UNIVERSIDAD DE GRANADA



ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDIN

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE PLANTAS



CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL E HISTOQUÍMICA DEL PISTILO DURANTE LA FASE PROGÁMICA E IMPLICACIÓN DE PECTINAS Y AGPS EN LAS INTERACCIONES POLEN-PISTILO EN EL OLIVO

TESIS DOCTORAL

Cynthia Gisela Suárez Rizzo Granada, 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada Autor: Cynthia Gisela Suárez Rizzo D.L.: GR. 3108-2009 ISBN: 978-84-692-5108-9

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL E HISTOQUÍMICA DEL PISTILO DURANTE LA FASE PROGÁMICA E IMPLICACIÓN DE PECTINAS Y AGPS EN LAS INTERACCIONES POLEN-PISTILO EN EL OLIVO

Memoria presentada por la Licenciada en Biología Dña. Cynthia Suárez Rizzo para optar al grado de Doctor

Fdo.: Cynthia Suárez Rizzo

 $V^{\underline{a}}B^{\underline{o}}$ Los directores de la tesis doctoral

Fdo.: Dra. M.I. Rodríguez-García Profesora de Investigación del CSIC Fdo.: Dr. A.J. 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 FPI del Ministerio de Educación y Ciencia. El trabajo ha sido financiado a través de los proyectos de investigación AGL2003-00179 (Ministerio de Educación y Ciencia) y P06-AGR-01791 (Proyecto de excelencia, Consejeria de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía)

A mis padres y hermanos Por su amor y apoyo



Primeramente, mi agradecimiento más profundo a mis dos directores de tesis, la Dra. María Isabel Rodríguez García y el Dr. Antonio Jesús Castro López. A la Dra. María Isabel Rodríguez García, por confiar en mí desde el principio, dándome su apoyo y permitiéndome trabajar en su grupo en la Estación Experimental del Zaidín, y por darme mucho ánimo, cariño y su amistad. Al Dr. Antonio Jesús Castro López por la colaboración brindada durante mi tesis, especialmente en la última etapa, por toda la paciencia y por hacerme ver que siempre las cosas se pueden hacer mejor.

A lo largo de esta tesis he realizado 3 estancias de investigación, la primera en el Centro de Investigación y Formación Agraria "Alameda del Obispo" (IFAPA) en Córdoba (España), donde la Dra. Hava Rapoport me brindó su colaboración y sus conocimientos sobre el olivo, al igual que Esther y Paula me han brindado una sonrisa y su amistad hasta hoy.

A la Dra. Anna Majweska-Sawka, durante los 3 meses de mi estancia en el Plant Breeding and Aclimatization Institute, en Bydgoszcz, Polonia, por mostrarme el mundo de las pectinas y AGPs, por aconsejarme y compartir buenos momentos y tartas polacas junto conmigo y su grupo. Todos me hicieron sentir como en casa.

Al Dr. Denis Murphy, por permitirme trabajar en su grupo en la Universidad de Glamorgan, UK. Al igual que Mark Partridge, ya doctor, ambos me ayudaron durante mis seis meses de estancia en Gales y con los cuales se ha forjado una amistad sincera.

Por otro lado, quiero agradecer a mi tutora, la Dra. Carmen Lluch Plá, su inestimable ayuda durante todo el periodo de mi tesis.

También quisiera agradecer a los miembros del grupo Biología Reproductiva de Plantas, mi grupo de trabajo a lo largo de mi tesis porque en cada momento me han sabido ofrecer su cariño, sus consejos, pero sobre todo su alegría.

Al Dr. Juan de Dios Alché, por ser mi "otro jefe", por todo lo que científicamente aprendí de él, por enseñarme todo lo que sé del confocal y por los momentos en los que más que un jefe se comportó como un amigo.

Un agradecimiento especial a Conchita Martínez Sierra, por la colaboración, paciencia, apoyo desde el primer día que llegue al laboratorio y sobre todo por esa gran amistad que me brindó y me brinda, por escucharme y aconsejarme siempre, a quien la vida con el tiempo le ha dado otra hija.



A mis compañeros de laboratorio José Carlos, Juan David, Dori, Madhi, María José, Krzysztof, Agnieszka y Mariam, y a Mounim, al que siempre recordaré, por su apoyo, ánimo, cariño, y por compartir conmigo muchos momentos tanto alegres como tristes, por tener siempre tendida su mano amiga, por escucharme, en fin, por darme cariño y sobre todo una gran amistad, con la que podré contar siempre.

También agradecer a todo el personal de la Estación Experimental del Zaidín, y a todos aquellos que se preocuparon tanto por mí como por mi tesis.

Recordar en este momento a mis amigas, en especial a Ute, Loli y Lita por compartir un sinfín de viajes, de momentos inolvidables y por compartir mi vida, por quererme tal como soy.

A mis tres familias en Granada, las residentes y a la administración del colegio Mayor Alsajara que durante mis primeros años compartieron conmigo momentos inolvidables. A las familias de Sousa y Siles-López por ser las personas por las cuales hoy por hoy puedo afirmar que, a pesar de haber venido sola a continuar mis estudios, jamás me he sentido así, porque ellos han estado a mi lado cada día durante estos años.

Agradecer a mi familia, mis tíos, primos y mi abuela en Argentina que siempre se interesan por saber cómo sigue mi tesis y mi vida, donde quiera que esté.

Por último, agradecer hoy y siempre a mis padres de los que estoy orgullosa y porque me han brindado todo en mi vida, amor, felicidad, afán de superación, sueños por los que vivir y que, al igual que mi hermana, a pesar de la distancia, el ánimo, apoyo y alegría que me brinda n me dan la fortaleza necesaria para seguir adelante.

	CAPÍT	ULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1.	La fase plantas	e progámica en el contexto de la reproducción sexual de las	3
1.2.	El pisti 1.2.1 1.2.2 1.2.3	lo Diversidad morfológica y estructural del pistilo Funciones del pistilo en la reproducción Receptividad estigmática y polinización efectiva	4 4 7 8
1.3.	La pare 1.3.1 1.3.2	ed celular y la matriz extracelular del pistilo Composición y estructura de la pared celular y la matriz extracelular Funciones de la pared celular y la matriz extra- celular.	9 9 10
	1.3.3 1.3.4 1.3.5	Pectinas: composición y estructura Proteínas con arabinogalactanos (AGPs): composición y estructura Funciones de la pectinas y AGPs del pistilo en la reproducción sexual	10 12 13
1.4.	El gran 1.4.1 1.4.2	o de polen Estructura y funciones de la pared del polen Estructura y funciones del tubo polínico	14 14 15
1.5.	El olivo 1.5.1 1.5.2 1.5.3 1.5.4	El cultivo del olivo El cultivo del olivo El ciclo reproductivo del olivo Estudios sobre la reproducción sexual del olivo Marcadores de variedades en el olivar	17 17 18 19 21
	CAPÍT	ULO 2: OBJETIVOS	23
	CAPÍT	ULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1.	Materia 3.1.1. 3.1.2. 3.1.3.	al vegetal Flores de olivo Pistilos Polen	29 29 29 30
3.2.	Método 3.2.1. 3.2.2. 3.2.3. 3.2.4.	Determinación de la viabilidad del polen Germinación <i>in vitro</i> del polen Procesamiento de muestras para microscopía 3.2.3.1. Fijación 3.2.3.2. Deshidratación 3.2.3.3. Inclusión 3.2.3.4. Microtomía Citoquímica para microscopía óptica (MO)	30 30 31 32 32 34 34 35 35

ĴĹ_____

		3.2.4.1. Tinción con azul de metileno/azul de toluidina	35
		3.2.4.2. Tinción de polisacáridos mediante PAS	36
		3.2.4.3. Cuantificación del almidón	37
		3.2.4.4. Tinción de calosa	37
		3.2.4.5. Tinción de lípidos mediante Sudan Black B	38
	3.2.5.	Contrastado de cortes ultrafinos para microscopía electrónica	
		de transmisión (MET)	39
	3.2.6.	Inmunocitoquímica	40
		3.2.6.1. Inmunolocalización de AGPs y pectinas en el pistilo	
		mediante microscopía de fluorescencia (MF)	40
		3.2.6.2. Inmunolocalización de AGPs, pectinas y Ole e 10 en el	
		polen mediante microscopía láser confocal (MLC)	41
		3.2.6.3. Inmunolocalización de AGPs y pectinas en el pistilo y	
		el polen mediante microscopía electrónica de	
		transmisión (MET)	43
		3.2.6.4. Observación y captura de imágenes	44
	3.2.7.	Extracción de pectinas y AGPs	44
		3.2.7.1. Polen	44
		3.2.7.2. Pistilos	45
	3.2.8.	Cuantificación de los extractos proteicos	45
	3.2.9.	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-	
		PAGE)	46
	3.2.10	. Tinción de proteínas totales	48
		3.2.10.1. Tinción con azul de Coomassie	48
		3.2.10.2. Tinción con nitrato de plata	48
	3.2.11	. Secado y documentación de los geles	49
	3.2.12	. Análisis de expresión de AGPs y pectinas	50
	3.2.13	. Análisis de densitometría	51
	3.2.14	. Análisis estadísticos	51
	CAPÍT	ΓULO 4: RESULTADOS	53
4.1.	La flor	ración del olivo	55
	4.1.1.	Las inflorescencias	55
	4.1.2.	La flor	56
	4.1.3.	Etapas del desarrollo de la flor	57
	4.1.4.	Morfología del pistilo	59
	4.1.5.	Diferencias morfológicas del pistilo entre variedades	60
42	Estruc	etura del pistilo	62
1.2	4 2 1	El estigma	62
	4.2.2	El estilo	62
	4.2.3	El ovario	64
	4.2.4	Caracterización histológica del pistilo durante su desarrollo	64
	4.2.5	Caracterización histoquímica del pistilo durante su desarrollo.	71
		4.2.5.1. Localización de polisacáridos	71
		1	

Ĵ

0	

	4.2.5.2. Cuantificación del almidón 4.2.5.3. Localización de lípidos	78 80
	 4.2.6. Organización celular del pistilo durante el desarrollo 4.2.6.1. El estigma	85 85 86
	4.2.0.5. El ovario 4.2.7. Características específicas de los tejidos del pistilo del olivo	90 90
4.3.	AGPs y pectinas en el pistilo del olivo durante su desarrollo 4.3.1. Análisis de expresión de AGPs y pectinas en el pistilo del olivo 4.3.2. Localización de AGPs y pectinas en el pistilo del olivo	93 93 98
4.4.	AGPs y pectinas en el polen del olivo durante la germinación <i>in vitro</i> 4.4.1. Análisis de expresión de AGPs y pectinas en el polen 4.4.2. Localización de AGPs y pectinas en el polen	118 118 122
4.5.	Calosa y Ole e 10 en el polen del olivo 4.5.1. Localización de calosa en el tubo polínico durante la	134
	4.5.2. Localización de calosa en el tubo polínico durante la	134
	germinación <i>in situ</i>	136
	polen	137
E 1	CAPITOLO 5: DISCUSION	139
5.1.	olivo	141
5.2.	Morfología y composición del pistilo del olivo	142
5.3.	Receptividad y periodo de polinización efectiva en el olivo	144
5.4.	El estilo y el ovario del olivo durante la fase progámica	149
5.5.	Función del almidón en el pistilo del olivo durante la fase progámica	152
5.6.	Los tejidos del pistilo en el olivo presentan inclusiones acuolares y nucleolares	153
5.7.	Implicaciones de pectinas y AGPs en la reproducción del olivo 5.7.2. Implicaciones de las pectinas y AGPs del pistilo en la	155
	reproducción del olivo	156
	reproducción del olivo	158
	CONCLUSIONES	161
	ANEXOS	167
	BIBLIOGRAFIA	179

La reproducción sexual es esencial para la propagación de las plantas superiores. Además, desde la perspectiva agronómica, es un proceso clave dado que, en la mayoría de las especies cultivadas, sólo la fertilización garantiza la formación del fruto y, por tanto, la producción de cosechas. No obstante, el estudio de la reproducción sexual en el olivo ha recibido poca atención hasta la fecha, a pesar del enorme interés agronómico de este cultivo. La razón de este olvido se debe a que tradicionalmente esta especie se ha propagado de manera vegetativa, principalmente mediante estaquillas, pasando la reproducción sexual a un segundo plano.

El objetivo general de este trabajo es generar conocimiento sobre los mecanismos celulares y moleculares que regulan las interacciones que se establecen entre el polen y el pistilo durante la fase progámica en el olivo. Para ello, es imprescindible disponer de un buen conocimiento de las diferentes estructuras que están implicadas en dichas interacciones. Este conocimiento es importante para la implementación de los programas de mejora vegetal basados en la reproducción sexual en esta especie.

Mediante diferentes técnicas de microscopía, citoquímicas, análisis de expresión de proteínas e inmunolocalizaciones en este trabajo de tesis doctoral se han planteado los siguientes objetivos específicos: 1) la caracterización morfológica, estructural e histoquímica del pistilo durante la antesis; 2) determinar los cambios a nivel morfológico, estructural e histoquímico que ocurren en los distintos órganos del pistilo antes, durante y después de la polinización; 3) y finalmente con objeto de conocer las implicaciones de las macromoléculas de pectinas y AGPs se analizó el perfil de expresión y se localizó a nivel celular las pectinas y proteínas unidas a arabinogalactanos (AGPs) en el pistilo del olivo antes, durante y después de la polinización, y en la pared del grano de polen del olivo durante la germinación *in vitro*.

Sexual plant reproduction is essential for the propagation of higher plants. Under an agronomical point of view, it is a key process because, in most of cultivated species, only fertilization guarantees fruit formation. However, instead of its enormous agronomical interest, little attention has been paid to the study of sexual reproduction in the olive because this species is mainly propagated by cuttings in the field.

The main aim of this work is to get knowledge about the cellular and molecular mechanisms that regulate pollen-pistil interactions in the olive during the progamic phase. For that purpose, it is essential to have a good knowledge of the reproductive structures involved in such interactions. The understanding of how such mechanisms are regulated will allow us in the future to apply the new technologies of biology in order to improve current breeding programs.

By using different microscopy techniques, and cytochemistry and biochemistry methods, the following specific objectives have been accomplished: 1) to analyze the morphological, structural and cytochemical characteristics of olive pistil at anthesis, 2) to determine the morphological, structural and cytochemical changes before, during and after pollination, and 3) to study the expression pattern and the cellular localization of pectins and arabinogalactan proteins (AGPs) in the pistil tissues before, during and after pollination, as well as in the pollen grain wall during *in vitro* germination.

INTRODUCCIÓN



1.1. La fase progámica en el contexto de la reproducción sexual de las plantas

Las plantas aseguran su supervivencia mediante la reproducción vegetativa, sexual o una combinación de ambas. La ventaja de la reproducción sexual es que permite la recombinación del material genético de los progenitores y, por tanto, la aparición de nuevos caracteres fenotípicos sobre los que actúa la selección natural. La reproducción sexual se inicia con la formación de la flor y las estructuras reproductoras, en las que se alojan los gametofitos femenino y masculino haploides (n). Durante la polinización, el polen (gametofito masculino) es transportado desde la antera hasta la superficie del estigma. La llegada del polen al estigma marca el inicio de la fase progámica. En el estigma, el polen se adhiere, hidrata y germina (Fig. 1.1). El tubo polínico que emerge del grano de polen penetra y crece a través de los tejidos del pistilo hasta llegar al ovario, donde a través del micropilo en el óvulo entra en el saco embrionario (gametofito femenino). Durante este proceso tienen lugar fenómenos de adhesión, reconocimiento y señalización celular entre el grano de polen y el pistilo, todo ello bajo un estrecho control genético y celular (Herrero y Hormaza 1996, de Graaf et al. 2001). Una vez que el tubo polínico llega al saco embrionario, libera las células espermáticas y se produce la doble fecundación.



Figura 1.1. La fase progámica en las Angiospermas. Adaptado de Hiscock y Allen (2008).

1.2. El pistilo

1.2.1. Diversidad morfológica y estructural del pistilo

En las angiospermas, el pistilo o gineceo ocupa la posición central de la flor, y consta de uno (pistilo simple) o varios carpelos fusionados (pistilo compuesto) que forman en la base una estructura fértil, el ovario, dentro del cual se desarrollan los óvulos (Gasser y Robinson 1993). La parte superior de los carpelos se prolonga y diferencia en una estructura a modo de cilindro, denominada estilo (Fig. 1.2). Este proceso requiere una etapa inicial de divisiones celulares seguida de una fase de elongación y diferenciación celular en el ápice que resulta en una variedad morfológica del estigma que refleja los distintos mecanismos de polinización presentes en las Angiospermas (Barret *et al.* 2000). La diferenciación de los tejidos internos del estilo da lugar a la formación del tejido transmisor del estilo, en el que se va configurando una matriz extracelular a partir de los distintos componentes secretados por las células (Wolters-Arts *et al.* 1996, de Graaf *et al.* 2001). El desarrollo completo del pistilo puede finalizar antes del inicio de la polinización, o bien terminar la maduración del saco embrionario durante la polinización



Figura 1.2. Esquema de una flor perfecta de una planta Angiosperma, donde el ovario ocupa la posición central.

El *estigma* se sitúa en la zona superior del pistilo. Desde el punto de vista estructural, el estigma consta de dos ó más lóbulos de tejido parenquimático en la parte más interna, y de un tejido secretor que puede terminar en papilas. La zona basal del esigma, comunica las papilas con el tejido transmisor del estilo. El estigma puede ser de dos tipos: húmedo o seco. En los estigmas húmedos, la superficie de las papilas aparece cubierta de una secreción acuosa o exudado, que contiene proteínas, lípidos, polisacáridos que son secretados al espacio extracelular por el tejido secretor y las propias papilas (Cheung 1996). En los estigmas secos, la superficie de las papilas consta de una pared celular primaria cubierta por una cutícula cérea muy hidrofóbica e impermeable, y una delgada película de naturaleza proteica en la parte más externa (Edlund *et al.* 2004, Hiscok y Allen 2008).

El *estilo* suele presentar forma tubular y es de longitud variable. Desde el exterior hacia el interior, el estilo consta de una epidermis formada por una única o unas pocas capas de células, y el parénquima, en el que encontramos los haces vasculares que conectan el pistilo con el sistema vascular central de la planta. La estructura de la zona central determina la existencia de tres clases de estilos, huecos, sólidos y semisólidos (Knox 1984, Lord 2000) y también se les llama estilos abiertos, cerrados y semicerrados (de Graaf et al 2001). En las plantas que poseen estilos sólidos, la zona central del estilo está ocupada por el tejido transmisor (TT), que se diferencia a partir de la epidermis interna o las capas más próximas a la misma de los carpelos (Fig. 1.3A). Los espacios intercelulares presentes en el TT están rellenos de una matriz (MI) rica en aminoácidos y azúcares libres, polisacáridos, proteínas, glicoproteínas y compuestos fenólicos (Cheung 1996). Dicha matriz muestra una intensa actividad esterasa y fosfatasa ácida, similar al mucílago presente en el canal estilar de las especies con estilos huecos (Labarca et al. 2002). En los estilos huecos, la parte central forma el denominado canal estilar, que parte de la cavidad ovárica y llega a la superficie del estigma. La superficie de dicho canal está formada por una capa continua de células epidérmicas diferenciadas de tipo glandular, cubiertas por una abundante matriz extracelular de tipo mucilaginoso y de composición similar a la matriz intercelular (Fig. 1.3B).



Figura 1.3. Tipos de estilos en Angiospermas. **A**, pistilo con estilo sólido, como en *Arabidopsis*; **B**, pistilo con estilo hueco, como en *Lilium*. Abreviaturas= Po: polen, TP: tubo polínico, ETT: epidermis del tejido transmisor. Esquema adaptado de Lord (2000).

El ovario consta de una epidermis rodeada por una cutícula protectora, y una zona interna de tejido parenquimático y haces vasculares. Dentro del ovario, hay una o más cavidades o lóculos que contienen los óvulos (Fig. 1.4A). Éstos se originan a partir de una zona especializada de la pared interna del ovario que se denomina placenta, y están unidos a ella por un pedúnculo llamado funículo. Cada óvulo consta de un saco embrionario rodeado por un tejido compacto que forma la nucela, que a su vez está rodeada por uno o más tegumentos. Los tegumentos dejan un orificio o micrópilo, por donde penetra el tubo polínico al saco embrionario. El funículo y la nucela se unen en una zona conocida como chalaza. Cada óvulo está inervado por un haz vascular que atraviesa el funículo y llega hasta la chalaza. En Angiospermas encontramos tres tipos de sacos embrionarios (monospórico, bispórico y tetraspórico) en función del tipo de citocinesis durante la meiosis, el número y patrón de divisiones mitóticas y el patrón de celularización (Yadegari y Drews 2004). El gametofito femenino más común (> 70% de las Angiospermas, incluyendo grupos de relevancia agronómica como las crucíferas, gramíneas, leguminosas y solanáceas) es el monospórico (Fig. 1.4B) y está formado por tres células haploides próximas a la chalaza, llamadas antípodas, una célula central diploide y tres células haploides (dos sinérgidas y la ovocélula) próximas al micrópilo y que forma el aparato filiforme (Maheshwari 1950).



Figura 1.4. El gametofito femenino en las Angiospermas. **A**, estructura de un óvulo; **B**, estructura del saco embrionario de *Arabidopsis* de tipo monospórico, formado por 6 células haploides y 1 célula diploide (célula central). Abreviaturas= ac: antípodas, cc: célula central, ns: núcleo secundario oc: ovocélula, sc: sinérgidas.

1.2.2. Funciones del pistilo en la reproducción

Los pistilos de todas las Angiospermas comparten tejidos, de tipo vascular, parenquimático y epidérmico, con los órganos vegetativos de la planta. Estos tejidos son necesarios para el soporte estructural, el transporte de moléculas, la nutrición y la protección y defensa del propio pistilo (Gasser y Robinson-Beers 1993).

La arquitectura especializada del estigma, a nivel de las papilas y el tejido secretor subpapilar, permite modular la adherencia, hidratación y germinación del grano de polen, las relaciones de incompatibilidad polenpistilo, y el crecimiento y orientación inicial del tubo polínico.

En el estilo, el tejido transmisor (TT) proporciona los nutrientes y precursores necesarios para el crecimiento del tubo polínico (Herrero y Hormaza 1996). Además, el TT desempeña un papel clave en la adhesión y orientación del tubo polínico (Lord 2003). El modelo de atracción mecánica propone que el tubo polínico podría crecer a través de su extremo apical a lo largo de marcadores específicos distribuidos sobre la superficie de las células del tejido transmisor (Cheung *et al.* 1995, Mollet *et al.* 2000). Como alternativa,

algunos estudios sugieren la existencia en los tejidos del pistilo de gradientes de determinadas moléculas (ej. GABA), que podría controlar la orientación quimiotrópica del tubo polínico (Palanivelu *et al.* 2003). Algunos estudios sugieren que existe una correlación positiva entre la cantidad (volumen) de tejido trasmisor del pistilo, y el número de tubos polínicos y óvulos (Matthews *et al.* 1999).

El ovario es el órgano donde se encuentran los óvulos y se forma el saco embrionario y es el encargado de albergar, proteger y nutrir al gametofito femenino. Por otro lado, la orientación del tubo polínico en la placenta del óvulo depende de secreciones que producen las células glandulares y determinadas estructuras especializadas como el obturador (Herrero 2001). Además, existen estudios genéticos que sugieren que el saco embrionario controla la orientación hacia el micrópilo y la recepción del tubo polínico (Higashiyama *et al.* 2001, Skinner *et al.* 2004, Escobar-Retrespo 2007), a través del exudado secretado por el micropilo y aparato filiforme de las sinérgidas, que contiene sustancias atrayentes del tubo polínico (Franssen-Verheijen y Willemse 1990, 1993).

1.2.3. Receptividad estigmática y polinización efectiva

El *periodo de polinización efectiva* (PPE) fue definido en 1965 por Williams como la diferencia (en días) entre el tiempo en que el óvulo permanece viable y el tiempo transcurrido desde la polinización hasta que se produce la fertilización, siempre que este valor no exceda el periodo de receptividad estigmática (Williams 1966). El PEP está condicionado por aquellos factores que condicionan tres aspectos clave del proceso reproductivo como son la receptividad estigmática, la cinética del tubo polínico y la longevidad del óvulo (Sanzol y Herrero 2001).

La *receptividad estigmática* se refiere a la habilidad del estigma para capturar el polen mediante su adhesión y permitir que éste se hidrate y germine. El periodo de receptividad estigmática varía entre 1 h y varios días dependiendo de la especie (Heslop-Harrison 2000). El inicio del periodo de receptividad estigmática coincide con el final de la maduración del estigma (Uwate y Lin 1981, Herrero y Arbeloa 1989), mientras que la degeneración del estigma o la ruptura de la integridad de las papilas marcan normalmente el final del periodo de receptividad estigmática (Egea y Burgos 1992, Gonzalez *et al.* 1995a). Un retraso en la maduración del estigma o una degradación temprana del mismo podrían limitar el PPE (Herrero 1983, Guerrero-Prieto *et* *al.* 1985, Egea *et al.* 1991, González *et al.* 1995b). A modo de ejemplo, el polen de *Pyrus communis* puede adherirse, hidratarse y germinar sobre estigmas degradados, pero el crecimiento del tubo polínico se interrumpe de manera abrupta (Sanzol *et al.* 2003). La cinética del crecimiento del tubo polínico es muy variable y depende de la especie, del origen genético (i.e. cultivar), del estadio nutritivo de la flor, de las condiciones ambientales (ej. una elevada temperatura favorece un crecimiento rápido del tubo polínico) y de la interacción con el propio pistilo (Sanzol y Herrero 2001). La longevidad del óvulo es el tercer factor que condiciona el PEP y, por tanto, el cuajado de los frutos. Cualquier anomalía en el desarrollo (Rallo *et al.* 1981) o degeneración precoz del óvulo (Jaumien 1968), debido a causas genéticas o ambientales, son factores limitantes del PEP.

1.3. La pared celular y la matriz extracelular del pistilo

1.3.1. Composición y estructura de la pared celular y la matriz extracelular

A diferencia del contacto directo entre células que existe en los animales, en las plantas esta interacción se produce a través de las paredes celulares y matrices extracelulares. Las paredes celulares del pistilo no difieren en su estructura y composición de las de otros tejidos de la planta. Están constituidas por microfibrillas de celulosa, unidas entre sí por otros polisacáridos no fibrilares denominados genéricamente hemicelulosas (ej. xiloglucano), que actúan como lubricantes (Fig. 1.5). La red de celulosa-hemicelulosa se halla inmersa en una compleja matriz gelificada, que determina la porosidad de la pared celular (Baron-Epel *et al.* 1998) y proporciona cargas que modulan el pH de la misma. Dicha matriz está formada por pectinas muy hidratadas, proteínas estructurales (ej. extensinas, AGPs, etc.) y diversas proteínas solubles (ej. peroxidasas).



Figura 1.5. Esquema de la estructura de la pared de la célula vegetal.

En el pistilo, el tejido transmisor (TT) sintetiza y secreta una matriz acuosa de consistencia mucilaginosa, que rellena los espacios intercelulares existentes en los estilos sólidos, o bien el canal estilar en aquellas especies en las que los estilos son huecos (Lord 2000). El análisis químico de la matriz extracelular (ECM) revela que está compuesta de azúcares libres, proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos y compuestos fenólicos (Cheung 1996). Además, las papilas del estigma sintetizan y secretan al exterior material que forma el exudado en el caso de los estigmas húmedos, mientras que en los estigmas secos las papilas están cubiertas por una fina película proteica y una cutícula cérea impermeable (Hiscock y Allen 2008).

1.3.2. Funciones de la pared celular y la matriz extracelular

En el pistilo, la pared celular participa en la adhesión, señalización célulacélula, defensa y en numerosos procesos de crecimiento y desarrollo, además de cómo soporte estructural (Carpita y McCann 2000). En algunas especies autoincompatibles, los factores (SRK y SLG) que determinan el reconocimiento y la consiguiente aceptación o rechazo del polen son de origen esporofítico y se localizan en la pared de las papilas (Hiscock y McInnis 2003).

Las funciones de la ECM vienen determinadas por las características físico-químicas de los componentes de la misma. En los estigmas húmedos, la adhesión e hidratación del polen parecen estar mediados por factores (i.e lípidos) que se acumulan en el exudado, el cual es sintetizado y secretado por las papilas (Wolters-Arts *et al.* 2002). Otra función atribuida al exudado estigmático es la defensa frente a patógenos (Kuboyama 1998, Miller *et al.* 2000). La ECM del pistilo rellena los espacios intercelulares y juega un papel destacado en el crecimiento del tubo polínico, al facilitar su adhesión, aportar los nutrientes necesarios, y orientar al tubo polínico (Lord 2003, Sanchez *et al.* 2004). En algunas especies autoincompatibles, el fenotipo incompatible del polen depende de su genoma haploide, y está mediado por factores del esporofito (S-RNasas) secretados a la ECM y captados por el tubo polínico a su paso por el estilo.

1.3.3. Pectinas: composición y estructura

Las pectinas son heteropolisacáridos complejos presentes en la pared celular vegetal. Representan el 30% del peso seco de la pared y son una mezcla de polímeros ácidos y neutros. Los polímeros de pectinas crean superficies cargadas que regulan el pH y el balance iónico. Además, proporcionan el

entorno adecuado para la formación de microfibrillas de celulosa, determinando el grado de porosidad de la pared (Willats *et al.* 2001). Las pectinas están sujetas a modificaciones que alteran su conformación y los sitios de unión a la pared celular. Muchos de los residuos acídicos en las pectinas están esterificados con grupos metilo, acetilo y otros grupos no definidos (Mc Cann *et al.* 1994). Estas esterificaciones ocurren en el aparato de Golgi durante la biosíntesis de las pectinas. La desesterificación de las pectinas por enzimas esterasas tiene lugar en la pared celular, donde se encuentran estas enzimas, y da lugar a un aumento del número de grupos carboxilos libres, los cuales pueden unirse a Ca²⁺ y formar pectatos, que modifican las propiedades físicas de las pectinas. En función de su composición y estructura, se pueden distinguir diferentes tipos de pectinas (Willats *et al.* 2006).



Figura 1.6. Estructura de las distintas clases de pectinas presentes en la pared vegetal. Adaptado de http://www.bmb.leeds.ac.uk/staff/jpk.

Los homogalacturonanos (HG) son polímeros lineales formados por 100-200 residuos de ácido galacturónico (GalA) unidos por enlaces α -(1 \rightarrow 4). Son sintetizados en el aparato de Golgi y depositados con el 70-80% de los residuos de GalA esterificados con grupos metilo o acetilo en el C6 (Fig. 1.6). Los ramnogalacturonanos de tipo I (RGI) son polímeros formados por al menos 100 repeticiones del disacárido [\rightarrow 4)- α -D-GalA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rha-(1 \rightarrow]. Entre el 20 y el 80% de los residuos de ramnosa llevan unidas cadenas laterales de azúcares, principalmente galactanos y arabinanos (Fig. 1.6). Los ramnogalacturonanos de tipo II (RGII) son polímeros muy conservados que contienen cadenas laterales en las que hay azúcares poco comunes como la apiosa (Vidal *et al.* 2000).

1.3.4. Proteínas con arabinogalactanos (AGPs): composición y estructura

Son proteínas ricas en hidroxiprolina, serina, alanina, treonina y glicina, muy solubles en soluciones acuosas y con un elevado grado de glicosilación (Rumyantseva 2005, Knox 2006). La parte proteica representa únicamente el 2-10% de la masa total de la glicoproteína. La parte glucídica constituye el 90-98% del total y confiere a las AGPs una gran resistencia a la proteólisis. Los arabinogalactanos (polímeros de D-galactosa y L-arabinosa) son los principales componentes glucídicos de estas glicoproteínas (Fig. 1.7). Las AGPs aparecen frecuentemente unidas a la membrana plasmática (Pennell *et al.* 1989, Norman *et al.* 1990), y como componentes de la matriz extracelular (Clark *et al.* 1979).



Figura 1.7. Estructura de las proteínas con arabinogalactano (AGPs). Esquema adaptado de Serpe y Nothnagel (1999).



1.3.5. Funciones de las pectinas y AGPs del pistilo en la reproducción sexual

Se han propuesto diversas funciones que son comunes para las pectinas y las AGPs, incluyendo la diferenciación celular y organogénesis de las estructuras vegetativas y reproductoras de la planta, y la interacción molecular y señalización celular (Reiter *et al.* 1997). Además, las pectinas participan en otras funciones más específicas como la expansión celular, defensa, regulación iónica, orientación celular, y regulación de la porosidad de la pared celular. Por otro lado, las AGPs participan también en la adhesión y reconocimiento celular, nutrición y muerte celular programada.

Las discrepancias que se observan al comparar el crecimiento del tubo polínico in vitro e in vivo sugieren que el pistilo participa de manera decisiva en el crecimiento del mismo, aportando nutrientes que son incorporados por el tubo (Herrero y Hormaza 1996, Lord 2003). Además, la transición entre el estigma y el estilo supone una reducción del espacio por el que los tubos crecen, compitiendo entre sí. Por tanto, es importante que el pistilo provea a los tubos polínicos de un ambiente óptimo en cuanto a recursos para su crecimiento. Los azúcares unidos a los residuos de Ser e Hyp de las AGPs representan hasta el 90% de la masa total de la glicoproteína. Estas proteínas son deglicosiladas por enzimas hidrolíticas, por lo que se les ha atribuido una función en la nutrición del tubo polínico (Wu et al. 1995). Por otro lado, se han identificado y caracterizado diversas enzimas con actividad pectinolítica en el polen y el tubo polínico que catalizan la despolimerización de los ácidos pécticos (Dearnaley y Daggard 2001, Wing et al. 1989, Bosch y Hepler 2005). Dichas enzimas podrían facilitar la entrada del tubo polínico a través de las paredes pectocelulósicas de las papilas y, al mismo tiempo, proveer al tubo de precursores de la pared necesarios para su crecimiento. Algunos autores han propuesto también que los homogalacturanos (HG) con bajo grado de esterificación presentes en el tejido transmisor podrían actuar como reservorio de Ca⁺², que al quedar libre estaría disponible para el crecimiento del tubo polínico (Lenartowska et al. 2001).

Las pectinas y AGPs del tubo polínico podrían también jugar un papel en su adhesión y orientación. Ensayos de adhesión *in vitro*, en los que se utilizó una matriz artificial diseñada a partir de exudado del canal estilar inmovilizado sobre una membrana de nilón, permitieron determinar que la unión de una pectina y la proteína SCA establece adhesiones funcionales equivalentes a las uniones del tubo polínico a la epidermis del tejido transmisor en *Lilium* (Jauh *et al.* 1997, Mollet *et al.* 2000, Park *et al.* 2000, Lord 2003). En base a estos resultados, estos autores han propuesto un modelo de orientación en el que el crecimiento del tubo polínico estaría estimulado por contacto del tubo con estas zonas de adhesión del tejido transmisor. En el género *Nicotiana*, las AGPs específicas del tejido transmisor (TTS) presentan un gradiente creciente de glicosilación a medida que descendemos en el estilo (Cheung *et al.* 1995, Wu *et al.* 2000). Este hecho podría significar que estas proteínas glicosiladas actúan a la vez como nutriente y como factor quimiotrópico del tubo polínico (Hepler *et al.* 2001).

1.4. El grano de polen

1.4.1. Estructura y funciones de la pared del polen

En la madurez, las células vegetativa y generativa que forman el grano de polen aparecen englobadas por una única pared celular que consta de 3 partes bien diferenciadas: intina, exina y cubierta externa. La exina es la capa estructurada de la pared y está formada mayoritariamente por esporopolenina, un politerpeno impermeable y resistente a los agentes químicos, procedente del tapetum. Al final del desarrollo de la antera, el tapetum se degrada debido a la muerte celular programada. Parte de ese contenido se ensambla en estructuras resistentes a la degradación, y se deposita sobre la exina, rellenando sus cavidades y huecos, que es lo que se conoce como cubierta externa del polen o "pollen coat" (Preuss et al. 1993). Su composición puede diferir entre especies (Pacini 1997, Dickinson et al. 2000), aunque en general está constituida por sustancias lipídicas, tales como ácidos grasos, carotenoides y flavonoides (Pitfanelli et al. 1998), así como diversas proteínas incluyendo enzimas hidrolíticas de la pared (Bih et al. 1999) y proteínas implicadas en la adhesión del polen y en la respuesta de autoincompatibilidad (Preuss et al. 1993, Ruiter et al. 1997, Murphy y Ross 1998, Mayfield et al. 2001). La intina es la capa más interna de la pared del polen y está formada por pectinas y hemicelulosa. Las pectinas esterificadas y desesterificadas se acumulan tanto en la intina como en superficie externa de la exina (Cresti et al. 1983, Geitmann et al. 1995, Li et al. 1995, Majewska-Sawka y Rodríguez-García 2006), y proceden del polen y del tapetum, respectivamente (Aouali et al. 2001).

La célula vegetativa del polen maduro de *Lilium* contiene pectinas esterificadas (PE) y desesterificadas (PDE) en pequeñas vesículas del citoplasma. La acumulación de pectinas en las vesículas de Golgi del polen podría jugar un papel como reservorio de compuestos pécticos, necesarios en



los inicios de la germinación y crecimiento del tubo polínico (Jauh y Lord 1996, Derksen *et al.* 1999).

La estructura y composición de la exina y cubierta de la pared del polen son características importantes para determinar el tipo de polinización, es decir si su transporte hasta el estigma de la planta es por el aire (anemófila) o por insectos (entomófila) (Hopkins *et al.* 1969, Heslop-Harrison 1979b, Pacini y Franci 1996, Dobson and Bergstrom 2000) y, además, regulan procesos clave como la adhesión del polen a la superficie estigmática (Luu *et al.* 1997a, b, Zinkl *et al.* 1999), la hidratación del grano de polen (Elleman y Dickinson 1986, Wolters-Arts et al. 1998, Mayfield y Preuss 2000), el reconocimiento del polen por parte del estigma con el consiguiente rechazo o aceptación del mismo (Luu *et al.* 1999), y el inicio de la germinación y el crecimiento del tubo polínico.

1.4.2. Estructura y funciones de la pared del tubo polínico

La pared del tubo polínico difiere de la pared de la célula vegetal tanto en su estructura como en su función. Así, la cantidad de celulosa es pequeña en comparación al resto de polímeros que conforman la pared y no parece existir un sistema de microfibrillas organizado. La pared del tubo polínico aparece configurada como un cilindro que crece exclusivamente a través de su extremo apical y en una única dirección (Derksen 1996, Hepler et al. 2001). Está formada por una pared primaria compuesta de pectinas, y una pared secundaria de calosa, adyacente a la membrana plasmática (Heslop-Harrison 1987, Steer y Steer 1989). La pared primaria se forma en el ápice del tubo a partir de pectinas esterificadas (Li et al. 1994, Jauh y Lord 1996, Parre y Geitmann 2005) que son secretadas a través de vesículas procedentes del Golgi (Levy y Staehelin 1992, Hasegawa et al. 1998). Durante el proceso de maduración de la pared, el crecimiento del tubo desplaza las pectinas del ápice hacia la zona subapical, donde sufren un proceso de de-esterificación, a través de la hidrólisis de los grupos metoxiésteres de los homogalacturonanos, proceso que es llevado a cabo por enzimas pectina metilesterasas (Bosch y Hepler 2005, Chen y Ye 2007). De esta forma, las pectinas liberan grupos carboxilos, los cuales se unen a iones Ca²⁺ formando pectatos que le confieren a la pared del tubo polínico una mayor fuerza mecánica (Jarvis 1984, Carpita y Gibeaut 1993). De forma paralela, la actividad de la calosa sintasa da lugar a una capa de calosa bajo la capa fibrosa de pectinas. Al final del proceso, la pared del tubo polínico incorpora también otras proteínas tales como AGPs y extensinas.

Dado que el crecimiento del tubo polínico es rápido y se extiende a lo largo del pistilo, la síntesis de la pared, su composición y la configuración de sus componentes son factores importantes en la regulación del crecimiento del tubo polínico y, por lo tanto, del proceso de fertilización. Por tanto, el suministro de los precursores de la pared celular debe ser también rápido y continuo durante todo el proceso (Geitmann y Sterr 2006). La actividad pectinolítica del tubo polínico, además de facilitar su entrada a través de las paredes pectocelulósicas del pistilo, podría contribuir al aprovisionamiento de precursores de la paret a partir de las pectinas y AGPs presentes en el exudado estigmático y la matriz extracelular del tejido transmisor (Bosch y Hepler 2005).

La pared celular del tubo polínico desempeña múltiples funciones, incluyendo el control físico de la forma del tubo, la protección de la célula generativa de los daños mecánicos y la resistencia contra la presión de turgencia (Benkert *et al.* 1997, Geitmann y Sterr 2006). Existen evidencias que muestran que pectinas y AGPs podrían jugar también una función importante en la adhesión y orientación del tubo polínico al tejido transmisor (Jauh and Lord 1996, Lord 2000). El estilo puede ser de tipo hueco (ej. *Lilium*) o sólido (ej. Arabidopsis). En el primer caso, los tubos polínicos, a través de su pared, crecen adheridos a la epidermis del canal transmisor, el cual está relleno de mucílago, mientras que en el segundo los tubos crecen a través de la matriz extracelular del tejido transmisor (Lord 2000).



Figura 1.8. Modelo de adhesión y crecimiento del tubo polínico en *Lilium*. Esquema adaptado de Lord (2000).

En *Lilium*, las células de la epidermis del tejido transmisor aparecen cubiertas de una matriz mucilaginosa rica en pectinas desesterificadas y adhesinas ricas en cisteína (SCA), que interaccionan con pectinas y AGPs de la pared del tubo polínico (Fig. 1.8) creando puntos de adhesión (Park *et al.* 2000). Además, existen evidencias de que ciertas AGPs de la membrana plasmática podrían jugar un papel en la señalización celular del ápice del tubo polínico (Schultz *et al.* 1998) al servir de diana para las vesículas secretoras que transportan los componentes de la pared primaria. Estudios de inhibición, mediante el uso del reactivo de Yariv, un inhibidor de pectinas, muestran que el tubo polínico interrumpe su crecimiento, pero se forma una pared más gruesa de lo habitual debido a que el transporte de vesículas secretoras en la zona apical se mantiene (Roy *et al.* 1998).

Además, la pared del tubo polínico es una estructura porosa que permite el paso de proteínas del pistilo que determinan las reacciones de compatibilidad en muchas especies. En muchas especies con estigmas húmedos es común que el grano de polen incompatible o foráneo se hidrate y germine un tubo polínico sin que exista un proceso selectivo en la superficie del estigma (Wheeler *et al.* 2001). En estos casos, el reconocimiento del polen por parte del pistilo se produce en algún punto dentro del estigma o del estilo. Así, en las familias Solanáceas, Rosáceas y Escrofulariáceas el reconocimiento del polen ocurre en la parte superior del estilo y es llevado a cabo por una ARNasa de tipo S (ARNasa-S), secretada por el tejido transmisor (TT) del pistilo a la matriz extracelular (McClure *et al.* 1989) e incorporada a través de la pared del tubo polínico (Luu *et al.* 2000).

1.5. El olivo

1.5.1. El cultivo del olivo

El inicio del cultivo del olivo se remonta hacia los años 4000-3000 a. C. y su origen se sitúa en oriente próximo, probablemente en algún punto entre Siria y Jordania. Aunque los principales países productores se sitúan alrededor de la cuenca mediterránea, es un cultivo emergente en muchas zonas de Asia central, en Australia y en California. Entre las especies arbóreas cultivadas en España, cuya unidad de cosecha es el fruto, el olivo ocupa el segundo puesto en términos de producción tras los cítricos con casi 4 millones de toneladas en 2005 (http://faostat.fao.org), lo que representa algo más de la cuarta parte de la producción mundial (15 millones de toneladas) de ese mismo año. En Andalucía, la superficie dedicada al olivar supera el millón y medio de
hectáreas, lo que equivale al 33% de las tierras de cultivo y el 16% de la superficie total de la región (Fig. 1.9).



Figura 1.9. Superficie destinada al cultivo del olivo en Andalucía (en verde).

1.5.2. El ciclo reproductivo del olivo

El olivo es un árbol polimórfico, con fases juvenil y adulta. El ciclo vegetativo del árbol se manifiesta después de su reposo invernal y su crecimiento es lento. El olivo alcanza la madurez reproductora al cabo de 5-8 años y con un desarrollo pleno a los 20 años.



Figura 1.9. Ciclo reproductivo bienal del olivo. Esquema adaptado de Rallo y Cuevas (2001).



El ciclo reproductivo del olivo, como ocurre en muchos otros árboles frutales, es bienal (Fig. 1.10). Durante el periodo primavera-verano del primer año se produce la formación de las yemas y la inducción e iniciación floral. El descenso de la temperatura es la causa más probable del reposo invernal. Durante la primavera del segundo año, se produce el desarrollo floral, la polinización y la fecundación. El desarrollo de la semilla y el crecimiento y desarrollo del fruto se produce desde el inicio del verano hasta bien entrado el invierno del segundo año.

1.5.3. Estudios sobre la reproducción sexual del olivo

La información que actualmente disponemos sobre la reproducción del olivo es escasa y está fragmentada. Desde el punto de vista agronómico, los estudios realizados hasta el momento se han orientado a conocer: 1) los factores ambientales y fisiológicos que inducen la floración (Badr y Hartmann 1971, 1972, Lavee *et al.* 1986, Fernández-Escobar *et al.* 1992, Dos Santos Ramos 2000), 2) la fenología de la floración de ciertas variedades (Barranco y Rallo 1984), 3) el ciclo de floración de los diferentes cultivares (Barranco *et al.* 1994, Rallo *et al.* 2005), 4) las relaciones de diferentes aspectos de la polinización cruzada (Fernández-Escobar y Rallo 1981, Fernández-Escobar y Gómez-Valledor 1985), 5) las relaciones de autoincompatibilidad polen-pistilo y compatibilidad entre cultivares (Bradley y Giggs 1963, Cuevas 2005), y 6) la etapa de post-antesis de la flor y la abscisión del fruto (Rapoport y Rallo 1991).

A nivel básico, se han estudiado distintos aspectos relacionados con la ontogenia del gametofito masculino (polen), tales como la ultraestructura del grano de polen (Pacini y Juniper 1979a, 1979b, Fernández y Rodríguez-García 1994), la formación de la pared de calosa (Alché y Rodríguez-García 1997), la diferenciación del retículo endoplasmático y su función como lugar de síntesis almacenamiento de proteínas (Rodríguez-García y Fernández 1990, v Rodríguez-García et al. 1995a, 1995b, Fernández et al. 1996), el ciclo ribosómico y los nucleoloides citoplasmáticos (Rodríguez-García y Fernández 1897, Alché et al. 1994), los cuerpos nucleares (Olmedilla et al. 1997), y la formación de la pared del polen y las aperturas (Fernández y Rodríguez-García 1988, 1989, 1995), entre otros. Además, se han postulado las características morfológicas que definen al polen viable y se ha puesto a punto la germinación in vitro del polen (M'rani-Alaoui 2000). Esto ha permitido estudiar la ultrastructura del tubo polínico (M'rani-Alaoui 2000), la organización de los microtúbulos (De la Flor et al. 2003), la división y motilidad nuclear (Rodríguez-García *et al.* 2003), la dinámica de sustancias de reserva durante el desarrollo del polen (Rodríguez-García *et al.* 2003), y la formación de la pared del tubo polínico (Majewska-Sawka *et al.* 2002), entre otros aspectos. 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), debido a su significado para la formación del fruto. Por otro lado, los escasos estudios centrados en la morfología y composición del pistilo no son completos (King 1928, Ciampolini *et al.* 1983, Rapoport 2004, Reale *et al.* 2006). Sin embargo, la información que hay sobre el pistilo es escasa y las interacciones entre el polen y pistilo aún no se han abordado.

