+	ND	--	ND	--	--	-	--	12
Empeltre	ND	ND	--	++	++	++	-	--	+	--	++	++	+++	+++	+	+++	14

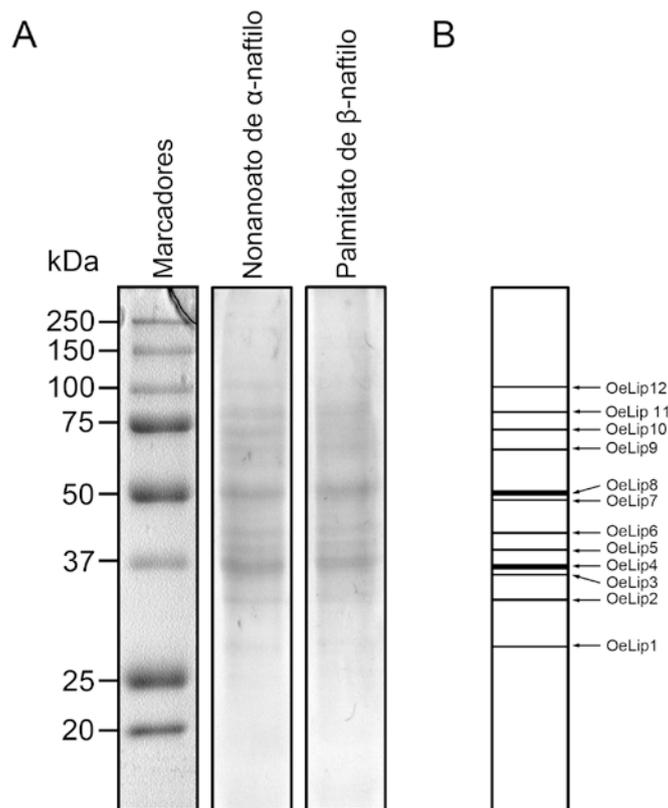
Las enzimas esterasas NE del polen fueron reenumeradas secuencialmente desde el extremo anódico del gel. La intensidad de cada banda se muestra en una escala de 5 niveles: muy poco intensa (--), poco intensa (-), algo intensa (+), bastante intensa (++) y muy intensa (+++). ND, banda no detectada.

Tras el análisis de los perfiles de actividad esterolítica en geles de poliacrilamida, se observó que la variedad 'Picual' era el cultivar que presentaba el menor número de bandas esterolíticas (6), mientras que los cultivares 'Lechín de Granada' y 'Empeltre' mostraron el mayor número de isoenzimas (14). Las esterasas OeEst4-OeEst6 y OeEst15 se detectaron en todos los cultivares analizados, pero no se encontró ninguna banda asociada a un cultivar determinado. OeEst4 fue la actividad esterasa NE más prominente en todos los cultivares analizados salvo en 'Arbequina', 'Empeltre', 'Galega' y 'Lechín de Granada', en los que OE11-OE14 fueron las bandas esterolíticas de mayor relevancia. Con objeto de determinar si las diferencias en el perfil de actividades esterolíticas redundan en la funcionalidad del polen, se midió la densidad óptica de cada banda esterolítica y se llevaron a cabo análisis de correlación entre los valores de densidad óptica de cada isoenzima, así como



del total de isoenzimas (sumando las distintas bandas en cada cultivar), y los valores de viabilidad y germinabilidad del polen de los distintos cultivares analizados. Ninguna de las correlaciones fue significativa (datos no mostrados).

A continuación, se analizó el perfil electroforético de actividades esterasa en el polen utilizando como sustrato ésteres de cadena intermedia como el nonanoato de  $\alpha$ -naftilo (9 C), o de cadena larga como el palmitato de  $\beta$ -naftilo (16 C), según el protocolo 3.2.11. El perfil electroforético de actividades esterasa/lipasa fue similar con ambos sustratos (Figura 4.12). Se identificaron un total de 12 bandas esterasa/lipasa con pesos moleculares comprendidos entre 28 y 78 kDa (Tabla 4.3). Las bandas de actividad presentes en los geles de poliacrilamida fueron nombradas genéricamente como OeLip (*Olea europaea* Lipasa). Las bandas fueron numeradas consecutivamente desde el extremo anódico del gel. El perfil de actividades fue idéntico cuando se utilizaron los isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  de ambos sustratos (datos no mostrados).



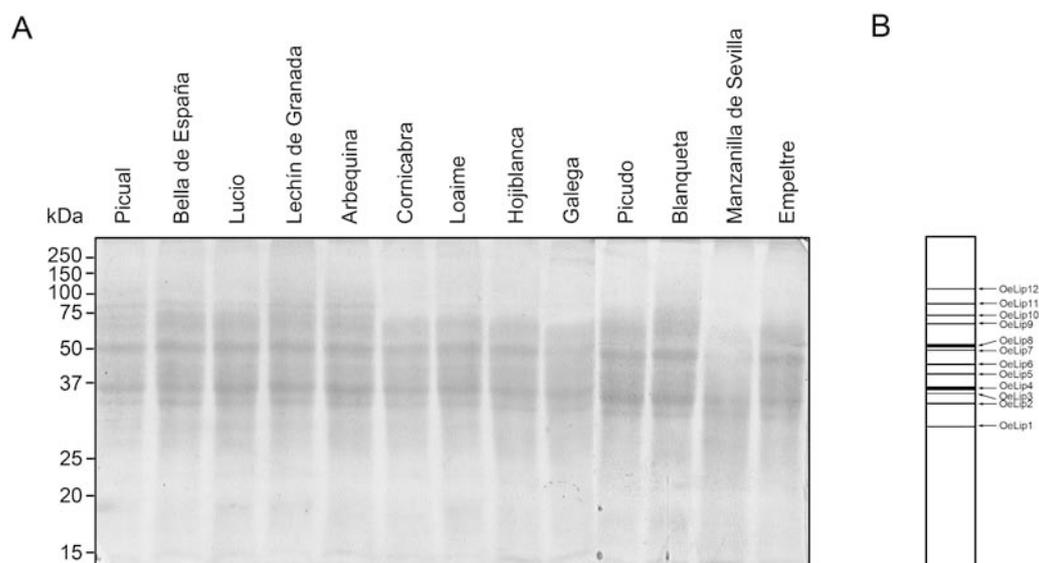
**Figura 4.12.** A) Perfil de actividades esterasa/lipasa en geles de poliacrilamida a partir de extractos proteicos de polen maduro de olivo de la variedad 'Lechín de Granada'. En la mezcla de reacción se utilizó nonanoato de  $\alpha$ -naftilo ó palmitato de  $\beta$ -naftilo como sustrato del enzima. B) Zimograma de actividades esterasa/lipasa en el polen de olivo a partir de los geles de la Fig. 4.12A.



**Tabla 4.3.** Peso molecular (kDa) de las bandas esterasas/lipasas del polen maduro de olivo capaces de hidrolizar ésteres de cadena larga.

Banda	Peso molecular (kDa)
OeLip1	28,0
OeLip2	32,4
OeLip3	32,8
OeLip4	35,7
OeLip5	38,8
OeLip6	39,7
OeLip7	42,4
OeLip8	49,3
OeLip9	51,6
OeLip10	66,5
OeLip11	75,0
OeLip12	78,0

También se llevaron a cabo ensayos de actividad esterasa/lipasa a partir de extractos proteicos del polen de 13 cultivares diferentes (8 variedades principales y 5 variedades secundarias). Los resultados obtenidos muestran que el perfil electroforético es similar en la mayoría de las variedades estudiadas.



**Figura 4.13.** A) Perfil de actividades esterasa/lipasa en geles de poliacrilamida a partir de extractos proteicos de polen maduro de 13 variedades de olivo. En la mezcla de reacción se utilizó palmitato de  $\beta$ -naftilo como sustrato del enzima. B) Zimograma de actividades esterasa/lipasa del polen de olivo a partir de los geles en la Fig. 4.13A.



No obstante, se observaron algunas diferencias cuantitativas y cualitativas significativas entre cultivares (Figura 4.13, Tabla 4.4). Las variedades 'Picual', 'Bella de España', 'Lucio', 'Lechín de Granada', 'Arbequina', 'Picudo' y 'Blanqueta' presentan perfiles muy similares en los que se observan 12 bandas esterolíticas. En el extremo opuesto, el polen de 'Manzanilla de Sevilla' mostró un reducido número de bandas en el gel (5) y unos niveles de actividad enzimática menor que el resto de cultivares analizados. Finalmente, las bandas OELip10-OeLip12 están ausentes en el polen de 'Cornicabra', 'Loaime', 'Hojiblanca', 'Galega' y 'Empeltre'. No se encontró ninguna banda específicamente asociada a un determinado cultivar. OeLip4 y OeLip8 fueron la actividades esterasa/lipasa más prominentes en todos los cultivares analizados.

**Tabla 4.4.** Perfil de actividades esterasa/lipasa en el polen de 13 variedades de olivo.

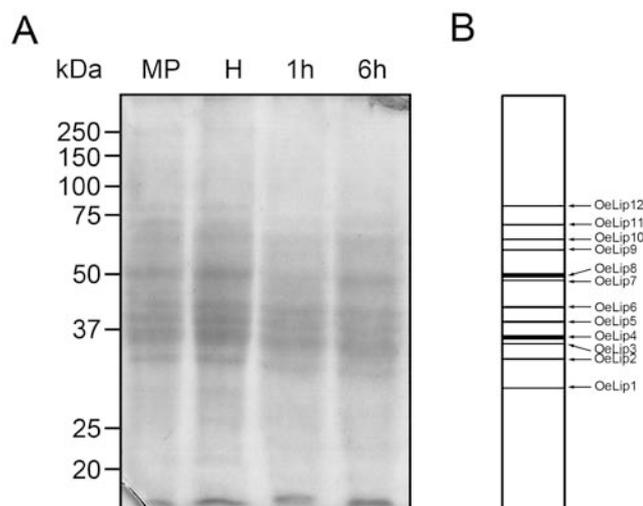
Cultivar	Bandas esterolíticas (OeLip)												No. de bandas
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Picual	-	+	-	+++	+	-	-	+++	-	-	-	--	12
Bella de España	-	+	-	+++	+	-	-	+++	-	-	-	--	12
Lucio	-	+	-	+++	+	-	-	+++	-	-	-	--	12
Lechín de Granada	-	+	-	+++	+	-	-	+++	-	-	-	-	12
Arbequina	-	+	-	+++	+	-	-	+++	-	-	-	--	12
Cornicabra	--	+	-	++	-	-	-	++	-	ND	ND	ND	9
Loaime	--	+	-	++	-	-	-	++	-	ND	ND	ND	9
Hojiblanca	--	+	-	++	-	-	-	++	-	ND	ND	ND	9
Galega	--	+	-	++	--	--	--	+	--	ND	ND	ND	9
Picudo	--	+	-	+++	+	-	-	+++	-	-	-	--	12
Blanqueta	--	+	-	+++	+	-	-	+++	-	-	-	--	12
Manzanilla de Sevilla	-	+	-	+	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	5
Empeltre	--	+	-	++	-	-	-	++	-	ND	ND	ND	9

La intensidad de cada banda esterolítica se muestra en una escala de 5 niveles: muy poco intensa (--), poco intensa (-), algo intensa (+), bastante intensa (++) y muy intensa (+++). ND, banda no detectada.

El análisis del perfil de actividades esterasa/lipasa en el polen durante la germinación *in vitro* mostró un patrón similar en los distintos estadios del proceso, con ligeras diferencias a nivel cuantitativo (Figura 4.14). Durante la hidratación del polen, el nivel de actividad enzimática de las distintas bandas se incrementó ligeramente. Después de 6 h de germinación, los niveles de



intensidad de todas las bandas presentes en el gel disminuyeron hasta valores similares al polen maduro.

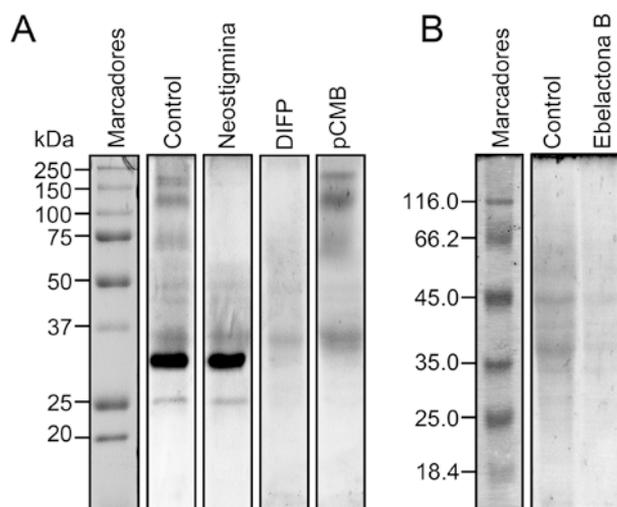


**Figura 4.14.** A) Perfil de actividades esterasa/lipasa en geles de poliacrilamida a partir de extractos proteicos de polen de la variedad 'Lechín de Granada'. En la mezcla de reacción se utilizó palmitato de  $\beta$ -naftilo como sustrato del enzima. B) Zimograma de actividades esterasa/lipasa del polen de olivo a partir de los geles de la figura 4.12A.

Una vez identificadas las distintas actividades esterasa NE, se llevó a cabo la clasificación funcional de dichas enzimas. Para ello, se realizaron experimentos con distintos inhibidores específicos (neostigmina, DIFP, p-CMB) según se detalla en el protocolo 3.2.10. Los resultados obtenidos muestran que las enzimas OeEst1 y OeEst2 son inhibidas en su totalidad por los inhibidores DIFP y p-CMB, pero no se ven afectadas por la presencia de neostigmina (Figura 4.15A). Este patrón de inhibición sugiere que ambas enzimas pertenecen al grupo de las carboxilesterasas. La inhibición con el p-CMB podría reflejar la proximidad de un residuo de cisteína en el sitio activo de la proteína. Las enzimas OeEst9-OeEst14 fueron completamente inhibidas por la acción de carbamatos (neostigmina) y organofosfatos (DIFP), pero no por la acción del p-CMB (Figura 4.15A). En base a estos resultados, estas proteínas fueron clasificadas como colinesterasas. El resto de bandas esterolíticas presentes en los geles de poliacrilamida (OeEst3-OeEst8) no mostraron variación alguna en presencia de ninguno de los inhibidores (Figura 4.15A). Por tanto, según la clasificación de Holmes y Masters (1967), estas enzimas se englobarían en el grupo de acetilesterasas.



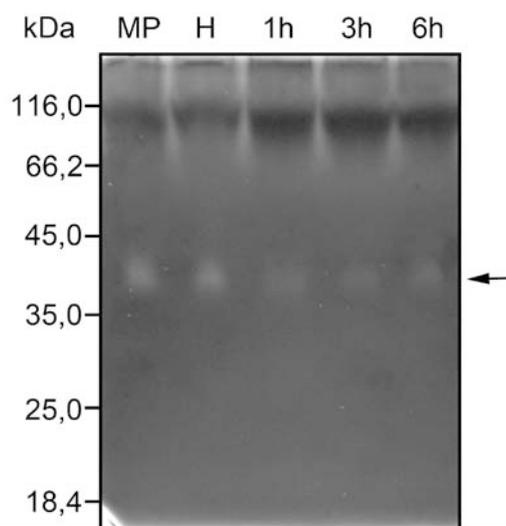
También se analizó el efecto del inhibidor ebelactona B sobre el perfil electroforético de actividades esterasa/lipasa utilizando como sustrato del enzima el palmitato de  $\beta$ -naftilo, según se describe en el protocolo 3.2.12. Se observó que todas las bandas presentes en los geles de poliacrilamida fueron parcialmente inhibidas en presencia del inhibidor, independientemente de la concentración del mismo.



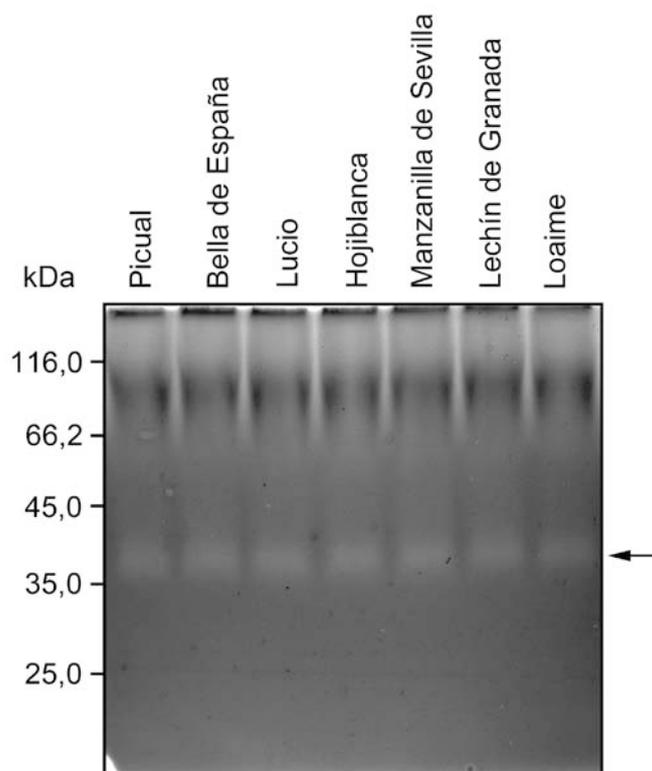
**Figura 4.15.** Ensayos de inhibición *in gel* de las actividades esterasa NE y esterasa/lipasa a partir de extractos proteicos de polen maduro de olivo de la variedad 'Lechín de Granada'. **A)** Efecto de la neostigmina, DIFP y p-CMB sobre la actividad esterasa NE en el polen. **B)** Efecto de la ebelactona B sobre la actividad esterasa/lipasa en el polen.

#### 4.2.2. Análisis electroforético de la actividad pectina metilesterasa del polen

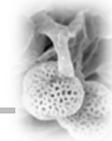
Se determinó el perfil electroforético de actividades pectina metilesterasa (PME) en geles nativos de poliacrilamida a partir de extractos de polen maduro de olivo de la variedad 'Lechín de Granada' (protocolos 3.2.13 y 3.2.14). Para ello, se utilizó pectina esterificada de cáscara de naranja como sustrato del enzima. Se detectó la presencia de una única banda pectinolítica con un peso molecular de 40 kDa (Figura 4.16). Así mismo, se observó una disminución significativa de la actividad de dicha enzima durante la germinación *in vitro* del polen.



**Figura 4.16.** Detección de la actividad PME en geles nativos de poliacrilamida a partir de extractos proteicos (30 de  $\mu\text{g}$  de proteína total) de polen maduro de olivo de la variedad 'Lechín de Granada' durante la germinación *in vitro*. Se observó una única banda pectinolítica de 40 kDa (flecha), la cual disminuyó su intensidad a lo largo de la germinación.



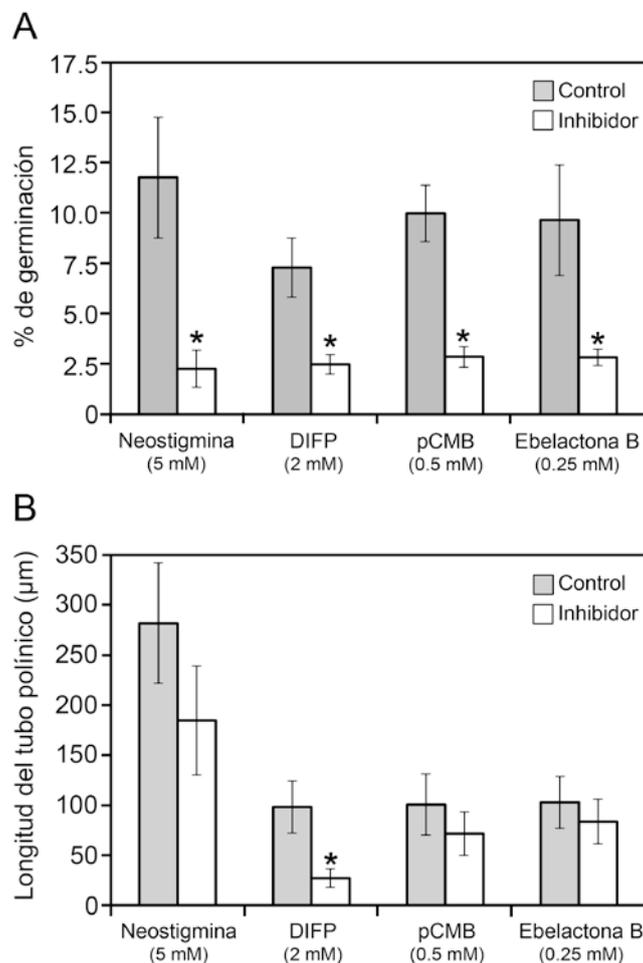
**Figura 4.17.** Detección de la actividad PME en geles nativos de poliacrilamida a partir de extractos proteicos (30 de  $\mu\text{g}$  de proteína total) de polen maduro de olivo de 7 variedades diferentes. Se observa una única banda pectinolítica de 40 kDa (flecha) de intensidad similar.



En paralelo, se estudió el perfil de actividad PME en el polen de 7 variedades de olivo ('Bella de España', 'Hojiblanca', 'Lechín de Granada', 'Loaime', 'Lucio', 'Manzanilla de Sevilla' y 'Picual') con objeto de determinar la existencia de diferencias cuantitativas y/o cualitativas. Se detectó una única banda pectinolítica en todos los cultivares estudiados, de aproximadamente 40 kDa (Figura 4.17). No se observaron diferencias intervarietales significativas en los niveles de actividad de dicha enzima.

#### 4.3. Análisis funcional de las enzimas esterasas mediante inhibidores

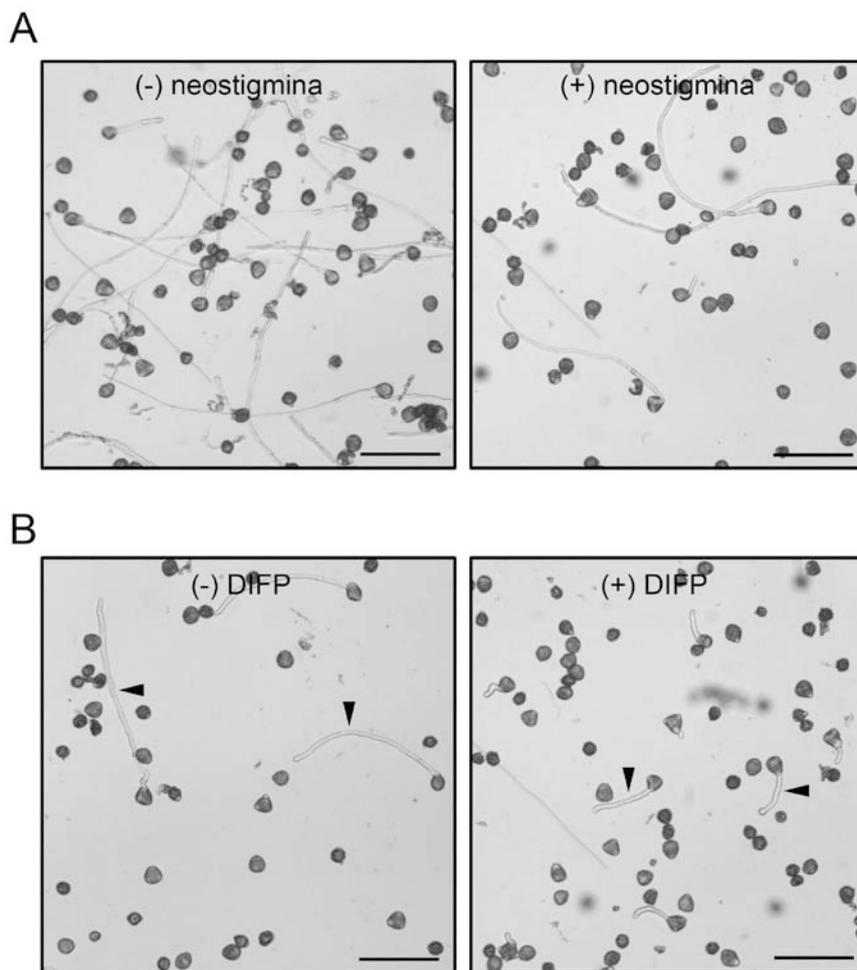
Con objeto de estudiar la implicación de las enzimas esterasas del polen de olivo en la germinación y el crecimiento del tubo polínico se llevaron a cabo ensayos de inhibición durante la germinación *in vitro* (protocolo 3.2.15).



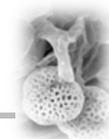
**Figura 4.18.** **A)** Efecto de varios agentes inhibidores específicos de enzimas esterasas sobre el porcentaje de germinación *in vitro* del polen. **B)** Efecto de varios agentes inhibidores específicos de enzimas esterasas sobre la tasa de crecimiento del tubo polínico *in vitro*. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas (test de Mann-Whitney) a nivel de  $p < 0,05$ .



Después de 6 h de cultivo *in vitro*, los resultados obtenidos indican que el tratamiento con los distintos inhibidores ocasiona en todos los casos una reducción significativa de la capacidad de germinar del polen de olivo (cv. 'Lechín de Granada') en comparación con los controles no tratados (Figuras 4.18<sup>a</sup> y 4.19A). A elevadas concentraciones, estos compuestos inhiben completamente la capacidad de germinar del polen o producen alteraciones en la morfología del tubo polínico, que da lugar a que el extremo apical se hinche anormalmente y estalle, liberando el contenido del citoplasma al medio de cultivo y haciendo inviable el crecimiento del tubo (datos no mostrados).



**Figura 4.19.** A) Efecto de la neostigmina (+) sobre la capacidad de germinación *in vitro* del polen de olivo en comparación con el control (-). B) Efecto del DIFP (+) sobre la tasa de crecimiento del tubo polínico *in vitro* en comparación con el control (-). La longitud del tubo polínico después de 6 h de germinación disminuyó hasta cuatro veces después del tratamiento con el inhibidor (cabezas de flecha).



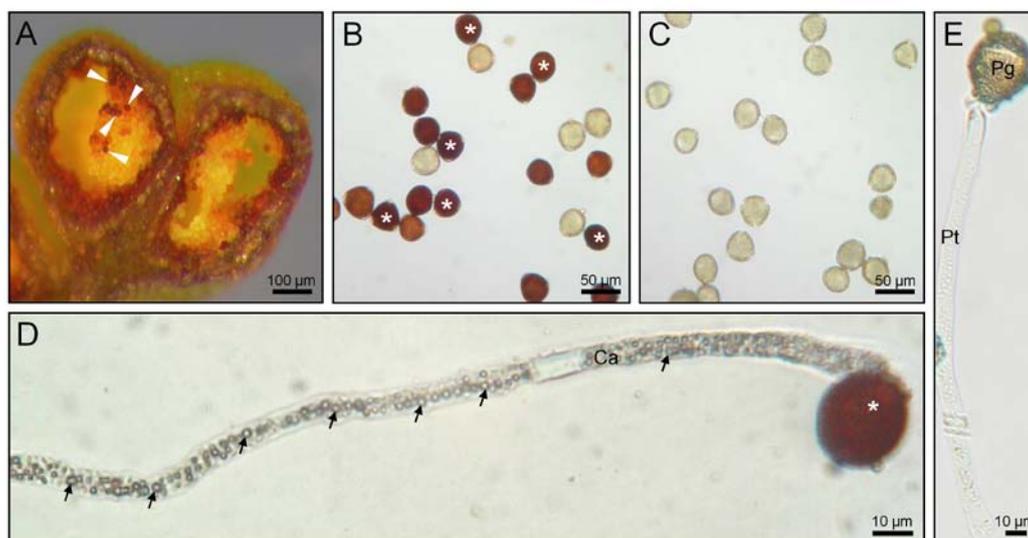
Por otro lado, el DIFP fue el único inhibidor que afectó significativamente a la longitud del tubo polínico después de 6 h de germinación (Fig. 4.23B; 4.24B). También se observó que los valores obtenidos como control en los inhibidores DIFP y p-CMB disminuyen significativamente con respecto al polen germinado directamente sobre medio de cultivo, pero no en el caso de la neostigmina. Esto es probablemente debido al hecho de que la neostigmina se disolvió en agua, mientras que los inhibidores DIFP y p-CMB se prepararon en isopropanol y etanol, respectivamente. Esto sugiere que ambos productos, por sí solos, tienen un efecto perjudicial para el desarrollo del tubo polínico.

#### **4.4. Localización celular de la actividad esterasa en el polen de olivo**

La localización de la actividad esterasa NE en el polen de olivo (protocolo 3.2.17) se realizó *in vivo*, y a partir de secciones semifinas y ultrafinas que se obtuvieron tras procesar los tejidos para microscopía óptica y electrónica de transmisión (protocolo 3.2.16).

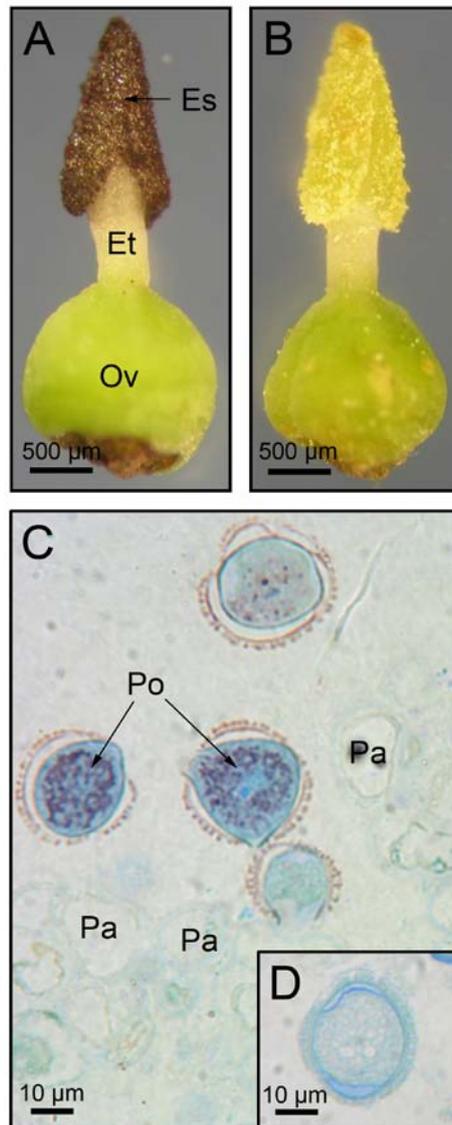
##### **4.4.1. Localización celular de la actividad esterasa NE**

La localización *in vivo* se realizó en el polen maduro dentro de la antera (Figura 4.20A) y en el polen sobre el estigma polinizado (Figura 4.21). En el lóculo de la antera, algunos granos de polen aparecen intensamente teñidos tras la reacción enzimática (Figura 4.20A). La tinción tras la dehiscencia de la antera fue desigual. Así, encontramos granos de polen intensamente teñidos de color marrón-rojizo, pólenes con un grado de tinción menor y pólenes sin teñir (Figura 4.20B). Esta variabilidad en la reacción enzimática indica distintos grados de viabilidad del polen, de forma que cuanto mayor es la intensidad de la coloración mayor será el nivel de actividad esterasa NE en el grano. Por otro lado, los pólenes sin teñir probablemente corresponden a granos no viables. En el polen germinado *in vitro* durante 3 h, la actividad esterasa NE fue visible en la superficie del grano de polen, la cual se tiñó de color marrón-rojizo, y en el citoplasma del tubo polínico (Figura 4.20D). Los controles negativos sin el sustrato del enzima en la mezcla de reacción mostraron la ausencia de coloración tanto en el grano de polen como en el tubo polínico, lo que confirma la especificidad de la reacción enzimática (Figura 4.20C, E).



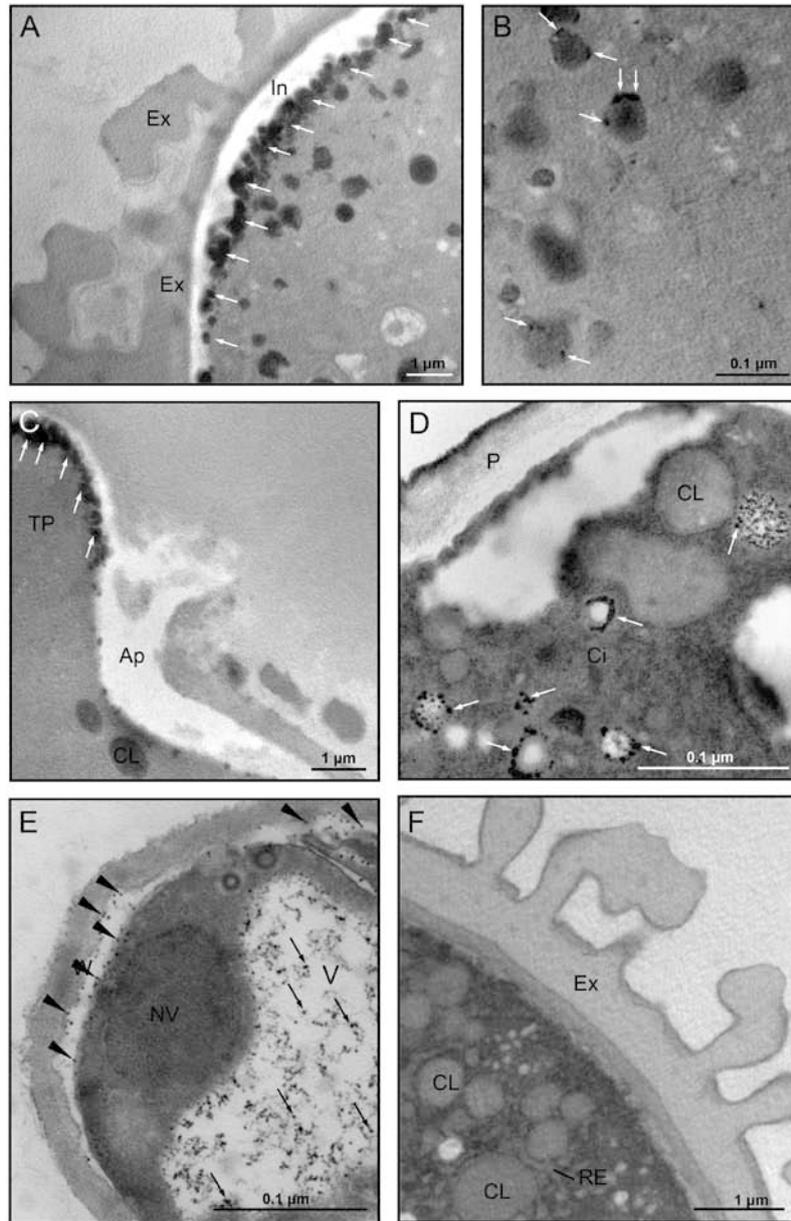
**Figura 4.20.** Localización *in vivo* de la actividad esterasa NE en el polen de olivo. **A)** Sección transversal de una antera de olivo en el estadio de polen maduro. Las cabezas de flecha indican los granos de polen con tinción marrón-rojiza positiva. **B)** Detección de la actividad esterasa NE en el polen maduro tras el antesis de la antera. Los granos de polen con actividad enzimática aparecen teñidos de color marrón-rojizo (asteriscos), mientras que los granos no viables aparecen sin teñir. **C)** Control negativo de B sin el sustrato del enzima. **D)** Detección de actividad esterasa NE en el polen de olivo después de 3 h de la germinación *in vitro*. Se observa tinción de color marrón-rojizo en la superficie del grano (asterisco) y en el citoplasma del tubo polínico (flechas). **E)** Control negativo de D sin el sustrato del enzima.

Durante la polinización, se observó una intensa tinción en la superficie del estigma, lo que indica una elevada actividad esterasa (Figura 4.21A). Por el contrario, no se observó reacción enzimática alguna en la superficie del estilo y ovario. Estos ensayos se repitieron sobre secciones semifinas de pistilos polinizados, que se procesaron para microscopía, tal y como se describe en el protocolo 3.2.16. En dichas secciones, la señal correspondiente a la reacción enzimática se localizó en forma de precipitados de color marrón-rojizos, los cuales aparecen distribuidos por todo el citoplasma de la célula vegetativa del grano de polen (Figura 4.21C). También se localizó actividad enzimática en la exina de la pared del polen, mientras que la intina y las aperturas no mostraron ningún marcado. Así mismo, se observó una ligera reacción enzimática en el citoplasma de las papilas del estigma. En paralelo, se realizaron controles negativos omitiendo el sustrato del enzima en la mezcla de reacción, lo que demuestra la especificidad de la reacción enzimática (Figura 4.21B, D).

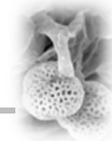


**Figura 4.21.** Localización de la actividad esterasa NE en el polen de olivo durante la germinación *in vivo*. **A)** Pistilo de olivo con granos de polen en su superficie, en la que se observa una intensa tinción positiva, indicativa de la actividad esterasa NE. **B)** Control negativo de A sin el sustrato del enzima. **C)** En secciones de pistilos polinizados, la señal correspondiente a la actividad esterasa NE se localizó en forma de precipitados de color marrón-rojizo distribuidos por todo el citoplasma de la célula vegetativa, y en la pared del polen. También se observó una ligera tinción en las papilas del estigma (flechas). **D)** Control negativo de C sin el sustrato del enzima. Es, estigma; Et, estilo; Ov, ovario; P, polen; Pa, papila.

Posteriormente, se llevó a cabo la localización ultraestructural de la actividad esterasa NE en el polen maduro y el polen germinado *in vitro* durante 3 h. Para ello, las muestras fueron procesadas para microscopía electrónica de transmisión (protocolo 3.2.16). La detección de la actividad enzimática se realizó sobre cortes ultrafinos (protocolo 3.2.17).



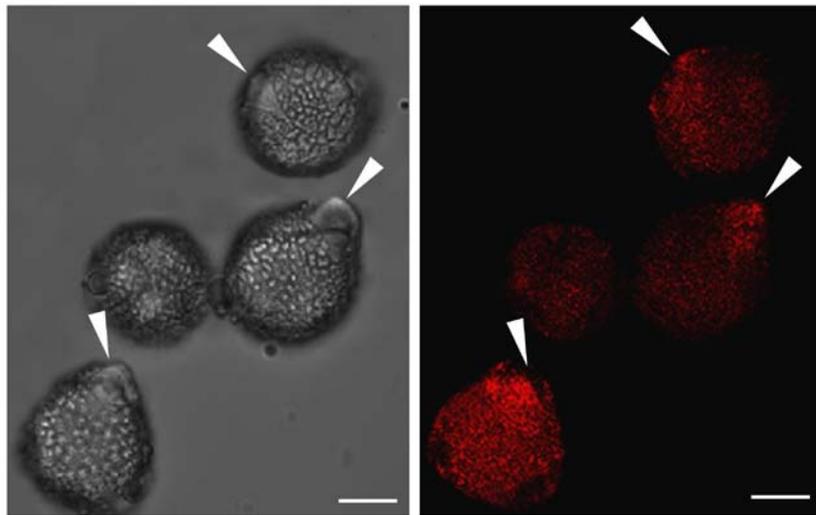
**Figura 4.22.** Localización ultraestructural de la actividad esterasa NE en el polen de olivo (cv. 'Lechín de Granada'). **A)** En el polen maduro, se observan gruesos precipitados electro-densos en la intina, especialmente a nivel de las aperturas (flechas). **B)** En el citoplasma de la célula vegetativa, los precipitados se localizan en la superficie de cuerpos lipídicos (flechas). **C)** Al principio de la germinación, se produce una acumulación de precipitado electro-densos en el ápice del tubo polínico que comienza a emerger (flechas). En el tubo polínico se localizan precipitados electro-densos distribuidos alrededor de cuerpos esféricos distribuidos en el citoplasma (flechas). **E)** En la vacuolar del tubo, los precipitados se localizan en la capa interna de la pared del tubo polínico (cabezas de flecha) y dentro de la vacuola (flechas). **F)** Control negativo sin el sustrato del enzima. Ap, aperturas; Ci, citoplasma; CL, cuerpo lipídico; Ex, exina; NV, núcleo vegetativo; In, intina; P, pared celular; RE, retículo endoplasmático; TP, tubo polínico; V, vacuola.



Los resultados obtenidos muestran la presencia de actividad esterasa NE en forma de precipitados electro-densos. En el polen maduro, dichos precipitados aparecen localizados en la intina, especialmente en las aperturas (Figura 4.22A), y asociados a la superficie de los cuerpos lipídicos de reserva (Figura 4.22B). Durante la germinación, se observó una acumulación de precipitados en el ápice del tubo polínico (Figura 4.22C) y alrededor de pequeñas vesículas distribuidas a lo largo del citoplasma del tubo polínico (Figura 4.22D). En la región distal del tubo polínico, se observó la presencia de un número abundante de precipitados en la capa interna de la pared del tubo polínico y en el interior de la vacuola (Figura 4.22E). Los controles negativos, en los que se omitió el sustrato del enzima, no mostraron marcado alguno (Figura 4.22F).

#### 4.4.2. Localización celular de la actividad esterasa/lipasa

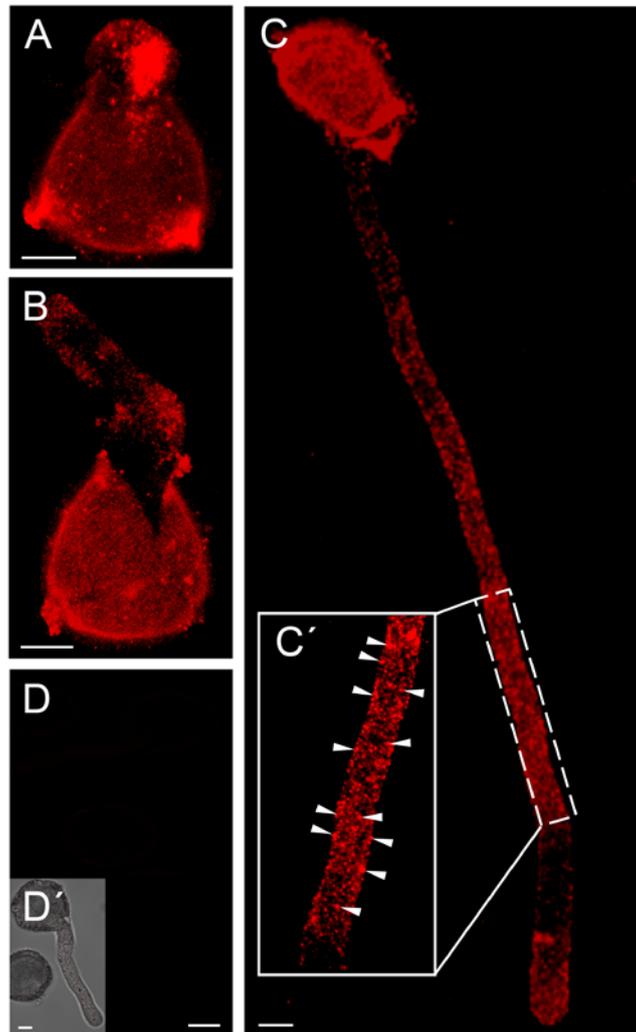
La localización de la actividad esterasa/lipasa se realizó en granos de polen mediante microscopía de barrido láser confocal, utilizando un éster de resorufina como sustrato del enzima (protocolo 3.2.18). En el polen maduro, la señal fluorescente se detectó en la pared del grano de polen, acumulándose principalmente en las aperturas del grano (Figura 4.23).



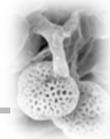
**Figura 4.23.** Localización de la actividad esterasa/lipasa en el polen maduro de olivo (cv. 'Lechín de Granada'). La fluorescencia (imagen de la derecha) se localiza en la pared del polen, particularmente en las aperturas del grano (cabezas de flecha). A la izquierda se observa la misma imagen bajo luz transmitida. Barras= 10  $\mu$ m.



Durante la germinación *in vitro*, la señal fluorescente correspondiente a la actividad esterasa/lipasa se localizó inicialmente (10 min de germinación) en las tres regiones aperturales del polen hidratado (Figura 4.24A). Transcurridas 1 y 3 h de cultivo, se observó la presencia de un punteado fino fluorescente a lo largo de todo el citoplasma del tubo polínico, que se hace más intenso en las proximidades del ápice (Figura 4.24B, C-C'). No se observó fluorescencia en el control correspondiente (Figura 4.24D-D').

