

Universidad de Granada



Estación Experimental del Zaidín (CSIC)

Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas



EEZ-CSIC

Variabilidad morfológica, isoenzimática e histológica del argán (*Argania spinosa* L.) y de su aceite en la región de Chouihiya (Berkane, Marruecos). Contribución a su propagación *in vitro*.

Tesis doctoral

Mariam Assach

Granada, 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Mariam Allach
D.L.: GR 594-2013
ISBN: 978-84-9028-408-7

Variabilidad morfológica, isoenzimática e histológica del argán (*Argania spinosa* L.) y de su aceite en la región de Chouihiya (Berkane, Marruecos). Contribución a su propagación *in vitro*.

Memoria presentada por la licenciada en Ciencias Biológicas Mariam Allach para optar al grado de doctor.

Fdo: Allach Mariam

V° B°

Codirector de la tesis doctoral

V° B°

Codirector de la tesis doctoral

Fdo: Dr. J.D. Alché Ramírez

Fdo: Dr. A. Pulido Regadera

Este trabajo ha sido realizado en la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), gracias a la concesión de una beca predoctoral para mujeres investigadoras jóvenes de la fundación L'Oréal-UNESCO (2005-2006) y una beca predoctoral de la fundación L'Oréal-Marruecos (2006-2009). Este trabajo ha sido financiado por los proyectos BFU 2004-00601/BFI, BFU2008-00629, BFU2011-22779 (Ministerio de Ciencia e Innovación) y P2006-AGR-01791, P2010-AGR-6274, P2011-CVI-7487 (Junta de Andalucía).

Al alma de mi padre

Al alma de mi abuelo Al haj m' hand

A mi marido Ibrahim

A mi madre

A mis hermanos y hermanas

A mis hijos Fátima y Zakaríá

Agradecimientos

Las primeras líneas de estos agradecimientos las dedico a la Prof. María Isabel Rodríguez García por ofrecerme la gran oportunidad de incorporarme en su grupo y de hacerme sentir como en familia por sus palabras de ánimo, por proporcionarme la carta de aceptación por la cual se me concedió la beca predoctoral de la UNESCO-l'Oréal, y por darme la oportunidad de realizar el curso de Histoquímica en Madrid-CSIC.

A mi directores, los doctores Juan de Dios Alché Ramírez y Amada Pulido Regadera. Al Dr. Alché por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio, por depositar su absoluta confianza en mí, por proporcionarme la carta de aceptación por la cual se me concedió la beca predoctoral de la UNESCO-l'Oréal, y por corregirme la ortografía y la gramática de la tesis. Gracias a su apoyo dí mis primeros pasos en el mundo de la investigación y la ciencia. Resulta muy difícil expresar el valor de su excelente dedicación, consejos, comprensión y su infinita paciencia sobre todo en el periodo de mi embarazo y cuando nació mi hija Fátima. A la Dra. Pulido por su ayuda y apoyo a lo largo de la tesis y en la elaboración de esta memoria y por su amabilidad y amistad. Sinceramente me siento orgullosa de haber formado parte de su grupo de investigación y sería siempre un gran honor para mí desarrollar actividades juntos en el futuro, si Dios quiere. Muchas gracias por todo.

Al Prof. José María Ramos por su apoyo y sus consejos. Le quiero decir que le debo mucho respecto.

A la Dra. María Dolores Garrido por su amistad y sus consejos y ánimos.

A la doctora Fatiha Chibi de la Facultad de Ciencias de Tánger, por su amistad y sus consejos.

A los Dres. Bel Abed y Mohamed Amine Afilal de la Facultad de Ciencias de Oujda-Marruecos por proporcionarme la carta de aceptación por la cual me aceptaron en doctorado en la Universidad de Granada.

A la Dra. Carmen Lluch, mi tutora, por haberme aceptado como estudiante de doctorado en la Facultad de Ciencias de Granada.

Al Dr. Antonio Jesús Castro por su disposición infinita en responder a mis dudas y preguntas.

Al Dr. Barea por ofrecerme la oportunidad de realizar el curso de la UNESCO.

A mis compañeros y compañeras del grupo, el Dr. Mohamed M'rani por ofrecerme el material vegetal para hacer el trabajo de los cortes del endospermo y cotiledón de la semilla de argán para observar el desarrollo de proteínas de almacenamiento durante la maduración de la semilla. Al Dr. Mounim Hamman Khalifa por su disposición absoluta en enseñarme y explicarme los principios de la electroforesis e inmunoblotting. Al Dr. José Carlos López por ofrecerme el anticuerpo primario frente a las proteínas de almacenamiento de bajo peso molecular. A la Dra. Adela Olmedilla por su interés en preguntar por mi salud y la de mi niña y por haberme ayudado un día que me encontró cargada con la compra y la niña en la calle. A Irene y Salvatore por su simpatía y haberme ayudado en muchas ocasiones. A Rosa, por su amistad y simpatía y muchos momentos buenos. A Conchita por haberme enseñado las técnicas de cortar las muestras al micrótopo y por ofrecerme muchos favores, ayudarme en cortar las muestras de anteras y pólenes, por su ayuda en el periodo de mi embarazo, y por su amistad que llegó tarde pero en su buen momento. A Dori por ofrecerme el protocolo de actividad SOD, por los buenos momentos. A Sonia por su amistad y buen corazón. A Mahdi por su amistad. A la doctora Cynthia por su amistad. A Juan David por su amistad y por haberme prestado su PNB para realizar la actividad esterasa de semillas *in vitro*. A todas aquellas personas del centro o fuera del centro que han marcado de alguna manera todo ese periodo de preparación de esa tesis, les digo muchas gracias.

A UNESCO-L'Oréal por haber ofrecerme una beca predoctoral de un año y a L'ORÉAL de Marruecos por ofrecerme una beca de tres años para terminar de realizar esta tesis. Mi especial gratitud al

director de L'Oréal Marruecos, el Sr. Hérvé Streichenberger por su especial comportamiento, por sus ánimos y confianza.

Mi especial gratitud a mi querida madre por su cariño, sus ánimos y su confianza. Tengo la certitud de que has esperado ese momento mucho tiempo. Te quiero mama.

Al alma de mi querido padre por su cariño y por su ánimo. Has esperado este momento toda tu vida, pero tengo la certeza de que te vas a enterar de lo que has esperado en tu hija y serás feliz en el cielo.

A mi marido Ibrahim por su amor, su paciencia y su sacrificio. Te quiero.

Mis palabras más dulces son para mí tesoro Fátima. Fuiste mi compañera durante todo ese tiempo de preparación de tesis, cuando me sentía mal y con desánimo, pasaba a la guardería para recogerte y nada más que verte, se me olvidaba todo.

Para mi hijo Zakaríá, te invito a leerla cuando puedas. Te quiero.

A mi hermano Bilal, mi compañero de ese largo viaje, que siempre lo encuentro donde lo necesito. Gracias por cuidar a mi niña las noches de laboratorio, los sábados y domingos, y por acompañarme al hospital cuando Fátima se ponía enferma. Por cuidarme cuando nació Fátima. Por muchas cosas.

Resumen

Resumen

El argán (*Argania spinosa* L. Skeels) es un árbol endémico de Marruecos, con un gran impacto socioeconómico en la zona por sus múltiples usos, que incluyen especialmente la alimentación ganadera a partir de sus frutos, y la extracción de un aceite de excelentes cualidades alimentarias y terapéuticas. La especie se encuentra sin embargo en estado de amplia regresión debido especialmente a la sobreexplotación. Es por otra parte escasa la literatura científica que analiza los diversos aspectos de la biología de la especie y sus potenciales aplicaciones.

Con objeto de analizar la variabilidad morfológica del argán de las regiones Noroeste de Marruecos (Chouhiya, provincia de Berkane) y del Suroeste (Agadir), se ha realizado una prospección de los ejemplares presentes, que han sido caracterizados atendiendo a un modelo morfológico clásico de discriminación de variedades de olivo, adaptado convenientemente al argán. El análisis de numerosos parámetros del árbol, la hoja, el fruto y el endocarpo ha permitido explorar la gran variabilidad de esta planta, y diferenciar 6 subespecies/variedades, denominadas argán (genérico), argán de árbol pequeño, argán de fruto alargado, argán de hojas pequeñas, argán de fruto apuntado, argán de fruto grande y argán sin fruto. Los estudios morfológicos han sido extendidos con análisis de la compleja fenología floral de esta planta, y de un estudio pionero micromorfológico y ultraestructural del grano de polen, que ha permitido establecer diferencias entre las subespecies/variedades analizadas.

Además de los marcadores morfológicos descritos, se han utilizado dos tipos de marcadores isoenzimáticos (superóxido dismutasa -SOD-, y actividades esterasas inespecíficas) en diferentes tejidos de la planta, así como proteínas de almacenamiento de semillas para identificar la posible presencia de

polimorfismos en el germoplasma de la especie. En el caso de las SODs han sido identificadas diferentes isoenzimas, que han sido caracterizadas como CuZn-SODs y Mn-SODs mediante la utilización de inhibidores específicos en ensayos de actividad en gel. Estos ensayos así como las medidas espectrofotométricas de actividad han permitido definir perfiles de actividad característicos para las distintas variantes morfológicas observadas. En el caso de las esterasas, han sido identificadas multitud de bandas, que igualmente poseen un carácter discriminatorio entre subespecies/variedades.

Por primera vez han sido identificadas proteínas de almacenamiento de semillas (SSPs) de tipo 11S, similares a leguminas, en los tejidos de la semilla de argán. La identificación se basa en los perfiles proteicos obtenidos mediante SDS-PAGE para el cotiledón y el endospermo de la semilla, en condiciones a) desnaturizantes y b) desnaturizantes y reductoras, así como en la reacción cruzada frente a un anticuerpo desarrollado frente a las SSPs de tipo 11S del olivo. Los perfiles obtenidos han servido para generar un modelo de la distribución de las subunidades detectadas, compuestas por 5 péptidos diferentes de menor tamaño, asociadas en hasta 3 combinaciones distintas α/β formadas por una α -proteína con I_p ácido de mayor tamaño combinada con una β -proteína menor de carácter más básico, unidas por puentes disulfuro. Las SSPs se encuentran masivamente presentes en los tejidos de la semilla de argán en forma de cuerpos proteicos estrechamente relacionados metabólicamente y estructuralmente con cuerpos lipídicos. Se trata de componentes altamente nutricionales de la semilla, que probablemente estén igualmente presentes en el aceite.

Han sido analizados parámetros bioquímicos esenciales (composición en ácidos grasos, esteroides y capacidad antioxidante) del aceite de argán de distintas procedencias geográficas y varietales. La primera característica notable de los aceites analizados es su alta variabilidad, en consonancia con datos

disponibles en la literatura. En general se trata de aceites con elevado contenido en ácidos grasos oleico y linoleico, y bajo contenido en ácidos grasos saturados como palmítico y esteárico, así como en colesterol. También contienen niveles muy altos de tocoferoles delta y gamma. La estabilidad de los aceites es sin embargo escasa, lo que afecta su calidad especialmente en términos de índice de peróxidos, lo que hace que gran parte de los aceites analizados se cataloguen en las categorías inferiores de la norma marroquí.

Con la finalidad de contribuir al desarrollo de métodos eficientes de propagación del argán en la naturaleza, han sido optimizados diversos procedimientos de cultivo *ex vitro* e *in vitro* de la semilla, alternativos a los existentes. En el caso del cultivo *in vitro*, ha sido optimizado un método que incluye el empleo de medio de cultivo con baja salinidad, y la adición de diversas giberelinas, que han permitido obtener tasas relevantes de germinación y enraizamiento, así como buenos niveles de enraizamiento secundario, adecuados para el trasplante. Este sistema ha permitido además, la realización de un extensivo análisis histológico y estructural de la germinación *in vitro* en esta planta.

Abstract

The argan tree (*Argania spinosa* L. Skeels) is a Moroccan endemic tree, representing a high social and economic impact in this area due to its multiple usages, which include animal feeding with its fruits, and the extraction of an excellent oil both like a foodstuff and therapeutically. The species is however threatened of wide regression due particularly to over-exploitation. On the other hand, scientific literature devoted to the different aspects of the biology of this species and its potential applications is scarce.

In order to analyze the morphological variability of the argan in the NorthEast regions of Marocco (Chouihya, province of Berkane) and the SouthEast (Agadir), we have carried out a prospection of the specimens detected, which have been characterized by using a classical morphological model used for varietal discrimination in the olive tree, after its adequate adaptation to the argan tree. The analysis of numerous parameters from the tree, leaf, fruit and endocarp allowed us to explore the large variability of this plant, as well as to distinguish among six subspecies/varieties denominated argan (generic), argan of small fruit, argan of elongated fruit, argan of small leaves, argan of pointed fruit, and fruitless argan. The morphological studies have been extended with the analysis of the complex flower phenology, and with a pioneer micro-morphological and ultrastructural study of the pollen grain, which allowed establishing differences among the analyzed subspecies/varieties.

In addition to the morphological markers described above, two types of isoenzyme markers (superoxide dismutase -SOD- and unspecific esterase activities) in different tissues of the plant, and seed storage proteins were used in order to identify the putative presence of polymorphism in the germplasm of this species. As for SODs, different isoenzymes have been identified and characterized as CuZn-SODs and Mn-SODs by using specific inhibitors in activity

gel assays. Such assays in combination with spectrophotometric measurements of the activity allowed defining characteristic profiles for each morphological variant observed. In the case of esterases, a multitude of bands were observed, also displaying a discriminatory character among the different subspecies/varieties.

For the first time, seed storage proteins (SSPs) of the 11S type, similar to legumins, have been identified in the tissues of the argan seed. Identification was based on the protein profiles obtained after SDS-PAGE for both the cotyledon and the endosperm under a) denaturing, and b) denaturing, reducing conditions, and by their cross-reaction to an antibody raised to the SSPs of the 11S-type in the olive. The protein profiles obtained assisted to generate a model of the distribution of the subunits detected, formed by 5 different peptides of lower size, associated in up to 3 different α/β combinations formed by a α -protein of larger size and acidic Ip, combined to a β -protein of lower size and basic character, linked by disulfide bonds. SSPs are massively present in the argan seed tissues in the form of protein bodies closely related both metabolically and structurally to oil bodies. They are highly nutritious components of the seeds, which are likely to be present also in the oil.

Essential biochemical parameters (fatty acid composition, sterols and antioxidant capacity) have been analyzed in the argan oil from different geographic and varietal origins. A highly noticeable characteristic is the high variability of data, in good agreement with the literature available. Overall, they consist of oils with high content in fatty acids oleic and linoleic, low content in saturated fatty acids like palmitic and stearic, as well as low cholesterol. They also contain high levels of delta and gamma tocopherols. Stability of oils is however scarce, and this affects their quality, particularly in terms of the index of peroxides, making great part of the oils analyzed to be catalogued among the lower categories of the Moroccan regulation.

With the aim of contributing to the development of efficient methods to propagate the argan tree in the nature, we have set up different procedures for *ex vitro* and *in vitro* culture of the argan seed, alternative to those already developed. In the case of *in vitro* culture, a method has been designed including the use of a culture medium with low salinity, and the addition of several gibberellins, which allowed us to obtain relevant rates of germination and rooting, as well as good levels of secondary rooting, adequate for transplantation. Moreover, this system allowed us to perform an extensive histological and structural analysis of the *in vitro* germination in this plant.