El olivo ha sido tradicionalmente considerado como parcialmente autocompatible (Fernández-Bolaños y Frías 1969). Sin embargo, los resultados relacionados con el comportamiento auto- e inter-compatible del olivo en diferentes cultivares son contradictorios (Bartolini y Guerriero 1995, Cuevas y Polito 1997, Cuevas 2005). Este hecho ha sido atribuido a los numerosos factores ambientales que afectan a la fertilización en el olivo (Bradley y Griggs 1963, Griggs et al. 1975, Bartolini y Guerriero 1995, Cuevas et al. 1994, Lavee 2002). Recientemente, se han utilizado microsatélites para determinar la paternidad de la descendencia en olivos procedentes de programas de mejora con autopolinización y polinización cruzada (De la Rosa et al. 2004), obteniéndose evidencias de que el sistema de autoincompatibilidad es una realidad al menos en los cultivares Arbequina, Frantoio, Lechín de Sevilla, Manzanilla de Sevilla y Picual (Díaz et al. 2006). Además, las pruebas de paternidad con marcadores moleculares muestran que la influencia de los factores medioambientales en la variabilidad de resultados no es realmente significativa. En lo que sí coinciden muchos autores es en las ventajas de la polinización cruzada con polen de otros cultivares para la producción (Cuevas y Polito 1997, Cuevas et al. 2001, Lavee 2002, Moutier 2002). Los estudios de campo sobre autocompabilidad y compatibilidad cruzada en el olivo se han realizado mediante pruebas de autopolinización y polinización cruzada, y recuento del nº de frutos cuajados (Bartolini y Guerriero 1995, Cuevas et al. 2001, Lavee et al. 2002, Moutier 2002). También se ha estudiado el crecimiento del tubo polínico en pistilos autopolinizados o con polinización cruzada, observándose que inicialmente el polen germina en el estigma, aunque el crecimiento del tubo se detiene en la zona donde confluyen el estigma y el estilo (Cuevas et al. 1997, 2001, Bartolini y Guerriero 1995). En base a estos resultados, se ha propuesto la existencia de un sistema de autoincompatibilidad de tipo gametofítico en el olivo (Sedgley 1994, Bartolini y Guerriero 1995,



Cuevas *et al.* 2001, Moorkerjee *et al.* 2005). Sin embargo, hasta la fecha se desconocen las bases moleculares que regulan dicho sistema.

El polen de olivo es responsable directo de un número creciente de problemas asociados con la alergia respiratoria, y su incidencia sobre la población humana está claramente relacionada con la distribución geográfica de dicho cultivo (Bousquet et al. 1985, Gioulekas et al. 1991, Wheeler 1992, Liccardi et al. 1996; Florido et al. 1999). Este hecho ha provocado un interés creciente en los últimos años por la identificación y caracterización de productos génicos del polen del olivo (Rodríguez et al. 2001, 2002, 2007). En paralelo, se han iniciado estudios sobre la función de estas proteínas en el contexto de la reproducción (Alché et al. 1998, 1999, 2004, Barral et al. 2005, Morales et al. 2008). También se han identificado y caracterizado diversos marcadores bioquímicos y moleculares del desarrollo del fruto, entre los que se incluyen las proteínas de almacenamiento de tipo 11S (Alché et al. 2006, Wang et al. 2007), un translocador plastídico de glucosa (Butowt et al. 2003), componentes del sistema de degradación de proteínas mediado por ubiquitina (Rodríguez-García et al. 2004), o enzimas relacionadas con la síntesis de ácidos grasos (Rodríguez-García et al. 2004, Hamman-Khalifa 2005), entre otros. No obstante, la información disponible sobre los genes/proteínas implicados en la gametogénesis, la interacción polen-pistilo, la fertilización y los mecanismos de desarrollo y maduración del embrión y el fruto en el olivo es muy escasa.

1.5.4. Marcadores de variedades en el olivar

La expansión de cultivares de olivo, su hibridación, selección de descendencia y clonación ha originado una gran diversidad de cultivares (Zohary y Spiegel Roy, 1975). Se han descrito 2600 cultivares diferentes de olivo en el mundo (Rugini y Lavee 1992), de los cuales 272 están catalogados en España (Barranco y Rallo 1984). La primera clasificación sistemática de variedades de olivo data del siglo XVIII (Pitton de Tournefort 1719). Desde entonces, la identificación de cultivares de olivo se ha realizado en base a caracteres morfológicos cuantitativos y/o cualitativos 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. 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). No obstante, su uso ha sido reemplazado en la actualidad por los marcadores de ADN, entre los que se incluyen los RAPDs, AFLPs, SCARs, SSTs y los microsatélites o ISSRs. Dichos marcadores se han utilizado con éxito en la identificación de variedades (Bogani *et al.* 1994, Fabbri *et al.* 1995, Díaz *et al.* 2006, 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).

OBJETIVOS



La reproducción sexual es esencial para la propagación de las plantas superiores. Además, desde la perspectiva agronómica, es un proceso clave dado que, en la mayoría de las especies cultivadas, sólo la fertilización garantiza la formación del fruto y, por tanto, la producción de cosechas. No obstante, el estudio de la reproducción sexual en el olivo ha recibido poca atención hasta la fecha. Las razones de este olvido hay que buscarlas en que esta especie se ha propagado tradicionalmente de manera vegetativa, principalmente mediante estaquillas (Barranco *et al.* 2004), por lo que el estudio de la reproducción sexual ha quedado relegado a un segundo plano.

El objetivo general de este trabajo es generar conocimiento sobre los mecanismos celulares y moleculares que regulan las interacciones que se establecen entre el polen y el pistilo durante la fase progámica en el olivo. Para ello, es imprescindible disponer de un buen conocimiento de las diferentes estructuras que están implicadas en dichas interacciones. Este conocimiento es importante para la implementación de los programas de mejora vegetal basados en la reproducción sexual en esta especie. En este contexto, los objetivos específicos que se han planteado en este trabajo de tesis doctoral han sido los siguientes:

- 1) Llevar a cabo la caracterización morfológica, estructural e histoquímica del pistilo del olivo durante la antesis.
- Determinar los cambios a nivel morfológico, estructural e histoquímico que ocurren en los distintos órganos del pistilo antes, durante y después de la polinización.
- Analizar el perfil de expresión y la localización celular de pectinas y proteína unidas a arabinogalactanos (AGPs) en el pistilo del olivo antes, durante y después de la polinización.
- Analizar el perfil de expresión y la localización celular de los polisacáridos de la pared del grano de polen del olivo durante la germinación *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS





3.1. Material vegetal

3.1.1. Flores de olivo

Para realizar este trabajo de investigación se recolectaron flores perfectas de olivo (*Olea europaea L.)* de las variedades Picual (utilizada como variedad de referencia), Arbequina, Loaime y Lucio. Las muestras fueron tomadas en las provincias de Córdoba (Banco de Germoplasma de Olivo, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera "Alameda del Obispo") y Granada (Estación Experimental del Zaidín, CSIC). La recolección se realizó durante el período de floración (Mayo y Junio) de los años 2004 a 2008.

Para la selección de flores se consideró un sistema de muestreo aleatorio de una rama de 20 árboles distintos. Las inflorescencias de la zona central del ramo fructífero se cosecharon a la altura del recolector a lo largo del perímetro del árbol (da Silva, 2006). Para conseguir un mismo estado de desarrollo de las flores, al inicio de la floración se procedió a la eliminación de todas las flores abiertas en una misma rama durante el primer día, de modo que sólo permanecieron las flores blancas cerradas. Al siguiente día se procedió a la retirada de las flores cerradas y a la posterior elección de las flores recién abiertas, con los pétalos separados y las anteras visibles. Se tomaron muestras durante un periodo de 10-15 días, dependiendo del año de recolección.

3.1.2. Pistilos

Para este estudio se utilizaron pistilos procedentes de inflorescencias de la variedad Picual. La disección de los pistilos se realizó a partir de inflorescencias recién recolectadas del árbol, utilizando para ello una lupa binocular y unas pinzas de punta fina. De este modo se recolectaron pistilos antes de la polinización (botón floral cerrado), durante la fase receptiva del estigma (flores abiertas con anteras dehiscentes) y después de la polinización (flores sin pétalos y sin anteras). El material utilizado para los ensayos bioquímicos fue congelado en N₂ líquido y almacenado a -80° C, con objeto de disponer de suficiente material durante todo el año. Para los estudios de microscopía, 30 pistilos de cada estadio fenológico fueron inmediatamente procesados tras la disección, con objeto de evitar daños en los tejidos, según se describe más adelante.

Los análisis morfométricos del pistilo de los cv. Picual, Arbequina, Lucio y Loaime se llevaron a cabo mediante el programa Image Tool v.3.0 (Wilcox *et al.* 2002). Se midió la altura y anchura del estigma, estilo y ovario a partir de 15 pistilos de cada variedad, y se calculó la media y la desviación estándar. Los



resultados se representaron gráficamente mediante el programa Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corp., USA)

3.1.3. Polen

En los estudios llevados a cabo en este trabajo de investigación se utilizó polen maduro de olivo (*Olea europaea* L.) de la variedad Picual. La recolección del polen se efectuó durante el periodo de floración y se utilizaron para ello dos métodos. El primero incluye el uso de aspiradores industriales que llevan incorporados una serie de filtros que permiten aspirar y retener selectivamente el polen a partir de las inflorescencias. El segundo es la técnica clásica mediante la cual se cubren con bolsas de papel las inflorescencias jóvenes. Tras la antesis, el polen se deposita y acumula en el fondo de la bolsa, de donde es aspirado y separado de los restos florales mediante el filtrado a través de tamices con un diámetro de poro de 50 μ m. Como en el caso de los pistilos, el material utilizado para los ensayos bioquímicos fue congelado en N₂ liquido y almacenado a –80°C hasta su posterior uso. Para los estudios de microscopía, el polen fue procesado tras la recolección, según se describe más adelante.

3.2. Métodos

3.2.1. Determinación de la viabilidad del polen

La calidad del polen es primordial para que la fecundación tenga éxito. De ocurrir alteraciones en la misma, la fecundación y formación del fruto podría verse comprometida. La viabilidad del polen se define como su capacidad para germinar y emitir un tubo polínico. Con objeto de evaluar la viabilidad del polen se llevó a cabo la prueba de la reacción fluorocromática (FCR) según el protocolo Heslop-Harrison y Heslop-Harrison (1970).

<u>Principio</u>

Cuando los granos de polen se incluyen en una solución de diacetato de fluoresceína (FDA), este reactivo (apolar y no fluorescente) pasa al citoplasma de la célula vegetativa. Las esterasas citoplasmáticas hidrolizan el FDA liberando la fluoresceína (polar y fluorescente), la cual se acumula en el citoplasma. Aquellos granos que muestran fluorescencia amarillo-verdosa al ser observados con una luz azul se consideran viables, dado que: a) poseen un sistema de membranas intacto, y b) poseen enzimas esterasas activas. Por otro lado, los granos de polen inviables no presentan fluorescencia debido a la ausencia de esterasas activas y/o a la difusión de la fluoresceína a través de las membranas dañadas.

<u>Reactivos</u>

- Solución de diacetato de fluoresceína (FDA) 2 mg/ml en acetona
- Solución de sacarosa 0,5 M

<u>Procedimiento</u>

- 1. Mezclar 10 mg de polen maduro con una gota de la solución de sacarosa 0,5 M.
- 2. Colocar sobre un portaobjetos una gota de la solución de FDA y dejar evaporar la acetona.
- 3. Colocar una gota de la solución de sacarosa con el polen sobre la gota de acetato de fluoresceína.
- 4. Incubar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 5–15 minutos.
- 5. Observar en el microscopio de epifluorescencia con el filtro azul.
- 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 muestrean 5 campos que contengan al menos 100 granos de polen).

3.2.2. Germinación in vitro del polen

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

<u>Reactivos</u>

• Medio de germinación, que se prepara de acuerdo a la siguiente tabla:

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

Tabla 3.1

¹ Para garantizar la integridad de los tubos polínicos, el pH debe estar entre 5,5 y 6,5.

² El medio 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.

<u>Procedimiento</u>

- 1. Preparar el medio de cultivo.
- 2. Pesar 0,02 g de polen maduro. Poner el polen sobre papel de aluminio dentro de una placa Petri que contiene varias capas de papel absorbente humedecido con agua y que actuará como cámara húmeda.
- 3. Incubar el polen durante 1 h a 30°C y en oscuridad.
- 4. Poner el polen en una placa Petri y añadir 5 ml de medio de cultivo y homogeneizar bien la mezcla, evitando que el polen se apelmace y forme grumos.
- 5. Incubar a 25°C y en agitación suave. Se considera que el polen ha germinado cuando la longitud del tubo polínico supera el diámetro del grano.
- 6. 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 muestrean 5 campos que contengan al menos 100 granos de polen).

3.2.3. Procesamiento de muestras para microscopía

El material que se utilizó en los diferentes estudios tanto de microscopía óptica como de microscopía electrónica fue procesado siguiendo el protocolo que a continuación se detalla.

3.2.3.1. Fijación

La fijación es una etapa crítica en el procesamiento de muestras para microscopía cuya función es la de preservar las estructuras tisulares y celulares en su estado original, retener los diferentes componentes químicos celulares (ej. lípidos, proteínas, etc.) y mantener intacta la actividad enzimática y la inmunogenicidad de las distintas proteínas.

<u>Reactivos</u>

- Solución de cacodilato sódico 0,025 M (pH 7,0)
- Solución de tetróxido de osmio al 1% (p/v)
- Solución PBS 10x: Na2HPO4 80 mM, KH2PO4 15 mM, NaCl 1,3 mM y KCl 30 mM, pH 7,4
- Solución de fijación, que se prepara de acuerdo a la siguiente tabla:

Reactivo	Cantidad	Concentración final		
Paraformaldehído	5 g	2,5 % (p/v)		
Glutaraldehído al 25% (v/v)	2.5 ml	2 % (v/v)		
NaOH 1N	1 gota	-		
H2O destilada	Hasta 25 ml			
Procedimiento: disolver el paraformaldehído en el tampón cacodilato con la ayuda del				
NaOH. Enfriar la solución resultante a 4°C. Añadir el glutaraldehído y ajustar el pH				
hasta 7,4. Completar con H2O destilada hasta un volumen final de 25 ml.				

Procedimiento para los pistilos

- 1. Diseccionar los pistilos de la flor mediante unas pinzas y un escalpelo.
- 2. Colocar los pistilos individualmente en tubos de 1,5 ml y añadir 0,5 ml de solución de fijación. Incubar durante 6 h a 4°C.
- 3. Cambiar el fijador e incubar las muestras durante 16 h a 4°C.
- 4. Retirar el fijador con una pipeta Pasteur y lavar las muestras con tampón cacodilato 0,025 M (pH 7,0) e incubar durante 30 minutos a 4°C.
- 5. Repetir el paso 4 dos veces más.

En el caso de que las muestras sean destinadas a la realización de estudios ultraestructurales, se lleva a cabo una post-fijación según se describe a continuación.

- 6. Retirar el tampón cacodilato y añadir 0,5 ml de una solución de tetróxido de osmio al 1% e incubar durante 2 h a 4°C en oscuridad.
- Lavar las muestras con tampón cacodilato 0,025 M (pH 7,0) durante 30 minutos a 4°C.
- 8. Repetir el paso 7 dos veces más.

<u>Procedimiento para el polen</u>

- 1. Pesar 0,1 g de polen (maduro, hidratado o germinado ¹) en un tubo de 1,5 ml.
- 2. Añadir 0,5 ml de solución de fijación e incubar a 4°C durante 1–2 h.



- Tras dejar reposar el polen unos minutos, retirar con cuidado el fijador con una pipeta Pasteur y lavar las muestras con tampón cacodilato 0,025 M (pH 7,0) durante 30 minutos a 4°C.
- 4. Repetir el paso 3 dos veces más.
- 5. Lavar con solución PBS 1x durante 15 minutos a 4°C.
- 6. Repetir el paso 5 dos veces más.

<u>Notas</u>:

¹ En el caso del polen germinado se debe quitar la mayor cantidad posible de medio de cultivo y añadir al menos la misma cantidad de fijador. Para los lavados se procede del mismo modo.

3.2.3.2. Deshidratación

Dado que las resinas son hidrófobas, antes de la inclusión es necesario eliminar el agua de la muestra. La deshidratación se realiza en una serie de soluciones de etanol a concentraciones crecientes, tal y como se describe a continuación.

<u>Reactivos</u>

• Etanol absoluto

<u>Procedimiento</u>

- 1. Retirar el tampón de lavado y añadir la solución de etanol al 30% (v/v). Incubar durante 1 h a 4°C
- Retirar la solución de etanol al 30% y añadir la solución de etanol al 50% (v/v). Incubar durante 1 h a 4°C.
- 3. Retirar la solución de etanol al 50% y añadir la solución de etanol al 70% (v/v). Incubar durante 16 h a -20°C.
- 4. Retirar la solución de etanol al 70% y añadir la solución de etanol al 90% (v/v). Incubar durante 6 h a -20° C.
- 5. Retirar la solución de etanol al 90% y añadir la solución de etanol al 100% (v/v). Incubar durante 2 días a -20° C.
- 6. Repetir el paso 5.

3.2.3.3. Inclusión

La inclusión en una resina incrementa la dureza de los tejidos con objeto de poder obtener secciones ultrafinas. La inclusión de las muestras se realizó en una resina acrílica (Unicryl). La polimerización de esta resina se realiza a bajas temperaturas lo que permite preservar la inmunogenicidad de las distintas moléculas (ej. proteínas).

<u>Reactivos</u>

- Resina Unicryl
- Etanol absoluto

<u>Procedimiento</u>

- 1. Colocar las muestras en cambios sucesivos de:
 - a. Etanol absoluto:Unicryl (1:1) durante 2 días a –20°C.
 - b. Repetir el paso a.
 - c. Unicryl durante 1 semana a –20°C.
 - d. Unicryl durante 1 día a –20°C.
- 2. Colocar las muestras en cápsulas de gelatina y rellenar con la resina Unicryl.
- 3. Polimerizar la resina Unicryl a –20°C durante 3 días bajo una lámpara de luz UV.

3.2.3.4. Microtomía

Para la obtención de secciones, con la ayuda de una cuchilla se talla una pirámide trapezoidal en el extremo de la cápsula donde se encuentra la muestra. Las secciones se realizaron mediante el uso de cuchillas de vidrio o diamante en un ultramicrotomo Ultracut E (Reichert-Jung, Alemania). Inicialmente, se obtienen cortes semifinos de una micra de grosor que se depositan en una gota de agua sobre un portaobjetos y se tiñen con azul de metileno/azul de toluidina para determinar la morfología y el estado de la muestra. Para obtener los cortes ultrafinos (70-90 μ m), es necesario tallar una nueva pirámide de menor tamaño en la zona del tejido que se desea estudiar. Los cortes se depositan sobre rejillas de níquel de 200 agujeros recubiertas con una fina película de Formvar 15/95E (Sigma) para facilitar la adhesión de los mismos.

3.2.4. Citoquímica para microscopía óptica (MO)

3.2.4.1. Tinción con azul de metileno/azul de toluidina

<u>Principio</u>

Esta tinción se utiliza para el estudio de la morfología general de un tejido o muestra. El azul de metileno es un colorante básico y electropositivo que se une a compuestos cargados negativamente. El azul de toluidina es un colorante metacromático derivado del tolueno que se une a estructuras con enlaces de aminas. El color final de la tinción es azulado.



<u>Reactivos</u>

Solución de tinción: azul de toluidina al 0,5% (p/v), azul de metileno al 0,5% (p/v) y borax al 1% (p/v)

<u>Procedimiento</u>

- 1. Colocar una gota de la solución de tinción sobre la/s sección/es en un portaobjetos e incubar durante 3 minutos.
- 2. Lavar abundantemente con H₂O ultrapura hasta eliminar exceso de colorante.
- 3. Secar las muestras en una placa calefactora.
- 4. Poner un cubreobjetos y montar en un medio adhesivo (Merkoglass, Merck).

3.2.4.2. Tinción de polisacáridos mediante PAS

<u>Principio</u>

La técnica del PAS tiñe específicamente los polisacáridos presentes en un tejido o muestra. Se basa en la oxidación de los glicoles presentes en los azúcares por la acción del ácido periódico. Los aldehídos resultantes de dicha oxidación reaccionan con el reactivo de Schiff (una mezcla de pararosanilina y metabisulfito sódico) y se tiñen de color rojo o rojo púrpura.

<u>Reactivos</u>

- Sistema de tinción ácido periódico/reactivo de Schiff (PAS) (Sigma-Aldrich)
- Solución de hematoxilina Gill (Sigma-Aldrich)

<u>Procedimiento</u>

- 1. Sumergir los portaobjetos con los cortes en la solución de ácido periódico durante 5 minutos.
- 2. Lavar los portaobjetos varias veces con agua con objeto de eliminar los restos de la solución.
- 3. Sumergir los portaobjetos en el reactivo Schiff durante 15 minutos.
- 4. Lavar los portaobjetos durante 5 minutos con agua.
- 5. Teñir los cortes con una solución de hematoxilina Gill durante 3 minutos.
- 6. Lavar los portaobjetos con agua.
- 7. Dejar secar los portaobjetos en la placa calefactora.
- 8. Poner un cubreobjetos y montar en un medio adhesivo (Merkoglass, Merck).



Para llevar a cabo la cuantificación del contenido de almidón en las distintas estructuras de pistilo se utilizaron secciones longitudinales teñidas mediante PAS, correspondientes a las distintas fases del desarrollo. Se tomaron 30 fotografías de un área de ~1 mm² de cada una de las zonas diferenciadas del pistilo [el estigma (tejido papilar y subpapilar), el estilo (parénquima y tejido transmisor) y el ovario (parénquima y óvulo)] en cada una de estas fases. A partir de dichas fotografías, se midió la densidad óptica de los gránulos de almidón presentes mediante el programa Image Tool v.3.0 (Wilcox *et al.* 2002), y se calculó la media y la desviación estándar. Los gráficos correspondientes se realizaron con el programa Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corp.).

3.2.4.4. Tinción de calosa

La tinción de calosa se llevó a cabo con azul de anilina y su fluorocromo, el sirofluor.

<u>Principio</u>

El azul de anilina es un colorante con pequeñas impurezas cuyo compuesto mayoritario es triarilmetano, que tiene la propiedad de formar complejos con la calosa (Eschrich y Currier 1964). El sirofluor es el fluorocromo purificado a partir de dicho colorante y también se une específicamente a la calosa (β -1,3-glucano).

<u>Reactivos</u>

- Solución de fijación: mezcla de etanol y ácido acético (3:1)
- Solución de NaOH 8 N
- Solución de permeabilización: acetona a –20°C
- Tampón Tris-HCl 50 mM, pH 6,8
- Solución de azul de anilina al 0,05% (p/v) en 0,1 M K₃PO₄, pH ~12,4 (Martin 1959)
- Solución de sirofluor (Biosupplies, Australia) a una concentración final de 0,025 mg/ml en agua destilada
- Solución de Citifluor (Ted Pella Inc., USA)

Procedimiento para los pistilos

- 1. Diseccionar el pistilo de la flor mediante unas pinzas y un escalpelo.
- 2. Poner el pistilo en un tubo de 1,5 ml, añadir 0,2 ml de solución de fijación e incubar durante 6 h a 4°C.
- Pasar el pistilo a un tubo de 1,5 ml limpio, añadir 0,2 ml de solución de NaOH 8 N e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.



- 5. Hacer un aplastado del pistilo sobre la superficie de un portaobjetos.
- 6. Añadir una gota de Citifluor sobre el aplastado y cubrir la muestra con un cubreobjetos.
- 7. Observar la muestra en un microscopio de fluorescencia equipado con un juego de filtros de excitación LP450/490.

<u>Procedimiento para el polen</u>

- 1. Poner 0,5 ml de la muestra de polen germinado en un tubo de 1,5 ml, añadir 0,5 ml de solución de fijación e incubar durante 6 h a 4°C.
- 2. Pasar el polen fijado a un tubo de 1,5 ml limpio, añadir 0,5 ml de solución de permeabilización e incubar durante 5 minutos a –20°C.
- 3. Lavar el polen con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 6,8) durante 5 minutos.
- 4. Quitar el tampón de lavado, añadir una gota de la solución de sirofluor e incubar durante 15 minutos en oscuridad.
- 5. Poner una gota de la muestra en un portaobjetos.
- 6. Añadir una gota de Citifluor sobre la muestra, mezclar y cubrir con un cubreobjetos.
- 7. Observar la muestra en un microscopio de fluorescencia equipado con un juego de filtros de excitación LP450/490.

3.2.4.5. Tinción de lípidos mediante Sudan Black B

<u>Principio</u>

La técnica del Sudan Black B tiñe específicamente los lípidos de un tejido o muestra. El Sudan Black B es un lisocromo que se disuelve fácilmente en lípidos hidrofóbicos (apolares). Además, posee dos átomos de nitrógeno que se pueden ionizar. Por tanto, es también un colorante catiónico que se une a lípidos hidrofílicos (polares) como los fosfolípidos (FLs). La coloración resultante es azul-negruzca.

<u>Reactivos</u>

• Solución de Sudan Black B: Sudan Black B en etanol 70% (p/v) a saturación. El colorante se disuelve en agitación toda la noche a 60°C y la solución resultante se filtra antes de ser utilizada

<u>Procedimiento</u>

- 1. Sumergir los portaobjetos con los cortes en la solución de Sudan Black B e incubar a 40°C durante 15 minutos.
- 2. Lavar los portaobjetos varias veces con agua.
- 3. Dejar secar los portaobjetos en la placa calefactora.
- 4. Montar con glicerina gelificada.

3.2.5. Contrastado de cortes ultrafinos para microscopía electrónica de transmisión (MET)

Los cortes ultrafinos se pueden observar directamente bajo el haz de electrones del microscopio electrónico de transmisión. No obstante, para incrementar el contraste se utiliza una doble tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo, según se describe a continuación.

<u>Reactivos</u>

- Solución de acetato de uranilo al 5% (p/v). La solución se filtra y se almacena en oscuridad a 4°C
- Solución de citrato de plomo. Para preparar dicha solución, mezclar 10 ml de Pb(NO₃)₂ 80 mM y 10 ml de C₆H₅Na₃O₇ 113 mM, y dejar reposar durante 30 minutos. Añadir 4 ml de NaOH 1 M y completar con H₂O ultrapura hasta 25 ml. A partir de esta solución se realizan alícuotas de citrato de plomo e hidróxido sódico 0,01 M (v/v, 1/8)

<u>Procedimiento</u>

- 1. Colocar un trozo de parafilm en una caja 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 minutos y en oscuridad ¹.
- 3. Lavar cada rejilla con H₂O ultrapura durante 10 segundos.
- 4. 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 ².
- 5. Colocar cada rejilla en la gota de modo que los cortes estén en contacto con la solución e incubar durante 5 minutos y en oscuridad.
- 6. Lavar las rejillas con H₂O ultrapura durante 10 segundos.
- 7. Dejar secar las rejillas sobre papel secante en una caja Petri.

<u>Notas</u>:

¹ La luz provoca la formación de cristales de acetato de uranilo que precipitan sobre los cortes. Para evitarlo, es conveniente centrifugar la solución a 12.000g durante 2 minutos antes de su uso, y cubrir la placa de Petri con papel de aluminio para evitar la exposición a la luz.



3.2.6. Inmunocitoquímica

3.2.6.1. Inmunolocalización de AGPs y pectinas en el pistilo mediante microscopía de fluorescencia (MF)

La localización de pectinas y AGPs en los tejidos del pistilo durante su desarrollo se realizó a partir de secciones semifinas en un microscopio de fluorescencia (MF), tal y como se describe a continuación.

<u>Reactivos</u>

- Solución de PBS 10x: Na2HPO4 80 mM, KH2PO4 15 mM, NaCl 1,3 mM y KCl 30 mM, pH 7,4
- Solución de bloqueo: BSA al 5% (p/v) en PBS 1x
- Solución de Citifluor (Ted Pella Inc)

<u>Procedimiento</u>

- 1. Incubar los portaobjetos con las secciones de las muestras en la solución de bloqueo durante 24 h a temperatura ambiente y en agitación.
- 2. Lavar los portaobjetos con PBS 1x durante 15 minutos.
- Incubar con el anticuerpo primario en solución de bloqueo durante 7 h a 4°C (ver tabla 3.3).

Anticuerpo	Dilución	Epítopo que reconoce el anticuerpo
LM5	1/5	[(1→4)-β-D-galactosa]₄
LM6	1/5	[(1→5)-α-L-arabinosa]₅
JIM7	1/25	Pectinas con 15-80% de esterificación y epítopos compuestos por residuos esterificados con grupos metilo flanqueados por residuos no esterificados
JIM5	1/5	Pectinas con 31-40% de esterificación y epítopos compuestos por 4 o más residuos no esterificados flanqueados por residuos esterificados con grupos metilo
JIM13	1/5	β -D-Glc p A(1 \rightarrow 3)- α -D-Gal p A (1 \rightarrow 2)-L-Rha

Tabla 3.3

- 4. Lavar con PBS 1x durante 15 minutos.
- 5. Repetir el paso 4 dos veces más.
- 6. Lavar con PBS 1x durante 12 h a 4°C.
- Incubar con un anticuerpo secundario anti-IgG de rata conjugado con FITC (dilución 1/50) en PBS 1x con BSA al 2,5% (p/v) durante 7 h y en oscuridad.
- 8. Lavar con PBS 1x durante 15 minutos y en oscuridad.
- 9. Repetir el paso 8 cuatro veces más.
- 10. Lavar con PBS 1x durante 12 h a 4°C y en oscuridad.
- 11. Lavar con H₂O ultrapura durante 15 minutos y en oscuridad.
- 12. Repetir el paso 11 dos veces más
- 13. Dejar secar los portaobjetos durante 1 h y en oscuridad.
- 14. Añadir una gota de la solución de Citifluor en cada muestra y cubrir con un cubreobjetos. Al finalizar este paso, las muestras están listas para ser observadas en el microscopio.

3.2.6.2. Inmunolocalización de AGPs, pectinas y Ole e 10 en el polen mediante microscopía láser confocal (MLC)

En el caso de las muestras de polen (maduro, hidratado y germinado), la inmunolocalización de AGPs, pectinas y Ole e 10 se llevó a cabo a partir de muestras completas y fijadas en un microscopio láser confocal.

<u>Reactivos</u>

- Solución de fijación: paralformadehído al 4% (v/v) en tampón Tris 50 mM, pH 7,2
- Solución de PBS 10x: Na2HPO4 80 mM, KH2PO4 15 mM, NaCl 1,3 mM y KCl 30 mM, pH 7,4
- Solución de bloqueo: BSA al 5% (p/v) en PBS 1x
- Solución de Citifluor (Ted Pella Inc.)

<u>Procedimiento</u>

- 1. Fijar la muestra (polen) en solución de fijación durante 2 h.
- 2. Lavar la muestra en un tubo de 1,5 ml con PBS 1x durante 15 minutos.
- 3. Repetir el paso 2 dos veces más.
- 4. Incubar la muestra con la solución de bloqueo durante 36 h.
- 5. Lavar con PBS 1x durante 15 minutos.
- 6. Repetir el paso 5 dos veces más.
- 7. Incubar la muestra con el anticuerpo primario (ver tabla 3.4) diluido en solución de bloqueo durante 4 h a 4°C.

Tabla 3.4

Anticuerpo	Dilución	Ερίτορο
LM5	1/20	$[(1\rightarrow 4)-\beta$ -D-galactosa] ₄
LM6	1/20	[(1→5)-α-L-arabinosa]₅
JIM7	1/20	Pectinas con 15-80% de esterificación y epítopos compuestos por residuos esterificados con grupos metilo flanqueados por residuos no esterificados
JIM5	1/20	Pectinas con 31-40% de esterificación y epítopos compuestos por 4 o más residuos no esterificados flanqueados por residuos esterificados con grupos metilo
JIM13	1/20	β -D-Glc <i>p</i> A(1→3)-α-D-Gal <i>p</i> A (1→2)-L-Rha
JIM 14	1/20	Residuos L-Ara
Anti-Ole e 10	1/1000	-

- 8. Lavar con PBS 1x durante 15 minutos a 4°C.
- 9. Repetir el paso 8 dos veces más.
- 10. Incubar con un anticuerpo secundario anti-IgG de rata conjugado con Alexa 488 (dilución 1/100) en PBS 1x con BSA al 2,5%, durante 1 h y 30 minutos a 4°C, y en oscuridad.
- 11. Lavar con PBS 1x durante 15 minutos a 4°C.
- 12. Repetir el paso 11 dos veces más.
- 13. Añadir una gota de solución de Citifluor en cada muestra. Poner una gota de la muestra entre dos cubreobjetos y sellar los lados con cinta adhesiva creando una cámara estanca (Fig. 3.1). Al finalizar este paso, las muestras están listas para ser observadas en el microscopio.



Figura 3.1

3.2.6.3. Inmunolocalización de AGPs y pectinas en el pistilo y el polen mediante microscopía electrónica de transmisión (MET)

La localización a nivel ultraestructural de pectinas y AGPs en los tejidos del pistilo y en el polen (maduro, hidratado y germinado) se realizó a partir de secciones ultrafinas sobre rejillas de níquel de 200 agujeros.

<u>Reactivos</u>

- Solución de bloqueo: BSA al 5% (p/v) en PBS 1x
- Solución de PBS 10x: Na2HPO4 80 mM, KH2PO4 15 mM, NaCl 1,3 mM y KCl 30 mM, pH 7,4
- Solución de acetato de uranilo al 5% (p/v). La solución se filtra y se almacena en oscuridad a 4°C
- Solución de citrato de plomo. Para preparar dicha solución, mezclar 10 ml de Pb(NO₃)₂ 80 mM y 10 ml de C₆H₅Na₃O₇ 113 mM, y dejar reposar durante 30 minutos. Añadir 4 ml de NaOH 1 M y completar con H₂O ultrapura hasta 25 ml. A partir de esta solución se realizan alícuotas de citrato de plomo e hidróxido sódico 0,01 M (v/v, 1:8)

<u>Procedimiento</u>

- 1. Colocar la rejilla sobre una gota de H₂O ultrapura durante 1 minuto.
- 2. Incubar la rejilla en la solución de bloqueo durante 4 h.
- 3. Incubar con el anticuerpo primario (dilución 1/5) en solución de bloqueo durante 3 h (ver tabla 3.5).

Material	Anticuerpo	Dilución	Ερίτορο
Pistilo/Polen	LM5	1/5	$[(1\rightarrow 4)-\beta$ -D-galactosa] ₄
Pistilo/Polen	LM6	1/5	$[(1\rightarrow 5)-\alpha-L-arabinosa]_5$
Pistilo/Polen	JIM7	1/5	Pectinas con 15-80% de esterificación y epítopos compuestos por residuos esterificados con grupos metilo flanqueados por residuos no esterificados
Polen	JIM5	1/5	Pectinas con 31-40% de esterificación y epítopos compuestos por 4 o más residuos no esterificados flanqueados por residuos esterificados con grupos metilo
Pistilo/Polen	JIM13	1/5	β -D-Glc <i>p</i> A(1 \rightarrow 3)- α -D-Gal <i>p</i> A (1 \rightarrow 2)-L-Rha
Polen	JIM 14	1/5	Residuos L-Ara libres

Tabla 3.5

- 4. Lavar la rejilla con PBS 1x durante 5 minutos.
- 5. Repetir el paso 4 tres veces más.
- 6. Incubar con un anticuerpo secundario anti-IgG de rata conjugado con oro de 15 nm (dilución 1/50) en BSA 2,5% (p/v) en PBS 1x, durante 1 h y 30 minutos.
- 7. Lavar la rejilla con PBS 1x durante 5 minutos.
- 8. Repetir el paso 7 tres veces más.
- 9. Lavar la rejilla con H₂O mili-Q durante unos segundos.
- 10. Dejar secar las rejillas sobre un papel secante en el interior de una caja Petri.
- 11. Contrastar las rejillas con acetato de uranilo y nitrato de plomo.

3.2.6.4. Observación y captura de imágenes

Las secciones semifinas de pistilos teñidas con azul de metileno/azul de toluidina y tratadas para inmunocitoquímica se observaron en ambos casos en un microscopio de epiflorescencia Axioplan (Carl Zeiss Inc., USA) y las imágenes se tomaron con una cámara ProgRes C3 y el programa ProgRes CapturePro (Jenoptik Laser, Optik, Systeme GmbH, Jena, Alemania). Las muestras de polen se observaron en un microscopio láser confocal C1 (Nikon Corp., Japón). Las imágenes de campo claro se realizaron mediante la opción de luz transmitida. Las imágenes fueron capturadas con el programa EZ-C1. Las rejillas con las secciones ultrafinas fueron observadas en un microscopio electrónico de transmisión JEM-1011 (Jeol Ltd., Tokio, Japón). Las imágenes fueron capturadas con una cámara MegaView III y el programa iTEM (Olympus Soft Image Solutions GmbH, Múnich, Alemania).

3.2.7. Extracción de pectinas y AGPs

3.2.7.1. Polen

Se extrajeron pectinas y AGPs a partir de polen maduro, polen hidratado y polen germinado a distintos tiempos de acuerdo al siguiente protocolo:

<u>Reactivos</u>

- Tampón de extracción: Tris-HCl 40 mM, urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS al 4% (p/v), SDS al 3% (p/v), DTT 60 mM, anfolitos 3-10 al 0,2% (v/v) y azul de bromofenol, pH 8,8. Guardar a 4°C
- Fluoruro de fenilo metanosulfonilo (PMSF) 100 mM en isopropanol. Guardar a –20°C

<u>Procedimiento</u>

- Poner en un vial de cristal 0,1 gr de polen y añadir 1,5 ml de tampón de extracción y 200 μl de PMSF¹ 100 mM. Dejar en agitación a 4°C durante 3 h.
- 2. Clarificar el sobrenadante mediante centrifugación a 12.000g durante 30 minutos. Almacenar en alícuotas a -20° C hasta su posterior uso.

<u>Notas:</u>

¹ El PMSF es un agente inhibidor de proteasas. Antes de usar, calentar con el fin de disolver los cristales que se forman durante su almacenamiento prolongado a bajas temperaturas.

3.2.7.2. Pistilos

Se extrajeron pectinas y AGPs de pistilos en distintos estadios de desarrollo a partir de un único método pero utilizando distintas soluciones de extracción.

<u>Reactivos</u>

- Solución de extracción 1: ácido cítrico (C₆H₈O₇) 84 mM, hidrosulfito de sodio (Na₂S₂O₄) 2 mM y DTT 100 mM, pH 3,0
- Solución de extracción 2: SDS al 10% (p/v) en la solución de ácido cítrico
- Solución de extracción 3: Tris-HCl 40 mM, urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS al 4% (p/v), SDS al 3% (p/v), DTT 60 mM, anfolitos 3-10 al 0,2% (v/v) y azul de bromofenol, pH 8.8
- Solución de extracción 4: TCA al 20% (p/v) y DTT 100 mM en acetona

Procedimiento

- 1. Pesar 0,1 g de material (pistilos).
- 2. Poner dicho material en un mortero, enfriado previamente con N_2 líquido. A continuación, moler hasta conseguir que el material se transforme en un polvillo fino.
- 3. Añadir el polvillo a un tubo estéril de 1,5 ml y resuspender en 1 ml de solución de extracción. Añadir 100 μ l de PMSF 100 mM.
- 4. Centrifugar a 12.000*g* durante 30 minutos a 4°C.
- 5. Hacer alícuotas de 100 μl del sobrenadante y guardar a $-20^\circ C$ hasta su posterior uso.

3.2.8. Cuantificación de los extractos proteicos

La concentración de proteínas extraídas se cuantificó con el método colorimétrico de Bradford (1976).

<u>Principio</u>

Se basa en la unión de un colorante, el azul de Comassie G-250 a las proteínas. En solución ácida, el colorante existe en dos formas, una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteínacolorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre, que presenta un máximo de absorción a 595 nm.

<u>Reactivos</u>

- Reactivo de Bradford (Bio-Rad, USA): solución de azul de Coomassie G250 en ácido fosfórico (H₃PO₄) y metanol. Guardar a 4°C
- Solución de BSA 1 µg/µl. Guardar a –20°C

<u>Procedimiento</u>

- 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 H₂O destilada.
- 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 H₂O destilada hasta un volumen de 800 μl.
- 3. Añadir 200 µl del colorante Bradford y mezclar invirtiendo los tubos.
- 4. Transcurridos un mínimo de 5 minutos, medir la DO⁵⁹⁵ 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.

3.2.9. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para la separación de proteínas se utilizó un sistema de electroforesis vertical "Mini Protean 3" (Bio-Rad, USA), según el método de Laemli (1970) con algunas modificaciones.

<u>Reactivos</u>

- 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)
- SDS al 10% (p/v)
- Tampón de electroforesis 10x: Tris-ClH 100 mM (pH 8,3), glicina 100 mM y SDS al 0.1 % (p/v)

- Tampón de muestras 2x: Tris-ClH (pH 6,8) 50 mM, SDS al 4% (p/v), glicerol al 12% (v/v), mercaptoetanol al 2% (v/v) y azul de bromofenol al 0,01% (p/v)
- Persulfato amónico al 10 % (p/v)
- TEMED

<u>Procedimiento</u>

- 1. Montar los moldes (a modo de sándwich).
- Preparar los geles concentrador (4%) y separador (10 ó 12%) según se especifica en la tabla 3.6. Aplicar vacío a ambas soluciones¹.

Componentes	4%	10%	12%
Acrilamida/bis-acrilamida	1,3 ml	3,3 ml	4,0 ml
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	-	2,5 ml	2,5 ml
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	2,5 ml	-	-
SDS al 10 % (p/v)	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
H ₂ O mili-Q	6,1 ml	4,1 ml	3,4 ml
APS al 10% (p/v)	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5µl	5µl

Tabla 3	3.6
---------	-----

- Llenar los moldes con la solución correspondiente al gel separador². Añadir 50 μl de N-butanol saturado en H₂O y dejar polimerizar³.
- Una vez polimerizado el gel, eliminar el N-butanol con H2O 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.
- Hervir las muestras (30 μg de proteínas totales en tampón de muestras 1x) a 95°C durante 3 minutos y enfriar en hielo durante 10 minutos.
- 6. Cargar las muestras en los pocillos sin llegar a rebasar la altura de éstos. Llenar el tanque con tampón de electroforesis.
- 7. Conectar a voltaje constante (200 V) durante 45 minutos.

<u>Notas</u>:

¹ El O₂ inhibe la polimerización de la acrilamida.

² Dejar aproximadamente 1.5 cm para añadir el gel concentrador.

³ 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.



3.2.10. Tinción de proteínas totales

3.2.10.1. Tinción con azul de Coomassie

<u>Reactivos</u>

- Solución de tinción: ácido acético al 10 % (v/v), metanol al 45 % (v/v) y azul de Coomassie R250 al 0,25% (p/v)
- Solución para desteñir: metanol al 45 % (v/v) y ácido acético al 15 % (v/v)

<u>Procedimiento</u>

- 1. Una vez separadas las proteínas mediante electroforesis, teñir el gel en la solución de tinción durante 1 h y en agitación.
- 2. Lavar con H₂O destilada.
- 3. Desteñir el gel para eliminar el exceso de colorante.

3.2.10.2. Tinción con nitrato de plata

<u>Reactivos</u>

- Solución de fijación: etanol al 30% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v)
- Solución de sensibilización: etanol al 20% (v/v), acetato potásico 0,5 M, 3 g/l de tetrationato potásico y 0,5% (v/v) de glutaraldehído al 50%. Almacenar a 4°C
- Solución de tinción: nitrato de plata 0,2% (p/v) y 0,7 ml/l de formaldehído al 37%
- Solución de revelado: 30 g/l de carbonato potásico, 500 μ l/l de fomaldehído al 37% y 0,0124 g/l de tiosulfato sódico 16 μM
- Solución de parada: 30 g/l de Tris-HCl y 25 ml/l de ácido acético

<u>Procedimiento</u>

- 1. Sumergir el gel en solución de fijación e incubar en agitación durante 1 h a temperatura ambiente.
- Colocar el gel en la solución de sensibilización e incubar en agitación durante 6 h a temperatura ambiente¹.
- 3. Lavar el gel en agua miliQ 6x 20 min
- 4. Teñir el gel en la solución con nitrato de plata en agitación durante 1 h a temperatura ambiente.
- 5. Lavar el gel en agua mili-Q durante unos segundos.
- 6. Incubar el gel en agitación en la solución de revelado durante 5-10 minutos.
- 7. Parar el revelado.

<u>Notas</u>:

¹ Cubrir el gel con papel de aluminio para evitar la luz.

3.2.11. Secado y documentación de los geles

<u>Procedimiento</u>

- 1. Tras teñir el gel con azul de Coomassie, dejar el gel durante una noche en una solución de glicerol al 3% (v/v).
- 2. Colocar un trozo de papel de celofán humedecido con H₂O sobre una placa de metacrilato, poner el gel y, sobre éste, otro pedazo de celofán humedecido, cuidando que no queden burbujas entre ambos.
- 3. Poner el molde de la segunda placa de metacrilato, que encaja con la primera, y sujetar el celofán con unas pinzas tal y como se muestra en la figura 3.2, cuidando de no tensarlo excesivamente.
- 4. Dejar secar sobre una superficie plana durante 24 h. Una vez seco, es posible obtener una imagen digitalizada del gel mediante un escáner.



3.2.12. Análisis de expresión de AGPs y pectinas

Para llevar a cabo los análisis de expresión de las distintas AGPs y pectinas en el pistilo y el polen se realizaron experimentos de Western blot según se describe a continuación.



<u>Reactivos</u>

- Tampón de transferencia: Tris-ClH 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20 % (v/v)
- Solución de bloqueo: leche en polvo al 3 % (p/v) en tampón TBST
- Tampón TBST: Tris-ClH 10 mM, pH 7,4, cloruro sódico 150 mM y Tween 20 al 0,3 % (v/v)
- Metanol

<u>Procedimiento</u>

ETAPA 1: TRANSFERENCIA

- 1. Después de la electroforesis (SDS-PAGE), incubar el gel en tampón de transferencia durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 2. Pre-tratamiento de la membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF)¹:
 - Mojar la membrana en metanol.
 - Eliminar el metanol y añadir H₂O destilada. Lavar en agitación durante 3-5 minutos.
 - Equilibrar la membrana en tampón de transferencia durante 10 minutos.
- 3. Montar los casetes de transferencia².
- 4. Transferir³ a 100 V durante 1,5 h. Una vez finalizada la transferencia, continuar con la inmunodetección.

ETAPA 2: INMUNODETECCIÓN

- 5. Bloquear la membrana en solución de bloqueo durante 12 h, a 4°C.
- 6. Incubar con el anticuerpo primario específico (Tabla 3.7) a temperatura ambiente:

Anticuerpo	Dilución	Tiempo	Material
LM5	1/20	12 h	Pistilo/Polen
LM6	1/20	12 h	Pistilo/Polen
JIM7	1/20	12 h	Pistilo/Polen
JIM5	1/20	12 h	Polen
JIM13	1/20	12 h	Pistilo/Polen
JIM 14	1/20	12 h	Polen

Tabla 3.7

- 7. Lavar la membrana con TBST durante 15 minutos.
- 8. Repetir el paso 7 tres veces.
- Incubar con un anticuerpo secundario anti-IgG de rata conjugado con Alexa 488 (dilución 1/100) en TBS 1x durante 12 h a 4°C, y en oscuridad.
- 10. Lavar la membrana con TBST durante 15 minutos.
- 11. Repetir el paso 10 tres veces.
- 12. Lavar la membrana con agua miliQ durante 10 minutos.
- 13. Repetir el paso 12
- 14. Escanear la membrana en un escáner Pharos (Bio-Rad) equipado con un sistema de láseres capaces de excitar el fluorocromo Alexa 488.

<u>Notas</u>:

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

² La transferencia de proteínas se llevó a cabo en un sistema "Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell" (Bio-Rad, USA), siguiendo las indicaciones del manual que acompaña a dicho equipo.

³ Alternativamente, podemos transferir toda la noche a bajo voltaje (ej. 15 V), a 4°C.

3.2.13. Análisis de densitometría

Se llevaron a cabo análisis densitométricos de las bandas resultantes de los experimentos de inmunodetección con los distintos anticuerpos tanto en el polen como en el pistilo. Para ello, se utilizó la herramienta "Volume Analysis Report" del programa Quantity One (Bio-Rad). Los datos obtenidos, expresados inicialmente en valores de densidad (intensidad/mm²), se representaron gráficamente mediante el programa Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corp.) en forma de porcentajes relativos referidos al mayor valor de la serie.

3.2.14. Análisis estadísticos

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en el presente trabajo se llevó a cabo mediante el programa SPSS Statistics v17.0 para Windows (SPSS Inc., USA). Los gráficos que se presentan en el apartado de resultados fueron generados en Microsoft Office Excel 2007 para Windows.

Además de la estadística descriptiva [número de observaciones (N), media y desviación estándar (SD)], se utilizaron los test estadísticos siguientes:

test de normalidad de Shapiro-Wilks, análisis de la varianza (ANOVA) de Friedman y análisis post hoc de Bonferroni.