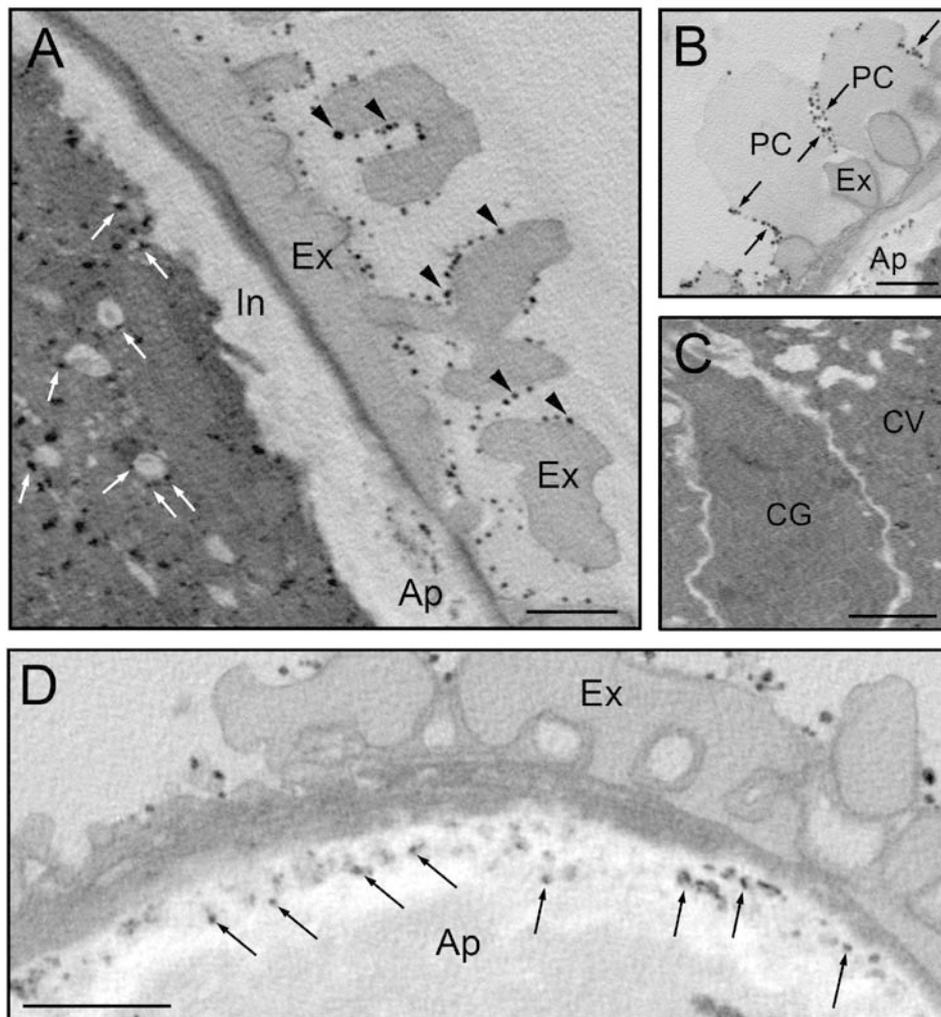


**Figura 4.24.** Localización de la actividad esterasa/lipasa en el polen maduro de olivo (cv. 'Lechín de Granada') mediante microscopía de barrido láser confocal. **A)** Reconstrucción 3-D de un grano de polen tras 10 min de germinación. **B)** Reconstrucción 3-D de un grano de polen después de 1 h de germinación. **C)** Reconstrucción 3-D de un grano de polen a las 3 h de germinación. **C')** A mayor aumento, se observa el aspecto granular de la fluorescencia. **D)** Sección óptica de polen germinado que muestra un control negativo en ausencia del sustrato del enzima. **D')** Imagen como en D pero bajo luz transmitida. Barras= 10  $\mu$ m.



#### 4.4.3. Localización celular de la actividad acetilcolinesterasa

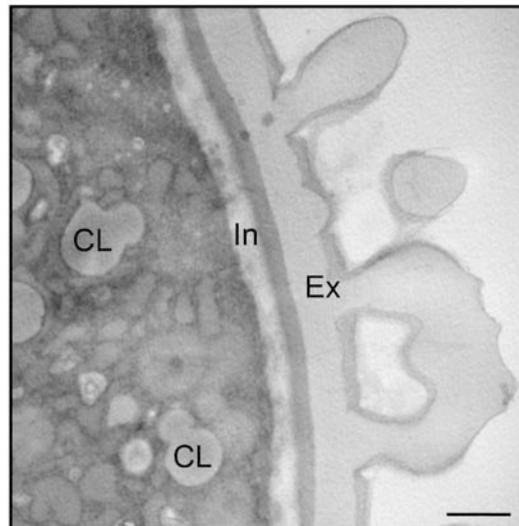
Con objeto de determinar la localización ultraestructural de la actividad acetilcolinesterasa (AChE) en el polen maduro y el polen germinado *in vitro*, las muestras se procesaron para microscopía electrónica de transmisión (protocolo 3.2.16). La detección de la actividad AChE se realizó usando la acetiltiocolina como sustrato del enzima (protocolo 3.2.19).



**Figura 4.25.** Localización ultraestructural de la actividad acetilcolinesterasa en el polen maduro de olivo (cv. 'Lechín de Granada'). **A)** Sección de polen maduro donde se observan precipitados electro-densos en la exina (cabezas de flecha) y en el citoplasma de la célula vegetativa, asociados a pequeñas vesículas (flechas). **B)** Detalle de la pared del polen donde se distinguen precipitados en el material externo adherido a la exina o "pollen coat" (flechas). **C)** Detalle de la célula generativa, en la que no se observa ningún precipitado. **D)** Sección de polen hidratado en el que se observa la acumulación de precipitados electro-densos en la intina de la región apertural (flechas). Ap, apertura; CG, célula generativa; CV, célula vegetativa; Ex, exina; In, intina; PC, pollen coat. Barras= 1 µm.

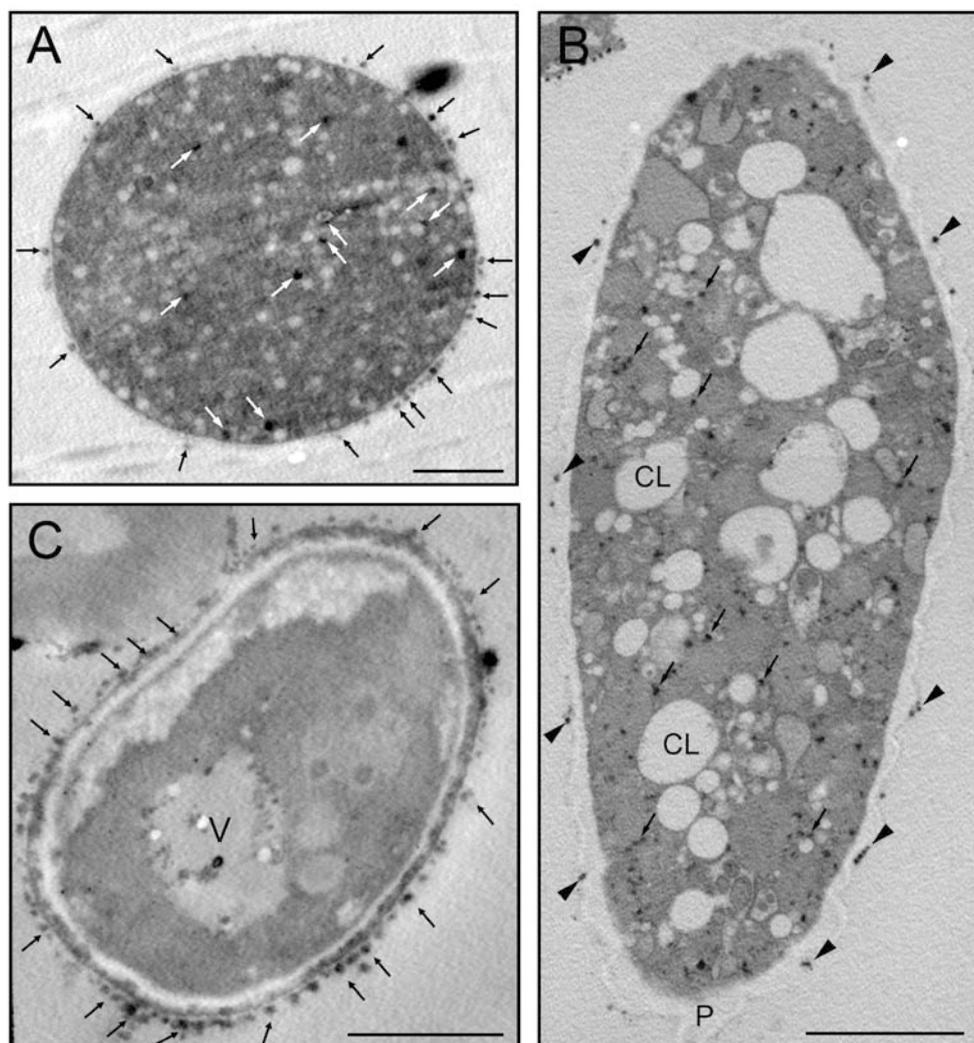
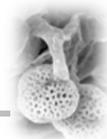


En el polen maduro, se observaron un gran cantidad de precipitados electro-densos, localizados principalmente en la superficie de la capa más externa de la exina (Figura 4.25A) y de las gotas de material lipídico que forman el “pollen coat” y que se depositan entre las báculas de la exina (Figura 4.25B). En menor medida, se observó un marcado en el citoplasma de la célula vegetativa del polen, donde los precipitados aparecen frecuentemente asociados a la superficie de pequeñas vesículas citoplasmáticas (Figura 4.25A). La célula generativa no mostró ningún marcado (Figura 4.24C). Tras la hidratación del polen, se observó un intenso marcado en las aperturas hinchadas del polen (Figura 4.25D). Los controles negativos confirmaron la especificidad de la reacción enzimática (Figura 4.26).



**Figura 4.26.** Control negativo de la actividad acetilcolinesterasa (AChE) en el polen de olivo. CL, cuerpo lipídico; Ex, exina; In, intina. Barra= 1  $\mu$ m.

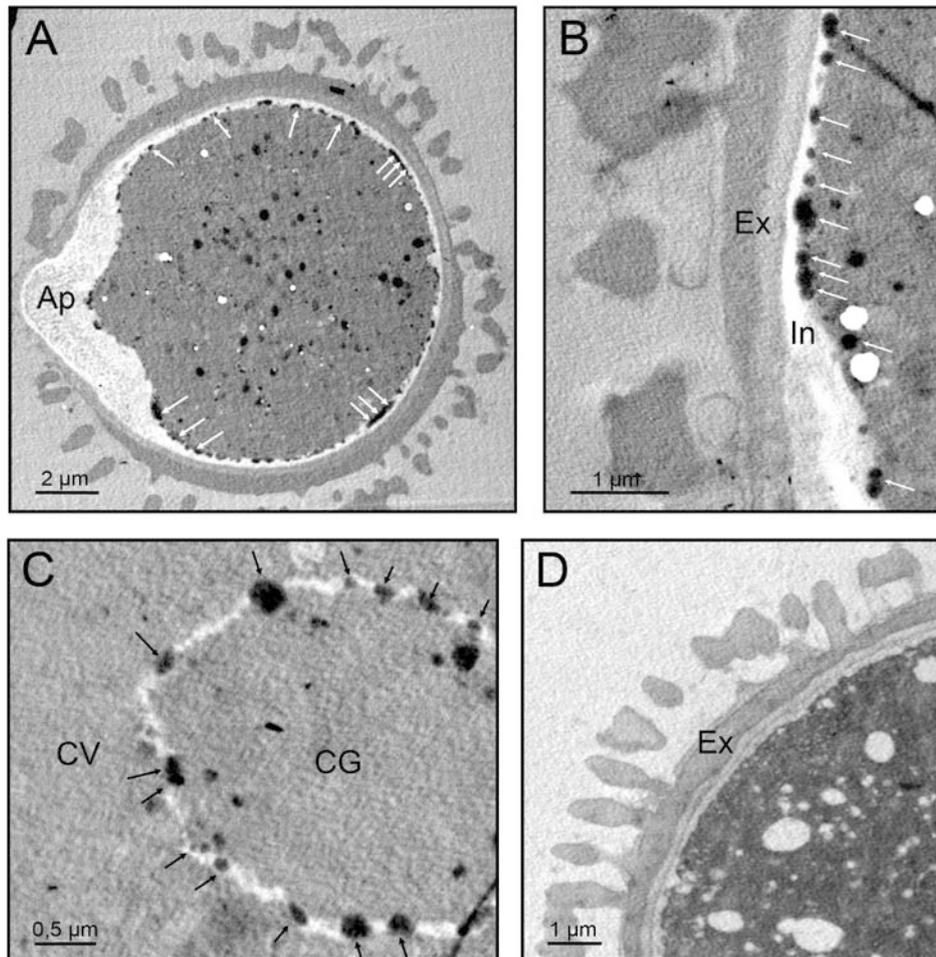
Durante la germinación del polen, se observan numerosos precipitados electro-densos en el citoplasma del tubo polínico. En la zona apical del tubo, dichos precipitados aparecen a menudo asociados a pequeñas vesículas próximas a la membrana plasmática, y también en la pared celular (Figura 4.27A). En la zona subapical del tubo polínico, se observaron precipitados en el citoplasma y en la superficie externa de la pared del tubo polínico (Figura 4.27B). En la zona vacuolada del tubo el precipitado correspondiente a la actividad acetilcolinesterasa se localiza principalmente en la superficie externa de la pared del tubo polínico (Figura 4.27C).



**Figura 4.27.** Localización ultraestructural de la actividad acetilcolinesterasa (AChE) en el polen de olivo (cv. 'Lechín de Granada') durante la germinación *in vitro*. **A)** Sección transversal del tubo polínico en la zona apical del tubo. Se observa un intenso marcado en la pared del tubo polínico (flechas negras) y asociado a pequeñas vesículas que se fusionan con la membrana plasmática (flechas blancas). **B)** Sección tangencial de la zona subapical del tubo polínico en el que se observan precipitados en el citoplasma (flechas) y en la cara externa de la pared (cabezas de flecha). **C)** Sección transversal de la zona vacuolar del tubo polínico. Se observa un denso marcado localizado en la pared celular (flechas). CL, cuerpos lipídicos; P, pared celular; V, vacuola. Barras= 1  $\mu$ m.

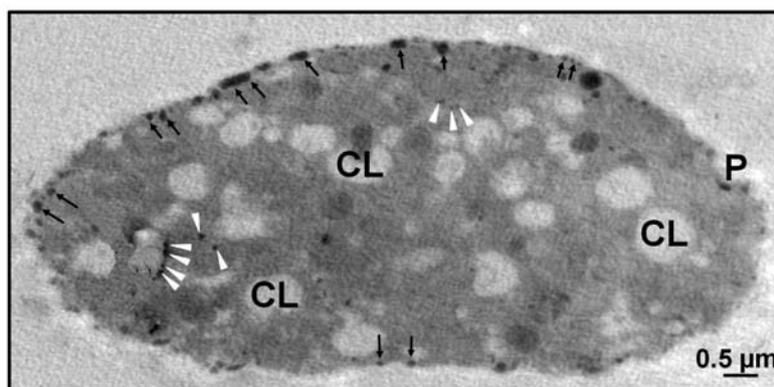
#### 4.4.4. Localización celular de la actividad PME

Con objeto de determinar la localización ultraestructural de la actividad pectina metilesterasa (PME) en el polen maduro y el polen germinado *in vitro*, se utilizó pectina esterificada de cáscara de naranja como sustrato del enzima (protocolo 3.2.24.2).



**Figura 4.28.** Localización ultraestructural de la actividad PME en el polen maduro. **A)** Sección transversal de un polen maduro hidratado. Se distinguen precipitados electro-densos en la cara interna de la intina, muy próximos al plasmalema (flechas) y también distribuidos por todo el citoplasma de la célula vegetativa. **B)** Detalle de la pared del polen cercana a la zona de la apertura, donde se observa una acumulación de precipitados electro-densos gruesos (flechas). **C)** Detalle de la célula generativa, en la que se observa abundantes precipitados dentro de la pared celular (flechas). **D)** Control negativo de una sección de un grano de polen. Ap, Apertura; CG, célula generativa; CV, célula vegetativa; Ex, exina; In, intina.

Los resultados obtenidos mostraron la presencia de precipitados electro-densos sobre la capa interna de la intina, próxima al plasmalema, del grano de polen hidratado (Figura 4.28A, B) y por todo el citoplasma de la célula vegetativa (Figura 4.28A). El marcado de la reacción enzimática se localizó también en la pared celular de la célula generativa (Figura 4.28C). En el caso del polen germinado *in vitro*, los precipitados electro-densos se observaron en la capa interna de la pared del tubo polínico y en el citoplasma del tubo polínico (Figura 4.29).



**Figura 4.29.** Localización ultraestructural de la actividad PME en el tubo polínico del polen de olivo. Sección tangencial de la zona subapical de un tubo polínico tras 3 h de germinación, en la que se observan precipitados electro-densos en las cercanías del plasmalema (flechas) y en el citoplasma (cabezas de flecha). CL, cuerpos lipídicos; P, pared celular.

#### 4.5. Análisis de proteómica

Se llevó a cabo el análisis del proteoma del exudado estigmático en dos especies diferentes: *Lilium longiflorum* (azucena blanca) y *Olea europaea* (olivo). Ambas especies difieren en su clasificación taxonómica, características anatómicas del pistilo, composición del exudado estigmático, distribución geográfica y usos (Tabla 4.5).

**Tabla 4.5.** Características de las especies elegidas para el estudio.

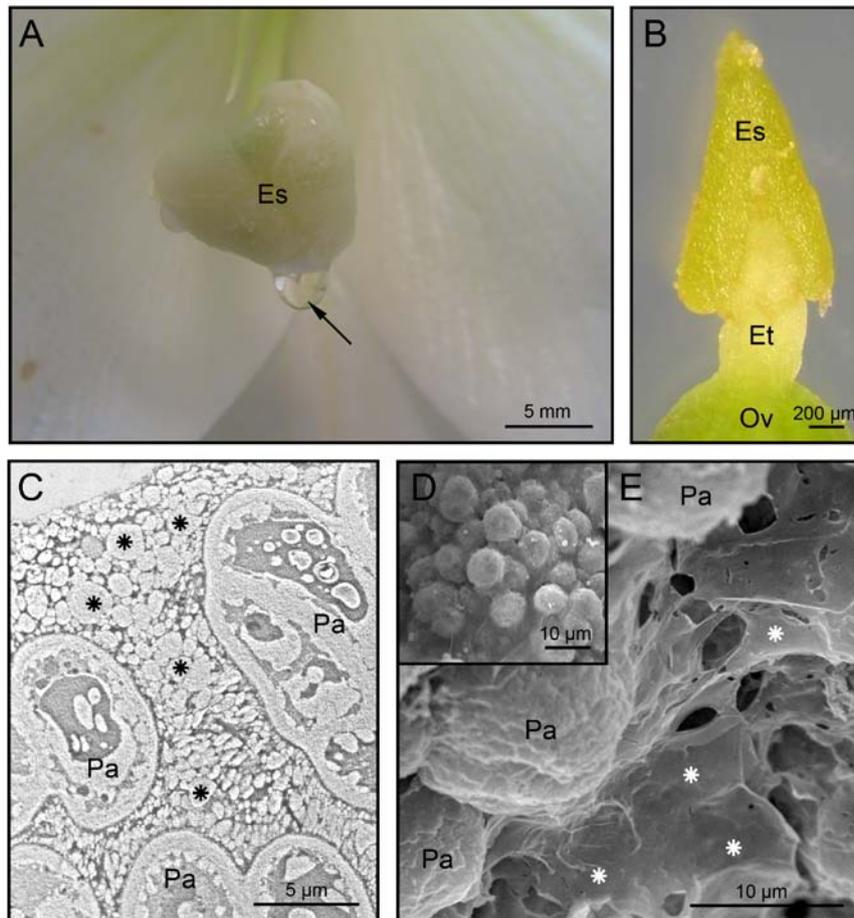
Características	<i>Lilium longiflorum</i>	<i>Olea europaea</i>
Taxonomía	Monocotiledónea	Dicotiledónea
Tipo de estigma	Húmedo/Papilar	Húmedo/Papilar
Composición del exudado	Acuoso	Lipídico
Anatomía del estigma y estilo	Hueco	Sólido
Polinización	Entomófila	Anemófila
Distribución geográfica	Japón y Filipinas	Mediterráneo
Uso del cultivo	Ornamental	Agronómico

##### 4.5.1. Análisis proteómico del exudado estigmático

En *Lilium*, el exudado estigmático aparece en forma de gotas macroscópicas que se depositan sobre la superficie del estigma (Figura 4.30A). En el olivo, el tamaño del pistilo es mucho más reducido (Figura 4.30B) y la producción de exudado en términos cuantitativos es mucho menor. A simple vista no se



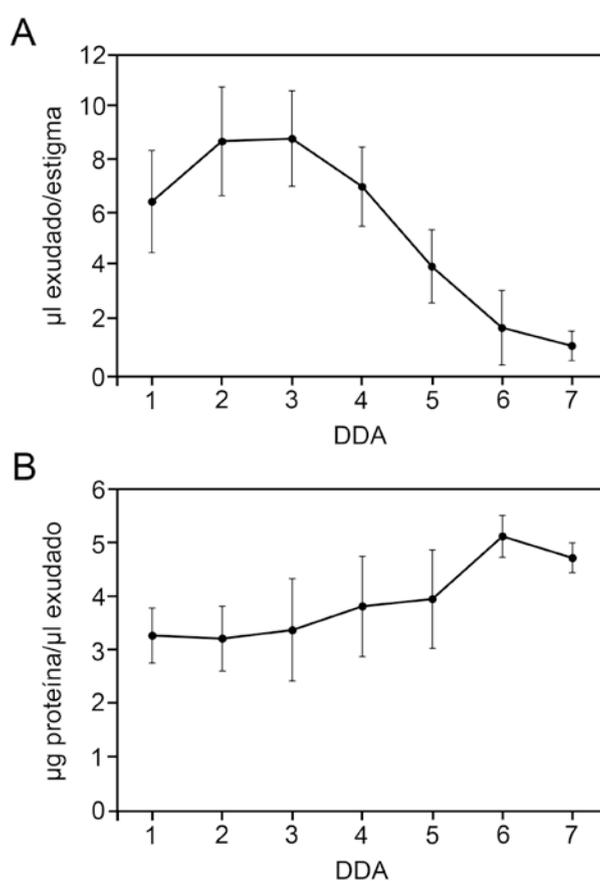
aprecia la formación de gotas macroscópicas pero se observa que la superficie del estigma aparece cubierta por una fina película que confiere un aspecto brillante al estigma (Figura 4.30B). A nivel ultraestructural, el exudado del olivo presenta un aspecto heterogéneo y vesicular, y recubre en su totalidad la superficie de las papilas del estigma (Figura 4.30C). A microscopía electrónica de barrido, el exudado presenta el aspecto de una matriz traslúcida que recubre la superficie del estigma y también se encuentra entre las papilas y en los espacios intercelulares del tejido papilar (Figura 4.30D-E).



**Figura 4.30.** Exudado estigmático de *Lilium longiflorum* y *Olea europea*. **A)** Estigma de *Lilium*, en el que se observan gotas macroscópicas de exudado (flecha). **B)** Estigma de olivo que presenta un aspecto brillante en su superficie debido a la presencia de exudado. **C)** Fotomicrografía de microscopía electrónica de transmisión de papilas estigmáticas de olivo rodeadas por una matriz heterogénea de exudado de aspecto vesicular (asteriscos)... **D)** Fotomicrografía de microscopía electrónica de barrido de la superficie papilar del estigma de olivo. **E)** Detalle de las papilas, en las que se observa el exudado como una matriz (asteriscos) Es, estigma; Et, estilo; Ov, ovario; Pa, papilas.

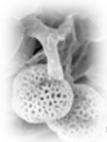


En el caso de *Lilium*, se realizó un estudio detallado de la dinámica de secreción del exudado estigmático y de su contenido proteico a partir del momento de la antesis de la flor (día 1). La figura 4.31 muestra los cambios en la cantidad de exudado secretado y su contenido proteico desde el inicio de la antesis hasta la degeneración del estigma. Se observó un máximo en la síntesis de exudado estigmático al segundo-tercer día de la antesis (Figura 4.31A). A continuación, la producción de exudado en el estigma disminuyó gradualmente. Paralelamente, se observó que el contenido de proteínas presentes en el exudado se incrementó progresivamente hasta alcanzar un máximo transcurridos 6 días desde el inicio de la antesis.

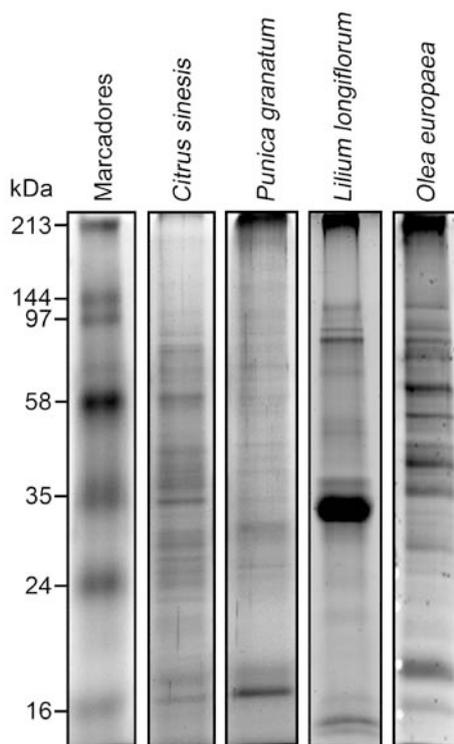


**Figura 4.31.** Dinámica de secreción del exudado estigmático durante la fase progámica en *Lilium longiflorum*. **A)** Cambios en el volumen de exudado secretado por el estigma durante los 7 días posteriores a la antesis de la flor. **B)** Variaciones en el contenido proteico del exudado secretado por el estigma durante los 7 días posteriores a la antesis de la flor. DAA, días después de la antesis.

Con el fin de caracterizar el proteoma del exudado estigmático de *Lilium* y olivo, se llevaron a cabo análisis mediante 1-D SDS-PAGE del

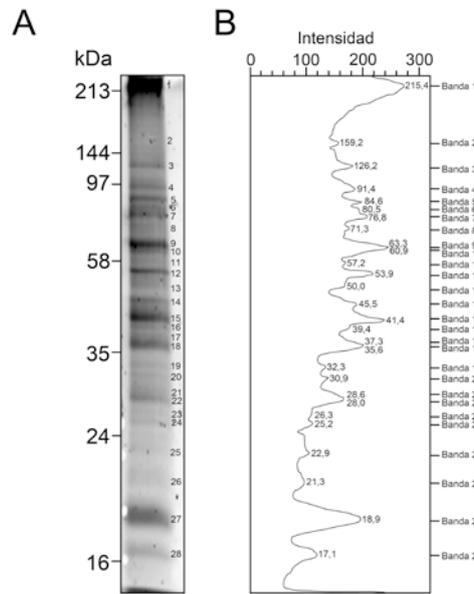


exudado de varias especies de Angiospermas (protocolo 3.2.21.3). Después de la electroforesis, la tinción de proteínas se llevó a cabo con el fluorocromo Deep Purple (Figura 3.2.21.4). Los resultados mostraron que el perfil proteico 1-D difiere cuantitativa y cualitativamente entre las distintas especies de Angiospermas estudiadas (Figura 4.32).

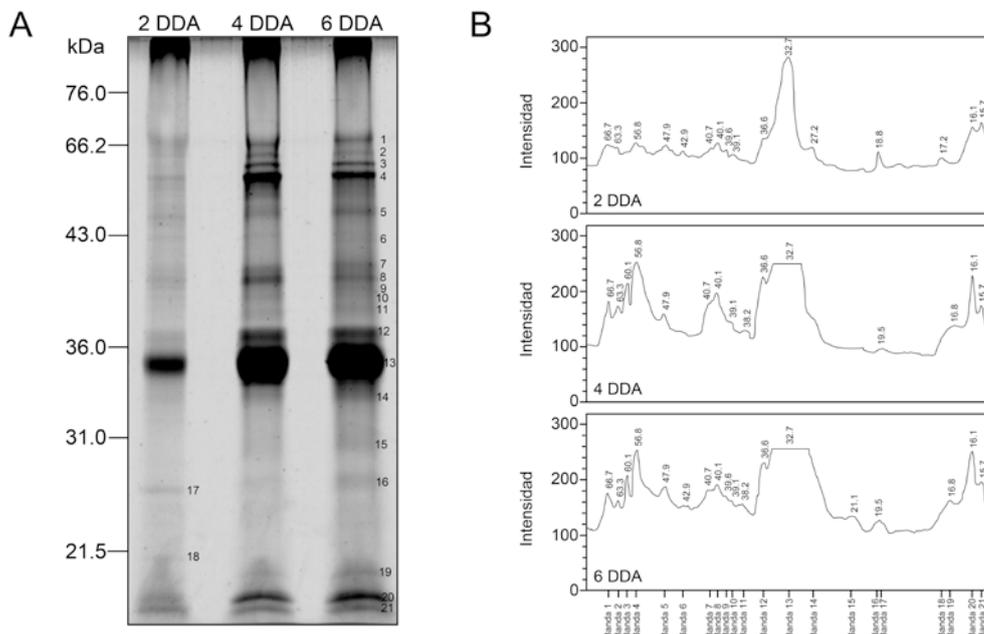


**Figura 4.32.** Perfil electroforético del proteoma del exudado estigmático de diferentes Angiospermas. Aproximadamente 30  $\mu$ g de proteínas totales por muestra se analizaron mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%. La tinción de proteínas se llevó a cabo con el fluorocromo Deep purple. Los marcadores proteicos de peso molecular se muestran a la izquierda (kDa).

En el exudado estigmático de olivo se observó la presencia de 28 bandas proteicas con pesos moleculares entre 17,1 y 215,4 kDa (Figura 4.33), mientras que en el exudado de *Lilium* se identificaron hasta 21 bandas proteicas con pesos moleculares comprendidos entre 15,7 y 66,7 kDa (Figura 4.34). El análisis electroforético del perfil de las proteínas del exudado de *Lilium* durante la fase progámica mostró un incremento gradual del contenido proteico que corrobora los resultados obtenidos mediante la cuantificación de los extractos (Figura 4.33). A nivel cualitativo, el perfil proteico fue muy similar durante todo el proceso. No obstante, se observó que las bandas proteicas 17 y 18 eran sintetizadas al inicio de la fase progámica (2DDA), pero desaparecían del gel 1-D en estadios posteriores.



**Figura 4.33.** A) Perfil electroforético 1-D del proteoma del exudado estigmático de olivo. Los números en el gel representan las distintas bandas proteicas. Los marcadores proteicos se muestran a la izquierda (kDa). B) Perfil densitométrico de las bandas proteicas presentes en la figura 4.33A. Los números representan los pesos moleculares de las distintas bandas.



**Figura 4.34.** Análisis de la dinámica de síntesis de proteínas en el exudado de *Lilium longiflorum*. A) Perfil electroforético 1-D del proteoma del exudado estigmático de *Lilium longiflorum* transcurridos 2, 4 y 6 días desde el inicio de la antesis. Los números representan las distintas bandas proteicas. Los marcadores proteicos se muestran a la izquierda (kDa). B) Perfil densitométrico de las bandas proteicas presentes en la figura 4.34A. Los números representan los pesos moleculares de las distintas bandas. DDA, días después de la antesis.



A continuación se llevó a cabo el análisis proteómico de las distintas bandas proteicas de los geles 1-D. Para ello, las bandas fueron escindidas del gel con ayuda de un escalpelo y se realizó la digestión enzimática *in gel* de las proteínas mediante tripsina. En el Anexo 1, se muestra de forma esquemática el patrón de escisión de las distintas bandas del gel de poliacrilamida en dos muestras independientes de exudado para cada una de las especies analizadas. Los fragmentos peptídicos resultantes de la proteólisis fueron analizados mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (nanoLC-ESI-MS/MS; protocolo 3.2.21.5) y secuenciación *de novo* (protocolo 3.2.21.6). Los resultados se procesaron de forma individual (banda a banda) o en conjunto (modo MudPit). Los análisis de MS/MS dieron lugar a espectros MS2 de gran calidad para cada una de las bandas proteicas analizadas (Anexo 2). La lista completa de las proteínas identificadas en el exudado de olivo y *Lilium* se muestran en las tablas S1 y S2, contenidas en el Anexo 3 (hoja Excel que se adjunta en el DVD). En cada tabla se incluye información referente al tipo de análisis MS/MS, número de acceso de la proteína, nombre de la proteína identificada y la especie, secuencia de los péptidos identificados, familia proteica a la que pertenece cada proteína, peso molecular teórico de la proteína, puntuación BLAST, y la clasificación funcional en base a distintas ontologías (FunCat y Gene Ontology) de las distintas proteínas.

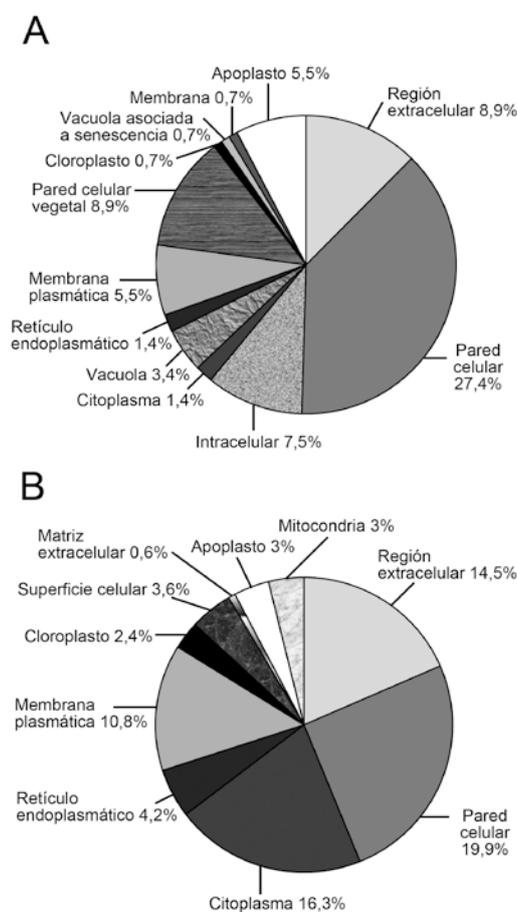
Los análisis de proteómica permitieron identificar un total de 576 proteínas, de las cuales 286 están presentes en el exudado estigmático de *Lilium* y 290 en el exudado de olivo (Tablas S1 y S2, Anexo 3).

**Tabla 4.6.** Proteínas identificadas en el exudado estigmático de *Lilium* y olivo.

Familia	Nombre de la proteína
PF00009	GTP elongation factor Tu
PF00012	Heat shock protein 70
PF00044	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
PF00038	Reverse transcriptase
PF00121	Triosephosphate isomerase
PF00234	Lipid transfer protein
PF00295	Poygalacturonase
PF00314	Thaumatococin
PF00332	$\beta$ -1,3-glucanase
PF00560	Leucine rich repeat (LRR) protein
PF00657	GDSL-like lipase
PF01095	Pectinesterase
PF02866	NAD-dependent malate dehydrogenase



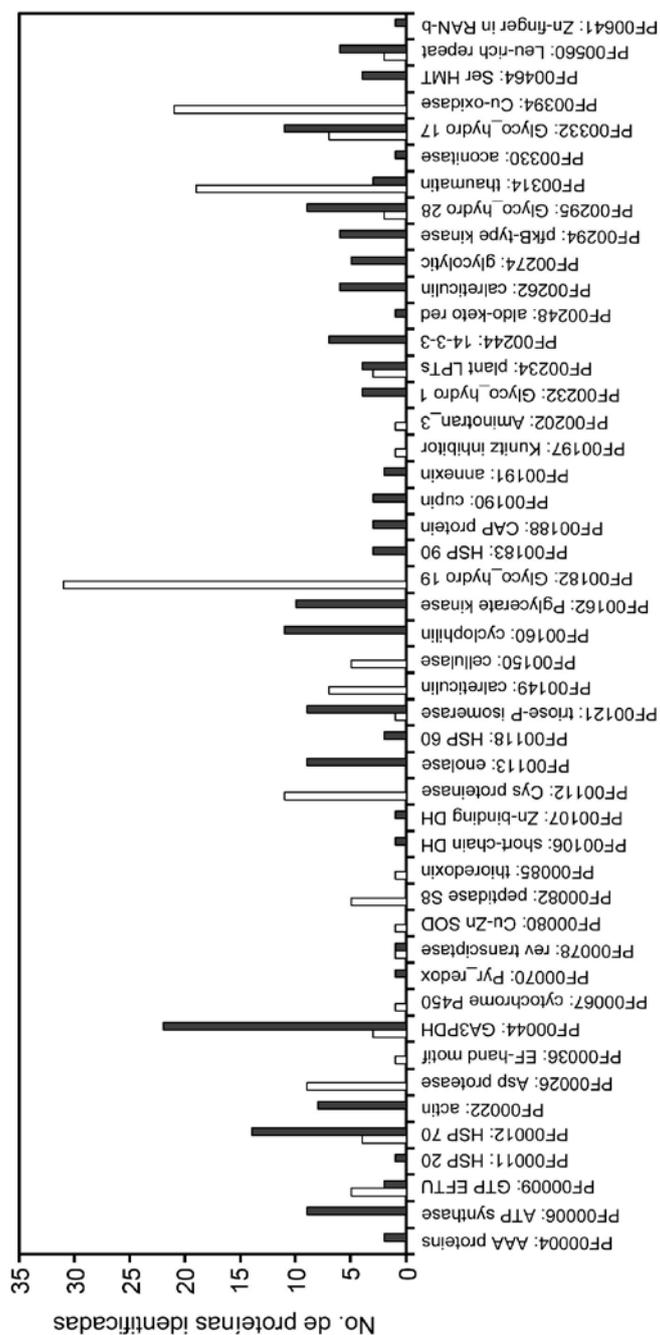
Analizando con detalle los resultados obtenidos, se observó que el 18,5% (53 proteínas) de las proteínas identificadas en *Lilium* son proteínas únicas, mientras que en el olivo el 28% (81 proteínas) de las proteínas identificadas son proteínas únicas. Sólo 13 de las 121 proteínas identificadas están presentes en ambos exudados (Tabla 4.6). El número total de proteínas identificadas no se pudo determinar debido a la existencia de polimorfismos en el 66% de las proteínas analizadas, las cuales presentan dos o más isoformas. El análisis *in silico* de las secuencias aminoacídicas mostró que el 81% de las proteínas del exudado de *Lilium* presentan un péptido señal, lo que indica que son secretadas por la ruta exocítica clásica del RE/Golgi. Este porcentaje disminuye al 50% en el exudado de olivo. Los datos de predicción de la localización celular de las proteínas, basados en Gene Ontology (GO), son consistentes con estos datos y muestran que la mayoría de las proteínas presentan una localización extracelular (Figura 4.35). No obstante, un 20% y 50% de las proteínas mostraron una localización intracelular.



**Figura 4.35.** Predicción de la localización subcelular de las proteínas identificadas en el exudado de *Lilium* (A) y olivo (B) en base a la clasificación de Gene Ontology (GO).



En base a la existencia de determinado dominios proteicos, las 286 proteínas identificadas en el exudado de *L. longiflorum* se agrupan en 50 familias proteicas de la base de datos Pfam, mientras que las 290 proteínas identificadas en el exudado de olivo se agrupan en 67 familias (Figura 4.36).



**Figura 4.36.** Familias proteicas (base de datos Pfam) identificadas en el exudado estigmático de olivo (barras grises) y *Lilium* (barras blancas).

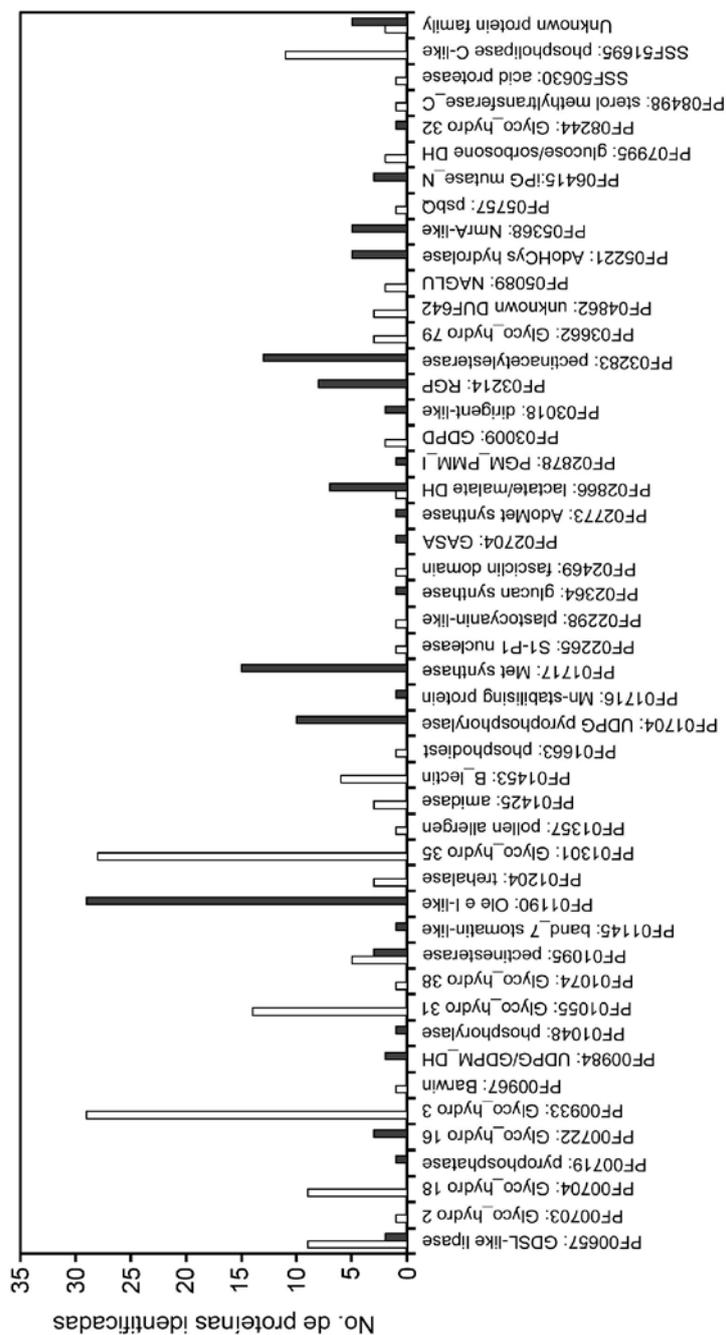


Figura 4.36. Continuación.

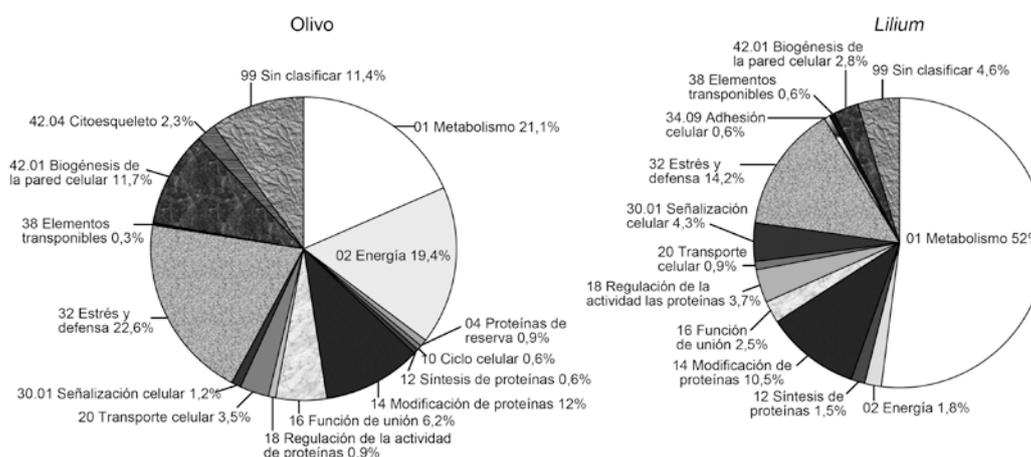
La asignación de una función biológica a cada una de las proteínas identificadas se llevó a cabo mediante el sistema GO (Gene Ontology), el cual establece una clasificación jerárquica de los genes según el proceso biológico en el que participan y su función molecular. Así, se pudo determinar que las



proteínas del exudado del estigma participan en al menos 95 procesos biológicos diferentes (Anexo 4). Existen 24 procesos biológicos que son comunes a ambos exudados, entre los que destacan el metabolismo de carbohidratos, de lípidos y de nucleótidos, las respuestas de defensa y estrés, procesos de fosforilación y metilación, la modificación de la pared celular, la regulación negativa de la actividad catalítica, y diversas reacciones de reducción-oxidación. El resto de procesos biológicos son exclusivos de una u otra especie. En *Lilium*, destaca la presencia de enzimas implicadas en la degradación de proteínas (proteasas) y enzimas implicadas en el catabolismo de la quitina (quitinasas). Por su parte, en el olivo, son exclusivas ciertas proteínas implicadas en procesos de señalización celular mediados por ácido salicílico y brasinosteroides, en la biosíntesis de celulosa y en la deposición de calosa.