Indice

- Agradecimientos

- Resumen

- Abstract

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Un poco de historia.....	3
1.2 Botánica.....	4
1.3 Distribución geográfica.....	8
1.4 Utilidad socio-económica.....	11
1.5 Variabilidad de argán y caracteres morfológicos.....	11
1.5.1 Marcadores morfológicos del árbol, fruto y semilla.....	12
1.5.2 Marcadores morfológicos del polen	13
1.6 Marcadores moleculares.....	16
1.6.1 Izoenzimas y otras proteínas.....	17
1.6.1.1 Superóxidodismutasas (SODs)	
1.6.1.2 Esterasas	
1.6.1.3 Proteínas de almacenamiento de semillas	
1.7 El aceite de argán.....	26
1.8 El cultivo <i>in vitro</i> de argán.....	28
2. OBJETIVOS.....	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
3.1. Prospección.....	39
3.2 Estudio morfológico de las distintas variedades de argán de la región de Chouhiya- Berkane (Noroeste de Marruecos)....	40
3.3. Materiales vegetales utilizados en las técnicas analíticas.....	42
3.4 Preparación, observación y análisis de muestras para Estudios histológicos y celulares.....	43
3.4.1 Fijación	43
3.4.2 Inclusión en parafina para observación a microscopía óptica.....	44
3.4.3 Tratamiento de los portaobjetos con TESPA.....	44
3.4.4 Inclusión en resina Unicryl para microscopía electrónica de transmisión.....	45
3.4.5 Inclusión en Epon para microscopía electrónica	

de transmisión.....	45
3.4.6 Obtención de cortes semifinos.....	46
3.4.7 Tinción de cortes semifinos para su observación	
Al microscopio óptico.....	47
3.4.8 Obtención de cortes ultrafinos.....	48
3.4.9 Recubrimiento de las rejillas con formvar.....	49
3.4.10 Contrastado de cortes ultrafinos para la	
observación de su ultraestructura mediante microscopía	
electrónica.....	50
3.4.10.1 Contrastado con acetato de uranilo	
3.4.10.2 Contrastado con citrato de plomo	
3.4.11 Detección de lípidos en secciones de semillas	
mediante tinción con Sudan Black.....	51
3.4.12 Análisis morfométrico.....	52
3.5 Análisis bioquímico de proteínas de almacenamiento	
de semilla.....	52
3.5.1 Extracción de proteínas de semillas	52
3.5.2 Análisis de solubilidad de las proteínas de	
Almacenamiento de semilla.....	53
3.5.3 Cuantificación de proteínas totales.....	53
3.5.4 SDS-PAGE en condiciones reductoras y no	
reductoras.....	54
3.5.5 Purificación de bandas individuales de proteínas	
de almacenamiento de la semilla.....	55
3.5.6 Inmunoblotting para proteínas 11S....	55
3.6 Identificación de isoenzimas de SOD en semillas y hojas .	56
3.6.1 Extracción de proteínas.....	56
3.6.2 Detección de actividad SOD en geles nativos de	
poliacrilamida.....	57
3.6.3 Ensayos de inhibición de actividad SOD.....	58
3.6.3.1 Inhibición con KCN	
3.6.3.2 Inhibición con H ₂ O ₂	
3.6.4 Estudio espectrofotométrico de la actividad	
SOD en hojas y semillas de distintas subespecies de	
argán.....	59
3.6.5 Detección de isoformas de SOD mediante	
inmunoblotting.....	61
3.7 Detección de actividades esterasas en semillas y hojas...	62
3.7.1 Extracción de proteínas de semillas para la	
determinación de actividad esterasa inespecífica	62

3.7.2	Ensayos espectrofotométricos de actividad esterasa inespecífica	62
3.7.3	Ensayos de actividad esterasa en geles de poliacrilamida en condiciones seminativas	63
3.8	Obtención y análisis de muestras de aceite.....	64
3.9	Ensayos de propagación.....	65
3.9.1	Germinación <i>ex vitro</i> de las semillas.....	65
3.9.2	Germinación <i>in vitro</i> de las semillas.....	66
3.9.3	Efecto de las giberelinas sobre los cultivos <i>in vitro</i> de semillas.....	68
3.9.4	Efecto de la combinación de hormonas ANA y BAP	69
3.9.5	Efecto del frío sobre la germinación <i>in vitro</i> de las semillas.....	69
4.	RESULTADOS.....	71
4.1.	Descripción pomológica de las subespecies de <i>Argania spinosa</i> L.	73
4.1.1.	Descripción morfológica atendiendo a las flores e inflorescencias.....	80
4.1.2.	Descripción varietal atendiendo al tipo de ramas: espinas y espaciado de los entrenudos.....	85
4.1.3.	Análisis comparativo varietal de los caracteres morfológicos de la antera y del grano del polen	87
4.1.3.1.	Análisis citológico mediante microscopía óptica (MO).	
4.1.3.2.	Análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión (MET).	
4.2.	Identificación de isoenzimas de SOD en semillas y hojas de <i>Argania spinosa</i> L.	102
4.2.1.	Estudio espectrofotométrico de la actividad SOD en semillas y hojas de variedades de <i>Argania spinosa</i> L.....	102
4.2.2.	Actividad SOD en semillas.....	103
4.2.2.1.	Detección de la actividad SOD en geles nativos de poliacrilamida.	
4.2.2.2.	Identificación del tipo de SOD mediante ensayos de inhibición con KCN y H ₂ O ₂	
4.2.2.3.	Detección de isoformas SOD mediante inmunobloting	
4.2.3.	Actividad SOD en hojas.....	112
4.2.3.1.	Detección de actividad SOD en geles	

	nativos de poliacrilamida.	
	4.2.3.2. Identificación del tipo de SODs en hoja mediante ensayos de inhibición con KCN y H ₂ O ₂	
	4.2.3.3. Detección de isoformas SOD mediante inmunoblotting	
4.3.	Análisis de la actividad esterasa en semillas de argán.	118
4.3.1.	Ensayos espectrofotométricos de la actividad esterasa no específica en extractos de semillas.....	118
4.3.2.	Actividad esterasa en geles de poliacrilamida en condiciones seminativas.....	120
4.4	Proteínas de almacenamiento en semillas de argán.....	122
4.4.1.	Análisis de la solubilidad de las proteínas de almacenamiento de las semillas de argán.....	122
4.4.2.	Análisis bioquímico de las proteínas 11 S en la semilla de argán	124
4.4.3.	Purificación de componentes individuales de las proteínas 11S en la semilla de argán.....	125
4.4.4.	Identificación varietal en base a las proteínas 11S de semillas de argán.....	128
4.4.5.	Detección de proteínas en semillas durante la maduración de la semilla de argán.....	132
4.5.	Análisis de aceite de argán: composición en ácidos grasos, esteroides y capacidad antioxidante.....	138
4.6.	Optimización de métodos de cultivo in vitro de argán para favorecer su propagación en la Naturaleza	142
4.6.1.	Germinación ex-vitro de las semillas.....	142
4.6.2.	Germinación in vitro de las semillas	144
4.6.3.	Efecto de la adición de hormonas al medio de cultivo..	148
4.6.3.1.	Adición de giberelinas.	
4.6.3.2.	Efecto de ANA y BAP	
4.6.3.3.	Efecto de la imbibición	
4.6.3.4.	Efecto del frío	
4.6.4.	Análisis macroscópico, citológico del proceso de germinación <i>in vitro</i>	154
4.7.	Detección de lípidos durante la maduración de la semilla de argán.....	161
5.	DISCUSIÓN.....	169
5.1	El argán posee una amplia variabilidad morfológica.....	171
5.2	El argán posee una fenología floral compleja, que suscita	

el que existan aún numerosas incógnitas sobre su biología reproductiva.....	174
5.3 La optimización de métodos de análisis proteico y de Actividad enzimática en tejidos de argán permite abordar nuevos estudios sobre la biología reproductiva y la estabilidad y usos del aceite y las semillas.....	177
5.4 Las semillas de argán contienen importantes cantidades De proteínas de almacenamiento de tipo 11S que les confieren un elevado poder nutricional.....	181
5.5 El aceite de argán posee una composición diferencial con respecto a otros aceites alimentarios ampliamente utilizados, y una gran variabilidad entre muestras.....	185
5.6 El desarrollo de nuevos métodos de propagación del argán mediante germinación (in vitro) de semillas permitirá mitigar la deforestación y fomentar nuevos usos de esta especie.....	190
6. CONCLUSIONES.....	195
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	201
8. APÉNDICES.....	235
- Lista de abreviaturas	
- Proceedings 3rd International SMBBM Congress, IUBMB Special Meeting &	
- 6th FASBMB Congress, Marrakesh, 2009 358-362. (2009).	







1.1.Un poco de historia.

En 1801 Schousbo, cónsul de Dinamarca en Marruecos desde 1791, publica sus observaciones sobre la flora de Marruecos y particularmente sobre el argán. Muchos autores (Correa de Serra 1806; de Candolle 1844; le Vicomte de Noe 1853) citaron dichas observaciones más tarde y completaron su descripción de este árbol. En 1878 Hooker describió el método de extracción de aceite de argán. En 1888, Cotton aisló un principio activo a partir de la mezcla del fruto de argán y lo identificó como una mezcla de saponinas a la que llamó “arganina”. En 1897, Engler completó la descripción del argán. En 1906, Gentil definió el área geográfica de argán del Souss. En 1925 Emberger precisó la antigua extensión de la especie. En 1926, Maire publicó tras sus misiones en Souss, su primer artículo sobre la vegetación del Suroeste de Marruecos, citando dos tipos de argán: Argán como *Euphorbia echinus* (del litoral atlántico) y argán como *Hesperola burnum platycarpum* (de las montañas de Adar), evocando así la primera clasificación de argán de las planicies y las montañas. En 1929, Battino se interesó en el aceite y otros productos de argán, especialmente la “arganina”, a la que atribuyó una acción hemolítica *in vivo* e *in vitro*. En 1938, Emberger publicó “Les chèvres et l’arganier”. En 1965, Monnier demostró que la explotación abusiva por parte del hombre y el ganado eran las dos causas fundamentales de la regresión en el área de extensión del argán.

El nombre científico del argán, reconocido desde 1911 según el índice Kewensis, es *Argania spinosa* (L.) Skeels. Actualmente el argán es

Introducción



una especie en peligro de extinción, protegida por la Ley de Dahir marroquí y declarada Patrimonio de la Humanidad por la UNESCO desde 1989.

El argán ha despertado el interés de investigadores debido a las propiedades farmacológicas y las múltiples aplicaciones de su aceite en medicina, cosmética, alimentación, etc. (Morton y Voss 1987). Hoy en día el argán es muy conocido por las virtudes curativas de su aceite en laboratorios de productos cosméticos de prestigio internacional como Galénic, Yves Rocher y L'Oréal. Muchos laboratorios en EEUU, Alemania, Francia y China han puesto en marcha estudios de investigación sobre este árbol, que es el único de la familia de las Sapotáceas que puede vivir en condiciones de aridez. El argán permite un equilibrio ecológico en zonas áridas y podría ser introducido en zonas áridas de Europa. Una ventaja adicional de esta especie es que prácticamente no precisa labores de mantenimiento, excepto en los primeros años y se adapta muy bien en condiciones de sequía.

1.2. Botánica

Argania spinosa (L.) Skeels (sinónimo: *A. sideroxylon* Roem. & Schult.) es una especie endémica de Marruecos. Es la esencia forestal más original del África del norte por su interés botánico y sus múltiples usos de carácter socio-económico. Su clasificación botánica se muestra en la siguiente Tabla (Tabla 1).



Clasificación	
Phylum	<i>Fanerógamos</i>
Sub. Reino	<i>Angiospermas</i>
Clase	<i>Dicotiledónea</i>
Sub. clase	<i>Gamopétalos</i>
Orden	<i>Ebenales</i>
Familia	<i>Sapotaceae</i>
Genero	<i>Argania</i>
Especie	<i>Argania spinosa</i> (L.) Skeels

Tabla 1. Clasificación filogenética del argán

El árbol tiene un aspecto parecido a un olivo y puede llegar a alcanzar 8 a 10 metros de altura, según las condiciones ecológicas del lugar. Tiene un porte muy grande y un contorno redondo en general. Su tronco es muy vigoroso y corto. Las ramificaciones son muy diversificadas y densas y las extremidades de las ramificaciones suelen ser espinosas. Las hojas son persistentes. Sin embargo, en épocas de sequía prolongada, el árbol puede perder sus hojas en parte o totalmente. Las hojas tienen un color verde fuerte en el haz y verde claro en el envés. Están agrupadas en fascículos. Son lanceoladas, espatuladas ó ligeramente pecioladas, con un nervio central y nervios laterales muy finos y ramificados.



Figura 1. Árbol de argán en la región de Chouihya, provincia de Berkane.

El fruto es una baya de forma variable (oval, apuntada, redonda o globular) (Jaccard 1925). Se observa polimorfismo en la forma del fruto, la forma del árbol, su altura, la forma de las hojas, y otros parámetros.



Figura 2. Fruto de argán.

El fruto maduro tiene un color amarillo verdoso ó marrón según las variedades. El pericarpio contiene tres capas: el exocarpo (piel), el mesocarpo (pulpa) y el endocarpo (hueso) que contiene 1, 2 ó 3 semillas. El argán es una especie monoica con flores hermafroditas. Las inflorescencias

Introducción



se presentan como glomérulos axilares formados por 5-15 flores que están compuestas por cinco pétalos de color blanco. Los estambres son cinco en general, pero en algunas variedades el número puede aumentar hasta diez. El ovario es súpero, con un estilo corto, compuesto por 4 a 8 carpelos soldados, y cónico, con la altura de los estambres aunque en ocasiones los supera.

La floración tiene lugar generalmente en primavera o en otoño según las condiciones climáticas. Este hecho genera un escalonamiento en la maduración del fruto, que ocurre durante un largo periodo del año (de mayo a septiembre). Es particularmente intensa en las ramas en fase de elongación situadas en la periferia de la corona y muy rara en las ramas viejas donde los glomérulos nacen en las cicatrices de las hojas caídas. En estas ramas es frecuente el fenómeno de la coliflor que consiste en la acumulación de numerosas flores y que también ha sido descrito en otras Sapotáceas. La polinización es al 80% anemófila y al 20% entomófila (Thierry 1987).

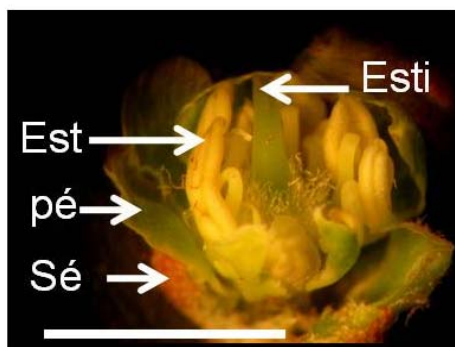


Figura 3. Flor hermafrodita de argán. Esti: Estigma; Pé: Pétalo; Est: Estambre, Sé: Sépalo. La barra representa 20 mm.

Introducción



El sistema radical del argán es altamente desarrollado. Es muy profundo y pivotante, para poder aprovechar al máximo las precipitaciones y afrontar las agresivas condiciones climáticas.

1.3. Distribución geográfica

El argán ocupa una superficie muy importante en Marruecos. Según algunos autores, dicha superficie oscila de 550.000 a 650.000 hectáreas (Emberger 1938,1939). Otros autores cifran su extensión en 700.000 hectáreas (Boudy 1950, 1952) y hasta 828000 hectáreas (Anónimo 1989, 1991).

El hábitat del argán se encuentra en las zonas subsaharianas de Marruecos, donde es capaz de vivir 150-250 años (Ehrig 1974). Está perfectamente adaptado a climas xéricos (precipitaciones 100-400 mm/año) y elevadas temperaturas (hasta 50° C). Se distribuye por cinco provincias marroquíes en ecosistemas áridos y semiáridos de influencia atlántica entre los 29° y 32° de latitud norte (Travis et al. 2002; Msanda et al. 2005), siendo las más importantes Agadir, Essaouira, Taroudant y Tiznit (Charrouf y Guillaume 2007). De forma subespontánea, aparece en el Sáhara, entre Djbel Ouarkiz y la Hamada de Tindouf (Argelia), en microhábitats húmedos, así como en ciertos puntos del levante español en Alicante (Rivera y Ruiz 1987; Crespo et al. 2007). El argán ha sido también examinado como cultivo candidato para su introducción en el desierto del Negev en Israel (Nerd et al 1994, 1998; Bellefontaine 2010). Su área de distribución silvestre es esencialmente el suroeste de Marruecos,

Introducción



extendiéndose desde la región de Essaouira hasta Oued Poum en su límite sur. Hacia el interior, las poblaciones más extensas se encuentran en el Oued Souss en la vertiente meridional del Alto Atlas, y las septentrionales y meridionales del Anti Atlas, alcanzando los 1.300-1.500 m (Msanda 1993; Msanda et al. 2005), donde crece en variados hábitats y densidades en los pisos infra y termomediterráneo inferior árido a semiárido con fuerte influencia oceánica (Emberger 1925, 1939; El-Aboudi et al. 1992; Quézel et al. 1995; Msanda et al. 2005). En algunos puertos de montaña, como Tizi n'Test, puede superar los 2.000 m de altura. Estas poblaciones ocupan un área de 820.000 ha, lo que representa el 7% de la cubierta forestal de todo el país. Algunas colonias aisladas se encuentran en el noreste de Marruecos (35° N, 3° W) a 400 y 700 Km de la masa principal: en Berkane en la vertiente norte de los Montes de Beni-Snassen cerca de la costa mediterránea (800 ha), en la llanura de Bou-Areg (Kariat Arakmane) en el Rif oriental, y en los valles altos de Oued Grou cerca de Rabat (50 ha) (Emberger 1924, 1925; Maire 1939; El Aboudi et al. 1992; Travis et al. 2002; Reda Tazi et al. 2003; Msanda et al. 2005).