4.1. La floración del olivo

El olivo florece una vez al año entre los meses de abril y junio. La floración puede ser más o menos temprana y su duración variable (entre 10 y 15 días aproximadamente), dependiendo de la variedad y de las condiciones climáticas y las características de la zona de cultivo (temperatura, lluvia y altitud). En la provincia de Granada, la variedad Picual, que es la más extendida, suele florecer durante la segunda mitad de mayo. De las otras tres variedades elegidas para este estudio, Arbequina es la más temprana ya que florece a primeros de mayo, mientras que Loaime y Lucio lo hacen en el mes de junio. La antesis de la flor en las variedades de este estudio dura de 3 a 5 días.

4.1.1. Las inflorescencias

En las cuatro variedades de olivo estudiadas, se ha observado que las flores se agrupan en inflorescencias paniculadas; es decir, presentan un eje central con ramificaciones que pueden a su vez estar o no ramificadas, dependiendo de la variedad. Las inflorescencias presentan asincronía en el desarrollo de las flores, que se abren de forma escalonada, siendo las del ápice de la inflorescencia las últimas en abrir (Fig. 4.1A). Las inflorescencias pueden tener entre 10 y 24 flores, dependiendo del tamaño de la inflorescencia y la variedad (Fig. 4.1A, B).



Figura 4.1. Inflorescencias de olivo en plena floración. A, flores asincrónicas con botones blancos y flores abiertas; B, flores abiertas con anteras dehiscentes. Barra= 1 mm.

Las flores están unidas a la inflorescencia por un pedicelo que puede ser corto, 1,5 mm o nulo. En las ramificaciones de las inflorescencias, las flores pueden estar aisladas o formar grupos de tres en las variedades Picual, Arbequina y Lucio, ó de 5 flores en la variedad Loaime (Fig. 4.2)



Figura 4.2. Esquema de inflorescencias en las variedades estudiadas.

4.1.2. La flor

La flor del olivo es pequeña, actinomorfa y con simetría regular, de prefloración valvar y sin olor. El olivo es una especie andromonoica, con flores hermafroditas o perfectas (con ovario y anteras), y estaminíferas o imperfectas (sólo con anteras en el mismo pie de planta), aunque se ha observado una mayor frecuencia de flores perfectas. Las flores perfectas de la variedad Picual miden aproximadamente 4-5 mm en la época de antesis. Generalmente, las flores presentan 4 sépalos fusionados formando un cáliz campanulado, persistente y de color verde-blanquecino, 4 pétalos blancos soldados en la base, y dos estambres grandes de igual tamaño, constituidos por el filamento, unido por la base a los pétalos, y la antera, de color amarillo intenso, que se observa intercalada entre dos pétalos, permitiendo una mayor exposición del polen al viento (Fig. 4.3A). Las anteras amarillas son libres, con dos tecas biloculares. El filamento se adhiere por el punto medio de la zona dorsal (anteras dorsifijas), y la dehiscencia es longitudinal por una hendidura central entre las tecas, conocida como estromio (Fig. 4.3B, C). El pistilo, órgano femenino también conocido como gineceo, ocupa la posición central en la flor. Esta formado por un ovario súpero, compuesto de dos carpelos fusionados que dan lugar a un ovario bilocular con 2 óvulos por lóculo, un estilo corto y un estigma grande bilobulado y con papilas (Fig. 4.3D). En resumen, la flor perfecta del olivo se puede definir con la siguiente fórmula floral: K (4) [C (4) A2] G (2).



Figura 4.3. Flores de olivo de la variedad Picual. **A**, grupo de flores asincrónicas con distinto grado de apertura de la flor; **B**, antera turgente, unida por el filamento al sépalo; **C**, anteras en plena dehiscencia, abriéndose por el estromio (flechas) o hendidura central entre las tecas; **D**, flor después de la dehiscencia de las anteras y el estigma con polen en su superficie (flechas). Barra= 1 mm.

4.1.3. Etapas del desarrollo de la flor

Con el objeto de poder estudiar el desarrollo del pistilo y establecer una relación entre los cambios que éste sufre y los que ocurren en la flor, se han definido diferentes fases. Debido a que la floración es un proceso continuo, se han determinado marcadores morfológicos fáciles de visualizar para poder distinguir las diferentes etapas entre sí a lo largo de la floración. Los parámetros morfológicos considerados fueron: la posición y el color de los sépalos, pétalos, pistilo y anteras, así como la turgencia/dehiscencia de las anteras y la presencia de polen en el estigma. En base a estos criterios se han distinguido 8 fases (Fig. 4.4), que se describen a continuación:

- 1. <u>Botón verde</u>: pétalos cerrados verdes; el cáliz verde ocupa la mitad inferior del botón floral.
- <u>Botón blanco</u>: ligeramente mayor que en la etapa anterior y, como consecuencia, el cáliz sólo cubre el tercio inferior del botón floral; tanto los pétalos como los sépalos han adquirido un color blanquecino.
- 3. <u>Flor parcialmente abierta</u>: comienzan a abrirse los pétalos dejando visible las anteras amarillas.
- 4. <u>Flor abierta con anteras turgentes</u>: pétalos blancos completamente separados, con anteras turgentes de color amarillo intenso; se puede ver el estigma de color verde y el estilo de color blanquecino.
- 5. <u>Flor con anteras dehiscentes</u>: los pétalos se abren llegando a estar perpendiculares con respecto al pistilo; anteras dehiscentes abiertas que dejan en su superficie los granos de polen amarillos; el pistilo permanece con el mismo color verde y en el estigma se aprecian algunos puntos amarillos debido al polen depositado en su superficie.

- 6. <u>Flores con anteras marrones</u>: pétalos hacia abajo, más cercanos al cáliz; las anteras marrones y en proceso de senescencia; el estigma parece más amarillo debido a la mayor cantidad de polen depositado en la superficie; el ovario se hace visible debido a un aumento de tamaño.
- <u>Flores sin pétalos ni anteras</u>: los pétalos se secan y caen al igual que los estambres; el estigma permanece amarillo pero comienza a oscurecerse en el ápice.
- 8. <u>Flores con estigma y estilo marrón</u>: el estigma y el estilo adquieren un color marrón y comienzan a secarse; el ovario puede crecer notablemente, aumentando de tamaño y sobrepasando el cáliz debido a la fecundación y cuajado del fruto. Otra posibilidad es que el ovario permanezca del mismo tamaño, indicando que la fecundación no fue posible.

En los estudios citoquímicos y bioquímicos realizados se han considerado los estadios de botones florales (1 y 2) como etapas <u>antes de la polinización</u>. Los estadios en que la flor está abierta (3, 4 y 5) se corresponderían con la <u>polinización</u>. Finalmente, a partir de la caída de los pétalos y anteras (6, 7 y 8) se consideran como estadios <u>después de la polinización</u> (Fig. 4.4).



Figura 4.4. Etapas del desarrollo de la flor en el olivo (var. Picual). **1**, botón verde; **2**, botón blanco; **3**, flor parcialmente abierta; **4**, flor abierta con anteras turgentes; **5**, flor abierta con anteras dehiscentes; **6**, flor con antera marrones; **7**, flor sin pétalos; **8**, flor sin pétalos y estigma marrón con ovario fecundado (A) o sin fecundar (B). Barra= **1** mm.

Antes de la polinización; durante la polinización; de la polinización.

4.1.4. Morfología del pistilo

El pistilo está formado por un ovario súpero que se continúa en un estilo simple y corto y en el extremo se encuentra el estigma papiloso con dos lóbulos de color verde. A lo largo de la floración, el pistilo aumenta de tamaño como consecuencia del desarrollo progresivo de las distintas partes, tal como se observa en la figura 4.5.

Al comienzo de la polinización los lóbulos del estigma están juntos y a medida que progresa su desarrollo el estigma se alarga y ensancha como consecuencia de que los lóbulos se separan y las papilas se hacen más visibles. El estilo en un principio es corto, con un diámetro mayor o igual a su longitud y posteriormente incrementa su longitud y eleva la posición del estigma con respecto a las anteras. El ovario también aumenta su tamaño, separándose de la parte basal del cáliz y se hace más visible. Debido a la asincronía de la floración en el olivo, el polen se puede depositar en los estigmas desde que la flor comienza a abrirse.

La diferenciación del pistilo está íntimamente relacionada con el desarrollo de la flor. Conociendo los marcadores morfológicos característicos de las diferentes etapas de la flor, se puede inferir el periodo de desarrollo del pistilo (Fig. 4.5).



Figura 4.5. Desarrollo del pistilo del olivo durante la floración (var. Picual). **1**, botón verde; **2**, botón blanco; **3**, flor parcialmente abierta; **4**, flor abierta con anteras turgentes; **5**, flor abierta, anteras dehiscentes; **6**, flor con anteras marrones; **7**, flor sin pétalos; **8**, flor sin pétalos con estigma marrón y ovario fecundado (A) o sin fecundar (B). Barra= 1 mm.

Antes de la polinización; durante la polinización; de la polinización



De acuerdo a nuestras observaciones, en la fase de flor abierta y anteras turgentes, el pistilo presenta diferencias notables en cuanto a su tamaño, forma y color en las 4 variedades estudiadas (Fig. 4.6 y Anexo I).



Figura 4.6. Pistilos de distintas variedades de olivo en la fase 4 (flor con anteras turgentes) Barra= 1 mm.

En el estigma puede ocurrir que los dos lóbulos parezcan estar fusionados, como ocurre en la variedad Lucio. En las otras 3 variedades se distinguen bien los 2 lóbulos que aparecen separados ya desde el inicio del estigma (var. Arbequina), desde el centro (var. Loaime) o sólo al final (var. Picual). Los análisis morfométricos confirman las observaciones de que el área del estigma es mayor en la variedad Lucio y la más pequeña en la variedad Arbequina (Fig. 4.7).

El estilo más pequeño corresponde a la variedad Lucio, que no llega al milímetro, mientras que en la variedad Loaime llega a ser hasta 2 veces más largo (Fig. 4.7.). La variedad Arbequina presentó el estilo de mayor diámetro, mientras que en Picual el estilo mostró tamaños intermedios en largo y ancho (Fig. 4.7).

Los ovarios, según la relación anchura/altura, son de dos tipos: esféricos y ovoidales. Al primer grupo pertenecen las variedades Arbequina y Loaime, mientras que los de las variedades Lucio y Picual son ovoides, aunque en el



primero el eje transversal es el mayor y en el segundo es mayor el eje longitudinal (Fig. 4.7).

Figura 4.7. Histogramas de las medidas del estigma, estilo y ovario de las distintas variedades estudiadas.

El análisis de los datos mediante el test ANOVA de un factor permitió determinar que existen diferencias significativas en todos los parámetros morfométricos del pistilo estudiados entre los 4 cultivares (ver Anexo II). El análisis post hoc de estos datos mostró que todos los parámetros, a excepción de la anchura del estilo y del ovario, difieren significativamente entre los distintos cultivares cuando éstos se comparan entre sí dos a dos (Anexo III). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la anchura del estilo entre los cultivares Loaime y Lucio, y únicamente Lucio y Arbequina mostraron diferencias significativas en la anchura del ovario.



4.2. Estructura del pistilo

Las observaciones al microscopio óptico de cortes semifinos teñidos con azul de metileno nos permitieron reconocer y caracterizar los diferentes tejidos que conforman la estructura del pistilo en las distintas fases de la polinización.

4.2.1. El estigma

El estigma está compuesto por una zona externa de papilas epidérmicas, dos o tres capas de células glandulares internas y una región de células basales internas no glandulares que unen las células glandulares más externas con el tejido transmisor del estilo (Fig. 4.8A). Estos tejidos presentan una tinción similar, y de mayor intensidad que las células externas que los rodean. En el estigma se puede apreciar una estructura similar a un embudo, en el que el diámetro mayor corresponde a las papilas externas, y que se continua hasta llegar al tejido transmisor del estilo (Fig. 4.8A, C). Esta tinción diferencial de tejidos marca el camino por donde pasan los tubos polínicos hacia el estilo. Las papilas son células muy activas por la cantidad de exudado que secretan durante el periodo de polinización (Fig. 4.8B). Las células externas que rodean a la zona basal del estigma son continuación del tejido parenquimático del estilo y presentan características similares (Fig. 4.8C). Este tejido externo parece tener una función de soporte estructural del tejido secretor.

4.2.2. El estilo

El estilo presenta una epidermis de una sola capa de células vacuoladas y alargadas, cubierta por una cutícula externa protectora. Hacia el interior se encuentra el córtex, tejido parenquimático que está compuesto por varias filas de células prismáticas y vacuoladas. En esta zona también se encuentran dos haces conductores a ambos lados, que comunican el estigma con la zona basal del ovario. En la zona central, se encuentra el tejido transmisor que constituye el eje longitudinal del estilo. Está constituido por células ricas en citoplasma, y que se tiñen intensamente (Fig. 4.8A, C-D). El tejido transmisor aparentemente se dirige hacia uno de los 2 lóculos, entrando a través del funículo en uno de los óvulos, donde pierde su identidad (Fig. 4.8D).



Figura 4.8. Secciones ópticas de pistilos de flores en plena floración teñidos con azul de metileno. **A**, corte de longitudinal de pistilo; **B**, corte transversal de la zona papilar con exudado y granos de polen en la superficie; **C**, corte longitudinal de la prolongación del estigma hacia el estilo a través de la región basal de células no glandulares; **D**, corte longitudinal del estilo con el tejido transmisor que se continua en uno de los lóculos (flechas); **E**, corte transversal ovario en donde se observan los cuatro óvulos.



El ovario está constituido por una epidermis que tiene una sola capa de células vacuoladas, cubierta por una cutícula gruesa de características similar a la del estilo. En la zona de unión de la epidermis del ovario con el estilo, se aprecia una invaginación de la epidermis y cutícula, originando un estrechamiento en el cuello de botella del estilo. A continuación, se observa la peridermis, que está formada por varias capas de células poliédricas y vacuoladas con paredes celulares delgadas. Los haces vasculares se encuentran rodeando a los dos lóculos y dividen el pericarpo en dos partes, la externa o mesodermis (después de la fecundación mesocarpo) y la interna o endodermo (endocarpo del fruto). Este último tiene características similares a la mesodermis, aunque el tamaño de sus células suele ser menor. En la zona más interna de la endodermis, se encuentran los dos lóculos que contienen, a su vez, dos óvulos cada uno. Los óvulos están protegidos por la pared del lóculo, formada por una o varias capas celulares con paredes gruesas y que se tiñen intensamente con azul de metileno. Los óvulos son anátropos, ya que sus micrópilos se encuentran orientados hacia la zona más alta del ovario. Los óvulos se unen al ovario por medio del funículo y la zona superior de la placenta (Fig. 4.8D, E). No se ha encontrado obturador o alguna estructura semejante a una protuberancia en el óvulo, situada en la entrada del micrópilo, y que regule la entrada de los tubos polínicos en el saco embrionario.

4.2.4. Caracterización histológica del pistilo durante su desarrollo

Durante las <u>etapas de botón verde y blanco</u> los lóbulos del estigma están muy juntos (Fig. 4.9A) y la cantidad de exudado teñida con azul de metileno es apenas perceptible y no se observa polen en la superficie de las papilas (Fig. 4.9C). El estilo está constituido por una capa externa de células epidérmicas recubierta por una cutícula delgada. A continuación, las células del parénquima son alargadas y de características semejantes a la epidermis (Fig. 4.9B). En ninguno de los numerosos cortes observados en esta fase se ha podido advertir el tejido transmisor que llegue hasta el ovario. En el ovario, lo más característico es la presencia en la mesodermis de un conjunto de células vacuoladas en las que sólo se tiñen las paredes y núcleo, destacando del resto de células que las rodean (Fig. 4.9D).



Figura 4.9. Secciones longitudinales de pistilos de flores cerradas (botón blanco) teñidos con azul de metileno. **A**, corte central de un pistilo, con los 2 lóbulos del estigma muy próximos; **B**, corte más tangencial del estilo, donde se observan la cutícula, epidermis y el parénquima; **C**, parte superior de los lóbulos, con papilas externas sin exudado; **D**, cutícula, epidermis y mesodermis del ovario. Barra flor= 1 mm.

Cuando la <u>flor se abre y las anteras están turgentes</u>, los dos lóbulos del estigma siguen estando muy cercanos y entrelazados en su parte interna por las papilas (Fig. 4.10A), y se observan algunos pólenes en la superficie del estigma. A partir de esta fase se puede distinguir claramente un material amorfo o exudado en la superficie del las papilas (Fig. 4.10B). También se detecta material secretado en los espacios intercelulares de las células secretoras internas (Fig. 4.10D). Se aprecia que la cutícula que rodea al estilo ya es de mayor grosor (Fig. 4.10C), al igual que ocurre en el ovario.



Figura 4.10. Secciones longitudinales de pistilos de flores con anteras turgentes teñidos con azul de metileno. **A**, Corte central de pistilo; **B**, zona superior de los lóbulos del estigma con las papilas más separadas que en la etapa anterior; **C**, corte más tangencial del estilo, donde se observan la epidermis y el parénquima; **D**, parte basal del estigma, con las papilas internas en el centro de la imagen; **E**, corte de ovario mostrando la zona basal del óvulo. Barra de la flor= 1 mm.

En la fase de <u>flores abiertas con las anteras dehiscentes</u>, aumenta la superficie de las papilas al separarse más los 2 lóbulos del estigma, al mismo tiempo que las papilas se desarrollan y aumentan de tamaño. (Fig. 4.11A). Paralelamente se incrementa la secreción de exudado y el número de granos de polen depositados en la superficie del estigma es notablemente mayor (Fig. 4.11A, B). Se observa la presencia algunos tubos polínicos entre las papilas. En esta fase se distingue fácilmente el tejido transmisor debido a la diferenciación de las células y al engrosamiento de las paredes celulares y, como consecuencia, la tinción con azul de metileno es más intensa que para el resto de los tejidos del estilo (Fig. 4.11C). En algunos cortes se puede ver como el tejido transmisor llega hasta uno de los 2 lóculos del ovario (Fig. 4.11D).



Figura 4.11. Secciones longitudinales de pistilos de flores con anteras dehiscentes teñidas con azul de metileno. **A**, corte central de pistilo; **B**, zona superior del estigma con pólenes germinados y exudado (estrellas); **C**, estilo mostrando el tejido transmisor; **D**, corte longitudinal de ovario mostrando la zona del tejido transmisor. Barra de la flor= 1 mm.

En fase de flor <u>con anteras marrones</u>, los granos de polen alrededor del estigma siguen siendo abundantes. Muchos están vacíos o colapsados (Fig. 4.12A) y otros están geminados, observándose tubos polínicos largos entre las papilas internas del estigma. Paralelamente, las papilas externas muestran signos de envejecimiento (Fig. 4.12B). La probabilidad de encontrar el tejido transmisor en esta fase llegando hasta los lóculos del ovario es alta (Fig. 4.12C, D).



Figura 4.12. Secciones longitudinales de pistilos de flores con anteras dehiscentes marrones teñidos con azul de metileno. **A**, corte central de pistilo; **B**, detalle del estigma con pólenes en proceso de germinación; **C**, estilo con el tejido transmisor; **D**, ovario mostrando la zona del tejido transmisor. Barra de la flor= 1 mm.

En la etapa de <u>caída de los pétalos</u>, el estigma comienza a oscurecerse en la zona más distal de uno de los 2 lóbulos. En cortes semifinos teñidos con azul de metileno se distinguen bien la zona de degeneración de las papilas (Fig. 4.13A, C). La cantidad de granos de polen es notablemente menor que en estadios anteriores, pero el exudado permanece (Fig. 4.13B). Es difícil de distinguir el tejido transmisor del resto de los tejidos del estilo al perder su tinción característica (Fig. 4.13D). El cambio más significativo en el ovario es que por primera vez se detecta la presencia de células isodiamétricas con paredes gruesas lignificadas, conocidas como esclereidas, en la zona central de la mesodermis, coincidiendo con los puntos donde se localizan los haces vasculares (Fig. 4.13E).



Figura 4.13. Secciones longitudinales de pistilos en el estadio de flor sin pétalos. **A**, corte longitudinal del pistilo, **B**, detalle de la zona receptiva del estigma; **C**, detalle de una zona comenzando a degradarse del estigma; **D**, estilo; **E**, ovario. Obsérvese las esclereidas en el ovario (círculos). Barra de la flor= 1 mm.

Finalmente, cuando el <u>estigma y estilo se visualizan totalmente</u> <u>marrones</u> y marchitos, se observa que sus tejidos se desorganizan como consecuencia de la muerte celular programada de estas estructura (Fig. 4.14A– B). En la mitad del estilo, se observa una degradación total de las células que favorece la fractura o separación del ovario del resto del pistilo (Fig. 4.14A, C). Como consecuencia de la fecundación el ovario se engrosa y se incrementan los puntos de localización de esclereidas en la endodermis y paralelamente aumente el número de células que se esclerifican alrededor de la esclerida inicial (Fig. 4.14D). Estas células lignificadas son el inicio de la formación del hueso del fruto. Cuando la doble fecundación no ha tenido éxito, el ovario se detiene en su crecimiento y termina cayéndose.



Figura 4.14. Secciones longitudinales de pistilos en el estadio de flor con estigma y estilo marrón. **A**, corte longitudinal de pistilo; **B**, estigma completamente degradado; **C**, detalle de una zona comenzando a degradarse del estilo; **D**, ovario. Obsérvese el aumento de esclereidas en el ovario (círculos). Barra de la flor= 1 mm.

4.2.5. Caracterización histoquímica del pistilo durante su desarrollo

La localización y cambios que polisacáridos y lípidos experimentan durante el desarrollo del pistilo, se ha estudiado mediante la tinción de Schiff (PAS) y la tinción con Sudan Black B, respectivamente (Fig. 4.15).



Figura 4.15. Cortes longitudinales de pistilos teñidos con: (**A**) azul de metileno para estudios histológicos en general, (**B**) PAS para localización de polisacáridos, y (**C**) Sudán Black B para la localización de lípidos.

4.2.5.1. Localización de polisacáridos

Cuando la flor está cerrada y el <u>botón floral</u> es todavía de <u>color verde</u>, lo más significativo es la tinción PAS positiva de las paredes celulares de todos los tejidos del pistilo (Fig. 4.16A). Destaca una tinción más intensa de color rosa púrpura en las paredes del tejido glandular interno del estigma (Fig. 4.16B), de las paredes de las células que rodean a los 2 lóculos del ovario y de la cutícula del estilo y el ovario (Fig. 4.16C, D). Además se observan unos pocos gránulos rosa púrpura en las células de la epidermis y el parénquima (córtex) del estilo, que por su tamaño y localización celular corresponderían a granos de almidón (Fig. 4.16C). En el ovario no se observan gránulos positivos a la tinción de PAS, lo que indica la ausencia de almidón en esta fase del desarrollo (Fig. 4.16D, E).



Figura 4.16. Cortes longitudinales de pistilos de olivo en el estadio de botón verde teñidos mediante la técnica de PAS. **A**, corte de pistilo con una mayor tinción en el estigma y en las paredes que rodean a los 2 lóculos en el ovario; **B**, detalle del tejido glandular del estigma; **C**, corte del estilo, donde se observa el tejido transmisor con células más pequeñas y ordenadas en filas; en la parte más externa, las células son más grandes y poliédricas y se observan unos pocos gránulos violeta de almidón (flechas); **D** y **E**, detalle de los lóculos del ovario donde se aprecia la tinción más intensa de la cutícula y las paredes celulares que rodean al lóculo (flechas). Barra del botón floral= 1 mm.

En la fase de <u>botón floral blanco</u>, se observan pequeños gránulos de almidón en las papilas y el tejido glandular del estigma (Fig. 4.17B). En el estilo, también se encuentran abundantes gránulos de almidón (Fig. 4.17C, D),

siendo de mayor tamaño en el parénquima que en el tejido transmisor. Hay que destacar la mayor cantidad de almidón en las células adyacentes a los haces vasculares. Otra característica de esta etapa de desarrollo es una mayor tinción de las paredes celulares y espacios intercelulares del tejido transmisor que en la fase anterior, (Fig. 4.17C, D). Se observa por primera vez pequeños gránulos de almidón en la mesodermis del ovario y gránulos de mayor tamaño en el óvulo (Fig. 4.17E).



Figura 4.17. Cortes longitudinales de pistilos de olivo en el estadio de botón blanco. **A**, vista general de un pistilo completo; **B**, papilas y tejido glandular del estigma con almidón (flechas); **C** y **D**, tejidos del estilo con numerosos gránulos de almidón, que son más grandes en las células próximas a los haces conductores (flechas negras) que en las células más alejadas (flechas blancas); **E**, tejidos del ovario con gránulos de almidón (flechas) que son más pequeños en la mesodermis y de mayor tamaño en el óvulo. Barra del botón floral= 1 mm.

74

Desde el momento en que la flor comienza a abrirse ya pueden llegar pólenes de otras flores al pistilo. Cuando la flor todavía tiene las <u>anteras</u> <u>turgentes</u> no se observa ninguna reacción PAS positiva en la superficie de las papilas aunque ya se había detectado exudado con azul de metileno. En cambio, si se aprecia tinción entre las células del tejido glandular (Fig. 4.18A, B). Con respecto al almidón, se ve que ya no hay gránulos en las papilas, pero sí se mantiene en las células más internas cercanas al tejido conductor al igual que ocurre en el estilo (Fig. 4.18B, C). Los mayores cambios ocurren en el ovario donde se aprecia un notable incremento de gránulos violeta en el mesocarpo y el óvulo, en el cuál existe una marcada polarización del almidón (Fig. 4.18C, D).



Figura 4.18. Cortes longitudinales del pistilo de olivo en el estadio de flor con anteras turgentes. A, vista general de un pistilo completo; B, papilas sin almidón y tejido glandular del estigma con almidón (flechas) y secreción entre las células (estrellas); C, tejidos del estilo con abundantes gránulos de almidón (flechas); D, tejidos del ovario con numerosos gránulos de almidón en la mesodermis; E, detalle del óvulo. Barra de la flor= 1 mm.

En la fase de <u>anteras dehiscentes</u> se observa una cantidad considerable de exudado PAS positivo (Fig. 4.19A, B), que en estadios anteriores no fue detectado. Apenas hay almidón en las papilas, y en el estilo se aprecia una mayor cantidad de almidón en la mitad inferior del mismo (Fig. 4.19C). En el ovario, el almidón sólo está presente en las proximidades de los vasos (Fig. 4.19D). La cutícula tiene una doble capa que se tiñe intensamente con PAS en el interior y más débilmente en el exterior (Fig. 4.19C, D).



Figura 4.19. Cortes longitudinales del pistilo de olivo en el estadio de flor con anteras dehiscentes. **A**, vista general de un pistilo completo; **B**, papilas con exudado (estrellas) y sin gránulos de almidón; **C**, tejidos del estilo con polarización del almidón hacia la zona basal; **D**, ovario con poco almidón. Barra de la flor= 1 mm.

Cuando la flor aún no ha perdido los pétalos, pero tiene las <u>anteras</u> <u>marrones</u> completamente, se observa que en el estigma ya no hay nada de almidón (Fig. 4.20A, B). Las células estigmáticas son grandes, apreciándose una cierta desorganización en la zona basal del tejido estigmático (Fig. 4.20C), en el que se detecta poco almidón, el cual se localiza en el tejido transmisor de la parte inferior (Fig. 4.20D). En el ovario también disminuye notablemente la cantidad de gránulos de almidón, que se visualizan preferentemente en las células cercanas al tejido vascular, tanto en la mesodermis como en los óvulos (Fig. 4.20E).



Figura 4.20. Cortes longitudinales de pistilo de flores con anteras marrones. **A**, corte del pistilo completo; **B**, papilas y tejido glandular sin gránulos de almidón, pero con secreción intercelular positivo al PAS (estrellas); **C**, células desorganizadas en la parte basal del estigma y en la parte superior del estilo; **D**, corte del estilo, en el que se observan gránulos de almidón (flechas) sólo en el tejido transmisor de la parte inferior; **E**, tejidos del ovario con gránulos de almidón (flechas) próximos a los haces vasculares. Barra de la flor= 1 mm.

En el estadio de <u>flor sin pétalos</u>, en el que el estigma está aparentemente bien conservado, se observa la degradación de las papilas en el ápice estigmático de uno los lóbulos, el cual da una tinción más intensa con la reacción de PAS (Fig. 4.21A-E). En esta fase final de la floración, el almidón sólo se encuentra en los óvulos, y aparece polarizado alrededor del saco embrionario (Fig. 4.21F).



Figura 4.21. Cortes longitudinales del pistilo de olivo en el estadio de flores sin pétalos. A, pistilo completo; B, detalle de estigma, donde el ápice de uno de los lóbulos se tiñe más intensamente de color rosa-púrpura; C-E, distintas zonas del estigma; C, zona basal del estigma aparentemente receptiva con exudado (estrella), D, zona comenzando a degradarse y E, zona degradada; F, óvulo en el que se aprecia una polarización del almidón (flechas) en las células próximas al saco embrionario. Obsérvese que el canal del micropilo da positivo al PAS (círculo). Barra del pistilo= 1 mm.

4.2.5.2. Cuantificación del almidón

A partir de cortes de pistilos teñidos con PAS en distintos estadios de la fase progámica, se cuantificó el almidón presente en los diferentes tejidos midiendo la densidad óptica por área de los gránulos de almidón (Fig. 4.22).



Figura 4.22. Cuantificación de la cantidad de almidón en el estigma (**A**), estilo (**B**) y ovario (**C**) durante el desarrollo del pistilo. Nótese el aumento progresivo del contenido de almidón hasta la fase de polinización, y el descenso rápido que ocurre después de la polinización. Sólo en el óvulo persiste una pequeña cantidad tras la polinización una vez que la flor pierde los pétalos.

Los resultados de la cuantificación indican que inicialmente existe un aumento de los niveles de almidón en todos los tejidos del pistilo. En las papilas y el parénquima del estilo, el máximo se alcanza antes de la polinización mientras que, en el resto de los tejidos, esto ocurre durante la polinización. A partir del estadio de flor abierta con anteras turgentes, el almidón se metaboliza en su casi totalidad en los distintos tejidos del pistilo con excepción del óvulo, en el que persiste una cierta cantidad tras la polinización. El tejido transmisor del estilo es donde el almidón se mantiene presente durante más tiempo (desde el estadio de botón blanco hasta el de flor abierta con anteras dehiscentes).

También se ha medido la densidad óptica relativa de los gránulos de almidón en relación a los distintos tejidos del pistilo, encontrándose que la mayor cantidad de almidón se acumula en el estilo y el ovario, siendo el estigma la parte del pistilo que presenta menos almidón (Fig. 4.23).



Figura 4.23. Cuantificación de la cantidad relativa de almidón en el estigma, estilo y ovario en los estadios de botón verde (**A**), botón blanco (**B**), flor abierta con anteras turgentes (**C**), flor con anteras dehiscentes (**D**), flor con anteras marrones (**E**) y flor con estigma marrón (**F**).

Los resultados muestran que, en las fases previas a la polinización, el estilo es la parte del pistilo que más almidón contiene mientras que, comparativamente, el estigma presenta los niveles más bajos. El hecho más relevante es el incremento (del 2% al 25%) en los niveles de almidón que tiene lugar en el estigma entre los estadios de botón verde y botón blanco (Fig. 4.23A, B). En el estadio de flor abierta, durante la polinización, aumenta la cantidad relativa de almidón en el estilo, el cual llega a acumular más de la mitad del contenido total de almidón del pistilo. En cambio, durante la polinización, los niveles de almidón disminuyen progresivamente en el estigma (Fig. 4.23C, D). Después de la polinización, cuando las papilas ya han cumplido su función, y los granos de polen han germinado y emitido los tubos polínicos, la cantidad de almidón presente en las mismas alcanza el mínimo. En el estilo, parte del almidón es utilizado y los niveles disminuyen hasta un 25%. Por el contrario, en el ovario hay un aumento notable de la cantidad de gránulos hasta alcanzar el ~75% del almidón total del pistilo (Fig. 4.23 E, F).

4.2.5.3. Localización de lípidos

Fosfolípidos, lípidos neutros y esteroles se tiñen intensamente con Sudan Black B, por lo que la utilización de esta tinción en cortes nos puede indicar la distribución de lípidos en el pistilo y sus posibles cambios antes, durante y después de la polinización.

En pistilos procedentes de flores cerradas, es decir antes de la polinización, se observó una delgada capa lipídica externa que cubre las papilas. (Fig. 4.24A, B). También se tiñen las células glandulares más internas y la secreción de las mismas. Hay que destacar una intensa tinción en el interior de los vasos del floema del tejido vascular que se extiende a lo largo de todo el pistilo, excepto en la placenta y en los óvulos. El comportamiento de los haces vasculares con respecto a la tinción de Sudan Black es el mismo durante y después de la polinización (Fig. 4.25E y 4.26E). El xilema que lo acompaña no se tiñe en ningún caso (Fig. 4.24C, D). La cutícula que bordea la epidermis del estilo y el ovario se visualiza como una capa gruesa de color negro intenso (Fig. 4.24C, D). En los lóculos, el espacio entre la endodermis y los óvulos es altamente positivo al Sudan Black B (Fig. 4.24C). En el estilo y el ovario las células cercanas a los vasos conductores muestran una mayor intensidad a la tinción de los lípidos (Fig. 4.24C, D). La zona no glandular interna del estigma, así como el tejido transmisor y las células de la epidermis del estilo y ovario no se tiñen con el Sudan Black B.



Figura 4.24. Cortes longitudinales del pistilo de olivo antes de la polinización. **A**, pistilo completo; **B**, zona papilar y glandular con una mayor tinción en la zona interna; **C**, estilo, con la cutícula teñida intensamente; **D**, ovario donde se observa la tinción alrededor del óvulo; **E**, detalle de los vasos de la mesodermis del ovario. Barra del botón floral= 1 mm.

<u>Durante la polinización</u>, el principal cambio observado es a nivel del estigma, donde el exudado es muy abundante y se tiñe parcialmente con Sudan Black B (Fig. 4.25A, D). La tinción de las papilas y células glandulares se hace más evidente que en la etapa anterior (Fig. 4.25B-D). El tejido transmisor no presenta tinción alguna (Fig. 4.25C). En el óvulo, se observa una polarización

de las células más teñidas hacia la parte más alejada del saco embrionario, el cual también aparece ligeramente teñido (Fig. 4.25E)



Figura 4.25. Cortes longitudinales del pistilo de olivo durante la polinización. **A**, pistilo completo; **B**, zona papilar y glandular del estigma con los haces vasculares; **C**, estilo y zona central del ovario, mostrando el tejido transmisor con tinción negativa; **D**, detalle de la zona papilar (recuadro en B) con exudado (estrellas) y granos de polen; **E**, detalle del óvulo con el saco embrionario (óvalo), en el que se observa la polarización de los lípidos. Barra de la flor= 1 mm.

<u>Después de la polinización</u>, comienzan a detectarse los primeros síntomas de deterioro en el estigma. Se observa una desorganización de las

papilas y persiste el exudado ligeramente positivo a la tinción de Sudan Black B (Fig. 4.26B-D), aunque disminuye la intensidad de la reacción en el tejido glandular (Fig. 4.26C). Otra diferencia significativa es que, al aumentar el tamaño del ovario, también son más numerosas las células de la mesodermis que se tiñen y el grado de tinción con respecto a la epidermis se hace más homogéneo. La cutícula se presenta gruesa e intensamente teñida (Fig. 4.26C).



Figura 4.26. Cortes longitudinales del pistilo de olivo después de la polinización. **A**, pistilo completo; **B**, ápice de un lóbulo donde se observan síntomas de degradación; **C**, estilo y zona central del ovario, donde se observa como la tinción positiva con Sudan Black se ha extendido hacia las zonas más externas del estilo y el ovario; **D**, detalle de la zona papilar con exudado positivo al Sudán Black B (estrellas); **E**, detalle de los haces vasculares que se dirigen a los óvulos, donde la tinción es negativa. Barra del pistilo= 1 mm.

ľ

Se puede concluir que el pistilo presenta una distribución específica de los lípidos según los tejidos y que dicha distribución no cambia de manera significativa a lo largo de la fase progámica (Tabla 4.1).

ÓRGANO	TEJIDO	MARCADO		
		Antes	Durante	Después
Estigma	Exudado	-	+	+
	Papilas	+	++	+
	No glandular	-	-	-
	Parénquima	+	+	+
	Xilema	-	-	-
	Floema	++	++	++
Estilo	Cutícula	++	++	++
	Epidermis	-	-	+/-
	Parénquima	-	-	-
	Transmisor	+	+	+
	Xilema	-	-	-
	Floema	++	++	++
Ovario	Cutícula	++	++	++
	Epidermis	-	-	-
	Mesodermis	+	+	+
	Xilema (mesodermis)	-	+	-
	Floema (mesodermis)	+	-	+
	Endodermis	++	++	++
	Límite del lóculo	++	++	++
	Óvulo	+	+	+
	Xilema (óvulo)	-	-	-
	Floema (óvulo)	-	_	-

Tabla 4.1. Localización de los lípidos en los distintos tejidos del pistilo de olivo antes, durante y después de la polinización. (-) ausencia de marcado; (+) marcado moderado; (++) marcado intenso.

4.2.6. Organización celular del pistilo durante el desarrollo

La observación de cortes ultrafinos de pistilos de olivo bajo el microscopio electrónico de transmisión (MET) nos permitió estudiar la ultraestructura celular de los tejidos del pistilo y los cambios que éstos experimentan a lo largo de la fase progámica.

4.2.6.1. El estigma

Las papilas epidérmicas, situadas en la periferia del estigma, presentan una estructura alargada característica, compuesta por 3 ó 4 células envueltas por una cubierta común, que es densa a los electrones. En su interior, las células papilares presentan una gran vacuola central rodeada por el citoplasma periférico. En el estadio de botón blanco, las células papilares presentan amiloplastos, y se detecta muy poco exudado en su superficie (Fig. 4.27A). A medida que las papilas maduran, sus paredes se hacen más gruesas, el almidón se metaboliza y los plastos se degradan, al mismo tiempo que progresa la secreción del exudado (Fig. 4.27B).

Cuando el estigma está receptivo, se observa una gran cantidad de exudado de estructura heterogénea, y granos de polen inmersos en dicho exudado, los cuales se hidratan e inician la germinación (Fig. 4.27B). Una vez terminada la polinización, el citoplasma de las papilas se desorganiza y degrada hasta originar la muerte de dichas células (Fig. 4.27C). El exudado cambia tanto en su aspecto como en su composición (ver resultados histoquímicos en el capítulo 4.2.2) y, aunque todavía se observan granos de polen en la superficie del estigma, la mayoría están colapsados o tienen apariencia de no ser viables. Estos síntomas sugieren que el estigma ha dejado de ser receptivo y que, por tanto, ha terminado el periodo de polinización efectiva.



Figura 4.27. Cortes longitudinales ultrafinos de papilas de la superficie externa del estigma. **A**, papilas jóvenes en el estadio de botón blanco parcialmente abierto, en las que se observa una delgada capa de exudado de aspecto vesicular (estrellas); **B**, papilas estigmáticas de flores abiertas en plena polinización, con gran cantidad de exudado (estrellas) de estructura vesicular polarizada y heterogénea. Se observa un grano de polen rodeado de material aparentemente lipofílico procedente del exudado; **C**, papilas de flores sin pétalos, con signos de degradación celular. Obsérvese la notable diferencia en la cantidad de exudado y estructura del mismo en los tres estadios.

Las células glandulares más internas del estigma se activan antes que las papilas, secretando abundante material que se deposita entre los espacios intercelulares, y van adquiriendo una forma más redondeada (Fig. 4.28A, B). La zona basal interna no glandular se continúa con el tejido transmisor, formando un tejido más compacto que está constituido por células de tamaño uniforme y forma poliédrica, con una vacuola central, y amiloplastos cuyo almidón se metaboliza durante la polinización (Fig. 4.28C, D).



Figura 4.28. Cortes de la región interna del estigma de olivo. **A**, células glandulares subpapilares muy jóvenes, vacuoladas y con numerosos gránulos de almidón (flechas), paredes de diferente grosor con espacios intercelulares (estrellas); **B**, células glandulares de estigma de flores abiertas, que adquieren una forma redondeada y se separan entre sí por grandes espacios rellenos de material secretado (estrellas); **C**, células basales poliédricas de estigma joven con abundante almidón (flechas), paredes gruesas y sin espacios intercelulares; **D**, células basales de estigmas de flores abiertas en las que se ha metabolizado el almidón.



<u>La epidermis del estilo</u> está constituida por una o dos capas de células alargadas muy diferenciadas con una gran vacuola central, quedando el citoplasma y núcleo desplazados a la periferia. Es distintivo de estas células y de las células parenquimáticas contiguas la presencia en la vacuola de abundantes cristales prismáticos (inclusiones transparentes a los electrones), situados de manera preferente en la zona basal de dichas células (Fig. 4.29A, B). La cantidad de cristales disminuye progresivamente conforme avanza el desarrollo del estilo, quedando confinados a la capa celular más externa del estilo.

En el <u>parénquima del estilo</u> (o córtex), las células son vacuoladas y alargadas en sentido longitudinal. Tanto el citoplasma como los núcleos se hacen más evidentes en su tamaño a medida que nos aproximamos al tejido transmisor del estilo. Los gránulos de almidón presentes en las células del paréquima son de gran tamaño (Fig. 4.29C).



Figura 4.29. Cortes de la región externa del estilo. A, epidermis de un estilo joven (botón floral blanco) con abundantes cristales en el interior de las vacuolas (flechas); **B**, epidermis de un pistilo desarrollado (flor con anteras marrones) con la cutícula más gruesa que en la fase anterior; C, vista general de la epidermis y el parénquima del estilo, en la que se aprecia la diferencia entre las células externas y las internas.

El <u>tejido transmisor</u> ocupa la parte central del estilo y está constituido por filas de células regulares alargadas y que, en los pistilos desarrollados, presentan paredes más gruesas que las de las células vecinas y se comunican entre sí a través de plasmodesmos (Fig. 4.30A, B). El citoplasma es rico en ribosomas y orgánulos, y el núcleo es grande y se sitúa en posición central. Las vacuolas son pequeñas o están ausentes y los plastos tienen gran cantidad de almidón durante la polinización (Fig. 4.30C).



Figura 4.30. Cortes longitudinales de la región interna del estilo (parénquima y tejido transmisor). **A**, vista general en el estadio de flor abierta con anteras dehiscentes, en la que se aprecia la diferencia de grosor entre las paredes celulares de ambos tejidos. Se observa la presencia de algunos cristales en las vacuolas del parénquima (flechas), y la presencia de gran cantidad de almidón (asteriscos) en ambos tejidos; **B**, detalle de los plasmodesmos (círculo) existentes entre las células del tejido transmisor.


4.2.6.3. El ovario

En la zona de unión entre el estilo y el ovario, las células de la epidermis presentan núcleos prominentes y adquieren formas irregulares (Fig. 4.31A). La epidermis del ovario propiamente dicho presenta una fila externa de células alargadas dispuestas en empalizada, con núcleos prominentes localizados en el centro, y vacuolas grandes a ambos lados con inclusiones cristalinas en su interior, y rodeadas por una delgada capa de citoplasma (Fig. 4.31B). Se observa que la cutícula que rodea al ovario se va engrosando a medida que aumenta el tamaño del ovario (Fig. 4.31 A, B).

La mesodermis está constituida por células parenquimáticas isodiamétricas, vacuoladas y con grandes núcleos (Fig. 4.31C). En el ovario desarrollado (estadio de flor abierta), las células de la mesodermis presentan una gran cantidad de gránulos de almidón, el cual se metaboliza más tarde, por lo que deja de verse en las etapas posteriores a la polinización (Fig. 4.31D). En su lugar, se detecta un material electrodenso amorfo que atraviesa la vacuola.

La endodermis está compuesta por una o varias capas de células que conforman la pared de los lóculos (Fig. 4.31E, F). Está caracterizada por la presencia de células alargadas en sentido transversal, con paredes celulares gruesas. Entre estas capas de células y los óvulos aparece un material electrodenso (Fig. 4.31F).

En el óvulo, inicialmente, las células presentan características morfológicas similares a las células de la mesodermis. Después de la fecundación, existe una marcada diferenciación celular entre ambos tejidos. Así, de los 4 óvulos presentes en el ovario, el óvulo funcional empieza su desarrollo como semilla y los 3 restantes degeneran. Por otro lado, la mesodermis experimenta un incremento gradual en el tamaño de sus células, y se observan mayores espacios intercelulares y los haces vasculares forman un anillo que separa la mesodermis de la endodermis.

4.2.6.4. Características específicas de los tejidos del pistilo del olivo

Se ha observado que los tejidos del pistilo del olivo presentan dos características peculiares, que son:

a) La presencia de numerosas inclusiones muy densas a los electrones, que se localizan en el núcleo. Dichas inclusiones pueden alcanzar un tamaño similar al del nucléolo, pero se diferencian de éste porque presentan formas irregulares, a veces poliédricas, pero nunca son esféricas (Fig. 4.32A).



Figura 4.31. Cortes longitudinales del ovario del olivo. A, zona externa de unión del estilo y ovario; B, epidermis del ovario con células alargadas en empalizada de mayor densidad a los electrones que el resto de los tejidos del ovario; C, células de la mesodermis, con abundante almidón (asteriscos), pertenecientes a un ovario en el estadio de flor abierta; D, mesodermis de un ovario en n estadio posterior a la polinización en el que el almidón se ha metabolizado casi completamente; E, endodermis de un ovario joven; F, endodermis y óvulo con una estructura electrodensa (flechas) entre ambos.

b) La presencia de cristales prismáticos en la mayoría de las vacuolas. Dichos cristales son electrodensos pero aparecen transparentes a los electrones en los cortes, debido a que lo que se visualiza en realidad son los lugares dejados por los cristales que, debido a su dureza, saltan de la muestra durante la fase de ultramicrotomía. Como resultado, los cortes parecen estar sucios debido a la presencia de restos de estos cristales negros esparcidos por toda la célula muestra (Fig. 4.32B). Esporádicamente, se puede observar algunos de estos cristales electrodensos que permanecen en su localización original en la vacuola.



Figura 4.32. Cortes ultrafinos de ovario. **A**, núcleos con inclusiones muy densas (flechas); **B**, zona con los huecos dejados por los cristales (flechas) y un cristal (círculo) que permanece en la muestra.

4.3. Pectinas y AGPs en el pistilo del olivo durante su desarrollo

4.3.1. Análisis de expresión de pectinas y AGPs en el pistilo del olivo

Para llevar a cabo los análisis de expresión de las distintas AGPs y pectinas se prepararon extractos de proteínas totales a partir de pistilos de olivo en el estadio 8, utilizando distintos métodos de extracción. El perfil proteico se analizó mediante SDS-PAGE y las proteínas se visualizaron mediante tinción con nitrato de plata. Los mejores resultados desde el punto de vista cuantitativo (cantidad de proteína total en el extracto crudo, estimada mediante el método colorimétrico de Bradford) y cualitativo (número de bandas, amplitud del rango de peso molecular y reproducibilidad del perfil electroforético 1D) se obtuvieron cuando la extracción se realizó con una solución del detergente aniónico SDS al 10% (p/v), seguido del método basado en la extracción con agentes caótropos (urea/tiourea). Por otro lado, las soluciones 1 (ácido cítrico) y 4 (TCA/acetona) mostraron una baja capacidad para extraer y solubilizar las proteínas del pistilo (Fig. 4.33A). Para determinar la idoneidad del método de extracción, se realizaron también ensayos de Western blot con los anticuerpos anti-pectinas LM5 y LM6. Los resultados confirmaron la presencia de ambas pectinas únicamente en los extractos proteicos obtenidos mediante el método de extracción con SDS y, en menor medida, a partir de la extracción con urea/tiourea (Fig. 4.33B).



Figura 4.33. Optimización del método de extracción de proteínas totales a partir de pistilos de olivo. **A**, extracción y solubilización de proteínas totales a partir de pistilos (estadio 8 del desarrollo floral) mediante distintos métodos. Las proteínas (~25 µg/muestra) fueron analizadas mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10%, teñidos con nitrato de plata; **B**, inmunodetección de pectinas mediante ensayos de Western blot. Las proteínas (~25 µg/muestra) fueron transferidas desde geles de poliacrilamida al 10% a membranas de PVDF, las cuales fueron incubadas con los anticuerpos LM5 y LM6. M= marcadores proteicos.