Por otro lado, dichas proteínas llevan a cabo 111 funciones moleculares distintas (Anexo 5). Existen 32 funciones moleculares que son comunes a ambos exudados, entre las que destacan actividades enzimáticas tales como GTPasa, peroxidasa, poligalacturonasa y pectinesterasa. Además, en el exudado de *Lilium* se identificaron actividades superóxido dismutasa (SOD), fosfolipasa C, endopeptidasa y lacasa, mientras que el exudado de olivo se demostró la existencia de proteínas con actividad calosa sintasa y glucanasa.

La figura 4.37 muestra una representación esquemática de las distintas categorías funcionales (FunCat) de las proteínas presentes en el exudado de olivo y *Lilium*.



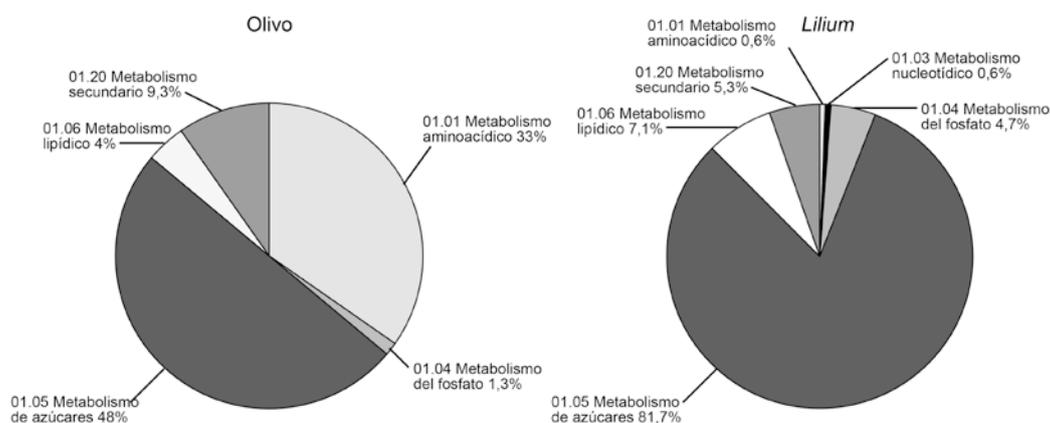
**Figura 4.37.** Representación esquemática de las distintas categorías funcionales principales (FunCat, main) de las proteínas identificadas en el fluido estigmático de olivo y *Lilium*.

El conjunto de proteínas identificadas en el exudado fueron agrupadas en 15 categorías funcionales principales (Figura 4.35), 12 de ellas comunes a ambas especies. Entre ellas, destacan el metabolismo, la señalización celular, la



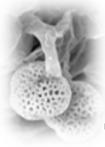
respuesta frente a estrés biótico y abiótico, y la biogénesis de la pared celular. Además, en el exudado estigmático de olivo se identificaron proteínas relacionadas con el ciclo celular y el citoesqueleto, mientras que en *Lilium* se encontraron proteínas relacionadas con la adhesión celular. No se pudo asignar la función a un 11,4% y 4,6% de las proteínas identificadas en el exudado de olivo y *Lilium*, respectivamente.

Las proteínas relacionadas con el metabolismo constituyen el grupo funcional más numeroso en ambos exudados (21,1% del total de proteínas en olivo y 52% en *Lilium*). La figura 4.38 muestra una representación esquemática de las distintas categorías funcionales secundarias relacionadas con el metabolismo celular.



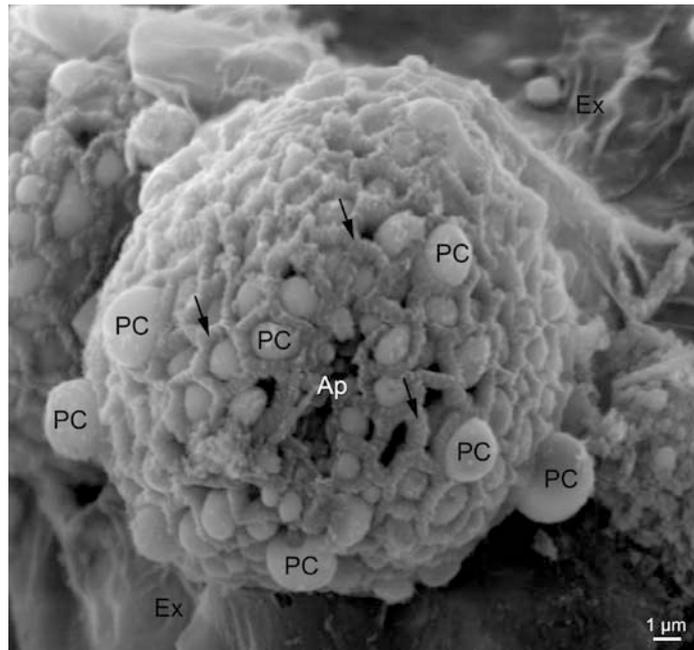
**Figura 4.38.** Representación esquemática de las distintas categorías funcionales secundarias (FunCat, secondary) del metabolismo a las que pertenecen las proteínas identificadas en el fluido estigmático de olivo y *Lilium*.

Las proteínas fueron agrupadas en 6 categorías funcionales secundarias relacionadas con el metabolismo, 5 de las cuales están representadas en ambos exudados. En *Lilium*, se identificó una proteína implicada en el metabolismo nucleotídico, ausente en el exudado de olivo. Las proteínas relacionadas con el metabolismo (catabolismo) de azúcares y polisacáridos constituyen el principal grupo de proteínas relacionadas con el metabolismo (48% del total de proteínas del metabolismo identificadas en el exudado de olivo y 81,7% en *Lilium*). Por otro lado, es de destacar que un 33% de las enzimas presentes en el exudado estigmático del olivo tiene una función relacionada con el metabolismo de aminoacídico, mientras que este grupo de enzimas están prácticamente ausentes (0,6%) en el exudado de *Lilium*.



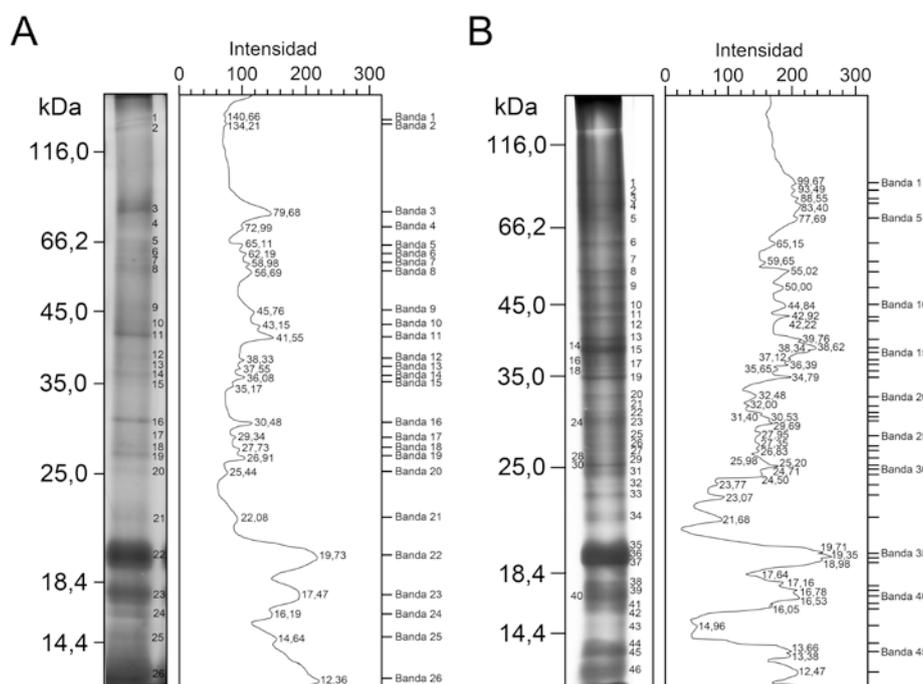
#### 4.5.2. Análisis proteómico del “pollen coat” del olivo

El “pollen coat” se forma a partir de los restos celulares del *tapetum* de la antera y, en el polen de olivo, aparece en forma de gotas que se depositan sobre la superficie de la pared del polen y cubren los huecos u orbículos que dejan los elementos que determinan la estructura reticulada de la exina (Figura 4.39).



**Figura 4.39.** Fotomicrografía de microscopía electrónica de barrido de un grano de polen de olivo sobre la superficie del estigma, en el que se observa el “pollen coat” en el interior de las cavidades que forma la exina (flechas). Ap, apertura; Ex, exudado estigmático; PC, “pollen coat”.

Con el fin de caracterizar el proteoma del “pollen coat” de olivo, se llevó a cabo la extracción de proteínas mediante a) disolventes orgánicos (ciclohexano), o b) marcado covalente de las proteínas de la superficie del grano de polen con el fluorocromo CyDye, según se describe en el protocolo 3.2.21.2. Posteriormente, dichas proteínas se separaron electroforéticamente mediante 1-D SDS-PAGE (protocolo 3.2.21.3). Tras la extracción con disolventes orgánicos, se detectaron 26 bandas proteicas con pesos moleculares entre 12,4 y 140,7 kDa (Figura 4.40A). Mediante el marcado covalente de proteínas en superficie, el número de bandas proteicas se incrementó a 46, con pesos moleculares comprendidos entre 12,5 y 99,7 kDa.

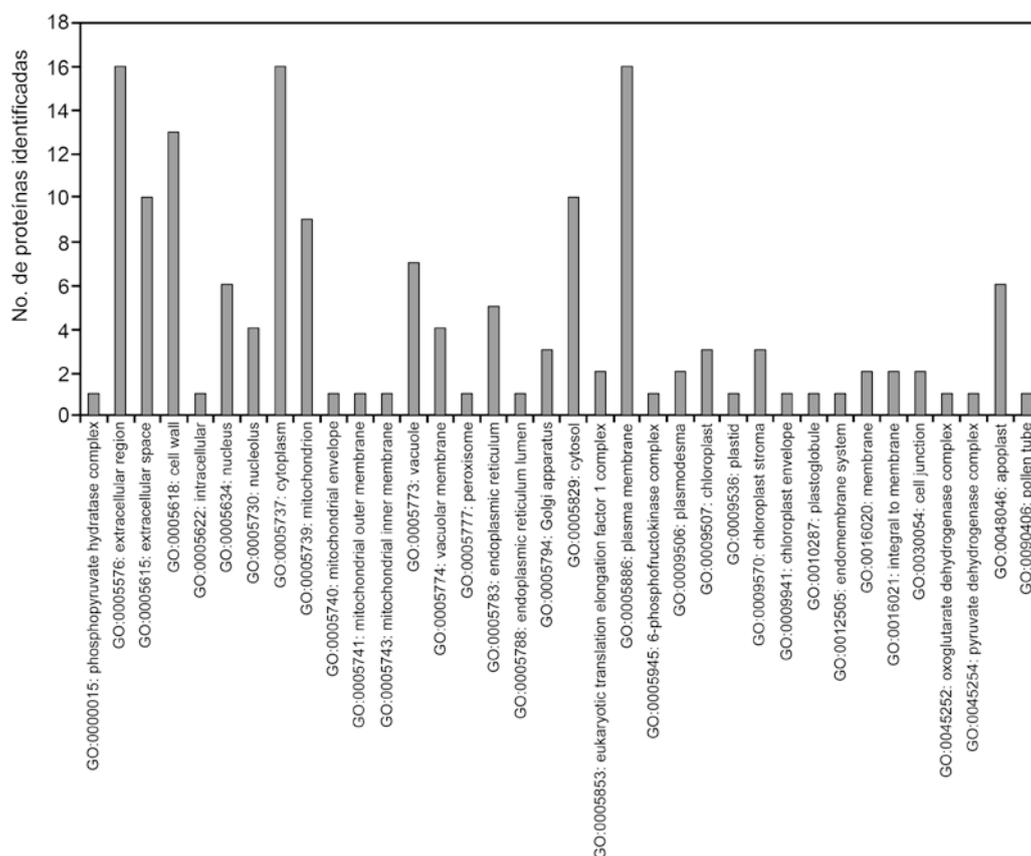


**Figura 4.40.** A) Perfil electroforético 1-D del proteoma del “pollen coat” de olivo. Los números en el gel representan las distintas bandas proteicas. Los marcadores proteicos se muestran a la izquierda (kDa). B) Perfil densitométrico de las bandas proteicas presentes en la figura 4.40A. Los números representan los pesos moleculares de las distintas bandas.

A continuación se llevó a cabo la identificación de las distintas bandas proteicas de los geles 1-D. Para ello, las proteínas fueron aisladas del gel de poliacrilamida con un escalpelo y se realizó la digestión enzimática *in gel* de las proteínas mediante tripsina. En el Anexo 6, se muestra de forma esquemática el patrón de escisión de las distintas bandas proteicas a partir de dos muestras independientes de proteínas del “pollen coat” obtenidas mediante el marcado fluorescente en superficie o la extracción con disolventes orgánicos, respectivamente. Los fragmentos peptídicos resultantes de la proteólisis fueron analizados mediante nanoLC-ESI-MS/MS (protocolo 3.2.21.5) y secuenciación *de novo* (protocolo 3.2.21.6). La lista completa de las proteínas identificadas en el “pollen coat” se muestra en la tabla S3 (Anexo 3). Con en el caso del exudado estigmático, se incluye información referente al tipo de análisis MS/MS, número de acceso de la proteína, nombre de la proteína identificada y la especie, secuencia de los péptidos identificados, familia proteica a la que pertenece cada proteína, peso molecular teórico de la proteína, puntuación BLAST, y la clasificación funcional en base a distintas ontologías (FunCat y Gene Ontology) de las distintas proteínas.



Los análisis de proteómica permitieron identificar 162 proteínas del “pollen coat”, de las cuales 48 fueron únicas, lo que representa el 30% del total de proteínas identificadas. Como en el caso del exudado, no se pudo determinar el número total de proteínas debido a la existencia de polimorfismos en el 70% de las proteínas analizadas, las cuales presentan dos o más isoformas. El análisis *in silico* de las secuencias aminoacídicas mostró que 42 de las proteínas identificadas (26%) en el “pollen coat” de olivo presentan un péptido señal teórico, lo que indica que son secretadas por la ruta exocítica clásica del RE/Golgi. Los datos de predicción de la localización celular de las proteínas, basados en Gene Ontology (GO), son consistentes con estos datos y muestran que 28 de las 76 proteínas (37%) para las que existen datos sobre GO component presentan una localización extracelular (Figura 4.41). No obstante, casi un 60% de las proteínas mostraron una localización intracelular.



**Figura 4.41.** Predicción de la localización subcelular de las proteínas identificadas en el “pollen coat” de olivo en base a la clasificación ontológica de Gene Ontology (GO).



En base a la existencia de determinado dominios proteicos, las 162 proteínas identificadas en el “pollen coat” de olivo se agrupan en 103 familias proteicas de la base de datos Pfam (Figura 4.42).

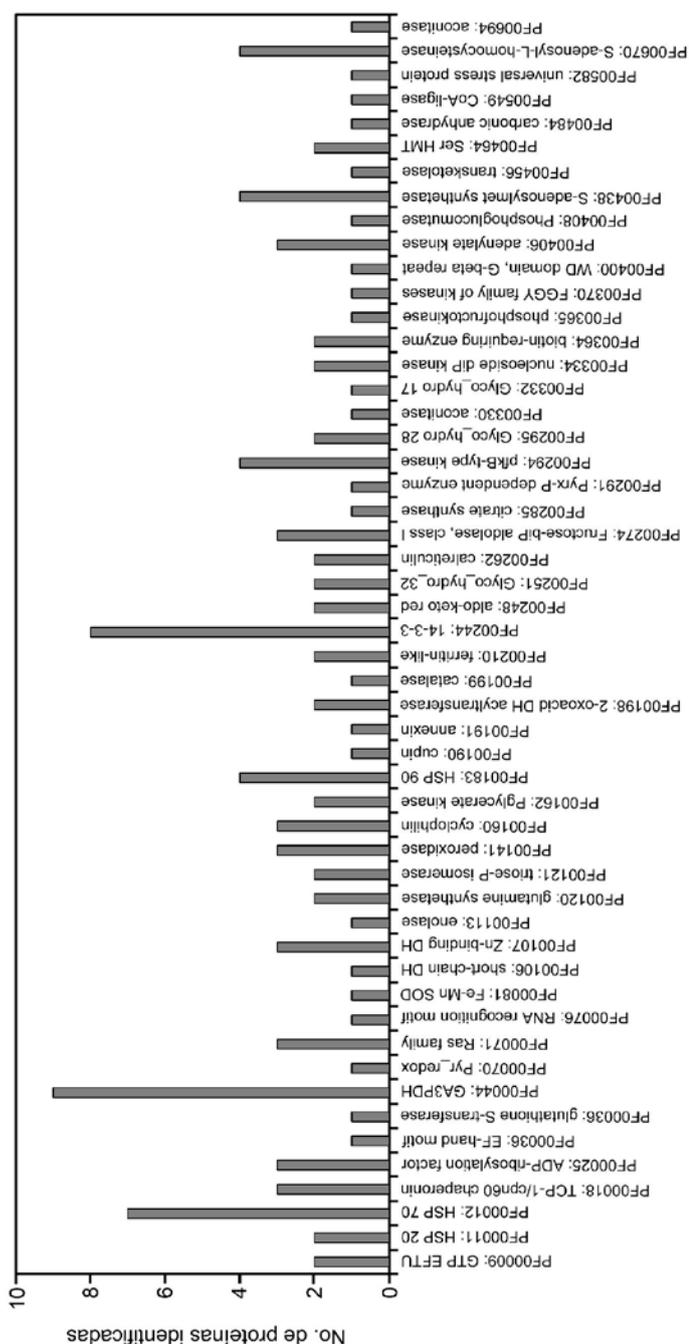


Figura 4.42. Familias proteicas (base de datos Pfam) identificadas en el “pollen coat” de olivo.

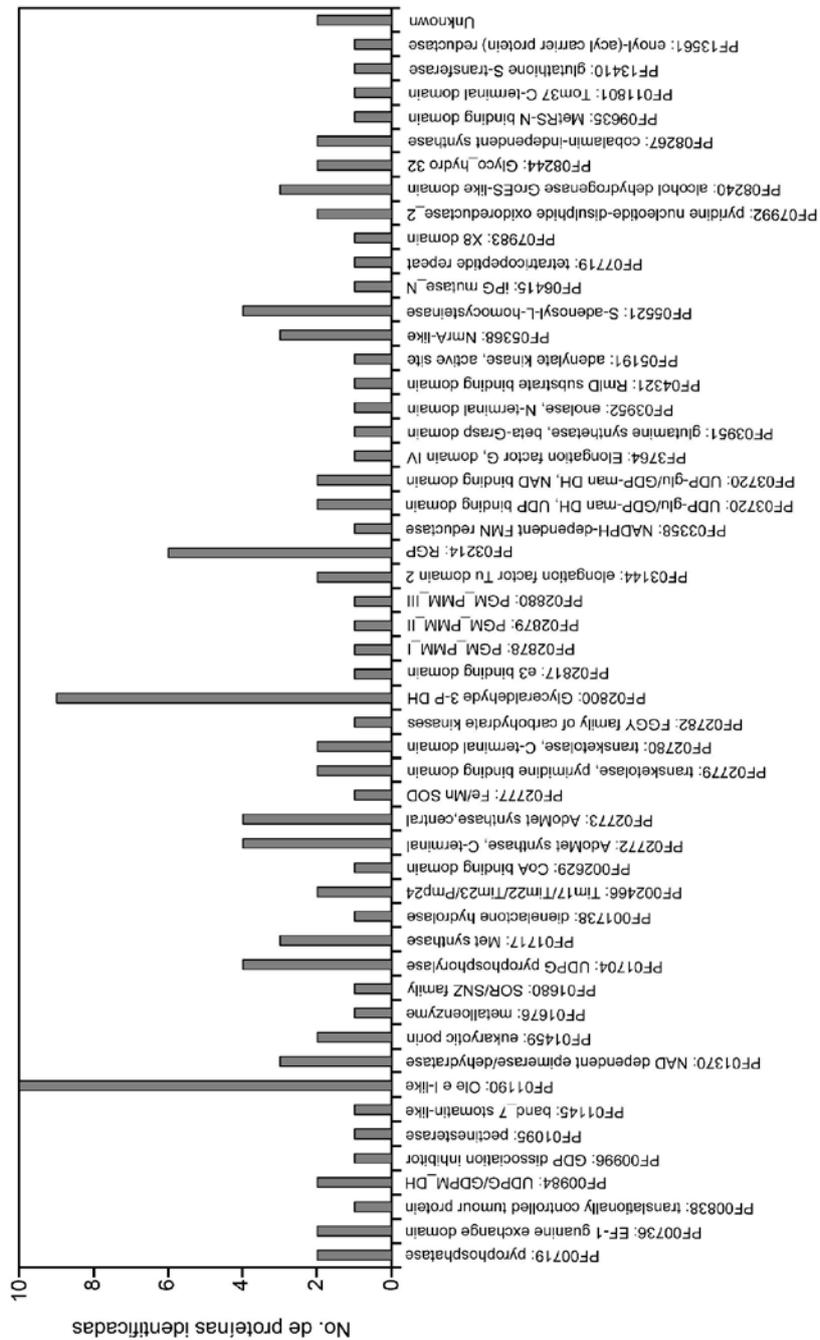


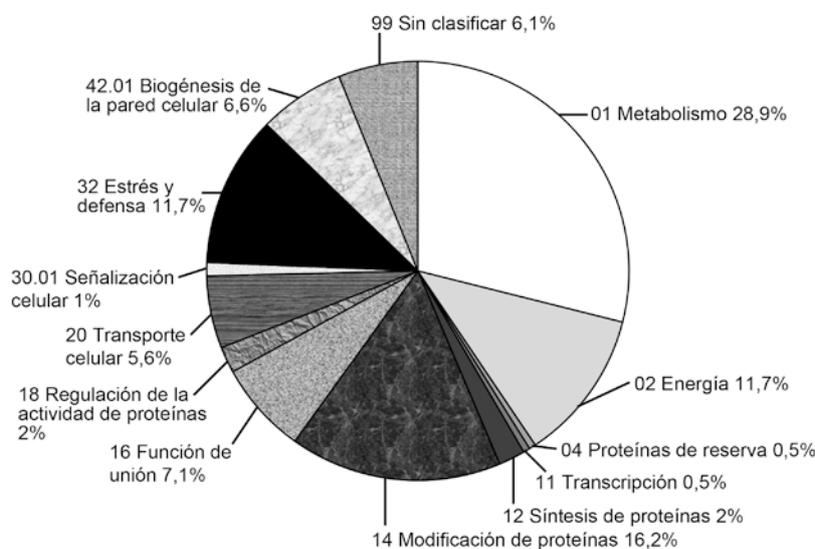
Figura 4.42. Continuación.

La asignación de una función biológica a cada una de las proteínas identificadas se llevó a cabo mediante el sistema de clasificación GO (Gene Ontology). Así, se pudo determinar que las proteínas del “pollen coat” participan en al menos 90 procesos biológicos diferentes (Anexo 7). Entre estos, destacan, en función del número de proteínas implicadas, las respuestas frente



a estrés, procesos de fosforilación, la modificación de la pared celular, y los procesos de reducción-oxidación. Se desconocen los procesos biológicos en los que participan 36 de las proteínas identificadas en el “pollen coat”. Por otro lado, las proteínas del “pollen coat” llevan a cabo 89 funciones moleculares distintas (Anexo 8), entre las que destacan las actividades enzimáticas poligalacturonasa y pectinesterasa, ambas relacionadas con el metabolismo de las pectinas de la pared celular, y varias actividades enzimáticas ligadas a procesos de detoxificación celular tales como catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa (SOD). No existe información en la base de datos GO (Gene Ontology) sobre la función molecular de 25 de las proteínas identificadas.

La figura 4.43 muestra una representación esquemática de las distintas categorías funcionales (FunCat) de las proteínas presentes en el “pollen coat” de olivo. El conjunto de proteínas identificadas fueron agrupadas en 12 categorías funcionales principales, entre las que destacan el metabolismo, la producción de energía, la modificación de proteínas, la respuesta frente a estrés biótico y abiótico, y la biogénesis de la pared celular. No se pudo asignar la función a un 6,1% de las proteínas identificadas.

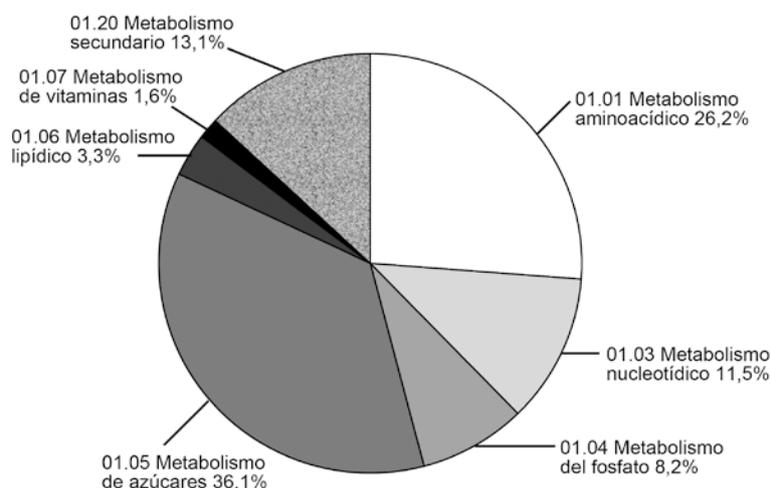


**Figura 4.43.** Representación esquemática de las distintas categorías funcionales principales (FunCat, principal) de las proteínas identificadas en el “pollen coat” de olivo.

Las proteínas relacionadas con el metabolismo constituyen el grupo funcional más numeroso (28,9% del total de proteínas del “pollen coat”). La figura 4.44 muestra una representación esquemática de las distintas categorías funcionales secundarias relacionadas con el metabolismo celular. Las proteínas fueron agrupadas en 7 categorías funcionales secundarias relacionadas con el



metabolismo. El grupo más abundante de enzimas está relacionado con el metabolismo de azúcares (36,1% del total de proteínas), seguido por el de las enzimas implicadas en el metabolismo de amino ácidos (26,2%) y el metabolismo secundario (13,1%).



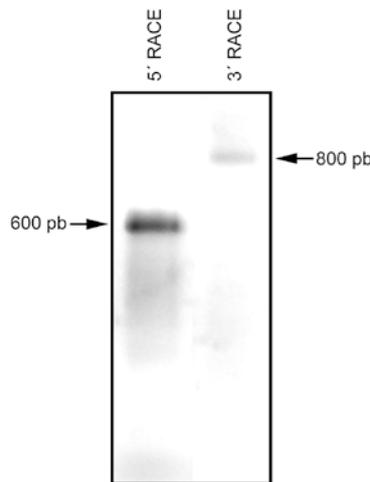
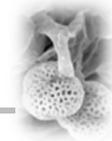
**Figura 4.44.** Representación esquemática de las distintas categorías funcionales secundarias (FunCat, secundaria) del metabolismo a las que pertenecen las proteínas identificadas en el “pollen coat” de olivo.

#### 4.6. Caracterización de una pectina metilesterasa (PME) del polen de olivo

La clonación de una pectina metilesterasa (PME) del polen se llevó a cabo mediante una estrategia de RT-PCR (protocolo 3.2.22). A partir del alineamiento múltiple de varias secuencias nucleotídicas de PMEs de plantas, se diseñaron cebadores degenerados (Material y Métodos, Tabla 3.17) con los cuales se amplificó un fragmento de unos 250 pb de la zona central del ADNc. A partir de esta secuencia, se diseñaron cebadores específicos (Tabla 3.17) con los cuales se amplificaron los extremos 5' y 3' del ADNc de la PME de *Olea europaea* mediante la técnica de RACE (protocolo 3.2.22.4).

##### 4.6.1. Clonación de una PME del polen de olivo

Mediante la estrategia descrita anteriormente se amplificaron dos fragmentos solapantes de 600 pb (extremo 5') y 800 pb (extremo 3'), a partir de los cuales se reconstruyó la secuencia completa del ADNc de la PME (Figura 4.45).



**Figura 4.45.** Fragmentos de ADNc de la PME del polen de olivo obtenidos mediante RACE 5' y 3'. Los fragmentos de ADN fueron separados en un gel de agarosa y visualizados mediante tinción con GelRed (protocolo 3.2.22.5).

Ambos fragmentos se secuenciaron (protocolo 3.2.22.8) y mediante análisis *in silico* (protocolo 3.2.22.9) se reconstruyó la secuencia nucleotídica completa del ADNc de la PME del polen de olivo, formada por 1095 pares de bases (Figura 4.46).

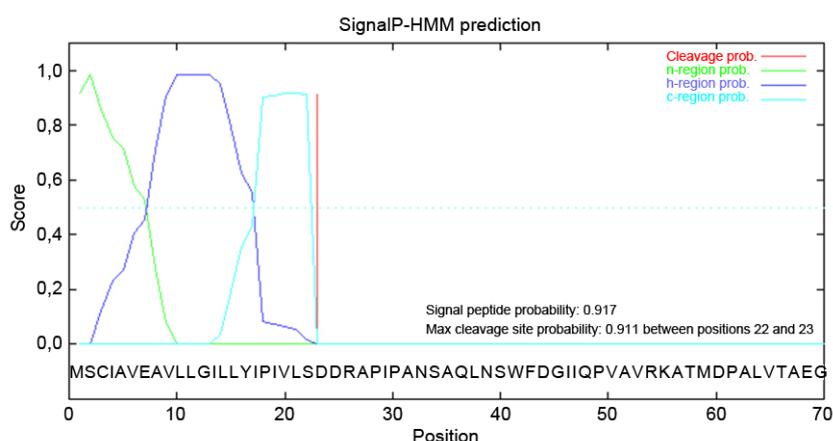
```

ATGTCTTGTATTGCCGTGGAGGCAGTTCTATTGGGCATTCTTCTGTACATCCCCATTGTACTTTCTGATGATAGA 75
1  M S C I A V E A V L L G I L L Y I P I V L S D D R
  GCACCTATTCCAGCAAATAGTGCTCAATTTAAACAGTTGGTTTGTATGGCATTATTCAACCAGTAGCTGTTCCGGAAA 150
26  A P I P A N S A Q L N S W F D G I I Q P V A V R K
  GCAACCATGGACCCGGCCTTAGTCACCGGGAGGGCAAGCCAAGGTGATAAAATGAAAAGCGATGGAAGTGGC 225
51  A T M D P A L V T A E G Q A K V I K L K S D G S G
  GATTTCAAGTCGATCAATGAAGCGATAAAAAGCATTCCCGATGACAATACTAAAAGAGTCATTTTATCGTTTGC 300
76  D F K S I N E A I K S I P D D N T K R V I L S F S
  CCTGGAAACTATAGCGAGAAAGTCAAGATTGGAATGTATAAACTATATCACCTTCTATGGGGAAGATCCAAAT 375
101 P G N Y S E K V K I G M Y K H Y I T F Y G E D P N
  AACATGCCAATTTCTGGTGTGGTGGAAACAGCAACAGAATATGGAAGTGTGGATAGTCCACCCCTCATCGTGGAA 450
126 N M P I L V F G G T A A E Y G T V D S A T L I V E
  TCAAATTAATTCAGTGCCGTTAATTTGAAAATTTGTAATTTCTGCGCCGAGGCCTGATGGTAAAAGGGTTGGAGCT 525
151 S N Y F S A V N L K I V N S A P R P D G K R V G A
  CAGGCAGCAGCATTGAGAATAAGTGGAGACAAGGCATCTTCTATAATGTCAAATTTATGGATTTCAAGATACT 600
176 Q A A A L R I S G D K A S F Y N V K I Y G F Q D T
  CTTTGTGATGACAAGGAAAAACATTTCTATAAAGACTGTATATTTGAAGGCACTGTTGATTTTCTATCTTTGGCAGT 675
201 L C D D K G K H F Y K D C Y I E G T V D F I F G S
  GGCAATCCATCTTTCTGAACACGGAGTTACATGCCGTCCCGGGGATCAGCCGGCAATCATCACTGCACAGGCA 750
226 G K S I F L N T E L H A V P G D Q P A I I T A Q A
  AGGAAAACCTGAATCGGAAGACACGGGATACTATTTGTGAAGTGCAGGGTGACAGGCGGCGGCCTTTTGGGC 825
251 R K T E S E D T G Y Y F V N C R V T G G G A F L G
  AGATCTGGATGCCTGCAGCTAAAGTGGTGTGGCTTACACTGAAATGGGTGATGCTATTACCCCTGAAGGATGG 900
276 R S W M P A A K V V F A Y T E M G D A I H P E G W
  ATCCTTGTA AACCTGAACACGAAAGCACGGTAAGGTTCCAGAGTATAACAATAAAGGACCTGGAGCGAACATG 975
301 I L V K P E H E S T V R F P E Y N N K G P G A N M
  GAAAAGCGAGCTAAATTCGTTAAGAGGCTATCTGATGCAGAAGCCAAACAATCCATTAGCCTTGGCTCTATAGAG 1050
326 E K R A K F V K R L S D A E A K Q S I S L G S I E
  GCTTCGAAGTGGCTGCTTCTCCTAGAGTCGTGGGCTACCGTAG 1095
345 A S K W L L P P R V V G L P
  
```

**Figura 4.46.** Secuencia nucleotídica (negro) y aminoacídica (rojo) de la PME del polen de olivo. En la primera, los codones de iniciación (ATG) y finalización (TAG) aparecen en negrita. En la segunda, los aminoácidos del centro activo aparecen en negrita (Q176, Q198, D199, D220), mientras que un sitio potencial de glicosilación (N103) aparece subrayado.



La secuencia nucleotídica obtenida codifica para un polipéptido de 364 aminoácidos, con una masa molecular teórica de 39,653 kDa y un punto isoeléctrico de 6,96. La secuencia aminoacídica muestra varios residuos (posiciones 182, 204, 205 y 226) que podrían corresponder al sitio activo del enzima y un posible sitio de N-glicosilación en la posición 103 (Figura 4.46). El análisis *in silico* de la secuencia aminoacídica mediante el algoritmo SignalP muestra la probable existencia (probabilidad: 91,7%) de un péptido señal en la PME de olivo, con un sitio probable de corte entre las posiciones 22S y 23D (Figura 4.47).



**Figura 4.47.** Predicción de la existencia de un péptido señal en la secuencia aminoacídica de la PME del polen olivo mediante el algoritmo SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

Por otro lado, la secuencia aminoacídica de la PME de olivo también contiene varios residuos de Ser (S), Thr (T) y Tyr (Y) susceptibles de ser fosforilados por enzimas quinasas (Figura 4.48).

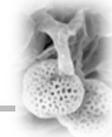
```

MSCIAVEAVLLGILLYIPIVLSDDRAPIPANSAQLNSWFDGIIQPVAVRKATMDP 55
ALVTAEGQAKVIKLSDGSGDFKSINEAIKSIIPDDNTRVILSFSFGNYSEKVKI 110
GMYKHYITFYGEDPNNMPLVFGGTAAEYGTVDSATLIVESESNYFSAVNLKIVNSA 165
PRPDGKRVGQAALRISGDKASFYNVKIYGFQDTLCDDKGGKHFYKDCYIEGTVD 220
FIFGSGKSI FLNTELHAVPGDQPAIITAQARKTESEDTGYFVNCRVTTGGGAFLG 275
RSWMPAAKVVFAYTEMGDAIHPEGWILVKPEHESTVRFPEYNNKGPANMEKRAK 330
FVKRLSDAEAKQSISLSIEASKWLLPPRVVGLP 364

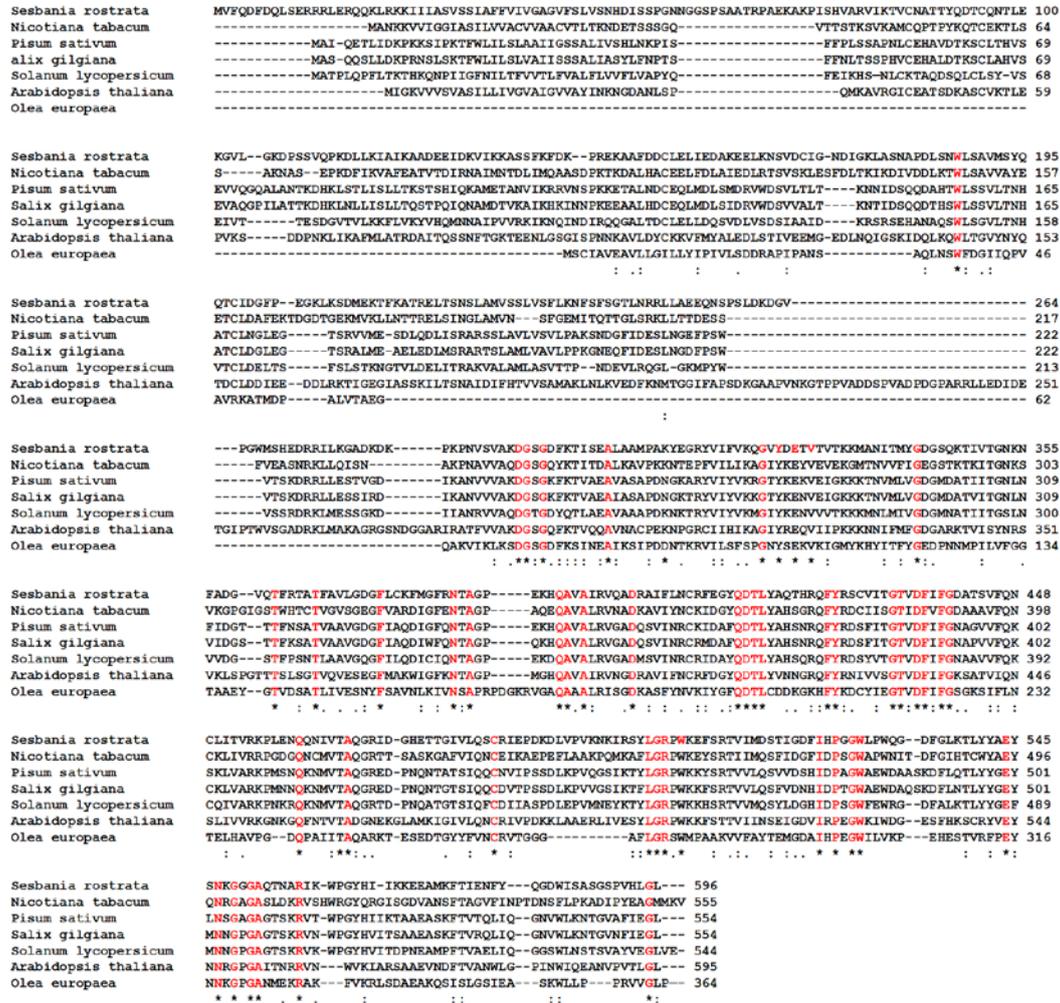
```

**Figura 4.48.** Predicción de la existencia de sitios de fosforilación (en rojo) en la secuencia aminoacídica de la PME del polen de olivo, mediante el algoritmo PlantPhos (<http://csb.cse.yzu.edu.tw/PlantPhos>).

El alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de la PME de olivo con otras PMEs de plantas mostró una elevada homología (Figura 4.49),

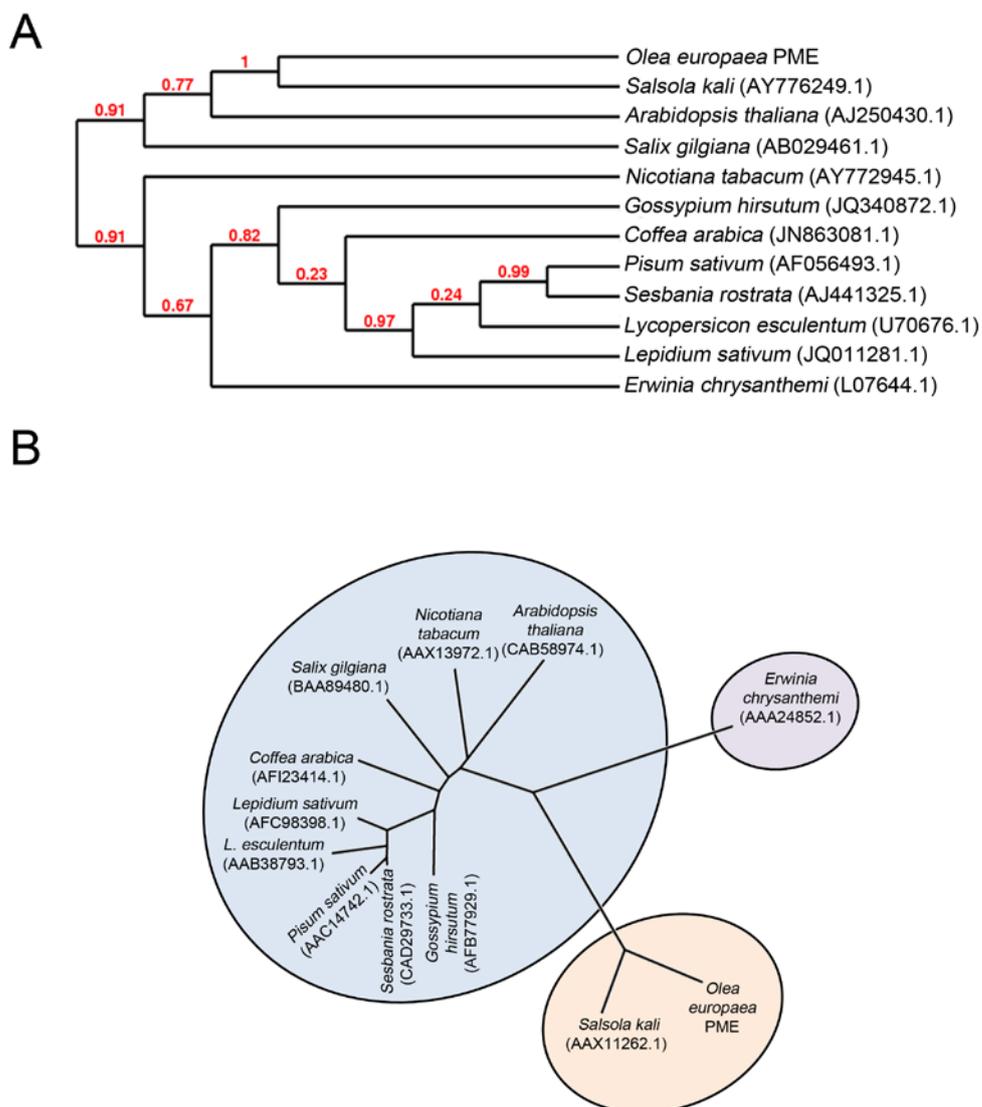


que varía entre el 79% de *Solanum lycopersicum* (número de acceso= AAB38793.1) y *Arabidopsis thaliana* (CAB58974.1), y el 85% de *Salix gilgiana* (BAA89480.1).



**Figura 4.49.** Alineamiento múltiple de las secuencias aminoácidas de PMEs de *Sesbania rostrata* (CAD29733.1), *Nicotiana tabacum* (AAX13972.1), *Pisum sativum* (AAC14742.1), *Salix gilgiana* (BAA89480.1), *Solanum lycopersicum* (AAB38793.1) y *Arabidopsis thaliana* (CAB58974.1). En rojo aparecen los aminoácidos conservados en todas las secuencias.