Estas poblaciones aisladas de la masa principal han sido consideradas relictos de una distribución mucho más amplia del argán en el pasado (Boudy 1950; Tregubov 1963; Benabid 1985).

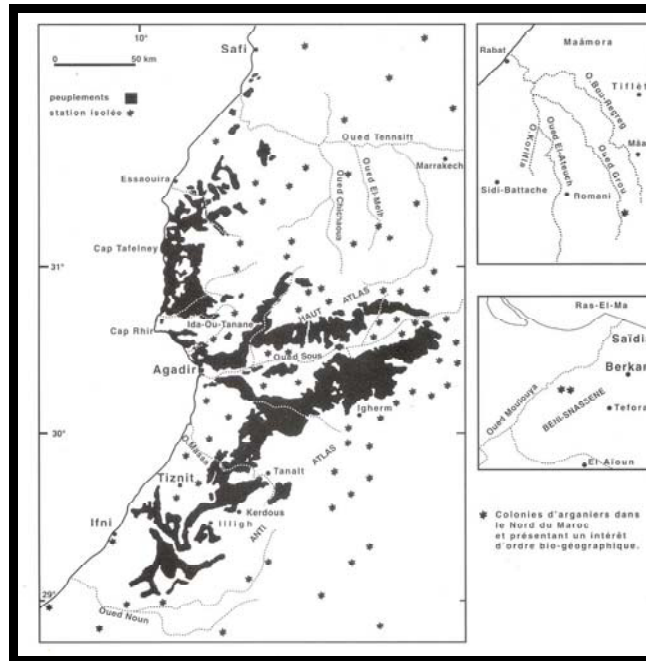


Figura 4. Localización del argán en Marruecos (Extraído de Peltier 1982).

Así, Emberger (1938) consideró que el área de argán fue históricamente mucho más amplia. La situación actual podría deberse a los cambios climáticos, de forma que el clima tropical previo puede haber dejado sitio a un clima de tipo mediterráneo durante el paso del Terciario al Cuaternario. La superficie actual del argán permite considerar a esta especie como la segunda especie forestal en abundancia en Marruecos, precedida por *Quercus rotundifolia* L., que ocupa 1.364.100 ha y seguida por *Tetraclinis articulata*, una especie forestal muy extendida también en Marruecos (607.900 ha). En cualquier caso, algunas estimaciones indican

Introducción



que la densidad del argán se ha reducido un 44.5 % durante el periodo 1970 a 2007 (le Polain de Waroux y Lambin 2012)

1.4. Utilidad socio-económica

Con una densidad media de 30 árboles/ha, se estima que el argán de Marruecos supone unos 21.000.000 árboles. Se cree que ese patrimonio genera 7.560.000 puestos de trabajo familiar por año sólo en extraer aceite y constituye un soporte alimentario permanente para 900.000 rumiantes (cabras y ovejas). Desde el punto de vista de la producción, el argán ofrece un triple aprovechamiento:

1. los frutos dan un aceite comestible,
2. los productos que se forman después de la extracción (pulpa, pasta) son muy apreciados por el ganado y
3. las cáscaras de las semillas están destinadas a la combustión.

Desde el punto de vista ganadero, el argán ofrece una cubierta de vegetación espontánea y un follaje muy apreciado por el ganado.

1.5. Variabilidad del argán y caracteres morfológicos

El conocimiento del patrimonio varietal es indispensable para la mejora de las especies puesto que representa su materia prima. Por tanto, la conservación y el estudio de los recursos genéticos son necesarios no sólo para salvaguardar el patrimonio genético, sino también para llevar a cabo estudios de mejora y selección varietal.



1.5.1. Marcadores morfológicos del árbol, fruto y semilla

La caracterización e identificación de variedades de las especies de interés agronómico se ha basado tradicionalmente en la utilización de esquemas pomológicos, empleando un número considerable de caracteres morfológicos y agronómicos. Caracteres como el vigor del árbol, la precocidad, la producción media, el enraizamiento, la susceptibilidad a enfermedades y plagas, se han utilizado en la evaluación agronómica de las distintas variedades. Así, el hombre ha seleccionado individuos con unas determinadas características, siendo ésta la base de la mejora genética clásica.

Para utilizar criterios agronómicos en la identificación varietal es necesario realizar un número elevado de repeticiones en el espacio y el tiempo, ya que son caracteres muy influenciados por las condiciones ambientales (Barranco et al. 2005). Los marcadores morfológicos y agronómicos siguen siendo ampliamente utilizados hoy en día ya que no requieren medios o tecnologías complicadas y también porque son los únicos marcadores basados en la observación directa de la planta.

No obstante, estos métodos presentan ciertas dificultades, principalmente derivadas de la influencia de las condiciones ambientales, el estado fenológico y el manejo que se realiza del cultivo en los caracteres de estudio. Además existe un problema de subjetividad a la hora de realizar la descripción.

Son pocos los datos disponibles sobre la estructura genética de las poblaciones de argán. Se han realizado caracterizaciones de variabilidad

Introducción



mediante marcadores morfológicos. Así, un estudio realizado por El Moussadik et al. (1995) sobre genotipos escogidos en 8 localizaciones eco-geográficamente representativas del área de distribución del argán, destacó que el argán tiene una diversidad genética importante a nivel intra e interpoblacional. La riqueza alélica resultó a veces diferente de una población a otra. Un estudio de caracterización llevado a cabo por Ferradous (1995) utilizando 11 caracteres morfológicos del fruto y de la semilla llegó a distinguir 6 variantes de la especie utilizando criterios biométricos (anchura/largo). El estudio de la variabilidad de formas del fruto y semilla permite una selección previa del material para estudios posteriores sobre la diversidad genética.

La variabilidad morfológica del argán fue siempre atribuida a la acción del ambiente. Sin embargo, la fuerte herencia de algunos caracteres demuestra que el componente genético en esa variabilidad es muy importante.

1.5.2. Marcadores morfológicos del polen

Los caracteres morfológicos del polen en las plantas con semillas han sido utilizados con éxito para la clasificación taxonómica de las especies vegetales (Martens y Fretz 1980). Además, utilizando estos marcadores se han podido discriminar variedades dentro de una misma especie. Así se ha realizado por ejemplo en olivo donde diferentes caracteres ultraestructurales de la pared del polen se han utilizado para la

Introducción



discriminación varietal en esta especie (Roselli 1979; Pacini and Vosa 1979; Lanza et al. 1995, 1996; Javady y Arzani 2001, Fendri 2011).

La exina y la intina constituyen los dos componentes principales de la pared del polen, y se distinguen entre sí por su naturaleza química, su morfología y su desarrollo (Heslop-Harrison 1975). La exina es la capa externa de la pared del polen. Presenta numerosas ornamentaciones, y está compuesta mayoritariamente por esporopolenina, un polímero de carotenoides y ésteres de carotenoides (Shaw, 1971), que se caracteriza por su resistencia a la biodegradación. La exina, a su vez, se diferencia en dos capas denominadas endexina y ectexina. Esta última está formada, a su vez por la capa basal, las columelas o báculas, y el téctum, que es el resultado del engrosamiento terminal de las báculas y que puede llegar a hacerse más o menos continuo y cubrir la parte externa de la exina. Con el MEB se puede apreciar especialmente la estructura reticulada de la exina, constituida por lo que se denomina muro (que corresponde al téctum) y que incluye en su parte más externa los elementos esculturales. Las superficies abiertas que se encuentran entre los muros se denominan lúmenes. La intina es la capa mas interna de la pared y está en contacto con el plasmalema. La intina constituye la pared primaria del polen y está compuesta de hemicelulosa y pectinas (Heslop-Harrison 1968; 1982). A nivel ultraestructural, está formada por una matriz fibrilar.

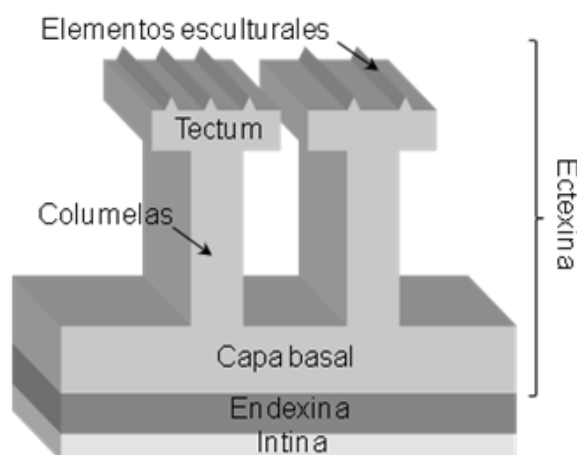


Figura 5. Composición de la pared del polen (Skvarla y Larson 1966)

Se conoce muy poco sobre la biología reproductiva del argán en general. Un estudio pionero sobre polen reveló una gran variabilidad morfológica, ya que existen 6 tipologías diferentes que presentan 2, 3, 4, 5 y 6 aperturas, y una alta variabilidad a nivel del diámetro también siendo estos componentes no independientes (Faouzia 2002). En el grupo de Biología Reproductiva de Plantas de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC) se han iniciado previamente diversos estudios de caracterización ultraestructural de la pared del grano de polen del argán (M'rani-Alaoui et al. 2003). La pared del polen maduro del argán presenta una exina bien desarrollada y una estructura bien definida, un tectum continuo de tipo rugulado-estriado, columelas cortas y una capa basal en la que no se observan “white lines”. La endexina está bien diferenciada de la ectexina, debido a su mayor densidad electrónica. Finalmente la intina está representada por una capa delgada excepto en las cinco regiones aperturales donde se engruesa. Se trata de un polen pentacolporado. Las

Introducción



características de esta pared así como el elevado número de aperturas indican que este polen está preparado para sufrir agresiones climáticas debido a la aridez de la zona donde se localiza este árbol (Hormaza y Herrero 1996).

1.6. Marcadores moleculares

En la actualidad se ha generalizado el uso de marcadores moleculares para el estudio de los recursos genéticos, ya que permiten complementar y ampliar la información obtenida con los métodos tradicionales (morfológicos), así como reducir algunos de los inconvenientes que supone el empleo de los mismos (por ejemplo la subjetividad y la influencia de las condiciones ambientales). Los marcadores moleculares constituyen también una herramienta eficaz para la identificación de plantas de vivero, con la posibilidad de establecer el correspondiente certificado de autenticidad. Los marcadores utilizados con más éxito en estudios de identificación varietal han sido las isoenzimas y los marcadores de ADN; como los de tipo RAPD, AFLP y microsatélite (SSR). Si bien estos marcadores podrían servir para establecer la identidad de los genotipos dada su capacidad discriminante, la elección de uno u otro va a depender de la complejidad técnica y del coste. Así, las isoenzimas y los RAPDs son marcadores útiles para identificar económicamente un elevado número de variedades, mientras que los AFLPs y microsatélites muy polimórficos requieren de una mayor infraestructura y son más caros. Por

Introducción



tanto, la sencillez, el coste y la capacidad de los laboratorios son factores que determinan la elección de uno u otro marcador.

1.6.1.-Isoenzimas y proteínas

Los primeros marcadores desarrollados para discriminación varietal, se basaron en la identificación de proteínas e isoenzimas por electroforesis en geles de almidón o poliacrilamida, (Pontikis et al. 1980; Ouazzani et al. 1993; Trujillo et al. 1995). Las isoenzimas se pueden definir como diferentes formas moleculares de una enzima que catalizan la misma reacción bioquímica. Según Murphy et al. (1990), las ventajas de las isoenzimas en la identificación varietal, así como en los estudios de biodiversidad, se deben a las siguientes características: en primer lugar son marcadores codominantes, rápidos, sencillos y económicos, presentes en todos los tejidos de la planta y en todos los estadios de desarrollo de la misma. Las isoenzimas se consideran como productos primarios del gen y, por lo tanto, sus patrones son reproducibles y muy poco afectados por las condiciones ambientales. El principal inconveniente de este tipo de marcadores es su nivel relativamente bajo de polimorfismo, que resulta insuficiente para identificar variedades muy próximas (Liu y Furnier 1993). Según nuestro conocimiento, los estudios de identificación varietal publicados hasta la fecha, basados en el uso de este tipo de marcadores en el argán son muy limitados (El Mousadik y Petit 1996).



1.6.1.1. Superóxido dismutasas (SODs)

Las SODs han sido utilizadas con éxito para estudios de identificación varietal en diversas especies como *Helianthus annuus* (Palomo et al. 1999), *Prunus armeniaca* (Zhebentiaeva et al. 2001) y *Dichanthium annulatum* (Saxena y Chandra 2010). Las SODs pertenecen a la superfamilia de metaloenzimas y producen la desproporción del radical superóxido (O_2^-), catalizando su conversión en H_2O_2 y O_2 .



Representan la primera ruta de defensa de la planta frente a los efectos tóxicos del radical superóxido producido en diferentes compartimentos celulares (Fridovich 1986; Halliwell y Gutteridge 2001). Existen tres tipos de SODs dependiendo del ión metálico integrante del grupo prostético: Mn, Fe y Cu-Zn (Fridovich 1986). El número y el tipo de isoenzimas SOD puede diferenciar las distintas variedades. También varía dependiendo del momento de desarrollo, de las condiciones ambientales y del tipo celular (Bridges y Salin 1981; Bowler et al. 1994, Kliebenstein et al. 1998; Alscher et al. 2002). Cada subtipo de SOD posee diferentes características moleculares.

Las Fe-SODs constituyen probablemente el grupo más anciano de SODs (Alcher et al. 2002), y están ampliamente distribuidas por todo el reino vegetal (Salin y Bridges 1981). Se inactivan por H_2O_2 y son resistentes a la inhibición por KCN. Han sido descritos dos grupos distintos de Fe-

Introducción



SOD. El primero es un homodímero formado por dos subunidades idénticas de 20 kDa, con 1 o 2 átomos de Fe en el centro activo. El segundo grupo de Fe-SODs, que se encuentra en la mayoría de las plantas superiores, es un tetrámero con un peso molecular de 80-90 kDa con 2-4 átomos de Fe en el centro activo (Alsher et al. 2002). Las Fe-SODs se localizan principalmente en cloroplastos (Salin 1988; Asada 1994), pero también en peroxisomas (Droillard y Paulin 1990).

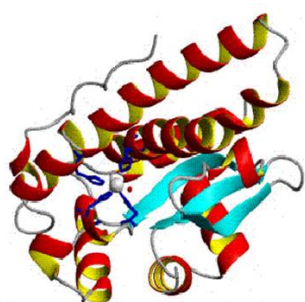
Las Mn-SODs son estructuralmente homodímeros y homotetrámeros formados por subunidades de 23 kDa (Bannister et al. 1987). Las Mn-SODs no se inhiben ni con cianuro ni con H_2O_2 y están presentes en mitocondrias y en peroxisomas (Baum y Scandalios 1981; del Río et al. 1983; Palma et al. 1986; Sandalio y del Río 1987; Bowler et al. 1994; Corpas et al. 1998; del Río et al. 2003). El gen de la Mn-SOD se expresa en todos los tipos celulares, siendo la única SOD presente en tejidos vasculares (Corpas et al. 2006).