Una vez optimizado el método de extracción, se analizó el perfil proteico del pistilo antes (AP), durante (P) y después de la polinización (DP). El análisis mediante SDS-PAGE mostró la presencia de numerosos polipéptidos en los tejidos del pistilo en un rango de peso molecular amplio en los tres estadios de desarrollo (Fig. 4.34). En dichos perfiles se observan algunas proteínas mayoritarias en un rango de peso molecular de 20-75 KDa. Así mismo, se aprecian diferencias entre los distintos estadios en términos cuantitativos (cantidad de una determinada proteína) y cualitativos (presencia de distintas proteínas).



Figura 4.34. Perfil proteico del pistilo de olivo antes (AP), durante (P) y después de la polinización (DP). Las proteínas (~25 μ g/muestra) fueron analizadas mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10%, teñidos posteriormente con nitrato de plata. M= marcadores proteicos.

Los ensayos de inmunodetección de las distintas AGPs y pectinas en los tejidos del pistilo en los estadios AP (antes de la polinización), P (durante la polinización) y DP (después de la polinización) se llevaron a cabo mediante experimentos de Western blot en los que se utilizó una batería de anticuerpos primarios anti-AGPs (JIM13) y anti-pectinas (LM5, LM6, JIM7 y JIM5) en combinación con un anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo Alexa 488. La densidad óptica de las bandas resultantes de dichos análisis se midió mediante el programa Quantity One. A partir de estos datos, se calculó la cantidad relativa de proteína en los 3 estadios analizados en cada caso.

Los análisis de expresión de **pectinas neutras** se llevaron a cabo mediante los anticuerpos LM5 y LM6. El anticuerpo LM5 fue capaz de reconocer dos proteínas de ~163 y ~174 KDa (Fig. 4.35A). Los análisis densitometría mostraron la cantidad de ambas pectinas es similar. Además, se observa una ligera disminución del contenido de ambas pectinas durante la polinización, que se acentúa aún más al final del proceso (Fig. 4.35B).



Figura 4.35. Inmunodetección de pectinas con motivos $[(1 \rightarrow 4)-\beta-D-galactosa]_4$ en su estructura. **A**, análisis de Western blot mediante el anticuerpo LM5 a partir de extractos proteicos de pistilos de olivo recolectados antes (AP), durante (P) y después de la polinización (DP); **B**, densidad óptica relativa antes (AP), durante (P) y después de la polinización (DP) de las bandas reactivas de 174 (en gris) y 163 (en negro) KDa de la figura A. M, marcadores proteicos.

Por otro lado, el anticuerpo LM6 fue capaz de reconocer una pectina de ~155 kDa, que está presente en los 3 estadios analizados (Fig. 4.36A). Además, durante la fase de polinización, aparecen 2 bandas adicionales en la zona baja del gel de 25 y 15 KDa, respectivamente. Estas pectinas de bajo peso molecular vuelven a desaparecer tras finalizar el periodo de polinización.



Figura 4.36. Inmunodetección de pectinas con motivos $[(1 \rightarrow 5)-\alpha$ -L-arabinosa]₅ en su estructura. **A**, análisis de Western blot mediante el anticuerpo LM6 a partir de extractos proteicos de pistilos de olivo recolectados antes (AP), durante (P) y después de la polinización (DP); **B**, densidad óptica relativa antes (AP), durante (P) y después de la polinización (DP) de las bandas reactivas de 155 (en gris), 25 (en blanco) y 15 (en negro) KDa de la figura A. M, marcadores proteicos.

Los estudios densitométricos mostraron que la pectina de mayor peso molecular (155 KDa) es la más abundante de las tres formas detectadas. Los niveles de esta pectina neutra se incrementan durante la polinización, y disminuyen después de la misma hasta alcanzar valores ligeramente inferiores a los del estadio anterior a la polinización (Fig. 4.36B).

Los análisis de expresión de las **pectinas** con alto y bajo grado de esterificación se realizaron mediante los anticuerpos JIM7 y JIM5, respectivamente. El anticuerpo JIM7 permitió detectar una pectina de unos 200 KDa, con un grado de esterificación del 15-80% y que presenta en su estructura epítopos formados por residuos esterificados con grupos metilo flanqueados por residuos sin esterificar (Fig. 4.37A). Este tipo de pectinas se sintetiza durante la polinización. Después de la polinización, se produce una disminución de aproximadamente un 20% en el contenido de dicha pectina (Fig. 4.37B).



Figura 4.37. Inmunodetección de pectinas esterificadas. **A**, análisis de Western blot mediante el anticuerpo JIM7 a partir de extractos proteicos de pistilos de olivo recolectados antes (AP), durante (P) y después de la polinización (DP); **B**, densidad óptica relativa antes (AP), durante (P) y después de la polinización (DP) de la banda reactiva de 199 KDa de la figura A. M, marcadores proteicos.

A su vez, el anticuerpo JIM5 mostró la presencia de una banda de un peso molecular próximo a los 270 KDa. Dicha banda corresponde a una pectina con un grado de esterificación del 31-40% y que presenta en su estructura epítopos formados por 4 o más residuos no esterificados, flaqueados en ambos extremos por residuos esterificados con grupos metilo (Fig. 4.38A). Esta pectina aparece únicamente durante la polinización y sus niveles de expresión son muy bajos (Fig. 4.38B).



Figura 4.38. Inmunodetección de pectinas con bajo grado de esterificación. **A**, análisis de Western blot mediante el anticuerpo JIM5 a partir de extractos proteicos de pistilos de olivo recolectados antes (AP), durante (P) y después de la polinización (DP); **B**, densidad óptica relativa antes (AP), durante (P) y después de la polinización (DP) de la banda reactiva de 264 KDa de la figura A. M, marcadores proteicos.

Finalmente, se llevaron a cabo análisis de expresión de **proteínas arabinogalactanos** (AGPs) en el pistilo. Así, el anticuerpo JIM13 fue capaz de reconocer una AGP de unos 180 KDa que presenta motivos del tipo β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2)-L-Rha en su estructura (Fig. 4.39A). Los análisis densitométricos mostraron un incremento significativo del contenido de dicha AGP en el pistilo durante la polinización, seguido de una disminución tras dicho periodo (Fig. 4.39B).



Figura 4.39. Inmunodetección de AGPs con motivos β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2)-L-Rha en su estructura. **A**, análisis de Western blot mediante el anticuerpo JIM13 a partir de extractos proteicos de pistilos de olivo recolectados antes (AP), durante (P) y después de la polinización (DP); **B**, densidad óptica relativa antes (AP), durante (P) y después de la polinización (DP) de la banda reactiva de 179 KDa de la figura A. M, marcadores proteicos.



4.3.2. Localización de pectinas y AGPs en el pistilo del olivo

Los estudios de localización celular de las distintas pectinas y AGPs en el pistilo se realizaron mediante las técnicas de inmunolocalización a microscopía óptica de fluorescencia (MF) sobre secciones semifinas, y a microscopía electrónica de transmisión (MET) sobre secciones ultrafinas.

Los análisis de localización de **pectinas neutras** se llevaron a cabo mediante los anticuerpos LM5 y LM6. El anticuerpo LM5 permitió localizar pectinas neutras que contienen en su estructura motivos del tipo $[(1\rightarrow 4)-\beta$ -Dgalactosa]₄. Estas pectinas están presentes en los tejidos no secretores, localizándose en el parénquima y la epidermis del estilo y del ovario. Por contra, este tipo de pectinas está ausente en el estigma y el tejido transmisor (Fig. 4.40). También hay que destacar la polarización de la fluorescencia en el óvulo, que se localiza en las células que rodean al saco embrionario.



Figura 4.40. Inmunolocalización a microscopía óptica de fluorescencia (MF) de pectinas neutras con motivos $[(1 \rightarrow 4)-\beta$ -D-galactosa]₄ en su estructura, mediante el anticuerpo LM5, en pistilos de olivo antes (A), durante (B) y después (C) de la polinización. Obsérvese la fluorescencia en la epidermis del pistilo, el parénquima y en las paredes de los lóculos del ovario, así como su localización polarizada en los óvulos, alrededor del saco embrionario (flechas).

A nivel ultraestructural, no se detectó la presencia de este tipo de pectinas ni en el exudado ni en ninguna estructura del <u>estigma</u>, con la excepción de las células externas del parénquima (Fig. 4.41).



Figura 4.41. Inmunolocalización, mediante el anticuerpo LM5, de pectinas con motivos $[(1 \rightarrow 4)-\beta-D$ -galactosa]₄ en su estructura, en el estigma del olivo. A, corte longitudinal del estigma al MF; B, sección de las papilas al MET; C, detalle del exudado estigmático y de las paredes de las papilas (recuadro de la figura B); D, vista general al MET de la región subpapilar; E, detalle de las paredes celulares del tejido subpapilar. Obsérvese la presencia de marcado en el tejido parenquimático del estigma (figura A), y la ausencia de partículas de oro en el exudado, las papilas y el tejido subpapilar (figuras A, C y E).

En el <u>estilo</u>, las células epidérmicas presentan una intensa señal fluorescente que, sin embargo, no está localizada en las paredes celulares ni en la cutícula que recubre dicha epidermis (Fig. 4.42A, B). A nivel

ultraestructural, se observó que los granos de oro se localizan preferentemente en las vacuolas de las células epidérmicas, frecuentemente asociados a estructuras cristalinas presentes en dichas vacuolas (Fig. 4.42C, D).



Figura 4.42. Inmunolocalización, mediante el anticuerpo LM5, de pectinas con motivos [($1 \rightarrow 4$)- β -D-galactosa]₄ en su estructura, en el estilo del olivo. **A**, corte longitudinal del estilo visto al MF; **B**, detalle de la epidermis del estilo; **C**, corte visto al MET de la epidermis y la cutícula; **C**, detalle de la vacuola de una célula epidérmica con cristales (asteriscos), en la que se observa el marcado con oro (flechas).

En el parénquima del estilo, se observó una diferencia apreciable en los niveles de marcado con oro entre las diferentes paredes celulares, en función de su orientación con respecto al eje longitudinal del estilo. Así, las paredes celulares paralelas al eje presentan un número menor de partículas de oro que las que se orientan en sentido transversal. (Fig. 4.43)



Figura 4.43. Inmunolocalización, mediante el anticuerpo LM5, de pectinas con motivos [$(1 \rightarrow 4)$ - β -D-galactosa]₄ en su estructura, en el estilo del olivo. A, corte longitudinal del estilo visto al MF; B, corte al MET del tejido parenquimático; C, detalle de paredes celulares longitudinales paralelas al eje del estilo (marco horizontal de la figura B); D, detalle de paredes celulares transversales al eje del estilo. Obsérvese la diferencia a nivel del marcado con granos de oro (flechas).

En el <u>ovario</u>, se observó que la localización de pectinas con el anticuerpo LM5 era similar a la de la epidermis y el parénquima del estilo. A nivel subcelular, las partículas de oro se localizaron también en la vacuola de

las células epidérmicas, mientras que las paredes mostraron ausencia de marca, al igual que ocurre con la cutícula (Fig. 4.44).



Figura 4.44. Inmunolocalización, mediante el anticuerpo LM5, de pectinas con motivos $[(1 \rightarrow 4)-\beta-D$ -galactosa]₄ en su estructura, en el ovario del olivo. A, corte longitudinal del ovario al MF donde se aprecia una fluorescencia más intensa en la epidermis; B, corte al MET del tejido epidérmico del ovario; C, detalle de unas células epidérmicas del ovario. Se observa un marcado intenso en las vacuolas (flechas), mientras que las paredes celulares aparecen libres de partículas de oro.

El anticuerpo LM6 permitió localizar pectinas neutras que contienen residuos de arabinosa (arabinanos) en lugar de galactosa en su estructura. Mediante estudios de inmunofluorescencia se vio que todos los tejidos daban señal de forma aparentemente generalizada (Fig. 4.45). Una característica de este tipo de pectinas es que se localiza en aquellos tejidos del pistilo en los que las pectinas con galactosa (galactanos) están ausentes, como es el caso de las papilas y el tejido transmisor.



Figura 4.45. Inmunolocalización a MF de pectinas neutras ricas en arabinosa (arabinanos), mediante el anticuerpo LM6. **A**, corte longitudinal de un pistilo de olivo durante la polinización. Se observa fluorescencia en todos los tejidos; **B**, detalle de un óvulo en el que se observa una intensa señal presente en la pared externa de los lóculos (endodermis).

Al estudiar el <u>estigma</u> en detalle, se observaron diferencias cuantitativas en los niveles de marcado entre los diferentes estadios. La distribución de la fluorescencia es irregular en el interior de las papilas jóvenes, y se hace más homogénea durante la polinización. La causa principal es la presencia de una cantidad creciente de exudado. A medida que avanza la floración, aumenta la secreción del exudado, y con él la cantidad de este tipo de pectinas (Figs. 4.46A y 4.47A).

A nivel subcelular, en la fase previa a la polinización, se detectaron partículas de oro en el citoplasma próximo a la pared de las papilas, y en el exudado, pero no en las paredes celulares (Fig. 4.46C).



Figura 4.46. Inmunolocalización, mediante el anticuerpo LM6, de pectinas neutras ricas en arabinosa en el estigma del olivo antes de la polinización. **A**, vista general al MF de un lóbulo del estigma con un marcado intenso e irregular de las papilas; **B**, sección al MET de papilas de la superficie del estigma con poca cantidad de exudado; **C**, detalle del exudado y las papilas en los que se observan unos pocos granos de oro (flechas).

Durante la polinización, las pectinas ricas en arabinosa aparecen distribuidas de manera homogénea entre las papilas del estigma, en la pared de los granos de polen inmersos en el exudado y en los tubos polínicos que germinan (Fig. 4.47A, B). Se observó que el polen es capaz de germinar sin estar en contacto directo con las papilas. A nivel subcelular, la localización de arabinanos durante esta fase se observa mayoritariamente en el exudado del estigma (Fig. 4.47C, D).



Figura 4.47. Inmunolocalización, mediante el anticuerpo LM6, de pectinas neutras ricas en arabinosa en el estigma del olivo durante la polinización. A, vista general de la zona papilar al MF; B, superficie papilar con polen embebido en el exudado, de matriz heterogénea, vista al MET; C, detalle del exudado cercano a las papilas en el que se observa el marcado con oro (flechas); D, exudado en contacto con el polen con abundante marcado con oro (flechas).

En el <u>estilo</u>, las pectinas ricas en residuos de arabinosa dan una mayor señal en la epidermis, pero no en la cutícula que recubre a la misma (Fig. 4.48A, C). A nivel ultraestructural, dichas pectinas se localizan en la pared celular y las vacuolas de las células epidérmicas (Fig. 4.48D).



Figura 4.48. Inmunolocalización, mediante el anticuerpo LM6, de pectinas neutras ricas en arabinosa en el estilo del olivo. **A**, corte longitudinal del estilo al MF, en el que se aprecia una fuerte señal fluorescente proveniente de la epidermis; **B**, vista general al MET de la epidermis; **C**, detalle de la cutícula con algunos granos de oro cerca de la pared celular (flechas); **D**, detalle de células epidérmicas con marca localizada en los engrosamientos de las paredes celulares y en las vacuolas (flechas).

En el tejido transmisor y la zona parenquimática interior del estilo, las pectinas reconocidas por el anticuerpo LM6 se localizan en la pared celular, cerca de la membrana plasmática, así como en las vesículas que se fusionan con la vacuola (Fig. 4.49C).



Figura 4.49. Inmunolocalización, mediante el anticuerpo LM6, de pectinas neutras ricas en arabinosa en el estilo del olivo. **A**, corte longitudinal del estilo al MF, en el que se observa fluorescencia en el tejido transmisor y el parénquima adyacente; **B**, sección al MET de células del parénquima interno del estilo (recuadro blanco en la figura A); **C**, detalle de las paredes celulares del parénquima en las que se puede ver abundante marca de oro (flechas) en vesículas que vierten su contenido hacia la pared.

En el <u>ovario</u>, la localización subcelular sigue el mismo patrón que en el estilo: paredes celulares y vacuolas. En la epidermis y el parénquima contiguos, las partículas de oro se localizan preferentemente en las paredes celulares, mientras que en las células parenquimáticas más internas la marca se concentra en las vacuolas (Fig. 4.50).



Figura 4.50. Inmunolocalización, mediante el anticuerpo LM6, de pectinas neutras ricas en arabinosa en el ovario del olivo. **A**, corte longitudinal de los tejidos externos del ovario (epidermis y parénquima) al MF; **B**, vista general de células del parénquima del ovario al MET (recuadro blanco en la figura A); **C**, detalle de una célula del parénquima interno (recuadro blanco de **A**) con las partículas de oro (flechas) localizadas en la pared celular y en los cristales presentes en la vacuola; **D**, detalle de una célula del parénquima más interno, donde las partículas de oro (flechas) se localizan preferentemente en la vacuola.

Los análisis de localización de las pectinas esterificadas se realizaron mediante los anticuerpos JIM7 v JIM5. Los experimentos de inmunolocalización a MF con el anticuerpo JIM7 confirmaron también la presencia de pectinas con epítopos formados por residuos esterificados (grado de esterificación= 15-80%) con grupos metilo flanqueados por residuos sin esterificar en los tejidos del pistilo. Dichas pectinas se localizaron en la epidermis, el tejido parenquimático, los haces vasculares y en los óvulos (Fig. 4.51). En general, no se observaron cambios importantes en la distribución de pectinas esterificadas en los tres estadios estudiados, salvo la presencia de este tipo de pectinas en las células que rodean al saco embrionario, que se hace más evidente a partir del estadio de polinización. Cabe destacar la ausencia de pectinas esterificadas en los tejidos secretores del estigma.



Figura 4.51. Inmunolocalización a MF de pectinas ácidas esterificadas, mediante el anticuerpo JIM7, en pistilos de olivo antes (**A**), durante (**B**) y después (**C**) de la polinización. Destaca la intensa fluorescencia observada en la endodermis que rodea al óvulo (flechas) y alrededor del saco embrionario, y la ausencia de señal en los tejidos secretores (zona papilar y subpapilar) del estigma.

A nivel subcelular, se confirmó la ausencia de pectinas esterificadas en las papilas y la zona subpapilar del <u>estigma</u>. Sin embargo, el anticuerpo fue capaz de reconocer este tipo de pectinas en las paredes celulares del tejido parenquimático (Fig. 4.52).



Figura 4.52. Inmunolocalización, mediante el anticuerpo JIM7, de pectinas esterificadas en el estigma del olivo. **A**, corte longitudinal del estigma a MF. Se observa fluorescencia en las paredes celulares del parénquima, al igual que en el polen depositado en la superficie del las papilas; **B**, vista general de las células del tejido parenquimático al MET; **C**, detalle de las paredes celulares (zona del recuadro en **B**) en las que los granos de oro (flechas) se localizan específicamente en las paredes celulares.

Las pectinas esterificadas en el <u>estilo</u> también se encuentran localizadas en las paredes celulares de manera muy específica. La fluorescencia se observa con mayor intensidad en ciertas zonas distribuidas irregularmente a lo largo del estilo, debido posiblemente a que el tejido parenquimático presenta gran cantidad de matriz extracelular en los que la cantidad de pectinas esterificadas podría ser mayor (Fig. 4.53).



Figura 4.53. Inmunolocalización, mediante el anticuerpo JIM7, de pectinas esterificadas en el estilo del olivo. **A**, corte longitudinal del estilo a MF. Se observa fluorescencia en las paredes celulares y la matriz extracelular, así como en la cutícula; **B**, vista general de las células parenquimáticas al MET; **C**, vista general de las células epidérmicas del estilo al MET; **D**, detalle de las paredes celulares del parénquima, donde se observa una marca específica con oro (flechas); **E**, detalle de las paredes celulares de la epidermis, donde se observa una marca específica con oro (flechas). También hay un ligero marcado en las vacuolas y en los cristales (asteriscos) que éstas contienen.

La inmunolocalización con el anticuerpo JIM7 en el <u>ovario</u> mostró la presencia de una gran cantidad de pectinas esterificadas en la endodermis y la epidermis (Fig. 4.54A). A nivel ultraestructural, se observaron partículas de oro en las paredes de dichas células y de los haces vasculares del ovario (Fig. 4.54C, D).



Figura 4.54. Inmunolocalización, mediante el anticuerpo JIM7, de pectinas esterificadas en el ovario del olivo. **A**, corte longitudinal del ovario a MF. Se observa que la fluorescencia se localiza principalmente en la endodermis; **B**, vista general al MET de las células epidérmicas (área del recuadro blanco en **A**); **C**, detalle de una célula epidérmica (área del recuadro en **B**) en la que se aprecia una gran vacuola con cristales (asteriscos). Las partículas de oro (flechas) se localizan específicamente en la pared celular; **D**, detalle de una célula de los haces vasculares del ovario. Se observa que las partículas de oro (flechas) se localizan específicamente en la paret celular; **D**, detalle de una célula de los haces vasculares del ovario. Se observa que las partículas de oro (flechas) se localizan en las paredes.

Por otro lado, las pectinas ácidas con bajo grado de esterificación sólo se localizan en la cutícula del estilo y el ovario durante la fase de polinización.

En la localización de **proteínas arabinogalactanos** (AGPs) se utilizó el anticuerpo JIM13. El estigma, el tejido transmisor y los óvulos presentan una fluorescencia intensa, mientras que en la zona parenquimática del estilo y en las paredes del ovario la intensidad es menor, aunque se observa un incremento durante el desarrollo (Fig. 4.55). Cabe destacar la presencia de AGPs en el óvulo, que se localizan de manera polarizada en la matriz extracelular de las células que rodean al saco embrionario. Se aprecian dos zonas claras en función de la intensidad de la fluorescencia, que anatómicamente se corresponden con los tejidos secretores del estigma y el estilo, y el parénquima externo o córtex.



Figura 4.55. Inmunolocalización a MF de AGPs, mediante el anticuerpo JIM13, en el pistilo del olivo antes (**A**), durante (**B**) y después (**C**) de la polinización. Inicialmente, la mayor intensidad de la fluorescencia se localiza en el estigma y el óvulo y, progresivamente, se extiende al resto de los tejidos del pistilo durante su desarrollo.

En el <u>estigma</u>, se han localizado AGPs en el exudado, el citoplasma y las vacuolas de las papilas (Fig. 4.56A, B). En la zona subpapilar, la vacuola es el compartimento celular con mayor cantidad de AGPs, aunque también se observó marcado en el citoplasma. Por el contrario, en las paredes celulares de las papilas no se observaron apenas granos de oro (Fig. 4.56C, D).



Figura 4.56. Inmunolocalización de AGPs, mediante el anticuerpo JIM13, con residuos de β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalpA- (1 \rightarrow 2)-L-Rha en su estructura, en el estigma del olivo. A corte longitudinal del estigma al MF; B, detalle de una papila al MET en el que se observa marcado con oro en el exudado y el citoplasma; C y D, detalle de unas células de la región subpapilar con un intenso marcado (flechas) en el citoplasma y en vesículas que vierten su contenido hacia la pared celular.

El <u>estilo</u> presenta una localización de AGPs en todos los tejidos y con una distribución similar a la del estigma. Hay que mencionar la presencia de granos de oro tanto en la cutícula como en el floema (Fig. 4.57).



Figura 4.57. Inmunolocalización de AGPs, mediante el anticuerpo JIM13, con motivos de β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalpA- (1 \rightarrow 2)-L-Rha en su estructura, en el estilo del olivo. **A**, corte longitudinal del estilo al MF; **B**, corte al MET de la epidermis del estilo; **C**, vasos conductores del floema en los que se observa la presencia de marcado (flechas) en el lumen y en las paredes engrosadas; D, detalle de la cutícula en la que se pueden apreciar los granos de oro (flechas).

En el <u>ovario</u>, la señal fluorescente mostró que este tipo de AGPs se localizan en los óvulos, especialmente en las células que rodean al saco embrionario (Fig. 4.58A). También se observó señal, aunque en mucha menor medida en los tejidos que darán lugar al futuro mesocarpo y en la zona periférica del ovario, próxima a la epidermis. En ambos tejidos, las partículas de oro se encuentran asociadas a la vacuola y al citoplasma (Fig. 4.58C, D). Así mismo, se observó marcado en las células epidérmicas (Fig. 4.58F).



Figura 4.58. Inmunolocalización de AGPs, mediante el anticuerpo JIM13, con motivos de β -D-GlcpA(1 \rightarrow 3)- α -D-Galp A (1 \rightarrow 2)-L-Rha en su estructura, en el ovario del olivo. **A**, corte longitudinal del ovario al MF; **B-D**, tejido parenquimático en el que se observa marcado con oro (flechas) en el citoplasma y la vacuola; **E** y **F**, tejido epidérmico, en el que se aprecia el marcado (flechas).

Todos los controles realizados, en los que se omitió el anticuerpo primario correspondiente, dieron negativo tanto a nivel de MF como de MET (Fig. 4.59).



Figura 4.59. Controles negativos en los que se omitió el anticuerpo primario LM6. **A**, corte longitudinal del ovario al MF; **B**, detalle de unas células del tejido subpapilar al MET.

4.4. Pectinas y AGPs en el polen del olivo durante la germinación in vitro

4.4.1. Análisis de expresión de pectinas y AGPs en el polen

Para realizar los análisis de expresión de las distintas AGPs y pectinas en el polen maduro y los cambios que tienen lugar durante la germinación *in vitro* se prepararon extractos de proteínas totales a partir de polen maduro sin hidratar, polen maduro hidratado y polen germinado según el método que se describe en el capítulo de "Material y Métodos". El perfil proteico se analizó mediante SDS-PAGE y las proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie.



Figura 4.60. Perfil proteico del polen maduro (PM), el polen hidratado (PH) y el polen germinado (3h) del olivo. Las proteínas (~25 μ g/muestra) fueron analizadas mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10%, teñidos con azul de Coomassie. M= marcadores proteicos.

Los análisis mostraron la presencia de numerosos polipéptidos en un rango de peso molecular amplio en el polen maduro, hidratado y germinado (Fig. 4.60). En dichos perfiles, se observan algunas proteínas mayoritarias, destacando la presencia de una proteína de 20 KDa, que es la más abundante y que ha sido identificada como el alérgeno Ole e 1. Así mismo, se aprecian algunas diferencias entre los distintos estadios en términos cuantitativos (cantidad de una determinada proteína) y cualitativos (presencia de distintas proteínas), aunque la capacidad de resolución de este tipo de geles es limitada dado su tamaño. La detección de **pectinas neutras** en el polen se realizó mediante los anticuerpos LM5 y LM6. El anticuerpo LM5 fue capaz de reconocer hasta 7 tipos de galactanos en el polen maduro en un rango de peso molecular de 58-92 KDa (Fig. 4.61A). Durante la hidratación y germinación del polen, los niveles de expresión de dichas moléculas disminuyen significativamente (Fig. 4.61B).



Figura 4.61. Inmunodetección de pectinas con motivos $[(1\rightarrow 4)-\beta$ -D-galactosa]₄ en su estructura. **A**, análisis de Western blot mediante el anticuerpo LM5 a partir de extractos proteicos de polen maduro (PM), polen hidratado (PH) y polen germinado (3h); **B**, densidad óptica relativa de la suma de las bandas reactivas (corchete) de la figura A, en cada uno de los estadios anteriores. M, marcadores proteicos.

El anticuerpo LM6 detectó una banda reactiva de un peso molecular de 253 KDa (Fig. 4.62A), cuyos niveles de expresión se incrementan durante la hidratación y posterior crecimiento del tubo polínico (Fig. 4.62B).



Figura 4.62. Inmunodetección de pectinas con motivos $[(1 \rightarrow 5)-\alpha$ -L-arabinosa]₅ en su estructura. **A**, análisis de Western blot mediante el anticuerpo LM6 a partir de extractos proteicos de polen maduro (PM), polen hidratado (PH) y polen germinado (3h); **B**, densidad óptica relativa de la banda reactiva de 253 KDa de la figura A, en cada uno de los estadios anteriores. M, marcadores proteicos.

Los análisis de expresión de las **pectinas esterificadas** en el polen se realizaron mediante los anticuerpos JIM7 y JIM5. El anticuerpo JIM7 permitió detectar una pectina de unos 290 KDa con un grado de esterificación del 15-80% en su estructura (Fig. 4.63A), que incrementa sus niveles de expresión en el polen germinado (Fig. 4.63B).



Figura 4.63. Inmunodetección de pectinas esterificadas. **A**, análisis de Western blot mediante el anticuerpo JIM7 a partir de extractos proteicos de polen maduro (PM), polen hidratado (PH) y polen germinado (3h); **B**, densidad óptica relativa de la banda reactiva de 290 KDa de la figura A, en cada uno de los estadios anteriores. M, marcadores proteicos.

A su vez, el anticuerpo JIM5 mostró la presencia de una banda de un peso molecular de unos 264 KDa (Fig. 4.64A). Dicha banda corresponde a una pectina con un grado de esterificación del 31-40%, que alcanza el máximo nivel de expresión en el polen germinado (Fig. 4.64B).



Figura 4.64. Inmunodetección de pectinas esterificadas. **A**, análisis de Western blot mediante el anticuerpo JIM5 a partir de extractos proteicos de polen maduro (PM), polen hidratado (PH) y polen germinado (3h); **B**, densidad óptica relativa de la banda reactiva de 264 KDa de la figura A, en cada uno de los estadios anteriores. M, marcadores proteicos.

La detección de **AGPs** en el polen se realizó mediante los anticuerpos JIM13 y JIM14. JIM13 fue capaz de reconocer una AGP de 318 KDa y un segundo grupo, indeterminado en cuanto al número, en un rango de 70-120 KDa (Fig. 4.65A). En ambos casos, los niveles de expresión se incrementaron notablemente durante la hidratación y la germinación (Fig. 4.65B).



Figura 4.65. Inmunodetección de AGPs con motivos β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2)-L-Rha en su estructura. **A**, análisis de Western blot mediante el anticuerpo JIM13 a partir de extractos proteicos de polen de olivo recolectados antes (AP), durante (P) y después de la polinización (DP); **B**, densidad óptica relativa de la banda de 318 KDa (en gris) y del clúster de 70-120 KDa (en negro) de la figura A. M, marcadores proteicos.

Finalmente, el anticuerpo JIM14, que reconoce epítopos formados por moléculas libres de L-arabinosa presentes en las AGPs, mostró reactividad con una única banda de 269 KDa (Fig. 4.66A). El máximo nivel de expresión se detectó en el polen, disminuyendo durante la germinación (Fig. 4.66B).



Figura 4.66. Inmunodetección de AGPs con motivos de L-arabinosa libres en su estructura. **A**, análisis de Western blot mediante el anticuerpo JIM14 a partir de extractos proteicos de polen maduro (PM), polen hidratado (PH) y polen germinado (3h); **B**, densidad óptica relativa de la banda reactiva de 269 KDa de la figura A, en cada uno de los estadios anteriores. M, marcadores proteicos.



Una vez confirmada la presencia de AGPs y pectinas en el grano de polen y el tubo polínico se procedió a analizar la localización de dichas moléculas durante la germinación del polen mediante microscopía láser confocal (MLC) y microscopía electrónica de transmisión (MET).

La utilización del anticuerpo LM5 permitió localizar **pectinas neutras** que contienen en su estructura motivos del tipo $[(1\rightarrow 4)-\beta$ -D-galactosa]₄. Estas pectinas mostraron una localización específica en las tres aperturas del polen maduro (Fig. 4.67A). Durante la hidratación, la señal fue mayor en la apertura por la cual emerge el tubo polínico (Fig. 4.67B). Una vez que el polen germina, se observa en la apertura un anillo fluorescente. Por otro lado, la pared del tubo sólo presenta una señal débil en la zona del ápice (Fig. 4.67 C, D).



Figura 4.67. Inmunolocalización a MLC de pectinas neutras con motivos $[(1 \rightarrow 4)-\beta$ -D-galactosa]₄ en el polen del olivo, mediante el anticuerpo LM5. A, sección óptica de polen maduro. Se observa que la señal fluorescente (flechas) se localiza específicamente en las aperturas; **B**, reconstrucción 3D de un grano de polen al inicio de la germinación. La fluorescencia es más intensa en la apertura por la que emerge el tubo polínico; **C** y **D**, proyección de las secciones ópticas (C) y reconstrucción 3D (D) de un grano de polen después de 3 h de germinación, respectivamente.

A nivel ultraestructural, este tipo de pectinas (galactanos) se localizan en el grano de polen y en el tubo polínico, asociadas a vesículas de Golgi presentes en el citoplasma, aunque los niveles de marcado son bajos (Fig. 4.68).



Figura 4.68. Inmunolocalización a MET de pectinas con motivos $[(1 \rightarrow 4)-\beta$ -D-galactosa]₄ en el polen del olivo, mediante el anticuerpo LM5. **A**, sección de polen maduro donde se observan vesículas con oro coloidal (flechas); **B**, sección de un tubo polínico, con marcado con oro (círculos) en las vesículas de Golgi.

El anticuerpo LM6 reconoce pectinas neutras ricas en arabinosa a lo largo de toda la superficie externa del tubo polínico, siendo la señal más intensa en el ápice (Fig. 4.69A, B). En la zona distal, se distinguen unos anillos alrededor del tubo, situados a distancias más o menos regulares (Fig. 4.69C).





Figura 4.69. Inmunolocalización a MLC de pectinas neutras con motivos $[(1 \rightarrow 5)-\alpha$ -L-arabinosa]₅ en el polen del olivo, mediante el anticuerpo LM6. **A**, sección óptica de polen maduro. Obsérvese la fluorescencia de la pared del tubo (flechas); **B**, reconstrucción 3D de un grano de polen después de 3 h de germinación; **C**, detalle de la zona distal (marco de la figura B), en la que se distinguen anillos fluorescentes rodeando al tubo (flechas).

A nivel ultraestructural, se observan partículas de oro en las vesículas de Golgi y, en menor medida, en la exina, mientras que la intina y la cubierta externa de la pared están libres de marcado. En el tubo polínico, la señal se concentra en la pared externa de la pared (Fig. 4.70).



Figura 4.70. Inmunolocalización a MET de pectinas neutras ricas en arabinosa, mediante el anticuerpo LM6. **A**, sección de polen maduro en el que las partículas de oro aparecen confinadas en las vesículas de Golgi en el citoplasma (círculos) y en la exina (flechas); **B**, sección de un tubo polínico en el que se observa un intenso marcado (flechas) a lo largo de la pared; **C**, detalle de la pared del tubo, en el que se observa el marcado con oro (flechas) en la capa externa de la pared.

Por otro lado, los anticuerpos JIM7 y JIM5 nos permitieron determinar la localización de **pectinas esterificadas** en el grano de polen y el tubo polínico. En el polen maduro, ninguna de las tres aperturas presentan señal con el anticuerpo JIM7, el cual reconoce pectinas esterificadas con grupos metilo (Fig. 4.71A). Sin embargo, cuando el polen se hidrata, aparece señal fluorescente en una de las aperturas (Fig. 4.71B). Una vez que el tubo polínico ya se ha formado, la señal se distribuye a lo largo de la pared el tubo polínico, concentrándose en el ápice del mismo (Fig. 4.71C-E). Este patrón de localización se mantiene después de varias horas de germinación (Fig. 4.71D).



Figura 4.71 Inmunolocalización a MLC de pectinas esterificadas con grupos metilo, mediante el anticuerpo JIM7. **A**, sección óptica de un grano de polen maduro; **B**, reconstrucción 3D de un grano de polen hidratado. Obsérvese la fluorescencia en una de las aperturas (flecha); **C**, proyección de las secciones ópticas de un grano de polen tras 1 h de germinación *in vitro*. Obsérvese que la fluorescencia se localiza en mayor medida en el ápice del tubo polínico (flecha); **D**, proyección de las secciones ópticas de un grano de polen tras 6 h de germinación *in vitro*; **E**, detalle de la zona apical y subapical de un tubo polínico.

A nivel ultraestructural, las pectinas esterificadas se localizan en el lumen de pequeñas vesículas del citoplasma del polen, así como en la intina (Fig. 4.72A). En el tubo polínico, el marcado con oro se localiza en la pared del tubo y en el citoplasma, observándose una polarización hacia el ápice (Fig. 4.72B).


Figura 4.72. Inmunolocalización a MET de pectinas esterificadas, mediante el anticuerpo JIM7. A, sección de polen maduro con marcado en el citoplasma (círculos), así como en la intina (flechas); B, corte longitudinal de la zona subapical del tubo polínico con marcado con oro a lo largo de la pared celular (flechas) y en el citoplasma (círculo).

Por otro lado, el anticuerpo JIM5 nos permitió localizar pectinas ácidas que presentan un grado bajo de esterificación con grupos metilo (31-40 %) en el grano de polen y el tubo polínico durante la germinación *in vitro*. En el polen maduro, las tres aperturas presentan fluorescencia, lo que indica la presencia de dichas pectinas (Fig. 4.73A). Cuando el polen se hidrata, se observa fluorescencia en 2 ó en las 3 aperturas (Fig. 4.73B). Una vez que el tubo

polínico emerge del grano de polen, la señal fluorescente se distribuye de manera homogénea a lo largo de la pared celular del tubo polínico, desde la apertura hasta el ápice (Fig. 4.73C, D).



Figura 4.73. Inmunolocalización a MLC de pectinas con un nivel de esterificación bajo, mediante el anticuerpo JIM5. **A**, sección óptica de un grano de polen maduro. Obsérvese la fluorescencia en las 3 aperturas (flechas); **B**, sección óptica de un grano de polen tras 1 h de germinación *in vitro*. Obsérvese que la fluorescencia se localiza en la pared del tubo polínico (flechas); **D**, reconstrucción 3D de un grano de polen tras 6 h de germinación *in vitro*.

A nivel ultraestructural, las partículas de oro aparecen localizadas dentro de vesículas que se encuentran dispersas en el citoplasma (Fig. 4.74A). También se observa marcado en la pared del grano de polen, a nivel de la zona más externa de la intina, que está en contacto con la endexina, así como en la superficie externa de la exina. En el tubo polínico, el marcado se localiza mayoritariamente en la parte más externa de la pared (Fig. 4.74B).



Figura 4.74. Inmunolocalización a MET de pectinas desesterificadas, mediante el anticuerpo JIM5. **A**, sección de polen maduro. Se observa marcado con oro en algunas vesículas del citoplasma (círculos), así como en la capa más externa de la intina, y en la exina (flechas); **B**, corte tangencial del tubo polínico a las 6 h de germinación, en el que las partículas de oro se localizan preferentemente hacia la superficie externa de la pared (flechas) y, en menor medida, en el citoplasma (círculos).

Finalmente, la localización de **AGPs** se llevó a cabo mediante los anticuerpos JIM13 y JIM14. El anticuerpo JIM13 reconoce motivos β -D-GlcpA(1-3)- α -D-GalpA-(1-2)-L-Rha en las AGPs. Estas moléculas están presentes en la cubierta externa del polen maduro, antes y después de la hidratación (Fig. 4.75A, B). Después de la germinación, la fluorescencia se extiende a lo largo de toda la pared del tubo polínico (Fig. 4.75C). En algunas secciones ópticas, se observa una doble capa de marcado en la pared (Fig. 4.75D).



Figura 4.75. Inmunolocalización de AGPs a MLC en el polen del olivo, mediante el anticuerpo JIM13. A y B, sección óptica (A) y reconstrucción 3D (B) de granos de polen hidratados. Se observa una ligera fluorescencia en la cubierta del polen; C, proyección de las secciones ópticas de un grano de polen germinado. La fluorescencia se localiza mayoritariamente en la pared del tubo polínico, y en menor medida, en la cubierta del polen; D, sección óptica de una zona de la pared del tubo polínico. Obsérvese la doble capa de marcado (flechas) en la pared del tubo.

A nivel ultraestructural, las AGPs que reconoce el anticuerpo JIM13 se localizan en la cubierta del polen, el citoplasma y, en algunos casos, asociado a vesículas del Golgi que depositan su contenido en la intina cercana a la 129 apertura (Fig. 4.76A, B). Después de la hidratación, se aprecia mayor número de partículas de oro en la intina apertural (Fig. 4.76B). Posteriormente, cuando el tubo polínico empieza a formarse, se observa un marcado importante tanto en el citoplasma como en la pared del mismo (Fig. 4.76C).



Figura 4.76. Inmunolocalización a MET de AGPs en el polen del olivo, mediante el anticuerpo JIM13. A, sección de polen maduro con partículas de oro en el citoplasma (círculos) y en la intina (flechas); B, sección de polen hidratado con partículas de oro en la intina de la apertura (flechas) y en el citoplasma (círculos). Se observan algunas vesículas marcadas con oro que se fusionan con el plasmalema y vierten su contenido hacia la intina (estrellas); C, sección de un tubo polínico, en el que se observa un intenso marcado tanto en la pared como en el citoplasma.

Por otro lado, el anticuerpo JIM14 reconoce epítopos formados por moléculas de L-arabinosa presentes en las AGPs. En los experimentos realizados, se detectó señal fluorescente a lo largo de la pared del tubo polínico, aunque dicho marcado es más evidente en la zona apical y subapical del tubo. En menor medida, también existe señal entre el retículo de la exina de la cubierta del polen (Fig. 4.77).



Figura 4.77. Inmunolocalización de AGPs a MLC en el polen del olivo, mediante el anticuerpo JIM14. A y B, proyección de la secciones ópticas (A) y reconstrucción 3D (B) de un grano de polen hidratado, que comienza a germinar. Obsérvese que la localización es discontinua y se concentra principalmente en la zona apical y subapical; C y D, proyección de la secciones ópticas (C) y reconstrucción 3D (D) de un polen germinado.

A nivel ultraestructural, las partículas de oro se observan únicamente en el citoplasma del polen maduro (Fig. 4.78A). Durante la germinación, la señal se localiza principalmente en vesículas del citoplasma del ápice y la zona subapical del tubo polínico (Fig. 4.78B).



Figura 4.78. Inmunolocalización a MET de AGPs en el polen de olivo, mediante el anticuerpo JIM 14. A, sección de polen maduro con marcado con oro (círculos) en el citoplasma. B, sección de tubo polínico de un polen germinado. Las partículas de oro se localizan en el citoplasma (círculos.

En los controles negativos en los que se omitió el anticuerpo primario correspondiente, no se observó ni señal fluorescente en los experimentos a MLC (Fig. 4.79A) salvo la autofluorescencia de la pared del grano de polen causada por la exina, ni partículas de oro en los ensayos a MET (Fig. 4.79B).



Figura 4.79. Controles negativos por omisión del anticuerpo primario, en el polen del olivo. **A**, sección óptica a MLC. La señal de color rojo es fluorescencia propia de la pared del polen; **B**, sección de un grano de polen maduro a MET, en la que se observa la ausencia de partículas de oro.



4.5. Calosa y Ole e 10 en el polen del olivo

Con objeto de determinar la presencia de calosa (polímero de 1,3- β -glucano) en el tubo polínico durante la germinación *in vitro* e *in situ*, se llevaron a cabo experimentos de citoquímica mediante la tinción con siroflúor y azul de anilina, respectivamente. En el microscopio láser confocal, la calosa da lugar a una fluorescencia azul-verdosa cuando se tiñe con azul de anilina, o de color verde intenso en el caso del siroflúor.

Por otro lado, se llevó a cabo la inmunolocalización de una proteína de unión a carbohidratos (Ole e 10), que muestra preferencia por el 1,3- β -glucano, durante la germinación *in vitro* del polen mediante un anticuerpo específico anti-Ole e 10, y se estudió la posible relación de esta molécula con la calosa presente en el tubo polínico mediante experimentos de co-localización a MLC.

4.5.1. Localización de calosa en el tubo polínico durante la germinación in vitro

Los resultados muestran que, durante la germinación in vitro del polen de olivo, la calosa se localiza a lo largo de la pared del tubo polínico, así como en los engrosamientos de la pared conocidos como tapones de calosa (Fig. 4.80A, B). El número de tapones o engrosamientos de la pared varía de 1 a 7 en la mayoría de los tubos polínicos observados, en función del tiempo de germinación. A partir del segundo tapón, los engrosamientos de calosa de la pared se producen a intervalos de distancia más o menos regulares. Ocasionalmente, en un pequeño porcentaje de tubos polínicos (<2%) aparecen acumulaciones de calosa en el ápice. Tras la monitorización continuada del crecimiento del tubo, se observó que dichos tubos polínicos cesan en su crecimiento apical al tiempo que aumenta la cantidad de calosa que se deposita en el ápice (Fig. 4.80B). A mayor aumento, se observa que la calosa se deposita en la región más interna de la pared del tubo, en la zona advacente a la membrana plasmática (Fig. 4.80C, D). Los tapones de calosa se forman por engrosamiento de la pared del tubo polínico hacia el interior. Aunque, inicialmente, el citoplasma a ambos lados del tapón se comunica a través de un canal central (Fig. 4.80C, D), una vez que finaliza su formación, dicho canal se cierra, separando la parte del tubo cercana al grano de polen del citoplasma y núcleos espermáticos de la parte distal del tubo polínico (Fig. 4.80E, F).



Figura 4.80. Localización a MLC de calosa en tubos polínicos después de 8 h de germinación *in vitro*, mediante tinción con siroflúor. **A**, proyección de secciones ópticas de granos de polen germinados, en los que se observa la presencia de tapones de calosa (flechas) y la autofluorescencia (en color rojo) de la pared del polen; **B**, sección óptica de un polen germinado. Se aprecia la presencia de un tapón de calosa (flecha) y la acumulación de calosa en el ápice (círculo); **C** y **D**, localización de un tapón de calosa en formación en el interior de un tubo polínico visto a MLC mediante un sistema óptico de Nomarsky (C) y tras la tinción con siroflúor (D). Nótese la presencia de un canal central (flecha) que comunica el citoplasma situado a ambos lados del tapón; **E** y **F**, tapón de calosa completamente formado, en el que el canal central se cierra completamente.

4.5.2. Localización de calosa en el tubo polínico durante la germinación in situ

Durante la germinación *in situ* en el pistilo, el patrón de localización de la calosa en el tubo polínico confirma los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*. Los depósitos de calosa se distribuyen a lo largo de la pared del tubo polínico y se acumulan hasta formar varios tapones o engrosamientos de la misma (Fig. 4.81). Ocasionalmente, también se ha observado una intensa fluorescencia en el ápice de los tubos, siendo este hecho más frecuente en pistilos en los que empieza a haber signos de degradación de las papilas, en las que también se detecta la fluorescencia azul verdosa específica de la calosa.



Figura 4.81. Localización a MF de calosa en aplastados de pistilos de olivo teñidos con azul de anilina. **A**, papilas de un pistilo joven sin granos de polen ni tubos polínicos, y que no presenta fluorescencia azul-verdosa característica de la calosa; **B**, tubo polínico con tapones de calosa fluorescentes (flechas) creciendo en medio de las papilas del estigma; **C**, papilas de a pistilos con síntomas de degradación, en las que se observa la fluorescencia de la calosa; **D**, sección de células papilares, en las que se observa la fluorescencia azul-verdosa característica de la calosa en las papilas.

4.5.3. Localización de Ole e 10 durante la germinación in vitro del polen

Los resultados obtenidos en los ensayos de inmunolocalización con el anticuerpo anti-Ole e 10 muestran que dicha proteína está presente en la pared del tubo polínico. La señal se visualiza como una capa de fluorescencia roja discontinua (Fig. 4.82A, B). En los ensayos de localización doble de calosa y Ole e 10, se observó que aunque ambas moléculas están presentes en la pared el tubo polínico, no coinciden en su localización dado que los depósitos de calosa aparecen en la parte más interna de la pared mientras que la proteína Ole e 10 se localiza en la parte externa de la misma (Fig. 4.82B). En cambio, existe colocalización de ambas moléculas en el citoplasma próximo al tapón de calosa. Dicha colocalización se visualiza como una fluorescencia amarillenta, resultante de combinar la fluorescencia verde de la calosa y la roja de Ole e 10.



Figura 4.82. Colocalización a MLC de Ole e 10 y calosa en tubos polínicos después de 8 h de germinación *in vitro*. **A**, sección óptica de un polen germinado. Los depósitos de calosa (TC) aparecen de color verde-amarillento; **B**, detalle de un tapón de calosa (TC). También se observa una capa de calosa fluorescente verde en la parte más interna de la pared del tubo polínico (flechas gruesas). La proteína Ole e 10 se localiza en la parte externa de la pared del tubo polínico (flechas delgadas). El color amarillento del citoplasma próximo al tampón (estrellas) muestra la colocalización de la proteína Ole e 10 y la calosa.