Los alineamientos de las secuencias nucleotídicas y aminoácidas fueron utilizados para la generación de árboles filogenéticos mediante el programa Phylogeny ([www.phylogeny.fr](http://www.phylogeny.fr)). El análisis filogenético permitió agrupar las distintas secuencias en tres “clusters” y diferenciar la PME de una bacteria como *Erwinia chrysanthemi* (L07644.1) de las PMEs de plantas (Figura 4.50). La PME del polen de olivo se agrupa con una PME de *Salsola kali* (AY776249.1) y se diferencia claramente del resto de PMEs de plantas.



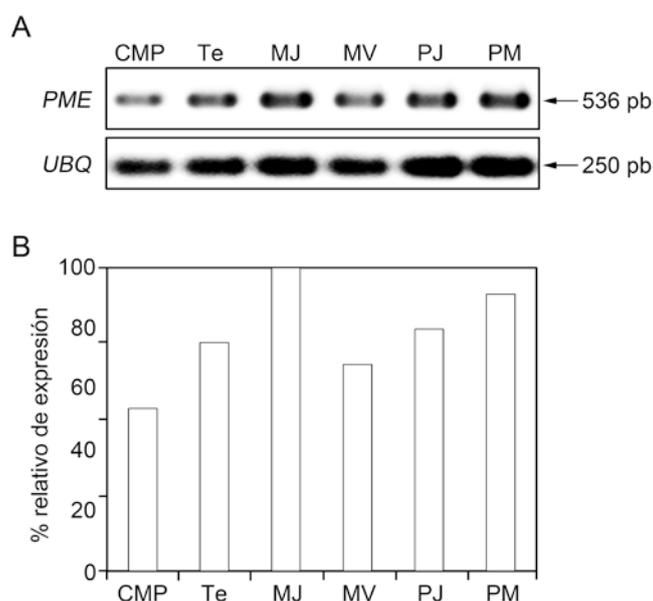
**Figura 4.50.** Análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas (A) y aminoacídicas (B) de PMEs de plantas. Junto al nombre de la especie, aparece el número de acceso.

#### 4.6.2. Análisis de expresión de la PME durante la ontogenia del polen

Una vez clonada la PME del polen de olivo, se llevaron a cabo análisis de expresión a nivel de los transcritos y de la proteína. El análisis de expresión de los transcritos durante la ontogenia del polen en la antera se evaluó mediante ensayos de RT-PCR semi-cuantitativa utilizando cebadores específicos (protocolo 3.2.23.1). Los resultados de la amplificación revelaron la presencia de una única banda de 536 pb, correspondiente a un fragmento de la PME del polen de olivo (Figura 4.51A). En paralelo, se amplificó un fragmento de 250 pb de la ubiquitina (UBQ) del polen de olivo. Mediante análisis de

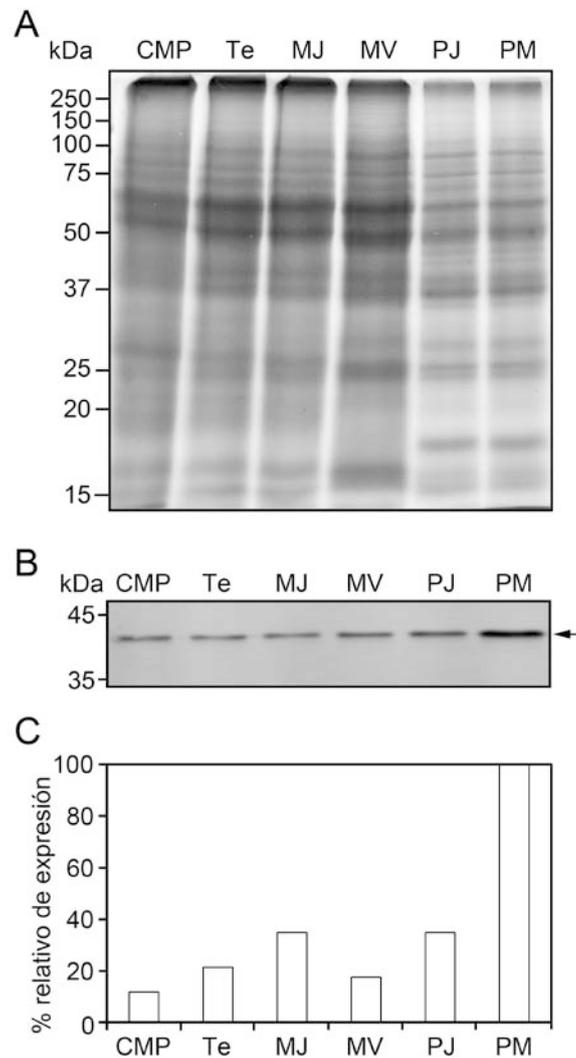


densitometría se cuantificaron los niveles de expresión de la PME en cada estadio de desarrollo de la antera (Figura 4.51B). Los datos densitométricos de expresión de la PME se normalizaron con respecto al control interno (UBQ) y se expresaron como porcentaje relativo respecto al valor mayor (MJ, 100%). Se observó que el patrón de expresión de la PME del polen varía significativamente durante el desarrollo, detectándose dos picos de expresión en los estadios de tétrada-microspora joven y polen maduro.



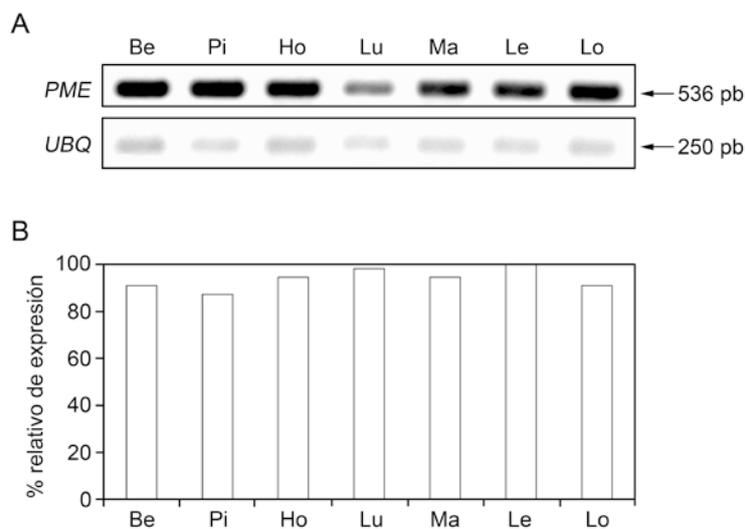
**Figura 4.51.** **A)** Análisis de expresión mediante RT-PCR de la PME y la ubiquitina del polen de olivo durante el desarrollo de la antera. **B)** Cuantificación de los niveles de transcritos mediante densitometría a partir de las bandas de la figura 4.51A. CMP, célula madre del polen; Te, tétrada; MJ, microspora joven; MV, microspora vacuolada; PJ, polen joven; PM, polen maduro.

En paralelo, se llevaron a cabo estudios de expresión a nivel de la proteína mediante Western blot (protocolo 3.2.23.2), utilizando para ello un anticuerpo anti-PME específico. Los resultados mostraron la presencia de una única banda proteica de unos 40 kDa de peso molecular (Figura 4.52B). El perfil de expresión de la proteína PME se correlaciona muy bien con el patrón de expresión de los transcritos, observándose dos picos de síntesis en los estadios de tétrada-microspora joven y polen maduro (Figura 4.52C).



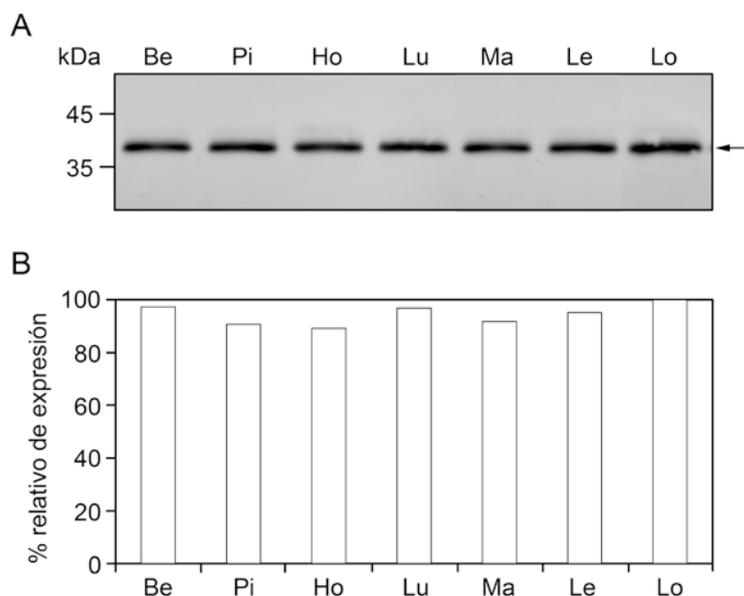
**Figura 4.52.** Análisis de expresión de la proteína PME del polen de olivo durante el desarrollo de la antera. **A)** Perfil proteico del polen en los distintos estadios de su desarrollo. Los marcadores proteicos (kDa) se muestran a la izquierda de la figura. **B)** Análisis de expresión de la PME del polen de olivo mediante Western blot, utilizando un Ac anti-PME específico. **C)** Cuantificación de los niveles de expresión de la proteína mediante densitometría a partir de las bandas proteicas de la figura 4.52B. CMP, célula madre del polen; Te, tétrada; MJ, microspora joven; MV, microspora vacuolada; PJ, polen joven; PM, polen maduro.

Los niveles de transcritos de la PME fueron similares en el polen de distintas variedades, con valores de expresión relativa que oscilaron entre el 87% del cultivar Picual y el 100% de la variedad Lechín de Granada (Figura 4.53).



**Figura 4.53.** A) Análisis de expresión mediante RT-PCR de la enzima PME y la ubiquitina en el polen maduro de distintos cultivares de olivo. B) Cuantificación de los niveles de transcritos mediante densitometría a partir de las bandas de la figura 4.53A. Be, Bella de España; Pi, Picual; Ho, Hojiblanca; Lu, Lucio; Ma, Manzanilla de Sevilla; Le, Lechín de Granada; Lo, Loaime.

Los niveles de la proteína fueron también muy parecidos en el polen de las distintas variedades (Figura 4.54A, flecha), con valores de expresión relativa que oscilan entre el 90% de Hojiblanca y el 100% de Lechín (Figura 4.54B).

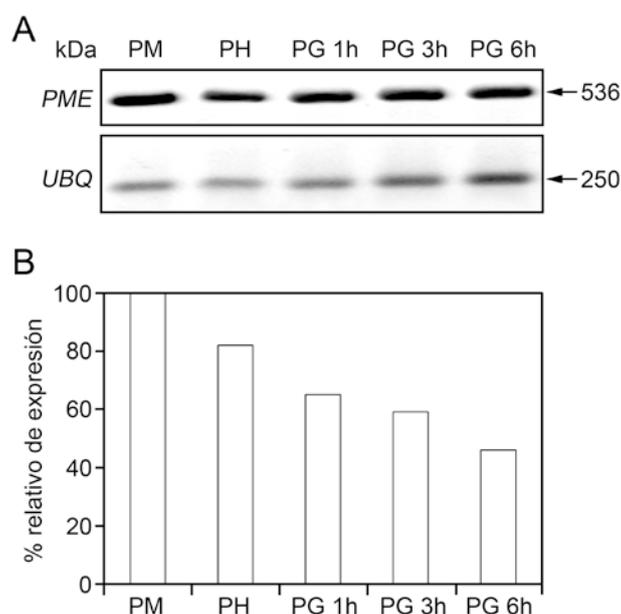


**Figura 4.54.** A) Análisis de expresión mediante Western blot de la PME del polen de distintos cultivares de olivo. B) Cuantificación de los niveles de proteína mediante densitometría a partir de las bandas de la figura 4.54A. Be, Bella de España; Pi, Picual; Ho, Hojiblanca; Lu, Lucio; Ma, Manzanilla de Sevilla; Le, Lechín de Granada; Lo, Loaime.



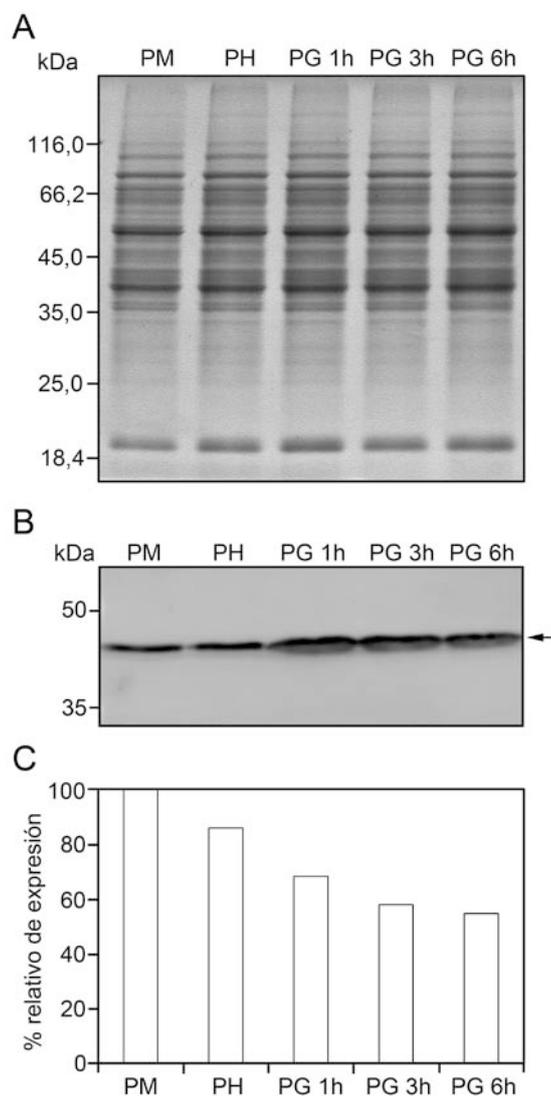
### 4.6.3. Análisis de expresión de la PME durante la germinación del polen

Se realizaron estudios de expresión de la PME durante la germinación *in vitro* del polen. A nivel de transcritos, se amplificó mediante RT-PCR un fragmento de 536 pb de la PME de olivo (Figura 4.55A). El patrón de expresión génica mostró una disminución progresiva de los niveles de transcritos durante el proceso de germinación y elongación del tubo polínico (Figura 4.55B).



**Figura 4.55.** **A)** Análisis de expresión mediante RT-PCR de la PME y la ubiquitina durante la germinación *in vitro* del polen de olivo. **B)** Cuantificación de los niveles de transcritos mediante densitometría a partir de las bandas de la figura 4.55A. PM, polen maduro; PH, polen hidratado; PG 1h, polen germinado durante 1 h; PG 3h, polen germinado durante 3 h; PG 6h, polen germinado durante 6 h.

En paralelo, se realizaron, estudios de expresión de la proteína mediante Western blot, utilizando un anticuerpo anti-PME específico (Figura 4.56). Los resultados obtenidos mostraron una única banda proteica con un peso molecular de unos 40 kDa (Figura 4.56B, flecha). Los niveles de proteína son más elevados en el polen maduro y disminuyen de forma significativa y progresiva a medida que transcurre la germinación y el crecimiento del tubo polínico (Figura 4.56C).



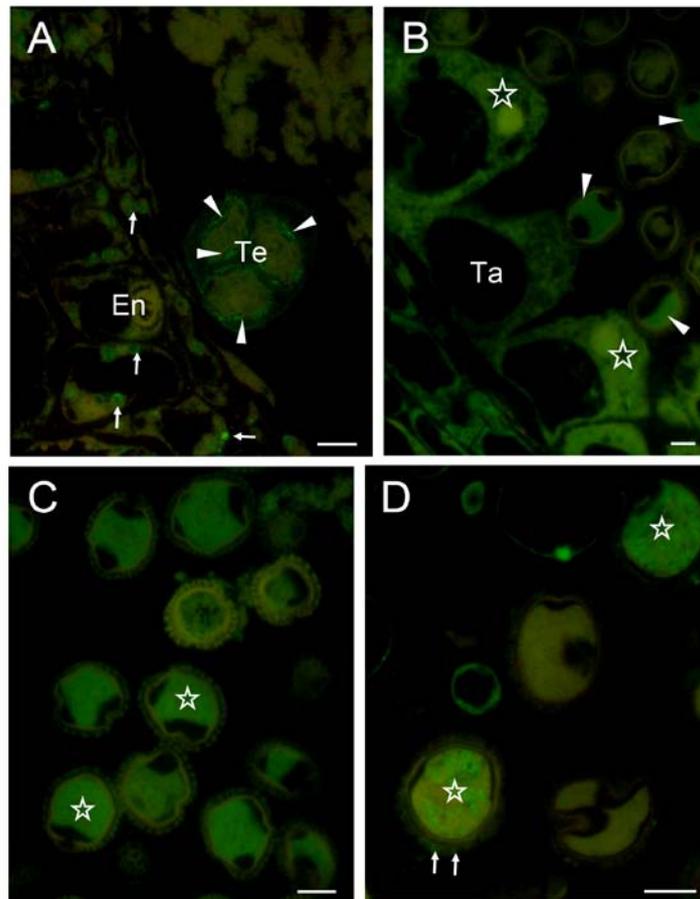
**Figura 4.56.** A) Perfil proteico del polen en los distintos estadios de la germinación *in vitro*. Los marcadores proteicos (kDa) se muestran a la izquierda de la figura. B) Análisis de expresión de la proteína PME del polen de olivo durante la germinación *in vitro*. C) Cuantificación de los niveles de expresión de la proteína mediante densitometría a partir de las bandas proteicas de la figura 4.56B. PM, polen maduro; PH, polen hidratado; PG 1h, polen germinado durante 1 h; PG 3h, polen germinado durante 3 h; PG 6h, polen germinado durante 6 h.

#### 4.6.4. Localización celular de la PME en el polen y el tubo polínico

La localización celular de la PME se realizó, en primer lugar, mediante microscopía óptica de fluorescencia a partir de secciones de anteras de olivo en diferentes etapas del desarrollo (protocolo 3.2.24.1). Los resultados obtenidos muestran la presencia de marcado fluorescente a partir del estadio de tétrada (Figuras 4.57 A, cabezas de flecha). Además, se observó la presencia de señal

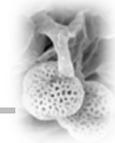


fluorescente en los tejidos esporofíticos de la antera (flechas). En el estadio de microspora, la PME se localizó en el citoplasma de la microspora (Figura 4.57B, cabezas de flecha), y también se observó un intenso marcado en el *tapetum* (Figura 4.57B, asteriscos). En el polen bicelular, la proteína se localizó en el citoplasma de la célula vegetativa (Figura 4.57C-D, asteriscos) y en la pared celular (Figura 4.57D, flechas).

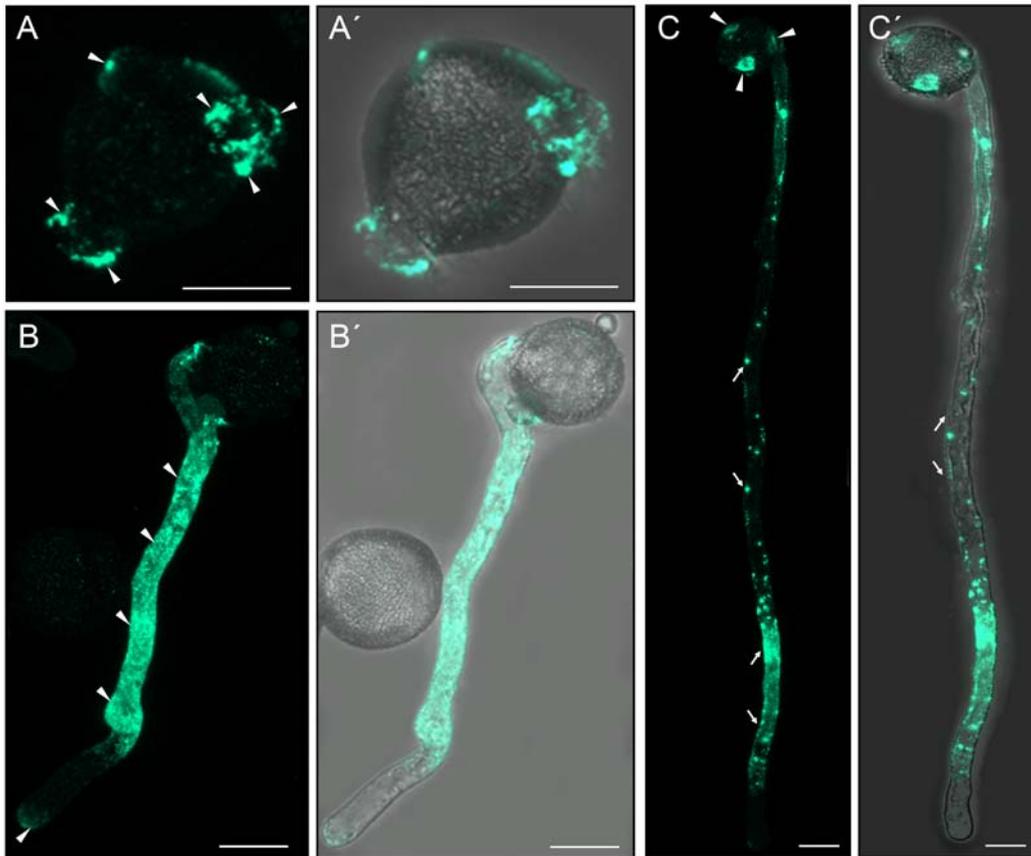


**Figura 4.57.** Inmunolocalización a microscopía de fluorescencia de la PME en secciones de anteras de olivo durante el estadio de tétrada (A), microspora joven (B), polen joven (C) y polen maduro (D). En, endotecio; Te, tétrada; Ta, tapetum. Barras= 10  $\mu$ m.

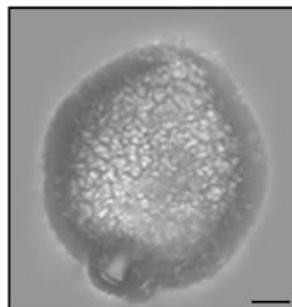
A continuación, se llevó a cabo la localización de la PME en el polen durante la germinación *in vitro* mediante microscopía de barrido láser confocal (protocolo 3.2.24.2). En el polen hidratado, la PME mostró una localización específica en las tres aperturas del grano (Figura 4.58A-A'). Después de la germinación, la señal fluorescente se localizó en el citoplasma a lo largo del tubo polínico, con excepción de la región subapical (Figura 4.58B-B'). La señal fluorescente del tubo polínico desaparece a medida que el cultivo progresa en



el tiempo y queda restringida a una porción adyacente a la zona subapical, y al ápice del tubo polínico. No se observó señal en el control negativo (Figura 4.59).



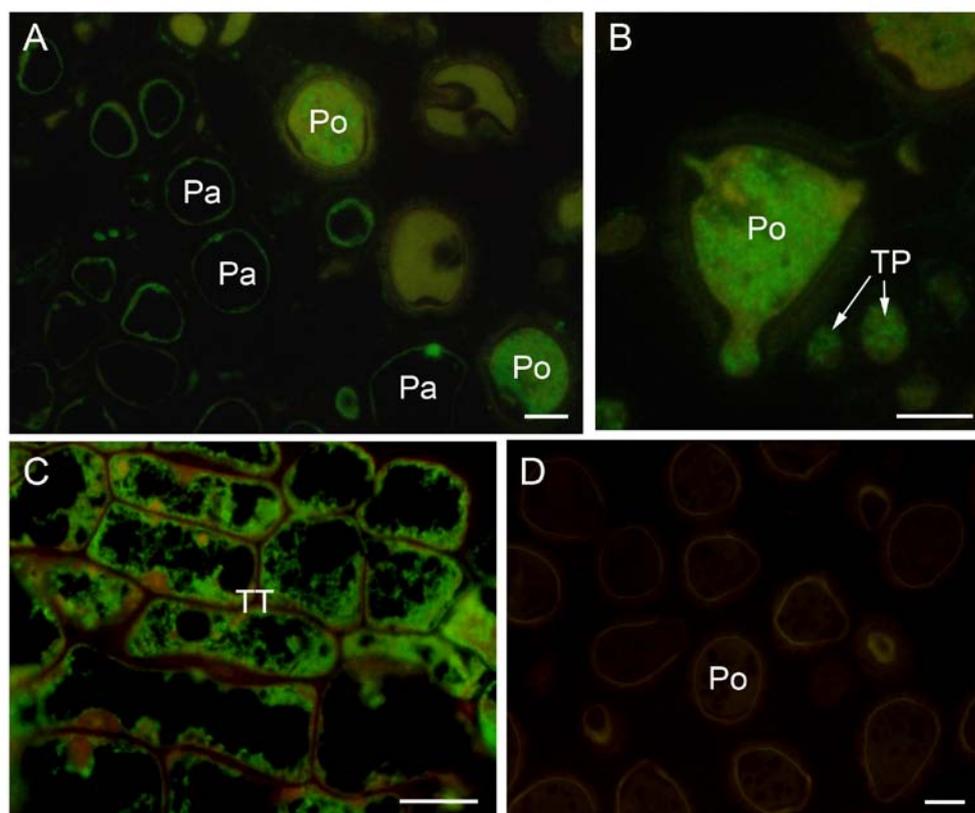
**Figura 4.58.** Inmunolocalización a microscopía láser confocal de la PME del polen durante la germinación *in vitro*. **A-A')** Reconstrucción 3-D de un grano de polen hidratado. **B-B')** Reconstrucción 3-D de un grano de polen germinado tras 1 h de cultivo. **C-C')** Reconstrucción 3-D de un grano de polen germinado tras 1 h de cultivo.



**Figura 4.59.** Control negativo de la localización a microscopía láser confocal de la PME en el polen maduro de olivo. Barra= 5  $\mu$ m.

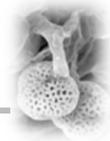


De forma complementaria, se llevó a cabo mediante microscopía de fluorescencia la localización de la PME en el polen durante la germinación *in vivo* en el estigma, a partir de secciones de pistilos polinizados. Los resultados confirmaron la localización celular observada en el polen germinado *in vitro*. Así, la señal fluorescente se localizó en el citoplasma de la célula vegetativa y la pared del polen, y el citoplasma del tubo polínico (Figura 4.60A-B). Además, se observó señal en el citoplasma de las papilas del estigma (Figura 4.60A) y en el citoplasma de las células del tejido transmisor del estilo (Figura 4.60C). El control negativo no mostró marcado (Figura 4.60D).

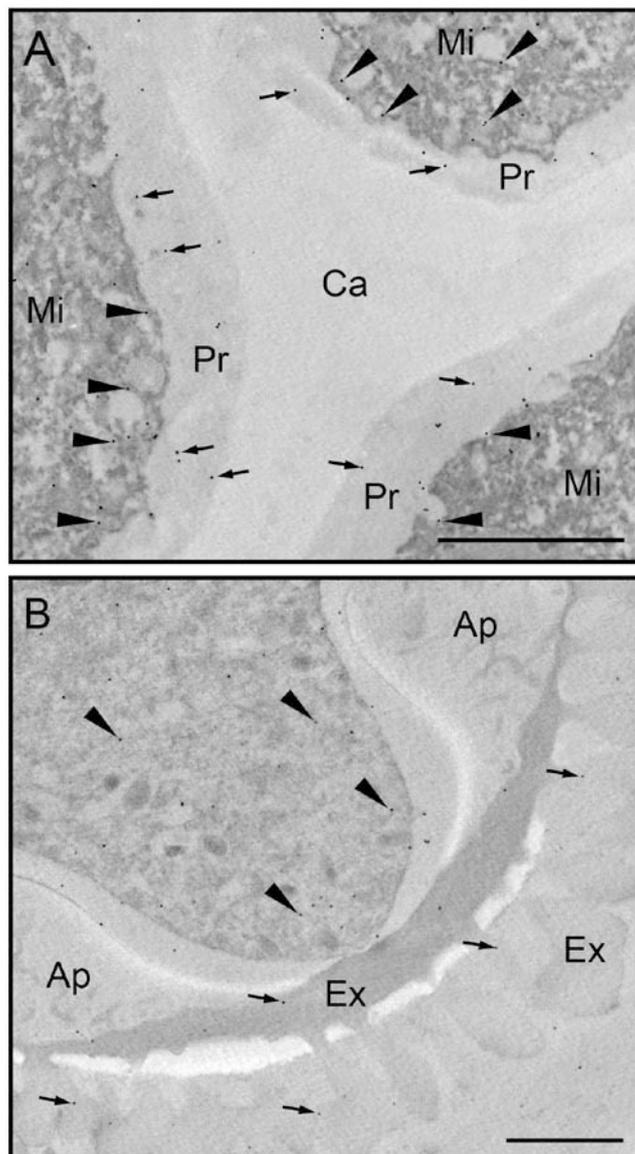


**Figura 4.60.** Inmunolocalización a microscopía de fluorescencia de la PME en secciones de pistilos polinizados. **A)** Sección longitudinal de un estigma polinizado. **B)** Sección de un grano de polen germinado sobre el estigma visto a mayor aumento. **C)** Sección longitudinal del tejido transmisor del estilo. **D)** Control negativo sin el anticuerpo primario. Pa, papila; Po, polen; TP, tubo polínico; TT, tejido transmisor. Barras= 10  $\mu$ m.

Finalmente, se realizaron estudios de inmunolocalización de la proteína PME durante el desarrollo del polen, mediante microscopía electrónica de transmisión (protocolo 3.2.24.3), con objeto de obtener información más precisa sobre la localización a nivel ultraestructural de la proteína. En el



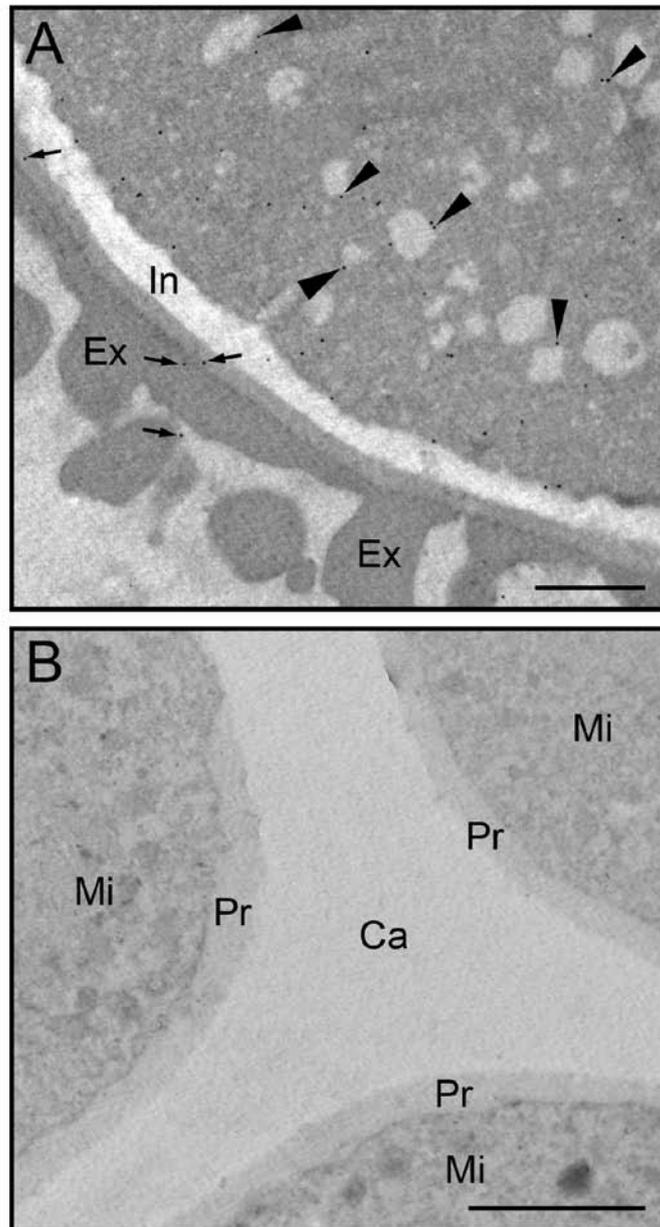
estadio de tétrada, la PME aparece localizada en el citoplasma de las microsporas, asociada a la superficie de pequeñas vesículas de secreción, las cuales se fusionan con la membrana plasmática (Figura 4.61A, cabezas de flecha). También se observó marcado con oro en la primexina (flechas), mientras que la calosa no mostró ninguna señal. En el estadio de microspora, la proteína se localiza en el citoplasma (Figura 4.61B, cabezas de flecha) y en la exina de la pared celular (Figura 4.61B, flechas), pero no se observó marcado en las aperturas.



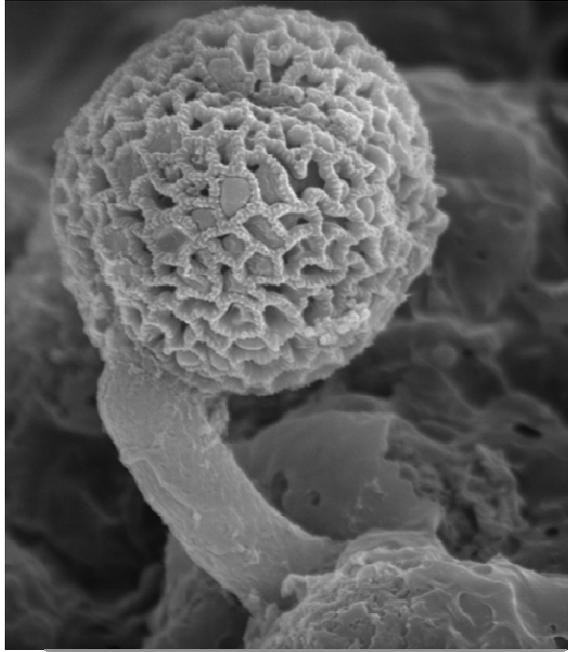
**Figura 4.61.** Localización ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión de la proteína PME en la tétrada (A) y la microspora (B) de olivo. Ap, apertura; Ca, calosa; Ex, exina; Mi, microspora; Pr, primexina. Barras= 1  $\mu$ m.



En el polen bicelular maduro, el marcado con oro se observó en el citoplasma de la célula vegetativa, frecuentemente asociado a cisternas del retículo endoplasmático (Figura 4.62A, cabezas de flecha), y en la exina (Figura 4.62A flechas), pero no en la intina. Tampoco se detectó marcado con oro en el control negativo (Figura 4.62B).



**Figura 4.62.** A) Localización ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión de la proteína PME en el polen bicelular maduro. B) Control negativo sin el anticuerpo primario. Ca, calosa; Ex, exina; In, intina, Mi, microspora; Pr, primexina. Barras= 1  $\mu$ m.



## **DISCUSIÓN**

“La frase más excitante que se puede oír en ciencia, la que anuncia nuevos descubrimientos, no es ¡Eureka! si no ¡es extraño...!”

Isaac Asimov





### 5.1. El polen de olivo contiene numerosas enzimas esterasas implicadas en la germinación

Las esterasas son un grupo de enzimas hidrolíticas ubicuas, codificadas por familias multigénicas múltiples, que poseen una amplia especificidad de sustratos. Cuando el sustrato del enzima es un éster de cadena simple (ej. acetato de naftilo), ésta se denomina de forma genérica esterasa no específica (NE). No obstante, muchas esterasas específicas son también capaces de hidrolizar ésteres simples, lo que añade confusión y hace difícil su clasificación. La presencia de actividad esterasa NE en el polen y el estigma fue descrita por primera vez en los años 70 (Heslop-Harrison 1975; Vithanage y Knox 1976). Posteriormente, se han identificado y caracterizado a nivel bioquímico un número reducido de enzimas NE con capacidad esterolítica, principalmente en plantas que poseen un estigma seco como es el caso de *Brassica* (Lavithis y Bhalla 1995, Hiscock *et al.* 2002), *Arabidopsis* (Mayfield *et al.* 2001) y girasol (Shakya y Bhatla 2010).

Este trabajo de tesis doctoral constituye el primer estudio en el que se realiza una clasificación sistemática funcional de las enzimas esterasas NE presentes en el grano de polen de una planta con estigma de tipo húmedo, como es el olivo. De acuerdo a los resultados obtenidos, el polen maduro de olivo contiene al menos 14 enzimas esterasas NE con capacidad para hidrolizar ésteres simples no específicos. Este número de enzimas es mayor que el número de esterasas identificadas en el polen de plantas con estigma seco, y es similar al número de enzimas esterasas presentes en otros tejidos vegetales, tales como las hojas, en especies como *Manihot esculenta* (Pereira *et al.* 2001), *Aspidosperma polyneuron* (de Carvalho *et al.* 2003) y *Vitis vinifera* (Ribeiro-Orasmo *et al.* 2007). Dado que la clasificación funcional de las esterasas en plantas ha sido poco estudiada, se desconoce el número total de esterasas vegetales, pero cabe esperar que su número se incremente notablemente en la medida en que otras especies y órganos/tejidos sean caracterizados.

La clasificación funcional de las esterasas NE se basa principalmente en su comportamiento en presencia de tres tipos de inhibidores: carbamatos, organofosfatos (OPs) y compuestos sulfidriilo. En base a este criterio, podemos clasificar las esterasas NE en tres grandes grupos (Holmes y Masters 1967). Las enzimas carboxilesterasas (EC 3.1.1.1) son inhibidas únicamente por la acción de OPs. Las arilesterasas (EC 3.1.1.2) ven afectadas su actividad enzimática en presencia de compuestos sulfidriilo. Finalmente, las acetilesterasas no son sensibles a ninguno de estos inhibidores. Algunas esterasas específicas como las colinesterasas (EC 3.1.1.7, ChE) y acetilcolinesterasas (EC 3.1.1.8, AChE) son inhibidas por OPs. No obstante, a diferencia de las esterasas NE, la actividad de



las enzimas ChE y AChE se ve negativamente afectada en presencia de carbamatos. En base a estos criterios, las esterasas identificadas en el polen del olivo fueron clasificadas en tres grandes grupos funcionales: carboxilesterasas (2 enzimas), acetylesterasas (6 enzimas) y acetilcolinesterasas (6 enzimas). No se detectó actividad arilesterasa en el polen.

Un primer grupo de las enzimas esterasas NE identificadas está constituido por dos enzimas carboxilesterasas de 25,7 kDa y 32,8 kDa. El número de enzimas carboxilesterasas en el olivo es bajo en comparación con otras especies. Por ejemplo, en *Brassica* se han identificado hasta siete carboxilesterasas diferentes entre el estigma y el grano de polen (Hiscock *et al.* 1994; Hiscock *et al.* 2002), mientras que en el polen de girasol se detectaron cinco isoformas (Shakya and Bhatla 2010). Entre las enzimas carboxilesterasas del polen de *Brassica*, destaca la presencia de una proteína de 22 kDa de peso molecular, con capacidad para hidrolizar los polímeros de cutina presentes en la cutícula impermeable que recubre de forma continua la superficie del estigma (Hiscock *et al.* 1994). Ensayos de inhibición *in vivo* han demostrado que estas enzimas son necesarias para la penetración del tubo polínico a través de las papilas estigmáticas (Hiscock *et al.* 2002). En el caso de las carboxilesterasas identificadas en el olivo, es poco probable que sean enzimas cutinasas homólogas a las descritas en *Brassica*, dado que la superficie del estigma no está cuticularizada (Serrano *et al.* 2008; Suárez *et al.* 2012). El patrón de localización subcelular de la actividad esterasa NE en el grano de polen y en el tubo polínico del olivo es similar al descrito por Bednarska (1992) en *Vicia faba*. Los datos de localización subcelular sugieren que la intina del grano de polen es el lugar donde se acumulan las enzimas esterolíticas que son liberadas posteriormente cuando el polen entra en contacto con la superficie del estigma (Hiscock *et al.* 1994). Los ensayos de inhibición mostraron que la capacidad de germinación *in vitro* del polen de olivo se ve seriamente afectada en presencia de inhibidores específicos (DIFP y PMSF) de las enzimas carboxilesterasas. Además, en aquellos granos capaces de germinar, la tasa de elongación del tubo polínico disminuyó significativamente. Estos datos sugieren que, además de su función en la penetración del tubo polínico a través de la cutícula, tal y como se ha demostrado en *Brassica* (Hiscock *et al.* 2002), las enzimas carboxilesterasas del polen podrían tener una función importante en la germinación y el propio crecimiento del tubo polínico.

Un segundo grupo de enzimas esterasa NE comprende a seis acetilesterasas. Estas enzimas fueron previamente identificadas en hojas y frutos (Nielsen *et al.* 2002; Orasmo *et al.* 2007), así como en tejidos reproductivos, como por ejemplo el *tapetum* de la antera y el polen de *Citrus aurantifolia* (Nielsen *et al.* 2002). Durante la polinización, la actividad



acetilesterasa se localiza en el polen y en las papilas del estigma. Algunos residuos de GalA de los compuestos pécticos que forman la pared celular están O-acetilados en el grupo hiroxilo del C2 o C3 (Perrone *et al.* 2002; Ralet *et al.* 2008). Recientemente, se ha caracterizado funcionalmente una acetilesterasa (PtPAE1) de *Populus trichocarpa* en tabaco (Gou *et al.* 2012). La sobreexpresión del gen que codifica esta enzima altera el desarrollo del polen en la antera y disminuye la tasa de germinación y crecimiento del tubo polínico hasta el punto de originar una esterilidad masculina severa. Es posible que alguna de las acetilesterasas identificadas en el polen de olivo pudiera tener una función similar aunque se necesitan datos empíricos adicionales que prueben esta hipótesis.

El tercer grupo de enzimas esterasas identificado está constituido por 6 acetilcolinesterasas (AChE). Como es de esperar, estas enzimas son completamente inhibidas por OPs y carbamatos (Sagane *et al.* 2005). Las acetilcolinesterasas son responsables de la degradación de la acetilcolina (ACh). Los neurotransmisores como la ACh se asocian tradicionalmente a funciones de señalización rápida y a larga distancia en animales. No obstante, las plantas también llevan a cabo procesos de señalización rápida y a larga distancia mediante acciones de potencial clásico que tienen repercusión sobre distintos procesos fisiológicos (Baluška *et al.* 2005; Brenner *et al.* 2006). Además de la existencia de transmisores específicos como auxinas (Baluška *et al.* 2004) y oligogalacturónidos (OGAs) (Ridley *et al.* 2001), las plantas también poseen algunos neurotransmisores clásicos como la acetilcolina (ACh) (Ođjakova y Hadjiivanova 1997; Roshchina 2001; Horiuchi *et al.* 2003) y el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (Palanivelu *et al.* 2003). Estas moléculas se sintetizan rápidamente en los tejidos somáticos vegetales en respuesta a diversos estímulos, tales como la exposición a bajas y altas temperaturas, la hipoxia, la acidificación del citoplasma, el estrés hídrico y diversas fitohormonas (Snedden y Fromm 1999; Kinnnersley y Turano 2000). Además, intervienen en varios procesos fisiológicos, entre los que se incluyen la regulación del pH, el balance C/N, la fotosíntesis, la defensa frente a patógenos, la regulación osmótica y el desarrollo entre otros (Wessler *et al.* 2001; Beuve *et al.* 2004; Bouché y Fromm 2004). La existencia de actividad colinesterasa en el polen maduro fue descrita por primera vez por Bednarska (1992) en *Vicia faba* por medio de técnicas histoquímicas. Los resultados de localización de la actividad AChE en el polen de olivo son similares a los descritos en *Vicia faba*. La actividad AChE se localiza principalmente sobre la superficie de la exina de la pared celular del grano de polen. Además, los datos obtenidos sugieren que las acetilcolinesterasas del polen de olivo podrían tener un doble origen, esporofítico y gametofítico. Esta hipótesis se sustenta en la presencia de



actividad AChE en los restos de *tapetum* de la antera, que se depositan sobre la superficie de la pared del polen y rellenan las cavidades u orbículos de las báculas de la exina, formando el “pollen coat”. Durante la germinación, la localización ultraestructural de la actividad AChE en el tubo polínico sugiere que la enzima es secretada por exocitosis al espacio extracelular a través de la vía RE/Golgi. A nivel bioquímico, en este trabajo de tesis doctoral se ha identificado por primera vez el número de isoformas de la enzima AChE presentes en el polen maduro de una planta. Los pesos moleculares de las AChEs son similares a los descritos para otras AChEs de diferentes especies de plantas (Luppa y Andrä 1983). Estos resultados apoyan estudios previos en los que se demostró la existencia de actividad acetilcolinesterasa *in vitro* en homogenizados acuosos de anteras y polen de varias especies de plantas (Semenova y Roshchina 1993; Roshchina y Semenova 1994). Los ensayos de inhibición mostraron que la presencia de inhibidores específicos de AChE afecta negativamente a la capacidad de germinación del polen de olivo, pero no al crecimiento del tubo polínico. Existen evidencias que relacionan la presencia de neurotransmisores con la reproducción sexual de las Angiospermas (Palanivelu *et al.* 2003). En un trabajo reciente, Tezuka *et al.* (2007) analizaron el papel de la ACh y la AChE en la reproducción sexual de *Lilium longiflorum*. Dicha función estaría relacionada con la inducción de la elongación de los tubos polínicos en el pistilo tras la polinización auto-incompatible. Estos autores proponen que los niveles endógenos de la ACh en los pistilos pueden controlar la elongación de los tubos polínicos después de la polinización, por lo que los fenómenos de auto-incompatibilidad son el resultado de una disminución en la concentración de ACh. Por otra parte, la actividad acetilcolinesterasa en los pistilos y granos de polen autocompatibles es mayor que tras la polinización cruzada (Roshchina, 1991; Kovaleva y Roshchina 1997; Tezuka *et al.* 2007). Actualmente, no existen evidencias experimentales que demuestren que el mecanismo de actuación de las enzimas AChEs del polen de olivo sea similar al observado en el polen de *Lilium longiflorum*. No obstante, la localización extracelular de las AChEs en el polen de olivo sugiere que estas enzimas podrían poseer una función como agente transductor de señales entre el polen y el pistilo.