Las Cu,Zn-SODs, también denominadas SOD A, son proteínas muy estables y parecen estar presentes en prácticamente todas las células eucariotas (Halliwell y Gutteridge 1985). Son dímeros formados por dos subunidades idénticas que incluyen un átomo de Cu y otro de Zn en cada una. El átomo de cobre interviene en la reacción de dismutación, mientras que el átomo de Zn parece estabilizar la enzima (Halliwell y Gutteridge 1985). El peso molecular de la forma dimerica es de aproximadamente 32 kDa. Se inhiben reversiblemente por cianuro y por concentraciones de H_2O_2 superiores a 10 μ M (Fridovich 1978). Las Cu,Zn-SODs han sido localizadas

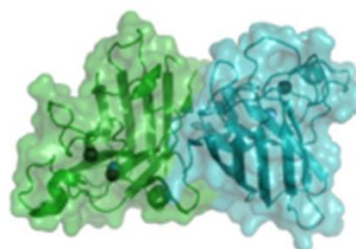
Introducción



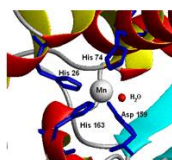
en el citosol, en los cloroplastos, peroxisomas y en el apoplasto (Sandalio y del Río 1987, 1988; Salin 1988, Kanematsu y Asada 1991; Ogawa et al. 1996, 1997; Sandalio et al. 1997; Corpas et al. 1998; del Río et al. 2002). Existe una gran diferencia entre las Cu,Zn-SODs citosólicas y cloroplastídicas. Los dos grupos divergieron pronto en la evolución. Mientras que las Cu,Zn-SODs cloroplastídicas tienen 153 aminoácidos y el aminoácido terminal puede ser una leucina, una isoleucina o una valina, las SODs citosólicas tienen 152 aminoácidos y el último aminoácido es siempre una glicina. El resto de la secuencia presenta un alto grado de homología (Fink y Scandalios 2002).



Estructura monomérica de la Mn- SOD del citoplasma humana.



Estructura dimérica de la Cu- SOD del citoplasma humana.



Estructura del sitio activo de la Mn- SOD de la mitocondria humana.

Figura 6. Estructura de varias isoformas de SOD humana (extraído de la web: www.enzyme.wikibis.com)

Introducción



Según nuestro conocimiento, no existen estudios previos de caracterización de SODs en *Argania spinosa* L. disponibles en la literatura.

1.6.1.2 Esterasas

Las esterasas son un grupo de enzimas capaces de hidrolizar ésteres en sus componentes ácidos y alcoholes. El polimorfismo isoenzimático de las esterasas está documentado desde los años 60 (Schwartz 1967). Además, son muy útiles en los estudios de variabilidad genética porque su especificidad para distintos sustratos permite el análisis simultáneo de varios loci. Las esterasas pertenecen a menudo a familias multigénicas (Oakeshott et al. 1993; Robin et al. 1996). Se han detectado de 14 a 16 isoenzimas esterasas mediante geles de poliacrilamida en diferentes especies vegetales (Pereira et al. 2001; Carvalho et al. 2003; Orasmo et al. 2007; Frigo et al. 2009). Muy recientemente se ha realizado en el grupo de investigación un estudio de actividad esterasa sobre 13 variedades de olivo a partir de extractos de polen. Este estudio ha mostrado un gran polimorfismo entre cultivares tanto en el número de bandas esterolíticas como en la intensidad de las mismas (Rejón 2012). Este estudio se completó estudiando la implicación de estas esterasas en la interacción polen-pistilo.

En los ensayos de actividad esterasa, se pueden utilizar diferentes sustratos (naftol-AS-C-cloroacetato, naftol-AS-D-acetato, alfa-naftil-acetato y alfa-naftil-butirato). En todos los casos, estos sustratos al ser hidrolizados en presencia de una sal diazoica producen un precipitado insoluble en el lugar de la reacción.

Introducción



Hasta la fecha, según nuestro conocimiento, el uso de estas enzimas para la identificación varietal de argán es muy limitado (El Mousadik y Petit 1996).

1.6.1.3 Proteínas de almacenamiento de semillas

Las semillas son los órganos de propagación de la planta, y en muchos casos son consumidas por el hombre y otros animales. El porcentaje de proteínas en semillas es aproximadamente un 10% en cereales y un 40% en algunas leguminosas y semillas oleaginosas. La mayoría de las proteínas de las semillas maduras tienen un papel metabólico o estructural y sirven para suministrar aminoácidos durante el periodo de desarrollo y germinación de la semilla. En las semillas siempre existe un grupo o más de proteínas de almacenamiento que se presenta en un porcentaje muy alto en comparación con los demás grupos. Estas proteínas suelen ser responsables de la calidad alimenticia de estas semillas. Por ejemplo, el bajo contenido en lisina, treonina y triptófano en varios cereales y de cisteína y metionina en semillas de las leguminosas puede limitar la calidad nutricional de éstas. A pesar de la gran variación en su estructura, todas las proteínas de almacenamiento de la semilla tienen propiedades comunes. Primero, son sintetizadas en grandes cantidades en tejidos especializados y en estadios precisos del desarrollo de la semilla. La síntesis de esas proteínas de almacenamiento está regulada por la nutrición de la planta. Así, se necesita un elevado aporte de nitrógeno y azufre. Otra propiedad común de las proteínas de almacenamiento es su presencia en semillas maduras en forma

Introducción



de cuerpos proteicos discretos (“protein bodies”). Finalmente, las proteínas de almacenamiento son una mezcla de componentes que muestran polimorfismo dentro de la misma especie. Este polimorfismo es debido a la presencia de familias múltigénicas o en algunos casos, a procesos proteolíticos y de glucosilación.

Por su importancia económica y su abundancia, las proteínas de almacenamiento fueron las primeras proteínas caracterizadas. Por ejemplo, el gluten del trigo fue aislado por Beccari en 1745. En 1924, Osborne clasificó las proteínas de almacenamiento en 4 grupos diferentes, dependiendo de su solubilidad en agua (albúminas), en solución salina (globulinas), alcohol/agua (prolaminas) o en solución ácida o básica (glutelinas). La mayoría de las proteínas de almacenamiento de semillas incluyen albúminas, globulinas y prolaminas.

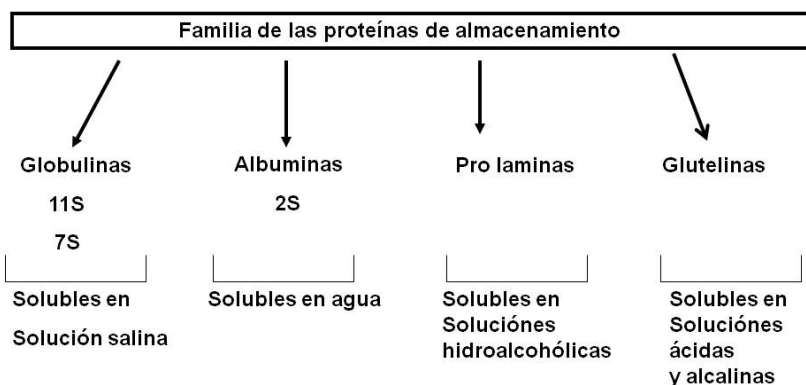


Figura 7. Esquema de los cuatro grupos de proteínas de almacenamiento.
(Osborne, 1924).

Las albúminas, están frecuentemente presentes en semillas de dicotiledóneas y han sido estudiadas especialmente en las crucíferas, sobre

Introducción



todo en las semillas oleaginosas de colza (siendo denominadas napinas) y *Arabidopsis*. Las llamadas napinas consisten en dos polipéptidos de peso molecular ~ 9.000 y 4.000 Da unidos por puentes disulfuro y se denominan albúminas de tipo 2S (Ericson et al. 1986). Las napinas son sintetizadas como un solo precursor. La estructura heterodimérica y las cisteínas implicadas en los puentes disulfuro están ampliamente conservadas en esta familia de proteínas en distintas especies como calabaza, algodón y altramuza (Galan et al. 1982; Lille e Inglis, 1986; Hara-Nishimura et al. 1993;).

Las globulinas son el grupo más ampliamente distribuido de proteínas de almacenamiento. Están presentes en dicotiledóneas, monocotiledóneas, incluyendo cereales y palmeras, así como las esporas de helechos (Templeman et al. 1987). Se pueden dividir en dos grupos, basados en el coeficiente de sedimentación (S_{20w}): vicilinas 7S y leguminas 11S. Los dos grupos muestran una variación considerable en su estructura, resultado en parte del procesado post-traducciona. Los dos grupos tienen un importante papel nutricional. Las globulinas son generalmente deficientes en cisteína y metionina, mientras que las globulinas 11S tienen un porcentaje ligeramente más alto de ambos aminoácidos. Las globulinas han sido estudiadas con mucho detalle en leguminosas, especialmente en *Vicia faba* y *Phaseolous vulgaris*.

Las leguminas 11S son las proteínas de almacenamiento mayoritarias no solamente en las leguminosas, sino también en otras dicotiledóneas y algunos cereales como el arroz y la avena. Previamente, en el grupo de investigación también se ha determinado que las proteínas 11S son el componente mayoritario de las proteínas de almacenamiento de la

Introducción



semilla del olivo, representando prácticamente el 70% de las proteínas totales (Alché et al. 2006). La proteína madura consiste en 6 subunidades unidas por uniones no covalentes. Cada subunidad consiste en un par de polipéptidos, uno ácido de Mr ~ 40.000 y otro básico de Mr ~ 20.000, unidos por un puente disulfuro. Cada subunidad es sintetizada como una proteína precursora que es procesada proteolíticamente, después de la formación del puente disulfuro. El grupo ha desarrollado un anticuerpo frente a proteínas 11S de olivo que detecta proteínas inmuno-relacionadas en otras especies de semillas oleaginosas como el sésamo o el girasol (Alché et al. 2006).

Las globulinas 7S, son proteínas típicamente triméricas de peso molecular Mr ~ 150.000 a 190.000. Son proteínas deficientes en cisteína y por eso no pueden formar puentes disulfuro. La composición de las subunidades varía considerablemente debido a los procesos post-traduccionales (proteólisis y glucosilación).

Como hemos dicho anteriormente, el contenido proteico en las semillas, es muy importante nutricionalmente. Por ello en esta tesis hemos analizado las proteínas 11S (las proteínas de almacenamiento mayoritarias en un gran número de especies), en las semillas de argán y también su posible utilización como marcadores moleculares para identificación varietal.



1.7. El aceite de argán

Tradicionalmente el aceite de argán es extraído de las semillas del fruto mediante un procedimiento esencialmente artesanal (Morton y Voss 1987; Charrouf y Guillaume 1999, 2002a, 2008). Son las mujeres las que cumplen tradicionalmente esta tarea. Los frutos son recolectados entre mayo y agosto y secados al sol durante varios días. Luego, utilizando piedras, se extrae la pulpa de la dura cáscara de las semillas de argán (denominada “nuez de argán”). La pulpa es comestible para el ganado doméstico; mientras que las cáscaras secas pueden utilizarse como combustible. Posteriormente se machacan las nueces peladas del argán con las mismas piedras y se tuestan a fuego lento en ollas de barro hasta que adquieren un color marrón (esa operación es muy importante porque la evaporación de agua conlleva una destrucción de saponinas y otros compuestos no lipídicos). Una vez secas, se muelen en un molino utilizado antiguamente para moler los cereales, obteniéndose una masa aceitosa a la que se añade regularmente agua hasta obtener una pasta o torta suave que se amasa y se prensa constantemente para ir separando el aceite, que es finalmente embotellado. La extracción del aceite es incompleta, quedando aproximadamente un 20% de aceite en la pasta. Si el aceite de argán se prepara correctamente, sobre todo si el agua añadida es de alta calidad, puede conservarse durante varios meses; en caso contrario, su consumo ha de ser rápido. La cantidad de agua modifica la composición del aceite sobretodo disminuyendo la cantidad de fenoles que son agentes

Introducción



antioxidantes relativamente polares e hidrófilos. Se calcula que para obtener un litro de aceite se necesitan unos 34 kg de frutos secos.

Las propiedades organolépticas del aceite son muy apreciadas por su sabor a avellana. Las comunidades bereberes lo toman en tostadas durante el desayuno, para cocinar o en ensaladas (Charrouf y Guillaume 1999). También se consume mezclado con almendras y miel en forma de una pasta muy energética llamada “*amlou*”. Su contenido elevado en ácidos grasos insaturados y su rica fragancia y aroma le dotan de un gran valor dietético y culinario (Farines et al. 1984a; Morton y Voss 1987; Prendergast y Walker 1992).

A las características bioquímicas del aceite de argán le atribuyen sus propiedades particulares: es un aceite de tipo oleico-linoleico (rico en ácidos grasos insaturados que representan el 80%). El ácido linoleico representa el 36%. Se le atribuye un papel importante en la reducción del infarto del miocardio, la reducción del colesterol y el desarrollo cerebral. Ha sido siempre recomendado también para el reumatismo y el tratamiento de la diabetes.

Los ácidos grasos esenciales del aceite de argán superan en proporción los de la leche materna, que contiene un 10% de ácido linoleico. También supera en proporción a los ácidos grasos de la carne y el pescado. Por eso se indica que este aceite es también recomendable para la alimentación de los bebés.

Introducción



El uso tradicional de la pasta para la belleza de las mujeres de la zona hizo surgir la idea de introducir los productos de argán en la industria cosmética, hecho que ha tenido un enorme auge en estos últimos años. El aceite de argán tiene un enorme poder antioxidante, sobre todo en la piel para combatir las arrugas y la sequedad. También permite combatir el acné, por sus propiedades bactericidas.

1.8. El cultivo *in vitro* de argán

El argán constituye el tercer cultivo forestal en Marruecos. Esta especie endémica está sometida a una degradación alarmante debido a la explotación abusiva. En la actualidad, la regeneración natural del argán es muy escasa debido a que sus semillas se recogen para la extracción de aceite y las pocas que quedan en el suelo germinan, pero posteriormente son destrozadas por el ganado.

Se han realizado diversos ensayos de multiplicación vegetativa convencional para acelerar la producción en masa de árboles y conservar la especie. Muchos de ellos han resultado ineficaces debido a la dificultad innata de enraizamiento en el argán (Mokhtari y Zakaria 1998), y a la heterogeneidad de sus semillas debido a una reproducción fundamentalmente alógama (Msanda 1993).

La propagación del argán tanto por semillas como por esquejes es complicada debido principalmente a la inhibición tegumentaria (Nouaim

Introducción



1991; Berka y Harfouche 2001; Nouaim et al. 2002; Miloudi y Belkhodja 2009). La semilla posee unos tegumentos muy gruesos y rígidos, por lo que es muy difícil la regeneración del argán a partir de la semilla. Tanto la germinación como las primeras etapas de desarrollo seminal son periodos críticos en el establecimiento de esta especie, y los escasos ensayos de producción de semillas en vivero son muy heterogéneos en su éxito (Alouni y Bani-Aameur 1999, 2004). La viabilidad y la dormancia de las semillas son factores limitantes en la propagación del argán (Alouani y Bani-Aameur 2004; Al-Menaie et al. 2007). Se estima que la dormancia afecta a un 30% de las semillas (Al-Menaie et al., 2008). La germinación del argán requiere temperaturas nocturnas superiores a 21° C (Zahidi y Bani- Aameur 1997). Se han realizado diferentes ensayos y se ha observado que un mes de almacenamiento en frío, la escarificación de la semilla, el remojo previo en agua a diversas temperaturas, utilizar un medio de cultivo a base de turba y humus, la aplicación de fungicidas, el control del pH, y pre-tratamientos con ácido giberélico o nitrato potásico parecen reducir la dormancia e incrementar la tasa de germinación, dependiendo del genotipo materno (Bani –Aameur y Alouani 1999; Nouaim et al. 2002; Alouani y Bani-Aameur 2004; Al-Menaie et al. 2007, 2008; Miloudi y Belkhodja 2009).

Otro factor importante es que los frutos tienen un largo periodo de maduración tras la antesis (9-16 meses) (Bani- Aameur 2000, 2002). Esto se considera también un obstáculo severo para una producción fructífera organizada (Nerd et al. 1998), aunque sea una característica adaptativa propia de ambientes mediterráneos (Msanda et al. 2005).