DISCUSIÓN

5.1. El pistilo como marcador morfológico diferencial entre cultivares de olivo

El pistilo o gineceo es el órgano reproductor femenino que juega un papel esencial en la fertilización de las plantas y en la formación del fruto y semilla. Para caracterizar la estructura del pistilo del olivo y los cambios que este experimenta a lo largo su desarrollo, el primer paso fue definir las principales etapas del desarrollo floral en las que se iban a estudiar los pistilos. Para ello se utilizaron marcadores morfológicos de la flor fáciles de observar y distinguir, como son los cambios de posición y color de los sépalos, pétalos, anteras y pistilos, así como la turgencia/dehiscencia de las anteras y la presencia de polen en el pistilo. Estos criterios nos han permitido determinar 8 etapas bien definidas por primera vez, dado que la floración como proceso biológico dentro del ciclo reproductor del olivo no había sido estudiada hasta la fecha. No obstante, la floración sí ha sido contemplada como una fase fenológica en estudios previos a éste, considerando la fenología como el estudio de los fenómenos biológicos acomodados a cierto ritmo periódico relacionados con el clima de la zona (Hodges y Doraiswamy 1979). Así, en la escala BBCH (Biologische Bundesanstal, Bundessortenamt, Chemische Industrie), aceptada oficialmente por la Organización Europea y Mediterránea de Protección Vegetal (EPPO) (Lancashire et al. 1991, Hack et al. 1992), la floración constituye el estadio fenológico 6 en el olivo y se subdivide, a su vez, en 6 etapas que se distinguen en base a parámetros tales como el color de la corola, el porcentaje de flores abiertas en el árbol o la caída de pétalos (Sanz-Cortés et al. 2002). Aunque existen algunas coincidencias entre los estadios aquí propuestos y la escala fenológica BBCH (Sanz-Cortés et al. 2002). Sin embargo estos estadios no son válidos para el presente estudio, dado que se refieren de manera general al conjunto de la inflorescencia y no a la flor en particular.

La caracterización varietal del germoplasma de olivo es esencial para preservar la diversidad genética de la especie. Tradicionalmente, la clasificación de las variedades de olivo en España se ha basado en el uso de caracteres morfológicos (ej. endocarpo, fruto, hoja, etc.) y/o agronómicos (ej. producción media, susceptibilidad a ciertas enfermedades y plagas, etc.) dado que es un método simple, de bajo coste y está basado en la observación directa de la planta (Barranco y Rallo 1984, Tous y Romero 1993, Barranco *et al.* 2005). No obstante, el análisis fenotípico presenta dos inconvenientes: 1) el uso de caracteres morfológicos cuantitativos (poligénicos) y, 2) las fluctuaciones debidas a factores tales como la edad, el estadio fenológico y sanitario de la planta, el manejo del cultivo y las condiciones ambientales. Estas limitaciones



han sido superadas recientemente mediante la utilización de marcadores bioquímicos (ej. isoenzimas) y moleculares (ej. microsatélites) en los protocolos de identificación de variedades de olivo (Ganino *et al.* 2006). No obstante, el análisis fenotípico sigue siendo una herramienta de gran utilidad en la realización de trabajos de prospección y en la catalogación de las variedades presentes en los bancos de germoplasma (Caballero *et al.* 2006).

En el transcurso de los estudios realizados en el presente trabajo, se han encontrado diferencias significativas entre las variedades analizadas (Arbequina, Loaime, Lucio y Picual) con respecto al tamaño, forma y color del pistilo. Así, Lucio se distingue por la presencia en el estigma de dos lóbulos fusionados, que aparecen claramente separados en las otras variedades. Arbequina presenta el estilo más ancho de todas las variedades analizadas, mientras que el estilo de Loime es el de mayor longitud. Finalmente, Picual se diferencia del resto porque presenta un ovario ovoide en el que el eje vertical es mayor que el eje horizontal. Hasta el momento, los órganos reproductores presentes en la flor han sido excluidos de la lista de marcadores morfológicos utilizados en la caracterización de variedades de olivo. No obstante, algunos autores han propuesto que ciertas características de la morfología del polen (ej. exina) podrían constituir una herramienta útil para la discriminación varietal, dado que la influencia ambiental sobre estos caracteres es muy baja o nula (Roselli 1979, Lanza et al. 1995). En este sentido se han encontrado diferencias específicas en el patrón de la exina de 9 cultivares italianos de olivo mediante análisis al microscopio de barrido de la pared del grano de polen (Pacini y Vosa 1979). Las características diferenciales del pistilo encontradas en las variedades que nosotros hemos estudiado, sugieren que el órgano femenino podría ser un carácter morfológico de utilidad en la identificación de variedades de olivo, complementando así la información disponible con otros marcadores clásicos. Para ello, será necesario extender el análisis morfológico del pistilo a un mayor número de variedades de olivo.

5.2. Morfología y composición del pistilo del olivo

La caracterización del pistilo durante la antesis de la antesis es un paso previo necesario para conocer los cambios que tienen lugar antes y después de la polinización, así como los factores y procesos implicados. Su organización estructural y citoquímica determina las condiciones óptimas para la germinación del polen y el crecimiento posterior del tubo polínico y es, por tanto, clave para comprender la interacción polen-pistilo y la fertilización en el olivo. El pistilo de olivo cv. Picual, está formado por un estigma bilobulado de tipo húmedo, un estilo sólido simple y un ovario compuesto por la fusión de dos carpelos que albergan 4 óvulos, dos en cada lóbulo. Estos caracteres coinciden con los descritos previamente para otros cultivares de olivo (King 1938, Cresti *et al.* 1978, Ciampolini 1983, Rapoport 2005) y otras especies de la familia Oleaceae como *Syringa vulgaris, Jasminum* y *Franxinus* (Wastson y Dallwitz 1992, Jedrzejuk y Szlachetka 2005). No obstante, en el estigma de la variedad Picual, las papilas muestran claramente una estructura multicelular, en contraste con las papilas presentes en el cultivar Corregiolo, que son de tipo unicelular (Ciampolini *et al.* 1983).

Nuestros resultados histoquímicos han permitido detectar la presencia de carbohidratos y lípidos y hacer un seguimiento de sus niveles durante el desarrollo del pistilo. Los carbohidratos son importante fuente de nutrientes y de energía en los organismos vivos. Los componentes estructurales de la célula como son las paredes celulares están compuestos principalmente de carbohidratos. Durante el crecimiento y desarrollo de la planta, los fotoasimilados producidos por los cloroplastos en la hoja son transportados hacia diferentes órganos de la planta para su utilización o almacenaje. Evidencias recientes muestran que los carbohidratos son capaces de modular la expresión génica, lo que indica su implicación en funciones más complejas del desarrollo y crecimiento de la planta, además de las funciones estructurales y nutritivas (Van Oesten y Besford 1994, Rook et al. 2006). Durante el proceso de floración en orquídeas se ha demostrado un ciclo de movilización de carbohidratos (Wang et al. 2008). La tinción con PAS da positiva en el floema de los vasos conductores del pistilo del olivo, lo que sugiere un transporte de carbohidratos solubles desde los órganos fotosintéticos de la planta hasta el órgano femenino para su desarrollo y formación de estructuras. El exceso de carbohidratos, que inicialmente no necesita el órgano femenino de la flor como fuente de energía, se almacena como almidón, para su posterior utilización como fuente nutritiva. Hay que destacar la localización preferente del almidón, que se acumula en las proximidades de los vasos conductores que recorren el pistilo. Este hecho indica el posible origen del almidón en el pistilo a partir de los azucares solubles transportados a través de los vasos conductores desde otros órganos fotosintéticos de la planta.

El floema es responsable para el transporte a largas distancias de asimilados hacia órganos no fotosintéticos de la planta. La savia del floema además de azucares, micronutrientes, amino ácidos, ácidos inorgánicos, sustancias reguladoras del crecimiento, moléculas de señalización, mRNAs y proteínas (Fisher *et al.* 1992, Marentes y Grusak 1998), también puede contener complejo lipídicos y altas concentraciones de ácidos grasos de cadena media (Madey *et al.* 2001). La intensa reacción positiva al Sudan Black que se detecta en el floema de todos los haces del pistilo del olivo, con excepción de los vasos de la placenta y de los que se encuentran dentro de los dos lóculos en el ovario, confirma este transporte de larga distancia de lípidos hacia la parte cortical del pistilo.

5.3. Receptividad y periodo de polinización efectiva en el olivo

Cuando tiene lugar la polinización durante la antesis, el pistilo está completamente desarrollado y preparado para que el polen que llega al estigma por el viento, se hidrate y germine el tubo polínico. Esto significa que el estigma ha alcanzado su plena madurez con el completo desarrollo de las papilas estigmáticas y la secreción del exudado, lo que indica que es receptivo. La receptividad del estigma se refiere a su capacidad para permitir la germinación de granos de pólenes viables y compatibles

La presencia de exudado en el estigma al inicio de la antesis es un indicador de receptividad por parte del pistilo (Uwate y Lin 1981, Knox 1984, Herrero y Arbeloa 1989). Sin embargo, la sola presencia de exudado no es por sí sólo una garantía de receptividad, puesto que el inicio y cese de la receptividad estigmática es un proceso controlado (González *et al.* 1995).

En el estigma del olivo, las tinciones de PAS y Sudan Black confirman la heterogeneidad de la composición de la matriz extracelular de la superficie receptiva del estigma observada en otras especies, que incluye carbohidratos, lípidos y proteínas (Bell y Hicks 1976, Sedley 1979, Matsuzaki *et al.* 1983, Heslop-Harrison y Heslop-Harrison 1985, Cresti *et al.* 1988). Algunas de las proteínas podrían corresponder a esterasas y fosfatasas no específicas (Heslop-Harrison y Shivana 1977, Ghosh y Shivanna 1984). Según nuestros resultados, esta composición del exudado puede variar a lo largo de la antesis, lo que le puede conferir distinto grado de receptividad al estigma según sea la etapa de apertura de la flor. De acuerdo con Herrero (1992), la superficie receptiva del estigma participa en procesos de reconocimiento e hidratación más que en el aporte de nutrientes a los tubos polínicos, debido a que en esta fase los tubos todavía crecen autotróficamente gracias a las propias reservas del grano de polen. Este es el caso del polen maduro del olivo, el cual tiene una elevada

cantidad de lípidos de reserva, que van disminuyendo durante la germinación *in vitro* del polen (Rodríguez-García *et al.* 2003).

Es conocido que los pólenes bicelulares, presentes en la mayoría de las dicotiledóneas, tienen una elevada cantidad de reservas (almidón y/o lípidos) (Dafni y Firmage 2000), son de vida larga ya que resisten bien la deshidratación, y germinan con facilidad *in vitro* (Heslop-Harrison y Shivana 1977, Buitink *et al.* 2000). Por el contrario, los pólenes tricelulares casi no tienen reservas, cuando se liberan de la antera el grado de hidratación es alto (Buitink 2000), su vida media es corta y germinan con dificultad *in vitro* (Heslop-Harrison y Shivana 1977). Todas estas características parecen estar relacionadas con el tipo de estigmas donde germinan de modo que, generalmente, los pólenes bicelulares están asociados con estigmas húmedos (Heslop-Harrison y Shivana 1977, Sedley 1979). Esto es lo que ocurre en el olivo, cuyo polen es bicelular (Rodríguez García *et al.* 1995), de vida larga ya que se conservan bien a bajas temperaturas, y germinan con facilidad *in vitro* y además comprobamos que el estigma es de tipo húmedo.

A lo largo del desarrollo del pistilo, antes y después de la polinización, se observan cambios en la cantidad, estructura, y composición del exudado del estigma. Una mayor cantidad de exudado se detecta durante la antesis, y ocurre cuando hay mayor cantidad de granos de polen depositados en la superficie del estigma, inmersos en el exudado e iniciando la germinación del tubo. De estos resultados, se deduce que este es el momento de una mayor receptividad del estigma. Las papilas del olivo en el periodo de máxima receptividad están bien conservadas y no se lisan para que salga el exudado a la superficie como había sido anteriormente descrito en otras especies (Herrero y Dickinson 1979, Edlund *et al.* 2004), por lo que la secreción del exudado en el olivo es de tipo granulocrino, y se produce a través del plasmalema y la pared de la papila.

Cuando las anteras empiezan a presentar signos de envejecimiento (color marrón, pérdida de turgencia, bajada y caída de los pétalos), el exudado sigue siendo abundante, pero cambia el aspecto de su matriz, que es más vesicular, y la mayoría de pólenes encontrados están colapsados o vacíos, síntomas de que han perdido la capacidad de hidratarse y no pueden germinar. Esta imposibilidad de hidratación puede es debida al polen, a un cambio en la composición del exudado, o a ambos factores. En cualquier caso, se puede decir que el estigma ha dejado de ser receptivo. El cese de la receptividad estigmática



esta asociada con el inicio de la degeneración de las papilas (González *et al.* 1995).

La receptividad óptima es variable en las diferentes especies y puede ir desde unas pocas horas una vez que las flores se abren, como es el caso de la teca (Tangmitcharoen y Owens 1997), hasta unos pocos días después de la antesis como ocurre en el roble (Kalinganire *et al.* 2000). El estudio del desarrollo del pistilo nos ha permitido definir el tiempo de receptividad del estigma en el olivo, que comienza cuando las anteras se hacen visibles debido a la apertura de los pétalos y termina cuando las anteras comienzan a marchitarse. En el olivo, la receptividad parece ser óptima cuando las flores están completamente abiertas con las anteras turgentes y hasta después de la dehiscencia de las anteras. Se ha observado que una flor se abre por la mañana temprano y al atardecer ya ha terminado la dehiscencia de la antera, por lo que la receptividad del estigma en el olivo del cv. Picual no debe durar mucho más de 1 día, aunque puede variar entre 24 y 36 horas dependiendo del cultivar.

El concepto de periodo de polinización efectiva (EPP) fue introducido inicialmente por Williams (1965) y posteriormente revisado por Sanzol y Herrero (2001), siendo definido como el periodo durante el cual la polinización es efectiva para producir el fruto. Este periodo es determinado por la longevidad del óvulo menos el tiempo que transcurre entre polinización y fertilización, siendo este uno de los factores más importantes a tener en cuenta para el éxito de la fertilización. En el olivo, se ha determinado el EPP en base a la aparente relación existente entre la producción anual de frutos y la emisión diaria de polen a la atmósfera, contabilizada mediante estudios aerobiológicos a lo largo de 20 años. Para los cultivares italianos en que se ha realizado este estudio (Leccino, Frantoio y Dolce Agogia), se ha determinado un periodo de 4 días efectivos para la polinización (Orlandi et al. 2005). El problema de este trabajo es que no se tiene en cuenta los 3 parámetros importantes del proceso reproductivo: la receptividad del estigma, la cinética del tubo polínico y la longevidad del óvulo (Sanzol y Herrero 2001). En nuestra opinión, la metodología utilizada en este estudio no es la adecuada para determinar el EPP. Como ya se ha mencionado previamente, las diferentes etapas del proceso reproductivo del olivo no han sido estudiadas hasta la fecha, en particular la fase progámica.

Los detalles sobre la receptividad estigmática han sido estudiados en un limitado número de especies (Shivanna 2003, Yi *et al.* 2006). Aunque en el olivo hay algunos estudios sobre el óvulo y saco embrionario (Rallo *et al.* 1981),

esta es la primera contribución sobre el desarrollo y receptividad del estigma en esta especie. El hecho de que las anteras puedan estar todavía turgentes e intactas cuando la flor está completamente abierta, implica que el estigma en el olivo es receptivo antes de que se produzca la dehiscencia de las anteras de la misma flor. Este desfase entre el inicio de la receptividad del estigma con respecto a la dehiscencia de las anteras de la misma flor favorece la polinización cruzada (alogamia). Sin embargo, el hecho de que la floración en el olivo muestre una clara asincronía hace posible la existencia de la polinización entre diferentes flores de un mismo árbol o de otros árboles del mismo clon (singamia). Además, el periodo de receptividad del estigma es lo suficientemente largo como para que, eventualmente, también pueda ocurrir una autopolinización dentro de la misma flor (autogamia), lo que no implica que ésta llegue a buen término. En resumen, tanto los la posición y morfología de las anteras y el pistilo que presenta la flor del olivo, así como la duración de la receptividad del estigma y la asincronía de la floración, hacen posible la existencia de polinización cruzada y de autopolinización en el olivo. Sin embargo es evidente que la polinización cruzada comienza antes que la autopolinación y las probabilidades de éxito son más elevadas en el primer caso. En el cultivar Nabali Baladi, que es el más común en el olivar de Jordania, se ha visto que el porcentaje de óvulos fertilizados en flores con polinización cruzada es tres veces mayor que aquellas que han sido autopolinizadas (Ateyyeh *et al.* 2000)

de la superficie papilar se El exudado tiñe con azul de metileno/toluidina de forma similar al material acumulado en los espacios intercelulares de las células no glandulares de la base del estigma. También el exudado y la matriz extracelular se tiñen al positivamente con PAS, lo mismo que lo hacen el resto de las paredes celulares. En cambio, con la tinción de Sudan Black para lípidos, sólo se tiñe el exudado, las papilas epidérmicas y la matriz extracelular secretada por las células glandulares, mientras que en la base del estigma da tinción negativa, indicando una localización diferencial del material lipídico en el estigma.

El componente lipídico en el exudado está presente desde que se abre la flor y comienza la actividad secretora de las células glandulares y papilas. Este hecho también se ha observado en estudios de otras especies con estigmas de tipo húmedo como *Avocado, Nicotiana* y *Citrus* (Bell y Hicks 1976, Sedley 1979, Matsuzaki *et al.* 1983, Cresti *et al.* 1988). Previamente ya se había postulado que los lípidos, especialmente los triglicéridos cis-insaturados, son componentes esenciales de la secreción estigmática para la inducción, germinación y crecimiento del tubo polínico en el estigma y la entrada en el tejido transmisor (Wolters-Ars et al. 1998, 2002). Además, a los lípidos se les ha atribuido un papel adicional en la orientación del tubo polínico controlando el gradiente del potencial hídrico hacia el ovario (Lush et al. 2000). También los lípidos presentes en la cubierta del polen (pollen coat) parecen tener un papel activo en facilitar la hidratación (Elleman y Dickinson 1986, Murphy 2006). Los lípidos y el material proteico de la pared del polen han sido implicados preferentemente con fenómenos de adhesión e hidratación en estigmas secos como es el caso de Brassica y Arabidopsis (Hiscock y Allen 2008). Sin embargo, en el caso del olivo los resultados sugieren que la cubierta del polen podría tener un papel importante en estos fenómenos, ya que es notable la cantidad de material lipídico (pollenkit) y proteínas (trifinas) presentes en la misma (Fernández y Rodríguez-García 1988). Es evidente que en esta primera etapa de la fase progámica que tiene lugar en el estigma, tanto los lípidos del exudado como los de la exina del polen deben tener un papel relevante en la adhesión, hidratación y germinación del grano de polen del olivo.

La estructura del estigma en el olivo se completa con las células glandulares subpapilares y una región basal en forma de embudo de células internas no glandulares, que unen las células glandulares con el tejido transmisor. Hay que destacar la continuidad y similitud de caracteres morfológicos e histoquímicos entre las células que forman el embudo en el estigma y el tejido transmisor del estilo, que determinan el camino por el que los tubos polínicos pasan hasta llegar al ovario. La forma de embudo es propia de estigmas de tipo húmedo y estilos sólidos como ocurre en Nicotiana, Petunia, Eucaliptus y Santalum (Bell y Hicks 1976, Mattews et al. 1999). Además esta estructura cónica con estrechamiento hacia la base, favorece la frecuencia de tubos polínicos que se observan en el estigma, mientras que su presencia disminuye a medida que se acercan al estilo. Estas observaciones han sido descritas para especies que presentan incompatibilidad de tipo gametofítico, en las que el polen germina y se desarrolla a través del estigma, donde se para el crecimiento de los tubos y sólo pasan al estilo aquellos que son compatibles (Franklin-Tong et al. 1994). Se ha sugerido que las especies que presentan incompatibilidad gametofítica tienen polen bicelular, estigma húmedo y estilo sólido o cerrado. Todas estas características las tiene el olivo, lo que sugiere la existencia de un sistema de autoincompatibilidad gametofítica en esta especie, que previamente ya había sido atribuida a diferentes cultivares del olivo (Cuevas y Polito 1997, Ateyyeh et al. 2000).

Ĵ

En el olivo, el número el número de tubos encontrados en el estilo es muy reducido y finalmente son dos los tubos que llegan hasta final del estilo, de los que, en general, sólo uno penetra en el óvulo y pasa por el micropilo para llevar a cabo la doble fertilización de la ovocélula y de los dos núcleos centrales que se encuentran dentro del saco embrionario (Cuevas 1994).

5.4. El estilo y el ovario del olivo durante la fase progámica

En el estilo del olivo, el tejido transmisor es semejante al descrito en el tomate (Kadej et al. 1985), en el que la columna central es de mayor diámetro en la parte superior del estilo y gradualmente se va estrechando hacia el ovario. Se ha postulado que la arquitectura del estigma y del tejido transmisor del estilo puede determinar en parte el número de tubos que llegan al óvulo (Heslop-Harrison et al. 1985, Matthews et al. 1999). En el olivo, la forma de embudo de la zona basal del estigma así como el estrechamiento del tejido transmisor en dirección del ovario, junto con los escasos tubos encontrados en el estilo son consistentes con esta hipótesis. A lo largo de este estudio se ha encontrado un elevado número pólenes germinados y de tubos polínicos a través del estigma, mientras que en el estilo sólo eventualmente y con suerte ha sido posible visualizar algún tubo. Cuevas et al. (1995) ya habían observado que sólo un tubo polínico (o unos pocos) pasa la base del estilo y penetran en la parte superior del ovario. En estos casos, el tubo polínico pasa a través de la matriz extracelular del tejido transmisor del estilo (Sanders y Lord 1989) y esto se confirma en el olivo.

El ovario es la parte más compleja del pistilo, ya que en el se encuentran los tejidos esporofíticos, que protegen a las células gametofíticas femeninas y es donde tiene lugar fertilización que va a originar la semilla y el fruto. Por esta razón el éxito reproductivo ha sido asociado al ovario (Yates y Sparks 1994), siendo objeto de numerosos estudios. En el caso del olivo, también ha sido la parte más estudiada del pistilo (Rallo *et al.* 1981, Rapopport 2006, Rapopport y Rallo 1999, Ateyyed *et al.* 2000). Se sabe que la doble fertilización es un proceso muy conservado y en el olivo se sigue el patrón característico para todas las Angiospermas. Los tubos polínicos crecen a través de la superficie de la placenta, rica en secreciones, y penetran en el ovario (Sage *et al.* 1994). En algunas especies, se ha observado que el paso del tubo polínico desde el estilo al ovario, parece ser facilitado por una protuberancia de la placenta situada a la entrada del ovario, que conecta la base del estilo con el exostoma micropilar, y que se conoce como obturador (Tilton y Horner 1980, Milton *et al.* 1984) Esta estructura también ha sido observada en el melocotonero, en el que la conexión es temporal, ya que el tubo polínico sólo puede crecer a través del obturador cuando este presenta una secreción (Arbeloa y Herrero 1987). Otras estructuras han sido descritas en diferentes especies con una función similar en la regulación del paso de los tubos polínicos desde el estilo al ovario. En Zea mays se han encontrado unos pelos papilares en la base del estilo que previenen el paso de otros tubos polínicos una vez que la fertilización ha tenido lugar (Heslop-Harrison et al. 1985). En el pistachero (Pistacia vera) es una protuberancia denominada pontículo, y que se desarrolla en la parte superior del funículo entre el estilo y el óvulo, la encargada de controlar temporalmente el acceso del tubo polínico al óvulo (Martínez-Pallé y Herrero 1995). En el caso del olivo, no se ha observado ninguna estructura entre el estilo y ovario que regule el paso de los tubos polínicos. El tejido transmisor del estilo penetra en el ovario y termina en los lóculos del mismo, diferenciándose por la distinta morfología celular de los tejidos, pero sin observarse ninguna discontinuidad entre ellos. Esta falta de estructuras que regulen el paso de los tubos al ovario puede ser debido a que realmente son muy pocos los tubos que llegan al ovario (es muy difícil poder visualizarlos debido a su escaso número) y no es necesario este tipo de control. Otra razón puede ser que el ovario ya esta preparado para la fertilización cuando comienza la antesis y, por eso, tampoco hay que regular temporalmente la llegada de los tubos a los óvulos.

Una vez que el tubo polínico llega al óvulo este sigue creciendo a través del micropilo hasta llegar al saco embrionario. Se ha descrito que el micropilo es rico en secreción (Franssen-Verheijen y Willemse 1993). En el olivo, el contenido del micropilo da positivo a la tinción de PAS, lo que indica la presencia de carbohidratos solubles que podrían facilitar el paso del tubo polínico hacia el saco embrionario. La presencia de carbohidratos en el micropilo ha sido anteriormente detectada en otras especies (Chao 1977).

Hasta la fecha, no se conoce bien el papel que desempeñan las diferentes células del saco embrionario, pero se ha postulado que una vez que los tubos polínicos ya se encuentran dentro del ovario, estas células están implicadas en la emisión de señales que atraen a los tubos hacia el saco embrionario. Además, parece ser que la interacción entre los gametos masculinos y femeninos es decisiva durante el proceso de la doble fertilización, y conduce a un reconocimiento específico y preferencial de las células fertilizadas (Russell 1993, Dumas y Mogensen 1993). Un gradiente diferencial de Ca²⁺ también parece jugar un papel importante en la atracción de los tubos por el saco embrionario (Weterings y Russell 2004). El saco embrionario del olivo ha sido bien estudiado y se han definido los estadios de desarrollo del mismo (Extremera et al. 1988). Sin embargo, se desconoce por qué sólo se fecunda uno ó dos de los cuatro óvulos presentes en el ovario (Rapapport 2006). Se ha postulado que podría ser debido a que los pocos tubos que logran atravesar el estigma y llegar al estilo también inhiben su crecimiento antes de alcanzar el lóculo y sólo uno de ellos entra en el saco embrionario y consigue la doble fertilización con éxito (Bradley & Griggs 1963). Otra posibilidad es que el desarrollo de los sacos embrionarios no sea completo y, por tanto, los óvulos cuyos sacos embrionarios no han completado su formación no pueden ser fertilizados (Rallo et al. 1981, Extremera 1985). Parece ser que el saco embrionario juega un papel en atraer al tubo polínico, ya que se ha visto que los óvulos de mutantes de Arabidopsis que no tienen el saco embrionario formado no son capaces de atraer y guiar a los tubos polínicos hacia ellos (Hülskamp et al. 1995). Podría ocurrir que un desarrollo incompleto de los sacos embrionarios en el olivo se refleje en una incapacidad de los óvulos para atraer a los tubos. Otra posibilidad sería que los 4 óvulos se desarrollen completamente, pero al no llegar a ellos los tubos polínicos no tiene lugar la doble fertilización y, finalmente, abortan. Según nuestras observaciones, en el olivo, el tejido transmisor proveniente del estilo al llegar al ovario se distribuye de manera no uniforme entre los dos lóculos, es decir que uno de los lóculos aparentemente presenta una mayor cantidad de tejido transmisor Este hecho podría favorecer la llegada de los tubos polínicos hacia el lóculo que tiene más tejido transmisor y que sean estos óvulos (1 ó 2) los que logran la fertilización efectiva y formen la semilla con el embrión. Esto explicaría por qué nunca se llegan a fertilizar más de dos óvulos.

El inicio de deterioro del estigma y la caída de los pétalos son indicios de que ha terminado la etapa de polinización, pero no necesariamente de que ha tenido lugar el proceso de fertilización. La degradación y muerte celular del estigma y estilo ocurre como una etapa final del desarrollo del pistilo, con o sin fertilización. Es el rápido incremento del volumen del ovario el marcador más efectivo para conocer que la fertilización ha tenido éxito (Yates y Sparks 1994). A nivel histológico se puede detectar el paso de la etapa de post-polinización a post-fertilización gracias a la presencia de esclereidas en la endodermis, las cuales se hacen progresivamente más numerosas a medida que se incrementa la superficie del ovario. En caso de que no tenga lugar la fertilización, se detiene el crecimiento del ovario antes de la caída de la flor (Rapopport y Rallo 1991). Nuestras observaciones confirman que los ovarios no fecundados (en un número considerable de pistilos) no sobrepasan el cáliz, mientras que los que si lo han logrado comienzan un crecimiento progresivo de su mesodermis, así como de sus óvulos.



Es evidente que el almidón juega un papel importante en los procesos reproductivos de las plantas (Herrero 1992, Herrero y Hormaza 1996). Su presencia es una constante en la flor (Yu *et al.* 2000, Lebon *et al.* 2004, 2008), la antera (Clément *et al.* 1996, Clemente y Pacini 2001, Castro *et al.* 2007), el grano de polen (Pacini y Viegi 1995, Speranza *et al.* 1997, Pacini *et al.* 2006) y el pistilo tanto de plantas herbáceas (Herrero y Dickinson 1979, Kanahama y Saito 1988, Wang *et al.* 1993, Zinselmeier *et al.* 1995, Aloni *et al.* 1996), como arbóreas (Sedgley 1979, Felker *et al.* 1983, Arbolea y Herrero 1991, Fromm *et al.* 1995, Martínez-Palle y Herrero 1995, González *et al.* 1996, Rodrigo y Herrero 1998, Rodrigo *et al.* 2000).

La presencia de almidón en los 3 órganos que conforman el pistilo del olivo (estigma, estilo y ovario), así como el patrón de comportamiento que presenta a lo largo de su desarrollo, confirma la función nutritiva del mismo durante la fase progámica (Herrero y Dickinson 1979, Herrero y Hormaza 1996, Herrero 2000). Sin embargo, no hay que olvidar que en el olivo, el almidón también se ha encontrado en el estigma de pistilos jóvenes de botones florales blancos, cuando estos aún no han alcanzado su pleno desarrollo. El polen que llega al estigma es autótrofo puesto que tiene sus propias reservas y no necesita del estigma para nutrirse e iniciar la germinación del tubo (Herrero 1992). Esto significa que, el almidón de las papilas jóvenes, debe ser inicialmente metabolizado para el desarrollo propio para formar parte de los componentes azucarados de la matriz extracelular y, más tarde, del exudado. Así, cuando comienza la apertura de la flor, la presencia de almidón en las papilas es mínima, pero sí que se encuentra en las células glandulares más internas del estigma. La matriz extracelular de estas células también se tiñe con PAS, pero no lo hace inicialmente el exudado externo de las papilas. En plena polinización, la cantidad de exudado papilar es muy abundante y se tiñe con PAS de color rosa intenso, lo que indica un notable incremento de azucares en el mismo, mientras que el almidón llega a desaparecer de las células secretoras del estigma. Es probable que los azucares solubles procedentes de la hidrólisis del almidón pasen a formar parte del exudado estigmático. En otros estudios en diferentes especies con estigmas húmedos también se ha observado cómo el almidón va desapareciendo de las papilas estigmáticas a medida que aumenta la secreción estigmática (Herrero y Arbeloa 1989, Rodrigo y Herrero 2002). La diferente respuesta que tiene el exudado con la tinción de PAS, en función del

estadio, confirma que hay cambios en el contenido de carbohidratos en el exudado a lo largo de la antesis

La cuantificación del almidón durante el desarrollo del pistilo nos lleva a postular que: a) el estigma es donde antes se alcanza la máxima cantidad de almidón (antes de la polinización) y donde antes se metaboliza, por lo que se puede sugerir que su función debe estar relacionada con la secreción del exudado, y sus azucares pasan a formar parte del medio donde el polen una vez que aterriza en el estigma, se adhiere, se hidrata y germina. Como estas son las primeras etapas de la fase progámica, también es donde antes deja de tener un papel que requiera su presencia; b) en el estilo y el ovario, la máxima cantidad de almidón tiene lugar durante la polinización y luego el descenso es muy rápido, lo que implica que el tiempo que tarda el tubo polínico en llegar desde las papilas estigmáticas al estilo y ovario debe ser muy corto, y c) la mayor cantidad de almidón se detecta en el estigma del botón floral blanco, en el estilo de la flor con anteras dehiscentes y en el ovario con los pétalos caídos. Estos hechos reflejan que parte del pistilo tiene un mayor protagonismo y desarrolla una mayor actividad en las diferentes etapas de la fase progámica.

Finalmente, la caída temprana de flores y frutos en diferentes especies ha sido atribuida a una deficiencia en las reservas de carbohidratos (Sholefield *et al.* 1985, Buchholz 1986, Davie *et al.* 1995). También se ve afectado el desarrollo inicial de las flores en el albaricoquero por la falta de reservas de almidón en el pistilo (Rodrigo *et al.* 2000). No hay duda de que la reserva de carbohidratos está estrechamente relacionada con el éxito de la fertilización y el cuajado del fruto (Herrero 1992, Herrero y Hormaza 1996, Jean y Lapointe 2001). El estado nutritivo de la planta en su conjunto, con especial incidencia en la reserva de carbohidratos, es el que repercute en el éxito final del proceso reproductivo, mientras que la compartimentación en las diferentes partes del pistilo de las reservas de almidón en el momento oportuno es lo que posibilita que la cadena de los distintos pasos a lo largo de la fase progámica no se interrumpa y llegue a buen término la fertilización.

5.6. Los tejidos del pistilo en el olivo presentan inclusiones vacuolares y nucleares

Las observaciones al MO y MET mostraron la presencia de unas características comunes en los diferentes tejidos del pistilo en el olivo, como son la presencia de cristales en las vacuolas de la epidermis y el parénquima, e inclusiones proteicas nucleares en la mayoría de las células observadas.

Los cristales de las vacuolas se encontraron más frecuentemente en la epidermis y parénquima del estilo y del ovario. Son de forma más o menos alargada y rectangular y cuando están presentes son muy electrodensos, aunque habitualmente lo que se visualiza son las siluetas transparentes a los electrones, donde estarían ubicados los cristales electrodensos, debido a que al obtener los cortes de las muestras las inclusiones vacuolares saltan y se pierden. La impresión inicial al observar las muestras es que los cortes están sucios o contaminados debido al elevado número de estos cristales negros que rebotan de la vacuola a otros lugares de la célula o del tejido. Sólo después de repetidas observaciones, se llegó a la conclusión de que dicha contaminación se debía al material electrodenso procedente de los cristales presentes en las vacuolas. Previamente, estas inclusiones vacuolares ya habían sido observadas en estudios sobre las hojas de olivo, y mediante una combinación de métodos citoquímicos y técnicas de difracción y de microanálisis de rayos-X se habían identificado como oxalato de calcio (Alché y Rodríguez-García 1989). Los cristales de oxalato cálcico han sido ampliamente documentados en un gran número de especies, incluyendo Gimnospermas y hongos (Franceschi y Horner 1980). Se han encontrado cristales de oxalato cálcico en raíces de Yucca (Horner et al. 2000), los cuales muestran una estructura y una ubicación semejante a los encontrados en el pistilo de olivo; es decir, libres dentro de las vacuolas. A semejanza de los datos que aporta nuestro estudio, los cristales se hacen menos elongados y más cuadrados a medida que avanza su desarrollo. En los nectarios de Nicotiana tabacum, también han sido descriptos cristales de oxalato que están presentes antes y durante la antesis (Horner et al. 2007). Al igual que ocurre en el olivo, los cristales van disminuyendo en tamaño y cantidad después de la polinización, en paralelo a la disminución de los gránulos de almidón en dichas células. En estudios previos, se ha estudiado la ruta bioquímica del oxalato, donde sus precursores serían el almidón, la glucosa y finalmente el ascorbato (Smirnof et al. 2000). Este hecho sugiere que el exceso de almidón almacenado en la zona cortical del pistilo es utilizado como precursor de los cristales de oxalato.

La función del oxalato cálcico en plantas no está clara, aunque son varias las teorías propuestas. Una de las funciones podría ser para eliminar el exceso de oxalato y de este modo mantener el equilibrio iónico. Otra posibilidad sería la de de almacenar el exceso de calcio, o simplemente sólo como sostén estructural (Franceschi y Horner 1980, Horner y Zindler-Frank 1982). Es evidente que se necesitan más estudios acerca de la evolución de estos cristales en relación con los cambios metabólicos de la planta, que aporten más datos a favor de alguna/s de estas hipótesis, las cuales no son excluyentes. En este sentido, el hecho de que el cultivo del olivo suele desarrollarse en suelos calizos nos hace pensar que la presencia de tan elevada cantidad de cristales pueda ser una forma de almacenar el exceso de calcio, para cuando la planta lo necesite a lo largo de su desarrollo. La disminución de cristales en las vacuolas en pistilos menos jóvenes (después de la polinización), también apoya esta hipótesis.

Por otro lado, se ha observado la presencia de inclusiones nucleares muy densas a los electrones, de forma irregular y que por su localización en el núcleo de las células del pistilo podrían confundirse con aglomeraciones de cromatina condensada. Este tipo de inclusiones nucleares también habían sido observadas en pistilos de otros cultivares como Corregiolo (Ciampolini et al. 1983), y en las células de otros órganos de olivo del cultivar "Picual", como anteras, mesocarpo del fruto, semillas, embriones y raíz (datos no publicados, Rodríguez-García et al.). La naturaleza proteica y cristaloide de estas inclusiones ha sido previamente identificada (Alché y Rodríguez-García, 1988, 1989, Alché 1991). Inclusiones nucleares semejantes a las encontradas en olivo han sido ampliamente descritas en diferentes especies de angiospermas (Weintraub et al. 1971, Bigazzi 1989) pero, sin embargo, su origen y función sigue siendo desconocido. En base a las referencias encontradas sobre la presencia de inclusiones nucleares en diferentes especies y tejidos, lo único que se puede concluir es que estas inclusiones proteicas no están directamente relacionadas con los tejidos del pistilo, ni tampoco son exclusivas del olivo.

5.7. Implicaciones de las pectinas y AGPs en la reproducción del olivo

El desarrollo del estigma húmedo del olivo conlleva un aumento de secreción en la superficie de las papilas y de la matriz extracelular. En el estilo las células del tejido transmisor también tienen una actividad secretora que se refleja en un citoplasma rico en ribosomas y organelas. Las paredes celulares son más gruesas que las de las células corticales vecinas y la lámina media se disuelve para pasar a estar ocupada por la matriz extracelular. Todos estos cambios estructurales implican unos cambios en el contenido de pectinas y AGPs en el pistilo. Por este motivo se comenzó este estudio con el aislamiento, caracterización bioquímica y análisis de expresión y localización de estas macromoléculas.



Los análisis bioquímicos realizados en este trabajo muestran: 1) una ligera disminución de pectinas neutras ricas en galactosa, y un incremento de pectinas con alto contenido en arabinosa durante la polinización, 2) la aparición de pectinas ácidas esterificadas durante la polinización, 3) un incremento de AGPS durante la polinización. Estos datos sugieren que las pectinas neutras ricas en arabinosa y las AGPs tienen funciones relevantes en las interacciones polen-pistilo.

Las distintas clases de pectinas encontradas en el pistilo del olivo presentan diferentes patrones de distribución dependiendo de su función. Algunas pectinas se localizan mayoritariamente en los tejidos corticales del pistilo por lo que podrían tener una función estructural, mientras que otras se ubican preferentemente en el exudado, el tejido secretor del estigma, el tejido transmisor del estilo y en los óvulos, por lo que podrían estar implicadas en el reconocimiento del polen y su interacción con el pistilo. Hasta la fecha son escasos los estudios realizados sobre pectinas en pistilos de otras especies (Coimbra *et al.* 2003, Lenartowska *et al.* 2001, Wisniewska y Majewska-Sawka 2006).

En las paredes celulares de las zonas corticales del pistilo del olivo se han encontrado tres de los cuatro tipos de pectinas estudiadas: pectinas neutras ricas en residuos de galactosa, pectinas neutras con un elevado contenido en arabinosa arabinosa y pectinas con alto grado de esterificación. Por el contrario, las pectinas neutras con residuos de arabinosa y AGPs se localizan predominantemente en los tejidos secretores del pistilo. Esta localización diferencial entre tejidos secretores y no secretores también ha sido descrita en *Petunia* (Lenartowska *et al.* 2001), así como en órganos florales de *Lolium* (Wisniewska y Majewska-Sawka 2006).

Las diferencias encontradas en la composición de las paredes celulares estarían en estrecha relación con la función de los tejidos. Las pectinas neutras con residuos de galactosa reconocidas con el anticuerpo LM5 (Jones *et al.* 1997) se localizan de forma heterogénea en la zona cortical del estilo. La presencia de pectinas ricas en residuos de galactosa se ha asociado a menudo a paredes flexibles, permitiendo su elongación (Brickell y Grant Reid 1996, Willats *et al.* 1999 Baluska *et al.* 2002, Yu *et al.* 2003). La presencia de este tipo de pectinas facilitaría la elongación que experimenta el estilo del olivo durante su

desarrollo. Las pectinas neutras con residuos de arabinosa, reconocidas por el anticuerpo LM6, aunque en menor cantidad, también se han encontrado en el pistilo de olivo asociadas a las zonas parenquimáticas y con una mayor intensidad en la epidermis. Este patrón de localización también ha sido observado en semillas (Sutherland *et al.* 2004). Las paredes del pistilo del olivo también contienen pectinas con alto grado de metil-esterificación, que fueron detectadas a lo largo del desarrollo, y siempre asociadas a las paredes celulares del tejido parenquimático y epidérmico, mientras que no se localizaron en la zona glandular del estigma, ni en el tejido transmisor del estilo. Todas estas pectinas de las paredes del pistilo parecen cumplir una función de firmeza estructural, donde un cambio en la matriz de pectinas produce cambios en las propiedades estructurales de las paredes (Mc Cann y Roberts 1994).

Por otro lado, las pectinas neutras con residuos de arabinosa y las AGPs se han localizado mayoritariamente en el exudado, en las células glandulares del estigma y en el tejido transmisor en el olivo. Debido a que estos son los tejidos por donde pasan los tubos polínicos abriéndose camino entre la matriz extracelular de células vecinas, podrían estar implicadas en la adhesión y reconocimiento polen-pistilo. No es sorprendente que macromoléculas como las pectinas puedan estar implicadas en la adhesión (Willats et al. 1998) puesto que han sido frecuentemente localizadas en la lámina media en las raíces, lugar por donde las células se adhieren entre sí (Guillemin et al. 2005). Sin embargo, sólo hasta el inicio de este siglo XXI, no se ha prestado la atención necesaria a la matriz extracelular como vía de las interacciones entre células (Kohorn 2000). Se ha postulado que las pectinas de las paredes del tubo polínico se unen, mediante una proteína rica en cisteína denominada SCA (Stigma/stylar Cysteine-rich Adhesin), a las pectinas de las paredes estilares del TT, actuando como un puente entre los dos tipos de de células (Mollet et al. 2000, Lord 2001). Esta afirmación se basa en que ni las pectinas ni la molécula de SCA producen adhesión por separado. Además, se observó que la adhesión era específica para el polen de la misma especie (*Lilium*). Esto sugiere que la adhesión es el resultado de un proceso de reconocimiento. Por otro lado, estas AGPs están presentes en el estilo de Nicotiana tabacum y son deglicosiladas por el tubo polínico e incorporadas a la pared del tubo (Wu et al. 1995). En base al patrón de localización de dichas AGPs en el olivo, es posible que un sistema parecido esté presente en esta especie.

Se ha propuesto que las pectinas con residuos de arabinosa, además de estar implicadas en la adhesión, pueden controlar la porosidad y consistencia del gel que forman con el exudado (Fleischer *et al.* 1998). Todo ello facilitaría



que los pólenes que lleguen a la superficie del estigma se queden inmersos en el exudado, se hidraten y germinen, sin necesidad de estar en contacto directo con las papilas. En las zonas más internas del estigma, estas pectinas facilitarían el paso del tubo hacia el estilo, aportando un ambiente húmedo debido a la capacidad que tienen de acumular agua (Mc Cann y Roberts 1994).

5.7.2. Implicaciones de las pectinas y AGPs del polen en la reproducción del olivo

El patrón de expresión de las pectinas ácidas en el olivo es diferente dependiendo del grado de esterificación de éstas. Las pectinas altamente esterificadas están presentes en el polen maduro e hidratado, pero se aprecia un aumento gradual durante la germinación, posiblemente como consecuencia del crecimiento del tubo polínico. En cambio, los niveles de expresión de las pectinas con un grado bajo de esterificación solo son detectables durante el crecimiento del tubo polínico. Estos datos sugieren que, en el polen maduro y durante la hidratación del grano, la desesterificación de las pectinas se interrumpe, probablemente porque no hay segregación de pectinas esterificadas. A partir del desarrollo del tubo polínico, las pectinas esterificadas comienzan a segregarse en el ápice del tubo y, como consecuencia, se reinicia la desesterificación de pectinas en las paredes subapicales del tubo. Estos resultados se ajustan al modelo propuesto por Lord (2001). La distribución de pectinas esterificadas y no esterificadas encontrada en el tubo polínico del olivo coincide con la descrita para otras especies modelo como Nicotiana o Lilium: pectinas altamente esterificadas en el ápice del tubo polínico y mayor grado de pectinas desesterificadas en la zona subapical (Li et al. 1994, 1995, 1997, 2002, Jauh y Lord 1996, Lennon y Lord 2000), lo que indica que se trata de un patrón muy conservado de la pared del tubo polínico, que le confiere la suficiente flexibilidad en el ápice para que pueda seguir creciendo, al mismo tiempo de la necesaria rigidez para abrirse camino a través del pistilo. Las propiedades físicas de la pared celular parecen estar controladas no sólo por la cantidad total de pectinas sino también por la configuración de las mismas (Parre y Geitmann 2005). El gradiente de esterificación es el resultado del crecimiento polarizado desde el ápice ya que los componentes de las paredes son secretados en el ápice como residuos esterificados que se producen en el aparato de Golgi (Levy y Staehelin 1992, Hasegawa et al. 1998). Ya en la pared del tubo, las pectinas esterificadas se desesterifican de forma gradual gracias a la enzima pectina metilesterasa. Se ha postulado que los enzimas de desesterificación están presentes en vesículas del citoplasma y son secretadas simultáneamente con los precursores de las pectinas (Geitmann et al. 1995, Li et al. 1997). La

desesterificación permite que los grupos carboxilos libres se unan a iones Ca²⁺. Las pectinas desesterificadas forman dímeros a través de las interacciones iónicas de los iones Ca²⁺. A mayor cantidad de uniones, mayor será la rigidez de la matriz pectínica y mayor será el endurecimiento de la pared celular (Willats 2001). La elevada concentración de pectinas esterificadas en las zonas apicales del tubo polínico sugiere que dicha configuración es responsable de su alta flexibilidad (Li *et al.* 1994).

Mientras que los trabajos referentes a pectinas esterificadas y no esterificadas en la pared del tubo polínico son muy numerosos, las pectinas neutras han sido mucho menos estudiadas en el polen. Los análisis bioquímicos en el polen del olivo muestran una disminución significativa de los niveles de pectinas neutras ricas en galactosa y un incremento notable de las pectinas elevados de arabinosa con niveles en su estructura. neutras La inmunolocalización de pectinas neutras con arabinosa mediante el anticuerpo LM6 han mostrado unos anillos en la pared del tubo a intervalos más o menos regulares, semejantes a los previamente descritos por Stepka et al. (2000). La formación de estas estructuras puede ser una consecuencia a ciclos oscilatorios en el crecimiento del tubo (Parre y Geitmann2005).

Los análisis bioquímicos de detección de AGPs muestran un patrón de expresión creciente para aquellas moléculas que son reconocidas por el anticuerpo JIM13. Dichas proteínas se localizan específicamente en las aperturas del grano. En estas estructuras, estas AGPs tendrían un importante papel en la expansión de las aperturas por donde germina el tubo y en la formación de la pared del mismo. Además, estas macromoléculas se localizan en la pared celular del tubo polínico a lo largo de toda su superficie. En *Lilium*, las células de la epidermis del tejido transmisor aparecen cubiertas de una matriz mucilaginosa rica en pectinas desesterificadas y adhesinas ricas en cisteína (SCA), que interaccionan con pectinas y AGPs de la pared del tubo polínico creando puntos de adhesión (Park *et al.* 2000). El patrón de expresión y localización de las AGPs en el olivo es consistente con esta hipótesis, por lo que estas macromoléculas podrían estar involucradas en la adhesión del tubo polínico.