Finalmente, se identificó un grupo de 12 enzimas esterasas/lipasas en el polen de olivo, seis de las cuales fueron capaces también de hidrolizar ésteres no específicos, como por el ejemplo el acetato de  $\alpha$ -naftilo. Las lipasas han sido localizadas en la parte externa del grano de polen, formando parte del “pollen coat” (Mayfield *et al.* 2001; Shakya y Bhatla 2010). Sin embargo, no existe información sobre la localización celular de estas enzimas en el interior del grano de polen. En este trabajo, hemos observado la presencia de una intensa



actividad lipasa en el citoplasma de la célula vegetativa, asociado principalmente a la superficie de los cuerpos lipídicos (CLs). La biogénesis de estos orgánulos celulares tiene lugar durante el desarrollo del polen en la antera (Zienkiewicz *et al.* 2011). Durante la germinación del polen, los CLs se metabolizan y proveen al polen de la energía y los precursores de membrana necesarios para el crecimiento inicial del tubo polínico (Zienkiewicz *et al.* 2010). Se ha descrito que los triacilglicéridos (TAGs) almacenados en los cuerpos lipídicos de las semillas se hidrolizan a ácidos grasos libres y glicerol por la acción secuencial de una o más lipasas (Quettier y Eastmond 2009). Del mismo modo, cabría esperar que las lipasas que se localizan en la superficie de los CLs del polen de olivo pudieran estar implicadas en la hidrólisis de los TAGs durante la germinación del polen.

La superficie estigmática muestra también una fuerte actividad esterasa NE (Heslop-Harrison y Shivanna 1977; Lavithis y Bhalla 1995). En los estigmas secos, dicha actividad parece estar localizada en una fina película o capa proteica que recubre la parte más externa de la cutícula (Mattson *et al.* 1974; Heslop-Harrison *et al.* 1975; Knox *et al.* 1976). Recientemente, se han identificado varias serina esterases en el estigma de *Brassica* (Hiscock *et al.* 2002). En el caso de los estigmas húmedos, la actividad esterasa está asociada a la superficie estigmática, antes y después de la formación del exudado (Shivanna y Sastri 1981). La presencia de actividad esterasa en el estigma de olivo se puso de manifiesto mediante métodos histoquímicos. De forma similar al polen, se intentó determinar el número de enzimas esterases presentes en el estigma de olivo y llevar a cabo su clasificación funcional sin éxito. La extracción de proteínas en condiciones nativas dio lugar a perfiles con muy bajo contenido proteico en los geles de poliacrilamida. La adición de otros compuestos al tampón de extracción, tales como detergentes (ej. Triton X-100) y agentes caotrópicos (ej. urea) y reductores (ej. DTT), incrementó notablemente el número de proteínas en los extractos pero a costa de la pérdida irreversible de la actividad biológica de los mismos.

## 5.2. El perfil de actividades esterasa varía entre cultivares de olivo

La expansión del cultivo del olivo, su hibridación, selección de descendencia y clonación ha originado una gran diversidad de cultivares (Zohary y Spiegel Roy 1975). Tradicionalmente, la identificación de cultivares de olivo se ha basado en caracteres fenotípicos del árbol, del ramo, del fruto, de la hoja y de la inflorescencia, y mediante el uso de caracteres agronómicos (Ganino *et al.* 2006). No obstante, aunque efectivos, estos métodos presentan dificultades prácticas debido al efecto fluctuante que ejerce el medio ambiente sobre la expresión de la mayoría de los caracteres morfológicos analizados. Los



marcadores bioquímicos y moleculares apenas sí se ven afectados por el ambiente, y pueden ser fácilmente detectados en una gran variedad de tejidos de una manera sencilla y rápida. Los marcadores moleculares basados en el ADN, entre los que se incluyen los RAPDs, AFLPs, SCARs, SSTs y los microsátelites o ISSRs, se han utilizado con éxito en la identificación de variedades (Bogani *et al.* 1994; Fabbri *et al.* 1995; Díaz *et al.* 2006b; Ganino *et al.* 2007), la discriminación entre variedades cultivadas y silvestres (Besnard y Bervillé 2000; Belaj *et al.* 2001), y para estudiar las relaciones genéticas dentro del género *Olea* (Rallo *et al.* 2003), y entre especies de la familia Oleaceae (De la Rosa *et al.* 2002). En la actualidad, SSRs y AFLPs son los marcadores de ADN más utilizados (Trujillo *et al.* 2005).

Entre los marcadores bioquímicos, la caracterización de isoenzimas se ha aplicado con éxito para la discriminación de variedades de olivo (Pontikis *et al.* 1980, Ouazzani *et al.* 1993, Trujillo *et al.* 1995). Al analizar el perfil de actividades esterasa NE el polen de distintos cultivares se observó que la composición de enzimas esterasa varía cuantitativa y cualitativamente dependiendo del cultivar. El alto nivel de polimorfismo entre las enzimas esterases encontrado en nuestros estudios coincide con los resultados obtenidos en otros sistemas isoenzimáticos estudiados previamente en el olivo (Pontikis *et al.* 1980; Ouazzani *et al.* 1993; Trujillo y Rallo 1995) y en otras especies como la uva (Stavrakakis y Loukas 1983), la almendra (Hauagge *et al.* 1987) o la manzana (Weeden y Lamb 1985). La combinación de los perfiles de actividad esterasa NE permitió identificar 12 de las 13 variedades analizadas. Por lo tanto, este método puede ser útil para identificar cultivares en colecciones de germoplasma de olivo. El elevado polimorfismo enzimático detectado entre los 13 cultivares evaluados podría ser debido a la alta heterocigosidad observada en esta especie como consecuencia de su alogamia y de la incorporación de genes de acebuches a las formas de olivo cultivadas (Zohary y Roy Spiegel 1975).

Desde el punto de vista biológico, esta variabilidad enzimática podría tener efectos sobre la propia función del polen en la reproducción. Los estudios preliminares llevados a cabo en este trabajo muestran que los distintos cultivares tienen tasas de viabilidad y germinabilidad significativamente diferentes, aunque no se observó ninguna correlación con varios parámetros relacionados con las esterases NE del polen como el número de enzimas y los niveles de actividad *in vitro* e *in gel*. Otros parámetros que no se han estudiado en este trabajo, como la capacidad del polen para germinar *in vivo* o la tasa de crecimiento del tubo, podrían estar influenciados por la distinta composición de enzimas esterasa NE del polen. No obstante, hasta el momento no existen evidencias empíricas que apoyen esta hipótesis.



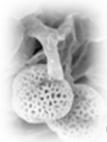
### 5.3. El exudado estigmático es un sitio metabólicamente activo que muestra divergencias funcionales entre especies

En este trabajo de tesis doctoral, se ha realizado por primera vez un análisis comparativo del proteoma del exudado estigmático de una monocotiledónea (*Lilium longiflorum*) y una dicotiledónea (*Olea europaea*). La elección de estas dos especies para su estudio se basó en las diferencias taxonómicas y ecológicas que presentan ambas especies. Tras los análisis se identificaron un total de 576 proteínas, de las cuales 286 están presentes en el exudado estigmático del *Lilium* y 290 en el de olivo. La presencia de tan elevado número de proteínas sugiere que el exudado participa activamente en la fisiología del polen y el tubo polínico, siendo clave en los procesos de interacción polen-estigma (hidratación y reconocimiento del polen, y nutrición, adhesión y orientación del tubo polínico). Sin embargo, únicamente 13 de las 94 familias proteicas están representadas en ambos exudados. Estos datos sugieren la existencia de divergencias funcionales importantes en el exudado de ambas especies.

#### 5.3.1. Diferencias en el perfil metabólico del exudado

El principal grupo de proteínas (en número) presentes en el proteoma del exudado está formado por enzimas relacionadas con el metabolismo de los azúcares y los polisacáridos. En el exudado de *Lilium* se detectaron numerosas enzimas hidrolíticas implicadas en la ruptura de enlaces O-glicosídicos, peptídicos, enlaces éster y amidas. El grupo más abundante de enzimas identificado fue el de las glicosilasas (GH), que incluye proteínas de las familias proteicas GH2, 3, 5, 16, 17, 18, 19, 27, 28, 31, 35, 38 y 79. El elevado número de enzimas hidrolasas indica la importancia del catabolismo de los polisacáridos dentro de la secreción estigmática de *Lilium*, y se justifica por la abundancia de polisacáridos, fundamentalmente AGPs y las pectinas, que caracteriza la composición del exudado estigmático de esta especie (Labarca et al. 1970; Aspinal y Rosell 1978). El tubo polínico de *Lilium* engloba azúcares y otros compuestos presentes en el exudado durante la germinación a través de un proceso de endocitosis (Labarca y Loewus 1972). En este contexto, las enzimas GH presentes en el exudado podrían contribuir a degradar los polisacáridos de gran tamaño secretados por las papilas en unidades más pequeñas y más fáciles de incorporar al tubo polínico para su posterior utilización en la biosíntesis de la pared del tubo. Las AGPs presentes en el exudado y en los espacios intercelulares del tejido transmisor proporcionan señales para el reconocimiento y orientación del tubo polínico (Wu et al 2001).

El exudado de *Lilium* también contiene enzima una endo- $\beta$ -manosidasa (familia GH 2), la cual rompe los enlaces Man $\beta$ 1-4GlcNAc en la estructura central de los N-glicanos (Ishimizu *et al.* 2004; Sasaki *et al.* 2005) y una  $\alpha$ -



manosidasa (familia GH 38), implicada en la hidrólisis de los enlaces Man $\alpha$ 1-3Man y Man $\alpha$ 1-6Man (Hossain *et al.* 2009). En las células vegetales, los mecanismos de deglicosilación proteica aún no están claros. Nuestros resultados sugieren que estas dos manosidasas podrían actuar conjuntamente para degradar los N-glicanos de alto contenido en manosa presentes en las glicoproteínas secretadas por el estigma. Por ejemplo, la N, N'-diacetil quitobiosa (GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc) es un importante N-glicano de la S-RNasa, una glicoproteína asociada a la auto-incompatibilidad gametofítica (GSI) (Ishimizu *et al.* 1996). Dado el comportamiento del tubo polínico, este hecho sugiere la existencia de un único locus del sistema GSI en *L. longiflorum*, aunque los S-genes no han sido identificados todavía. La identificación del azúcar que actúa como sustrato y el análisis de las proteínas que interactúan con la endo- $\beta$ -manosidasa ayudarán a elucidar su función biológica en el exudado estigma.

Aunque se ha descrito que en la composición del exudado estigmático de olivo existen pectinas y AGPs (Serrano *et al.* 2008, Suárez 2009), no se han identificado ninguna de las enzimas GH descritas anteriormente. Este hecho podría explicarse en que la composición del exudado en esta especie es fundamentalmente lipídico y la cantidad de polisacáridos es mucho menor. Otro aspecto relevante es la presencia de una gran cantidad de lípidos de reserva en el polen de olivo, que le confieren autonomía de crecimiento al inicio de la germinación (Rodríguez-García *et al.* 2003b; Zienkiewicz *et al.* 2010, 2011). El polen de *Lilium*, en cambio, no contiene una cantidad significativa de lípidos de reserva, y el almidón existente se metaboliza en su totalidad al final de su desarrollo (Castro y Clément 2007). Todos estos datos sugieren que el crecimiento inicial del tubo polínico en *Lilium* podría ser muy dependiente de las sustancias de reserva (polisacáridos) del exudado.

Un segundo grupo de enzimas hidrolíticas detectado en el exudado de *Lilium* muestran homología con Ser, Cys y Asp proteasas. Las proteasas son enzimas que normalmente presentan una localización intracelular, aunque se han descrito varias enzimas proteasas que son secretadas al apoplasto (Berger *et al.* 2000; Tanaka *et al.* 2001). Existen estudios que vinculan las proteasas con procesos de señalización extracelular mediada por péptidos (Bergey *et al.* 1996), que regulan distintos procesos de desarrollo como, por ejemplo, la densidad de estomas en la hoja (Von Groll *et al.* 2002). Así, se ha propuesto que las cardosinas A y B podrían participar en los eventos de proteólisis que tienen lugar en el exudado estigmático, los cuales son importantes para la interacción polen-pistilo (Ramalho-Santos *et al.* 1997; Vieira *et al.* 2001). Generalmente, las funciones de las proteasas secretadas dependen de receptores de proteínas. Por ejemplo, BRS1 es una Ser carboxipeptidasa que mejora la percepción de



brasinoesteroides a través de BRI1 (Li *et al.* 2001), que codifica un receptor quinasa localizado en la superficie de las células de la hoja (Nam y Li *et al.* 2002). En nuestro estudio, hemos identificado varios receptores de proteínas quinasa en ambos fluidos estigmáticos. Sin embargo, no se han identificado proteasas en el exudado estigmático de olivo. Esto debe probablemente al hecho de que el muestreo del exudado de olivo se realizó únicamente en un estadio de desarrollo y no a lo largo de toda la fase progámica, como en el caso de *Lilium*.

### 5.3.2. Diferencias en los mecanismos de defensa y respuesta a estrés

El estigma es una estructura que está en contacto directo con el ambiente lo que le hace ser muy vulnerable al ataque de patógenos. Este hecho explicaría la presencia de un sistema de defensa eficaz frente a patógenos en la superficie estigmática (Atkinson *et al.* 1993; Heslop-Harrison 2000). Este sistema está muy directamente relacionado con la síntesis de un conjunto de proteínas denominadas genéricamente PRPs (Patogenesis-Related Proteins). Las PRPs está agrupadas en 17 familias (Van Loon 1999; Edreva 2005), 10 de las cuales están representadas en el proteoma del exudado de *Lilium*, mientras que en el olivo sólo se han detectado 3 de estas familias (Tabla 5.1).

**Tabla 5.1.** Listado de proteínas PR identificadas en los exudados estigmáticos de *Lilium* y olivo.

Familia	Olivo	Lilium
PR-2	$\beta$ -1,3-glucanasas	$\beta$ -1,3-glucanasas
PR-3	-	Quitinasas I, II, III, V
PR-4	-	Quitinasas I, II
PR-5	TLPs	TLPs
PR-6	-	Inhibidores de proteinasas
PR-7	-	Endopeptidasas
PR-8	-	Quitinasas III
PR-9	Anexina?	Peroxidasas
PR-11	-	Quitinasas I
PR-14	-	LTPs

TLPs, thaumatin-like proteins; LTPs, lipid trasfer proteins.



Un resultado muy llamativo es la presencia de un gran número de enzimas quitinasas (familias PR-3, PR-4, PR-8 y PR-11) en el fluido estigmático de *Lilium*. La presencia de quitinasas se ha descrito previamente en el estigma húmedo de *Petunia* (Leung 1992), el tejido transmisor del tomate y la patata (Wemmer *et al.* 1994; Harikrishna *et al.* 1996) y el ovario de tabaco (Lotan *et al.* 1989). Curiosamente, estas enzimas están completamente ausentes del exudado de olivo. Este hecho podría estar relacionado con las diferentes características ecológicas de ambas especies. La polinización en *Lilium* es entomófila, mientras que el olivo la polinización es llevada a cabo por el viento. Esto implica que el estigma de *Lilium* podría estar más expuesto al ataque de los patógenos debido al contacto directo con los insectos polinizadores. Por otro lado, el olivo se cultiva en zonas mediterráneas, donde el clima es seco y la humedad relativa del aire es baja, mientras que *Lilium* procede de regiones lluviosas y con una alta humedad ambiental, lo que la hace más susceptibles a las infecciones por hongos.

En el olivo, la defensa podría estar a cargo de otras proteínas como las proteínas extracelulares de tipo NmrA y dirigente (dirigent-like), y enolasas, implicadas en la biosíntesis de lignina, isoflavonoides, y fenilpropanoides (Gang *et al.* 1998; Gang *et al.* 2001; Louie *et al.* 2007; Gleason y Chollet 2011). Todos estos compuestos poseen propiedades antifúngicas y antisépticas. Sin embargo, aún no está claro si su actividad en el estigma es constitutiva o si es inducida por la presencia del patógeno. También se han detectado varias ciclofilinas en el exudado y el “pollen coat” de olivo. Dichas proteínas se han identificado como proteínas extracelulares en el polen (Yokota *et al.* 2004) pero es la primera vez que se describe su presencia en el exudado del estigma. La función de las ciclofilinas no está clara. No obstante, su actividad peptidil-propil *cis-trans* isomerasa y su secreción a la matriz extracelular cuando las condiciones ambientales son desfavorables sugieren que estas proteínas están implicadas en la señalización celular en respuesta al estrés.

Varios aspectos relacionados con la reproducción sexual en el olivo tales como la receptividad estigmática, la germinabilidad del polen sobre el estigma y las relaciones de autoincompatibilidad se ve afectadas de forma significativa por cambios bruscos de temperatura durante la polinización (Cuevas *et al.* 1994; Koubouris *et al.* 2009; Polito 2011). Como respuesta al estrés térmico, las plantas sintetizan un conjunto de proteínas denominadas genéricamente Hsp (Heat shock proteins) que actúan como chaperonas, uniéndose a otras proteínas y evitando su desnaturalización (Feder y Hoffman 1999). Estudios recientes sugieren que estas proteínas pueden actuar también como moléculas de señalización en respuesta al estrés (Calderwood *et al.* 2007; Wahid *et al.* 2007). Resulta llamativa la presencia en el exudado de olivo de



numerosas proteínas de las familias Hsp-20, Hsp-60, Hsp-70 y Hsp-90, mientras que en la secreción estigmática de *Lilium* sólo se ha identificado una proteína Hsp-70, con dos variantes alélicas. Como en el caso anterior, estas diferencias podrían explicarse también por razones ecológicas, dado que las altas temperaturas durante el periodo de floración son frecuentes en las zonas donde se cultiva el olivo.

### 5.3.3. Proteínas relacionadas con la autoincompatibilidad y la muerte celular programada (PCD) del estigma

En el olivo, se ha especulado con la posibilidad de que exista un sistema de autoincompatibilidad de tipo gamético (GSI), dado que la mayoría de los tubos polínicos detienen su crecimiento en el estigma y solo unos pocos (2-3) atraviesan el estilo y llegan al ovario (Mookerjee *et al.* 2005). La presencia de una calosa sintasa en el exudado de olivo sugiere que la detención del crecimiento del tubo polínico en el estigma está acompañada por la deposición de la calosa sobre la superficie de las papilas estigmáticas, como ocurre en otras especies (Sedgley 1979, de Nettancourt 1997). En *Lilium*, no hay deposición de calosa en el estigma, lo que explicaría la ausencia de este enzima en el exudado.

En las plantas con flores, tras la polinización, el estadio final del desarrollo del estigma consiste en su senescencia controlada (Lam *et al.* 1999). La PCD de las células del estigma puede ser también inducida como respuesta al ataque de patógenos o el rechazo del polen incompatible (Wu y Cheung 2000; Bozhkov *et al.* 2005). Las proteasas juegan un papel clave en la ejecución de la PCD (Beers *et al.* 2000; Lam y del Pozo 2000; Woltering *et al.* 2002; Belenghi *et al.* 2004; Schaller 2004; Danon *et al.* 2004). El exudado estigmático de *Lilium* contiene varias Ser, Cys y Asp proteasas. El proceso de PCD incluye la degradación activa del núcleo para lo que se cree que se requiere una enzima DNasa tipo S1 (Aoyagi *et al.* 1998). Hasta el momento, sólo se han purificado y caracterizado tres DNasas de tipo-S1 en plantas: ZEN1 en *Zinnia elegans* (Thelen y Northcote 1989), BFN1 en *Arabidopsis thaliana* (Pérez-Amador *et al.* 2000) y BEN1 en *Hordeum vulgare* (Brown y Ho 1987). Todas estas enzimas funcionan como factores apoptóticos en los procesos de senescencia y requieren la presencia de iones  $Zn^{2+}$  para su actividad (Podzimek *et al.* 2011). En este trabajo hemos identificado por primera vez una nucleasa S1-P1, que es homóloga de la proteína SAP6 (Senescence-Associated Protein 6) de *Hemerocallis* (familia Liliáceas) (Panavas *et al.* 1999), en el estigma de *Lilium*, y que podría estar implicada la PCD del mismo. Como en el caso de las proteasas, la ausencia de estas proteínas en el exudado de olivo podría deberse a que el muestreo del exudado de olivo se realizó únicamente en un estadio previo a la antesis de la flor.



## 5.4. El exudado estigmático y el “pollen coat” contienen distintas enzimas esterasas

### 5.4.1. Enzimas esterasas implicadas en la modificación de la pared celular

Entre las proteínas identificadas en el exudado estigmático y el “pollen coat” existe un conjunto de enzimas hidrolasas que podrían participar en el crecimiento y remodelación de la pared celular del tubo polínico (Tabla 5.2). Estas enzimas participan en la degradación selectiva de los distintos polisacáridos que conforman la pared del tubo polínico, provocando cambios en su composición que, a su vez, se traducirían en cambios en el soporte estructural y mecánico, el mantenimiento de la forma celular, el control de la tasa de crecimiento y orientación del tubo polínico y la comunicación celular.

**Tabla 5.2.** Lista de enzimas implicadas en la modificación de la pared celular identificadas en el exudado estigmático (ex) de *Lilium* y olivo, y en el “pollen coat” (pc) de olivo.

Especie	Enzima	Proceso en la pared celular
<i>Olea</i> (ex)	$\beta$ -glucosidasa	Catabolismo de celulosa/xiloglucanos
<i>Lilium/Olea</i> (ex)	$\beta$ -glucosidasa	Catabolismo de celulosa/xiloglucanos
<i>Lilium</i> (ex)	$\beta$ -xylosidase/ $\alpha$ -arabinofuranosidasa	Catabolismo de arabinanos
<i>Lilium</i> (ex)/ <i>Olea</i> (pc)	Exo-1,3- $\beta$ -glucanasa	Catabolismo de calosa
<i>Lilium</i> (ex)	Celulasa	Catabolismo de celulosa
<i>Olea</i> (ex)	Xiloglucano endotransglicosilasa	Catabolismo de xiloglucanos
<i>Lilium/Olea</i> (ex, pc)	Endo-1,3- $\beta$ -glucanasa	Catabolismo de calosa
<i>Lilium</i> (ex)	$\alpha$ -galactosidasa	Catabolismo de galactomananos
<i>Lilium/Olea</i> (ex/pc)	Poligalacturonasa	Catabolismo de homogalacturonanos
<i>Lilium</i> (ex)	$\alpha$ -glucosidasa	Catabolismo de xiloglucanos
<i>Lilium</i> (ex)	$\beta$ -galactosidasa	Catabolismo de homogalacturonanos
<i>Lilium/Olea</i> (ex/pc)	Pectina metilesterasa	Catabolismo de homogalacturonanos
<i>Olea</i> (ex)	Pectina acetilesterasa	Catabolismo de homogalacturonanos
<i>Lilium/Olea</i> (ex)	LTP	Catabolismo de celulosa/xiloglucanos
<i>Lilium</i> (ex)	$\beta$ -expansina	Catabolismo de celulosa/xiloglucanos
<i>Olea</i> (ex/pc)	$\alpha$ -1,4-glucano sintasa	Biosíntesis de celulosa
<i>Olea</i> (ex)	UDP-arabinopiranososa mutasa	Biosíntesis de celulosa
<i>Olea</i> (ex)	UDP-L-arabinosa mutasa	Biosíntesis de celulosa
<i>Olea</i> (ex)	Calosa sintasa	Biosíntesis de calosa
<i>Olea</i> (pc)	UDP-glucosa pirofosforilasa	Biosíntesis de calosa
<i>Olea</i> (pc)	Ramnosa sintasa	Biosíntesis de pectinas

LTP, lipid transfer protein.



Entre las proteínas identificadas en ambos fluidos y en el “pollen coat” de olivo, encontramos enzimas pectinasas como las poligalacturonasas (PGs) y enzimas pectinesterasas como las PME<sub>s</sub> y PAE<sub>s</sub>. Las primeras hidrolizan las cadenas lineales de los HGs presentes en de las pectinas, dando lugar a la formación de oligogalacturónidos que contienen 2-20 residuos de GalA, los cuales podrían tener una función en los procesos de señalización celular (Ridley *et al.* 2001). Roggen y Stanley (1969) demostraron por primera vez que la adición exógena de PG al medio de cultivo promueve el crecimiento del tubo polínico, probablemente como resultado de un incremento de la plasticidad de la zona apical del tubo. Las PME<sub>s</sub> identificadas en ambos exudados estigmáticos han sido clasificadas como PME de tipo II ya que contienen una extensión en el extremo N-terminal denominada región PRO que es homóloga con el dominio PME<sub>I</sub> (inhibidor de PME, Pfam 04043) (Pelloux *et al.* 2007). Rockel *et al.* (2008) sugieren que los inhibidores de PME (PME<sub>I</sub>s) podrían ser incorporados por endocitosis en la zona del ápice del tubo, regulando así la estabilidad del tubo polínico mediante la inhibición local de la actividad PME. En base a nuestros resultados, sugerimos que estas PME<sub>I</sub>s podrían ser de origen estigmático. Ambos fluidos estigmáticos contienen una proteína inhibidora del enzima PG, cuya implicación en la regulación de dicha proteína aún se desconoce. También se han identificado enzimas bifuncionales de tipo  $\alpha$ -arabinosidasa/ $\beta$ -xilosidasa y  $\beta$ -galactosidasas en el exudado que podrían estar implicadas en la degradación de arabinanos y galactanos presentes en las pectinas.

#### 5.4.2. Enzimas esterasas/lipasas implicadas en el metabolismo lipídico

Otro grupo de proteínas esterasas identificadas fueron las GDSL lipasas. Estas enzimas se detectaron tanto en el exudado de *Lilium* como en el de olivo, siendo más abundantes en este último. Este hecho es fácilmente explicable dada la naturaleza lipídica del exudado de olivo, mientras que en *Lilium* es de naturaleza acuosa y su contenido en sustancias lipídicas es muy bajo. Las lipasas GDSL son enzimas que poseen una Ser en su sitio activo, localizado cerca del extremo N-terminal (Upton y Buckley 1995). Se han detectado enzimas lipasas GDSL extracelulares en otras secreciones como el néctar de *Jacaranda mimosifolia*, el látex de *Hevea brasiliensis* y el exudado peciolar de *Arabidopsis* (Arif *et al.* 2004; Kram *et al.* 2008; Kwon *et al.* 2009). Estas proteínas están involucradas en los mecanismos de defensa frente a patógenos en las plantas. Además, se ha demostrado que los lípidos modulan la transferencia de agua hacia el polen deshidratado en la superficie del estigma (Wolters-Arts *et al.* 2002; Edlund *et al.* 2004). Por ejemplo, las lipasas extracelulares presentes en el “pollen coat” de *Arabidopsis*, que son similares a las lipasas GDSL, son



necesarias para la hidratación del grano de polen (Updegraff *et al.* 2009). No se detectaron lipasas en el “pollen coat” de olivo. Se piensa que el exudado estigmático rico en lípidos de las plantas con estigmas húmedos desempeña un papel similar al “pollen coat”. La presencia de dos lipasas GDSL en el fluido estigmático de olivo parece corroborar esta hipótesis y explicaría la ausencia de estas enzimas en el “pollen coat”. Por el contrario, el fluido estigmático de *Lilium* es principalmente acuoso y contiene una cantidad muy baja de sustancias lipídicas. En este caso, las enzimas lipasas GDSL podrían estar implicadas en la atracción de polinizadores y/o en la prevención del crecimiento microbiano dentro del exudado.

## **5.5. El exudado estigmático y el “pollen coat” están implicados en diversos procesos de interacción entre el polen y el estigma**

### **5.5.1. Modificación selectiva de la pared celular del tubo polínico**

En la pared del tubo polínico se forma una pared secundaria de calosa por debajo de la pared primaria de pectinas (Meikle *et al.* 1991). Varias de las enzimas identificadas en el exudado estigmático de olivo y *Lilium* están implicadas en la degradación de la calosa (Tabla 5.1). Por ejemplo, la enzima endo-1,3- $\beta$ -glucanasa es capaz de escindir los polímeros de glucano y formar glicooligosacáridos, mientras que las exo-1,3- $\beta$ -glucanasas degradan estos glucooligosacáridos a unidades de glucosa. Ambas enzimas han sido identificadas previamente en polen de olivo y *Lilium* (Huecas *et al.* 2001; Takeda *et al.* 2004) pero es la primera vez que se describen en el estigma. Un estudio pionero realizado por Roggen y Stanley (1996) demostró que la aplicación exógena de endo-1,3- $\beta$ -glucanasa al medio de cultivo al comienzo de la germinación da lugar a un aumento en la longitud del tubo polínico, probablemente como resultado de la degradación de la calosa de la intina en la región apertural. Por otro lado, las exo- $\beta$ -1,3-glucanasas podrían estar implicadas en la degradación controlada de la calosa en la zona del ápice del tubo para facilitar la expansión del mismo, prevenir la obstrucción del ápice y/o para incrementar la porosidad de la pared de calosa del tubo, lo que redundaría en una mayor y mejor comunicación entre el tubo polínico y el estigma (Takeda *et al.* 2004).

La pared del tubo polínico también contiene pequeñas cantidades de microfibrillas de celulosa (Ferguson *et al.* 1998), cuya orientación determina la dirección del crecimiento del tubo, así como su forma (Geitmann y Ortega 2009). En un estudio reciente se ha demostrado que la celulosa tiene un papel importante en la estabilización mecánica de la región subapical del tubo polínico (Aouar *et al.* 2010). Si añadimos bajas concentraciones de celulosa al medio de germinación, se produce un efecto similar al obtenido tras la adición



de pectinasas (Roggen y Stanley 1969). En el exudado estigmático de ambas especies también hay presentes enzimas  $\beta$ -glucosidasas y celulasas implicadas en la degradación de celulosa (Tabla 5.1). Se ha observado que un proceso de digestión controlada podría liberar los xiloglucanos atrapados dentro de las moléculas de celulosa dando lugar a una mayor extensibilidad de la pared (Ohmiya *et al.* 2000).

Las microfibrillas de celulosa se disponen formando una red tridimensional estable con las hemicelulosas. La naturaleza dinámica de esta unión podría ser un factor importante para la modulación de la tasa de crecimiento de la pared del tubo polínico. El xiloglucano es el principal polisacárido hemicelulósico presente en la pared del tubo polínico (Freshour *et al.* 2003; Takeda *et al.* 2004). El fluido estigmático también contiene un conjunto de enzimas que intervienen en la restructuración de las hemicelulosas. Así, la acción hidrolítica combinada de las enzimas xiloglucano endotransglucosidasa y  $\beta$ -glucosidasa podría producir la liberación de oligosacáridos a partir del xiloglucano, y causar la relajación de la pared del tubo (Fry *et al.* 1992). Además, en el exudado existen enzimas  $\alpha$ -xilosidasa y  $\beta$ -galactosidasa, las cuales podrían escindir oligosacáridos a partir de xiloglucanos ricos en xilosa y galactosa. Además de todas estas enzimas, se han identificado otras proteínas que también podrían participar en la relajación de la pared del tubo, tales como las proteínas LTPs (Lipid Transfer Proteins), que se expresan en el estigma de tabaco (Nieuwland *et al.* 2005). Estas pequeñas proteínas se unen a los compuestos hidrofóbicos de la pared del tubo, interfiriendo estéricamente con la matriz de celulosa-xiloglucano, provocando una ruptura no hidrolítica de las uniones y favoreciendo el crecimiento del tubo polínico (Nieuwland *et al.* 2005). En el exudado de *Lilium* también se ha identificado una  $\beta$ -expansina, la cual se ha sugerido que está implicada en la regulación del crecimiento del tubo polínico mediante hormonas (Wu *et al.* 2008).

### 5.5.2. Comunicación polen-estigma

Algunas de las proteínas identificadas en el “pollen coat” y el exudado estigmático podrían desempeñar funciones relacionadas con la señalización polen-estigma. El primer mecanismo molecular de transducción de señales en el polen fue identificado en el tomate. El sistema está formado por dos receptores quinasa (LePRK1 y LePRK2) que se localizan en la membrana plasmática, a los que se une una proteína extracelular llamada LAT52 (Muschiatti *et al.* 1998). Cuando el polen se deposita sobre el estigma, una proteína estigmática desplaza a LAT52, la proteína LEPRK2 se desfosforila y se inicia una cascada autocrina de señales en el tubo (Wengier *et al.* 2003; Kaothien *et al.* 2005). En este trabajo de tesis doctoral hemos identificado por primera vez la presencia de receptores quinasa, homólogos a los del tomate, así



como sus posibles ligandos (ST14 en el olivo, y una LTP en *Lilium*) en el estigma de olivo y *Lilium*. Estos datos implican que un sistema de transducción de señales similar al del polen existe en el estigma y podría ser universal y estar presente en todas las plantas.

También se identificaron varias proteínas 14-3-3 en el “pollen coat” y el exudado estigmático de olivo. Las proteínas 14-3-3 se unen a otras proteínas diana fosforiladas y cambian su estructura, regulando su actividad biológica (DeLille *et al.* 2002). En *Lilium*, estas proteínas 14-3-3 aparecen asociadas a la membrana del polen y actúan sobre las H<sup>+</sup>-ATPasas, las cuales un gradiente de protones que permite reclutar proteínas de membrana a través de la ruta secretora durante la elongación del tubo (Perlt *et al.* 2005). En *Arabidopsis*, se ha descrito la presencia de una proteína 14-3-3 denominada GF14 cuya expresión está restringida al estigma de la flor madura, las anteras y el polen (Daugherty *et al.* 1996).

En plantas, las especies de oxígeno reactivas (ROS) junto con el óxido nítrico (NO) están implicadas en diversos procesos de señalización celular, y regulan diferentes procesos fisiológicos como el crecimiento, la defensa y la reproducción (Neil *et al.* 2002; McInnis *et al.* 2006; Hiscock *et al.* 2007, 2008; Sirová *et al.* 2011). Varias enzimas relacionadas con el metabolismo de ROS y NO han sido identificadas en el “pollen coat” (anexina, ascorbato peroxidasa, catalasa y Mn-SOD) de olivo y en los exudados estigmáticos de olivo (anexina) y *Lilium* (ascorbato peroxidasa, citocromo P450 y Cu-Zn SOD). El polen y estigma de olivo produce distintas cantidades de ROS y NOS, dependiendo del momento de desarrollo (Zafra *et al.* 2010; Jiménez-Quesada *et al.* 2010). Algunas anexinas tienen actividad peroxidasa (Gidrol *et al.* 1996) y se ha especulado con la posibilidad de que constituyan una fuente de producción de ROS y participen en los procesos de señalización (Kim *et al.* 2010). Recientemente se ha descrito la presencia del enzima citocromo P450 en el estigma húmedo de *Petunia hybrida* (Han *et al.* 2010). Se ha propuesto que la citocromo P450 es capaz de generar enzimáticamente NO a partir de la oxidación de NOHA mediante NADPH y O<sub>2</sub> (del Río *et al.* 2004).

Algunos azúcares juegan un papel destacado en la señalización celular (Eveland y Jackson 2011). Por ejemplo, la trehalosa es un monosacárido que actúa como molécula reguladora del metabolismo y el crecimiento de la planta y como agente protector frente al estrés, probablemente actuando directamente en las cascadas de señalización (Rolland *et al.* 2006; Fernández *et al.* 2010). En los análisis de proteómica del fluido estigmático, hemos identificado dos enzimas directamente relacionadas con la síntesis (UDP-glucosa fosforilasa) y degradación (trehalasa) de trehalosa, que sugiere la



existencia de una vía de señalización mediada este tipo de azúcares en el exudado.

Finalmente, se han identificado algunas proteína implicadas en mecanismos de regulación mediados por calcio en el “pollen coat” (calmodulina y calreticulina) y en el exudado de olivo (calreticulina y calnexina) y *Lilium* (calmodulina). La calmodulina es una proteína de unión a calcio y regula la función de este catión como mensajero secundario (Bouché et al. 2005). Otras dos proteínas de unión a calcio, calreticulina y calnexina, modulan la respuesta celular al actuar como tampón de calcio libre (Szabo et al. 2006). La presencia de estas proteínas en la superficie del estigma y el polen confirma la función del calcio, tal y como se ha descrito previamente, en los procesos de interacción polen-pistilo en las primeras etapas de la polinización (Golovkin y Reddy 2003; Lenartowska et al. 2009).

### 5.5.3. Adhesión y orientación del tubo polínico

Algunas de las proteínas identificadas en el exudado participan en los fenómenos de adhesión y orientación del tubo polínico. En *Lilium*, destacan las proteínas SCA (Stigma/style Cysteine-rich Adhesin), quimiocianina y una proteína con un dominio de tipo fasciclina. Esta última presenta un fuerte homología con proteínas de animales implicadas en la adhesión celular (Seymour et al. 2004). La proteína SCA fue caracterizada inicialmente a partir de las secreciones estigmática y estilar de *Lilium longiflorum* (Mollet et al. 2000; Park et al. 2000). Esta proteína se asocia a pectinas extracelulares (Chae et al. 2007) y funciona como una adhesina tanto *in vitro* como *in vivo*, facilitando la adherencia del tubo polínico durante su crecimiento en el estilo (Lord 2003; Kim et al. 2006). Además, actúa de forma cooperativa con la quimiocianina y facilita la quimiotaxis del tubo polínico (Park et al. 2000; Kim et al. 2003; Hiscock y Allen 2008). En el exudo de olivo se identificaron cuatro isoformas de una proteína LTP que presenta homología con la proteína SCA de *Lilium*. Estas proteínas están también presentes en el exudado estigmático de *Nicotiana* y *Petunia* (Nieuwland et al. 2005), por lo que este mecanismo de adhesión celular del tubo polínico podría ser universal en todas las plantas.

### 5.5.4. Respuestas de defensa y frente a estrés

Los estigmas de *Lilium* y olivo secretan dos proteínas clásicas implicadas en la defensa frente a patógenos (Tabla 5.2): las  $\beta$ -1,3 glucanasas y las proteínas de tipo taumatina (Selitrennikoff 2001; Petre et al. 2011). Existen evidencias que muestran que las enzimas  $\beta$ -1,3 glucanasas también están implicadas en la reproducción sexual de las plantas (del Campillo y Lewis, 1992). Estudios pioneros mostraron que la adición de  $\beta$ -1,3-glucanasa al medio de cultivo



estimula la germinación y el crecimiento del tubo polínico (Roggen y Stanley 1969). La presencia de  $\beta$ -1,3-glucanasas en el estigma y el tejido transmisor del estilo sugieren una función similar *in vivo* (Lotan *et al.* 1989; Ori *et al.* 1990; Constanbel y Brisson 1995).

### **5.6. El exudado estigmático y el “pollen coat” contienen algunas proteínas inesperadas**

Las papilas estigmáticas en los estigmas de tipo húmedo sufren a menudo un proceso de lisis celular y liberan su contenido al exudado estigmático (Edlund 2004). No obstante, no está claro si se trata de etapa más del programa de desarrollo normal del estigma, o si es el resultado de una respuesta frente al estrés. En el análisis del proteoma del “pollen coat” y el exudado estigmático de olivo se han identificado un conjunto de proteínas cuya localización habitual es típicamente intracelular. Entre estas proteínas encontramos varias enzimas glicolíticas como la gliceraldehído-3P deshidrogenasa y la triosa-P-isomerasa, actinas, proteínas ribosomales, y varias ATPasas de membrana. Existen evidencias de que algunas enzimas glicolíticas que no poseen péptido señal podrían ser secretadas a la pared celular (Pardo *et al.* 2000; Pitarch *et al.* 2002; Chivasa *et al.* 2002, 2005). La actina se ha localizado en los plasmodesmos de la pared celular (White *et al.* 1994). Las proteínas ribosomales forman parte de un complejo proteico extracelular clave en la inmunidad innata de algunos vertebrados (Bergsson *et al.* 2005). Existen estudios que demuestran la presencia de ATP en la matriz extracelular de plantas y animales (Roux y Steinebrunner 2007). En un trabajo reciente, se observó que la concentración extracelular óptima de ATP y la incorporación de dicho ATP extracelular por el tubo polínico durante la germinación implementa el crecimiento del tubo (Bernard *et al.* 2011). Por tanto, la presencia de ATPasas en el estigma de olivo podría indicar la existencia de un sistema de regulación de la concentración de ATP en el exudado.

### **5.7. El polen de olivo expresa una PME durante el desarrollo**

En este trabajo hemos clonado una PME a partir del ADNc que codifica para un polipéptido con una secuencia de 364 aminoácidos, un peso molecular teórico de 39,65 kDa y un pI de 6,96. La proteína presenta un sitio de N-glicosilación en el residuo Asn103. La secuencia de la PME de polen de olivo presenta una elevada homología (79-85%) con otras enzimas PME de polen de otras especies vegetales. El análisis filogenético reveló que la PME de olivo está claramente separada de otras PMEs que no son de plantas, y aparece agrupada en un clúster con la PME del polen de *Salsola kali*, separado de otro grupo en el



que aparecen otras PME de polen, incluyendo las de tabaco, tomate, y *Arabidopsis thaliana*. Recientemente se ha identificado y clonado la secuencia del alérgeno Ole e 11 (Salamanca *et al.* 2010), cuya homología es del 100% con la PME del polen de olivo.

Las PMEs de plantas son codificadas por familias multigénicas cuyos genes tienen conservada en su secuencia el dominio PME. Se ha descrito que existen numerosas isoformas de PMEs que se expresan en el grano de polen y en los tubos polínicos de diferentes especies como *Brassica* (Albani *et al.* 1991), maíz (Wakeley *et al.* 1998), tabaco (Bosch *et al.* 2005), *Salix* (Futamura *et al.* 2000) y *Arabidopsis* (Jiang *et al.* 2005; Pina *et al.* 2005). En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se han identificado 66 genes que codifican otras tantas PMEs. En el polen de *Arabidopsis* se expresan al menos 18 PMEs diferentes (Pina *et al.* 2005), 8 de las cuales se encuentran entre los 50 transcritos que presentan mayores niveles de expresión, lo que indica la relevancia de estas enzimas en la fisiología del polen. Este elevado número de isoformas contrasta con la presencia de una única enzima en el polen de olivo, aunque no podemos descartar la existencia de otras isoformas. Las PMEs de plantas se encuentran subdivididas en dos grupos, I y II (Micheli 2001; Tian *et al.* 2006). Las PME de tipo I contienen únicamente el dominio catalítico de la PME, mientras que las proteínas de grupo 2 poseen tanto el dominio catalítico de la PME como un dominio inhibidor específico de la PME (PMEI) (Markovic y Jornvall 1992; Giovane *et al.* 2004). La PME clonada en el polen de olivo pertenece a las PMEs del grupo I.