Introducción



Las técnicas de cultivo *in vitro* parecen ser las que albergan mayor potencial en la micropropagación de la especie, minimizando la influencia del medioambiente y de los tegumentos de la semilla y facilitando el enraizamiento (Bousselmane et al. 2001; Nouaim et al. 2002; Majourhat et al. 2007). Así, para el argán se han utilizado por ejemplo, pre-tratamientos de la semilla con agua para ablandarla y facilitar su germinación. También ha sido ensayado el cultivo *in vitro* de la semilla utilizando diferentes medios basados en el medio MS0 (Murashige y Skoog 1962), hormonas como ANA e IBA (Farah et al. 2001). También se han realizado cultivos *in vitro* de los tallos del argán (Nouaim et al. 2001).

Un problema adicional lo constituye la transferencia de las plántulas al suelo, que debido a la fragilidad de las raíces, es responsable de importantes pérdidas en la fase de aclimatación. Bouselmame et al. (2001) han analizado las condiciones del cultivo *in vitro* para inducir el enraizamiento de las plántulas y facilitar su transferencia fuera de las condiciones estériles.





II-Objetivos



Objetivos

II-Objetivos



II-Objetivos



A pesar de la importancia socio-económica del argán en su zona de desarrollo, parece claro del análisis de la bibliografía disponible que existen numerosas lagunas en el conocimiento básico sobre esta especie. Con el propósito de contribuir a disminuir la clara regresión a la que se encuentra sometida esta planta y a una mejor valorización de los productos obtenidos a partir de ella, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Caracterizar la variabilidad del argán (*Argania spinosa* L.) en el noroeste de Marruecos (Región de Chouihya, provincia de Berkane) y del Suroeste de Marruecos (Agadir) mediante el uso de parámetros pomológicos, histológicos, estructurales y bioquímicos.
- 2.-Analizar parámetros bioquímicos esenciales (composición en ácidos grasos, esteroides y capacidad antioxidante) del aceite de argán de distintas procedencias geográficas y varietales.
- 3.- Contribuir a la propagación del argán en la naturaleza mediante la optimización de métodos de cultivo *in vitro* de la semilla que garanticen una germinación rápida y un crecimiento y enraizamiento adecuados para el trasplante.

II-Objetivos





Materiales y Métodos





3.1. Prospección

El trabajo de prospección del material se realizó en colaboración con los habitantes del pueblo de “Amazigh” de Beni-Snassen. La zona de prospección se representa en la figura 8. En dicha zona se realizaron diversas rutas prospectivas y fueron definidos árboles de argán representativos de las distintas tipologías morfológicas analizados en este estudio. Para ello se utilizaron como parámetros morfológicos aquellos definidos para el olivo (*Olea europaea* L.) por Barranco y Rallo (1984). Los ejemplares caracterizados como modelo fueron marcados y utilizados para la recolección de material vegetal según se describe más adelante.

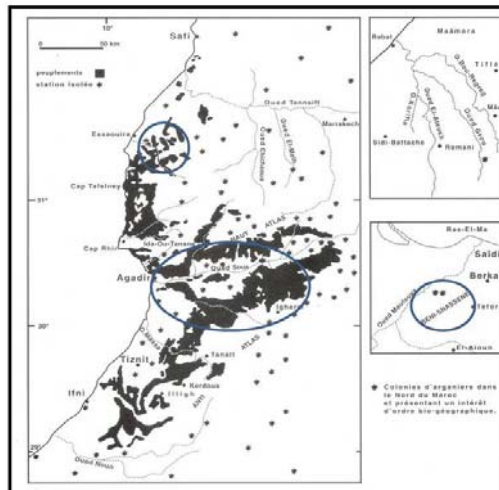


Figura 8. Mapa representativo que muestra marcadas con un círculo las tres zonas ricas en argán estudiadas en ese trabajo (Extraído de Peltier 1982).

III-Materiales y Métodos



3.2. Estudio morfológico de las distintas variedades de argán de la región Chouhiya-Berkane (Noroeste de Marruecos)

Para documentar los distintos tipos morfológicos del argán se realizaron fotos del árbol completo, hojas, frutos, semillas y flores. La discriminación se basó en los parámetros que se describen en la tabla 2, ampliamente utilizados para la caracterización pomológica del olivo (Barranco y Rallo 1984), ligeramente modificados para su adaptación al argán.

Caracteres del ÁRBOL	VIGOR Se refiere al tamaño del árbol	Bajo
		Medio
	DENSIDAD DE LA COPA Esté parámetro indica la abundancia de vegetación de la copa.	Elevado
		Clara
		Media
		Espesa
Caracteres de la HOJA	LONGITUD En el caso de argán las hojas son de longitud menor que las de olivo. Las medidas se hicieron sobre 100 hojas.	Corta (<2cm)
		Media (3-5 cm)
		Larga (>6)
	ANCHURA Las medidas se hicieron sobre 100 hojas.	Estrecha (<1 cm)
		Media (1-1,5 cm)
		Ancha (>1,5 cm)
	FORMA Determinada por la relación entre la longitud (L) y la anchura (A):	Elíptica (L/A)<4
		Elíptica-lanceolada (L/A) 4- 6
		Lanceolada (L/A)>6
	CURVATURA LONGITUDINAL DEL LIMBO	Hiponástica (haz cóncavo)
Plana		
Epinástica (envés cóncavo)		
		Helicoidal
Caracteres del FRUTO Determinados en una muestra de 100 frutos maduros tomados de la zona media de las ramas fructíferas, en su cara Sur y eliminando los frutos	PESO	Bajo (<3g)
		Medio (3-5g)
		Elevado (5-8g)
		Muy elevado (>8g)
	FORMA (en posición A) Determinada en función de la relación entre la longitud (L) y la anchura (A):	Esférica (L/A<1,25)
		Ovoidal (L/A 1,25-1,45)

III-Materiales y Métodos



<p>mayores y menores. Se denomina posición "A" aquella en la que el fruto presenta mayor asimetría al sujetarlo por sus extremos entre los dedos índice y pulgar. La posición "B" es la que resulta de girar 90° la anterior, quedando la parte más desarrollada hacia el observador.</p>		Alargado ($L/A > 1,45$)
	GRADO DE SIMETRÍA (en posición A) Determinado por la correspondencia entre sus dos mitades longitudinales	Simétrico
		Ligeramente asimétrico
		Asimétrico
	DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO (en posición B) Según su situación	hacia la base
		centrado
		hacia el ápice
	ÁPICE (en posición A)	Apuntado
		Redondeado
	BASE (en posición A)	Truncada
	Redondeada	
PEZÓN Carácter del punto estilar del fruto	Ausente	
	Esbozado	
	Evidente	
PRESENCIA DE LENTICELAS Este carácter se determina visualmente cuando el fruto está aún verde	Escasas	
	Abundantes	
TAMAÑO DE LAS LENTICELAS Este carácter se determina visualmente cuando el fruto está aún verde	Escasas	
	Abundantes	
COLOR EN MADURACIÓN Este carácter se observa al final del proceso de maduración del fruto cuando alcanza el color definitivo.	Verde, marrón....	
<p>Caracteres del ENDOCARPO Determinados en una muestra de 100 frutos maduros tomados de la zona media de las ramas fructíferas, en su cara Sur y eliminando los frutos mayores y menores. Se denomina posición "A" aquella en la que el fruto presenta mayor asimetría al sujetarlo por sus extremos entre los dedos índice y pulgar. La posición "B" es la que resulta de girar 90° la anterior, quedando la parte más desarrollada hacia el observador. peso: Bajo (<1,2g); peso Medio (1,2- 2g); peso Elevado (2- 2,5g); Muy elevado (>2,5g).</p>	PESO	Bajo (<1,2g)
		Medio (1,2- 2g)
		Elevado (2- 2,5g)
		Muy elevado (>2,5g)
	FORMA (en posición A) Determinada en función de la relación entre la longitud (L) y la anchura (A)	Esférica ($L/A < 1,4$)
		Ovoidal ($L/A 1,4- 1,8$)
		Elíptica ($L/A 1,8-2,2$)
		Alargada ($L/A > 2,2$)
	GRADO DE SIMETRÍA (en posición A): Determinado por la correspondencia entre sus dos mitades longitudinales	Simétrico
		Ligeramente asimétrico
		Asimétrico
	GRADO DE SIMETRÍA (en posición B)	Simétrico
		Ligeramente asimétrico.
	DIÁMETRO TRANSVERSAL MÁXIMO (en posición B): Según su situación	Hacia la base
		Centrado
		Hacia el ápice
	ÁPICE (en posición A)	Apuntado
Redondeado		
BASE (en posición A)	Apuntada	
	Truncada	
	Redondeada	

III-Materiales y Métodos



	NÚMERO DE SURCOS FIBROVASCULARES Se observan desde el punto de inserción del pedúnculo	Uniforme
		Agrupados junto a la sutura
	TERMINACIÓN DEL ÁPICE El mucrón es la terminación apuntada de una extremidad del endocarpo.	Con mucrón
		Sin mucrón

Tabla 2. Caracteres morfológicos utilizados en la clasificación.

3.3. Materiales vegetales utilizados en las técnicas analíticas

Para llevar a cabo el presente trabajo de investigación, se recogieron hojas, semillas y flores de siete subespecies de argán seleccionadas a las que hemos denominado argán (genérico), argán de árbol pequeño, argán de fruto alargado, argán de hojas pequeñas, argán de fruto apuntado, argán de fruto grande y argán sin fruto. Las hojas, frutos y flores fueron inmediatamente diseccionados y fijados para microscopía ó bien congelados inmediatamente en N₂ líquido y almacenados a -80° C hasta su posterior uso. Las semillas se guardaron a temperatura ambiente en lugar seco. Las anteras fueron recogidas de las flores bajo una lupa binocular y fijadas para procesarlas a microscopia óptica y electrónica. A lo largo del presente trabajo se utilizó argán (genérico) para los estudios indicados, salvo que se mencione lo contrario.

III-Materiales y Métodos



3.4. Preparación, observación y análisis de muestras para estudios histológicos y celulares

3.4.1. Fijación

Preparación del fijador:

Se disolvió 1g de paraformaldehído en 6 ml de agua destilada. Tras añadir una lenteja de NaOH, se mezcló en un baño termostático a 65°C hasta su disolución. Se dejó enfriar a 4° C y se añadieron 12.5 ml de tampón cacodilato 0.1 M y 2 ml de glutaraldehído (25%). Finalmente se ajustó el pH a 7.2 y se enrasó a 25 ml.

Para fijar, se añadió aproximadamente 1 ml de fijador sobre el material vegetal que queremos fijar y se dejó en hielo durante 2 h. Posteriormente se lavó el material fijado en tampón cacodilato 0.05 M, pH 7.2 (3 veces durante 2 h). A continuación, las muestras se deshidrataron mediante incubación a 4°C en una serie de disoluciones hidroalcohólicas con concentración creciente de etanol hasta llegar a etanol 100%.

Las muestras deshidratadas fueron incluidas en parafina y Unicryl como se describe a continuación. En el caso de las muestras para Epon es necesaria una postfijación previa a la deshidratación que se explica en el apartado correspondiente.



3.4.2. Inclusión en parafina para observación a microscopía óptica

Las muestras en tampón cacodilato fueron incubadas en 50% de Histo-Clear/Etanol durante una semana en la que se realizaron tres cambios de solución y posteriormente se incubó con 100% de Histo-Clear durante una semana a temperatura ambiente. A continuación se realizaron otros tres cambios al 50% de Histo-Clear/parafina durante una semana a 50°C y finalmente se incubaron en parafina pura durante otra semana a 50°C. Las muestras se incluyeron parafina a 50° C y fueron progresivamente enfriadas hasta temperatura ambiente. Las placas se almacenaron a 4°C. Las secciones de parafina fueron obtenidas en un micrótopo (Leica RM 2165 ModeII) y se depositaron encima de porta objetos tratados con TESPA. Las secciones deben ser desparafinadas previamente a su tinción mediante un tratamiento con Histo-Clear, e hidratación parcial con soluciones hidroalcohólicas. Tras la tinción con azul de toluidina/azul de metileno, las preparaciones fueron observadas en un microscopio (Zeiss Axioplan). Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital (Prog Res C4).

3.4.3.Tratamiento de los portaobjetos con TESPA

El TESPA (3-aminopropiltriethoxi-sileno) es un reactivo que hace que los cortes se adhieran a los portaobjetos evitando así que se pierdan en los sucesivos tratamientos a los que se les somete.

III-Materiales y Métodos



En primer lugar los portaobjetos fueron lavados con mezcla sulfocrómica durante toda la noche. Después se lavaron repetidamente con agua bidestilada y se secaron a 60°C durante varias horas. Una vez secos se introdujeron durante 5 minutos en jarras Coplin que contenían TESPAl al 3% en acetona. Posteriormente se lavaron dos veces con acetona, dos veces con agua bidestilada y se dejaron secar a temperatura ambiente.

3.4.4. Inclusión en resina Unicryl para microscopía electrónica de transmisión

Las muestras deshidratadas fueron infiltradas mediante dos cambios sucesivos en etanol 100%-Unicryl (1:1) durante 2 días. A continuación se incubaron en Unicryl durante una semana, realizando 2 cambios de solución. Todos los cambios se realizaron a -20°C. Finalmente las muestras fueron depositadas en el fondo de cápsulas de gelatina, y polimerizadas con luz UV durante 2 a 3 días a -20°C.

3.4.5. Inclusión en Epon para microscopía electrónica de transmisión

En este caso, las muestras fijadas como se ha descrito en el apartado correspondiente, fueron lavadas con tampón cacodilato y se sometieron a una postfijación con tetróxido de osmio.

La postfijación se realizó sumergiendo las muestras en una solución de tetróxido de osmio al 2% en tampón cacodilato 0.05 M. Para conseguir

III-Materiales y Métodos



una buena disolución de tetróxido de osmio, se debe preparar 24 h antes de su empleo. Primero hay que introducir la ampolla de 100 mg de tetróxido de osmio en un frasco topacio de boca ancha. Después hay que romper esta ampolla en el interior golpeando con una varilla de vidrio gruesa y añadir 100 ml de tampón, que debe disolver los cristales. Esta solución se conserva en el frigorífico a 4° C y en oscuridad para evitar su oxidación y bien tapado para impedir la salida de los vapores tóxicos del osmio. Tras la postfijación se lavaron las muestras 3 veces durante 2 horas con tampón cacodilato 0.05 M (pH 7.2). A continuación, las muestras se deshidrataron mediante incubación en una serie de disoluciones hidroalcohólicas con concentración creciente de etanol a 4°C hasta llegar a etanol 100%. La inclusión en Epon se realizó tras un paso intermedio de 5 minutos en óxido de propileno, seguido por cambios sucesivos en mezclas de Epon y óxido de propileno en concentración creciente de Epon hasta llegar a resina al 100%. A continuación las muestras se colocaron en el fondo de cápsulas de gelatina, que después se rellenaron de resina. En el último paso se dejó polimerizar en una estufa a 60°C durante 48 horas.

3.4.6. Obtención de cortes semifinos

Para la obtención de cortes semi y ultrafinos se utilizó un ultramicrotomo "Ultracut E" Reichert Jung. En primer lugar, se tallaron las muestras ya incluidas en resina y polimerizadas. Para ello se colocaron las muestras en el soporte porta-cápsulas del microtomo y se talló una pirámide

III-Materiales y Métodos



con una base con forma de trapecio que contenía el material biológico. Los cortes semifinos, de aproximadamente 1 μm de espesor, se realizaron con una cuchilla de vidrio sobre la cual se montó una balsa llena de agua en la que, una vez realizados los cortes, flotaban las secciones. Estos cortes fueron recogidos con la ayuda de un asa de siembra y depositados sobre una gota de agua en un portaobjetos. El portaobjetos se colocó una placa calefactora para que el agua se evaporara lentamente quedando el corte estirado y adherido al portaobjetos.

3.4.7. Tinción de cortes semifinos para su observación al microscopio óptico

Para conseguir una mejor visualización de las estructuras celulares se utilizó una solución de azul de metileno/ azul de toluidina / bórax que se preparó disolviendo 0.5g de bórax en 30ml de agua destilada para lo que se calentó al baño María. A continuación se le añadieron 0.25g de azul de metileno y 0.25g de azul de toluidina, se enrasó a 50 ml y se filtró la solución.

Para teñir los cortes semifinos ya adheridos al portaobjetos se cubrieron los cortes con una gota del colorante y se dejó actuar durante un tiempo que varió dependiendo del tipo de tejido. Transcurrido este tiempo se eliminó el resto de colorante lavando con agua bidestilada y se dejó secar de nuevo el portaobjetos sobre la placa calefactora.