Las AGPs que presentan residuos libres de L-arabinosa en su estructura y que son reconocidas por el anticuerpo JIM14 muestran un patrón de expresión contrario, dado que sus niveles de expresión disminuyen a lo largo de la germinación, y se localizan mayoritariamente en la zona apical y subapical del tubo polínico. En el ápice del tubo polínico se encuentra una elevada marca de partículas de oro en vesículas cercanas al ápice, lo cual sugiere que los precursores de las AGPs se distribuyen mayoritariamente desde el extremo apical (Labavitch 1981, McCartney y Knox 2002, Parre y Geitmann 2005). Estas AGPs estarían implicadas en la relación entre firmeza/plasticidad en el tubo polínico debido a que los epítopos no ramificados de $(1, 5)-\alpha$ -L-arabinosa son insolubles en agua pero pueden formar geles hidratados (Radha y Chandrasekaran 1997). La localización de este tipo de AGPs en la exina del polen maduro también había sido observada previamente en *Beta vulgaris* L, durante las etapas tempranas de la formación de la pared del polen, cuando las microsporas se encuentran todavía dentro de la pared de calosa (Majewska-Sawka y Rodríguez García 1999).



CONCLUSIONES


- 2. La asincronía en el desarrollo floral, y la morfología y posición en la flor de las anteras y el pistilo hace posible tanto la polinización cruzada como la autopolinización en el olivo. Sin embargo, el comportamiento del pistilo, cuyo estigma alcanza la madurez y es receptivo antes de que se produzca la dehiscencia de las anteras de la misma flor, favorece la polinización cruzada.
- 3. El periodo de receptividad del estigma en el olivo varía entre 1 y 3 días, dependiendo del cultivar y de factores ambientales como la humedad y la temperatura. En el olivo, la receptividad estigmática es óptima cuando la flor está completamente abierta y las anteras aún son turgentes y no dehiscentes. Este hecho coincide con la presencia de abundante exudado en la superficie del estigma y un incremento de la matriz extracelular que rellena los espacios intercelulares del tejido subpapilar y transmisor.
- 4. En la etapa de receptividad óptima del olivo, el estigma presenta las papilas intactas y bien conservadas, por lo que la secreción del exudado tiene que ser a través del plasmalema y las paredes papilares (secreción granulocrina), y no por lisis y degradación de las mismas.
- 5. En el olivo, en base a la composición lipídica del exudado y de la cubierta externa del polen, los lípidos deben tener un papel relevante en la hidratación, germinación y orientación del tubo polínico hacia el ovario, de acuerdo con la hipótesis propuesta por otros autores para otras especies de características semejantes.
- 6. Existe un ciclo de síntesis y degradación de almidón en el pistilo del olivo. En el estigma, la secreción de exudado coincide con la metabolización del almidón presente en las papilas, lo que sugiere que los azucares procedentes del almidón pasan a formar parte del exudado. Durante la polinización, el almidón presente en el estilo y ovario se metaboliza, lo que indica que puede ser utilizado en parte para proveer de nutrientes al tubo polínico.



- 8. El análisis de expresión y la localización celular de pectinas neutras con galactosa, y de pectinas esterificadas apuntan a que la función de estas macromoléculas es más bien estructural en el pistilo y el tubo polínico del olivo.
- 9. Los niveles máximos de expresión de las pectinas neutras con arabinosa y las AGPs en el pistilo ocurren durante la etapa de polinización y, en el polen, durante la germinación *in vitro*. Este hecho junto con su localización celular en los tejidos por donde pasan los tubos hacia el ovario, así como a lo largo de toda la pared del tubo polínico, implicaría a estas macromoléculas en los procesos de adhesión y reconocimiento polen-pistilo.



- 2. Cross-pollination and self-pollination are both likely to occur in the olive tree as the result of asynchrony in the floral development, and pistil and anthers morphology and position within the flower.
- 3. Stigmatic receptivity in the olive lasts 1 to 3 days and depends on the cultivar and some environmental factors like humidity and temperature. Stigmatic receptivity in the olive is considered optimal when the flower is completely open and the anthers are turgid but not dehiscent. This event coincides with the presence of an abundant exudate that covers the stigma surface, and an increase in the amount of the extracellular matrix filling the intercellular spaces in the sub-papillar and transmitting tissues.
- 4. During the period of optimal receptivity, the stigma presents intact papillar cells. Therefore, the secretion of the stigmatic exudates must take place through the plasma membrane and the cell wall of papillar cells.
- 5. The fact that both the pollen coat and the stigma exudate of olive contain large quantities of lipids, suggest that these molecules might have an important role in pollen hydration and germination, as well as in pollen tube guidance towards the ovary.
- 6. In the olive pistil, we could observe one wave of amylogenesis/amylolysis. Starch in the papillar cells was found to decrease coincidentally with the secretion of the stigma exudate, suggesting that sugars found in the exudate might partially derive from the mobilized starch. During pollination, starch is degraded in the style and the ovary, suggesting that it could serve to feed growing pollen tubes.
- 7. In the olive, the connection between the transmitting tissue and the ovary occurs through the placenta. The olive ovary does not present any specialized structure (e.g. obturator) regulating the pollen tube entry, as described for other species.
- 8. The expression analysis and the localization of neutral galactose-rich and esterified pectins suggest that these groups of pectins could play a structural function in both the pistil and the pollen tube in the olive.
- 9. The highest expression levels of neutral arabinose-rich pectins and AGPs in the pistils were detected during pollination, and during *in vitro* germination

in the pollen. These results together with the cellular localization of these molecules, suggest that they are involved in adhesion and pollen-pistil interaction processes.





Anexo I

Estadística descriptiva [número de observaciones (N), media y desviación estándar (SD)] de los caracteres morfométricos del pistilo del olivo en los cultivares Arbequina, Loaime, Lucio y Picual.

Carácter	Cultivar	Ν	Media (mm)	SD (mm)
Altura del estigma	Arbequina	15	0,5273	0,01163
	Loaime	15	1,4280	0,02042
	Lucio	15	1,8927	0,01710
	Picual	15	1,3600	0,02449
Anchura del estigma	Arbequina	15	0,5760	0,02131
	Loaime	15	0,7840	0,01595
	Lucio	15	0,8600	0,01890
	Picual	15	0,6333	0,04100
Altura del estilo	Arbequina	15	0,6980	0,01320
	Loaime	15	0,5520	0,01014
	Lucio	15	1,0440	0,02586
	Picual	15	0,9887	0,01767
Anchura del estilo	Arbequina	15	0,5153	0,01246
	Loaime	15	0,4100	0,01512
	Lucio	15	0,4013	0,01302
	Picual	15	0,4267	0,01543
Altura del ovario	Arbequina	15	1,4420	0,02808
	Loaime	15	1,5127	0,02576
	Lucio	15	1,0847	0,06289
	Picual	15	1,6187	0,04015
Anchura del ovario	Arbequina	15	1,4093	0,12719
	Loaime	15	1,4480	0,15744
	Lucio	15	1,5487	0,11783
	Picual	15	1,4320	0,09915

Anexo II

Análisis de la varianza (ANOVA) de Friedman (F) de los caracteres morfométricos del pistilo del olivo en los cultivares Arbequina, Loaime, Lucio y Picual.

Carácter	Varianza	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	р
	Inter-grupos	14,524	3	4,841	13403,39*	0,000
Altura estigma	Intra-grupos	0,020	0,020 56 0,000			
Cougina	Total	14,544	59			
	Inter-grupos	0,773	3	0,258	373,80*	0,000
Anchura	Intra-grupos	0,039	56	0,001		
estigilia	Total	0,811	59			
	Inter-grupos	2,488	3	0,829	2622,13*	0,000
Altura estilo	Intra-grupos	0,018	56	0,000		
	Total	2,506	59			
	Inter-grupos	0,121	3	0,040	204,10*	0,000
Anchura estilo	Intra-grupos	0,011	56	0,000		
Cotilo	Total	0,132	59			
	Inter-grupos	2,413	3	0,804	458,31*	0,000
Altura	Intra-grupos	0,098	56	0,002		
Ovalio	Total	2,511	59			
	Inter-grupos	0,170	3	0,057	3,51*	0,021
Anchura	Intra-grupos	0,906	56	0,016		
ovalio	Total	1,076	59			

 * La diferencia entre las medias es significativa para valores de p <0,05.

Anexo III

Análisis post hoc de Bonferroni de los caracteres morfométricos del pistilo del olivo en los cultivares Arbequina, Loaime, Lucio y Picual.

Variable	Cultivar	Cultivar	Diferencia	Error	n	Intervalo de confianza al 95%	
dependiente	(I)	(L)	(I-J)	típico	ч	Límite inferior	Límite superior
		Loaime	-0,900667*	0,006940	0,000	-0,91965	-0,88169
	Arbequina	Lucio	-1,365333*	0,006940	0,000	-1,38431	-1,34635
		Picual	-0,832667*	0,006940	0,000	-0,85165	-0,81369
		Arbequina	0,900667*	0,006940	0,000	0,88169	0,91965
	Loaime	Lucio	-0,464667*	0,006940	0,000	-0,48365	-0,44569
Altura		Picual	0,068000*	0,006940	0,000	0,04902	0,08698
estigma		Arbequina	1,365333*	0,006940	0,000	1,34635	1,38431
	Lucio	Loaime	0,464667*	0,006940	0,000	0,44569	0,48365
		Picual	0,532667*	0,006940	0,000	0,51369	0,55165
		Arbequina	0,832667*	0,006940	0,000	0,81369	0,85165
	Picual	Loaime	-0,068000*	0,006940	0,000	-0,08698	-0,04902
		Lucio	-0,532667*	0,006940	0,000	-0,55165	-0,51369
		Loaime	-0,207000*	0,009586	0,000	-0,23322	-0,18078
	Arbequina	Lucio	-0,284133*	0,009586	0,000	-0,31035	-0,25791
		Picual	-0,058200*	0,009586	0,000	-0,08442	-0,03198
		Arbequina	0,207000*	0,009586	0,000	0,18078	0,23322
	Loaime	Lucio	-0,077133*	0,009586	0,000	-0,10335	-0,05091
Anchura		Picual	0,148800*	0,009586	0,000	0,12258	0,17502
estigma		Arbequina	0,284133*	0,009586	0,000	0,25791	0,31035
	Lucio	Loaime	0,077133*	0,009586	0,000	0,05091	0,10335
		Picual	0,225933*	0,009586	0,000	0,19971	0,25215
		Arbequina	0,058200*	0,009586	0,000	0,03198	0,08442
	Picual	Loaime	-0,148800*	0,009586	0,000	-0,17502	-0,12258
		Lucio	-0,225933*	0,009586	0,000	-0,25215	-0,19971

 * La diferencia de medias es significativa para valores de p<0,05.

Anexo III

Continuación

Variable	Cultivar	Cultivar	Diferencia	Error	n	Intervalo de confianza al 95%	
dependiente	(I)	(L)	(I-J)	típico	μ	Límite inferior	Límite superior
		Loaime	0,146533*	0,006494	0,000	0,12877	0,16430
	Arbequina	Lucio	-0,346667*	0,006494	0,000	-0,36443	-0,32890
		Picual	-0,290600*	0,006494	0,000	-0,30836	-0,27284
		Arbequina	-0,146533*	0,006494	0,000	-0,16430	-0,12877
	Loaime	Lucio	-0,493200*	0,006494	0,000	-0,51096	-0,47544
Altura		Picual	-0,437133*	0,006494	0,000	-0,45490	-0,41937
estilo		Arbequina	0,346667*	0,006494	0,000	0,32890	0,36443
	Lucio	Loaime	0,493200*	0,006494	0,000	0,47544	0,51096
		Picual	0,056067*	0,006494	0,000	0,03830	0,07383
		Arbequina	0,290600*	0,006494	0,000	0,27284	0,30836
	Picual	Loaime	0,437133*	0,006494	0,000	0,41937	0,45490
		Lucio	-0,056067*	0,006494	0,000	-0,07383	-0,03830
		Loaime	0,104800*	0,005139	0,000	0,09074	0,11886
	Arbequina	Lucio	0,112533*	0,005139	0,000	0,09848	0,12659
		Picual	0,088133*	0,005139	0,000	0,07408	0,10219
		Arbequina	-0,104800*	0,005139	0,000	-0,11886	-0,09074
	Loaime	Lucio	0,007733	0,005139	0,828	-0,00632	0,02179
Anchura		Picual	-0,016667*	0,005139	0,012	-0,03072	-0,00261
estilo		Arbequina	-0,112533*	0,005139	0,000	-0,12659	-0,09848
	Lucio	Loaime	-0,007733	0,005139	0,828	-0,02179	0,00632
		Picual	-0,024400*	0,005139	0,000	-0,03846	-0,01034
		Arbequina	-0,088133*	0,005139	0,000	-0,10219	-0,07408
	Picual	Loaime	0,016667*	0,005139	0,012	0,00261	0,03072
		Lucio	0,024400*	0,005139	0,000	0,01034	0,03846

 * La diferencia de medias es significativa para valores de p $<\!0,\!05.$

Continuación

Variable	Cultivar	Cultivar Diferencia		Error	n	Intervalo de confianza al 95%	
dependiente	(I)	(L)	(I-J)	típico	μ	Límite inferior	Límite superior
		Loaime	-0,070667*	0,015297	0,000	-0,11251	-0,02883
	Arbequina	Lucio	0,357333*	0,015297	0,000	0,31549	0,39917
		Picual	-0,176667*	0,015297	0,000	-0,21851	-0,13483
		Arbequina	0,070667*	0,015297	0,000	0,02883	0,11251
	Loaime	Lucio	0,428000*	0,015297	0,000	0,38616	0,46984
Altura		Picual	-0,106000*	0,015297	0,000	-0,14784	-0,06416
ovario		Arbequina	-0,357333*	0,015297	0,000	-0,39917	-0,31549
	Lucio	Loaime	-0,428000*	0,015297	0,000	-0,46984	-0,38616
		Picual	-0,534000*	0,015297	0,000	-0,57584	-0,49216
		Arbequina	0,176667*	0,015297	0,000	0,13483	0,21851
Pict	Picual	Loaime	0,106000*	0,015297	0,000	0,06416	0,14784
		Lucio	0,534000*	0,015297	0,000	0,49216	0,57584
		Loaime	-0,038667	0,046433	1,000	-0,16567	0,08834
	Arbequina	Lucio	-0,139333*	0,046433	0,024	-0,26634	-0,01233
		Picual	-0,022667	0,046433	1,000	-0,14967	0,10434
		Arbequina	0,038667	0,046433	1,000	-0,08834	0,16567
	Loaime	Lucio	-0,100667	0,046433	0,207	-0,22767	0,02634
Anchura		Picual	0,016000	0,046433	1,000	-0,11101	0,14301
ovario		Arbequina	0,139333*	0,046433	0,024	0,01233	0,26634
	Lucio	Loaime	0,100667	0,046433	0,207	-0,02634	0,22767
		Picual	0,116667	0,046433	0,089	-0,01034	0,24367
		Arbequina	0,022667	0,046433	1,000	-0,10434	0,14967
	Picual	Loaime	-0,016000	0,046433	1,000	-0,14301	0,11101
		Lucio	-0,116667	0,046433	0,089	-0,24367	0,01034

* La diferencia de medias es significativa para valores de p <0,05.

Ĵ

Anexo IV

Estadística descriptiva [número de observaciones (N), media y desviación estándar (SD)] de la cantidad de almidón en los distintos tejidos del pistilo del olivo en el cultivar Picual.

Estadio ¹	Órgano	Tejido	N	Media (densidad/mm²)	SD (densidad/mm²)
		Papilas	15	0,7	0,94
	Estigma	Tejido subpapilar	15	0,0	0,00
(1) Detén warda	Estile	Parénquima	15	21,0	7,34
(1) boton verde	ESUIO	Tejido transmisor	15	1,3	1,24
	Ovaria	Parénquima	15	12,0	4,08
	Ovario	Óvulo	15	1,0	0,80
	Estigma	Papilas	15	22,0	1,63
	Estigma	Tejido subpapilar	15	18,0	2,16
(2) Botón blanco	Estilo	Parénquima	15	44,0	8,28
		Tejido transmisor	15	26,0	2,94
	Ovario	Parénquima	15	24,0	1,63
		Óvulo	15	23,3	1,24
	Estigma	Papilas	15	9,0	1,63
		Tejido subpapilar	15	26,0	0,81
(4) Flor abierta con	Estilo	Parénquima	15	34,3	1,24
anteras turgentes		Tejido transmisor	15	32,0	1,63
	Ovario	Parénquima	15	40,0	1,63
		Óvulo	15	32,3	3,85
	Estigma	Papilas	15	0,7	0,41
(5) Flor abierta con anteras dehiscentes	Estigina	Tejido subpapilar	15	13,3	1,24
	Estilo	Parénquima	15	20,4	2,86
		Tejido transmisor	15	29,0	0,81
	Overia	Parénquima	15	17,0	2,44
	Ovario	Óvulo	15	13,7	1,24

 1 Los números entre paréntesis se corresponden con los distintos estadios de la floración que se han definido en este trabajo en función de los caracteres morfométricos de la flor (ver sección 4.1.3. del capítulo de Resultados).

\sim	. •	• /
Con	finii	ación

Estadio ¹	Órgano	Tejido	Ν	Media (densidad/mm ²)	SD (densidad/mm²)
	Estimu	Papilas	15	0,3	0,40
	Estigma	Tejido subpapilar	15	3,7	1,25
(6) Flor abierta con anteras marrones	E-til-	Parénquima	15	8,0	0,81
	Estilo	Tejido transmisor	15	15,3	1,24
	Ovario	Parénquima	15	16,0	7,10
		Óvulo	15	15,7	4,04
(7) Flor sin pétalos y con el estigma marrón	Estigma	Papilas	15	0,0	0,00
		Tejido subpapilar	15	0,0	0,00
	т. «1	Parénquima	15	2,3	0,47
	ESUIO	Tejido transmisor	15	6,3	1,24
	Overia	Parénquima	15	10,0	0,81
	Ovario	Óvulo	15	17,0	5,09

 1 Los números entre paréntesis se corresponden con los distintos estadios de la floración que se han definido en este trabajo en función de los caracteres morfométricos de la flor (ver sección 4.1.3. del capítulo de Resultados).

Anexo V

Listado de abreviaturas (general)			
ADN	Ácido desoxirribonucléico		
AGPs	Proteínas con arabinogalactanos		
APS	Persulfato amónico		
BSA	Albúmina de suero bovino		
CHAPS	3-(cloroamidopropilo)-dimetilamonio-1-propanosulfato		
DO	Densidad óptica		
DTT	Ditiotreitol		
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético		
FCR	Reacción fluorocromática		
FDA	Diacetato de fluoresceína		
FITC	Isotianato de fluoresceína		
FLs	Fosfolípidos		
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión		
MF	Microscopía de fluorescencia		
MLC	Microscopía Láser Confocal		
МО	Microscopía óptica		
PAS	Ácido periódico/reactivo de Schiff		
PBS	Tampón fosfato salino		
PEG	Polietilenglicol		
PEP	Período de polinización efectiva		
PIPES	Ácido piperazin-N,N2-bis(2-etanosulfónico)		
PME	Pectina metilesterasa		
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo		
PVDF	Fluoruro de polivinilideno		

Listado de abrev	viaturas (microscopía)		
Ар	Apertura		
cg	Células glandulares		
cu	Cutícula		
cw	Pared celular		
ECM	Matriz extracelular		
en	Endodermis		
ep	Epidermis		
ex	Exudado		
Ex	Exina		
hv	Haces vasculares		
In	Intina		
me	Mesodermis		
Mi	Mitocondria		
Ν	Núcleo		
0	Ovario		
ov	Óvulo		
р	Plasmodesmata		
pg	Grano de polen		
рр	Papilas		
pq	Parénquima		
pt	Tubo polínico		
S	Estigma		
S	Almidón		
se	Saco embrionario		
st	Estilo		
TC	Tampón de calosa		
tt	Tejido transmisor		
V	Vacuola		

Anexo VI

Ŷ

BIBLIOGRAFÍA





Alché JD, Corpas FJ, Rodríguez-García MI, del Río LA (1998) Superoxido dismutase isoenzymes of olive pollen. Physiol. Plantarum 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, Jiménez-López JC, Wang W, Castro AJ, Rodríguez-García MI (2006) Biochemical characterization and cellular localization of 11S-type storage proteins in olive (Olea europaea L.) seeds. J. Agric. Food Chemistry 54: 5562-5570

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) El polen como vector responsable de alergias. Polen 8: 5-23

Alché JD, Rodríguez-García MI (1997) Fluorochromes for detection of callose in meiocytes of olive (Olea europaea L.). Biotech. Histochem. 72: 285-290

Alché, JD, Castro-López AJ, Hamman-Khalifa AM, Romero-Palacios PJ, Jiménez-López JC, Rodríguez-García MI (2004) Alergenicidad diferencial del polen en variedades cultivadas del olivo. Implicaciones Clínicas Alergol. Inmunol. Clin 19(2): 308

Altamura-Betti MM, Pasqua G, Mazzolani G (1982) Embryogenesis in Olea europaea L. Ann. Bot. 40: 141-152

Aouali N, Laporte P, Clement C (2001) Pectin secretion and distribution in the anther during pollen development in Lilium. Planta 213: 71-79

Arbeloa A, Herrero M (1985) Valoración de la translocación al óvulo y de la esterilidad femenina en melocotonero. Annals Aula Dei 17: 214-220

Arbeloa A, Herrero M (1987) The significance of the obturator in the control of pollen tube entry into the ovary in peach (Prunus persica). Ann Bot 60: 681-685



Ateyyeh AF, Stosser R, Qrunfleh M (2000) Reproductive biology of the olive (Olea europaea L.) cv. 'Nabali Baladi'. J. Appl. Bot. 74: 255-270.

Badr SA, Hartmann HT (1971) Effect of diurnally fluctuating vs. constant temperatures on flower induction and sex expression in the olive (Olea europaea L). Physiol. Plantarum 24: 140-145

Badr SA, Hartmann HT (1972) Flowering response of the olive (Olea europaea L.) to certain growth regulators applied under inductive and non-inductive environments. Botanical Gazette 133: 387-392

Baron-Epel O, Gharyal PK, Schindler M (1988) Pectins as mediators of wall porosity in soybean cells. Planta 175: 389-395

Barranco D, Fernandez-Escobar R, Rallo L. (1994) El cultivo del olivo. Junta de Andalucía, Ediciones Mundi Prensa. Madrid, pp. 151-152

Barranco D, Rallo L (1984) Las variedades de olivo cultivadas en Andalucía. Ministerio de Agricultura, Junta de Andalucía, Madrid, Spain.

Barranco D, Trujillo I, Rallo L. (2005). Libro I. Elaiografía Hispánica. En: Variedades de olivo en España. Rallo L, Barranco D, Caballero JM, Del Rio C, Martin A, Tous J, Trujillo I (Eds). Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

Barrett SCH, Jesson LK, Baker AM (2000). The evolution and function of stylar polymorphisms in flowering plants. Ann. Bot. 85 (suppl.): 253–265

Bartolini S, Guerriero R (1995) Self-compatibility in several clones of oil olive cv. Leccino. Adv. Hort. Sci. 9: 71-74

Belaj A, Trujillo I, De la Rosa R, Rallo L, Gimenez MJ (2001) Polimorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorfic markers in an olive Germoplasm Bank. J Am Soc Hort Sci 126: 64-71

Bell J, Hicks G (1976) Transmitting tissue in the pistil of tobacco: light and electron microscopic observations. Planta 131: 187-200

Benkert R, Obermeyer G, Bentrup FW (1997) The turgor pressure of growing lily pollen tubes. Protoplasma 198: 1–8.

Besnard G, Bervillé A (2000) Multiple origin of the Mediterranean Olive deduced from mitocondrial DNA polimorphisms. C.R. Acad. Sci. 323: 173-181



Bih FY, Wu SS, Ratnayake C, Walling LL, Nothnagel EA, Huang AH (1999) The predominant protein on the surface of maize pollen is an endoxylanase synthesized by a tapetum mRNA with a long 5 'leader. J. Biol. Chem. 274: 22884–22894

Bogani P, Cavalieri D, Petruccelli P, Polsinelli, Roselli G (1994) Identification of olive tree cultivars by random amplified polymorphic DNA. Acta Hort. 356: 98–101

Bosch M, Hepler PK (2005) Pectin methylesterases and pectin dynamics in pollen tubes. Plant Cell 17(12): 3219-3226.

Bousquet J, Cour P, Guérin B, Michel FB (1985) Allergy in the Mediterranean area. I. Pollen counts and pollinosis of Montpellier. Clin. Allergy 14: 249

Bradley MV, Griggs WH (1963) Morphological evidence of incompatibility in Olea europaea L. Phytomorphology 13: 141-156

Buchholz A (1986) Carbohydrate partitioning between fruitlets and young vegetative growth as a possible factor involved with fruitlet abscission in avocado. M.Sc. thesis, Hebrew University of Jerusalem.

Buitink J, Leprince O, Hemminga MA, Hoekstra FA (2000) The effects of moisture and temperature on the ageing kinetics of pollen: interpretation based on cytoplasmic mobility. Plant Cell Environ. 23: 967–974

Butowt R, Granot D, Rodriguez-Garcia MI (2003) A putative plastidic glucose translocater is expressed in heterotrophic tissues that do not contain starch during olive (Olea europaea L.) fruit ripening. Plant Cell Physiol. 44: 1152-1161

Caballero JM, Del Rio C, Barranco D, Trujillo I (2006) The Olive World Germplasm Bank of Córdoba, Spain. Olea 25: 14-19

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

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



Chen LQ, Ye D (2007) Roles of pectin methylesterases in pollen tube growth. J. Integrative Plant Biol. 49: 94-98

Cheung AY (1996) Pollen-pistil interactions during pollen tube growth. Trends Plant Sci. 1: 45-51

Cheung AY, Wang H, Wu HM (1995) A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. Cell 82: 383–393

Ciampolini F, Cresti M, Kapil RN (1983). Fine structural and cytochemical characteristics of style and stigma in olive. Caryologia 36: 211-230

Clarke AE, Anderson RL, Stone BA (1979) Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. Phytochemistry 18: 521-540

Clement C, Audran JC (1995) Anther wall layers control pollen sugar nutrition in Lilium. Protoplasma 187: 172-181

Clément C, Burrus M, Audran JC (1996) Floral organ growth and carbohydrate content during pollen development in Lilium. Amer. J. Bot. 83: 459-469

Clement C, Pacini E (2001) Anther plastids in angiosperms. Bot. Rev. 67: 54-73

Cresti M, Ciampolini E, Sarfatti G (1983) Ultraestructural features of Malus comunnis L. Mature Pollen. In: Mulcahy, DL and E Ottavano (Eds.), Pollen: Biology and Implications for Plant Breeding, Elsevier Science Publishing Group, pp. 165-172

Cuevas J (2005) Autoincompatibilidad polen-pistilo. In: Rallo L, Barranco D, Caballero JM, Del Río C, Martín A, Tous J, Trujillo I (Eds.), Variedades de Olivo en España Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa Madrid, Spain, pp. 301–308

Cuevas J, Polito VS (1997) Compatibility relationships in 'Manzanillo' olive. Hortic. Sci. 32: 1056-1058

Cuevas J, Rallo L, Rapoport HF (1994) Staining procedure for the observation of olive pollen tube behavior. Acta Hort. 474: 293-296



Dafni A, Firmage D (2000) Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. Plant Syst. Evol. 222: 113-132.

de Graaf BHJ, Derksen JWM, Mariani C (2001) Pollen and pistil in the progamic phase. Sex. Plant Reprod. 14: 41–55

Rodríguez-García MI, M'rani Alaoui M, De la Flor J, Fernández MC (2003) Observations on microtubules and nuclei motility in the pollen tube of olive (Olea europaea L.). Acta Biol. Cracov. Series Bot. 45/1: 97-101

De la Rosa R, James CM, Tobutt KR (2002) Isolation and characterisation of polymorphic microsatellites in olive (Olea europaea L.) and their transferability to other genera in the Oleaceae. Mol. Ecol. 2: 265-267

Dearnaley, JDW, Daggard GA (2001). Expression of a polygalacturonase enzyme in germinating pollen of Brassica napus. Sex. Plant Reprod. 13: 265-271

Derksen J (1996) Pollen tubes: a model system for plant cell growth. Bot. Acta 109: 341-345

Derksen J, Rutten T, Lichtscheidl I, de Win A, Pierson E, Rongen G (1995) Quantitative analysis of the distribution of organelles in tobacco pollen tubes: implications for exocytosis and endocytosis.Protoplasma 188: 267-276

Díaz A, De la Rosa R, Martín A, Rallo P (2006) 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 Genetics Genomes 2: 165-175

Dickinson HG, Elleman CJ, Doughty J (2000) Pollen coatings: chimaeric genetics and new functions. Sex. Plant Reprod. 12: 302-309

Dickinson HG, Lewis D (1973) Cytochemical and ultrastructural differences between intraspecific compatible and incompatible pollinations in Raphanus. Proc. Royal Soc. London 183: 21-38

Dobson HE, Bergstrom G (2000) the ecology and evolution of pollen donors. Plant Syst. Evol. 222: 63-87

Dos Santos Ramos AM (2000) Inducción floral y latencia de las yemas del olivo (Olea europaea L.). Tesis doctoral, Universidad de Córdoba



Dumas C, Mogensen HL (1993) Gametes and fertilization: maize as a model system for experimental embryogenesis in flowering plants. Plant Cell 5: 1337-1348

Edlund AF, Swanson R, Preuss D (2004) Pollen and stigma structure and function: The role of diversity in pollination. Plant Cell 16: S84–S97

Egea J, Burgos L (1992) Effective pollination period as related to stigma receptivity in apricot. Sci. Hort. 52: 77-83

Egea J, Burgos L, Garcia JE, Egea L. (1991) Stigma receptivity and style performance in several apricot cultivars. J. Hortic. Sci. 66: 19-25

Elleman CJ, Dickinson HG (1986) Pollen-stigma interactions in Brassica. IV. Structural reorganization in the pollen grains during hydration. J. Cell Sci. 80: 141-157

Extremera G (1985) Desarrollo del saco embrionario en dos cultivares de olivo (Olea europaea L.) Memoria de licenciatura (inéd.). Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba. Córdoba.

Extremera G, Rapoport H, Rallo L (1988) Caracterización del desarrollo normal del saco embrionario en olivo (Olea europaea L). Ann. Jardín Bot. Madrid 45: 197-211

Fabbri A, Hormaza JI, Polito VS (1995) Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (Olea europaea L.) cultivars. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 120: 538-542

Felker FC, Robitaille HA, Hess FD (1983) Morphological and ultrastructural development and starch accumulation during chilling of sour cherry flower buds. Am. J. Bot. 70: 376–386

Fernández MC, Olmedilla A, Alché JD, Palomino P, Lahoz C, Rodríguez-García MI (1996) Immunogold probes for light and electron microscopic localization of Ole e I in several Oleaceae pollens. J. Histochem. Cytochem. 44: 151-158

Fernández MC, Rodriguez-Garcia MI (1994) Pollen grain aperture in Olea europaea L. Rev. Palaeobot. Palynol. 85: 99-109

Fernández-Escobar R, Gómez-Valledor G (1985) Cross pollinization in Gordal Sevillana olives. Hort. Sci. 20: 191-192



Fernandez-Escobar R, Rallo L (1981) Influencia de la polinización cruzada en el cuajado de frutos de cultivares de olivo (Olea europaea L.). ITEA 45: 51-58

Fisher DB, Wu Y, Ku MSB (1992) Turnover of soluble proteins in the wheat sieve tube. Plant Physiol. 100: 1433-1441

Franceschi VR, Horner HT (1980) Calcium oxalate crystals in plants. Bot. Rev. 46: 361-427

Franklin-Tong VE, Lawrence MJ, Franklin FC (1994) The molecular and cellular biology of gametophytic self-incompatibility in Papaver rhoeas. In: Williams EG, Clarke AE, Knox RB (eds) Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants. Kluwer, Dordrecht, pp 42-64

Franssen Verheijen MAW, Willemse MTM (1993) Micropylar exudate in Gasteria (Aloaceae) and its possible function in pollen tube growth. Am. J. Bot. 80: 253-262

Fromm J, Hajirezaei M, Wilke I (1995) The biochemical response of electrical signaling in the reproductive system of Hibiscus plants. Plant Physiol. 109: 375-338

Ganino T, Bartolini A, Fabbri A (2006) The classification of olive germplasm a review. J Hortic Sci Biotech 81(3):319–334

Ganino T, Beghé 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. Genetic Res. Crop Evol. 54: 1531-1540

Gasser CS, Robinson BK (1993) Pistil development. Plant Cell 5: 1231.1239

Geitmann A, Hudak J, Vennigerholz F, Walles B (1995) Immunogold localization of pectin and callose in pollen grains and pollen tubes of Brugmansia suaveolens. Implication for the self incompatibility reaction. J Plant Physiol. 147: 225-235

Geitmann A, Stee M (2006) The architecture and properties of the pollen tube cell wall. In: (Malhó R Ed.), The pollen tube plant cell 3: 177-200



Ghosh S, Shivanna KR (1984) Structure and cytochemistry of the stigma and pollen–pistil interaction in Zephyranthes. Ann. Bot. 53: 91-106

Gioulekas D, Chatzigeorgiou G, Lykogiannis S, Papakosta D, Mpalafontis C, Spieksma FTh (1991) Olea europea 3-year pollen record in the area of Thessaloniki, Greece, and its sensitizing significance. Aerobiologia, 7: 57-61

González MV, Coque M, Herrero M (1995a) Papillar integrity as an indicator of stigmatic receptivity in kiwifruit (Actinidia deliciosa). J. Exp. Bot. 46: 263-269

González MV, Coque M, Herrero M (1995b) Stigmatic receptivity limits the effective pollination period in kiwifruit. J. Am. Soc. Hort. Sci. 120: 199-202

Griggs WH, hartmann HT, Bradley MV, Iwakiri BT, Whisler JE (1975) Olive pollination in Califoria. California Agricultural Station Bulletin 869

Guerrero-Prieto VM, Vasilakakis MD, Lombard PB (1985) Factors controlling fruit set of 'Napoleon' sweet cherry in western Oregon. Hort. Sci. 20: 913-914

Hack H, Gall H, Klemke Th, Klose R, Meier U, Stauss R (1992) Phänologische Entwicklungsstadien der Kartoffel (Solanum tuberosum L.). Codierung und Beschreibung nach der erweiterten BBCH-Skala mit Abbildungen. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. 45: 11-19

Hamman Khalifa AM (2005) Caracterización molecular del polimorfismo d elas profilinas en el polen de olivo y otras species alergogénicas. Tesis doctoral, Universidad de Granada.

Hasegawa Y, Nakamura S, Kakizoe S, Sato M, Nakamura N (1998) Immunocytochemical and chemical analyses of Golgi vesicles isolated from the germinated pollen of Camellia japonica. J. Plant Res. 111: 421-429

Hepler PK, Vidali L, Cheung AY (2001) Polarized cell growth in higher plants. Annu. Rev. Cell Dev. Bio.l 17: 159-187

Herrero M (1992a) From pollination to fertilization in fruit trees. Plant Growth Reg. 11: 27-32

Herrero M (1992b) Mechanisms in the pistil that regulate gametophyte population in peach (Prunus persica). In: Ottaviano E, Mulcahy DL, Sari-Gorla M, Mulcahy GB (eds), Angiosperm pollen and ovules. Springer, New York Berlin Heidelberg, pp. 377-381



Herrero M, Arbeloa A (1989) Influence of the pistil on pollen tube kinetics in peach (Prunus persica). Am. J. Bot. 76: 1441-1447

Herrero M, Dickinson HG (1979) Pollen-pistil incompatibility in Petunia hybrida: changes in the pistil following compatible and incompatible intraspecific crosses. J. Cell Sci. 36: 1-18

Herrero M, Hormaza JI (1996) Pistil strategies controlling pollen tube growth. Sex. Plant Reprod. 9: 343-347

Herrero M (1983) Factors affecting fruit set in 'Agua de Aranjuez' pear. Acta Hort. 139: 91-96

Heslop-Harrison J (1979) Pollen walls as adaptive systems. Ann. Missouri Bot. Gard. 66: 813-829

Heslop-Harrison J (1987) Pollen germination and pollen-tube growth. Int. Rev. Cytol. 107: 1-78

Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y (1985) Surfaces and secretions in the pollen-stigma interaction: a brief review. J. Cell Sci. 2: 287-300

Heslop-Harrison Y, Shivanna KR (1977) The receptive surface of the Angiosperm stigma. Ann. Bot. 41: 1233-1258

Heslop-HarrisonY (2000) Control gates and micro-ecology: The pollen-stigma interaction in perspective. Ann. Bot. 85: 5-13

Hiscock SJ, Allen AM (2008) Diverse cell signaling pathways regulate pollenstigma interactions: the search for consensus. New Phytol. 179: 286-317

Hodges T, Doraiswamy PC (1979) Crop phenology literature review for corn, soybean, wheat, barley, sorghum, rice, cotton and sunflower. Agristars Technical Report. Lockheed Electronics Co. Inc., Texas, USA

Hopkins CY, Jevans AW, Bock R (1969) Occurrence of octadecatrans-2,cis-9,cis-12 trienoic acid in pollen attractive to the honey bee. Can. J. Biochem. 47: 433-436

Hülskamp M, Kopczak SD, Horejsi TF, Kihl BK, Pruitt RE (1995a) Identification of genes required for pollen-stigma recognition in Arabidopsis thaliana. Plant J. 8: 703-714



Hülskamp M, Schneitz K, Pruitt RE (1995b) Genetic evidence for a long-range activity that directs pollen tube guidance in Arabidopsis. Plant Cell 7: 57-64

Jarvis MC (1984) Structure and properties of pectin gels in plant. Plant Cell Environ. 7 (3): 153-164

Jauh GY, Eckard K, Nothnagel E, Lord EM (1997) Adhesion of lily pollen tubes on an artificial matrix. Sex. Plant Reprod. 10: 173-180

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: 251-261

Jaumien F (1968) The cause of poor bearing trees of the variety 'Doyenne du Comice'. Acta Agrobot. 21: 75-106

Jedrzejuk A, Szlachetka W (2005) Development of flower organs in common lilac (Syringa vulgaris L.) cv. Mme Florent Stepman. Acta Biol. Cracov. Series Bot. 47/2: 41-52

Kalinganire A, Harwood CE, Slee MU, Simons AJ (2000) Floral structure, stigma receptivity and pollen viability in relation to protandry and self-incompatibility in silky oak (Grevillea robusta A. Cunn.). Ann. Bot. 86: 133-148

Kanahama K, Saito T (1988) Inflorescence type of tomato. J. Japan. Soc. Hortic. Sci. 57: 426-432

King JR (1938) Morphological development of the fruit of the olive. Hilgaedia 11: 437-455

Knox JP (2006) The structure and function of arabinogalactan proteins (AGPs) (1) Arabinogalactan-proteins (AGPs) and plant cell development. Food Ingred. J. Jpn. 21: 26-31

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

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



Labarca C, Kroh M, Loewus F (2002) The composition of stigmatic exudate from Lilium longiflorum: labeling studies with myo-inositol, D-glucose, and L-proline. Plant Physiol. 46: 150-156

Lancashire PD, Bleiholder H, Langelüddeke P, Strauss R, Van den Boom T, Weber E, Witzenberger A (1991) A uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. Ann. Appl. Biol. 119: 561-601

Lanza B, Marsilio V, Martinell IN (1995) Identificazione varietale di cultivars di olivo (Olea europaea L.). Approcci analitici quantitativi del pattern esinico del granello pollinico. Atti del convegno: "L'olivicoltura mediterranea: stato e prospettive della coltura e della ricerca", Rende, Italy, pp. 219-224

Lavee S (1986) Olive. In: Monselise SP (Ed.), Handbook of fruit seed and development, pp. 267-276, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA

Lavee S, Taryan J, Levin J, Haskal A (2002) The significance of crosspollination for various olive cultivars under irrigated intensive growing conditions. Olivae 91: 25-36

Lebon G, Duchêne E, Brun O, Magné C, Clément C (2004) Flower abscission and inflorescence carbohydrates in sensitive and non-sensitive cultivars of grapevine. Sex. Plant Reprod. 17: 71-79

Lebon G, Wojnarowiez G, Holzapfel B, Fontaine F, Vaillant-Gaveau N, Clement C (2008) Sugars and flowering in the grapevine (Vitis vinifera L.). J. Exp. Bot. 59: 2565-2578

Lenartowska M, Rodríguez-García MI, Bednarska E (2001) Immunocytochemical localization of esterified and unesterified pectins in unpollinated and pollinated styles of Petunia hybrid Hort. Planta 213: 182-191

Levy S, Staehelin LA (1992) Synthesis, assembly and function of plant cell wall macromolecules. Curr. Opin. Cell Biol. 4: 856-862

Li YQ, Chen F, Faleri C, Ciampolini F, Linskens HF, Cresti M (1995) Presumed phylogenetic basis of the correlation of pectin deposition pattern in pollen tube walls and the stylar structure of angiosperms. Proc. K. Ned. Acad. Wet. 98: 39-44

Li YQ, Chen F, Linskens H, Cresti M (1994) Distribution of unesterified and esterified pectins in cell walls of pollen tubes of flowering plants. Sex. Plant Reprod. 7: 145-152



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

Lush WM, Spurck T, Joosten R (2000) Pollen tube guidance by the pistil of a Solanaceous plant. Ann. Bot. 85: 39-47

Luu DT, Heizmann P, Dumas C (1997a) Pollen-stigma adhesion in kale is not dependent on the self-incompatibility genotype. Plant Physiol. 115: 1221-1230

Luu DT, Heizmann P, Dumas C, Trick M, Cappadocia M (1997b) Involvement of SLR1 genes in pollen adhesion to the stigmatic surface in Brassicaceae. Sex. Plant Reprod. 10: 227-235

Luu DT, Marty-Mazars D, Trick M, Dumas C, Heizmann P (1999) Pollenstigma 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

Madey E, Nowack LM, Thompson JE (2001) Isolation and characterization of lipid in phloem sap of canola. Planta 214: 625-634

Maheshwari P (1950) An introduction to the embryology of angiosperms. McGraw-Hill, New York, USA

Majewska-Sawka A, Rodríguez-García MI (2006) Involvement of ER cisternae in the patterning of the pollen exine. Protoplasma 228: 41-47

Marentes E, Grusak MA (1998) Mass determination of low-molecular-weight proteins in phloem sap using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. J. Exp. Bot. 49: 903-911

Martinez-Pallé, Herrero M (1995) The ponticulus: a structure bridging pollen tube access to the ovule in Pistacia vera. Sex. Plant Reprod. 8: 217-222



Martins PCS (2006) Calidad de la flor en variedades portuguesas del olivo Olea europaea L. Master en Olivicultura y Elaiotecnia. Mediterranean Institute of Agronomy, University of Cordoba.

Matsuzaki T, Koiwai A, Nobumaro K (1983) Total fatty acid and polar lipid content in developing flower of Nicotiana tabacum. Plant Cell Physiol. 24: 199-206

Matthews MS, Gardner J, Sedgley M (1999) The proteaceous pistil: morphological and anatomical aspects of the pollen presenter and style of eight species across five genera. Ann. Bot. 83: 385-399

Mayfield JA, Preuss D (2000) Rapid initiation of Arabidopsis pollination requires the oleosin-domain protein GRP17. Nat. Cell Biol. 2: 128-130

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 (1994) Changes in cell wall architecture during cell elongation. J. Exp. Bot. 45: 1683-1691

McClure BA, Haring V, Ebert PR, Anderson MA, Simpson RJ, Sakiyama F, Clarke AE (1989) Style self-incompatibility gene products of Nicotianu alata are ribonucleases. Nature 342: 955-957

Miller EA, Lee MCS, Atkinson AHO, Anderson MA (2000) Identification of a novel four-domain member of the proteinase inhibitor II family from the stigmas of Nicotiana alata. Plant Mol. Biol. 42: 329-333

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

Moorkerjee S, Guerin J, Collins G, Ford C, Sedley M (2005) Paternity analysis using microsatellite markers to identify pollen donors in an olive grove. Theor. Appl. Genet. 111: 1174-1182

Moutier N (2002) Varietal sheet: Canyon (olive). Plant Genetics Breeding 30: 15

Murphy DJ (2006) The extracellular pollen coat in Brassicaceae: Ccomposition, biosynthesis and functions in pollination. Protoplasma 228: 31-39



Murphy DJ, Ross JH (1998) Biosynthesis, targeting and processing of oleosinlike proteins, which are major pollen coat components in Brassica napus. Plant J. 13: 1-16

Norman PM, Kjellbom P, Bradley DJ, Hahn MG, Lamb CJ (1990) Immunoaffinity purification and biochemical characterization of plasma membrane arabino-galactan rich glcoproteins of Nicotiana gutinosa. Planta 181: 365-373

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

Orlandi F, Romano B, Fornaciari M (2005a) Effective pollination period in olive (Olea europaea L.): A pollen monitoring application. Sci. Hortic. 105: 313–318

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 (1988) Amylogenesis and amylolysis during pollen grain development. In: Cresti M, Gori P, Pacini E (Eds.), Sexual reproduction in higher plants. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 181-186

Pacini E, Guarnieri M, Nepi M (2006) Pollen carbohydrates and water content during development, presentation, and dispersal: a short review. Protoplasma 228: 73-77

Pacini E, Juniper BE (1979a) The ultraestructure of pollen grain development in olive (Olea europaea) 1. Proteins in the pore. New Phytol. 83: 157-164

Pacini E, Juniper BE (1979b) The ultraestructure of pollen grain development in olive (Olea europaea) 2. Secretion by the tapetal cell. New Phytol. 83: 165-174

Pacini E, Viegi L (1995) Total polysaccharide content of developing pollen in two angiosperm species. Grana 34: 237-241



Pacini E, Vosa CG (1979) Scanning electrón microscopy análisis of exine patterns in cultivars of olive (Olea europaea L.). Ann. Bot. 44: 745-748

Palanivelu R, Brass L, Edlund AF, Preuss D (2003) Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an Arabidopsis gene that controls GABA levels. Cell 114: 47-59

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: 151-163

Parre E, Geitmann A (2005a) Pectin and the role of the physical properties of the cell wall in pollen tube growth of Solanum chacoense. Planta 220: 582-592

Parre E, Geitmann A (2005b) More than a leak sealant. The mechanical properties of callose in pollen tubes. Plant Physiol. 137: 274-286

Pennell R, Knox J, Scofield G, Selvendran R, Roberts K (1989) A family of abundant plasma membrane associated glycoproteins related to the arabinogalactan proteins is unique to flowering plants. J. Cell Biol. 108: 1967-1977

Pontikis CA, Loukas M, Kousounis G (1980) The use of biochemical markers to distinguish olive cultivars. J. Hort. Sci. 55: 333-343

Preuss D, Lemieux B, Yen G, Davis RW (1993) A conditional sterile mutation eliminates surface components from Arabidopsis pollen and disrupts cell signaling during fertilization. Genes Development 7: 974-985

Rallo L, Martin GC, Lavee S (1981) Relationship between abnormal embryo sac development and fruitfulness in olive. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106(6): 813-817

Rallo P, Martín A, Dorado G (2005) Identificación de variedades de olivo por marcadores moleculares (SSrS). En: Variedades del olivo en España (Libro III). 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, España

Rallo PM, Rapoport HF (2001) Early growth and development of olive fruit mesocarp. J. Hort. Sci. 76: 408-421

Rapoport HF, Rallo L (1991) Fruit set and enlargement in Fertilized and unfertilized olive ovaries. Hort. Sci. 26: 896-898



Rapopport HF (2004) Botánica y morfología. En: Barranco D, Fernandez-Escobar R, Rallo L (Eds.), El cultivo del olivo. Junta de Andalucía, Ediciones Mundi Prensa, Madrid pp. 37-62

Reale S, Doveri S, Díaz A, Angiolillo A, Lucentini L, Pilla F, Martín A, Donini P, Lee D (2006) SNP-Based markers for discriminating olive (Olea europaea L) Genome 46: 1193-1205

Reiter WD, Chapple C, Sommerville CR (1997) Mutants of Arabidopsis thaliana with altered cell wall polysaccharide composition. Plant J. 12: 235-245

Rodrigo J, Herrero M (1998) Influence of intraovular reserves on ovule fate in apricot (Prunus armeniaca L.). Sex. Plant Reprod. 11: 86-93

Rodrigo J, Herrero M (2002) The honest of fruiting in apricot (Prunus armeniaca L.). J. Appl. Bot. 76: 13-19

Rodrigo J, Hormaza JI, Herrero M (2000) Ovary starch reserves and flower development in apricot (Prunus armeniaca) Physiologia Plantarum 108: 35-41

Rodríguez-García MI, Alché JD, Hamman-Khalifa AM, Butowt R, Jiménez-López JC Wang W, Castro AJ (2004). Marcadores moleculares que se expresan en el fruto del olivo". En: "Difusión de resultados de investigación del programa de mejora de la calidad de la producción del aceite de oliva". Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, MEC. Madrid. p 205-211

Rodríguez-García MI, Fernandez MC, Alché JD (1995) 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, Fernandez MC, Alché JD, Olmedilla A (1995) Endoplasmic reticulum as a storage site for allergenic proteins in pollen grains of several Oleaceae". Protoplasma 197: 111-116

Rodriguez-Garcia Mi, M'Rani-Alaoui M, De La Flor Díaz J, Fernández MC (2003) 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 (2003) Behavior of storage lipids during pollen development and pollen grain germination of olive (Olea europaea L.). Protoplasma 221: 237-244



Rook F, Hadingham SA, Li YH, Bevan MW (2006) Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. Plant Cell Environ. 29: 426-434

Roselli G. (1979). Identificazione di cultivar di olivo da alcuni caratteri del polline. Rivista di Ortoflorofrutticoltura 63: 435-445

Roy S, Jauh YH, Hepler PK, Lord EM (1998) Effects of Yariv phenylglycoside on cell wall assembly in the lily pollen tube. Planta 240: 450-458

Rugini E, Lavee S (1992) Olive biotechnology of perennial fruits crops. Hammerschlag F, Littz ARE. CAB International, Wallingford, UK, pp. 371-382

RuiterRK, MettenmeyerT, Van LaarhovenD, Van Eldik GJ, Doughty J, Van Herpen MA, Schrauwen JAM, Dickinson HG, Wullems GJ (1997) Proteins of the pollen coat of Brassica oleracea. J. Plant Physiol. 150: 85-91

Rumyantseva NI (2005) Arabinogalactan proteins: involvement in plant growth and morphogenesis. Biochem. 70: 1073-1085

Russell SD (1993) The egg cell: development and role in fertilization and early embryogenesis. Plant Cell 5: 1349-1359

Sage TL, Bertin RI, Williams EG (1994) Ovarian and other lateacting selfincompatibility systems. In: Williams EG, Clarke AE, Knox RB (Eds.) Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants. Kluwer, Dordrecht, pp. 116-140

Sanchez AM, Bosch M, Bots M, Nieuwland J, Feron R, Mariani C (2004) Pistil factors controlling pollination. Plant Cell 16: S98-106

Sanders LC, Lord EM (1989) Directed movement of latex particles in the gynoecia of three species of flowering plants. Science 243: 1606-1608

Sanz-Cortés F, Martínez-Calvo J, Badenes ML, Bleiholder H, Hack H, Llacer G, Meier U (2002) Phenological growth stages of olive trees (Olea europaea). Ann. Appl. Biol. 140: 151-157

Sanzol J, Herrero M (2001) The effective pollination period in fruit trees. Sci. Hortic. 90: 1

Sanzol J, Rallo P, Herrero M (2003) Stigmatic receptivity limits the effective pollination period in "agua de Aranjuez" pear. J. Appl. Ecol. 38: 1032-1044


Schultz C, Gilson P, Oxley D, Youl J, Bacic A (1998) GPI-anchors on arabinogalactan-proteins: implications for signalling in plants. Trends Plant Sci. 3: 426-431

Sedgley M (1979) Structural changes in the pollinated and nonpollinated avocado stigma and style. J. Cell Sci. 38: 49–60

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

Shivanna KR (2003) Pollen biology and biotechnology. Science Publishers Inc., Enfield, USA

Smirnoff N, Pallanca JE (1996) Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. Biochem. Soc. Trans. 24: 472-478

Steer MW, Steer JM (1989) Pollen tube tip growth. New Phytol. 111: 323–358

Tangmitcharoen S, Owens JN (1997) Pollen viability and pollen tube growth following controlled pollination and their relation to low fruit production in teak (Tectona grandis Linn. F.). Ann. Bot. 80: 401-410

Tilton VR, Horner HT (1980) Stigma, style, and obturator of Ornithogalum caudatum (Liliaceae) and their function in the reproductive process. Am. J. Bot. 67: 1113-1131

Tous J, Romero A (1993) Variedades del olivo. Fundación "La Caixa", Barcelona, España.