Existen evidencias experimentales que sugieren la implicación de las PMEs en la formación de la pared celular del polen durante su desarrollo en la antera (Albani *et al.* 1991; Mu *et al.* 1994; Wakeley *et al.* 1998; Lacoux *et al.* 2003), desempeñando un papel importante en los procesos de separación celular. En *Arabidopsis thaliana*, el gen *Quartet1* (QRT1) codifica para una PME (Rhee y Somerville 1998) que se expresa durante el proceso de separación de las microsporas de la tétrada (Francis *et al.* 2006). En el mutante *qrt1*, las microsporas de la tétrada permanecen unidas una vez que la pared de calosa se degrada, y continúan su desarrollo de forma normal. Al final del proceso, se pueden observar tétradas de granos de polen maduro unidos entre sí. Esto es debido a que la enzima PME participa activamente en la degradación de las pectinas de la pared celular primaria de la célula madre del polen de forma que, cuando el gen está mutado, la tétrada permanece indisoluble. QRT1 actúa de forma cooperativa con otro gen denominado QRT3, que codifica para una poligalacturonasa (PG) (Rhee *et al.* 2003). La desesterificación de los grupos metilo de las pectinas llevada a cabo por la PME (QRT1) induce a la PG (QRT3), lo que da lugar a una degradación controlada de las pectinas y a una



relajación de la pared celular primaria de la célula madre del polen (Tucker y Seymour 2002). Por otro lado, el gen SgPME1 de *Salix gilgiana* codifica para una PME que se expresa únicamente en el grano de polen maduro (Futamura *et al.* 2000). Este hecho sugiere que no todas las enzimas PME presentes en el polen participan en los mismos procesos de desarrollo.

En el olivo, la PME del polen se localiza en la pared celular de las células hijas que constituyen la tétrada y presenta un pico de expresión temporal en el momento de la separación de las microsporas de la tétrada. Estos datos sugieren que la PME de olivo podría tener una función similar a QRT1. Por otro lado, el mecanismo enzimático que permite la liberación de las microsporas de la tétrada a través de la acción de la PME podría ser universal en todas las Angiospermas. Durante el desarrollo de la antera de olivo, la PME se expresa también en las células del *tapetum* y en las microsporas/granos de polen en desarrollo. La apoptosis del *tapetum* en los estadios finales del desarrollo de la antera está acompañada por una intensa degradación de las paredes celulares de dicho tejido. Los restos del *tapetum* son liberados al lóculo de la antera y se depositan sobre la exina del polen. Por tanto, la presencia de la PME en el *tapetum* y en los restos celulares sugiere que la PME desempeña un papel importante en la degradación de dicho tejido al final del desarrollo.

Durante los estadios de maduración del polen, se produce una acumulación progresiva de transcritos y de la propia enzima. En el polen maduro, la proteína PME y su actividad se localizó alrededor de pequeñas vesículas probablemente procedentes del Golgi, distribuidas por todo el citoplasma de la célula vegetativa, así como en el lado más interno de la intina, en contacto con el plasmalema. Este patrón de localización subcelular es similar al de la enzima AtPPME1 en el polen maduro de *Arabidopsis* (Tian *et al.* 2006). Durante la hidratación, se observa un intenso marcado en las aperturas. La distribución de las pectinas esterificadas en el polen maduro es similar al de la enzima PME (Suárez 2009). Por otro lado, las pectinas desesterificadas se localizan principalmente en la intina y las aperturas, formando una estructura en forma de anillo que refuerza mecánicamente la zona por donde emerge el tubo polínico (Suárez 2009). La similitud en la localización espacial de pectinas esterificadas y PMEs sugiere que ambas son secretadas de forma simultánea durante la hidratación del polen. Por tanto, la PME secretada podría estar implicada en la desesterificación de las pectinas presentes en la apertura.

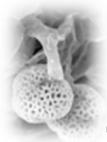
Existen evidencias que demuestran que las PME están directamente implicadas en la formación de la pared primaria del tubo polínico, la cual se compone fundamentalmente de pectinas (Jiang *et al.* 2005; Dardelle *et al.*



2010). Estos datos se han obtenido fundamentalmente a partir del estudio de mutantes en *Arabidopsis*. El gen VANGUARD1 (VGD1) codifica una proteína que posee un dominio catalítico PME y un dominio PME1 (Jiang *et al.* 2005). En el mutante *vgd1*, la tasa crecimiento del tubo polínico es significativamente menor que en el fenotipo silvestre (Jiang *et al.* 2005). Además, los tubos del mutante son muy inestables y a menudo inviables porque el extremo apical se hincha y acaba estallando. Este hecho origina una disminución significativa de la fertilidad masculina. Otra PME específica de polen en *Arabidopsis*, denominada AtPPME1, está implicada en el mantenimiento de la forma del tubo polínico (Tian *et al.* 2006). El mutante *atppme1* no muestra una disminución de la fertilidad masculina *in vivo*, pero el crecimiento polar de los tubos polínicos se suprime y éstos presentan fenotipos aberrantes con varios ápices.

El patrón de expresión de la PME de olivo sugiere que la proteína desempeña una función importante durante la germinación del polen, tal y como se ha descrito para otros genes con un patrón de expresión similar (Alché *et al.* 1999; McCormick 2004). El hecho de que no se detecten otras isoformas del enzima podría indicar que la PME del polen de olivo está implicada en el metabolismo de la pared del polen o del tubo polínico en función del momento del desarrollo. Durante la germinación, la PME del polen de olivo se localiza a lo largo de toda la pared del tubo polínico, salvo en la región apical. Este patrón coincide con la distribución de las pectinas desesterificadas, mientras que las pectinas esterificadas son especialmente abundantes en el ápice del tubo (Suárez 2009). Estos resultados de localización subcelular son similares a los observados en otras especies (Jauh y Lord 1996; Li *et al.* 1994, 2002; Parre y Geitmann 2005; Dardelle *et al.* 2010). En base a estos resultados, se ha propuesto que las pectinas altamente esterificadas son secretadas en el ápice del tubo polínico mediante la ruta exocítica clásica del RE/Golgi. En la zona subapical del tubo, estas pectinas esterificadas sufren a continuación un proceso de desesterificación, a través de la hidrólisis de los grupos metoxiésteres, proceso que es llevado a cabo por enzimas PMEs. Los grupos carboxilos libres de las pectinas se unen entonces al calcio y forman pectatos que aumentan la rigidez de la pared del tubo (Geitmann y Steer 2006).

Algunos autores sugieren que las PMEs también podrían actuar modificando la pared del tejido transmisor del estigma/pistilo facilitando la progresión del tubo polínico a través de las paredes pectocelulósicas de las células del pistilo y/o proporcionando los precursores de la pared necesarios para su crecimiento (Jiang *et al.* 2005). Las PMEs podrían regular el crecimiento del tubo polínico modificando las paredes celulares del pistilo y, por tanto, mejorando la interacción entre el tubo polínico y los tejidos



esporofíticos circundantes. En el olivo, la proteína PME del polen es secretada al medio de cultivo durante la germinación (Quirós *et al.* 2012). Este hecho viene corroborado por la existencia de altos niveles de actividad PME en el medio de germinación. También se ha localizado la PMEs en las papilas del estigma y en las células tejido transmisor. Se ha demostrado que las pectinas desesterificadas pueden interaccionar con ciertas proteínas como LTPs (proteínas de transferencia de lípidos), las cuales están presentes en el tejido transmisor del estilo (Tung *et al.* 2005). Recientemente, se ha puesto de manifiesto que la proteína LTP5, presente en el tubo polínico y en el tejido transmisor del pistilo de *Arabidopsis*, juega un papel fundamental en el mantenimiento de la polaridad del ápice del tubo polínico y en la orientación del crecimiento a través de la adhesión. Esta acción se lleva a cabo por la interacción de las proteínas LTP5 con las pectinas (Chae *et al.* 2009). Estos resultados apoyan la idea de que las PMEs desempeñan un papel importante en las interacciones polen-pistilo, actuando como uno de los factores clave en la modificación de la pared celular.



## **CONCLUSIONES**

“Es de importancia para quien desee alcanzar una certeza en su investigación, saber dudar a tiempo”

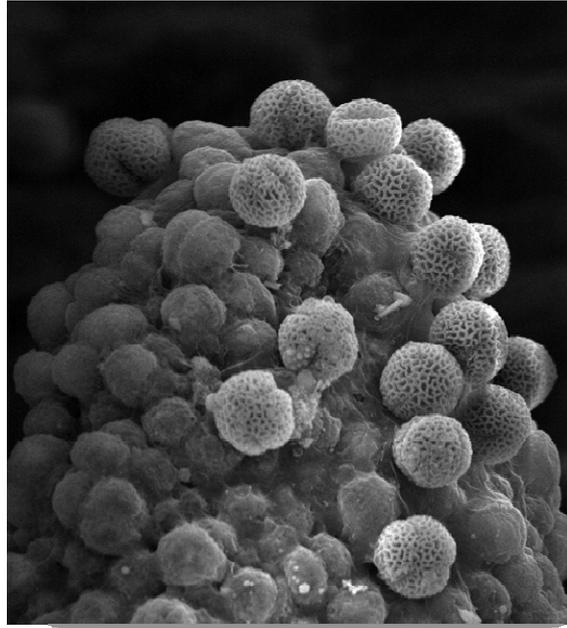
Aristóteles





1. Se ha realizado por primera vez una clasificación sistemática desde el punto de vista funcional de las enzimas estererasas presentes en el polen de una planta con estigma de tipo húmedo. El polen de olivo contiene numerosas enzimas estererasas, las cuales están implicadas en la modificación selectiva de la pared celular del tubo polínico, en procesos de comunicación celular y en la movilización de los lípidos de reserva durante la germinación y el crecimiento del tubo polínico.
2. El perfil electroforético de actividad esterasa varía de forma significativa en el polen de 12 de los 13 cultivares de olivo analizados. Por tanto, estas proteínas podrían ser un buen marcador isoenzimático para la identificación varietal en bancos de germoplasma de olivo. Además, estas diferencias podrían traducirse en variaciones entre cultivares en la propia funcionalidad del polen durante la germinación.
3. La composición del proteoma del exudado estigmático muestra diferencias significativas entre especies, las cuales se traducen en importantes divergencias funcionales que en su mayor parte se podrían explicar por las propias características morfológicas y ecológicas de cada especie.
4. El exudado estigmático no es únicamente el lugar en el que el polen se adhiere, hidrata y germina. La presencia de un gran número de proteínas y enzimas sugiere que es un sitio metabólicamente activo, y que participa directamente en la comunicación con el polen, la regulación del crecimiento del tubo polínico, y su adhesión y orientación en el estigma.
5. El exudado estigmático y el “pollen coat” de olivo contienen diversas enzimas estererasas implicadas en la modificación selectiva de los componentes polisacáridicos de la pared del tubo polínico y en el catabolismo de los lípidos de reserva del polen.
6. La mayoría de las proteínas del exudado son secretadas a través del Golgi. Sin embargo, algunas de las proteínas identificadas no presentan un péptido señal, y podrían ser secretadas a través de la membrana plasmática mediante un mecanismo exocítico alternativo no regulado.
7. El polen de olivo expresa una enzima pectina metilesterasa (PME) de tipo I durante su desarrollo. Esta enzima estaría implicada, a través de la degradación controlada de los compuestos pécticos, en la separación de las microsporas de la tétrada en la antera, y en la consolidación de la pared celular primaria del tubo polínico durante la germinación.



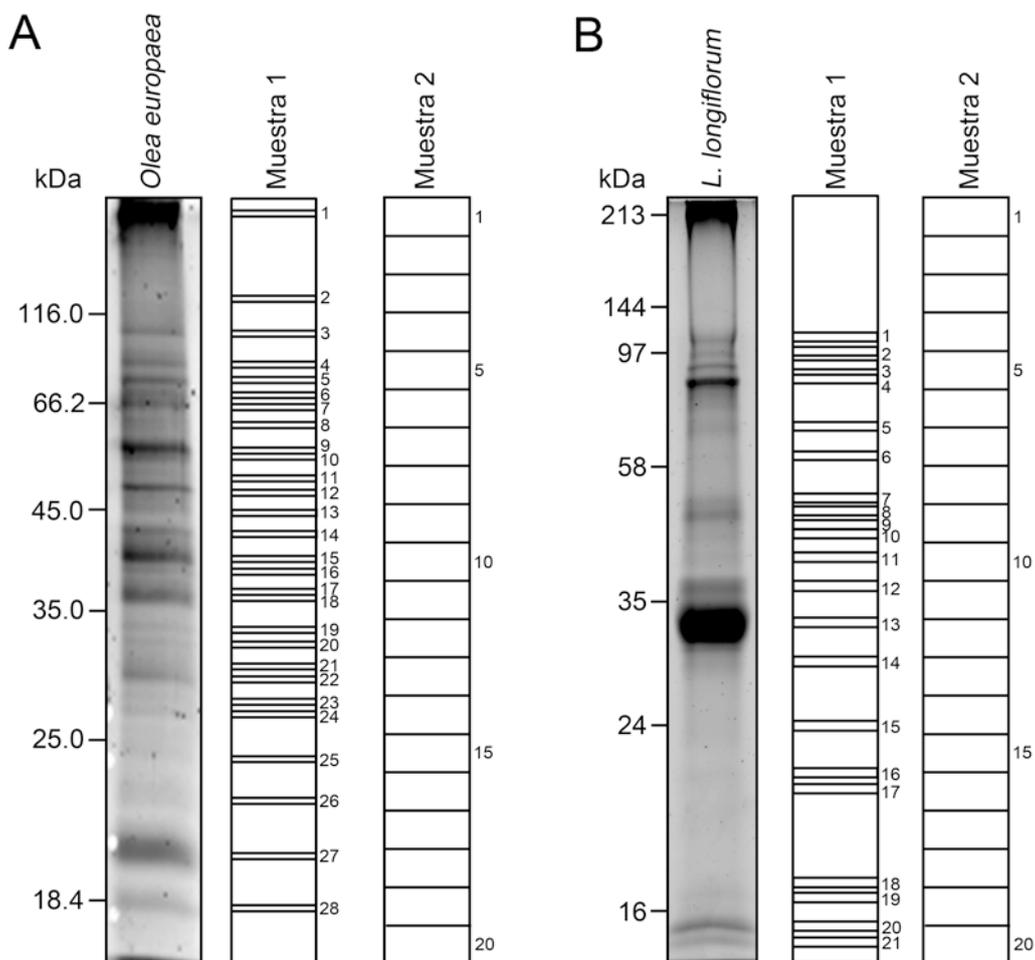


## **ANEXOS**

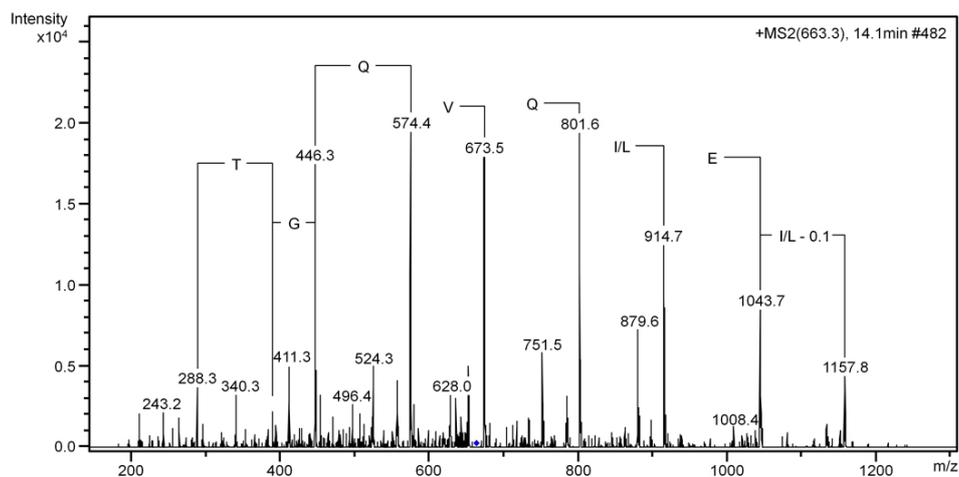
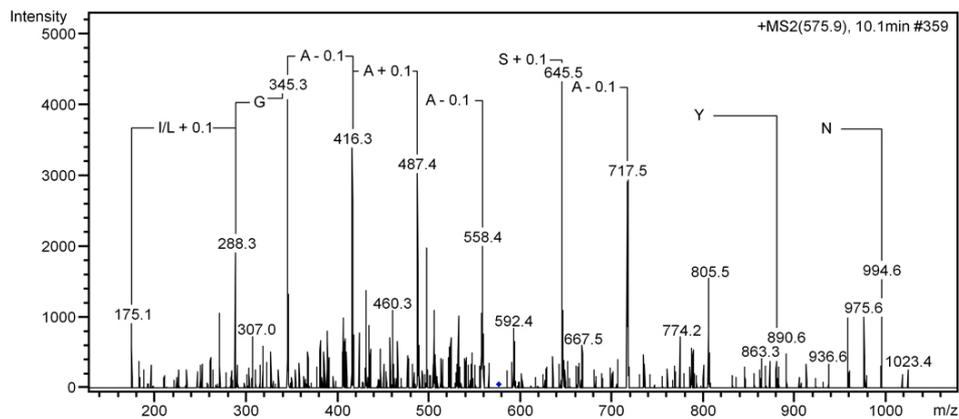
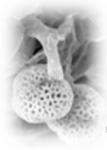
“La genialidad comienza las grandes empresas, pero sólo el trabajo las termina”

Joseph Joubert





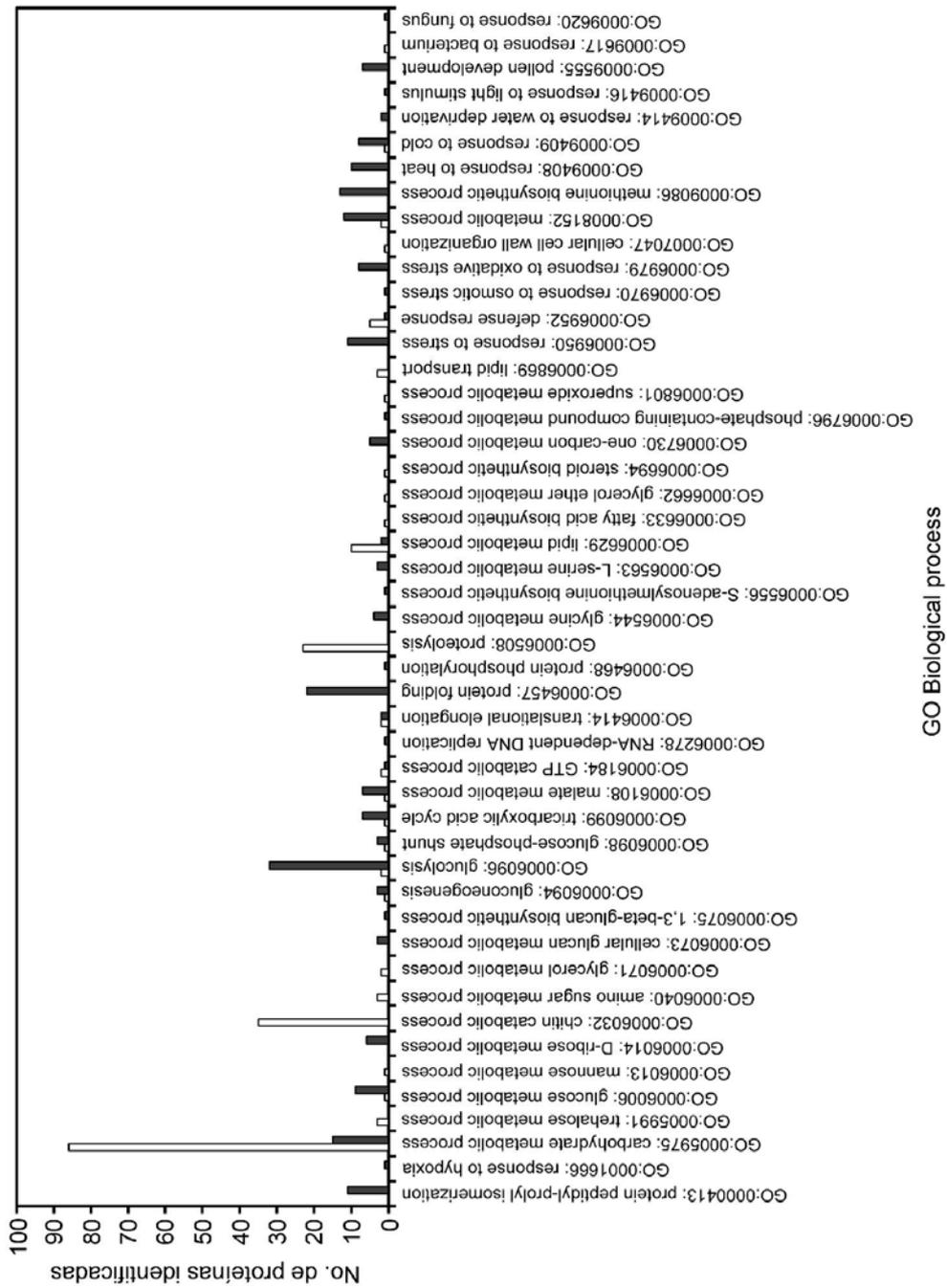
**Anexo 1. A)** Perfil electroforético de las proteínas del exudado de olivo y patrón de escisión de las distintas bandas proteicas analizadas mediante espectrometría de masas en dos muestras independientes. **B)** Perfil electroforético de las proteínas del exudado de *L. longiflorum* y patrón de escisión de las distintas bandas proteicas analizadas mediante espectrometría de masas en dos muestras independientes.



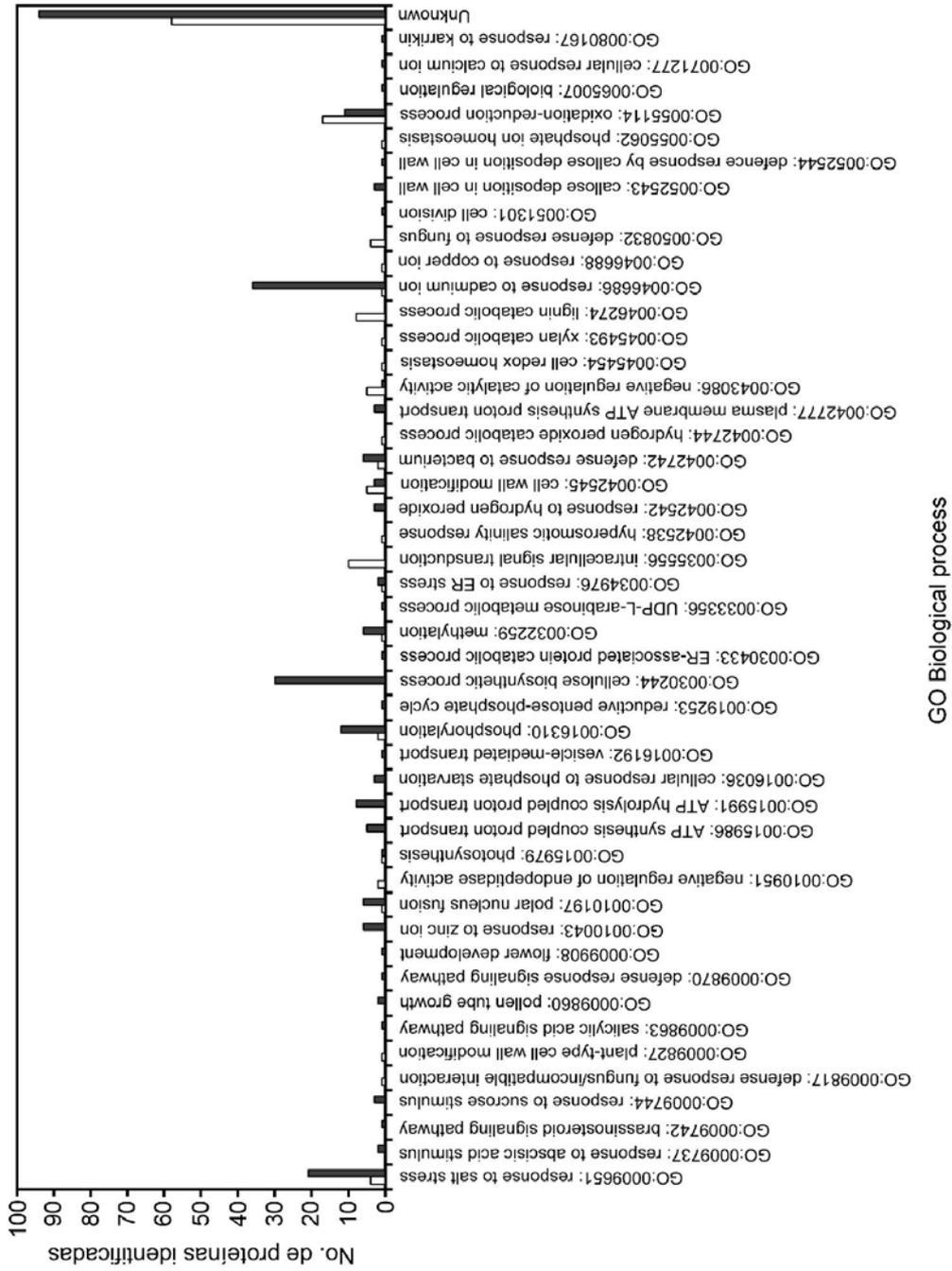
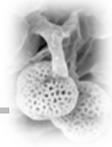
**Anexo 2.** A) Identificación de una esterasa/lipasa de tipo GDSL de *Arabidopsis thaliana* mediante búsqueda de homología en Mascot. Espectro MS/MS del ión parental doblemente cargado en m/z 575,9 correspondiente al péptido GVNYSAAAGIR. **(B)** Identificación de una enzima poligalacturonasa de *Gossypium hirsutum* por homología de secuencia mediante secuenciación *de novo* y BLAST. Espectro MS/MS del ión parental doblemente cargado en m/z 663,3 correspondiente al péptido APLELQVQGTLR.



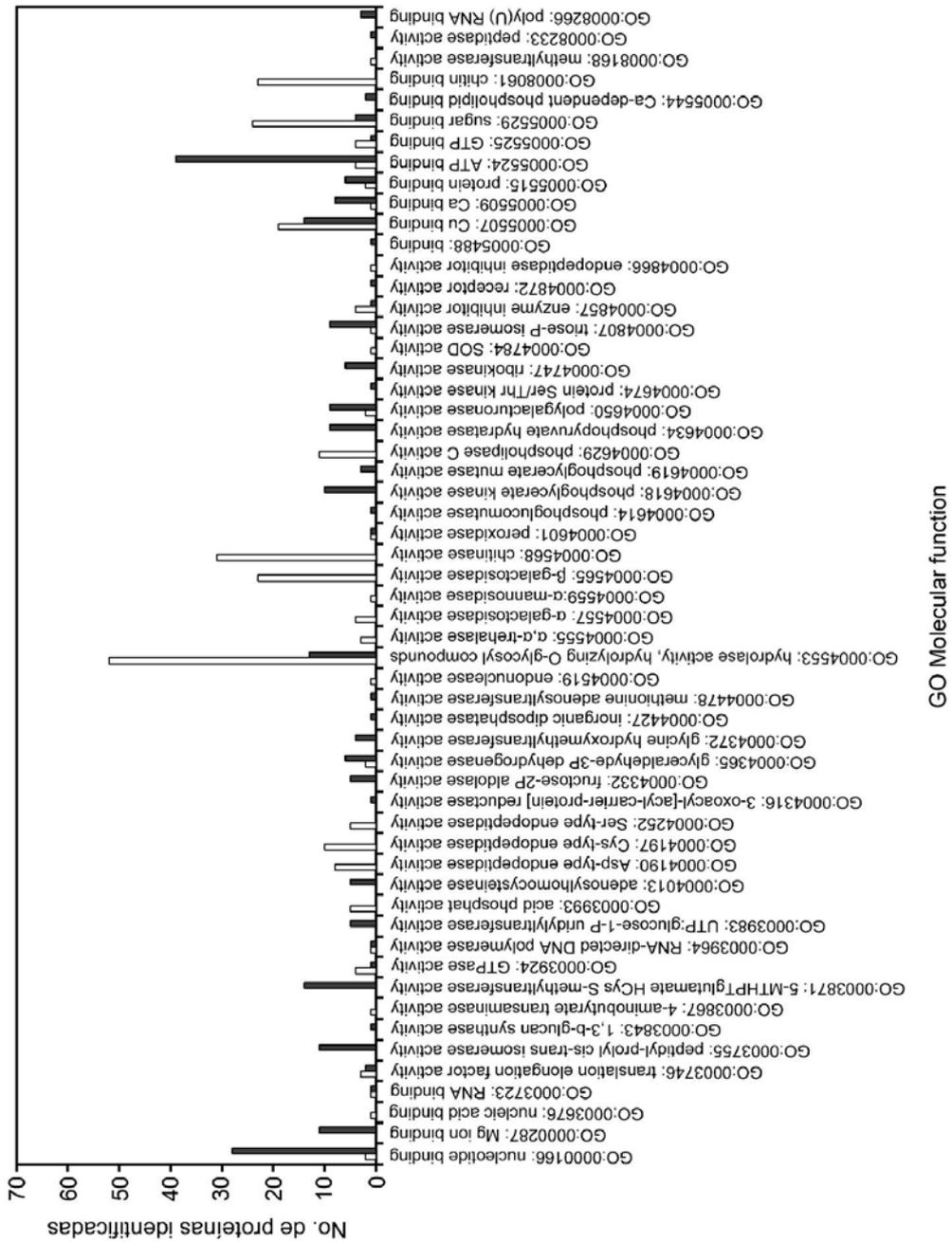
**Anexo 3.** Listado de proteínas identificadas mediante nano-LC-ESI-MS/MS y secuenciación *de novo* en el exudado estigmático de olivo y *Lilium*.



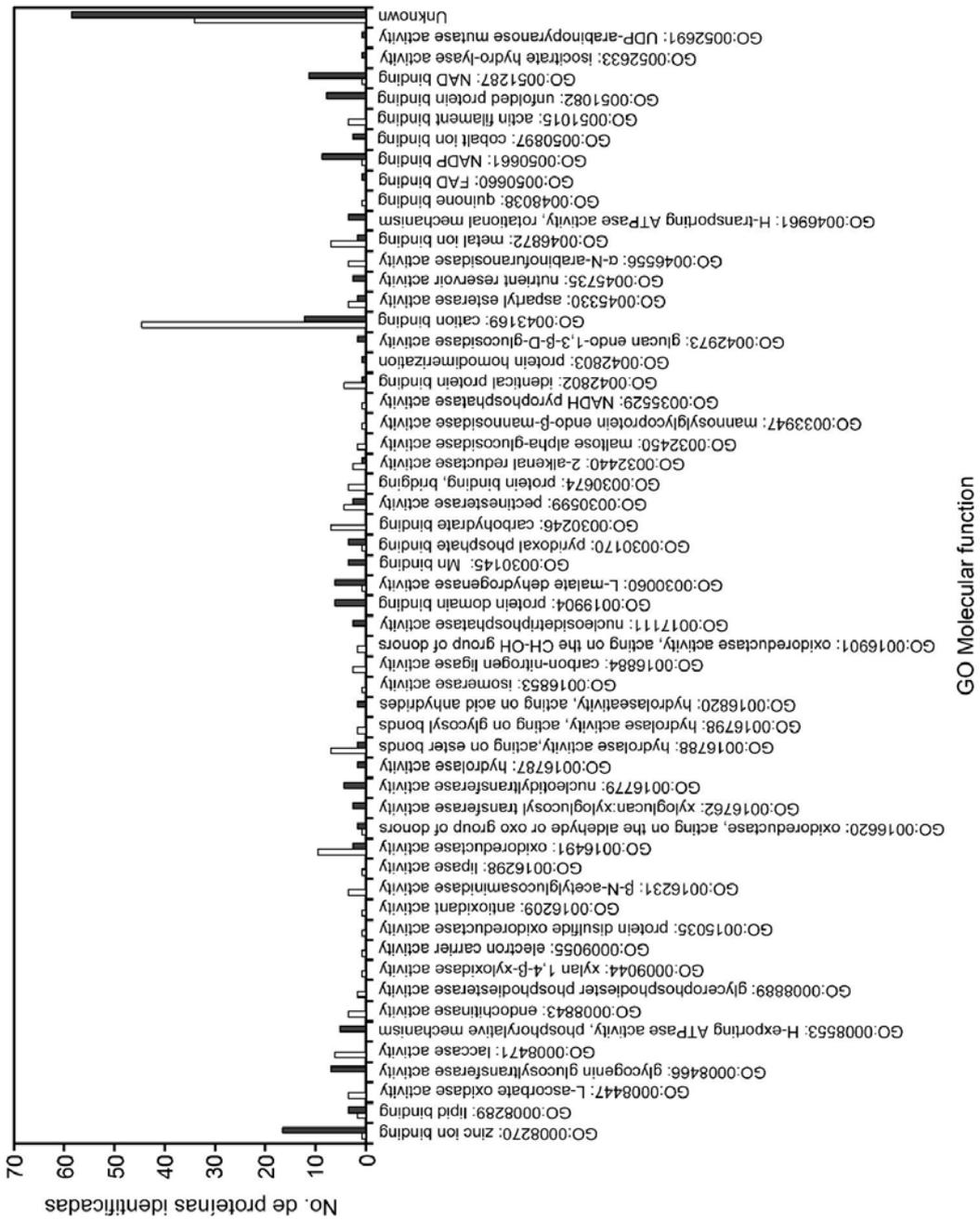
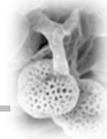
**Anexo 4.** Procesos biológicos en los que participan las proteínas del exudado de olivo (barras grises) y *Lilium* (barras blancas), en base a la clasificación de Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>).



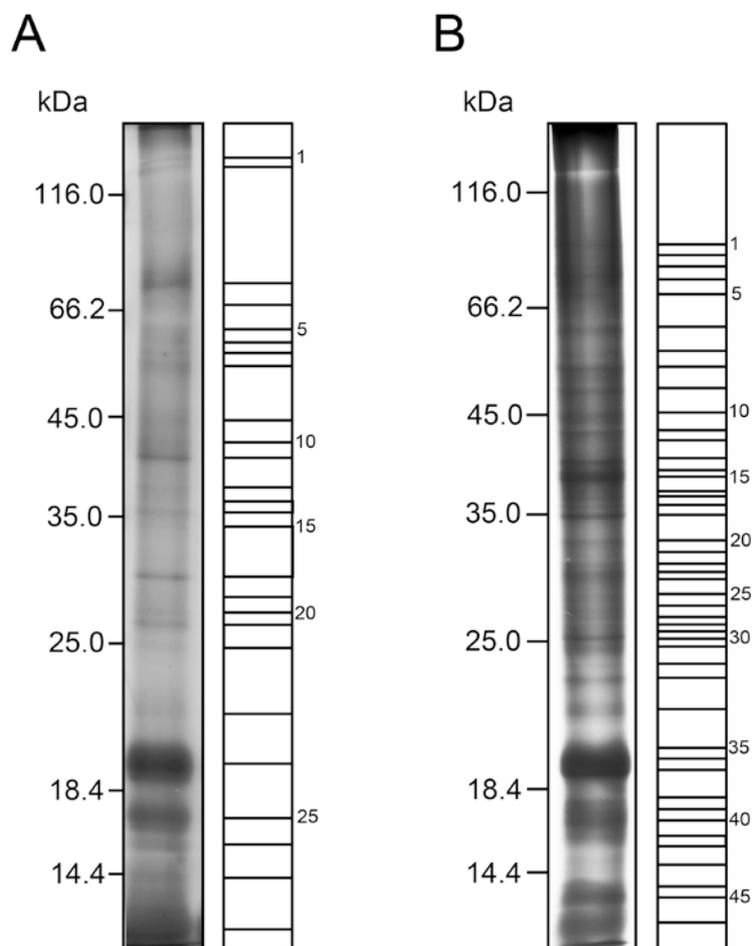
Anexo 4. Continuación.



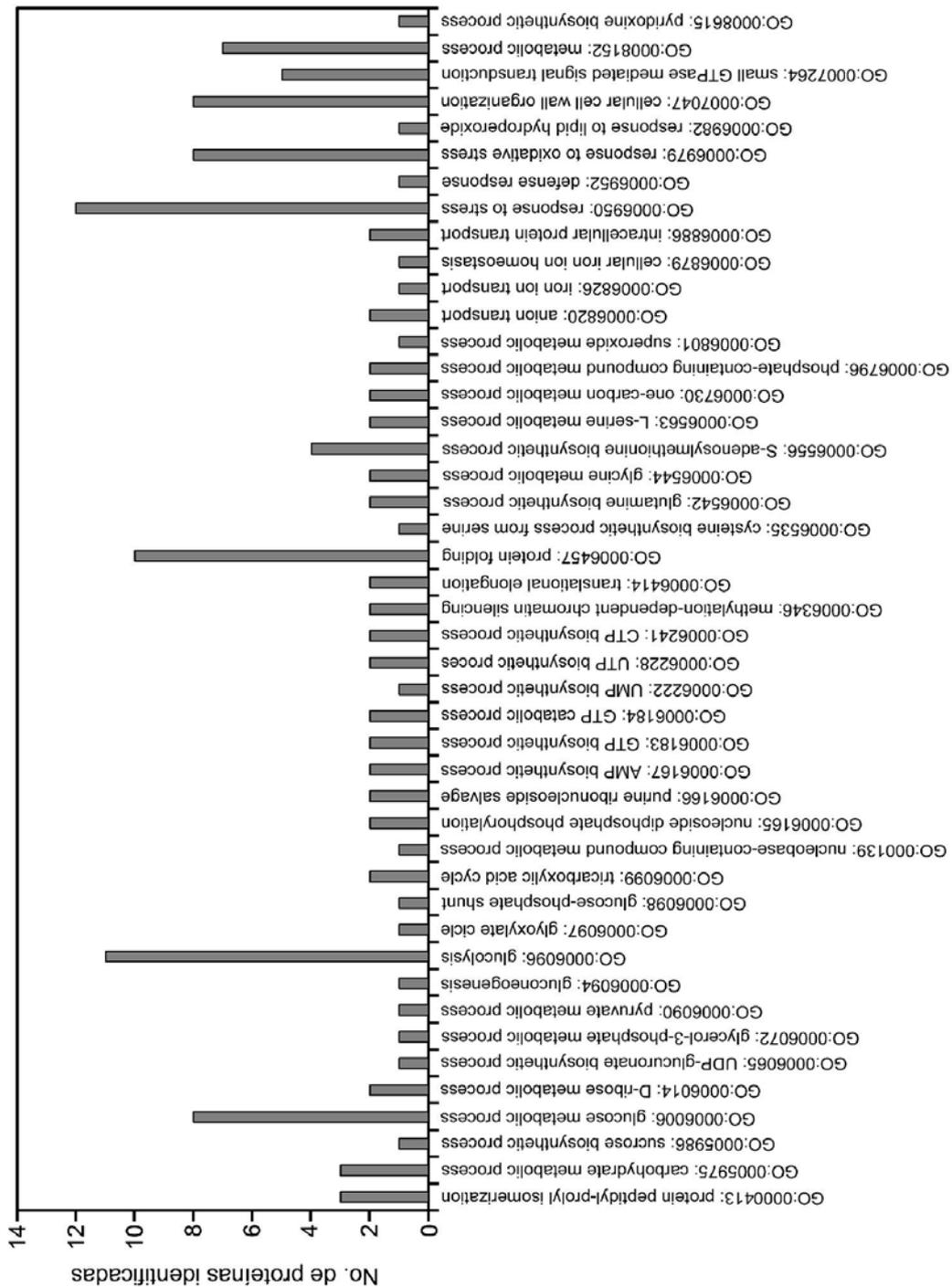
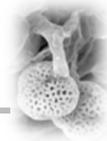
Anexo 5. Funciones moleculares de las proteínas del exudado de olivo (barras grises) y *Lilium* (barras blancas), en base a la clasificación de Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>).



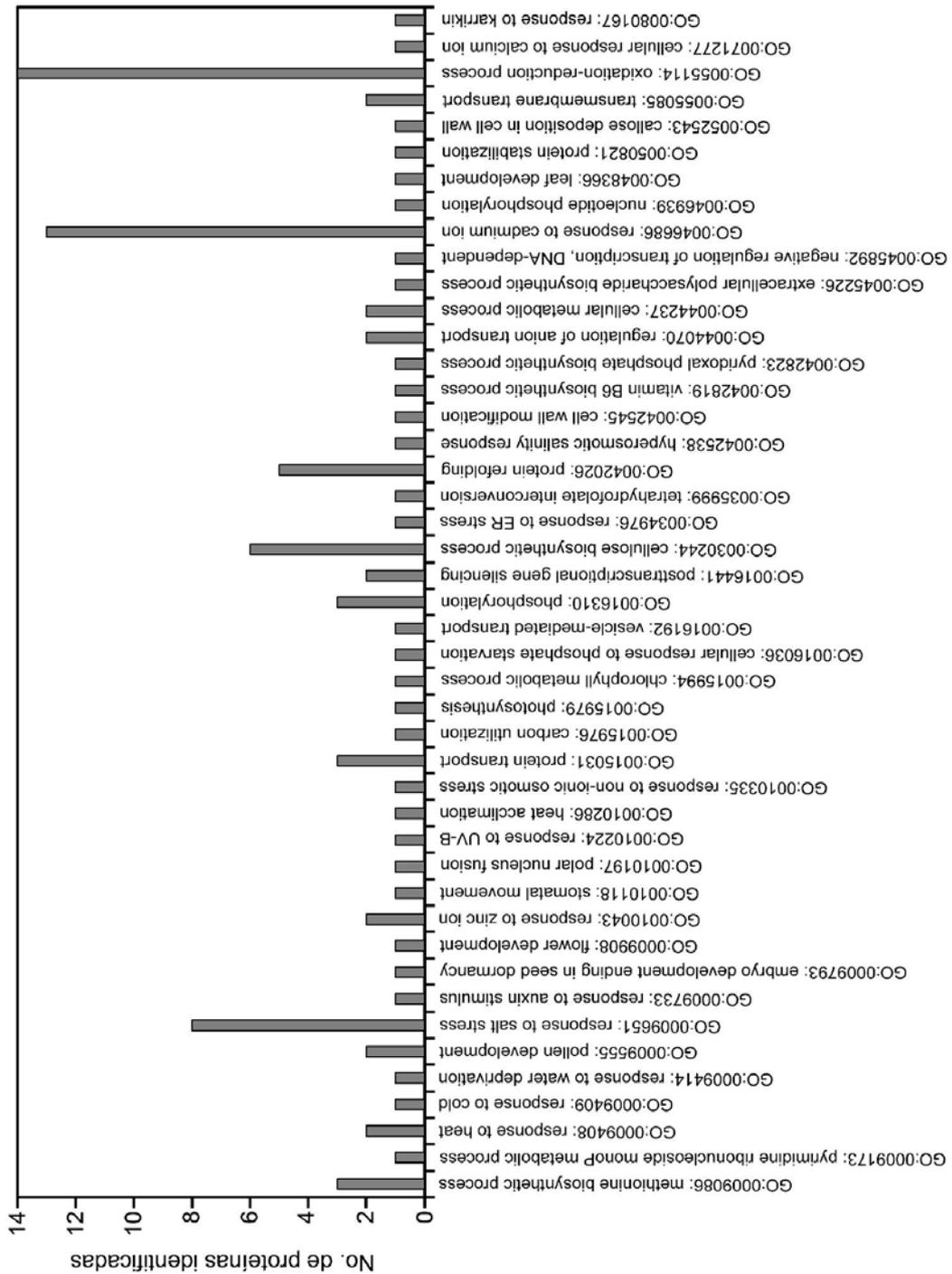
Anexo 5. Continuación.