III-Materiales y Métodos



Para poner las preparaciones en definitivo se utilizó Merckoglass (Merck) como medio de montaje. Se dispuso una gota sobre la preparación y se colocó sobre ella un cubreobjetos.

Las secciones se observaron utilizando un microscopio Zeiss Axioplan y se obtuvieron fotografías mediante una cámara digital Prog Res C4 acoplada a este microscopio.

3.4.8. Obtención de cortes ultrafinos

Tras visualizar los cortes semifinos al microscopio óptico, se identificaron las regiones de interés potencial para su observación al microscopio electrónico. Con la ayuda de la lupa del ultramicrotomo, se localizaron esas regiones en los bloques y se tallaron nuevas pirámides más pequeñas, de aproximadamente 1 mm de lado, que las contenían. Los cortes ultrafinos, cuyo espesor variaba de 60 a 80 nm, se realizaron con cuchilla de vidrio o diamante y al igual que los cortes semifinos, se quedan flotando sobre la balsa. El color de los cortes varía según su espesor, siendo óptimos los cortes de 80 nm de color gris plateado. Para ayudar a su recolección se agruparon utilizando una pestaña adherida al borde de un palillo. Una vez agrupados se recogieron por contacto con una rejilla de níquel. Las rejillas habían sido recubiertas con anterioridad con una película de formvar al 0.3% en cloroformo que proporcionaba una mayor estabilidad a los cortes facilitando su posterior manipulación.



3.4.9. Recubrimiento de las rejillas con formvar

Se preparó una disolución de formvar al 0.3% que se vertió sobre un embudo cilíndrico que había sido limpiado previamente dos veces con cloroformo. Este embudo tenía un diámetro ligeramente superior al de la anchura de un portaobjetos y disponía de una llave que permitía la salida del líquido a velocidad constante. Se introdujo en el embudo un portaobjetos limpio y se abrió la llave para que saliera el formvar. A continuación se sacó el portaobjetos y se dejó secar al aire. Cuando éste estaba seco se rasparon los bordes del portaobjetos con una cuchilla y se introdujo el portaobjetos en un recipiente con agua bidestilada de manera que la película de formvar se desprendía y quedaba flotando. A continuación, con la ayuda de unas pinzas finas, se colocaron las rejillas sobre el formvar dejando la cara mate en contacto con la película. Las rejillas se recogieron con otro portaobjetos recubierto de una etiqueta adhesiva. Este portaobjetos es hundido sobre un extremo de la película de formvar, de manera que las rejillas quedan entre el formvar y la etiqueta adherida al portaobjetos. Antes de la utilización de las rejillas se comprobó en el microscopio electrónico el grado de espesor de las películas y su homogeneidad.

III-Materiales y Métodos



3.4.10. Contrastado de cortes ultrafinos para la observación de su ultraestructura mediante microscopía electrónica

Las rejillas se contrastaron en primer lugar con acetato de uranilo y posteriormente con citrato de plomo.

3.4.10.1. Contrastado con acetato de uranilo

Se preparó una disolución de acetato de uranilo al 5% que se protegió de la luz con papel de aluminio y se guardó a 4°C. Antes de su utilización, se centrifugó esta solución a 12000g durante 2 minutos. Se tomó una gota de la parte superior del tubo y se depositó sobre un papel parafilm. A continuación, se hizo flotar la rejilla, protegiéndola de la luz, sobre esta solución durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo se lavó la rejilla con abundante agua bidestilada, se secó y se depositó sobre papel de filtro Whatman con los cortes dispuestos hacia arriba.

3.4.10.2. Contrastado con citrato de plomo

El citrato de plomo se preparó disolviendo 0.665g de nitrato de plomo y 0.835g de citrato sódico dihidratado en 30 ml de agua bidestilada.

III-Materiales y Métodos



La solución se dejó reposar durante al menos 30 minutos, y se añadió 4 ml de NaOH 1N. A continuación se enrasó a 25 ml con agua bidestilada y se diluyó con NaOH 0.01N en proporción 1:8 (citrato de plomo:NaOH 0.01N).

Al igual que con el acetato de uranilo, se centrifugó el citrato de plomo durante dos minutos antes de ser utilizado. Tras la centrifugación se depositaron sobre el papel Parafilm gotas de citrato de plomo y sobre estas se dispusieron las rejillas con los cortes en contacto con el reactivo durante 1 minuto. La tinción con citrato de plomo es delicada ya que éste puede precipitar al combinarse con el CO₂ del aire formando carbonato de plomo. Por esto, la tinción se realizó dentro de una placa Petri recubierta de parafilm en las que se dispusieron alrededor unas lentejas de sosa que producían una atmósfera seca que impedía que el citrato de plomo precipitase. A continuación las rejillas se lavaron abundantemente con agua bidestilada y se secaron con papel Whatman.

3.4.11. Detección de lípidos en secciones de semillas mediante tinción con Sudan Black

Para la realización de esta técnica histoquímica se recogieron los cortes semifinos del material de interés sobre portaobjetos que habían sido tratados previamente con TESPA.

Se utilizaron cortes semifinos (1µm) del endospermo y cotiledón en diferentes etapas de maduración de la semilla incluidos en Unicryl. De forma previa a la tinción, elaboró una solución de Sudan Black en alcohol 70% a saturación y se dejó en una estufa a 60° C durante toda la noche.

III-Materiales y Métodos



Después se filtró, previamente a la introducción de los portas con los cortes en la solución de Sudan Black durante unos 15 minutos a 45° C. Se lavaron las portas con agua del grifo y se dejaron secar antes de montarlos con una solución de glicerol/gelatina (Sigma) que contiene 1% de fenol.

3.4.12. Análisis morfométrico

Las imágenes digitales obtenidas en los distintos tipos de microscopía (óptica y electrónica) fueron sometidas a análisis morfométrico utilizando el programa UTHSCSA ImageTool (Soft Imaging System) con previa calibración de los sistemas de captura. En todos los casos se utilizó un número adecuado de imágenes procedentes de un número suficiente de muestras (67), de forma que se aseguró un valor significativamente estable de la media y de la desviación típica acumulados.

3.5. Análisis bioquímico de las proteínas de almacenamiento de semilla

3.5.1. Extracción de proteínas de semillas

Las semillas de argán fueron diseccionadas para aislar el endospermo y el cotiledón, que fueron inmediatamente homogenizados en un mortero previamente enfriado con nitrógeno líquido. El polvo resultante fue añadido a un tampón de extracción (125 mM Tris-HCl, pH 6.8 y 0.2% SDS) para condiciones desnaturizantes, ó (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.2% SDS y 1% mercaptoetanol) para condiciones desnaturizantes y

III-Materiales y Métodos



reductoras. Después de centrifugar a 10.000 g durante 10 minutos a 4° C, el sobrenadante fue recuperado, tratado durante 3 minutos a 95° C y centrifugado de nuevo a 10.000 g durante 10 minutos. Las proteínas del sobrenadante se precipitaron con 4 volúmenes de acetona fría durante toda la noche a -20° C, resuspendidas en el tampón de extracción y guardadas a -20° C.

3.5.2. Análisis de la solubilidad de las proteínas de almacenamiento de semilla

Para determinar la solubilidad de proteínas de semillas, se realizaron diversas extracciones del polvo resultante de la molturación de las muestras con nitrógeno líquido, utilizando los siguientes disolventes: a) agua destilada, b) 0.5 M de cloruro de sodio, c) 70% (v/v) 2-propanol, d) 60% (v/v) ácido acético, e) 0.1 M hidróxido de sodio y f) 0.1 M borato de sodio pH 10 al 1% SDS y 50 mM dithiothreitol (DTT).

3.5.3. Cuantificación de proteínas totales

Para la cuantificación de proteínas totales se utilizó un método comercial (Bio-Rad), basado en el método de Bradford (1976). Para obtener la curva patrón se prepararon seis diluciones diferentes (1µg/ml; 5µg/ml; 10µg/ml; 15µg/ml; 20µg/ml y 25µg/ml) en un volumen total de 800 µl a partir de una solución madre de BSA. Para la preparación de las muestras

III-Materiales y Métodos



(extractos proteicos crudos) se añadió 5 µl de muestra a 795 µl de H₂O destilada y posteriormente 200 µl de reactivo Bradford (Bio Rad). Tras incubar 5 min a temperatura ambiente, se realizó la lectura de la densidad óptica de las diferentes concentraciones de BSA, así como de las muestras a 595 nm con un espectrofotómetro (UV-1603, Shimadzu). Finalmente se estableció una recta de regresión a partir de los datos obtenidos de la curva patrón, en la cual se interpolaron los valores de la concentración de las proteínas presentes en cada una de las muestras.

3.5.4. SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% (w/v) para el gel separador (resolving gel) y 4% para el gel concentrador (stacking gel). Las muestras de proteínas fueron cargadas en las calles del gel tras mezclar con tampón de carga (125 mM Tris- Hcl pH 6.8, 2M Urea, 1% (w/v) SDS, 1% (v/v) 2-mercaptoetanol y 0.02 mg/ml azul de bromofenol). Antes de cargar las muestras en el gel, éstas fueron tratadas a 95° C durante 3 minutos. El mercaptoetanol fue descartado cuando se trataba de condiciones no reductoras. En todos los casos se utilizó un sistema de electroforesis (mini-Protean III/Bio-Rad). Los geles fueron teñidos con una solución de tinción: 25% metanol, 10% ácido acético y 0,1% de azul Coomassie R-250 (Bio-Rad) y desteñidos después con una solución de decoloración: 20% metanol, 7% ácido acético y 3% de glicerina.

III-Materiales y Métodos



3.5.5. Purificación de bandas individuales de proteínas de almacenamiento de la semilla

Después de resolver los extractos crudos de semillas maduras en geles de acrilamida en condiciones no reductoras, las bandas de mayor intensidad que corresponden a las proteínas de almacenamiento fueron cortadas individualmente del gel y incubadas durante 30 minutos en un tampón que contenía 100 mM Tris- HCl y 0.5%(w/v) SDS, pH8.2, y homogenizadas en un mortero. El homogenado resultante fue centrifugado a 10.000 g durante 10 minutos. Las proteínas en el sobrenadante se precipitaron con 4 volúmenes de acetona a -20° C durante toda la noche. Tras una nueva centrifugación utilizando las condiciones previas, se recuperó el precipitado que fue resuspendido en el tampón de extracción. Finalmente cada una de las bandas extraídas fue analizada nuevamente mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras.

3.5.6. Inmunoblotting para proteínas 11S

Para el análisis de los extractos proteicos de semillas mediante inmunoblotting, los geles fueron transferidos a una membrana PVDF, (BiotraceTM 0,45 μ m, Pall) mediante un sistema de transferencia semi-dry (Bio-Rad). Antes de proceder a la transferencia, la membrana se humectó mediante una incubación de 10 segundos en metanol, y posteriormente un lavado con agua ultrapura durante 5 minutos en agitación suave. Tras la transferencia, la membrana se equilibró en tampón TBST (1 mM Tris-HCl,

III-Materiales y Métodos



pH 7.4 y 5,7 mM NaCl, 0,1% Tween-20) durante 5 minutos y se bloqueó a continuación en una solución de bloqueo que contenía 10% de leche desnatada en TBST durante toda la noche a 4° C ó durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron las membranas con el anticuerpo primario, que en este caso correspondía a un anticuerpo denominado P1 que reconoce proteínas de almacenamiento de olivo de tipo 11S (Alché et al. 2005), a una dilución de 1:3000 en la misma solución de bloqueo durante toda la noche a 4° C ó 4 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente la membrana se lavó dos veces durante 30 minutos con TBST. Finalmente se incubó la membrana con el anticuerpo secundario diluido en TBST. En ese caso se trataba de un anti- rabbit IgG Alexa 633, a una dilución de 1:20.000 (Molecular Probes) durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad con agitación suave. A continuación se secaron las membranas y se procedió a su escaneo con un sistema Pharos, FX (Bio-Rad). El análisis densitométrico de las imágenes obtenidas se realizó con el software Quantity One (versión 4.6.2, Bio-Rad).

3.6. Identificación de isoenzimas de SOD en semillas y hojas

3.6.1. Extracción de proteínas

En el caso de las semillas, se pesaron 0.1g y se procedió inmediatamente a molerlas con N₂ líquido en un mortero previamente enfriado. Para algunos ensayos, se diseccionaron cotiledón y endospermo y se hizo la extracción de estos órganos independientemente. El polvo

III-Materiales y Métodos



resultante en cada caso, se añadió a una solución de extracción (tampón fosfato potásico 0.05 M, pH 7.8 y 15 mM PMSF) bien fría en una proporción de 1:4 (w/v). Todo el procedimiento se realizó a 4° C. Después de resuspender bien el polvo en el tampón de extracción, se dejó en agitación suave durante 2 horas. Posteriormente se centrifugó a 13.500 rpm durante 20 minutos, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20°C. Para medir la concentración de proteínas se utilizó el método Bradford.

En el caso de hojas se pesaron 2g y se procedió directamente a su homogenización en un mortero pre-enfriado a -20° C con N₂ líquido. El polvo resultante se añadió a una solución de extracción (Tris-HCl pH 8, 0.001 M EDTA, 0.001 M EGTA, 0.1 M NaCl, 7% PVPP, 0.015M DTT y 0.015 M PMSF) en una proporción de 1:4 (w/v). La mezcla se dejó en agitación suave durante 2 horas en la cámara fría. Posteriormente se procedió a centrifugar el homogenizado a 13.500 rpm durante 20 minutos a 4° C, se recuperó el sobrenadante, y se centrifugó de nuevo hasta que quedó suficientemente claro, y se guardó hasta su próximo uso a -20° C.

3.6.2. Detección de actividad SOD en geles nativos de poliacrilamida

Se utilizaron geles nativos al 12% de acrilamida para el gel separador y 4% para el gel concentrador. En este caso se descartó el uso de SDS en geles y en tampones tanto de carga de muestras como de electroforesis. La electroforesis se llevó acabo a 4° C y 80 V hasta que las muestras se concentraron al final del gel concentrador y posteriormente se

III-Materiales y Métodos



incrementó el voltaje hasta 160 V durante el resto de la carrera electroforética.

Para revelar la actividad en geles se utilizó el procedimiento de Beauchamp y Fridovich (1971). Tras la electroforesis, los geles se incubaron durante 25 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente en una solución que contiene 2.45 mM de NBT, 0.05 M tampón fosfato potásico pH 7.8. Inmediatamente después se procedió a un breve lavado de 5 segundos en tampón fosfato potásico, luego se incubó otros 20 minutos en oscuridad y con agitación a temperatura ambiente en una solución de 28 μ M de riboflavina y 28 mM de TEMED en tampón fosfato potásico. Finalmente se reveló el gel en tampón fosfato potásico 0,05 M pH7.8 con luz incidente de intensidad constante durante 15 minutos hasta que se vieron bandas transparentes sobre fondo violeta. El análisis densitométrico de los geles se realizó con el Software Quantity One (versión 4.6.2, Bio-Rad).

3.6.3. Ensayos de inhibición de actividad SOD

Durante los ensayos de actividad SOD en geles nativos se ensayaron los siguientes inhibidores:

3.6.3.1. Inhibición con KCN

Directamente después de la electroforesis, se sumergió el gel en una solución que contiene 15 mM de KCN en tampón fosfato potásico 0.05 M durante 20 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad y agitación. Luego

III-Materiales y Métodos



se procedió a un corto lavado con tampón fosfato. A continuación se procedió como previamente se ha mencionado para la detección de actividad SOD.

3.6.3.2 Inhibición con H₂O₂

Directamente tras la electroforesis, se sumergió el gel en una solución que contiene 5 mM de H₂O₂ en tampón fosfato potásico 0.05 M, durante 20 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente se procedió igual que para la detección de actividad SOD. Para la interpretación de los resultados se utilizó la siguiente tabla:

Inhibidor	Mn- SOD	Fe- SOD	Cu/Zn- SOD
KCN 15 mM	Resistente	Resistente	Sensible
H ₂ O ₂ 5 mM	Resistente	Sensible	Sensible

Tabla 3. Determinación del tipo de SOD mediante utilización de inhibidores Corpas, (1992).