Trujillo I, Rallo L, Arus P (1995). Identifying olive cultivars by isozyme analysis. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 120: 318-324

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, Martin A, Tous J, Trujillo I (Eds.). Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

Uwate WJ, Lin J (1981) Development of the stigmatic surface of Prunus avium L., sweet cherry. Am. J. Bot. 68: 1165-1176



Van Oosten JJ, Besford RT (1994) Sugar feeding mimics efects of acclimation to high CO2 -rapid downregulation of Rubisco small subunit transcripts but not of the large subunit transcripts. J. Plant Physiol. 143: 306-312

Vidal S, Doco T, Williams P, Pellerin P, York WS, O'Neill MA, Glushka J, Darvill AG, Albersheim P (2000). Structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II: Evidence for the backbone location of the aceric acid-containing oligoglycosyl side chain. Carbohydr. Res. 326: 277-294

Wang CY, Chiou CY, Wang HL, Krishnamurthy R, Venkatagiri S, Tan J, Yeh KW (2008) Carbohydrate mobilization and gene regulatory profile in the pseudobulb of Oncidium orchid during the flowering process. Planta 227: 1063–1077

Watson L, Dallwitz MJ (1992 onwards). The families of flowering plants: Descriptions, illustrations, ientification, and information retrieval. <u>http://biodiversity.uno.edu/delta/</u>

Weterings K, Russell SD (2004) Experimental analysis of the fertilization process. Plant Cell 16: S107-S118

Wheeler AW (1992) Hypersensitivity to the allergens of the pollen from the olive tree (Olea europaea). Clin. Exp. Allergy 22: 1052-1057

Wheeler MJ, Franklin-Tong VE Franklin FC (2001) The molecular and genetic basis of pollen-pistil interactions. New Phytol. 151: 565-584

Willats GT, Knox JP, Mikkelsen JD (2006) Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. Trends Food Sci. Tech 17: 97-10

Williams RR (1966) Pollination studies in fruit trees. III. The effective pollination period for some apple and pear varieties. Report of long Ashton Research Station for 1965: 136-138

Wing RA, Yamaguchi J, Larabell SK, Ursin VM, McCormick S (1989) Molecular and genetic characterization of two pollen-expressed genes that have sequence similarity to pectate lyases of the plant pathogen Erwinia. Plant Mol. Biol. 14: 17-28

Wolters-Arts M, Derksen J, Kooijman JW, Mariani C (1996) Stigma development in Nicotiana tabacum. Cell death in transgenic plants as a marker to follow cell fate at high resolution. Sex. Plant Reprod. 9: 243-254



Wolters-Arts M, Lush WM, Mariani C (1998) Lipids are required for directional pollen-tube growth. Nature 392: 818-821

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 HM, Wang H, Cheung AY (1995) A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. Cell 82: 395-403

Wu HM, Wong E, Ogdahl J, Cheung AY (2000) A pollen tube growthpromoting arabinogalactan protein from Nicotiana alata is similar to the tobacco TTS protein. Plant J. 22: 165-176

Yadegari R, Drews GN (2004) Female gametophyte development. Plant Cell 16: S133-S141

Yates IE, Sparks D (1993) Environmental regulation of anther dehiscence and pollen germination in pecan. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 118: 699-706

Yates IE, Sparks D (1994) Anatomy differs for aborting and non-aborting pistillate flowers in pecan. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 119:949-955.

Yi W, Law SE, Mccoy D, Wetzstein HY (2006) Stigma Development and Receptivity in Almond (Prunus dulcis). Ann. Bot. 97(1): 57-63

Yu Q, Hlavacka A, Matoh T, Volkmann D, Menzel D, Goldbach HE, Baluska F (2002) Short-term boron deprivation inhibits endocytosis of cell wall pectins in meristematic cells of maize and wheat root apices. Plant Physiol. 130: 415-421

Zinkl GM, Zwiebel BI, Grier DG, Preuss D (1999) Pollen-stigma adhesion in Arabidopsis: a species-specific interaction mediated by hydrophobic molecules in the pollen exine. Development 126: 5431-5440

Zinselmeier C, Westgate ME, Schussler JR, Jones RJ (1995) Low water potential disrupts carbohydrate metabolism in maize (Zea mays L.) ovaries. Plant Physiol. 107: 385–391

Zohary D, Spiegel-Roy P (1975) Beginnings of fruit growing in the old world. Science 187: 319-327

ARTÍCULOS PUBLICADOS





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

Patricia BARRAL*, Cinthya SUÁREZ†, Eva BATANERO*, Carlos ALFONSO‡, Juan de Dios ALCHɆ, María Isabel RODRÍGUEZ-GARCÍA†, Mayte VILLALBA*, Germán RIVAS‡ and Rosalía RODRÍGUEZ^{*1}

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040, Madrid, Spain, †Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Profesor Albareda 1, 18008, Granada, Spain, and ‡Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040, Madrid, Spain

CBMs (carbohydrate-binding modules) are the most common non-catalytic modules associated with enzymes active in plant cell-wall hydrolysis. They have been frequently identified by amino acid sequence alignments, but only a few have been experimentally established to have a carbohydrate-binding activity. A small olive pollen protein, Ole e 10 (10 kDa), has been described as a major inducer of type I allergy in humans. In the present study, the ability of Ole e 10 to bind several polysaccharides has been analysed by affinity gel electrophoresis, which demonstrated that the protein bound $1,3-\beta$ -glucans preferentially. Analytical ultracentrifugation studies confirmed binding to laminarin, at a protein/ ligand ratio of 1:1. The interaction of Ole e 10 with laminarin induced a conformational change in the protein, as detected by CD and fluorescence analyses, and an increase of 3.6 °C in the thermal

INTRODUCTION

Sexual reproduction in plants is initiated when a pollen grain settles on the stigma of the style in flowers and generates the pollen tube that delivers the male gametes to fertilize the eggs [1,2]. Although the biochemical mechanisms of this process have not been completely elucidated, it is known that it involves a diverse number of enzymatic activities. Among these, it is well established that proteins related to carbohydrate metabolism, such as callose synthases or expansins, have an important role in wall loosening and extension during pollen germination [3,4]. The pollen tube wall displays a characteristic primary wall composed largely of pectin, hemicellulose and cellulose, and a secondary callosic wall [2]. The pollen tube grows exclusively at the tip, which contains more methyl-esterified pectin than other wall regions distal to the tip wall [5-8]. Pollen germination also involves the secretion of proteins from the pollen grain or the pollen tube. In fact, imbibed pollen releases proteins present in the coat, in the wall, or secreted from the pollen interior. Some of these proteins have been described to induce type I allergy in humans [9].

Olive tree (*Olea europaea*) pollen is one of the main causes of allergy in Mediterranean countries, where this tree is widely cultivated. To date, ten allergens, named Ole e 1 to Ole e 10, have been isolated and characterized from this pollen [10–12]. Ole e 10, a small (10.8 kDa) and acidic (pI 5.8) protein, has been recently described as a major allergen from this pollen, since it affects more than 55 % of allergic patients [12]. The allergen was shown to be denaturation temperature of Ole e 10 in the presence of the glycan. These results, and the absence of alignment of the sequence of Ole e 10 with that of any classified CBM, indicate that this pollen protein defines a novel family of CBMs, which we propose to name CBM43. Immunolocalization of Ole e 10 in mature and germinating pollen by transmission electron microscopy and confocal laser scanning microscopy demonstrated the co-localization of Ole e 10 and callose $(1,3-\beta-glucan)$ in the growing pollen tube, suggesting a role for this protein in the metabolism of carbohydrates and in pollen tube wall re-formation during germination.

Key words: allergen, carbohydrate-binding module, $1,3-\beta$ -glucan, olive pollen, pollen germination.

implicated in IgE cross-reactivity among pollens, fruits and latex, suggesting the ubiquitous presence of Ole e 10-like proteins in different sources. Furthermore, the clinical relevance of Ole e 10 has been recently enhanced by the description of an association between asthma and sensitivity to Ole e 10 found in olive pollenallergic patients, pointing to a possible role of this allergen in the development and exacerbation of asthmatic processes [13].

Ole e 10 shows identity with amino acid sequences deduced from Arabidopsis thaliana genes, but protein products derived from the expression of these genes have not yet been reported, and their putative biological functions are unknown. Ole e 10 also shows similarity with the C-terminal domain (approx. 100 amino acid residues) of long 1,3- β -glucanases, which also have an N-terminal domain (approx. 300 amino acids in length) containing the catalytic site [11,14]. The C-terminal domain, the biological role of which is unknown, is absent from most 1,3- β -glucanases described to date [15]. Finally, Ole e 10 shows similarity with polypeptide segments - named Cys boxes of $1,3-\beta$ -glucanosyltransferases involved in yeast development: Epd (essential for pseudohyphal development) [16], Gas (glycophospholipid-anchored surface) [17-19] and Phr (pH-regulated) [20]. However, unlike these modules of glucanases and glucanosyltransferases, Ole e 10 is an independent protein that is not covalently attached to another polypeptide domain.

Enzymes that are implicated in carbohydrate metabolism usually consist of a catalytic domain plus one or several non-catalytic CBMs (carbohydrate-binding modules), which may enhance

Abbreviations used: AGE, affinity gel electrophoresis; bM_w, buoyant molar mass; CBM, carbohydrate-binding module; CLSM, confocal laser scanning microscopy; Epd, essential for pseudohyphal development; Gas, glycophospholipid-anchored surface; Phr, pH-regulated; TEM, transmission electron microscopy.

To whom correspondence should be addressed (email rrg@bbm1.ucm.es).

enzymatic activity by improving access to the substrate [21]. Although the first CBM definitions referred to non-catalytic sugarbinding domains from glycosyl hydrolases, this term also includes sugar-binding domains from structural proteins and some independent putative CBMs that are not directly appended to enzymatically active modules [21]. Based on similarities in primary structure, CBMs have been classified into 42 different families and grouped in the CAZy database (http://afmb.cnrs-mrs.fr/ CAZY).

In the present study, we analyse the biochemical activity of Ole e 10 by means of chemical, physical and spectroscopic experiments, as well as its cellular location by TEM (transmission electron microscopy) and CLSM (confocal laser scanning microscopy). The protein can be described as an independent CBM not linked to another polypeptide module, and represents the first member of a new CBM family, for which we propose the name CBM43.

EXPERIMENTAL

Materials

Ole e 10 was isolated from olive pollen as described previously [12]. Laminarin $(1,3-\beta$ -glucan, from *Laminaria digitata*), lichenan $(1,3/1,4-\beta$ -glucan, from *Cetraria islandica*) and CMcelullose $(1,4-\beta$ -glucan) were purchased from Sigma. Agarose $(1,3-\beta/1,4-\alpha$ -galactose) was purchased from Conda Labs. Laminarihexaose [$(1,3-\beta$ -glucan)₆] was purchased from Megazyme International.

Laminarin was subjected to MS analysis, for which the sample $(5 \mu g)$ was mixed with a matrix solution composed of saturated α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 30% (v/v) aqueous acetonitrile and 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid. Measurements were performed in a Bruker Reflex II matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometer (Bruker-Franzen Analytik) equipped with an ion source with visualization optics and a nitrogen laser (337 nm). The equipment was externally calibrated employing singly, doubly and triply charged signals from either cytochrome *c* (12360 Da) or BSA (66430 Da). Chains from 23 to 27 glucose units were identified as the major polysaccharide components of laminarin, although other minor constituents with lower and higher molecular masses were also present.

AGE (affinity gel electrophoresis)

The capacity of Ole e 10 to bind soluble polysaccharides was evaluated by AGE as described previously [22] with minor modifications. Briefly, native polyacrylamide gels were prepared, consisting of 15 % (w/v) acrylamide in 0.3 M Tris buffer, pH 8.8. Different amounts of saccharides (0.1–5 mg/ml) were added to the separating gel mixtures prior to polymerization. Ole e 10 (2 μ g) was electrophoresed at 25 mA/gel for 1 h at room temperature. Gels without ligand were run simultaneously under the same conditions. BSA (0.7 μ g; from Sigma) was used as a negative non-interacting control. Proteins were visualized by staining with Coomassie Blue R-250. The migration distances of both Ole e 10 and BSA were measured from the top of the gel, and these data were used to determine the dissociation constant (K_D) from plots of $1/(R_0 - r)$ against 1/*C* according to the affinity equation:

$$1/(R_0 - r) = 1/(R_0 - R_C)(1 + K_D/C)$$
(1)

where *r* is the relative migration distance of Ole e 10 in the gel in the presence of ligand, R_0 is the relative migration distance of free Ole e 10 in the absence of ligand, R_c is the relative migration

© 2005 Biochemical Society

distance of the complex at a high excess of ligand where all Ole e 10 molecules are fully complexed, *C* is the concentration of the ligand in the gel, and $K_{\rm D}$ is the dissociation constant of Ole e 10 for the ligand. $K_{\rm D}$ values were determined as the inverse of the absolute value of the intercept on the abscissa of data plotted according to the affinity equation. All migration distances of Ole e 10 were measured relative to the migration of the reference protein BSA.

Analytical ultracentrifugation analysis

The state of association of Ole e 10 alone (5.8 μ M) and in the presence of laminarin (1.23, 2.45 and 6.00 mM in glucose-equivalents units) was characterized by means of short-column (75 μ l) sedimentation equilibrium. The experiments were performed in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2, at 25 °C and 50000 g in an Optima XL-A analytical ultracentrifuge (Beckman-Coulter Inc.), equipped with absorbance optics, using an An-60Ti rotor and standard (12 mm optical path) double-sector centrepieces of Epon-charcoal. Absorbance scans at equilibrium were carried out at wavelengths at which the absorption of the sugar was negligible, and therefore only the protein gradient was monitored. Baseline offsets were measured afterwards at 200000 g.

Whole-cell weight-average bM_w (buoyant molar mass) values were obtained by fitting the experimental data to the equation for the radial concentration distribution of an ideal solute at sedimentation equilibrium, using the program EQASSOC supplied by Beckman-Coulter [23]. Analysis of the sedimentation equilibrium data for the mixtures of Ole e 10 with laminarin was performed assuming the linear approximation for the buoyant masses [24]:

$$bM_{w,C} = ibM_{w,P} + jbM_{w,L}$$
⁽²⁾

where $bM_{w,P}$ and $bM_{w,L}$ are the bM_w values for pure Ole e 10 (denoted by P) and pure laminarin (denoted by L) respectively, and C refers to the complex P_iB_j formed by *i* molecules of Ole e 10 and *j* molecules of laminarin (expressed as the equivalent number of molecules of glucose). The corresponding apparent weight-average molar masses (\overline{M}_w) were determined from the buoyant masses, taking into account the partial specific volumes of the protein (0.704 ml/g; obtained from the amino acid composition using the program SEDNTERP [25]) and of laminarin (because it is a 1,3- β -glucose polymer, we have used the value of 0.622 ml/g reported for glucose by Perkins et al. [26]).

CD analyses

CD spectra were obtained using a Jasco J-715 spectropolarimeter (Japan Spectroscopic Co.) fitted with a 150 W xenon lamp and connected to a Neslab RTE-111 thermostabilizer bath. Far-UV spectra of Ole e 10 (0.2 mg/ml), in absence or presence of laminarin (1 mg/ml), were registered in the range 190–250 nm using optical-path cell of 0.1 cm. Samples were analysed in 20 mM sodium phosphate, pH 7.2, at 25 °C. Mean residue mass ellipticities were calculated based on 106 Da as the average molecular mass/residue, obtained from the amino acid composition, and expressed in terms of θ (deg \cdot cm² \cdot dmol⁻¹). Final spectra were corrected by subtracting the corresponding baseline spectrum obtained for the buffer alone under identical conditions. Secondary structure estimations were performed by computer fit according to the method of Perczel et al. [27].

The temperature-induced denaturation of Ole e 10, in the absence or presence of laminarin (1 mg/ml), was monitored by CD measurements at 220 nm. The temperature was increased from 20 to 80 °C at 0.5 °C/min. Denaturation data are represented as the percentage denaturation of Ole e 10 in the absence and presence of laminarin at each temperature. These values were calculated by

considering the θ values at 20 and 80 °C as representing 0 % and 100 % denaturation respectively.

Denaturation curves were analysed using the two-state model. The difference in free energy (Gibbs energy) between the native and the denatured states, ΔG , was calculated using the equation:

$$\Delta G = -RT \ln K \tag{3}$$

where *R* is the gas constant (8.31 J/K per mol), *T* is the absolute temperature and *K* is the equilibrium constant. The corresponding thermodynamic parameters, T_m (the midpoint of the thermal denaturation curve), ΔH_m (the enthalpy change at T_m) and ΔS_m (the entropy change at T_m), were determined from plots of ΔG against *T*. In the midpoint of a thermal denaturation curve:

$$\Delta G = 0 = \Delta H_{\rm m} - T_{\rm m} \Delta S_{\rm m} \tag{4}$$

This gives ΔS_m as the slope of the plot of ΔG against *T* at T_m , and $\Delta H_m = T_m \Delta S_m$. The difference in the free energy change associated with the carbohydrate binding, $\Delta(\Delta G)$, was calculated as:

$$\Delta(\Delta G) = \Delta(T_{\rm m})\Delta S_{\rm m} = \Delta T_{\rm m}(\Delta H_{\rm m}/T_{\rm m})$$
⁽⁵⁾

where $\Delta(T_m)$ is the difference between the ΔT_m values measured for Ole e 10 in the presence and absence of carbohydrate, whereas ΔS_m and ΔH_m are values for the carbohydrate-free forms of the protein [28].

Fluorescence analysis

Fluorescence emission spectra were obtained using an SLM Aminco 8000 spectrofluorimeter at 25 °C in a 0.2 cm opticalpath cell, using 4 nm slits for both excitation and emission beams. The protein concentration was 4.6 μ M in Tris buffer, pH 8.8. Different amounts of laminarin (0, 3.6, 10.9, 18.2, 36.3, 72.6, 181.6, 290.5, 363.1 and 544.7 μ M) or laminarihexaose (0, 10.2, 30.8, 51.4, 102.9, 205.7 and 514.4 μ M) were added. Final spectra were corrected for protein concentration, and the corresponding baseline spectrum performed in the presence of the corresponding amount of carbohydrate was subtracted. The molar concentration of laminarin was calculated using a value of 17 glucose units as the average Ole e 10-carbohydrate bound structure, as determined from the ultracentrifugation analyses.

The titration curve for Ole e 10–carbohydrate binding was represented as the increase in fluorescence at 336 nm (ΔF_{336}), calculated from the emission spectra of Ole e 10 in the presence and absence of the sugar, with respect to the concentration of carbohydrate added to the sample. The data were analysed by non-linear regression using a standard single-site binding model, and the K_D value was calculated from the regressed data.

Pollen germination in vitro

Mature pollen grains were collected from selected *O. europaea* L. trees (cv. Picual) in Granada (Spain) during the anthesis period. Pollen was sieved through meshes of pore sizes 150 and 50 μ m in order to separate pollen grains from debris. Grains were then frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Stored pollen was pre-hydrated by incubation in a humid chamber at room temperature for 30 min and then transferred to Petri dishes (0.1 g/ plate) containing 10 ml of germination medium [10% (w/v) sucrose, 0.03% (w/v) Ca(NO₃)₂, 0.01% (w/v) KNO₃, 0.02% (w/v) MgSO₄ and 0.01% (w/v) boric acid]. Petri dishes were maintained at room temperature in the dark, and pollen samples were taken 8 h after the onset of the culture by transferring the culture to 1.5 ml disposable plastic tubes.

Immunolocalization of Ole e 10 by TEM and CLSM

For TEM studies, samples were processed as reported by Alché et al. [29], with minor modifications. Mature pollen grains were fixed for 4 h at 4 °C with 4 % (w/v) paraformaldehyde and 0.2 % (w/v) glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2. Samples were dehydrated in an ethanol series, gradually transferred to propylene oxide and embedded in Unicryl resin (BBInternational). Ultrathin sections (80 nm) were obtained using a Reichert–Jung ultramicrotome and then transferred on to formvar-coated 300-mesh nickel grids. Blocking of non-specific binding sites was carried out by incubation of sections for 15 min in a blocking solution containing 5% (w/v) BSA in PBS. Blocking was followed by incubation at room temperature for 2.5 h with a monoclonal antibody against Ole e 10, diluted 1:20 in blocking solution. After washing with PBS, the grids were treated for 2 h with a goat anti-(mouse IgG) secondary antibody coupled to 20 nm gold particles (BBInternational), diluted 1:30 in PBS. Finally, they were washed in PBS, rinsed in double-distilled water, and then stained for 10 min with 5 % (w/v) uranyl acetate. Observations were carried out using a Zeiss EM10C transmission electron microscope. Treatment of control sections was the same, except that incubation with the primary antibody was omitted.

For CLSM studies, in vitro-germinated pollen grains were separated from the culture medium by centrifugation (5000 g for 10 min) and fixed at 4 °C for 30 min in a solution containing 4 % (w/v) paraformaldehyde in washing buffer A (50 mM Tris/HCl, pH 6.8). After washing in buffer A, the samples were subjected to a permeation procedure by incubation in pre-cooled $(-20 \,^{\circ}\text{C})$ acetone for 10 min at -20 °C and further washing with buffer A. Samples were subsequently incubated at 4°C in the following solutions, using gentle shaking: blocking solution [5% (w/v) BSA, 1% (v/v) Triton X-100 prepared in washing buffer] for 10 min; washing solution B [1 % (v/v) Triton X-100 in washing buffer A], three changes of 10 min each; anti-Ole e 10 polyclonal antibody (diluted 1:50 in blocking solution) overnight; washing solution B as above; goat anti-(rabbit IgG) Cy3-conjugated secondary antibody (Sigma), diluted 1:500 in blocking solution, 2 h in the dark; and final rinses in washing solution B. Doublelabelling experiments with Ole e 10 and callose were carried out by additionally incubating the samples for 30 min with 0.025 mg/ ml sirofluor (Biosupplies) in distilled water after the immunolocalization protocol. Finally, samples were re-suspended in a CITIFLUOR/glycerol/PBS antifading solution (Sigma) and observed in a Nikon C1 confocal laser scanning microscope using a He/Ne laser (543 nm) for immunofluorescence (plus an Ar laser at 488 nm for double-labelling experiments). Negative controls were treated in the same way, except that the primary antibody was omitted.

RESULTS

Binding experiments using AGE

AGE with non-denaturing gels was used to analyse the ability of Ole e 10 to bind specifically to soluble polysaccharides (Figure 1). The analysis revealed an interaction between Ole e 10 and laminarin, and a slight retardation in the presence of CM-cellulose. No binding to agarose or lichenan was detected, indicating a preferential interaction between Ole e 10 and $1,3-\beta$ -glucans.

Quantitative binding of Ole e 10 to soluble polysaccharides was evaluated by AGE in the presence of various amounts of laminarin (Figure 2). The reciprocal relative migration distance $1/(R_0 - r)$ was plotted against the carbohydrate concentration. The K_D for the binding of Ole e 10 to the ligand under the conditions described



Figure 1 Qualitative AGE analysis of the interaction of Ole e 10 with soluble polysaccharides

Ole e 10 (2 μ g) and BSA (0.7 μ g) were electrophoresed on non-denaturing polyacrylamide gels containing polysaccharide (1 mg/ml) or no polysaccharide (–).



Figure 2 Quantitative AGE with laminarin as ligand

Ole e 10 and BSA were subjected to non-denaturing gel electrophoresis on gels containing different concentrations of laminarin. The data obtained were plotted using the equation described in the Experimental section.

was determined as the inverse of the absolute value of the intersect of the plot with the abscissa. According to this method, the $K_{\rm D}$ for the binding to laminarin was determined to be 0.79 mg/ml.

Analytical ultracentrifugation

Figure 3 plots the sedimentation equilibrium gradients of Ole e 10 $(5.8 \,\mu\text{M})$ alone and in the presence of laminarin (2.45 mM in glucose-equivalent units), and shows the effect of the sugar on protein behaviour. In the absence of laminarin. Ole e 10 sedimented at equilibrium as a single species with a best-fit bM_w of 3300 ± 100 (Figure 3, open circles) which, after buoyancy correction, is compatible with the expected molar mass of the Ole e 10 monomer on the basis of its amino acid composition (10785 Da). Addition of laminarin $[bM_w = 1545, calculated from the molar mass of$ the major component of the sugar (4094 Da) determined by MS] to the Ole e 10 solution modified the sedimentation behaviour of the protein: the gradient was steeper than for the protein alone, corresponding to a bM_w of approx. 4400 \pm 100 (Figure 3). This value is compatible with the formation of a complex between one Ole e 10 molecule and approx. 17 molecules of glucose. From these results, assuming that Ole e 10 binds laminarin molecules with 17 glucose units, the $K_{\rm D}$ value for the binding of Ole e 10 to laminarin obtained by AGE would be 290 μ M.

Figure 4 summarizes the effect of laminarin concentration upon the binding of the sugar to the Ole e 10 protein. At the lowest concentration of laminarin added to the protein (1.23 mM glucose-equivalent units) the amount of sugar bound to Ole e 10 was approx. 15 glucose units, a value that changed only slightly with increasing amounts of laminarin, reaching 18 ± 1 glucose units at the highest concentration of sugar used (6 mM).



Figure 3 Analytical ultracentrifugation analysis

Sedimentation equilibrium gradients (50000 g, 25 °C) are shown for Ole e 10 alone (\bigcirc) and in the presence of laminarin (grey circles). The solid lines show the corresponding best-fit gradients for a single sedimenting species at sedimentation equilibrium (with b M_w values for the protein and the protein–laminarin complex of 3300 \pm 100 and 4400 \pm 100 respectively). The concentrations of protein and laminarin were 5.8 μ M and 2.8 mM in equivalent glucose units respectively.



Figure 4 Binding of laminarin to Ole e 10 as assessed by sedimentation equilibrium

The amount of sugar bound to the protein was calculated from the change in the bM_w of Ole e 10 upon the addition of laminarin, as described in the Experimental section. The solid line is drawn to show the trend of the data.

Spectroscopic analysis

The content of regular elements of secondary structure in Ole e 10 was determined by obtaining its far-UV CD spectrum in the absence and in the presence of laminarin (Figure 5A). Laminarin induced a modification in the shape of the spectra of Ole e 10 and in the molar ellipticity values, indicating a change in the secondary structure of the protein. Application of the convex-constraint-analysis method of Perczel et al. [27] to these spectra allowed the quantification of this change in secondary structure composition (Table 1). Thermal denaturation curves for Ole e 10 in the presence or absence of laminarin (Figures 5B and 5C) revealed that the interaction with the carbohydrate increased the stability of Ole e 10, since the T_m value determined in the presence of laminarin (61.2 °C) was higher than that obtained in the



Figure 5 CD analyses of Ole e 10 in the presence of laminarin

(A) Far-UV (190–250 nm) CD spectra of Ole e 10 in absence (black circles) or presence (grey circles) of laminarin. Temperature-induced denaturation of Ole e 10 in the absence (black line) or presence (grey line) of laminarin was monitored by CD measurements at 220 nm (B) and expressed as percentage denaturation (C).

Table 1 Secondary structure composition of Ole e 10 determined from CD spectra

	Secondary structure content of Ole e 10 (%)	
	Ole e 10 alone	Ole e 10 + laminarin
α-Helix	17	15
β -Sheet	33	37
Turn	21	21
Coil	29	27

absence of the glucan (57.6 °C). The application of the twostate model to the denaturation process allowed us to determine a change in ΔG of 2.1 kJ/mol for the interaction of Ole e 10 with laminarin (Table 2).

To analyse the influence of carbohydrate binding on the tertiary structure of Ole e 10, fluorescence emission spectra of the protein in the absence and presence of different amounts of laminarin were recorded (Figure 6). Changes in the surroundings of the two Trp residues of Ole e 10 [12] were analysed by measurement of the fluorescence intensity values after excitation of the samples at 295 nm (Figure 6). Ole e 10 fluorescence emission spectra in the absence of laminarin showed two maxima (around 328 and 336 nm), indicating a different polarity in the local environment of both Trp residues. The addition of increasing amounts of laminarin induced a modification in the shape of the plot and a decrease in the fluorescence ratio at the maximum emission value for both Trp residues (F_{336}/F_{328}) (Figure 6, inset). This could indicate that the Ole e 10–carbohydrate interaction affects the two

Table 2 Energetic parameters calculated from the denaturation curves of Ole e 10 in the presence or absence of laminarin

 ΔS_m is the slope of the plot of ΔG against T at T_m . ΔH_m is given by $\Delta H_m = T_m(K)\Delta S_m$. T_m represents the midpoint of the thermal denaturation curve. $\Delta(T_m)$ is the difference between the T_m values measured for the protein with and without carbohydrate. $\Delta(\Delta G)$ is given by $\Delta(\Delta G) = \Delta(T_m)\Delta S_m = \Delta(T_m)(\Delta H_m/T_m)$, where ΔS_m and ΔH_m are values for the forms of the protein without carbohydrate.

e 10 alone Ole e 10 + laminarin
4.5 996.7
5.6 333.2
7.6 61.2
3.6 3.6
2.1 2.1



Figure 6 Fluorescence analysis of Ole e 10 in the presence of laminarin

Shown are fluorescence emission spectra (300–450 nm) of Ole e 10 after excitation at 295 nm, in the presence of different amounts of laminarin (μ M): 0 (\odot), 10.9 (\bigcirc), 18.2 (∇) and 72.6 (∇). Inset: increase in fluorescence intensity (\odot) at 336 nm determined from Ole e 10 emission spectra against laminarin concentration; the fluorescence intensity ratio (\bigcirc) at the maximum emission value for both Trp residues (F_{336}/F_{328}) is also shown. Carbohydrate concentrations were calculated assuming that Ole e 10 binds laminarin molecules with 17 glucose units.

Trp residues in different ways. The variation of the fluorescence intensity at 336 nm dependent on the laminarin concentration (Figure 6, inset) showed a saturating behaviour. From these results, assuming that Ole e 10 binds laminarin molecules with 17 glucose units, the estimated K_D for the Ole e 10–laminarin interaction in soluble conditions would be 88 μ M. Fluorescence emission spectra of Ole e 10 in the presence of different amounts of laminarihexaose were also obtained, but no differences in the spectra were detected.

Immunolocalization of Ole e 10 in mature and germinating olive pollen

In the mature pollen grain (Figure 7A), Ole e 10 epitopes were localized in the cytoplasm of the vegetative cell. Gold particles were observed mainly inside Golgi-derived vesicles. The pollen cell walls (intine and exine), the generative cell and both nuclei were practically free of gold particles. No gold labelling was found in control sections prepared by omitting the primary antibody (Figure 7B).

Figure 8 illustrates the double localization of Ole e 10 and callose by CLSM. Labelling of callose in the pollen tube by the fluorescent probe Sirofluor appeared as a greenish fluorescence occurring mainly in the tube plugs (Figure 8) and the thin innermost layer of the pollen tube wall, adjacent to the plasmalemma.





(A) Gold particles are localized inside Golgi-derived vesicles in the cytoplasm of the vegetative cell (unlabelled arrows). The pollen cell walls, the generative cell and both nuclei are devoid of labelling. (B) Control section prepared by omitting the primary antibody. Only a few particles are present. Ex, exine; GCy, generative cell cytoplasm; GN, generative cell nucleus; In, intine; L, lipids; VCy, vegetative cell cytoplasm; VN, vegetative cell nucleus. Bars represent 1 μ m.

Callose plugs were present in the pollen tube at intervals, and ranged in number between one and four. Immunofluorescence labelling of Ole e 10 became visible as red fluorescence located in the outermost layer of the pollen tube wall, frequently forming dense red spots (Figure 8C). The cytoplasm of the pollen tube also displayed red fluorescence, which co-localized with callose and therefore appeared as yellowish fluorescence. Negative control sections (not shown) did not exhibit significant fluorescence above background levels.

DISCUSSION

Ole e 10 has been described recently as a major olive pollen allergen, and represents the first isolated and characterized member of a new family of plant proteins whose biochemical activity was previously unknown [12]. In the present study, the ability of Ole e 10 to bind soluble polysaccharides has been demonstrated. In the absence of similar CBMs reported to date, Ole e 10 can be described as the first member of a novel family of CBMs, for which we propose the name CBM43, according to the classification of the CAZy database. Ole e 10 binds specifically 1,3- β glucans, with K_D values for the Ole e 10–laminarin interaction of 290 μ M (as assessed by AGE) and 88 μ M (by fluorescence). The monomeric state of Ole e 10 in its binding to laminarin was confirmed by analytical ultracentrifugation, which demonstrated a 1:1 stoichiometry for the Ole e 10–carbohydrate interaction.

Although most CBMs described to date exist as modules of larger enzymes, some non-catalytic carbohydrate-binding proteins contain free CBMs. This is the case for cellulosomal scaffolding proteins (CBM3), several independent putative CBMs (family 18), and NCP1 protein from the anaerobic fungus *Piromyces equi* (CBM29) [30]. These CBMs essentially act as scaffolding proteins, being present in multi-enzyme complexes implicated in carbohydrate metabolism, such as the cellulase–hemicellulase complex, in which the CBMs may mediate carbohydrate attachment [30]. In this context, Ole e 10 could act as a CBM to regulate the activity of different enzymes. On the other hand, Ole e 10 shows sequence identity with the non-catalytic C-terminal do-



Figure 8 CLSM co-localization of Ole e 10 and callose materials in olive pollen grains germinating *in vitro*

(A, B) Germinating olive pollen grain showing a callose plug (CP) observed by differential interferential contrast plus CLSM (A) and CLSM only (B). Optical sections show greenish fluorescence localized in the CP and the innermost layer of the pollen tube wall. Red autofluorescence can be observed in the pollen exine (filled stars). (C) High-magnification CLSM optical section of a pollen tube with a CP. Both the CP and the innermost layer of the pollen tube wall (thick short arrows) are intensely stained by Sirofluor. Ole e 10 is located in the outermost layer of the pollen tube wall, frequently forming dense red spots (thin long arrows), and in the pollen tube cytoplasm, co-localizing with callose and therefore appearing as yellowish fluorescence (empty stars)

mains of plant 1,3- β -glucanases [11,14,15] (27–53% identity, 44–69% similarity) and with Cys-box domains from yeast glucanosyltransferases [16–20] (Gas, Epd and Phr families; 23% identity, 40–43% similarity) of unknown biological or biochemical functions [12]. This similarity suggests a similar functional role for the two polypeptides in acting as CBMs facilitating ligand accessibility to the catalytic site, with Ole e 10-like proteins operating as free molecules (e.g. as a subunit of polymeric protein complexes) and Cys-box domains of glucanases and glucanosyltransferases fulfilling the same function as covalently bound domains. Finally, based on their identity with Ole e 10 [12], these Ole e 10-like domains could be included in this new CBM43 family.

The structural changes that occur in Ole e 10 during its interaction with carbohydrates have been studied by employing spectroscopic analyses. CD experiments demonstrated a slight but significant change in the secondary structure of Ole e 10 in the presence of laminarin. This change is in agreement with the fact that CBMs appear to have pre-formed carbohydrate recognition sites that mirror the solution conformations of their target sugars [21]. In addition, fluorescence studies showed a change in the environment of aromatic residues of Ole e 10, as a consequence of the interaction with the carbohydrate. Boraston et al. [21] have recently reported that the side chains of tryptophan, tyrosine and, less commonly, phenylalanine residues usually form the hydrophobic platforms in CBM binding sites. As an example, a conserved core with three aromatic residues has been implicated in protein–carbohydrate interactions of Cel9B from *Cellulomonas fimi* and Lam16A from *Thermotoga maritime* (family 4) [31]. On the other hand, most of the aromatic residues of Ole e 10 are highly conserved in the similar domains in plant $1,3-\beta$ -glucanases and yeast glucanosyltransferases [12]. This conservation in different proteins and different organisms supports a role in carbohydrate binding.

The biochemical activity of Ole e 10 established at this point may also help to explain certain aspects of its biological role in the pollen grain. The involvement of carbohydrates in pollen germination and pollen tube growth is well known. Among these, callose (1,3- β -glucan), one of the major components of the pollen tube wall, is deposited behind the tube tip as an inner-wall layer, and also forms the plugs that traverse older regions of the pollen tube. Localization of Ole e 10 within the mature pollen grain (inside Golgi-derived secretory vesicles) and its co-localization with callose materials in the pollen tube cytoplasm indicate the presence of dynamic changes in the localization of the protein, which is most probably secreted to the pollen tube wall upon pollen germination and pollen tube growth. Although the mechanisms underlying carbohydrate metabolism during pollen tube growth are not completely clear, a diverse number of enzymatic activities must be implicated in the synthesis and degradation of components of the pollen wall. At this level, the involvement of a callose synthase activity during pollen tube growth is well established [3,32], but less is known about the possible role of degradative enzymes such as $1,3-\beta$ -glucanases. Detailed analyses of the expression of $1,3-\beta$ -glucanases have indicated that these proteins are not normally expressed in the microspore or the pollen interior, but in the anther [9,33]. However, the expression of two exo- β -glucanases (LP-exo I and LP-exo II) in both the pollen grain and the pollen tube of the lily (Lilium longiflorum) has been reported recently [34]. These glucanases are secreted into the cell walls of the lily pollen tube, and a possible role in the regulation of pollen tube elongation, via hydrolysis of callose and 1,3:1,4- β -glucan within the pollen tube walls, has been suggested. Our results regarding the immunolocalization of Ole e 10 in the outermost layer of the pollen tube wall, close to the adjacent innermost callose wall, suggest the participation of the protein in this kind of process. Thus Ole e 10 could act as a carbohydrate-binding protein that interacts with $1,3-\beta$ -glucans and regulates the enzymatic activity of proteins implicated in cell wall synthesis/degradation during pollen germination, as a part of a multi-protein complex similar to that described for the cellulasehemicellulase complex.

Finally, elucidation of the biochemical activity of Ole e 10 and its localization in the pollen grain could help to explain the immunological behaviour of the protein. Although Ole e 10 has been described as a prevalent allergen, preliminary observations reported a low intrinsic antigenicity for this molecule [12]. This fact, added to the retardation in the release of Ole e 10 from the pollen cell after hydration – although the protein is highly soluble per se – were interpreted on the basis that the allergen may be expelled from the pollen linked to a particle that behaves as a carrier, thus increasing its potential antigenicity [12]. In this sense, several studies have shown an adjuvant activity of carbohydrates in the development of the allergic response [35,36]. These authors described the role of different kinds of particles (mainly starch granules) that act as carriers for grass pollen allergens and facilitate their access to the respiratory tract. However, this mechanism would not be applicable to olive pollen, as ultrastructural studies

carried out on this pollen [37] have determined that it does not display significant amounts of starch granules. Nevertheless, the biochemical activity of Ole e 10, its co-localization with carbohydrate particles in the pollen, as well as the effects of the inhalation of $1,3-\beta$ -glucans reported in humans (in which these carbohydrates promote airway allergic responses [38] and cause respiratory symptoms [39]), support the hypothesis of a interaction of Ole e 10 with some type of carbohydrate carrier such as $1,3-\beta$ -glucan polymers that could increase its antigenic potential and contribute to eliciting asthmatic reactions in allergic patients [13].

In conclusion, Ole e 10 defines a new family of CBMs, for which we suggest the name CBM43. The sequence identity described between Ole e 10 and the non-catalytic domains of $1,3-\beta$ -glucanases and glucanosyltransferases supports the inclusion of these domains into this CBM family, although their carbohydrate-binding capabilities must be demonstrated.

This work was supported by grant SAF2002-02711 from the Dirección General de Investigación (Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain). We thank Professor J. G. Gavilanes and Professor A. Martínez del Pozo for useful experimental advice for spectroscopic analyses.