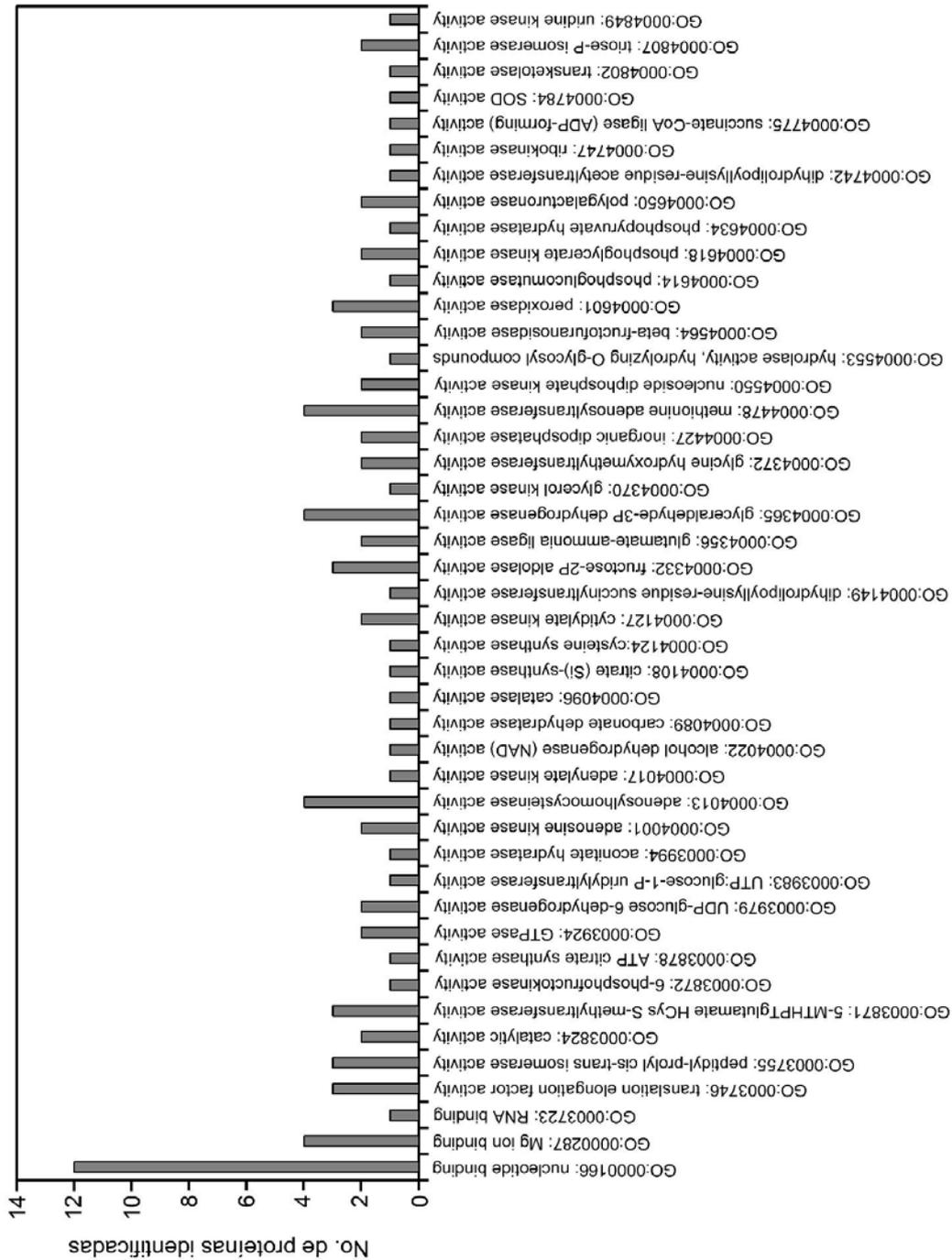
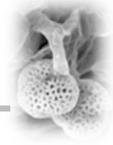
**Anexo 6.** Perfil electroforético de las proteínas del “pollen coat” de olivo y patrón de escisión de las distintas bandas proteicas analizadas mediante espectrometría de masas en dos muestras independientes. **A)** Marcado de proteínas con CyDye. **B)** Extracción de proteínas con ciclohexano.



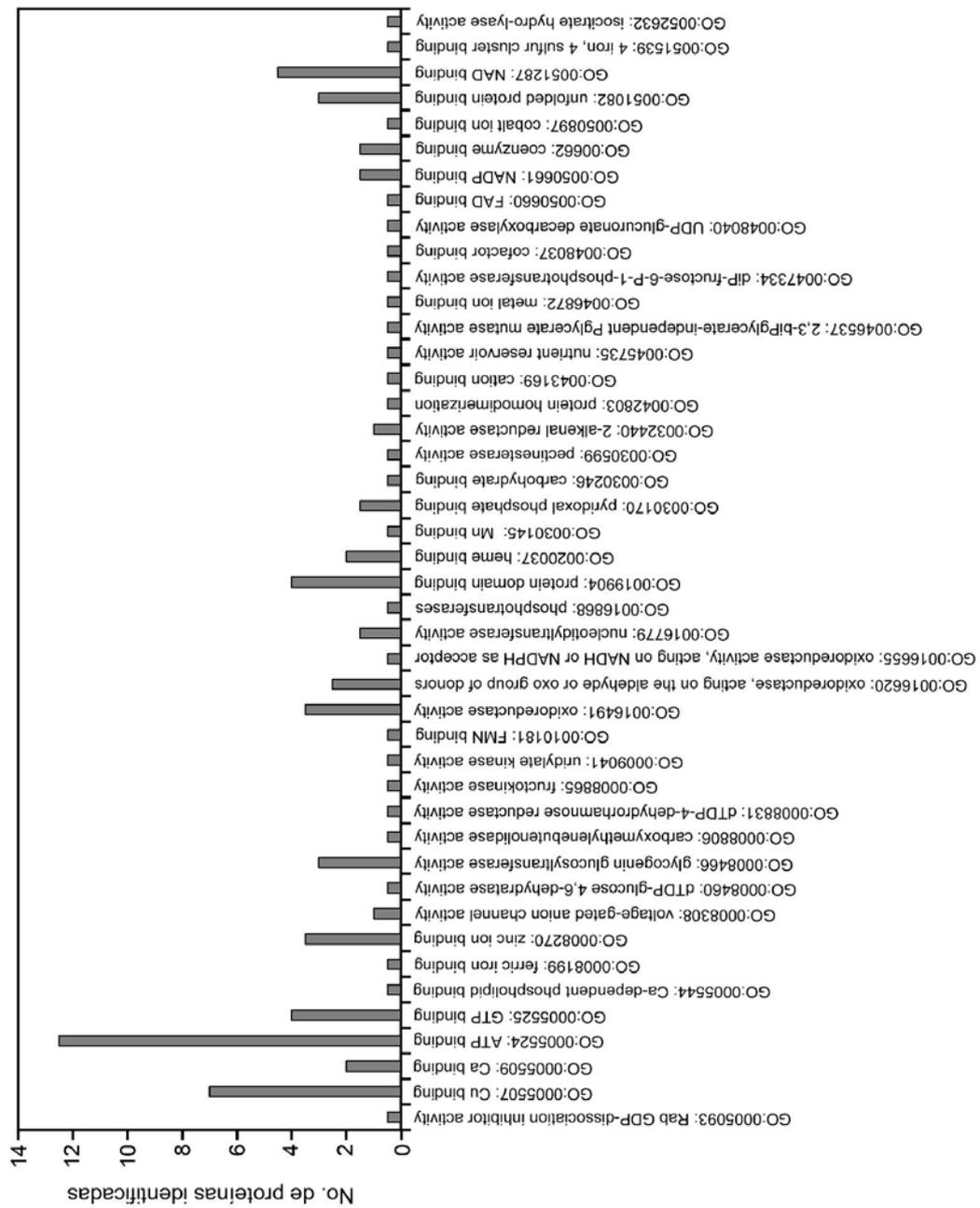
**Anexo 7.** Procesos biológicos en los que participan las proteínas del “pollen coat” de olivo en base a la clasificación de Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>).



Anexo 7. Continuación.



**Anexo 8.** Funciones moleculares de las proteínas del “pollen coat” de olivo en base a la clasificación de Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>).



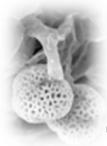
Anexo 8. Continuación.



---

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
Ap	Apertura
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Álbumina de suero bovino
CL	Cuerpo lipídico
Ca	Calosa
CG	Célula generativa
CHAPS	3-(cloroamidopropilo)-dimetilamonio-1-propanosulfato
Ci	Citoplasma
COI	Consejo Oleícola Internacional
CV	Célula vegetativa
DHM	Dimetilformamida
DIFP	Fluorofosfato de diisopropilo
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
Ex	Exina
FCR	Reacción fluorocromática
FDA	Diacetato de fluoresceína
In	Intina
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem
LTP	Proteínas de transferencia de lípidos
MET	Microscopía electrónica de transmisión
MF	Microscopía de fluorescencia
Mi	Microspora
MLC	Microscopía láser confocal
MO	Microscopía óptica
NE	Esterasa no específica
NV	Núcleo vegetativo
Pa	Papila

---

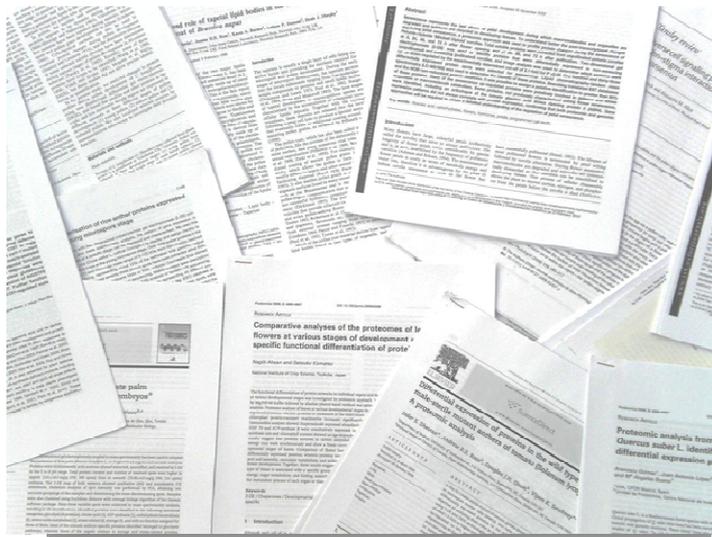


---

PBS	Tampón fosfato salino
P	Pared celular
PC	“Pollen coat”
Po	Polen
p-CMB	Benzoato de p-cloromercurio
PG	Poligalacturonasa
PME	Pectina metilesterasa
PNB	Butirato de p-nitrofenilo
Po	Polen maduro
Pr	Primexina
RACE	Amplificación rápida de los extremos de ADNc
RE	Retículo endoplasmático
SDS	Sulfato de sodio y dodecilo
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
TCA	Ácido tricloroacético
TP	Tubo polínico
TT	Tejido transmisor
V	Vacuola

---

**Anexo 9.** Listado de abreviaturas (continuación).



# BIBLIOGRAFÍA

“En el punto en el que se detiene la ciencia, empieza la imaginación”

Heyendhal





- Abercrombie JM, O'Meara BC, Moffatt AR, Williams JH (2011) Developmental evolution of flowering plant pollen tube cell walls: callose synthase (CalS) gene expression patterns. *BMC Evol. Develop.* 2: 14
- Albani D, Altosaar I, Arnison PG, Fabijanski SF (1991) A gene showing sequence similarity to pectin esterase is specifically expressed in developing pollen of *Brassica napus*: sequences in its 5' flanking region are conserved in other pollen-specific promoters. *Plant Mol. Biol.* 16: 501-513
- Albersheim P, Darvill AG, O'Neill MA, Schols H, Voragen AGJ (1996) An hypothesis: The same six polysaccharides are components of the primary cell wall of all higher plants. In: Visser J, Voragen AGJ (Eds.) *Pectins and Pectinases*, Amsterdam: Elsevier pp. 47-53
- Alché JD, Castro AJ, Olmedilla A, Fernandez MC, Rodríguez R, Villalba M, Rodríguez-García MI (1999) The major olive pollen allergen (Ole e 1) shows both gametophytic and sporophytic expression during anther development, and its synthesis and storage takes place in the RER. *J. Cell Sci.* 112: 2501-2509
- Alché JD, Corpas FJ, Rodríguez-García MI, del Río LA (1998) Superoxide dismutase isoenzymes of olive pollen. *Physiol. Plant.* 104: 772-776
- Alché JD, Fernández MC, Rodríguez-García MI (1994) 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
- Alché JD, M'rani-Alaoui M, Castro AJ, Rodríguez-García MI (2004) 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: 1149-1157
- Alché JD, Rodríguez-García MI (1997) Fluorochromes for detection of callose in meiocytes of olive (*Olea europaea* L.). *Biotech. Histochem.* 72: 285-290
- Altamura Betti MM, Pasqua G, Mazzolani G (1982b) Development of the female gametophyte in *Olea europaea* L. *Ann. Bot.* 40: 111-117



- Anderson TF (1951) Techniques for the preservation of three dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. *Trans. N.Y. Acad. Sci.* 13: 130-133
- Aouar L, Chebli Y, Geitmann A (2010) Morphogenesis of complex plant cell shapes - The mechanical role of crystalline cellulose in growing pollen tubes. *Sex. Plant Reprod.* 23: 15-27
- Aoyagi S, Sugiyama M, Fukuda H (1998) BEN1 and ZEN1 cDNAs encoding S1-type DNase that are associated with programmed cell death in plants. *FEBS Lett.* 429: 134-138
- Arif SA, Hamilton RG, Yusof F, Chew NP, Loke YH, Nimkar S, Beintema JJ, Yeang HY (2004) Isolation and characterization of the early nodule-specific protein homologue (Hev b 13), an allergenic lipolytic esterase from *Hevea brasiliensis* latex. *J. Biol. Chem.* 279: 23933-23941
- Ariizumi T, Toriyama K (2011) Genetic regulation of sporopollenin synthesis and pollen exine development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62: 437-460
- Aspinall GO, Rosell KG (1978) Polysaccharide component in the stigmatic exudate from *Lilium longiflorum*. *Phytochemistry* 17: 919-922
- Atkinson AH, Heath RL, Simpson RJ, Clarke AE, Anderson MA (1993) Proteinase inhibitors in *Nicotiana glauca* stigmas are derived from a precursor protein which is processed into five homologous inhibitors. *Plant Cell* 5: 203-213
- Baker CJ, Bateman DF (1978) Cutin degradation by plant pathogenic fungi. *Phytopathol.* 69:1577-1584
- Balestrieri C, Castaldo D, Giovane A, Quagliuolo L, Servillo L (1990) A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit (*Actinidia chinensis*). *Eur. J. Biochem.* 193: 183-187
- Baluška F, Mancuso S, Volkmann D, Barlow PW (2004) Root apices as plant command centres: the unique, “brain-like” status of the root apex transition zone. *Biologia (Bratislava)* 59: 7-19
- Baluška F, Volkmann D, Menzel D (2005) Plant synapses: actin-based domains for cell-to-cell communication. *Trends Plant Sci.* 10: 106-111



- Barral P, Suárez C, Batanero E, Alfonso C, Alché JD, Rodríguez-García MI, Villaba M, Rivas G, Rodríguez R (2005) 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. *Biochem. J.* 390: 77-84
- Barranco D, Fernández-Escobar R, Rallo L (2008) El cultivo del olivo. Departamento de agronomía. Escuela superior de Ingenieros agrónomos y Agricultura y Pesca. Ediciones Mundi-Prensa. España. p. 846
- Barranco D, Milona G, Rallo L (1994) Épocas de floración de cultivares de olivo en Córdoba. *Investigación Agraria* 9: 213-220
- Barranco D, Rallo L (1984) Las variedades de olivo cultivadas en Andalucía. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y Junta de Andalucía, 387
- Bednarska E (1992) The localization of nonspecific esterase and cholinesterase activity in germinating pollen and in pollen tube of *Vicia faba* L. The effect of actinomycin D and cycloheximide. *Biol. Plant.* 34: 229-240
- Bednarska E, Lenartowska M, Niekraś L (2005) Localization of pectins and Ca<sup>2+</sup> ions in unpollinated and pollinated wet (*Petunia hybrida* Hort.) and dry (*Haemanthus albiflos* L.) stigma. *Folia Histochem. Cytobiol.* 43: 249-259
- Beers EP, Woffenden BJ, Zhao C (2000) Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant Mol Biol.* 44: 399-415
- Belaj A, Trujillo I, De La Rosa, R, Rallo L, Giménez MJ (2001) Polymorphism and discriminating capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 126: 64-71
- Belenghi B, Salomon M, Levine A (2004) Caspase-like activity in the seedlings of *Pisum sativum* eliminates weaker shoots during early vegetative development by induction of cell death. *J. Exp. Bot.* 55: 889-897
- Benen JAE, Kester HCM, Visser J (1999) Kinetic characterization of *Aspergillus niger* N400 endopolygalacturonases I, II and C. *Eur. J. Biochem.* 259: 577-585
- Benen JAE, van Alebeek GJWM, Voragen AGJ, Visser J (2003a) Pectic esterases. In: Whitaker JR, Voragen AGJ, Wong DWS Eds.) *Handbook of Food Enzymology* New York: Marcel Dekker Inc. pp. 849-856



- Benkert R, Obermeyer G, Bentrup FW (1997) The turgor pressure of growing lily pollen tubes. *Protoplasma* 198: 1-8
- Berger D, Altmann T (2000) A subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* 14: 1119-1131
- Bergey G, Howe G, Ryan CA (1996) Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12053-12058
- Bergsson G, Agerberth B, Jörnvall H, Gudmundsson GH (2005) Isolation and identification of antimicrobial components from the epidermal mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *FEBS J.* 272:4960-4969
- Bernard C, Traub M, Kunz HH, Hach S, Trentmann O, Möhlmann T (2011) Equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) is critical for pollen germination and vegetative growth in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 62: 4627-4637
- Besnard G, Berville A (2000) Multiple origins for Mediterranean olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea*) based upon mitochondrial DNA polymorphisms. *Life Sci.* 323: 173-181
- Beuve N, Rispaill N, Laine P, Cliquet JB, Ourry A, Ledebunff E (2004). Putative role of aminobutyric acid (GABA) as a long-distance signal in up-regulation of nitrate uptake in *Brassica napus* L. *Plant Cell Environ.* 27: 1035-1046
- Biely P, MacKenzie CR, Puls J, Schneider H (1986) Cooperativity of esterases and xylanases in the enzymatic degradation of acetyl xylan. *Biotechnol.* 4: 731-733
- Bogani P, Cavalieri D, Petruccelli R, Polsinelli L, Roselli G (1994) Identification of olive tree cultivars by using random amplified polymorphic DNA. *Acta Hort.* 356:98-101
- Bonnin E, Clavurier K, Daniel S, Kauppinen S, Mikkelsen JDM, Thibault JF (2008) Pectin acetyl esterases from *Aspergillus* are able to deacetylate homogalacturonan as well as rhamnogalacturonan. *Carbohydr. Polym.* 74: 411-418



- Bonnin E, Le Goff A, van Alebeek GJWM, Voragen AGJ, Thibault JF (2003) Mode of action of *Fusarium moniliforme* endopolygalacturonase towards acetylated pectin. *Carbohydr. Polym.* 52: 381-388
- Bordenave M (1996) Analysis of pectin methyl esterases. In: Linskens HF (Eds.) *Plant cell wall analysis*. Berlin: Springer New York, pp. 165-180
- Bordenave M, Goldberg R, Huet JC, Pernollet JC (1995) A novel protein from mung bean hypocotyl cell walls with acetyl esterase activity. *Phytochemistry* 38: 315-319
- Bornscheuer U, Reif OW, Lausch R, Freitag R, Scheper T, Kolisis FN, Menge U (1994) Lipase of *Pseudomonas cepacia* for biotechnological purposes: purification, crystallization and characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 1201: 55-60
- Bosch M, Cheung AY, Hepler PK (2005) Pectin methylesterase, a regulator of pollen tube growth. *Plant Physiol.* 138: 1334-1346
- Bosch M, Hepler PK (2005) Pectin methylesterases and pectin dynamics in pollen tubes. *Plant Cell* 17: 3219-3226
- Bouché N, Fromm H (2004) GABA in plants: just a metabolite? *Trends Plant Sci.* 9: 110-115
- Bouché, N, Yellin A, Snedden WA, Fromm H (2005) Plant-specific calmodulin-binding proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 435-466
- Bozhkov PV, Filonova LH, Suarez MF (2005) Programmed cell death in plant embryogenesis. *Curr. Topics Dev. Biol.* 67: 135-179
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Bradley MV, Griggs WH (1963) Morphological evidence of incompatibility in *Olea europaea* L. *Phytomorphology* 13: 141-155
- Brenner ED, Stahlberg R, Mancuso S, Vivanco J, Baluška F, Van Volkenburgh E (2006) Plant neurobiology: an integrated view of plant signaling. *Trends Plant Sci.* 11: 413-419



- Brett CT, Waldron KW (1996) Physiology and biochemistry of plant cell walls. London: Chapman & Hall
- Brown PH, Ho T-HD (1987) Biochemical properties and hormonal regulation of barley nuclease. *Eur. J. Biochem.* 168: 357-364
- Brown SM, Crouch ML (1990) Characterization of a gene family abundantly expressed in *Oenothera organensis* pollen that shows sequence similarity to polygalacturonase. *Plant Cell* 2: 263-274
- Brummell DA (2006) Cell wall disassembly in ripening fruit. *Funct. Plant Biol.* 33: 103-119
- Brummell DA, Harpster MH (2001) Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 47: 311-340
- Caffall KH, Mohnen D (2009) The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 344: 1879-1900
- Calderwood SK, Mambula SS, Gray PJ Jr, Theriault JR (2007) Extracellular heat shock proteins in cell signalling. *FEBS Lett.* 581: 3689-3694
- Carpita N, Mc Cann M (2000) The cell wall. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, Buchanan BB, Gruissem MW, Jones RL (Eds.), American Society of Plant Physiologists, Rockville, USA, pp. 52-108
- Carpita NC, Gibeaut DM (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3: 1-30
- Carter C, Thornburg RW (2004) Is the nectar redox cycle a floral defense against microbial attack?. *Trends Plant Sci.* 9: 320-324
- Castro AJ, Alché JD, Cuevas J, Romero PJ, Alché V, Rodríguez-García MI (2003) Pollen from different olive tree cultivars contains varying amounts of the major allergen Ole e 1. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 131: 164-173
- Castro AJ, Bednarczyk A, Schaeffer-Reiss C, Rodríguez-García MI, Van Dorselaer A, Alché JD (2010) Screening of Ole e 1 polymorphism among olive cultivars by peptide mapping and N-glycopeptide analysis. *Proteomics* 10: 953-962



- Castro AJ, Clément C (2007) Sucrose and starch catabolism in the anther of *Lilium* during its development: a comparative study among the anther wall, locular fluid and microspore/pollen fractions. *Planta* 225: 1573-1582
- Chae K, Kieslich CA, Morikis D, Kim SC, Lord EM (2009) A gain-of-function mutation of *Arabidopsis* Lipid Transfer Protein 5 disturbs pollen tube tip growth and fertilization. *Plant Cell* 21: 3902-3914
- Chae K, Li Z, Li K, Morikis D, Kim ST, Mollet JC, de la Rosa N, Tan K, Lord EM (2007) Two SCA (stigma/style cysteine-rich adhesin) isoforms show structural differences that correlate with their levels of *in vitro* pollen tube adhesion activity. *J. Biol. Chem.* 282: 33845-33858
- Chen EMW, Mart AJ (1996) Nature of sites hydrolyzable by endopolygalacturonase in partially-esterified homogalacturonans. *Carbohydr. Polym.* 29: 129-136
- Chen LQ, Ye D (2007) Roles of pectin methylesterases in pollen tube growth. *J. Integ. Plant Biol.* 49: 94-98
- Chiang JY, Balic N, Hsu SW, Yang CY, Ko CW, Hsu YF, Swoboda I, Wang CS (2006) A pollen-specific polygalacturonase from lily is related to major grass pollen allergens. *Plant Physiol. Biochem.* 44: 743-751
- Chivasa S, Ndimba BK, Simon WJ, Robertson D, Yu XL, Knox JP, Bolwell P, Slabas AR (2002) Proteomic analysis of the *Arabidopsis thaliana* cell wall. *Electrophoresis* 23: 1754-1765
- Christensen TMIE, Nielsen JE, Mikkelsen JD (1996) Isolation, characterization and immunolocalization of orange fruit acetyl esterase. In: *Pectins and Pectinases*, Visser J and Voragen AGJ (Eds.) (Amsterdam: Elsevier Sciences), pp. 723-730
- Ciardiello MA, Tamburrini M, Tuppo L, Carratore V, Giovane A, Mattei B, Camardella L (2004) Pectin methylesterase from kiwi and kaki fruits: Purification, characterization, and role of pH in the enzyme regulation and interaction with the kiwi proteinaceous inhibitor. *J. Agric. Food Chem.* 52: 7700-7703
- Coenen GJ, Bakx EJ, Verhoef RP, Schols HA, Voragen AGJ (2007) Identification of the connecting linkage between homo- or



- xylogalacturonan and rhamnogalacturonan type I. *Carbohydr. Polym.* 70: 224-235
- Coimbra S, Costa M, Mendes MA, Pereira AM, Pinto J, Pereira LG (2010) Early germination of *Arabidopsis* pollen in a doble null mutant for the arabinogalactan protein genes AGP6 and AGP11. *Sex. Plant Reprod.* 23: 199-205
- Consejo Oleícola Internacional (2011). <http://www.internationaloliveoil.org/>
- Constabel CP, Brisson N (1995) Stigma- and vascular-specific expression of the PR-10 gene of potato: a novel pattern of expression of a pathogenesis-related gene. *Mol. Plant Microbe Interact.* 8: 104-113
- Cuevas J (2005) Incompatibilidad polen-pistilo. In: Rallo L, Barranco D, Caballero J, Martín A, del Río C, Tous J, Trujillo I (eds.) *Las variedades de olivo cultivadas en España. Libro II: Variabilidad y Selección.* Junta de Andalucía, ediciones Mundi-Prensa y COI, Sevilla, España
- Cuevas J, Díaz-Hermoso AJ, Galián D, Hueso JJ, Pinillos V, Sola D, Polito VS (2001) Response to cross-pollination and choice of pollinisers for the olive cultivars (*Olea europaea* L.) “Manzanilla de Sevilla”, “Hojiblanca” and “Picual”. *Olivae* 85: 26-32
- Cuevas J, Rallo L, Rapoport HF (1994) Staining procedure for the observation of olive pollen tube behavior. *Acta Hort.* 474: 293-296
- Danon A, Rotari VI, Gordon A, Mailhac N, Gallois P (2004) Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in *Arabidopsis*, which is mediated by caspase-like activities and which can be suppressed by caspase inhibitors, p35 and defender against apoptotic death. *J. Biol. Chem.* 279: 779-787
- Dardelle, F, Lehner A, Ramdani Y, Bardor M, Lerouge P, Driouich A, Mollet JC (2010) Biochemical and immunocytological characterizations of *Arabidopsis thaliana* pollen tube cell wall. *Plant Physiol.* 153: 1563-1576
- Daugherty CJ, Rooney MF, Miller PW, Ferl RJ (1996) Molecular organization and tissue-specific expression of an *Arabidopsis* 14-3-3 gene. *Plant Cell* 8: 1239-1248



- de Carvalho VM, Marques RM, Lapenta AS, Machado MFPS (2003) Functional classification of esterases from leaves of *Aspidosperma polyneuron* M. Arg. (*Apocynaceae*). Genet. Mol. Biol. 26: 195-198
- de Graaf BHJ, Derksen JWM, Mariani C (2001) Pollen and pistil in the progamic phase. Sex. Plant Reprod. 14: 41-55
- de la Rosa R, James CM, Tobutt KR (2004) Using microsatellites for paternity testing in olive progenies. HortSci. 39:51-354
- De la Rosa R, James M, Tobutt, KR (2002) Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the *Oleaceae*. Mol. Ecol. Note 2: 265-267
- De Lorenzo G, Cervone F, Hahn MG, Darvill A, Albersheim P (1991) Bacterial endopectate lyase: evidence that plant cell wall pH prevents tissue maceration and increases the half-life of elicitor-active oligogalacturonides. Physiol. Mol. Plant Pathol. 39: 335-344
- de Nettancourt D (1977) Incompatibility in angiosperms. Monographs on theoretical and applied genetics, 3. Springer-Verlag, New York
- Dearnaley JDW, Daggard GA (2001) Expression of a polygalacturonase enzyme in germinating pollen of *Brassica napus*. Sex. Plant Reprod. 13: 265-271
- del Campillo E, Lewis LN (1992) Identification and kinetics of accumulation of proteins induced by ethylene in bean abscission zones. Plant Physiol. 98: 955-961
- Del Río LA, Corpas FJ, Barroso JB (2004) Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. Phytochemistry 65: 783-792
- DeLille JM, Sehnke PC, Ferl RJ (2001) The Arabidopsis 14-3-3 family of signaling regulators. Plant Physiol. 126: 35-38
- Derksen J (1996) Pollen tubes: a model system for plant cell growth. Acta Bot. 109: 341-345
- Díaz A, De la Rosa R, Martin A, Rallo P (2006a) Development, characterization and inheritance of new microsatellites in olive (*Olea europaea*L.) and evaluation of their usefulness in cultivar identification and genetic relationship studies. Tree Genet. Genomes 2: 165-175



- Díaz A, Martín A, Rallo P, Barranco D, de la Rosa R (2006b) Self-incompatibility of 'Arbequina' and 'Picual' assessed by SSR markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 131: 250-255
- Dickinson HG (1970) Ultrastructural aspects of primexine formation in the microspore tetrad of *Lilium longiflorum*. *Cytobiologie* 1:437-449
- Dickinson HG, Elleman CJ, Doughty J (2000) Pollen coatings: Chimaeric genetics and new functions. *Sex. Plant Reprod.* 12: 302-309
- Dobson HE, Bergstrom G (1996) Pollen advertisement: chemical contrast between whole-flower and pollen odors. *Amer. J. Bot.* 83: 877-885
- Dobson HE, Bergstrom G (2000) The ecology and evolution of pollen donors. *Plant Syst. Evol.* 222: 63-87
- Dorokhov YL, Makinen K, Frolova OY, Merits A, Saarinen J, Kalkkinen N, Atabekov JG, Saarma M (1999) A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylesterase: the host-cell receptor for the tobacco mosaic virus movement protein. *FEBS Lett.* 461: 223-228
- Dos Santos Ramos AM (2000) Inducción floral y latencia de las yemas del olivo (*Olea europaea* L.). Tesis Doctoral Universidad de Córdoba (España)
- Dumas C (1974) Some aspects of stigmatic secretion in *Forsythia*. In: *Fertilization in Higher Plant*. Linskens HF (Eds.) Amsterdam, pp. 119-126
- Dumas C, Rougier M, Zandonella P, Ciampolini F, Cresti M, Pacini E (1978) The secretory stigma in *Lycopersicum peruvianum* Mill.: ontogenesis and glandular activity. *Protoplasma* 96: 173-187
- Edlund AF, Swanson R, Preuss D (2004) Pollen and stigma structure and function: The role of diversity in pollination. *Plant Cell* 16: S84-S97
- Edreva A (2005) Pathogenesis-related proteins: Research progress in the last 15 years. *Gen. Appl. Plant Physiol.* 31: 105-124
- Elleman CJ, Franklin-Tong V, Dickinson HG (1992) Pollination in species with dry stigmas: the nature of the early stigmatic response and the pathway taken by pollen tubes. *New Phytol.* 121: 413-424



- Erdtman G (1960) The acetolysis method. A revised description. *Sven. Bot. Tidskr.* 54: 531-564
- Eveland AL, Jackson DP (2011) Sugars, signalling, and plant development. *J. Exp.* 63: 3367-3377
- Fabbri A, Hormaza JI, Polito VS (199) Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 120: 538-542
- Feder EM, Hoffmann EG (1999) Heat-Shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev. Physiol.* 61: 243-282
- Feijó JA (2010) The mathematics of sexual attraction. *J Biol.* 9: 18 doi: 10.1186/jbiol233 pmid:20353548
- Ferguson C, Teeri TT, Siika-aho M, Read SM, Bacic A (1998) Location of cellulose and callose in pollen tubes and grains of *Nicotiana tabacum*. *Planta* 206: 452-460
- Fernández MC y Rodríguez-García MI (1988) Pollen wall development in *Olea europaea* L. *New Phytol.* 108: 91-99
- Fernández MC, Olmedilla A, Alché JD, Palomino P, Lahoz C, Rodríguez-García MI (1996) Immunogold probes for light and electron microscopy localization of Ole e I in several *Oleaceae* pollens. *J. Histochem. Cytochem.* 44: 151-158
- Fernández MC, Rodríguez-García MI (1989) Developmental changes in the aperture during pollen grain ontogeny in *Olea europaea* L. *New Phytol.* 111: 717-723
- Fernández MC, Rodríguez-García MI (1994) Pollen grain aperture in *Olea europaea* L. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 85: 99-109
- Fernández O, Béthencourt L, Quero A, Sangwan RS, Clément C (2010) Trehalose and plant stress responses: friend or foe? *Trends Plant Sci.* 15: 409-417
- Fernández-Escobar R, Benlloch M, Navarro C, Martín GC (1992) The time of floral induction in the olive. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117: 304-307



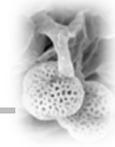
- Fernández-Escobar R, Gómez-Valledor G (1985) Cross-pollination in 'Gordal Sevillana' olives. *HortSci.* 20: 191-192
- Fernández-Escobar R, Rallo L (1981) Influencia de la polinización cruzada en el cuajado de frutos de cultivares de olivo (*Olea europaea* L.). *ITEA Información Técnica Económica Agraria* 45: 51-58
- Francis KE, Lam SY, Copenhaver GP (2006) Separation of *Arabidopsis* pollen tetrads is regulated by QUARTET1, a Pectin Methylesterase Gene1. *Plant Physiol.* 142: 1004-1013
- Franklin-Tong VE (1999) Signaling and the modulation of pollen tube growth. *Plant Cell* 11: 727-738
- Freshour G, Bonin CP, Reiter W-D, Alberheim P, Darvill AD, Hahn MG (2003) Distribution of fucose-containing xyloglucans in cell walls of the *mur1* mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 131: 1602-1612
- Fry SC, Smith RC, Renwick KF, Martin DJ, Hodge SK, Matthews KJ (1992) Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochem. J.* 282: 821-828
- Futamura N, Mori H, Kouchi H, Shinohara K (2000) Male flower-specific expression of genes for polygalacturonase, pectin methylesterase and beta-1,3-glucanase in a dioecious willow (*Salix gilgiana* Seemen). *Plant Cell Physiol.* 41: 16-26
- Gaffe J, Tieman DM, Handa AK (1994) Pectin methylesterase isoforms in tomato (*Lycopersicon esculentum*) tissues - Effects of expression of a pectin methylesterase antisense gene. *Plant Physiol.* 105: 199-203
- Gang DR, Fujita M, Davin LD, Lewis NG (1998) The 'abnormal lignins': mapping heartwood formation through the lignan biosynthetic pathway. In *Lignin and Lignan Biosynthesis*, ed. Lewis NG & Sarkanen S. Amer. Chem. Soc., Washington, DC, 389-421
- Gang DR, Wang J, Dudareva N, Nam KH, Simon JE, Lewinsohn E, Pichersky E (2001) An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. *Plant Physiol.* 125: 539-555
- Ganino T, Bartolini G, Fabbri A (2006) The classification of olive germplasma review. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 81: 319-334



- Ganino T, Beghè D, Valenti S, Nisi R, Fabbri A (2007) RAPD and SSR markers for characterization and identification of ancient cultivars of *Olea europaea* L. in the Emilia region, Northern Italy. *Genet. Resour. Crop Evol.* 54: 1531-1540
- García-Romera I, Fry SC (1995) The longevity of biologically-active oligogalacturonides in rose cell cultures: degradation by exopolygalacturonase. *J. Exp. Bot.* 46: 1853-1857
- Geitmann A, Chebli Y (2011) Gravity research on plants: use of single-cell experimental models. *Front Plant Sci.* 2, DOI: 10.3389/fpls.2011.00056
- Geitmann A, Hudák J, Vennigerholz F, Walles B (1995). Immunogold localization of pectin and callose in pollen grains and pollen tubes of *Brugmansia suaveolens*. Implications for the self-incompatibility reaction. *J. Plant Physiol.* 147: 225-235
- Geitmann A, Ortega JKE (2009) Mechanics and modeling of plant cell growth. *Trends Plant Sci.* 14: 467-478
- Geitmann A, Steer M (2006) The architecture and properties of the pollen tube cell wall. In: Malhó R (Ed.) *The pollen tube. A cellular and molecular perspective*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 177-200
- Ghosh S, Shivanna KR (1982). Anatomical and cytochemical studies on the stigma and style in some legumes. *Bot. Gaz.* 143: 311-318
- Gidrol X, Sabelli PA, Fern YS, Kush AK (1996) Annexin-like protein from *Arabidopsis thaliana* rescues delta oxyR mutant of Escherichia coli from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11268-11273
- Giovane A, Quagliuolo L, Servillo L, Balestrieri C, Laratta B, Loiudice R, Castaldo D (1994) Purification and characterization of 3 isozymes of pectin methylesterase from tomato fruit. *J. Food Biochem.* 17: 339-349
- Giovane A, Servillo L, Balestrieri C, Raiola A, D'Avino R, Tamburrini M, Ciardiello MA, Camardella L (2004) Pectin methylesterase inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta-Proteins and Proteomics* 1696: 245-252
- Gleason FK, Chollet R (2011) *Plant biochemistry (Biological science)*



- Golovkin M, Reddy ASN (2003) A calmodulin-binding protein from *Arabidopsis* has an essential role in pollen germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 10558-10663
- González-Carranza ZH, Elliott KA, Roberts JA (2007) Expression of polygalacturonases and evidence to support their role during cell separation processes in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 58: 3719-3730
- Gou JY, Miller LM, Hou G, Yu X, Chen XY, Liu CJ (2012) Acetyltransferase-mediated deacetylation of pectin impairs cell elongation, pollen germination, and plant reproduction. *Plant Cell* 24: 50-65
- Gou JY, Park S, Yu XH, Miller LM, Liu CJ (2008) Compositional characterization and imaging of “wall-bound” acylesters of *Populus trichocarpa* reveal differential accumulation of acyl molecules in normal and reactive woods. *Planta* 229: 15-24
- Hadfield KA, Bennett AB (1998) Polygalacturonases: Many genes in search of a function. *Plant Physiol.* 117: 337-343
- Han J, Clement JM, Li J, King A, Ng S, Jaworski JG (2010) The Cytochrome P450 CYP86A22 Is a Fatty Acyl-CoA omega-Hydroxylase Essential for Estolide Synthesis in the Stigma of *Petunia hybrida*. *J. Biol. Chem.* 285: 3986-3996
- Harikrishna K, Jampates-Beale R, Milligan SB, Gasser CS (1996) An endochitinase gene expressed at high levels in the stylar transmitting tissue of tomatoes. *Plant Mol. Biol.* 30: 899-911
- Hauagge R, Kester DE, Arulsekhar S, Parfitt DE (1987b) Isozyme variation among California almond cultivars II: Cultivar characterization and origins. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 112: 693-698
- Henikoff S, Henikoff JG (1992) Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919
- Hepler PK, Vidali L, Cheung AY (2001). Polarized cell growth in higher plants. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 17: 159-187
- Herrero M, Dickinson HG (1980) Pollen tube growth following compatible and incompatible intraspecific pollination in *Petunia hybrida*. *Planta* 148: 217-221



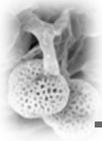
- Herrero M, Hormaza JI (1996) Pistil strategies controlling pollen tube growth. *Sex. Plant Reprod.* 9: 343-347
- Heslop-Harrison J (1963) An ultrastructural study of pollen wall ontogeny in *Silene pendula*. *Grana* 4: 7-24
- Heslop-Harrison J (1968) The pollen grain wall. *Science* 161: 230-237
- Heslop-Harrison J (1975) The physiology of the pollen grain surface. *Proc. R. Soc. London* 190: 275-299
- Heslop-Harrison J (1987) Pollen germination and pollen tube growth. *Int. Rev. Cytol.* 107: 1-78
- Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y (1970) Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence: intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Tech.* 45: 115-120
- Heslop-Harrison Y (1977) The pollen-stigma interaction: pollen tube penetration in *Crocus*. *Ann. Bot.* 41: 913-922
- Heslop-Harrison Y (1981) Stigma characteristics and angiosperm taxonomy. *Nordic J. Bot.* 1: 401-420
- Heslop-Harrison Y (2000) Control gates and micro-ecology: the pollen-stigma interaction in perspective. *Ann. Bot.* 85: 5-13
- Heslop-Harrison Y, Shivanna KR (1977) The receptive surface of the Angiosperm stigma. *Ann. Bot.* 41: 1233-1258
- Higashiyama T, Yabe S, Sasaki N, Nishimura Y, Miyagishima S, Kuroiwa H, Kuroiwa T (2001) Pollen tube attraction by the synergid cell. *Science* 293: 1480-1483
- Hiscock S, Bright J, McInnis SM, Desikan R, Hancock JT (2007) Signalling on the stigma: potential new roles for ROS and NO in plant cell signaling. *Plant Signal. Behav.* 2: 23-24
- Hiscock SJ, Allen AM (2008) Diverse cell signaling pathways regulate pollen-stigma interactions: the search for consensus. *New Phytol.* 179: 286-317



- Hiscock SJ, Bown D, Gurr SJ, Dickinson HG (2002) Serine esterases are required for pollen tube penetration of the stigma in *Brassica*. *Sex. Plant Reprod.* 15: 65-74
- Hiscock SJ, Coleman J, Dewey FM, Dickinson HG (1994) Identification and localization of an active cutinase in the pollen of *Brassica napus* L. *Planta* 193: 377-384
- Hiscock SJ, McInnis SM (2003) Pollen recognition and rejection during the sporophytic self-incompatibility response: *Brassica* and beyond. *Trends Plant Sci.* 8: 606-613
- Holmes RS, Masters CJ (1967) The developmental multiplicity and isoenzyme status of cavian esterases. *Biochim. Biophys. Acta* 132: 379-399
- Hong SB, Sexton R, Tucker ML (2000) Analysis of gene promoters for two tomato polygalacturonases expressed in abscission zones and the stigma. *Plant Physiol.* 123: 869-881
- Horiuchi Y, Kimura R, Kato N, Fujii T, Seki M, Endo T, (2003) Evolutional study on acetylcholine expression. *Life Sci.* 72: 1745-1756
- Horner HT, Pearson C (1978) Pollen wall and aperture development in *Helianthus annuus* (Compositae: Heliantheae). *Am. J. Bot.* 65: 293-309
- Hossain MA, Hossain MZ, Fujita M (2009) Stress-induced changes of methylglyoxal level and glyoxalase I activity in pumpkin seedlings and cDNA cloning of glyoxalase I gene. *Australian J. Crop Sci.* 3: 53-64
- Hsieh K, Huang AHC (2007) Tapetum accumulate endoplasmic reticulum-derived flavonoids and alkanes for delivery to the pollen surface. *The Plant Cell* 19: 582-596
- Huang L, Ye Y, Zhang Y, Zhang A, Liu T, Cao J (2009b) *BcMF9*, a novel polygalacturonase gene, is required for both *Brassica campestris* intine and exine formation. *Ann. Bot.* 104: 1339-1351
- Huecas S, Villalba M, Rodríguez R (2001) Ole e 9, a major olive pollen allergen is a 1,3- $\beta$ -glucanase: isolation, characterization, amino acid sequence, and tissue specificity. *J. Biol. Chem.* 276: 27959-27966
- Iglesias-Fernández R, Matilla AJ, Rodríguez-Gacio MC, Fernández-Otero C, de la Torre F (2007) The polygalacturonase gene PdPG1 is



- developmentally regulated in reproductive organs of *Prunus domestica* L. subsp. *insititia*. *Plant Sci.* 172: 763-772
- Ishimizu T, Sato Y, Saito T, Yoshimura Y, Norioka S, Nakanishi T, Sakiyama F. (1996). Identification and partial amino acid sequences of seven S-RNases associated with self-incompatibility of Japanese pear, *Pyrus pyrifolia* Nakai. *J. Biochem.* 120:326-334
- Jauh GY, Lord EM (1996) Localization of pectins and arabinogalactan protein in lily (*Lilium longiflorum* L.) pollen tube and style, and their possible roles in pollination. *Planta* 199: 251-26
- Jayani RS, Saxena S, Gupta R (2005) Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochem.* 40: 2931-2944
- Jiang L, Yang SL, Xie LF, Pua CS, Zhang XQ, Yang WC, Sundaresan V, Ye D (2005) VANGUARD1 encodes a pectin methyltransferase that enhances pollen tube growth in the Arabidopsis style and transmitting tract. *Plant Cell* 17: 584-596
- Jiménez-Quesada MJ, Zafra A, Rodríguez-García MI, Alché, JD (2010) Nitric oxide production during olive flowering and *in vitro* pollen germination. 3rd International Plant NO Club, Olomouc, Czech Republic, p. 32
- Kandasamy MK, Kristen U (1987) Developmental aspects of ultrastructure, histochemistry and receptivity of the stigma of *Nicotiana glauca*. *Ann. Bot.* 60: 427-437
- Kandasamy MK, Vivekanandan M (1983) Effect of stigmatic exudate and pistil extracts of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. on *in vitro* pollen growth of *Cyamopsis tetragonoloba* Taub. *Plant Sci. Lett.* 32: 343-348
- Kaothien P, Ok SH, Shuai B, Wengier D, Cotter R, Kelley D, Kiriakopolos S, Muschietti J, McCormick S (2005) Kinase partner protein interacts with the LePRK1 and LePRK2 receptor kinases and plays a role in polarized pollen tube growth. *Plant J.* 42: 492-503
- Kapellakis IE, Tsagarakis KP, Crowther JC (2008) Olive Oil History, Production and By-product Management. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 7: 1-26