3.6.4. Estudio espectrofotométrico de la actividad SOD en hojas y semillas de distintas subespecies de argán

Para la cuantificación de la actividad SOD se utilizó la técnica de Fridovich et al. (1975) ligeramente modificada. La xantina oxidasa cataliza

III-Materiales y Métodos



la reacción de la xantina y el oxígeno para generar superóxido. Éste, reacciona a su vez con el citocromo C. El método está basado en la competición de la SOD con el citocromo C por el anión superóxido creado *in vitro* por el sistema-xantina-xantina oxidasa. Esta competición produce una inhibición en la reducción del citocromo C que es medible a 550 nm.

En primer lugar es preciso generar un patrón de reducción del citocromo C, para lo cual en una cubeta se mezclaron 27 μ l del citocromo C (1mM), 19 μ l de xantina (10 mM), 2 μ l de EDTA (0.1 M) y tampón fosfato potásico 0.05 M pH 7.8 para completar un volumen final de 2 ml. Justo en el momento de la medida espectrofotométrica se añadió un volumen de entre 30- 100 μ l de xantina oxidasa. El volumen de xantina oxidasa utilizado es aquel que produce un aumento de absorbancia de \sim 0.02 A/ minuto. Las lecturas se realizaron a 25° C, monitorizando la formación del citocromo C reducido durante un período de 4 minutos.

A continuación se midieron las muestras, utilizando el mismo volumen de xantina oxidasa usado para preparar la curva patrón.

Los resultados se expresaron como unidades de actividad/mg de proteína. Una unidad de actividad SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para producir una inhibición de un 50% en la velocidad inicial de reducción del citocromo C a 25° C. El cálculo de la actividad enzimática, en U/ml, se efectuó mediante la determinación del porcentaje de inhibición producido por la muestra según la expresión:



$$\% \text{ Inhibición} = [\Delta E_{550}/\text{min (control)} - \Delta E_{550}/\text{min (problema)}] / \Delta E_{550}/\text{min (control)}.$$
$$\text{Unidades SOD} = \% \text{ Inhibición} / (100 - \% \text{ Inhibición}).$$

Siendo ΔE la media de los valores de las medidas en cada caso. Se realizaron 5 repeticiones por cada muestra.

Los porcentajes de inhibición producida deben estar comprendidos en el intervalo del 40%-60% para que los cálculos sean interpretables.

3.6.5. Detección de isoformas de SOD mediante immunoblotting

En este caso, los extractos proteicos fueron analizados mediante SDS-PAGE de forma similar a la descrita para el análisis de proteínas de almacenamiento de semillas en condiciones desnaturalizantes y reductoras. La transferencia y el análisis de inmunoblots se realizaron como previamente ha sido descrito. En este caso se utilizó un anticuerpo primario policlonal comercial de conejo anti Cu/Zn SOD (CSD₂) (Agrisera) a una dilución de 1:500. La incubación con este anticuerpo se realizó a 4° C durante toda la noche. Tras tres lavados con TBST de 15 minutos cada uno, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario a una dilución 1:10.000 (anti-rabbit IgG Alexa 633) a temperatura ambiente, en oscuridad con agitación.



3.7. Detección de actividades esterases en semillas y hojas

3.7.1. Extracción de proteínas de semillas para la determinación de actividad esterasa inespecífica

Se pesaron 0.5 g de semillas y se procedió directamente a homogenizarlas con N₂ líquido en un mortero previamente enfriado. El polvo resultante se añadió a una solución de extracción que contiene 1% Triton X-100 en tampón fosfato sódico 0.1 M pH 8 con 1% Triton X-100. Todos los procesos se realizaron a 4° C. Se dejó la mezcla en agitación durante 2 horas en la cámara fría. El homogenizado se centrifugó a 13.500 rpm durante tres ciclos de 20 minutos, hasta aclarar el sobrenadante, que se recuperó y se guardó a -20° C.

3.7.2. Ensayos espectrofotométricos de actividad esterasa inespecífica

Este método determina la actividad esterasa midiendo a 405 nm la cantidad de *p*-nitrofenol liberado debido la hidrólisis del PNB (*p*-nitrofenil butirato) en presencia de la enzima (Purdy y Kolattukudy, 1973).

Se preparó la siguiente mezcla de reacción (volumen final = 1 ml):

- 980 µl de tampón de reacción (tampón fosfato sódico pH 7.0)
- 10 µl del substrato (PNB, Sigma Aldrich)
- 10 µl del extracto proteico

III-Materiales y Métodos



Se dejaron las muestras a temperatura ambiente un mínimo de 30 minutos y se midió la absorbancia a 405 nm cada 30 minutos durante 2 horas en un espectrofotómetro (UV-1603, Shimadzu, Japón). Si hay actividad esterasa en el extracto proteico, éste cambiará de color y se tornará ligeramente amarillo, por tanto, una medida de absorbancia > 0 indica presencia de actividad esterasa. La actividad irá aumentando con el tiempo de medición. Para interpretar los resultados, se realizaron 5 experimentos en 10 muestras por cada variedad, luego se calculó la media por cada variedad para cada tiempo de medición. La actividad esterasa más alta se consideró como el 100% de la actividad.

3.7.3. Ensayos de actividad esterasa en geles de poliacrilamida en condiciones seminativas

Este método se basa en que las esterazas inespecíficas hidrolizan un éster derivado del naftaleno liberando un compuesto α -naftol que se acopla rápidamente a una sal diazónica, lo que produce un precipitado de color negruzco.

Los geles y el tampón de electroforesis se prepararon según el método de Laemmli (1970) descrito anteriormente, con el gel separador al 12% y el gel concentrador al 4%. Para preparar las muestras, éstas se mezclaron en proporción 1:1 con el tampón de carga 2x (125 mM de Tris, 1% SDS, 15% de glicerol y 0.02 mg/ml de azul de bromofenol). Las condiciones de electroforesis fueron: voltaje constante 150 V durante 1 hora a 4° C. Después de la electroforesis, se renaturalizó el gel con 100 ml de 1%

III-Materiales y Métodos



Triton X-100 en tampón fosfato 0.05 M pH 7.2 durante 2 horas, con cambios de solución cada 30 minutos. Seguidamente se incubó el gel durante 2 horas a 37° C y en oscuridad en una solución que contenía tampón fosfato 0.05 M pH 7.2, 100 mg de sales Fast Blue-RR y 60 mg de α -naftilbutirato preparado en 1 ml de acetona. La actividad se expresa en forma de bandas de color marrón fuerte. Las bandas reactivas fueron visualizadas con un sistema Pharos FX (Bio-Rad). El análisis de las imágenes obtenidas se realizó con el software Quantity One (versión 4.6.2, Bio-Rad).

3.8. Obtención y análisis de muestras de aceite

Las tres muestras analizadas fueron obtenidas de las cooperativas presentes en las regiones de Agadir, Essauira y Chouhiya, respectivamente. El aceite de argán fue extraído siguiendo las técnicas tradicionales por las mujeres de la cooperativa. El procedimiento de la extracción es un trabajo muy laborioso y necesita mucha experiencia. Tras quitar la cáscara, se tostaron las semillas y se molieron hasta conseguir una especie de pasta, que se guardó durante una semana hasta que se secó. Posteriormente se extrajo el aceite de esta pasta, prensándola con agua templada. Finalmente las muestras fueron transportadas al laboratorio, guardadas a 4°C en oscuridad y luego enviadas para el análisis de la composición en ácidos grasos, esteroides y diversos parámetros bioquímicos adicionales al laboratorio agroalimentario de Granada, localizado en el municipio de Atarfe

III-Materiales y Métodos



(<http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/agenciaagrariaypesquera/centros/red-de-laboratorios-agroalimentarios-y-estaciones-enologicas/laboratorio-agroalimentario-de-granada.html>)

3.9. Ensayos de propagación

3.9.1. Germinación *ex vitro* de las semillas

Para los ensayos de germinación *ex vitro*, las semillas fueron lavadas extensivamente, y procesadas mediante 3 tratamientos diferentes:

1. Semillas enteras escarificadas al nivel del micrópilo.
2. Semillas tratadas durante 4 días en una solución de agua con lejía al 40%.
3. Semillas tratadas durante 4 días en una solución de nitrato potásico al 0.1% (w/v).

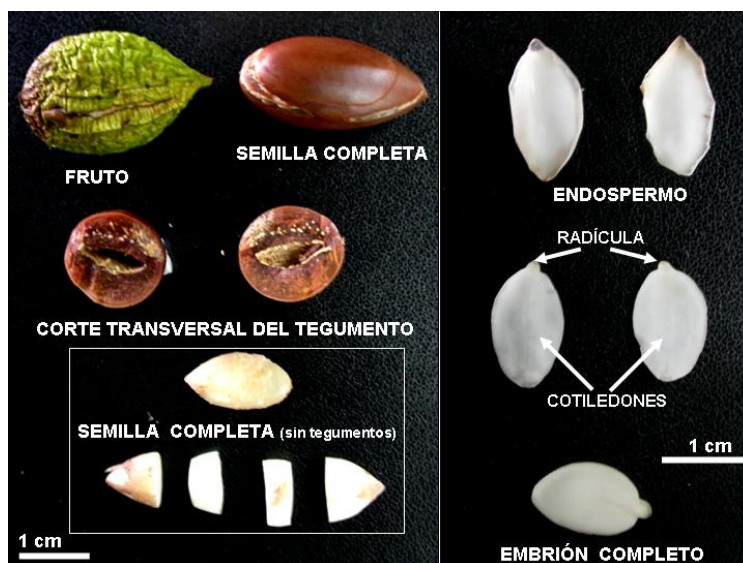


Figura 9. Vista macroscópica del fruto, semilla y embrión del argán.

Tras los distintos tratamientos, las semillas fueron cultivadas en un medio que contenía un 50% de turba y un 50% de perlita, a una temperatura entre 23° C y 25° C y un fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad, con una intensidad de luz de 12 W/m² (2500 lux).

3.9.2. Germinación *in vitro* de las semillas

Los embriones fueron diseccionados bajo la lupa, en la cámara de flujo y a continuación esterilizados mediante el siguiente procedimiento:

- Lavado con etanol al 70% durante 20 segundos.
- Lavado con hipoclorito sódico al 20%, 0.2% de Tween 20 durante 20 min.

III-Materiales y Métodos



- 3 lavados con agua destilada estéril.

Los embriones fueron cultivados en dos medios de composición diferente (Tabla 4):

1. Medio de Murashige y Skoog, (Murashige y Skoog 1962)
2. Medio de Murashige y Skoog con la mitad de macronutrientes (MS2).

A lo largo del proceso de germinación y crecimiento se tomaron fotos con una cámara digital de un total de 80 semillas y se procedió al análisis de imágenes con un programa “Analysis DOC”. Se midió la longitud del cotiledón y la radícula así como el grosor del cotiledón. Se consideró como valor significativo la media de las ochenta medidas para un tiempo x de germinación y crecimiento.

Murashige y Skoog completo	Murashige y Skoog con mitad de macronutrientes (MS2)
Macro nutrientes	Macro nutrientes
NH ₄ NO ₃ 1650 mg/l	NH ₄ NO ₃ 825 mg/l
KNO ₃ 1900 mg/l	KNO ₃ 950 mg/l
MgSO ₄ .7H ₂ O 370 mg/l	MgSO ₄ .7H ₂ O 185 mg/l
CaCl ₂ .2H ₂ O 440 mg/l	CaCl ₂ .2H ₂ O 220 mg/l
KH ₂ PO ₄ 170 mg/l	KH ₂ PO ₄ 85 mg/l

III-Materiales y Métodos



Micronutrientes		Micronutrientes	
H ₃ BO ₃	6.2 mg/l	H ₃ BO ₃	6.2 mg/l
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3 mg/l	MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3 mg/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6 mg/l	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6 mg/l
KI	0.83 mg/l	KI	0.83 mg/l
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25 mg/l	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25mg/l
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025 mg/l	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025mg/l
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025 mg/l	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025mg/l
Fuente de hierro (añadir fresco)		Fuente de hierro (añadir fresco)	
Fe.EDTA-Na salt	40 mg/l	Fe.EDTA-Na salt	40 mg/l
Vitaminas		Vitaminas	
Ácido nicotínico	0.5 mg/l	Ácido nicotínico	0.5 mg/l
Tiamina	0.1 mg/l	Tiamina	0.1 mg/l
Piridoxina	0.5 mg/l	Piridoxina	0.5 mg/l
Otros		Otros	
Mioinositol	100mg/l	Mioinositol	100mg/l
Glicina	2 mg/l	Glicina	2 mg/l

Tabla 4. Composición de los medios MS y MS2.

3.9.3. Efecto de las giberelinas sobre los cultivos *in vitro* de semillas

Los embriones de argán previamente esterilizados, fueron tratados con una solución de 8.67 μ M GA₃ durante un día a temperatura ambiente. Posteriormente se cultivaron *in vitro* en placas de Petri en un medio de Agar al 1% en una cámara de cultivo (25° C, 16h luz/8h oscuridad, 2500 lux).



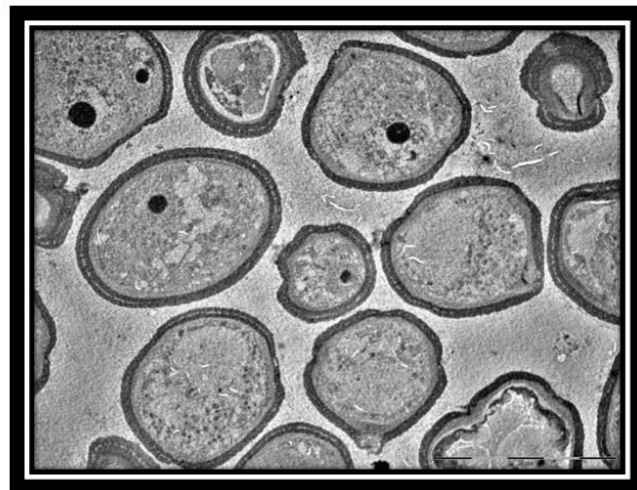
3.9.4. Efecto de la combinación de hormonas ANA y BAP

Los embriones de argán previamente esterilizados, también fueron cultivados en un medio de Murashige y Skoog que contenía la mitad de sales, un 5% de carbón activo y las hormonas ANA al 20% y BAP al 80% durante 14 días en oscuridad, ya que las hormonas se alteran con la luz. Pasados estos 14 días, las placas se pasaron a una cámara de cultivo a la luz, (25° C, 16h luz/8h oscuridad, 2500 lux).

3.9.5. Efecto del frío sobre la germinación *in vitro* de las semillas.

Se cultivaron embriones de argán en un medio de cultivo al 1% de Agar en placas de Petri en la cámara fría (4° C) durante 3 días. Después se pasaron a la cámara de cultivo. Pasados 20 días, las plántulas fueron transferidas a semilleros con un medio de cultivo que contenía 50% de turba y 50% de perlita previamente autoclavado. Durante la primera semana, se utilizó una mini campana de plástico sobre el semillero para guardar la humedad y se regó diariamente. Las plántulas crecieron durante un mes en condiciones controladas antes de sacarlas al aire libre.





Resultados

IV-Resultados





4.1. Descripción pomológica de las subespecies de *Argania spinosa* L.

Durante muchos años los descriptores morfológicos o pomológicos han sido los únicos utilizados para la identificación varietal de frutales. Por ello, nuestro estudio para la identificación varietal, tuvo como primer paso realizar una caracterización morfológica de las siete subespecies elegidas en este estudio a las que hemos denominado: Argania, Argania fruto apuntado, Argania fruto alargado, Argania árbol pequeño, Argania hojas pequeñas, Argania fruto grande y Argania sin fruto. En primer lugar, la clasificación se realizó en base a 25 caracteres morfológicos seleccionados a partir del esquema establecido por Barranco y Rallo (1948) para el olivo, modificado como se explicó en Materiales y Métodos para el caso del argán. Para exponer los resultados obtenidos se ha realizado una ficha varietal que contiene:

1. El nombre de la variedad.
2. Una figura con fotografías que muestran diferentes aspectos de morfológicos: del árbol, del fruto maduro, el endocarpo, la hoja madura y el fruto durante la maduración.
3. La descripción morfológica de la variedad, incluyendo: caracteres del árbol (4), caracteres de la hoja (4), caracteres del fruto (10) y caracteres del endocarpo (9) descritos anteriormente en Materiales y Métodos.