REFERENCES

- Mascarenhas, J. P. (1993) Molecular mechanisms of pollen tube growth and differentiation. Plant Cell 5, 1303–1314
- 2 Li, Y.-Q., Moscatelli, A., Cai, G. and Cresti, M. (1997) Functional interactions among cytoskeleton, membranes, and cell wall in the pollen tube of flowering plants. Int. Rev. Cytol. **176**, 133–199
- 3 Schlüpmann, H., Bacic, A. and Read, S. M. (1993) A novel callose synthase from pollen tubes of *Nicotiana*. Planta **191**, 470–481
- 4 Cosgrove, D. J. (2000) Loosening of plant cell walls by expansins. Nature (London) 407, 321–326
- 5 Taylor, L. P. and Hepler, P. K. (1997) Pollen germination and tube growth. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48, 461–491
- 6 Franklin-Tong, V. E. (1999) Signalling and the modulation of pollen tube growth. Plant Cell **11**, 727–738
- 7 Hepler, P. K., Vidali, L. and Cheung, A. Y. (2001) Polarized cell growth in higher plants. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 17, 159–187
- 8 Shivanna, K. R. (2003) *In vitro* pollen germination and pollen tube growth. In Pollen Biology and Biotechnology, p. 69, Science Publishers, Inc., Enfield, NH
- 9 Suen, D. F., Wu, S. S., Chan, H. C., Dhugga, K. S. and Huang, A. H. (2003) Cell wall reactive proteins in the coat and wall of maize pollen: potential role in pollen tube growth on the stigma and through the style. J. Biol. Chem. **278**, 43672–43681
- Rodríguez, R., Villalba, M., Monsalve, R. I. and Batanero, E. (2001) The spectrum of olive pollen allergens. Int. Arch. Allergy Immunol. **125**, 185–195
- 11 Huecas, S., Villalba, M. and Rodríguez, R. (2001) Ole e 9, a major olive pollen allergen is a 1,3-β-glucanase. Isolation, characterization, amino acid sequence, and tissue specificity. J. Biol. Chem. 276, 27959–27966
- 12 Barral, P., Batanero, E., Palomares, O., Quiralte, J., Villalba, M. and Rodríguez, R. (2004) A major allergen from pollen defines a novel family of plant proteins and shows intra- and interspecies cross-reactivity. J. Immunol. **172**, 3644–3651
- 13 Quiralte, J., Llanes, E., Barral, P., Arias de Saavedra, J. M., Sáenz de San Pedro, B., Villalba, M., Florido, J. F., Rodríguez, R., Lahoz, C. and Cárdaba, B. (2005) Ole e 2 and Ole e 10: new clinical aspects and genetic restrictions in olive pollen allergy. Allergy 60, 360–365
- 14 Palomares, O., Villalba, M. and Rodríguez, R. (2003) The C-terminal segment of the 1,3-β-glucanase Ole e 9 from olive (*Olea europaea*) pollen is an independent domain with allergenic activity: expression in *Pichia pastoris* and characterization. Biochem. J. 369, 593–601
- 15 Leubner-Metzger, G. and Meins, Jr, F. (1999) Functions and regulation of plant β-1,3-glucanases (PR-2). In Pathogenesis-related Proteins in Plants (Datta, S. K. and Muthukrishnan, S., eds.), pp. 49–76, CRC Press, Boca Raton, FL
- 16 Nakazawa, T., Horiuchi, H., Ohta, A. and Takagi, M. (1998) Isolation and characterization of EPD1, an essential gene for pseudohyphal growth of a dimorphic yeast, *Candida maltosa*. J. Bacteriol. **180**, 2079–2086
- 17 Vai, M., Gatti, E., Lacana, E., Popolo, L. and Alberghina, L. (1991) Isolation and deduced amino acid sequence of the gene encoding gp115, a yeast glycophospholipid-anchored protein containing a serine-rich region. J. Biol. Chem. 266, 12242–12248

- 18 Nuoffer, C., Horvath, A. and Riezman, H. (1993) Analysis of the sequence requirements for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Saccharomyces cerevisiae* Gas1 protein J. Biol. Chem. **268**, 10558–10563
- 19 Popolo, L. and Vai, M. (1999) The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. Biochim. Biophys. Acta 1426, 385–400
- 20 Mühlschlegel, F. A. and Fonzi, W. A. (1997) PHR2 of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene PHR1 with an inverted pattern of pH-dependent expression. Mol. Cell. Biol. **17**, 5960–5967
- 21 Boraston, A. B., Bolam, D. N., Gilbert, H. J. and Davies, G. J. (2004) Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. Biochem. J. 382, 769–781
- 22 Tomme, P., Creagh, A. L., Kilburn, D. G. and Haynes, C. A. (1996) Interaction of polysaccharides with the N-terminal cellulose-binding domain of *Cellulomonas fimi* CenC 1. Binding specificity and calorimetric analysis. Biochemistry **35**, 13885–13894
- 23 Laue, T. M., Shah, B. D., Ridgeway, T. M. and Pelletier, S. L. (1992) Interpretation of analytical sedimentation data for proteins. In Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science (Harding, S., Rowe, A. and Horton, J., eds.), pp. 90–125, Royal Society of Chemistry, Cambridge, U.K.
- 24 Minton, A. P. (1994) Conservation of signal: a new algorithm for the elimination of the reference concentration as an independently variable parameter in the analysis of sedimentation equilibrium. In Modern Analytical Ultracentrifugation (Schuster, T. M. and Sauer, T. M., eds.), pp. 81–93, Birkhäuser, Boston, MA
- 25 Minton, A. P. (1997) Alternative strategies for the characterization of associations in multicomponent solutions via measurement of sedimentation equilibrium. Prog. Colloid Polym. Sci. **107**, 11–19
- 26 Perkins, S. J., Miller, A., Hardingham, T. E. and Muir, H. (1981) Physical properties of the hyaluronate binding region of proteoglycan from pig laryngeal cartilage. Densitometric and small-angle neutron scattering studies of carbohydrates and carbohydrate-protein macromolecules. J. Mol. Biol. **150**, 69–95
- 27 Perczel, A., Hollosi, M., Tusnady, G. and Fasman, G. D. (1991) Convex constraint analysis: a natural deconvolution of circular dichroism curves of proteins. Protein Eng. 4, 669–679
- 28 Becktel, W. J. and Schellman, J. A. (1987) Protein stability curves. Biopolymers 26, 1859–1877

Received 16 March 2005/6 May 2005; accepted 10 May 2005 Published as BJ Immediate Publication 10 May 2005, doi:10.1042/BJ20050456

- 29 Alché, J. D., Castro, A. J., Olmedilla, A., Fernández, M. C., Rodríguez, R., Villalba, M. and Rodríguez-García, M. I. (1999) The major olive pollen allergen (Ole e I) shows both gametophytic and sporophytic expression during anther development, and its synthesis and storage takes place in the RER. J. Cell Sci. **112**, 2501–2509
- 30 Freelove, A. C. J., Bolam, D. N., White, P., Hazlewood, G. P. and Gilbert, H. J. (2001) A novel carbohydrate-binding protein is a component of the plant cell wall-degrading complex of *Piromyces equi*. J. Biol. Chem. **46**, 43010–43017
- 31 Boraston, A. B., Nurizzo, D., Notenboom, V., Ducros, V., Rose, D. R., Kilburn, D. G. and Davies, G. J. (2002) Differential oligosaccharide recognition by evolutionarily-related β -1,4 and β -1,3 glucan-binding modules. J. Mol. Biol. **319**, 1143–1156
- 32 Schlüpmann, H., Bacic, A. and Read, S. M. (1994) Uridine diphosphate glucose metabolism and callose synthesis in cultured pollen tubes of *Nicotiana alata* Link et Otto. Plant Physiol. **105**, 659–670
- 33 Bucciaglia, P. A. and Smith, A. G. (1994) Functional analysis of a β -1,3-glucanase gene (Tag1) with anther-specific RNA and protein accumulation using antisense RNA inhibition Plant Mol. Biol. **24**, 903–914
- 34 Takeda, H., Yoshikawa, T., Liu, X.-Z., Nakagawa N., Li Y.-Q. and Sakurai, N. (2004) Molecular cloning of two exo-β-glucanases and their in vivo substrates in the cell walls of lily pollen tubes. Plant Cell Physiol. 45, 436–444
- 35 Schappi, G. F., Taylor, P. E., Staff, I. A., Roland, J. M. and Suphioglu, C. (1999) Immunologic significance of respirable atmospheric starch granules containing major birch allergen Bet v 1. Allergy 54, 478–483
- 36 Suphioglu, C., Singh, M. B., Taylor, P., Bellomo, R., Holmes, P., Puy, R. and Knox, R. B. (1992) Mechanism of grass-pollen-induced asthma. Lancet **339**, 569–572
- 37 Rodríguez-García, M. I., M'rani-Alaoui, M. and Fernández, M. C. (2003) Behavior of storage lipids during development and germination of olive (*Olea europaea* L.) pollen. Protoplasma 221, 237–244
- 38 Wan, G.-H., Li, C.-S., Guo, S.-P., Rylander, R. and Lin, R.-H. (1999) An airbone mold-derived product, β-1,3-D-glucan, potentiates airway allergic responses. Eur. J. Biochem. 29, 2491–2497
- 39 Rylander, R. and Lin, R.-H. (2000) $(1 \rightarrow 3)$ - β -D-glucan relationship to indoor air-related symptoms, allergy and asthma. Toxicology **152**, 47–52

ORIGINAL ARTICLE

Structural organization and cytochemical features of the pistil in Olive (*Olea europaea* L.) cv. Picual at anthesis

I. Serrano · C. Suárez · A. Olmedilla · H. F. Rapoport · M. I. Rodríguez-García

Received: 23 May 2007/Accepted: 8 March 2008/Published online: 2 April 2008 © Springer-Verlag 2008

Abstract Pistil structure and composition are critical in recognizing and permitting the germination of suitable pollen grains. We have studied the structure of the different component tissues of the pistil, their organization and cytochemical features of olive flowers, Olea europaea L., at anthesis, an essential first step for understanding the processes of pollen-pistil interaction and fertilization. The pistil from olive cv. Picual trees is characterized by a wet bilobed stigma, a solid style and a bilocular ovary containing four ovules. The stigma is composed of external multicellular papillae and a non-papillate inner region of secretory cells. An exudate is observed on the surface of the papillae at anthesis, the moment when the flowers (first) open, but the anthers are not yet dehiscent. The inner secretory cells of the stigma and those of the stylar transmitting tissue are continuous, constituting a funnel-shaped zone which extends from within the stigma to the style base. The outer surface of the ovary and style epidermis is surrounded by a cuticle layer, while internally, the locule wall, formed by the innermost cells of the endocarp, consists of two layers of periclinally oriented cells with thicker

Communicated by Scott Russell.

I. Serrano and C. Suárez participated equally in this study and should both be considered as principal authors.

I. Serrano \cdot C. Suárez \cdot A. Olmedilla \cdot

M. I. Rodríguez-García (⊠) Department of Biochemistry, Cell and Molecular Biology of Plants, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain e-mail: mariaisabel.rodriguez@eez.csic.es

H. F. Rapoport

Department of Crop Protection, Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, P.O. Box 4084, 14080 Córdoba, Spain cell walls. Starch granules are distributed differentially, concentrated most densely in the style (adjacent to the vascular bundles), in the distil region of the ovary, and in the micropylar ends of the ovules. Well-developed vascular bundles are present in the lower part of the stigma, the style and in the pericarp of the ovary. The histochemical identification of sugars and lipid substances within and around the vascular bundles suggests that they are involved in the transport of these materials. Ultrastructural observations confirm the presence of exudates on the papillar surface and confirm the secretory characteristics of the inner stigmatic cells. They also demonstrate marked differences in size, form, and vacuolar and cytoplasmic contents among the cells of the various style and upper ovary tissues. We provide the first detailed cytological description at anthesis of all the olive pistil tissues, indicating the structural and cytochemical basis for the pistil behavior which will transpire during the progamic phase.

Keywords Olea europaea · Flower anthesis · Pistil · Structure · Cytochemistry

Introduction

One of the unique features of sexual reproduction in flowering plants is the interaction of the male gametophyte—the pollen grain and tube—with the sporophytic tissues of the pistil, before releasing the male gametes in the vicinity of the egg nucleus. In angiosperms, the pistil tissues provide both physical and chemical support and directional guidance to the pollen tube growth process (Knox 1984). The progamic phase is temporally correlated with the progression of the pollen tube from the hydration of the pollen grain, the germination and penetration of the pollen tube in the stigma, and culminates with the delivery of the sperm cells into the embryo sac. Among factors implicated in the potential success of fertilization include stigma receptivity to pollen germination, dynamics of pollen tube growth through the style and longevity of ovular receptivity (Sanzol and Herrero 2001). Thus it is important to determine the features of the pistil tissues at flower anthesis in order to characterize the receptive stigma, the length and nutritional support of the style and the degree of embryo sac maturation.

During the progamic phase the pistil tissues can recognize male gametes through cell signalling (De Graaf et al. 2001) and are also able to discriminate between desirable and undesirable pollen grains, in order to accept that from the appropriate species, while rejecting pollen from unrelated species or from the same plant in self-incompatible (SI) species (Edlund et al. 2004). The SI response, comprises a self-/nonself-recognition process between pollen and pistil, followed by selective inhibition of the self-pollen (tube) development, is one of the most important systems to prevent inbreeding and to generate and maintain genetic diversity (De Nettancourt 2001).

The olive tree, *Olea europaea* L., traditionally has been considered as self-compatible or partially self-incompatible (Fernández-Bolaños and Frías 1969). However, the results of compatibility tests in olive cultivars are quite contradictory (Bartolini and Guerriero 1995; Cuevas and Polito 1997; Cuevas 2005), varying particularly between researchers, years, and locations (Cuevas et al. 2001; Lavee et al. 2002). Recent studies using paternity tests suggest a high degree of self-incompatibility of olive (Moorkerjee et al. 2005; Díaz et al. 2006). A thorough knowledge of the organization of the structures and components taking part in transmission of male gametes is necessary to be able to resolve olive tree self-compatibility questions and to understand the processes and mechanisms by which SI and receptivity operate during the pollen-pistil encounter.

Different aspects of the olive pollen grain biology have been well documented, such as pollen development (Rodríguez-García and Fernández 1990; Alché et al.1994), tapetum (Pacini and Juniper 1979a, b), pollen cell wall and aperture formation (Fernández and Rodríguez-García 1988, 1989, 1994), maturation inside the anther (Rodríguez-García et al. 1995; Rodríguez-García et al. 2003a) and pollen germination in vitro (Majewska-Sawka et al. 2002; Rodríguez-García et al. 2003b). Embryo sac formation (Altamura Betti et al. 1982) and ovary tissues (Rallo and Rapoport 2001; Rapoport 2004; Martins et al. 2006) have also been described due to their significance for fruit development. The few studies focussed on pistil morphology, deal only partially with pistil structure and composition (King 1938; Rapoport 2004; Ciampolini et al. 1983; Reale et al. 2006). However, a complete study of the architecture, organization and composition of the three principal parts of the olive pistil: stigma, style and ovary is lacking.

The present study is part of an overall program aimed at studying the reproductive behavior of the olive (*Olea europaea* L.), with emphasis on the gynoecium. The objective of this report is to describe the structure of the different components of the pistil, their organization and their cytochemical features at flower anthesis, the time at which the processes involved in pollen–pistil interaction and fertilization will begin.

Materials and methods

Plant material

Perfect flowers (with both pistillate and staminate parts) were gathered periodically at anthesis during the months of May–June, 2003–2006, from *Olea europaea* L. trees, cv. Picual, grown in the provinces of Granada and Córdoba (Spain). Within the phenologically mixed populations of flowers, care was taken to select recently open or opening flowers with petals recently separated, ovary visible, and anthers yellow, turgid and intact.

Preparation for microscopy

The pistils were removed from the flowers and fixed in 4% paraformaldehyde and 2% glutaraldehyde 0.25% with 0.1 M cacodylate buffer at pH 7.5 overnight at 4°C. Other pistils were prefixed in 3% glutaraldehyde in 0.025 M cacodylate buffer at pH 7.5 for 2 h at room temperature and postfixed in 1% Oso4 in the same buffer for further 2 h. After fixation, all samples were washed with several changes of cacodylate buffer, dehydrated in an ethanol series and embedded in Unicryl or Epon resin. Semithin sections 1 μ m thick were cut using a RM2164 rotary microtome (Leica). For general histological observations, sections were stained with 0.05% toluidine blue. Photomicrographs were captured with a digital camera from images visualized with a Zeiss Standard microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Histochemistry

Periodic acid Schiff's reagent (PAS) treatment

To identify carbohydrates and starch granules, sections were prepared according to a modification of the procedure reported by Feder and O'Brien (1968). The slides were immersed in a 1% (w/v) periodic acid for 10 min, rinsed in running water for 5 min and stained in Schiff's reagent for

10 min in the dark. Then they were washed three times for 3 min each with 2% (w/v) sodium metabisulfite solution, and in running water for 10 min. Finally, the slides were covered with Merckoglass (Merck, Darmstadt, Germany).

Sudan Black staining

Sudan Black staining was used for neutral lipid identification (Bronner 1975), following the method described by Noher de Halac et al. (1992). Slides were immersed for 15 min at 60°C in a 70% ethanol solution of Sudan Black B which was-prepared immediately before use. Sections were mounted on slides with a thin film of APTES [a 3% acetone solution of (3-aminopropyl) triethoxy-silane (Sigma)] and rinsed in running water. Specimens were mounted in gelatin–glycerol at room temperature.

Coomassie Brilliant Blue

Protein material was stained according to Fisher's method (1968) with slight modifications. The staining solution consisted of 0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 dye in a solution of methanol:acetic acid:water (MAA, 5:1:4) filtered prior to use. The sections were stained for 30 min at room temperature, following rinsing in MAA which removed excess stain for 15 min at room temperature. The sections were mounted in Merckoglass.

Electron microscopy

Ultrathin sections were cut on a Reichert-Jung Ultracut E microtome, and stained for general contrast with 2% uranyl acetate followed by lead citrate. Observations were carried out with a Jeol TEM-1011 transmission electron microscope.

Results

Olive (*Olea europaea* L.) cv. Picual flowers are formed in paniculate inflorescences of 10–16 flowers. The perfect flowers measured approximately 4–5 mm length at anthesis. At this stage, the pistil is composed of a bilobed lightgreen stigma, a short cream-colored style and a round green ovary flanked by two yellow, turgid and intact anthers, a corolla formed by four basal fused white petals and a cone-shaped gamosepalate calyx (Fig. 1a). Pistils and anthers of flowers at anthesis are approximately the same length (2.5 mm) (Fig. 1a, b). After dissection of the flower, i.e., removing stamens and petals, the stigma is clearly visible, presenting a pointed or saddle-shaped profile depending on the orientation of the pistil (Fig. 1b). At this stage of development the stigma is approximately 1 mm long, the style about 0.5 mm long, and the ovary diameter 1–1.2 mm. Pollen grains are frequently observed on the stigmatic surface even when the anthers of the same flower are not yet dehiscent.

Pistil structure

A longitudinal section of an olive pistil stained with toluidine blue shows that the bilobed papillar stigma is basipetally continuous with a closed style and traversed by a core of transmitting tissue. The style terminates in the ovary which encloses two locules separated by a substantial placenta, each locule containing two ovules (Fig. 2a).

The external stigmatic surface is composed of multicellular vacuolated papillae which are covered by a layer of extra-cellular exudate (Fig. 2b). The inner stigmatic cells are non-papillate and are surrounded by a secretory substance that accumulates in the intercellular spaces forming



Fig. 1 Olive flowers at anthesis viewed with stereomicroscope. a Recently opened perfect flower. b Pistil showing different shapes (pointed or saddle) depending on the orientation of the pistil. c Yellow and turgid anther of the same flower as the pistil. The pistil and anthers of the same flower tend to have similar length, but the anthers appear longer due to the insertion point of the stamens on the petals. *a* anther, *o* ovary, *p* pistil, *s* stigma, *st* style. *Bars* 0.5 mm



Fig. 2 Olive pistil sections stained with toluidine blue. a Longitudinal section of a complete pistil: a bilobed stigma with pollen grains on its surface, a solid style showing a core of transmitting tissue, and an ovary which contains two locules. b Stigma transverse section surrounded by an exudate layer (*arrows*) and some pollen grains. c Details of a stigma longitudinal section showing externally oriented papillae and inner stigmatic cells with intercellular spaces (*arrows*). d Central longitudinal section of stigma base and style. Note the continuity between the inner stigmatic cells and the stylar transmitting tissue showing an intensively stained funnel shape. e Stylar transverse section: the central transmitting tissue and two lateral vascular

an interconnecting network (Fig. 2c). These inner stigmatic cells are continuous with the stylar transmitting tissue (Fig. 2a, d, f), showing an overall funnel-shaped arrangement, which is wider in the stigma and narrows basipetally in the style.

The style is composed of an epidermal cell layer, an intermediate tissue or stylar cortex consisting of larger vacuolated cells organized in layers and containing two vascular bundles, and a core of transmitting tissue which

bundles are clearly visible. **f** Details of the inner stigmatic cells and the stylar transmitting tissue forming a funnel shape along its longitudinal axis (*arrows* indicated narrowing proximal transmitting tissue). **g** Ovary longitudinal section showing an outer cuticle covering the epidermis (*small arrows*), roughly isodiametric cells of the inner mesocarp and the innermost cells of the endocarp, constituted by several layers of periclinally oriented cells with thicker cell walls and stronger staining (*larger arrows*). *en* endocarp, *ep* epidermis, *is* inner stigmatic cells, *me* mesocarp, *o* ovary, *ov* ovule, *pg* pollen grain, *pp* papillae cells, *s* stigma, *st* style, *stm* stome, *tt* transmitting tissue, *vb* vascular bundles. *Bars* 100 μ m

traverses its entire length (Fig. 2a, d, f). In median longitudinal sections with the appropriate orientation, it is possible to observe the two stigma lobes on either side of the pistil (Figs. 2a, 3a), and two vascular tissue bundles are visible on either side of the transmitting tissue (Fig. 2d). In transverse sections of the style, the form and location of these three zones of the style, i.e., the transmitting tissue and two vascular bundles, are clearly visible (Fig. 2e). The transmitting tissue is made-up of thick-walled cells which are aligned along the longitudinal axis of the pistil, and organized in vertical files (Fig. 2d, f).

The superior ovary is composed of two locules, each containing two anatropous ovules attached to the funiculi to the superior part of the central placenta with their micropyles oriented toward the upper part of the ovary. A cuticle surrounds the outer surface of the ovary epidermis contiguously with the outer style surface (Figs. 2g, 3a). In longitudinal sections, it is possible to distinguish the different ovary pericarp tissues surrounding the locules. The exocarp is composed of a unicellular epidermis formed by anticlinally elongated vacuolated cells interrupted by occasional stomates. Interior to the exocarp, the major part of the ovary pericarp is composed of larger polygonal cells which are traversed longitudinally by vascular tissue bundles (Figs. 2g, 3d). At this stage the cells of the mesocarp (composed of the portion of the pericarp exterior to the vascular bundles) and those of the endocarp (composed of the portion located within the vascular bundles) are similar. Surrounding the ovules is the locule wall, of which the innermost cells of the endocarp are composed of one to several layers of periclinally oriented cells with thicker cell walls and stronger staining (Figs. 2g, 3d).

Histochemistry

Differential staining was conducted to distinguish carbohydrates, lipids and proteins within the different tissues of the olive pistil. All pistil cell walls stain a pink color with PAS indicating non-soluble polysaccharides, but staining is more intense in the stylar transmitting tissue and the contiguous non-papillate cells within the stigma (funnelshaped zone) and also in the ovary epidermis, the inner endocarp wall bordering the locule, and the ovule epidermis (Fig. 3a). These cells are of two categories: transmitting and epidermal. The outer cuticle layer of the style and ovary also stains positively with this procedure, as do the intercellular spaces and the stigma exudate (Fig. 3a, b, c), which become more vivid as anthesis progresses. The PAS stain also allows us to visualize the distribution of starch granules in the different pistil tissues. It is noteworthy that the starch is concentrated mainly



Fig. 3 Olive pistil longitudinal sections stained with PAS. a Section of a complete pistil: all cell walls are stained pink, as is the cuticle of the ovary and style; the inner epidermis surrounding the locules (arrows) shows intense pink. **b** Detail of stigma showing intensive staining in the intercellular spaces (arrows). c Central section of style: the cell walls and intercellular spaces of the centrally located transmitting tissue show stronger pink staining; note the high starch concentration (granules) around the two lateral vascular bundles. d Portion (detail) of ovary and one of the ovules; starch granules are most concentrated in the mesocarp cells near the vascular tissue and in the ovule; the locule wall (corresponding to the ovary inner endocarp cells) shows intensive staining (arrows). en endocarp, ep epidermis, is inner stigmatic cells, me mesocarp, o ovary, ov ovule, pg pollen grain, pp papillae cells, s stigma, st style, tt transmitting tissue, vb vascular bundles. Bars 100 µm

around the vascular bundles (Fig. 3c, d); within the ovule there is a polarization of starch granules toward the micropylar end (Fig. 3d).

The extracellular exudate of the stigma papillae, the vacuoles of the secretory cells subjacent to the outer papillate cells, and the cuticle of the ovary and style stain positive with Sudan Black which is accumulated in hydrophobic regions indicative of lipids (Fig. 4a, b). Inside the locules, the space around the ovules stains acutely black (Fig. 4b, c). The style and ovary phloem also show intense black labeling, with the exception of the phloem in the placenta separating the two locules, which appears negative to Sudan Black (Fig. 4c).

Coomassie Blue, which differentially stains proteins, labels a distinct extracellular layer of exudate present around the stigma surface, as well as in the intercellular

Fig. 4 Olive pistil longitudinal sections stained with Sudan Black. a The papillar exudate (arrows) shows a weak black staining, in contrast to the intensive staining of the inner, vacuolated stigmatic cells. **b** Junction of the lower portion of the stigma and the upper portion of the style showing the inner stigmatic cells continuous with the stylar transmitting tissue, and a lateral vascular bundle; the phloem (arrows) is very positive to this lipid staining, as is the outer cuticle (arrowheads). c The phloem of the ovary vascular bundles also shows dark black color (arrows) except in the vascular bundle of the placenta separating the two locules, which appears without staining (double arrows); in the locule, the space bordering the ovules, there is a substance which appears acutely black (black arrows); the cell walls do not stain with this procedure, and the lack of staining is particularly evident in the endocarp cells (empty arrows). is inner stigmatic cells, ov ovule, ovb ovary vascular bundle, pg pollen grains, pp papillae cells, pvb placenta vascular bundle, st style, vb vascular bundle. Bars 50 µm spaces among the stigma cells and in the spaces between the cell walls of the transmitting tissue (Fig. 5a). The pistil vascular bundles are also positive with this stain (Fig. 5b). The outer cuticle layer of the style and the ovary, as well as cell walls and the border of the ovules, however, is not stained (Fig. 5b, c).

Pistil ultrastructure

Stigma

The papillae at the stigmatic external surface form assemblages of several vacuolated cells that are each surrounded by a thick continuous common wall. Covering the distal zones of the papillar cell wall is a thin electron dense layer which is sometimes locally interrupted, broken or



Fig. 5 Olive pistil longitudinal sections stained with Coomassie Brilliant Blue. a Details of stigma tissue: the extracellular exudate around the stigma surface and within the intercellular spaces is positive to this protein staining (arrows); **b** the style vascular bundles are also positive to this stain (arrows), but the style and ovary outer cuticle is not stained (arrowhead). c In the ovary the cell walls of the endocarp and the epidermis of the ovules are negative to protein staining (asterisk). en endocarp. me mesocarp, ov ovule, pg pollen grains, pp papillae cells, st style, vb vascular bundle. Bars 50 µm



absent, allowing direct contact between the cell wall and exudates. Outside the papillae an abundant exudate of heterogeneous content is present between cells and on the surface. The papilla cells are elongated with a large central vacuole that occupies practically the entire cell and occasionally contains osmiophilic material. The cytoplasm occupies a thin layer surrounding the vacuole. Within the cytoplasm, nuclei are visible, as are amyloplasts containing one or two small starch grains (Fig. 6a, b). Pollen grains are present at the stigmatic surface surrounded by exudate, which appears locally to be more homogenous than the exudate closer to the papillae, presumably due to the apparent fusion of the exudate vesicles (Fig. 6b).

Compared to the papillae, the cells of subpapillar zone display a richer cytoplasmic appearance relatively larger starch grains and more numerous filling amyloplasts. However, the intercellular spaces among the subpapillar cells contain material similar to the stigmatic exudate (Fig. 6c). Basipetal to the subpapillar zone, the internal stigmatic cells are relatively uniform in size and shape, and form a compact tissue, with smaller intercellular spaces than in more superficial papillar and subpapillar cells. In these cells, the intercellular matrix also differs from that of the papillar and subpapillar cells. Internal stigmatic cells are also highly vacuolated, and their cytoplasm is rich in ribosomes and contains few plastids and a low number of starch grains. Small spherical osmiophilic bodies are present in the cytoplasm, in peripheral areas between the plasmalemma and the cell wall, and occasionally in the vacuole, near its border with the cytoplasm. Plasmodesmata are visible in the cell walls (Fig. 6d).

Style

In the style, we distinguished three regions: (1) epidermis, (2) stylar cortex containing the two vascular bundles, and

Fig. 6 Electron micrographs of longitudinal sections of the stigma. a Multicellular papillae at the stigma external surface, surrounded by a thick, continuous wall. Heterogeneous exudate appears to be vesicular. Covering the distal zones of the papillae is a thin electron-dense layer between the cell wall and exudate, which is broken in places (empty arrow, also in b). **b** Pollen grain covered with exudate on the stigmatic surface. Note the difference in exudate close to the papillae with many small vesicles separated by membrane-like structures, and the more homogeneous exudate surrounding the pollen grain. c Subpapillar zone of the stigma. The intercellular spaces (stars) contain material similar to the stigmatic exudate observed in a and b. d Internal stigmatic cells, just below the subpapillar zone. cw cell wall, ex exudate, n nucleus, p plasmodesmata, pg pollen grain, pp papillae, s stigma, sg starch granule, v vacuole. Bars 5 µm



(3) a central core corresponding to the transmitting tissue. The features of these tissue cells are quite distinct, with a gradation in cellular ultrastructure forming a transition in fine-structural characteristics in intermediate layers: The outermost stylar cortex cells share features with the epidermal cells, whereas the cells of the inner stylar cortex are similar to the central core cells (Fig. 7a, b).

The style epidermal cells are characterized by a large central vacuole and a thin layer of peripheral cytoplasm. Few plasmodesmata are observed. Vacuoles in this layer contain numerous small electron-lucent crystalline inclusions, which are more or less elongated and angular in shape. Presumably the contents of those inclusions were lost during the sectioning process, as evidenced by the presence of large amounts of black material, which at first appear to be dirt or contamination. These inclusions are most plentiful in the epidermal cells and less numerous toward the interior of the style, while the transmitting tissue lacks any vacuolar inclusions. Globular osmiophilic bodies are present in the vacuole and the cytoplasm bordering the vacuole. Exterior to the epidermal cells is a thick cuticle in which at least two different layers may be discerned (Fig. 7c).

The transmitting tissue and inner stylar cortical cells present an elongated shape, although those of the transmitting tissue tend to be somewhat longer, with thicker cell walls. Their cells are richly cytoplasm, occupying practically all of the cell volume and their nuclei are large, conspicuous and centrally located. Vacuoles are small or absent, and the cytoplasm contains large plastids with abundant starch grains. The cell walls of the inner stylar cortex show a clearly visible middle lamella and contain numerous plasmodesmata, oriented in both longitudinal and transverse directions. The thicker walls of transmitting tissue cells contain numerous heterogeneously distributed black dots, probably corresponding to transversely sectioned plasmodesmata in obliquely sectioned cell walls (Fig. 7d). Between neighboring transmitting tissue cells and between these and the inner cortex, there are often well-defined, elongated intercellular spaces.

Ovary

Ultrastructural differences were observed between the ovary epidermis (Fig. 7e) and the stylar epidermal cells (Fig. 7c), although the ovary cuticle appears similar to that



Fig. 7 Electron micrographs of longitudinal sections of the style and upper part of the ovary. **a** General view of the epidermis and adjacent outer stylar cortex. Vacuoles show numerous small electron-light inclusions of crystalline shape (*arrows*; see also 2**c** detail). **b** General view of the style interior to **a**. **c** Detail of stylar epidermal cells covered by a thicker cuticle. *Arrowheads* mark osmiophilic bodies present in the vacuole and the cytoplasm bordering the vacuole. **d** Detail of the transmitting tissue and inner stylar cortex cells. Thicker obliquely sectioned walls of the transmitting tissue cells contain numerous heterogeneously distributed black dots (*circles*), looking similar in density and appearance to plasmodesmata

of the style. The ovary epidermal cells are radially elongated and roughly regular in size. The nuclei are centrally located, with a vacuole on either side: one toward the ovary exterior and another toward the interior. Both vacuoles contain electron-lucent angular inclusions similar to those of the stylar epidermis (Fig. 7e). In the upper part of the ovary the mesocarp cells immediately adjacent to the

structures. Intercellular spaces between neighboring cells (*stars*) **e** Epidermis and adjacent cells of the upper part of the ovary and **f** Ovary cells just below the style. The epidermal cells are radially elongated and roughly regular in size. The nuclei are centrally located, with a vacuole on either side: one towards the ovary exterior and another toward the interior. *Double arrows* mark black deposits of irregular intense electron-dense material in the vacuoles. *cu* cuticle, *cw* cell wall, *e* epidermis, *isc* inner stylar cortex, *osc* outer stylar cortex, *n* nucleus, *p* plasmodesmata, *sg* starch granule, *v* vacuole, *vb* vascular bundles, *tt* transmitting tissue. *Bars* 5 µm

epidermis are vacuolated and contain the same vacuolar crystal inclusions as the style and ovary epidermal cells.

The ovary cells just below the style (Fig. 7f) are heterogeneous in size and roughly isodiametric in shape. The nuclei are round and prominent, and contain large, black crystalloid bodies. These paracrystalline inclusions are also present in the nuclei of cells in different pistil tissues, but are more evident here. The cytoplasm is highly vacuolated and generally confined to peripheral areas of the cell. In the vacuoles there are thin strands or deposits of irregular intense electron-dense material (Fig. 7f).

Discussion

The details of pistil structure and composition permit us to characterize the state of the pistil at anthesis as a prelude to determining the changes which occur with and without successful pollination, and the factors and processes involved. The structural organization of the gynoecium sets the stage for the arrival and germination of the pollen tube and the ensuing sequence of progamic events, and is thus essential for understanding pollen-pistil interaction and fertilization in olive.

We observed the pistil from olive (*Olea europaea* L.) cv. Picual trees to be composed of a bilobed wet stigma, a solid style and a bilocular ovary with four ovules, which are observations in agreement with previous reports for other olive cultivars (King 1938; Cresti et al. 1978; Ciampolini et al. 1983), and also for some other related members of the Oleaceae family (Jedrzejuk and Szlachetka 2005). However, different from the observations of Ciampolini et al. (1983), the papillae clearly show a multicellular structure.

The presence of stigma exudate at the onset of anthesis is an indication of pistil receptivity at this time (Uwate and Lin 1981; Herrero and Arbeloa 1989). As the anthers are still turgid and intact at this stage, this means that olive stigmas become receptive before the anthers of the same flower have dehisced to release the pollen grains. This differential developmental timing favors cross pollination in olive, although it does not exclude the possibility of cultivar selfpollination between different flowers of the same tree or selfpollination within the same flower at a later moment.

Similar to reports for other species (Heslop-Harrison and Heslop-Harrison 1985; Knox et al. 1986), the various histochemical tests used in this study indicate that the extracellular components of the olive stigmatic receptive surface are heterogeneous, including carbohydrates, lipids and proteins. Some of the proteins may correspond to nonspecific esterases and phosphatases, which have previously been localized on the stigma receptive surface (Heslop-Harrison and Shivana 1977; Ghosh and Shivanna 1984). According to Herrero (1992), the receptive surface exudate appears to participate in the recognition and hydration processes rather than as nutritional support, since during this phase the pollen tubes grow autotrophically at the expenses of their own reserves.

There also appears to be an accumulation of similarly staining secretory material in the intercellular spaces of the non-papillate cell layers subjacent to the multicellular papillae. This extracellular matrix (ECM) stains positive to carbohydrates and proteins, signifying the presence of sugars, proteins or glycoproteins, but no lipid components were observed, whereas the outer exudate also stains with Sudan Black, indicating the presence of lipid components as well.

A notable structural characteristic of the stigma and style is the continuity and similarity of features between the funnel-shaped tissues composed by the subpapillar receptive tissue in the stigma and the transmitting tissue in the style, constituting the path for pollen tube growth. In this manner, the transmitting tissue in olive resembles that of tomato as observed by Kadej et al. (1985), who showed it beginning as a broad column in the stigma and gradually narrowing in the style. It has been postulated that the architecture of the stigma and the style plays a role in determining the pollen tubes that arrive at the ovule (Heslop-Harrison et al. 1985). The funnel-shaped subpapillar stigma tissue and basipetally decreasing crosssectional area of transmitting tissue in the olive style are consistent with this function.

The phloem is responsible for long-distance transport of assimilates to non-photosynthesizing organs of the plant. It has been reported that phloem sap contains sugars, micronutrients, amino acids, inorganic acids plant hormones, signaling molecules, mRNAs and proteins (Fisher et al. 1992; Marentes and Grusak 1998), but it may also contain complex lipids and high concentrations of mediumchain free fatty acids (Madey et al. 2001). The high numbers of starch granules we observed mainly in the cells neighboring the style and ovary vascular bundles were most likely in those regions as a result of conversion for storage directly following assimilate transport into the pistil. The observation of lipid substances inside the pistil phloem and nearby cells supports the long-distance transport of lipids in plants, according to the hypothesis of Madey et al. (2001).

The presence of starch as a storage carbohydrate in the pistil has been reported in diverse plant species (Sedgley 1979; Felker et al. 1983; Fromm et al. 1995; Martínez-Pallé and Herrero 1995; Zinselmeier et al. 1995; Aloni et al. 1996; González et al. 1996; Rodrigo et al. 2000). It is evident that the starch could have an important role in the plant reproductive process (Herrero 1992; Herrero and Hormaza 1996), supplying assimilates to support pollen tube growth through the style (Herrero and Dickinson 1979), or for the development of ovary and ovules (Brun and Betts 1984; Arbeloa and Herrero 1991). However, the means by which starch in the pistil participates in the reproductive process outside of nutritional provisioning is not well known. According to our results, the high starch content present in the different tissues of the olive pistil at

anthesis suggest it will be involved in the processes which taking place during the progamic phase.

The vacuolar inclusions found in style and ovary epidermis have been previously observed in Olea europaea leaves and identified as calcium oxalate (Alché and Rodríguez-García 1989). As far as we know such inclusions have not been reported in any other organs of the olive tree, but their presence has been widely documented in many different species (see review of Franceschi and Horner 1980). The crystalloid bodies found in the nucleus of olive pistil cells have also been described by Ciampolini et al. (1983) in the transmitting tissue of the olive pistil, but of another cultivar ("Corregiolo") different from the present study ("Picual"). Those same intranuclear bodies have been previously reported in the olive leaf and characterized as to their protein nature and crystal structure (Alché and Rodríguez-García 1988, 1989). Our group has also found such nuclear inclusions in the cells of other olive organs (anther, fruit mesocarp, embryo and root) (results not published). Such nuclear inclusions have been also reported in different species of Angiosperms (Weintraub et al. 1971; Bigazzi 1984). Their origin and function are unknown but, based on the above reports of their presence, neither they seem to be specific to the Olea europaea tree, nor directly related with pistil cell nuclei.

In contrast to the results of Ciampolini et al. (1983), we observed a thin electron-dense layer covering the distal zone of the papillar cell wall. We have identified this layer as cutin (results not published) and we consider that the breakage or absence we observe near where abundant exudates are present is likely a consequence of interruptions that permit the secretion of those exudates.

Black deposits in the vacuole cells of the stigma region below the papillae have been interpreted as tannic material by Ciampolini et al. (1983). The material they describe is similar to that which we observed in the ovary cells just below the style, but we did not find similar content in the stigmatic zone. Also in contrast to Ciampolini et al. (1983), we did not find any chloroplasts in any part of the olive pistil. However, we observed abundant amyloplasts, particularly in the transmitting tissue and the ovary.

The transmitting tissue of our studied material shows quite thick cell walls, where the characteristic plasmodesmata structures are present. Plasmodesmata are also well represented in the neighboring cortical cells, in both longitudinal and radial directions, supporting the possibility of vertical and transverse translocation of metabolites through the stylar region. The elongated intercellular spaces between neighboring transmitting tissue cells likely allow or assist pollen tube growth intercellularly through the transmitting tissue.

Our ultrastructural observations agree only partially with the description of the olive pistil reported by Ciampolini et al. (1983). The reasons could be due to the differences in the cultivars studied ("Picual" in our case in contrast to "Corregiolo" in their study), to differences in section orientation or to examination of different developmental stages due to sampling time (the onset of anthesis in our study rather than 24 h after assisted pollination).

The organization of cells and tissues and patterns of histochemical staining reveal a range of differences that undoubtedly influence the behavior of the olive pistil and penetration of pollen tubes. Just as these observed structures and their composition will help us understand postanthesis processes, further studies of the post anthesis changes will also permit more complete interpretation of the structures and composition present at anthesis that establish the conditions governing breeding success.

Acknowledgments We thank Conchita Martínez-Sierra for excellent technical assistance. This work was supported by the Spanish Ministry of Education and Science (MEC), project AGL2003-00719 and a FPI fellowship to C.S. and a FPU fellowship to I.S. The "Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía" also provided financing for this study with project P06-AGR-01791.

References

- Alche JD, Rodriguez-Garcia MI (1988) Ultrastructural and cytochemical observations on intranuclear inclusions in *Olea europaea*. Inst Phys Conf Ser 93:65–66
- Alche JD, Rodriguez-Garcia MI (1989) Application of X-ray microanalysis, diffraction and cytochemical techniques in the study of the structure and chemical composition of inclusions in *Olea europaea* leaves. Inst Phys Conf Ser 98:759–762
- Alché JD, Fernandez MC, Rodriguez-Garcia 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
- Aloni B, Karni L, Zaidman Z, Schaffer AA (1996) Changes of carbohydrates in pepper (*Capsicum annuum* L.) Flowers in relation to their abscission under different shading regimes. Ann Bot 78:163–168
- Altamura Betti MM, Pasqua G, Mazzolani G (1982) Development of the female gametophyte in *Olea europaea* L. Ann Bot 40:111– 117
- Arbeloa A, Herrero M (1991) Development of the ovular structures in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. New Phytol 118:527–534
- Bartolini S, Guerriero R (1995) Self-compatibility in several clones of olive oil cv. 'Leccino'. Adv Hortic Sci 9:71–74
- Bigazzi M (1984) The occurrence of intranuclear inclusions in the Labiatae, Verbenaceae and Scrophulariaceae. Caryologia 37:269–292
- Bronner R (1975) Simultaneous demonstration of lipids and starch in plant tissues. Stain Technol 50:1–4
- Brun WA, Betts KJ (1984) Source: sink relations of abscissing and non abscissing soybean flowers. Plant Physiol 75:187–191
- Ciampolini F, Cresti M, Kapil RN (1983). Fine structural and cytochemical characteristics of style and stigma in olive. Caryologia 36:211–230
- Cresti M, Ciampolini F, Pacini E, Sarfatti G (1978) Phytoferritin in plastids of the style of *Olea europaea* L. Acta Bot Neerl 27:417– 423

- Cuevas J (2005) Autoincompatibilidad polen-pistilo, In: Rallo L, Barranco D, Caballero JM, Del Río C, Martín A, Tous J, Trujillo I (eds) Variedades de Olivo en España Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa Madrid, Spain, pp 301–308
- Cuevas J, Polito VS (1997) Compatibility relationships in 'Manzanillo' olive. Hortic Sci 32:1056–1058
- 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
- De Graaf BHJ, Derksen JWM, Mariani C (2001) Pollen and pistil in the progamic phase. Sex Plant Reprod 14:41–55
- De Nettancourt D (2001) Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants. Springer, Berlin
- Díaz A, Martín A, Rallo L, Barranco D, De la Rosa R (2006) Self incompatibility of 'Arbequina' and 'Picual' olives assessed by SSR markers. J Am Soc Hortic Sci 131:250–255
- Edlund AF, Swanson R, Preuss D (2004) Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. Plant Cell 16:84–92
- Feder NT, O'Brien P (1968) Plant microtechnique: some principles and new methods. Am J Bot 55:123–142
- Felker FC, Robitaille HA, Hess FD (1983) Morphological and ultrastructural development and starch accumulation during chilling of sour cherry flower buds. Am J Bot 70:376–386
- Fernández-Bolaños P, Frías L (1969) Autofertilidad y austerilidad en el olivo. Agricultura 443:150–151
- Fernández MC, Rodriguez-Garcia MI (1988) Pollen wall development in *Olea europaea* L. New Phytol 108:91–99
- Fernández MC, Rodriguez-Garcia MI (1989) Developmental changes in the aperture during pollen grain ontogeny in *Olea europaea* L. New Phytol 11:717–723
- Fernández MC, Rodriguez-Garcia MI (1994) Pollen grain aperture in *Olea europaea* L. Rev Palaeobot Palynol 85:99–109
- Fisher BB (1968) Protein staining of ribbonned epon sections for light microscopy. Histochemie 16:92–96
- Fisher DB, Wu Y, Ku MSB (1992) Turnover of soluble proteins in the wheat sieve tube. Plant Physiol 100:1433–1441
- Franceschi VR, Horner HT (1980) Calcium oxalate crystals in plants. Bot Rev 46:361–427
- Fromm J, Hajirezaei M, Wilke I (1995) The biochemical response of electrical signalling in the reproductive system of *Hibiscus* plants. Plant Physiol 109:375–384
- Ghosh S, Shivanna KR (1984) Structure and cytochemistry of the stigma and pollen–pistil interaction in *Zephyranthes*. Ann Bot 53:91–106
- González MV, Coque M, Herrero M (1996) Pollen-pistil interaction in kiwifruit (Actinidia deliciosa; Actinidiaceae). Am J Bot 83:148–154
- Herrero M (1992) Mechanisms in the pistil that regulate gametophyte population in peach (*Prunus persica*). In: Ottaviano E, Mulcahy DL, Sari Gorla M, Bergamini Mulcahy G (eds) Angiosperm pollen and ovule. Springer, New York, pp 377–381
- Herrero M, Arbeloa A (1989) Influence of the pistil on pollen tube kinetics in peach (*Prunus persica*). Am J Bot 76:1441–1447
- Herrero M, Dickinson HG (1979) Pollen-pistil incompatibility in *Petunia hybrida*: changes in the pistil following compatible and incompatible intraspecific crosses. J Cell Sci 36:1–18
- Herrero M, Hormaza JI (1996) Pistil strategies controlling pollen tube growth. Sex Plant Reprod 9:343–347
- Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y (1985) Surfaces and secretions in the pollen-stigma interaction: a brief review. J Cell Sci Suppl 2:287–300
- Heslop-Harrison Y, Shivanna KR (1977) The receptive surface of the angiosperm stigma. Ann Bot 41:1233–1258

- Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y, Reger BJ (1985) The pollenstigma interaction in the grasses. Pollen tube guidance and the regulation of tube number in Zea mays L. Acta Bot Neerl 34:193–211
- Jedrzejuk A, Szlachetka W (2005) Development of flower organs in common lilac (*Syringa vulgaris* L.) cv. Mme Florent Stepman. Acta Biol Cracov 47:41–52
- Kadej AJ, Wilms HJ, Willemse MTM (1985) Stigma and stigmatoid tissue of Lycopersicon esculentum. Acta Bot Neerl 34:95–104
- King JR (1938) Morphological development of the fruit of the olive. Hilgardia 11:437–458
- Knox RB (1984) Pollen-pistil interactions. In: Linskens HF, Heslop-Harrison J (eds) Encyclopedia of plant physiology, new series, vol. 17. Springer, Berlin, pp 508–608
- Knox RB, Williams EG, Dumas C (1986) Pollen, pistil, and reproductive function in crop plants. Plant Breeding Rev 4:9-79
- 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
- Madey E, Nowack LM, Thompson JE (2001) Isolation and characterization of lipid in phloem sap of canola. Planta 214:625–634
- Majewska-Sawka A, Fernández MC, Mrani-Alaoui M, Münster A, Rodríguez-García MI (2002) Cell wall reformation by pollen tube protoplasts of olive (*Olea europaea* L.): comparison with pollen tube wall. Sex Plant Reprod 15:21–29
- Marentes E, Grusak MA (1998) Mass determination of low-molecular-weight proteins in phloem sap using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. J Exp Bot 49:903–911
- Martínez-Pallé E, Herrero M (1995) The ponticulus: a structure bridging pollen tube access to the ovule in *Pistacia vera*. Sex Plant Reprod 8:217–222
- Martins PC, Cordeiro AM, Rapoport HF (2006) Flower quality in orchards of olive, *Olea europaea* L., cv. Morisca. Adv Hortic Sci 20:262–266
- Moorkerjee S, Guerin J, Collins G, Ford C, Sedgley M (2005) Paternity analysis using microsatellite markers to identify pollen donors. Theor Appl Genet 111:1174–1182
- Noher de Halac I, Fama G, Cismondi IA (1992) Changes in lipids and polysaccharides during pollen ontogeny in *Oenothera* anthers. Sex Plant Reprod 5:110–116
- 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
- Rallo P, Rapoport HF (2001) Early growth and development of the olive fruit mesocarp. J Hortic Sci Biotech 76:408–412
- Rapoport HF (2004) Botánica y morfología, In: D Barranco R Fernández-Escobar L Rallo (eds) El cultivo del olivo, 5th edn. Junta de Andalucia y Mundi-Prensa, Andalucia, pp 37–62
- Reale L, Gromo S, Bonofiglio T, Orlandi F, Forniaceri M, Ferranti F, Romano B (2006) Reproductive biology of olive (*Olea europaea* L.) DOP Umbria cultivars. Sex Plant Reprod 19:151–161
- Rodrigo J, Hormaza JI, Herrero M (2000) Ovary starch reserves and flower development in apricot (*Prunus armeniaca*). Physiol Plant 108:35–41
- Rodríguez-García MI, Fernández MC (1990) Ultrastructural evidence of endoplasmic reticulum differentiation during the maturation of the olive pollen grain. Plant Syst Evol 171:221–231
- Rodríguez-García MI, Alche JD, Fernández MC (1995) Immunocytochemical localization of allergenic protein (Ole e 1) in the endoplasmic reticulum of the developing olive pollen grain (*Olea europaea* L.). Planta 196:558–563

- Rodríguez-García MI, Mrani-Alaoui M, Fernández MC (2003a) Behavior of storage lipids during pollen development and pollen grain germination of olive (*Olea europaea* L.). Protoplasma 221:237–244
- Rodriguez-García MI, Mrani-Alaoui M, De la Flor Díaz J, Fernández MC (2003b) Observations on microtubules and nuclei motility in the pollen tube of olive (*Olea europaea* L.) pollen. Acta Biol Cracov 45:97–101
- Sanzol J, Herrero M (2001) The effective pollination period in fruit trees. Sci Hortic 90:1–17
- Sedgley M (1979) Structural changes in the pollinated and nonpollinated avocado stigma and style. J Cell Sci 38:49–60
- Uwate WJ, Lin J (1981) Development of the stigmatic surface of *Prunus avium* L., sweet cherry. Am J Bot 68:1165–1176
- Weintraub M, Ragetli HW, Schroeder B (1971). The protein composition of nuclear crystals in leaf cells. Am J Bot 58:182–190
- Zinselmeier C, Westgate ME, Schussler JR, Jones RJ (1995) Low water potential disrupts carbohydrate metabolism in maize (*Zea mays* L.) ovaries. Plant Physiol 107:385–391

CERCA

Reproducción sexual en el olivo

Juan de Dios Alché, Juan David Rejón, Cinthya Suárez y María Isabel Rodríguez

El olivo (*Olea europaea* L.) nos ha acompañado a lo largo de la historia de la humanidad. Constituye uno de los cultivos de mayor importancia en los países mediterráneos. Aunque su multiplicación se realiza sobre todo de forma vegetativa (mediante estaquillas), es la reproducción sexual la responsable última de la formación del fruto.

A través del estudio de la formación del polen y el gineceo, vamos desentrañando la biología reproductiva de esta especie. Sin embargo, se desconocen todavía los mecanismos celulares y moleculares que permiten que ambas estructuras se reconozcan, interaccionen y se genere el tubo polínico, la estructura que dirige los núcleos espermáticos del polen hasta el saco embrionario, donde se produce la fecundación.

Numerosos productos génicos se hallan implicados en la reproducción del olivo. Entre ellos destacan ciertas proteínas que desarrollan funciones clave en la biología del polen; las mismas que desencadenan en humanos la alergia que muchos padecen.



▲ 1. Olivos en la Sierra de Tramuntana, Mallorca.



▲ 2. Ramas de olivo con inflorescencias o trama.

3. Flor de olivo con anteras dehiscentes y numerosos granos de polen.





◀ 4. El estigma posee papilas en su región externa. Esta microscopía de epifluorescencia muestra algunos de los componentes celulares que participan en la captación del polen: lípidos (*fucsia*) y polisacáridos (*azul*).

> ▲ 5. Estigma bilobulado de olivo con granos de polen sobre la superficie (microscopía electrónica de barrido).

▶ 6. Grano de polen de olivo con sus tres aperturas y la intrincada ornamentación de la exina (microscopía electrónica de barrido).