- Kauppinen S, Christgau S, Kofod LV, Halkier T, Dörreich K, Dalboge H (1995) Molecular cloning and characterization of a rhamnogalacturonan acetylerase from *Aspergillus aculeatus*. Synergism between rhamnogalacturonan degrading enzymes. *J. Biol. Chem.* 270: 27172-27178
- Kim HS, Patel K, Muldoon-Jacobs K, Bisht KS, Aykin-Burns N, Pennington JD, van der Meer MR, Nguyen P, Savage J, Owens KM, Vassilopoulos A, Ozden O, Park SH, Singh KK, Abdulkadir SA, Spitz DR, Deng CX, Gius D (2010) SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer Cell* 17: 41-52
- Kim J, Shiu SH, Thoma S, Li WH, Patterson SE (2006) Patterns of expansion and expression divergence in the plant polygalacturonase gene family. *Gen. Biol.* 7: R87
- Kim S, Mollet JC, Dong J, Zhang K, Park SY, Lord EM (2003) Chemocyanin, a small basic protein from the lily stigma, induces pollen tube chemotropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 16125-16130
- Kinnersley AM, Turano FJ (2000) Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 19: 479-509
- Knoll K (1930) UÈber Pollenkitt und Bestäubungsart. *Z. Bot.* 232: 609
- Knox RB (1984) Pollen-pistil interactions. In: Linskens HF, Heslop-Harrison J (Eds.) *Cellular interactions. (Encyclopedia of plant physiology, new series 17)* Springer, New York Berlin Heidelberg, pp. 508-608
- Knox RB, Clarke AE, Harrison S, Smith P, Marchalonis JJ (1976) Cell recognition in plants: determinants of the stigma surface and their pollen interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 2788-2792
- Knox RB, Heslop-Harrison J (1970) Pollen-wall proteins: localization and enzymic activity. *J. Cell Sci.* 6: 1-27
- Konar RN, Linskens HF (1966) The morphology and anatomy of the stigma of *Petunia hybrid*. *Planta* 71: 356-371
- Koubouris GC, Metzidakis IT, Vasilakakis MD (2009) Impact of temperature on olive (*Olea europaea* L.) pollen performance in relation to relative humidity and genotype. *Environ. Exp. Bot.* 67: 209-214



- Kovaleva LV, Roshchina VV (1997) Does cholinesterase participate in the intercellular interactions in pollen-pistil system? *Biol. Plant.* 39: 207-213
- Kram BW, Bainbridge EA, Perera MADN, Carter C (2008) Identification, cloning and characterization of a GDSL lipase secreted into the nectar of *Jacaranda mimosifolia*. *Plant Mol. Biol.* 68: 173-183
- Kristensen U, Biedermann M, Liebezeit G, Dawson R. (1979) The composition of stigmatic exudate and the ultrastructure of the stigma papillae in *Aptenia cordifolia*. *Eur. J. Cell Biol.* 19: 281-287
- Kroh M, Knuiman B (1982) Ultrastructural of cell wall and plugs in tobacco pollen tubes after chemical extraction of polysaccharides. *Planta* 154: 241-250
- Kroh M, Loewus F (1968) Biosynthesis of pectic substance in germinating pollen: Labeling with myo-inositol-2-<sup>14</sup>C. *Science* 160: 1352-1354
- Kroh M, Miki-Hirosige H, Rosen W, Loewus F. (1970) Incorporation of label into pollen tube walls from myo-inositol-labeled *Lilium longiflorum* pistils. *Plant Physiol.* 45: 92-194
- Kuboyama T (1998) A novel thaumatin-like protein gene of tobacco is specifically expressed in the transmitting tissue of stigma and style. *Sex. Plant Reprod.* 11: 251-256
- Kumar A, McClure B (2010) Pollen-pistil interactions and the endomembrane system. *J. Exp. Bot.* 61: 2001-2013
- Kwon SI, Kim SH, Bhattacharjee S, Noh JJ, Gassmann W (2009) SRFR1, a suppressor of effector-triggered immunity, encodes a conserved tetratricopeptide repeat protein with similarity to transcriptional repressors. *Plant J.* 57: 109-119
- Labarca C, Kroh M, Loewus F (1970) The composition of stigmatic exudate from *Lilium longiflorum*. Labelling studies with myo-inositol, D-glucose and L-proline. *Plant Physiol.* 46: 150-156
- Labarca, C, Loewus F (1972) The nutritional role of pistil exudates in pollen tube wall formation in *Lilium longiflorum*. I. Utilization of injected stigmatic exudates. *Plant Physiol.* 50: 7-14



- Lacoux J, Gutierrez L, Dantin F, Beaudoin B, Roger D, Laine E (2003) Antisense transgenesis of tobacco with a flax pectin methylesterase affects pollen ornamentation. *Protoplasma* 222: 205-209
- Lam E, del Pozo O (2000) Caspase-like protease involvement in the control of plant cell death. *Plant Mol. Biol.* 44: 417-28
- Lavee S (1986) Handbook of fruit set and development. En Monselise S. CRC Press 261-276
- Lavee S, Taryan J, Levin J, Haskal A (2002) The significance of cross-pollination for various olive cultivars under irrigated intensive growing conditions. *Olivae* 91: 25-36
- Lavithis M, Bhalla PL (1995). Esterases in pollen and stigma of *Brassica*. *Sex Plant Reprod.* 8: 289-298
- Lehner A, Dardelle F, Soret-Morvan O, Leoruge P, Driouich A, Mollet J-C (2010) Pectins in the cell wall of *Arabidopsis thaliana* pollen tube and pistil. *Plant Signal. Behav.* 5: 1282-1285
- Lenartowska M, Lenartowski R, Smoliński DJ, Wróbel B, Niedojadło J, Jaworski K, Bednarska E (2009) Calreticulin expression and localization in plant cells during pollen-pistil interactions. *Planta* 231: 67-77
- Leung DWM. Involvement of plant chitinase in sexual reproduction of higher plants (1992) *Phytochemistry* 31: 1899-1900
- Li J, Lease KA, Tax FE, Walker JC (2001) BRS1, a serine carboxypeptidase, regulates BRI1 signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 5916-5921
- Li YQ, Chen F, Linskens HF, Cresti M (1994) Distribution of unesterified and esterified pectins in cell walls of pollen tubes of flowering plants. *Sex. Plant Reprod.* 7: 145-152
- Li YQ, Mareck A, Faleri C, Moscatelli A, Liu Q, Cresti M (2002) Detection and localization of pectin methylesterase isoforms in pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L. *Planta* 214: 734-740



- Liners F, Gaspar T, Van Cutsem P (1994) Acetyl- and methyl-esterification of pectins of friable and compact sugar-beet calli: consequences for intercellular adhesion. *Planta* 192: 545-556
- Lixi J, Yang SL, Xie LF, Puah CS, Zhang XQ, Yang WC, Sundaresan V, Ye D. (2005) VANGUARD1 encodes a pectin methylesterase that enhances pollen tube growth in the Arabidopsis style and transmitting tract. *Plant Cell* 17: 584-96
- Lord EM (2000) Adhesion and cell movement during pollination: cherchez la femme. *Trends Plant Sci.* 5: 68-73
- Lord EM (2003) Adhesion and guidance in compatible pollination. *J. Exp. Bot.* 54: 47-54
- Lotan T, Ori N, Fluhr R. Pathogenesis-related proteins are developmentally regulated in tobacco flowers (1989) *Plant Cell* 1: 881-887
- Louie GV, Baiga TJ, Bowman ME, Koeduka T, Taylor JH, Spassova SM, Pichersky E, Noel JP (2007) Structure and reaction mechanism of basil eugenol synthase. *PLoS ONE* 2: e993
- Louvet R, Cavel E, Gutierrez L, Guénin S, Roger D (2006) Comprehensive expression profiling of the pectin methylesterase gene family during silique development in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 224: 782-791
- Luppa H, Andrä J (1983) The histochemistry of carboxylester hydrolases: problems and possibilities. *Histochem. J.* 15: 111-137
- Luu DT, Marty-Mazars D, Trick M, Dumas C, Heizmann P (1999) Pollen-stigma adhesion in *Brassica* spp involves SLG and SLR1 glycoproteins. *Plant Cell* 11: 251-262
- Luu DT, Qin XK, Morse D, Cappadocia M (2000) S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature* 407: 649-651
- M'rani Alaoui M (2000) Estudio a nivel celular de la germinación, emisión y elongación del tubo polínico en el olivo (*Olea europaea* L.). Tesis doctoral. Universidad de Granada, España
- Maiti IB, Kolattukudy PE (1979) Prevention of fungal infection of plants by specific inhibition of cutinase. *Science* 205: 507-508



- Majewska-Sawka A, Fernández MC, M'rani-Alaoui M, Münster A, Rodríguez-García (2002) Cell wall reformation by pollen tube protoplasts of olive (*Olea europaea* L.): structural comparison with the pollen tube wall. *Sex Plant Reprod.* 15:21-29
- Makinen Y, Brewbaker JL (1967) Isozyme polymorphism in flowering plants I. Diffusion of enzymes out of intact pollen grains. *Physiol. Plant* 20: 477-482
- Malhó R, Castanho Coelho P, Pierson E, Derksen J (2005) Endocytosis and membrane recycling in pollen tubes. In: Samaj J, Baluska F, Menzel D (eds) *The Plant Endocytosis*. Springer-Verlag, Germany, p 277-291
- Manabe, Y, Nafisi M, Verhertbruggen Y, Orfila C, Gille S, Rautengarten C, Cherk C, Marcus SE, Somerville S, Pauly M, Knox JP, Sakuragi Y, Vibe Schelle H (2011) Loss-of-function mutation of REDUCED WALL ACETYLATION2 in Arabidopsis leads to reduced cell wall acetylation and increased resistance to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* 155: 1068-1078
- Markovic O, Cederlund E, Griffiths WJ, Lipka T, Jornvall H (2002) Characterization of carrot pectin methylesterase. *Cell. Mol. Life Sci.* 59: 513-518
- Markovic O, Janecek S (2004) Pectin methylesterases: Sequence-structural features and phylogenetic relationships. *Carbohydr. Res.* 339: 2281-2295
- Markovic O, Jornvall H (1992) Disulfide bridges in tomato pectinesterase: variations from pectinesterases of other species; conservation of possible active site segments. *Protein Sci.* 1: 1288-1292
- Martin FW (1969) Compounds from the stigmas of some species. *Am. J. Bot.* 56: 1023-1027
- Martins PCS (2006) Calidad de la flor en variedades portuguesas del olivo *Olea europaea* L. Máster en Olivicultura y Elaiotecnia. Mediterranean Institute of Agronomy, University of Córdoba.
- Mattson O, Knox RB, Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y (1974). Protein pellicle of stigmatic papillae as a probable recognition site in incompatibility reactions. *Nature* 247: 298-300



- Mayfield JA, Fiebig A, Johnstone SE, Preuss D (2001) Gene families form the *Arabidopsis thaliana* pollen coat proteome. *Science* 292: 2482-2485
- McCann MC, Roberts K (1996). Plant cell wall architecture: The role of pectins. In: Visser J, Voragen AGJ (Eds.) *Pectins and pectinases*. Amsterdam: Elsevier, pp. 91-107
- McClure BM, Franklin-Tong VE (2006) Gametophytic self-incompatibility: understanding the cell mechanisms involved in “self” pollen tube inhibition. *Planta* 224: 233-245
- McCormick S (2004) Control of male gametophyte development. *Plant Cell*. 16: 142-154
- McInnis SM, Desikan R, Hancock JT, Hiscock SJ (2006) Production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species by angiosperm stigmas and pollen: potential signalling crosstalk? *New Phytol.* 172: 221-228
- Meikle PJ, Bonig I, Hoogenraad NJ, Clarke AE, Stone BA (1991) The location of (1→3)- $\beta$ -glucans in the walls of pollen tubes of *Nicotiana glauca* using a (1→3)- $\beta$ -glucan-specific monoclonal antibody. *Planta* 185: 1-8
- Micheli F (2001) Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends Plant Sci.* 6: 414-419
- Micheli F, Sundberg B, Goldberg R, Richard L (2000) Radial distribution pattern of pectin methylesterases across the cambial region of hybrid aspen at activity and dormancy. *Plant Physiol.* 124: 191-199
- Miki-Hiroshige H, Hoek IHS, Nakamura S. (1987) Secretions from the pistil of *Lilium longiflorum*. *Am J. Bot.* 74: 1709-1715
- Mohnen D (2008) Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 266-277
- Mollet JC, Park SY, Nothnagel EA, Lord EM (2000) A lily stylar pectin is necessary for pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix. *Plant Cell* 12: 1737-1749
- Mookerjee S, Guerin J, Collins G, Ford C, Sedgley M (2005) Paternity analysis using microsatellite markers to identify pollen donors in an olive grove. *Theor. Appl. Genet.* 111: 1174-1182



- Morales S, Jiménez-López JC, Castro AJ, Rodríguez-García MI, Alché JD (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: 332-341
- Mort AJ (2002) Interactions between pectins and other polymers. In: Seymour GB, Knox JP (Eds.) *Pectins and their Manipulation* Oxford: Blackwell Publishing, CRC Press, pp. 30-51
- Moustacas AM, Nari J, Borel M, Noat G, Ricard J (1991) Pectin methylesterase, metal-ions and plant cell wall extension - The role of metal-ions in plant cell wall extension. *Biochem. J.* 279: 351-354
- Moutier N (2002) Varietal sheet: Canyon (olive). *Plant Genetics Breed.* 30: 15
- Mu JH, Stains JP, Kao T-h (1994) Characterization of a pollen-expressed gene encoding a putative pectin esterase of *Petunia inflata*. *Plant Mol. Biol.* 25: 539-544
- Muschiatti J, Eyal Y, McCormick S (1998) Pollen tube localization implies a role in pollen-pistil interactions for the tomato receptor-like protein kinases LePRK1 and LePRK2. *Plant Cell* 10: 319-330
- Nam KH, Li J (2002) BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell* 110: 203-212
- Nari J, Noat G, Ricard J (1991) Pectin methylesterase, metal-ions and plant cell-wall extension. Hydrolysis of pectin by plant cell-wall pectin methylesterase. *Biochem. J.* 279, 343-350
- Neil SJ, Desikan R, Clarke A, Hancock JT (2002) Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol.* 128: 13-16
- Nepi M, Franchi GG, Pacini E (2001) Pollen hydration status at dispersal: cytophysiological features and status. *Protoplasma* 216: 171-180
- Nepi M, Guarnieri M, Pacini E (2003) "Real" and feed pollen of *Lagerstroemia indica*: ecophysiological differences. *Plant Biol.* 5: 311-314
- Nielsen JE, Christensen TMIE. 2002. Distribution of pectin methyl esterase and acetylesterase in the genus *Citrus* visualized by tissue prints and chromatography. *Plant Sci.* 162: 799-807



- Nieuwland J, Feron R, Huisman BAH, Fasolino A, Hilbers CW, Derksen J, Mariani C (2005) Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in tobacco. *Plant Cell* 17: 2009-2019
- Odjakova M, Hadjiivanova C (1997) Animal neurotransmitter substances in plants. *Bulg. J. Plant Physiol.* 23: 94-102
- Ohmiya Y, Samejima M, Shiroishi M, Amano Y, Kanda T, Sakai F, Hayashi T (2000) Evidence that endo-1,4- $\beta$ -glucanases act on cellulose in suspension-cultured poplar cells. *Plant J.* 24: 147-158
- Olmedilla A, Alché JD, Rodríguez-García MI (1997) Nucleolar evolution and coiled bodies during meiotic prophase in *Olea europaea* L.: differential localization of nucleic acids. *Eur. J. Cell Biol.* 74: 181-189
- Orasmo GR, Oliveira-Collet SA, Lapenta AS, Machado MFPS (2007) Biochemical and genetic polymorphism for carboxylesterase and acetyesterase in grapes clones of *Vitis vinifera* L. (*Vitaceae*) cultivars. *Biochem. Genet.* 45: 663-670
- Ori N, Sessa G, Lotan T, Himmelhochand S, Fluhr R (1990) A major stylar polypeptide (sp41) is a member of the pathogenesis-related proteins superclass. *EMBO J.* 9: 3429-3436
- Ouazzani N, Lumaret R, Villemur P, Di Giusto E (1993) Leaf allozyme variation in cultivated and wild olive trees (*Olea europaea* L.). *J. Hered.* 84: 34-42
- Pacini E (1997) Tapetum character states: Analytical keys for tapetum types and activities. *Can. J. Bot. Rev.* 75: 1448-1459
- Pacini E, Franchi GG (1993) Role of the tapetum in pollen and spore dispersal. *Plant Syst. Evol.* 7: 1-11
- Pacini E, Juniper BE (1979a) The ultrastructure of pollen grain development in olive (*Olea europaea*) 1. Proteins in the pore. *New Phytol.* 83: 157-164
- Pacini E, Juniper BE (1979b) The ultrastructure of pollen grain development in olive (*Olea europaea*) 2. Secretion by the tapetal cell. *New Phytol.* 83: 165-174



- Palanivelu R, Brass A, Edlund LAF, Preuss D (2003) Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an Arabidopsis gene that controls GABA levels. *Cell* 114: 47-59
- Panavas T, Pikula A, Reid PD, Rubinstein B, Walker EL (1999) Identification of senescence-associated genes from daylily petals. *Plant Mol. Biol.* 40: 237-248
- Pardo M, Ward M, Bains S, Molina M, Blackstock W, Gil C, Nombela C (2000) A proteomic approach for the study of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall biogenesis. *Electrophoresis* 21: 3396-3410
- Park SY, Jauh GY, Mollet JC, Eckard KJ, Nothnagel EA, Walling LL, Lord EM (2000) A lipid transfer-like protein is necessary for lily pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix. *Plant Cell* 12: 151-164
- Pauly M, Scheller HV (2000) O-Acetylation of plant cell wall polysaccharides: identification and partial characterization of a rhamno-galacturonan O-acetyl-transferase from potato suspension-cultured cells. *Planta* 210: 659-667
- Pelloux J, Rusterucci C, Mellerowicz EJ (2007) New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends Plant Sci.* 12: 267-277
- Pereira AJ, Lapenta AS, Vidigal-Filho PS, Machado MFPS (2001) Differential esterase expression in leaves of *Manihot esculenta* Crantz infected with *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Biochem. Genet.* 39: 289-296
- Pérez-Amador MA, Abler ML, Rocher EJD, Thompson DM, van Hoof A, LeBrasseur ND, Lers A, Green PJ (2000) Identification of BFN1, a bifunctional nuclease induced during leaf and stem senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 122: 169-179
- Perrone P, Hewage CM, Thomson AR, Bailey K, Sadler IH, Fry SC (2002) Patterns of methyl and O-acetyl esterification in spinach pectins: New complexity. *Phytochemistry* 60:67-77
- Petre B, Major I, Rouhier N, Duplessis S (2011) Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar. *BMC Plant Biol.* 11: 33



- Piffanelli P, Ross JHE, Murphy DJ (1997) Intra-and extracellular lipid composition and associated gene expression patterns during pollen development in *Brassica napus*. *Plant J.* 11: 549-556
- Piffanelli P, Ross JHE, Murphy DJ (1998) Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. *Sex. Plant Reprod.* 11: 65-80
- Pina C, Pinto F, Feijo JA, Becker JD (2005) Gene family analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome reveals biological implications for cell growth, division control, and gene expression regulation. *Plant Physiol.* 138: 744-756
- Pinney K, Polito VS (1990) Olive pollen storage and in vitro germination. In: International Symposium on Olive Growing. Rallo L, Caballero JM, Rscabar RS (Eds.). ISHS Acta Hort. 1: 286
- Pippen EL, McCready RM, Owens HS (1950) Gelation properties of partially acetylated pectins. *J. Am. Chem. Soc.* 72: 813-816
- Pitarch A, Sánchez M, Nombela C, Gil C (2002) Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. *Mol. Cell Proteomics* 1: 967-982
- Podzimek T, Matoušek J, Lipovová P, Poučková P, Spiwok V, Santrůček J (2011) Biochemical properties of three plant nucleases with anticancer potential. *Plant Sci.* 180: 343-51
- Polito V (2011) Pollination and Fruit Set. UCD Davis Plant Sciences
- Pontikis CA, Loukas M, Kousounis G (1980) The use of biochemical markers to distinguish olive cultivars. *J. Hort. Sci.* 55: 333-343
- Portnoi L, Horovitz A (1977) Sugars in natural and artificial pollen germination substrates. *Ann. Bot.* 41: 21-27
- Pressey R, Reger BJ (1989) Polygalacturonase in pollen from corn and other grasses. *Plant Sci* 59: 57-62
- Purdy RE, Kolattukudy PE (1973) Depolymerization of a hydroxyfatty acid biopolymer, cutin, by extracellular enzyme from *Fusarium solani* f. sp. pisi: isolation and some properties of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 159: 61-69



- Quentin M, Jauneau A, Morvan O, Mareck A, Gaffe J, Morvan C (1997) Immunolocalization of pectin methylesterases in the hypocotyl tissues of flax. *Plant Physiol. Biochem.* 35: 475-482
- Quettier AL, Eastmond PJ (2009) Storage oil hydrolysis during early seedling growth. *Plant Physiol. Bioch.* 47: 485-490
- Ralet MC, Crepeau MJ, Buchholt HC, Thibault JF (2003) Polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties of sugarbeet pectins differing in their degrees of methylation and acetylation. *Biochem. Eng. J.* 16: 191-201
- Ralet MC, Crépeau, MJ, Bonnin E (2008) Evidence for a blockwise distribution of acetyl groups onto homogalacturonans from a commercial sugar beet (*Beta vulgaris*) pectin. *Phytochemistry* 69: 1903-1909
- Rallo L, Barranco D, Caballero JM, Del Río C, Martín A, Tous J, Trujillo MI (2005) *Varietades de olivo en España*. Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones MundiPrensa. Madrid
- Rallo L, Cuevas J (2001) Fructificación y producción. In: *El Cultivo del olivo*. Barranco D, Fernández-Escobar R (Eds). Cuarta edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. pp 121-151
- Rallo P, Rapoport HF (2001) Early growth and development of the olive fruit mesocarp. *Jour. Hort. Sci. Biotech.* 76: 408-412
- Rallo P, Tenzer I, Gessler C, Baldoni L, Dorado G, Martín A (2003) Transferability of olive microsatellite loci across the genus *Olea*. *Theor. Appl. Genet.* 107: 940-946
- Ramalho-Santos M, Pissarra J, Veríssimo P, Pereira S, Salema R, Pires E, Faro CJ (1997) Cardosin A, an abundant aspartic proteinase, accumulates in protein storage vacuoles in the stigmatic papillae of *Cynara cardunculus* L. *Planta* 203: 204-212
- Ramírez Santa Pau MM (2001) Variabilidad de la producción en olivo (*Olea europaea* L.). Relación entre alternancia, floración, vigor y productividad. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba, España.
- Rapoport HF (2004) Capítulo 2: Botánica y morfología. En: Barranco D, Fernández-Escobar R y Rallo L. *El Cultivo del Olivo*. 5ª Ed. Madrid, España. Junta de Andalucía y Ediciones Mundi-Prensa, 37-62



- Rapoport HF, Rallo L (1991) Postanthesis flower and fruit abscission in 'Manzanillo' olive. *J. Amer. Soc. Hort. Sci* 116: 720-723
- Rexova-Benkova L, Markovic O (1976) Pectic enzymes. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 33: 323-385
- Rhee SY, Osborne E, Poindexter PD, Somerville CR (2003) Microspore separation in the quartet 3 mutants of *Arabidopsis* is impaired by a defect in a developmentally regulated pectinase required for pollen mother cell degradation. *Plant Physiol.* 133: 1170-1180
- Rhee SY, Somerville CR (1998) Tetrad pollen formation in quartet mutants of *Arabidopsis thaliana* is associated with persistence of pectic polysaccharides of the pollen mother cell wall. *Plant J.* 15: 79-88
- Ribeiro-Orasmo G, Oliveira-Collet SA, Lapenta AS, Machado MFPS (2007) Biochemical and genetic polymorphisms for carboxylesterase and acetyesterase in grape clones of *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) cultivars. *Biochem. Genet.* 45: 663-670
- Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen DA (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57: 929-967
- Robertson AW, Lloyd DG (1993) Rates of pollen deposition and removal in *Myosotis colensoi*. *Funct. Ecol* 7: 549-559
- Röckel N, Wolf S, Kost B, Raush T, Greiner S (2008) Elaborate spatial patterning of cell-wall PME and PME1 at the tube tip involves PME1 endocytosis, and reflects the distribution of esterified and de-esterified pectins. *Plant J.* 53: 133-143
- Rodríguez-García MI, Alché JD, Castro AJ, Suárez CG, Rejón JD (2011) Pollen and Pistil Features Involved in the Reproductive Biology of the Olive (*Olea Europaea* L.). En: *Plant physiology: from cell to fruit production system* (Provisional Title), Eds.: J. Palmer; M. Herrero; I. Hormaza; S. Tustin; M. Talón; F.R. Tadeo; M. Chaves; A.D. Webster. *Acta Horticulturae*, Vol IH09 (En prensa)
- Rodríguez-García MI, Fernández MC (1987) Cytoplasmic nucleoloids during microsporogenesis in *Olea europaea* L. *Biol. Cell* 60: 155-160



- Rodríguez-García MI, Fernández MC (1990) Ultrastructural evidence of endoplasmic reticulum changes during the maturation of the olive pollen grain (*Olea europaea* L.) Plant Syst. Evol. 171: 221-231
- Rodríguez-García MI, Fernández MC, Alché JD (1995a) 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
- Rodríguez-García MI, Fernández MC, Alché JD, Olmedilla A (1995b) Endoplasmic reticulum as a storage site for allergenic proteins in pollen grains of several Oleaceae. Protoplasma 187: 111-116
- Rodríguez-García MI, M'Rani-Alaoui M, De la Flor Díaz J, Fernández MC (2003a) Microtubules and nuclei in the tube of olive (*Olea europaea* L.) pollen. Acta Biol. Cracov. Series Bot. 45: 97-101
- Rodríguez-García MI, M'Rani-Alaoui M, Fernández MC (2003b) Behavior of storage lipids during pollen development and pollen grain germination of olive (*Olea europaea* L.). Protoplasma 221: 237-244
- Roggen HP, Stanley RG (1969) Cell wall hydrolyzing enzymes in wall formation as measured by pollen-tube extension. Planta 84: 295-303
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. Annu. Rev. Plant Biol. 57: 675-709
- Rombouts FM, Thibault JF (1986) Enzymatic and chemical degradation and the fine structure of pectins from sugar-beet pulp. Carbohydr. Res. 154: 189-203
- Roshchina VV (1991) Biomediators in plants: Acetylcholine and biogenic amines. Pushchino: Biological Center of USSR Academy of Sciences, 192
- Roshchina VV (2001) Neurotransmitters in plant life. Science Publishers, Enfield, pp 4-81
- Roshchina VV, Semenova MN (1994) Plant cholinesterases: activity and substrate-inhibitory specificity. J. Evol. Biochem. Physiol. 26: 644-651



- Roux SJ, Steinebrunner I (2007) Extracellular ATP: an unexpected role as a signaler in plants. *Trends Plant Sci.* 12: 522-527
- Sagane Y, Nakagawa T, Yamamoto K, Michikawa S, Oguri S, Momonoki Y (2005) Molecular characterization of maize acetylcholinesterase. A novel enzyme family in the plant kingdom. *Plant Physiol.* 138: 1359-1371
- Saitou N, Nei M (1986) The number of nucleotides required to determine the branching order of three species with special reference to the human-chimpanzee-gorilla divergence. *J. Mol. Evol.* 24: 189-204
- Salamanca G, Rodriguez R, Quiralte J, Moreno C, Pascual CY, Barber D, Villalba M (2010) Pectin methylesterases of pollen tissue, a major allergen in olive tree. *FEBS J.* 277: 2729-2739
- Sambrook J, Maniatis T, Frisch EF (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual.* New York, Cold Spring Harbor, USA
- Sanchez AM, Bosch M, Bots M, Nieuwland J, Feron R, Mariani C (2004) Pistil factors controlling pollination. *Plant Cell* 16: S98-106
- Sasaki S, Mori D, Toyo-oka K, Chen A, Garrett-Beal L, Muramatsu M, Miyagawa S, Hiraiwa N, Yoshiki A, Wynshaw-Boris A. et al.(2005). Complete loss of *Ndel1* results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Mol. Cell. Biol.* 25: 7812-7827
- Schaller A (2004). A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* 220: 183-197
- Scheller HV, Ulvskov P (2010) Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 263-289
- Schlüpmann H, Bacic A, Read SM (1994). Uridine diphosphate glucose metabolism and callose synthesis in cultured pollen tubes of *Nicotiana glauca* Link et Otto. *Plant Physiol.* 105: 659-670
- Schols HA, Voragen AG (1994) Occurrence of pectic hairy regions in various plant cell wall materials and their degradability by rhamnogalacturonase. *Carbohydr. Res.* 256: 83-95
- Schou O, Matsson O (1985) Differential localization of enzymes in the stigmatic exudates of *Primula obconica*. *Protoplasma* 125: 65-74



- Scott RJ (1994) Pollen exine: the sporopollenin enigma and the physics of pattern. In: *Molecular and Cellular Aspects of Plant Reproduction*. (Scott RJ, Stead MA) Cambridge, NY: Cambridge Univ. Press pp: 49-81
- Sedgley M (1979) Inter-varietal pollen tube growth and ovule penetration in the avocado. *Euphytica* 28: 25-35
- Sedgley M, Sierp MG, Maguire TL (1994) Interspecific hybridization involving *Banksia prionotes* Lind. and *B. menziesii* R.Br. (*Proteaceae*). *Int. J. Plant Sci.* 155: 755-762
- Selitrennikoff CP (2001) Antifungal proteins. *Applied Environ. Microbiol.* 67: 2883-2894
- Semenova MN, Roshchina VV (1993) The occurrence of cholinesterase in anthers of higher plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 40: 255-259
- Serrano I, Suárez C, Olmedilla A, Rapoport HF, Rodríguez-García MI (2008) Structural organization and cytochemical features of the pistil in olive (*Olea europaea* L.) cv. 'Picual' at anthesis. *Sex. Plant Reprod.* 21: 99-111
- Shakya R, Bhatla SC (2010) A comparative analysis of the distribution and composition of lipidic constituents and associated enzymes in pollen and stigma of sunflower. *Sex. Plant Reprod.* 23: 163-172
- Shayk M, Kolattukudy PE (1977) Production of a novel extracellular cutinase by the pollen and the chemical composition and ultrastructure of the stigma cuticle of *Nasturtium* (*Tropaeolum majus*). *Plant Physiol.* 60: 907-915
- Sheoran IS, Pedersen EJ, Ross ARS, Sawhney VK (2009) Dynamics of protein expression during pollen germination in canola (*Brassica napus*). *Planta* 230: 779-793
- Shevchik VE, Hugouvieux-Cotte -Pattat N (2003) PaeX, a second pectin acetyl esterase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* 185: 3091-3100
- Shevchik VE, Hugouvieux-Cotte-Pattat N (1997) Identification of a bacterial pectin acetyl esterase in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol. Microbiol.* 24: 1285-1301



- Shivanna KR (2003) Pollen biology and biotechnology, Science Publishers Inc. Enfield
- Shivanna KR, Sastri DC (1981) Stigma-surface proteins and stigma receptivity in some taxa characterized by wet stigma. *Ann. Bot.* 47: 53-64
- Shivanna KR, y Owens SJ (1989) Pollen-pistil interactions (Papilionoideae). In: Stirton CH y Zarucchi JL (Eds.) *Advances in legume biology. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 29: 157-182
- Štírová J, Sedlářová M, Piterková J, Luhová L, Petřivalský M (2011) The role of nitric oxide in the germination of plant seeds and pollen. *Plant Sci.* 181: 560-572
- Slater AT, Calder DM (1990) Fine structure of the wet, detached cell stigma of the orchid *Dendrobium speciosum* Sm. *Sex Plant Reprod.* 3: 61-69
- Snedden WA, Fromm H (1999) Regulation of the  $\gamma$ -aminobutyrate-synthesizing enzyme, glutamate decarboxylase, by calcium-calmodulin: a mechanism for rapid activation in response to stress. In *Plant Responses to Environmental Stresses: From Phytohormones to Genome Reorganization*. Ed. Lerner HR (Marcel Dekker, New York), pp 549-574
- Speranza A, Calzoni GL, Pacini E (1997) Occurrence of mono- or disaccharides and polysaccharide reserves in mature pollen grains. *Sex Plant Reprod.* 10: 110-115
- Stavrakakis M, Loukas M (1983) The between and withing-grape cultivars genetic variation. *Sci. Hort.* 19: 321-334
- Steer MW, Steer JL (1989) Pollen tube tip growth. *New Phytol.* 111: 323-358
- Suárez C, Castro AJ, Rapoport HF, Rodríguez-García MI (2012) Morphological, histological and ultrastructural changes in the olive pistil during flowering. *Sex Plant Reprod.* 25: 133-146
- Suárez Rizzo C (2009) Caracterización estructural e histoquímica del pistilo durante la fase progámica e implicación de pectinas y AGPs en las interacciones polen-pistilo en *Olea europaea* L. Tesis doctoral. Universidad de Granada, España



- Sun L, Van Nocker S (2010) Analysis of promoter activity of members of the PECTATE LYASE-LIKE (PLL) gene family in cell separation in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* 10: 152
- T, Inoue K, Shimonaka M, Saito T, Terai O, Norioka S (1999) PCR-based method for identifying the S-genotypes of Japanese pear cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 98:961-967
- Takahashi K, Shimada T, Kondo M, Tamai A, Mori M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2010) Ectopic expression of an esterase, which is a candidate for the unidentified plant cutinase, causes cuticular defects in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 51: 123-31
- Takeda H, Yoshikawa R, Liu XZ, Nakagawa N, Li YQ, Sakurai N (2004) Molecular cloning of two exo-beta-glucanases and their in vivo substrates in the cell walls of lily pollen tubes. *Plant Cell Physiol.* 45: 436-444
- Tanaka H, Onouchi H, Kondo M, Hara-Nishimura I, Nishimura M, Machida C, Machida Y (2001) A subtilisin-like serine protease is required for epidermal surface formation in *Arabidopsis* embryos and juvenile plants. *Development* 128: 4681-4689
- Tebbutt SJ, Rogers HJ, Lonsdale DM (1994) Characterization of a tobacco gene encoding a pollen-specific polygalacturonase. *Plant Mol. Biol.* 25: 283-297
- Tezuka T, Akita I, Yoshino N, Suzuki Y (2007) Regulation of self-incompatibility by acetylcholine and cAMP in *Lilium longiflorum*. *J. Plant Physiol.* 164: 878-885
- Thakur BR, Singh RK, Handa AK (1997) Chemistry and uses of pectin: A review. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 37: 47-73
- Thelen MP, Northcote DH (1989) Identification and purification of a nuclease from *Zinnia elegans* L.: a potential molecular marker for xylogenesis. *Planta* 179: 181-195
- Thibault JF, Renard CMGC, Axelos MAV, Roger P, Crepeau MJ (1993) Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid hydrolysis. *Carbohydr. Res.* 238: 271-286



- Tian GW, Chen MH, Zaltsman A, Citovsky V (2006) A pollen-specific pectin methylesterase involved in pollen tube growth. *Dev. Biol.* 294: 83-91
- Tieman DM, Handa AK (1994) Reduction in pectin methylesterase activity modifies tissue integrity and cation levels in ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) fruits. *Plant Physiol.* 106: 429-436
- Trujillo I, Morales A, Belaj A, Valpuesta V, Botella MA, Rallo P, Martín A, Dorado G (2005) Identificación de variedades de olivo por marcadores moleculares. En *Variedades de olivo en España (Libro III: Mejora y Biotecnología)*. Rallo L, Barranco D, Caballero JM, Del Rio C, Martín A, Tous J, Trujillo I (Eds). Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Trujillo I, Rallo L, Arus P (1995) Identifying olive cultivars by isozyme analysis. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 120: 318-324
- Tucker GA, Seymour GB (2002) Modification and degradation of pectins. *In:* GB Seymour, PG Knox (Eds) *Pectins and Their Manipulation*. CRC Press, Boca Raton, FL, 150-173
- Tung CW, Dwyer KG, Nasrallah ME, Nasrallah JB (2005) Genomewide identification of genes expressed in *Arabidopsis* pistils specifically along the path of pollen tube growth. *Plant Physiol.* 138: 977-989
- Updegraff EP, Zhao F, Preuss D. 2009. The extracellular lipase EXL4 is required for efficient hydration of *Arabidopsis* pollen. *Sex. Plant Reprod.* 22: 197-204
- Upton C, Buckley JT (1995) A new family of lipolytic enzymes?. *Trends Biochem. Sci.* 20: 178-179
- Vaknin Y, Gan-Mor S, Bechar A, Ronen B, Eisikowitch D (2000) The role of electrostatic forces in pollination. *Plant Syst. Evol.* 222: 133-142
- Van Buren JP (1979) The chemistry of texture in fruits and vegetables. *J. Texture Stud.* 10: 1-23
- Van Loon LC, Van Strien EA (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55: 85-97



- Vercauteren I, de Almeida Engler J, De Groot R, Gheysen G (2002) An *Arabidopsis thaliana* pectin acetyltransferase gene is upregulated in nematode feeding sites induced by root-knot and cyst nematodes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15: 404-407
- Vieira M, Pisarra J, Veríssimo P, Castanheira P, Costa Y, Pires E, Faro C (2001) Molecular cloning and characterization of cDNA encoding cardosin B, an aspartic proteinase accumulating extracellularly in the transmitting tissue of *Cynara cardunculus* L. *Plant Mol. Biol.* 45: 529-539
- Vincken JP, Schols HA, Oomen RJFJ, Mc Cann MC, Ulvskov P, Voragen AGJ, Visser RGF (2003) If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiol.* 132: 1781-1789
- Vithanage HIMV, Knox RB (1976) Pollen wall proteins: Quantitative cytochemistry of the origins of intine and exine enzymes in *Brassica oleracea*. *J. Cell Sci.* 423-435
- von Groll U, Berger D, Altmann T (2002) The subtilisin-like serine protease SDD1 mediates cell-to-cell signaling during *Arabidopsis* stomatal development. *Plant Cell* 14: 1527-1539
- Voragen AGJ, Coenen GJ, Verhoef RP, Schols HA (2009) Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Struct. Chem.* 20: 263-275
- Voragen AGJ, Schols HA, Pilinik W (1986) Determination of the degree of methylation and acetylation of pectins by HPLC. *Food Hydrocolloids* 1: 65-70
- Wahid A, Gelani S, Ashraf M, Foolad MR (2007) Heat tolerance in plants: An overview. *Environ. Exp. Bot.* 61: 199-223
- Wakabayashi K, Hoson T, Huber, DJ (2003) Methyl de-esterification as a major factor regulating the extent of pectin depolymerization during fruit ripening: a comparison of the action of avocado (*Persea americana*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) polygalacturonases. *J. Plant Physiol.* 160: 667-673
- Wakeley PR, Rogers HJ, Rozycka M, Greenland AJ, Hussey PJ (1998) A maize pectin methylesterase-like gene, ZmC5, specifically expressed in pollen. *Plant Mol. Biol.* 37: 187-192



- Waldron KW, Parker ML, Smith AC (2003) Plant cell walls and food quality. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2: 101-119
- Weeden NF, Lamb RC (1985) Identification of apple cultivars by isozyme phenotypes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110: 509-515
- Wemmer T, Kaufmann H, Kirch HH, Schneider K, Lottspeich F, Thompson RD (1994) The most abundant soluble basic protein of the stylar transmitting tract in potato (*Solanum tuberosum* L.) is an endochitinase. *Planta* 194: 264-273
- Wen FS, Zhu YM, Hawes MC (1999) Effect of pectin methylesterase gene expression on pea root development. *Plant Cell* 11: 1129-1140
- Wengier D, Valsecchi I, Cabanas ML, Tang WH, McCormick S, Muschietti J (2003) The receptor kinases LePRK1 and LeP-RK2 associate in pollen and when expressed in yeast, but dissociate in the presence of style extract. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100: 6860-6865
- Wessler I, Roth E, Schwarze S, Weikel W, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Kilbinger H (2001) Release of non-neuronal acetylcholine from the human placenta: difference to neuronal acetylcholine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 364: 205-212
- Wheeler MJ, Franklin-Tong VE, Franklin FC (2001) The molecular and genetic basis of pollen-pistil interactions. *New Phytol.* 151: 565-584
- White K, Grether ME, Abrams JM, Young L, Farrell K, Steller H (1994) Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* 264: 677-683
- White RG, Badelt K, Overall RL, Vesik M (1994) Actin associated with plasmodesmata. *Protoplasma* 180: 169-184
- Willats WGT, McCartney L, Mackie W, Knox JP (2001a) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol. Biol.* 47: 9-27
- Willats WGT, Orfila C, Limberg G, Buchholt HC, van Alebeek GJWM, Voragen AGJ, Marcus SE, Christensen TMIE, Mikkelsen JD, Murray BS, Knox JP (2001b) Modulation of the degree and pattern of methylesterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls. Implications for pectin methyl esterase action, matrix properties, and cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 276: 19404-19413



- Williams JH (2008) Novelty of the flowering plant pollen tube underlie diversification of a key life history stage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 11259-11263
- Williamson G (1991) Purification and characterization of pectin acetyltransferase from orange peel. *Phytochem.* 30: 445-449
- Williamson G, Faulds CB, Matthew JA, Archer DB, Morris VJ, Brownsey GJ, Ridout, MJ (1990) Gelation of sugarbeet and citrus pectins using enzymes extracted from orange peel. *Carbohydr. Polym.* 13: 387-397
- Wolf S, Mouille G, Pelloux J (2009) Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Mol. Plant* 2: 851-860
- Woltering EJ, van der Bent A, Hoeberichts FA (2002) Do plant caspases exist? *Plant Physiol.* 130: 1764-9
- Wolters-Arts M, Van der Weerd L, Van Aelst AC, Van der Weerd J, Van As, H, Mariani C (2002) Water-conducting properties of lipids during pollen hydration. *Plant Cell Environ.* 25: 513-519
- Wu H, de Graaf B, Mariani C, Cheung AY (2001) Hydroxyproline rich glycoproteins in plant reproductive tissues: structure, functions and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 1418-1429
- Wu HM, Cheung AY. (2000) Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Mol Biol.* 44: 267-281
- Wu JZ, Qin Y, Zhao J (2008a) Pollen tube growth is affected by exogenous hormones and correlated with hormone changes in styles before and after pollination in *Torenia fournieri* L. *Plant Growth Regulation* 55: 137-147
- Yokota E, Ohmori T, Muto S, Shimmen T (2004) 21-kDa polypeptide, a low-molecular-weight cyclophilin, is released from pollen of higher plants into the extracellular medium *in vitro*. *Planta* 218: 1008-1018
- Zafra A, Rodriguez-Garcia MI, Alché JD (2010) Cellular localization of ROS and NO in olive reproductive tissues during flower development. *BMC Plant Biol.* 10: 36



- Zhang Q, Huang L, Liu T, Yu X, Cao J (2008) Functional analysis of a pollen-expressed polygalacturonase gene. BcMF6 in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis*. Makino). Plant Cell Rep. 27:1207-1215
- Zienkiewicz K, Castro AJ, Alché JD, Zienkiewicz A, Suárez C, Rodríguez-García MI (2010) Identification and localization of a caleosin in olive (*Olea europaea* L.) pollen during *in vitro* germination. J. Exp. Bot. 61: 1537-1546
- Zienkiewicz K, Zienkiewicz A, Rodríguez-García MI, Castro AJ (2011) Characterization of a caleosin expressed during olive (*Olea europaea* L.) pollen ontogeny. BMC Plant Biology 11: 122
- Zohary D, Spiegel-Roy P (1975) Beginnings of fruit growing in the old world. Science 187: 319-327