Estas fichas están recogidas en las figuras 10-16 que aparecen continuación.



Argania

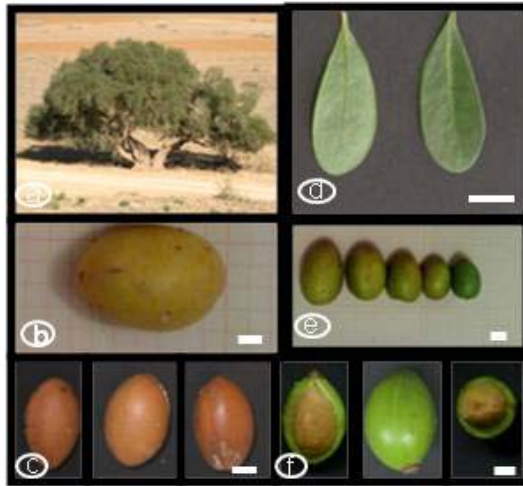


Figura 10. Caracteres morfológicos de la variedad Argania. a: árbol, b: fruto maduro, c: endocarpo, d: haz y envés de hojas, e: fruto durante la maduración, f: sección longitudinal y transversal del fruto. La barra representa 1 cm.

Caracteres del árbol

- Vigor: Elevado.
- Porte: Abierto.
- Densidad de la copa: Espesa.

Caracteres de la hoja

- Forma: Elíptica
- Longitud: Media.
- Anchura: Media.
- Curvatura longitudinal del limbo: Hiponástica.

Caracteres del fruto

- Peso: medio (- 2.04 g)
- Forma (en posición A): Ovoidal.
- Grado de simetría (en posición A): Simétrico.
- Diámetro transversal máximo (en posición B): Centrado.
- Ápice (en posición A): Apuntado.
- Base (en posición A): Redondeada.
- Pezón: Ausente.
- Presencia de lenticelas: Abundante.
- Tamaño de las lenticelas: Pequeñas.
- Color en maduración: Amarillo.

Caracteres del endocarpo

- Forma (en posición A): Ovoidal
- Grado de simetría (en posición A): Simétrico
- Grado de simetría (en posición B): Simétrico.
- Diámetro transversal máximo (en posición B): Centrado.
- Ápice (en posición A): Redondeado.
- Base (en posición A): Redondeada.
- Superficie: Lisa.
- Distribución de surcos fibrovasculares: Agrupados junto a la sutura.
- Terminación del Ápice: Sin mucrón.



Argania fruto apuntado

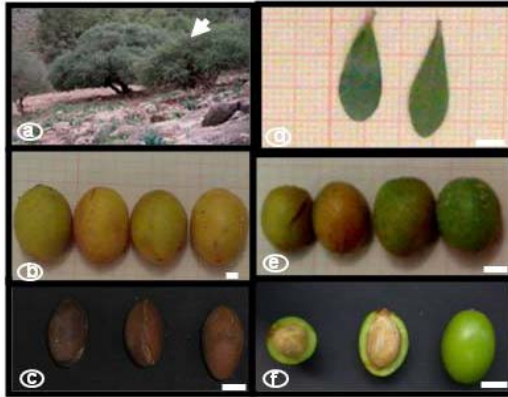


Figura 11. Caracteres morfológicos de la variedad Argania fruto apuntado. a: árbol, b: fruto maduro, c: endocarpo, d: haz y envés de hojas, e: fruto durante la maduración, f: sección longitudinal y transversal del fruto. La barra representa 1 cm.

Caracteres del árbol:

Vigor: Elevado.

Porte: Abierto.

Densidad de la copa: Espesa.

Caracteres de la hoja:

Forma: Elíptica.

Longitud: Media.

Anchura: Media.

Curvatura longitudinal del limbo: Plana.

Caracteres del fruto:

Fruto con una agujita en el Ápice.

Peso: Bajo.

Forma (en posición A): Ovoidal.

Grado de simetría (en posición A): Simétrico.

Diámetro transversal máximo (en posición B): Centrado.

Ápice (en posición A): Apuntado.

Base (en posición A): Truncada.

Pezón: Esbozado.

Presencia de lenticelas: Abundantes.

Tamaño de las lenticelas: Pequeñas.

Color en maduración: Amarillo-Marrón.

Caracteres del endocarpo:

Forma (posición A): Esférica/Ovoidal.

Superficie: Lisa.

Peso: Bajo.

Grado simetría (en A):Asimétrico.

Grado simetría (en B):Asimétrico.

Diámetro transversal máximo (en B): Centrado.

Ápice(en posiciónA):Redondeado.

Base(en posición A): Redondeada.

Distribución surcos fibrovasculares: Agrupados junto a la sutura.

Terminación Ápice: Sin mucrón.



Argania fruto alargado

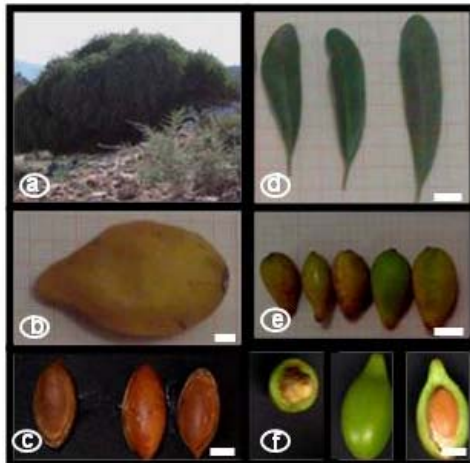


Figura 12. Caracteres morfológicos de la variedad Argania fruto alargado. a: árbol, b: fruto maduro, c: endocarpo, d: haz y envés de hojas, e: fruto durante la maduración, f: sección longitudinal y transversal del fruto. La barra representa 1 cm.

Caracteres del árbol:

Árbol no espinoso con un fruto característico

Vigor: Elevado.

Porte: abierto.

Densidad de la copa: Espesa.

Caracteres de la hoja:

Forma: Elíptica- Lanceolada.

Longitud: Larga.

Anchura: Media.

Curvatura longitudinal del limbo: Plana.

Caracteres del fruto:

Peso: Elevado.

Forma (en posición A): Alargada.

Grado de simetría (en posición A):

Simétrico.

Diámetro transversal máximo (en posición B): Centrado.

Ápice (en posición A): Apuntado.

Base (en posición A): Redondeada.

Pezón: Evidente.

Presencia de lenticelas: Escasas.

Tamaño de las lenticelas: Pequeñas.

Color en maduración: Amarillo.

Caracteres del endocarpo:

Forma (en posición A): Elíptica

Grado de simetría (en posición A):

Asimétrico.

Grado de simetría (en posición B):

Asimétrico.

Diámetro transversal máximo (en posición B): Centrado.

Ápice (en posición A): Apuntado.

Base (en posición A): Redondeada.

Superficie: Lisa.

Distribución de surcos fibrovasculares: Agrupados junto a la sutura.

Terminación del Ápice: con mucrón.



Argania árbol pequeño

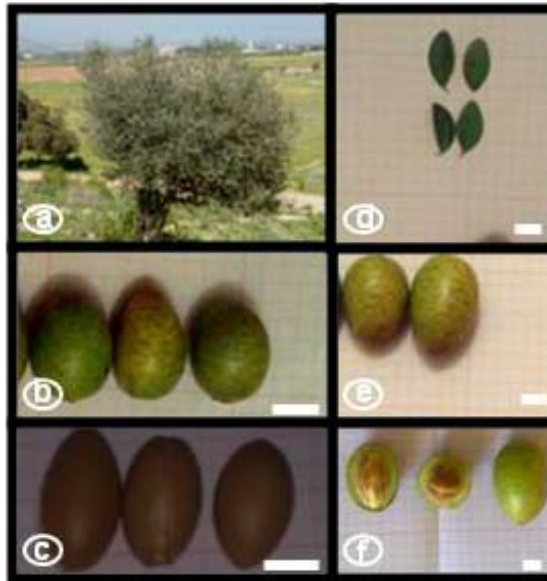


Figura 13. Caracteres morfológicos de la variedad Argania árbol pequeño a: árbol, b: fruto durante la maduración, c: endocarpo, d: haz y envés de hojas, e: fruto maduro, f: sección longitudinal y transversal del fruto. La barra representa 1 cm.

Caracteres del árbol: Con muchas espinas, Vigor: Bajo. Densidad de la copa: Clara.

Caracteres de la hoja

Forma: Elíptica. Longitud: Corta. Anchura: Media. Curvatura longitudinal del limbo: Plana.

Caracteres del fruto

Peso: Bajo. Forma (en A): Ovoidal. Grado de simetría (en A): Simétrico. Diámetro transversal máximo (en posición B): Centrado. Ápice (en posición A): Simétrico. Base (en posición A): Simétrico. Pezón: Ausente. Presencia de lenticelas: Abundantes. Tamaño de las lenticelas: Pequeñas. Color en maduración: Amarillo.

Caracteres del endocarpo:

Forma (en posición A): Alargada. Grado simetría (en A): asimétrico. Grado simetría (en B): asimétrico. Diámetro transversal máximo (en B): Centrado. Ápice (en A): Apuntado. Base (en A): Redondeada. Superficie: Lisa. Distribución surcos fibrovasculares: Agrupados junto a la sutura. Terminación del Ápice: Sin mucrón.



Argania hojas pequeñas

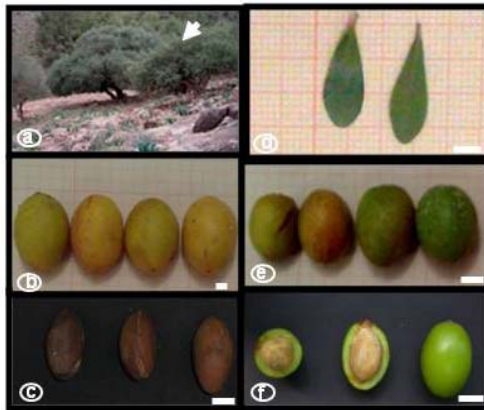


Figura 14. Caracteres morfológicos de la variedad Argania hojas pequeñas a: árbol, b: fruto maduro, c: endocarpo, d: haz y envés de hojas, e: fruto durante la maduración, f: sección longitudinal y transversal del fruto. La barra representa 1 cm.

Caracteres del árbol:

Hojas pequeñas, árbol espinoso.

Vigor: Medio.

Porte: Abierto.

Densidad de la copa: Media.

Caracteres de la hoja:

Forma: Elíptica.

Longitud: Corta.

Anchura: Estrecha.

Curvatura longitudinal del limbo:

Hiponástica.

Caracteres del fruto:

Peso: Medio.

Forma (en posición A): Ovoidal.

Grado de simetría (en posición

A): Simétrico

Diámetro transversal máximo (en posición B): Centrado.

Ápice (en posición A): Redondeado.

Base (en posición A):

Redondeada.

Pezón: Ausente.

Presencia de lenticelas:

Abundantes.

Tamaño de las lenticelas:

Pequeñas.

Color en maduración: Marrón.

Caracteres del endocarpo:

Forma (en posición A): Esférica.

Grado de simetría (en posición

A): asimétrico.

Grado de simetría (en B):

Ligeramente Asimétrico.

Diámetro transversal máximo (en posición B): Centrado.

Ápice (en posición A):

Redondeado.

Base (en posición A):

Redondeada.

Superficie: Lisa.

Distribución de surcos

fibrovasculares: Agrupados junto a la sutura.

Terminación del Ápice: Sin mucrón.



Argania fruto grande

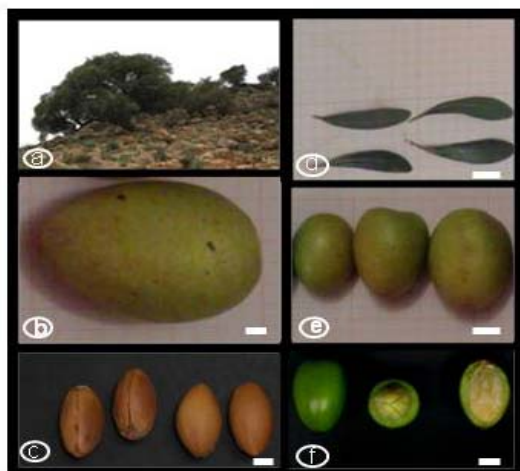


Figura 15. Caracteres morfológicos de la variedad Argania fruto grande a: árbol, b: fruto maduro, c: endocarpo, d: haz y envés de hojas, e: fruto durante la maduración, f: sección longitudinal y transversal del fruto. La barra representa 1 cm.

Caracteres del árbol :

Vigor: Elevado.
 Porte: Abierto.
 Densidad de la copa: Media.

Caracteres de la hoja:

Forma: Elíptica -Lanceolada.
 Longitud: Larga.
 Anchura: Media.
 Curvatura longitudinal del limbo: Hiperbólica.

Caracteres del fruto:

Peso: Muy elevado.
 Forma (en posición A): Ovoidal.
 Grado de simetría (en posición A): Ligeramente asimétrico.
 Diámetro transversal máximo (en B): Centrado.
 Ápice (en A): Redondeado.
 Base (en A): Redondeada.

Pezón: Ausente.
 Presencia de lenticelas: Abundantes.
 Tamaño de las lenticelas: Pequeñas.

Color en maduración: Amarillo.

Caracteres del endocarpo:

Forma (en posición A): Ovoidal.
 Grado de simetría (en posición A): Asimétrico.
 Grado de simetría (en posición B): Asimétrico.
 Diámetro transversal máximo (en B): Centrado.
 Ápice (en A): Redondeado/Truncado.
 Base (en A): Redondeada.
 Superficie: Lisa.
 Distribución surcos fibrovasculares: Agrupados junto a la sutura.
 Terminación del Ápice: Sin mucrón.



Argania sin fruto



Caracteres del árbol: Árbol no espinoso sin fruto.

Vigor: Medio.

Porte: Abierto.

Densidad de la copa: Clara.

Caracteres de la hoja:

Forma: Elíptica- Lanceolada.

Longitud: Larga.

Figura 16. Aspecto del árbol y las ramas de la variedad Argania sin fruto, un sólo ejemplar en la zona estudiada (Chouhiya- Provincia de Berkane).

4.1.1. Descripción morfológica atendiendo a las flores e inflorescencias

En segundo lugar para profundizar en nuestro estudio de identificación varietal, estudiamos las flores e inflorescencias de las 7 variedades de Argán seleccionadas (Figuras 17 a 19). Una primera observación general del desarrollo floral nos mostró que en todas las variedades, las flores de argán se desarrollan directamente en las axilas de las hojas por lo que se trata de flores sésiles y axilares y se agrupan en

IV-Resultados



glomérulos que contienen de 15 a 25 flores. Se observó también que el desarrollo de las flores no es sincrónico, ya que su tamaño es variable. Las flores de todas las variedades tienen 5 sépalos y 5 pétalos. Cuando se abre el botón floral, se aprecian generalmente 5 estambres en todas las subespecies excepto en la subespecie *Argania* sin fruto que tiene 7 estambres, con un filamento más largo (Fig. 19d). El pistilo se puede apreciar fuera del botón floral en todas las subespecies estudiadas, salvo en la subespecie *Argania* árbol pequeño que tiene el pistilo corto (Fig. 17c). Las anteras de todas las variedades están constituidas por dos tecas, donde se observan los granos de polen en las dehiscencias. Tras la fertilización se caen los pétalos y se engruesa el ovario que dará lugar a un fruto si la fecundación llega a buen término. En *Argania* sin fruto, como se puede deducir por su nombre, no se forma el fruto.



Figura 17. Inflorescencias y flores de argán. a: botones florales de la subespecie *Argania*, b: flor abierta de la subespecie *Argania*. c: botón floral de la subespecie *Argania árbol pequeño*. d: flor abierta de la subespecie *Argania árbol pequeño*.



Figura 18. Inflorescencias y flores de argán. a, botones florales de la subespecie *Argania* fruto alargado, jóvenes sésiles y axilares agrupados en glomérulo; b: flor abierta de la subespecie *Argania* fruto alargado; c: botón floral de la subespecie *Argania* fruto apuntado; d: flor abierta de la subespecie *Argania* fruto apuntado.

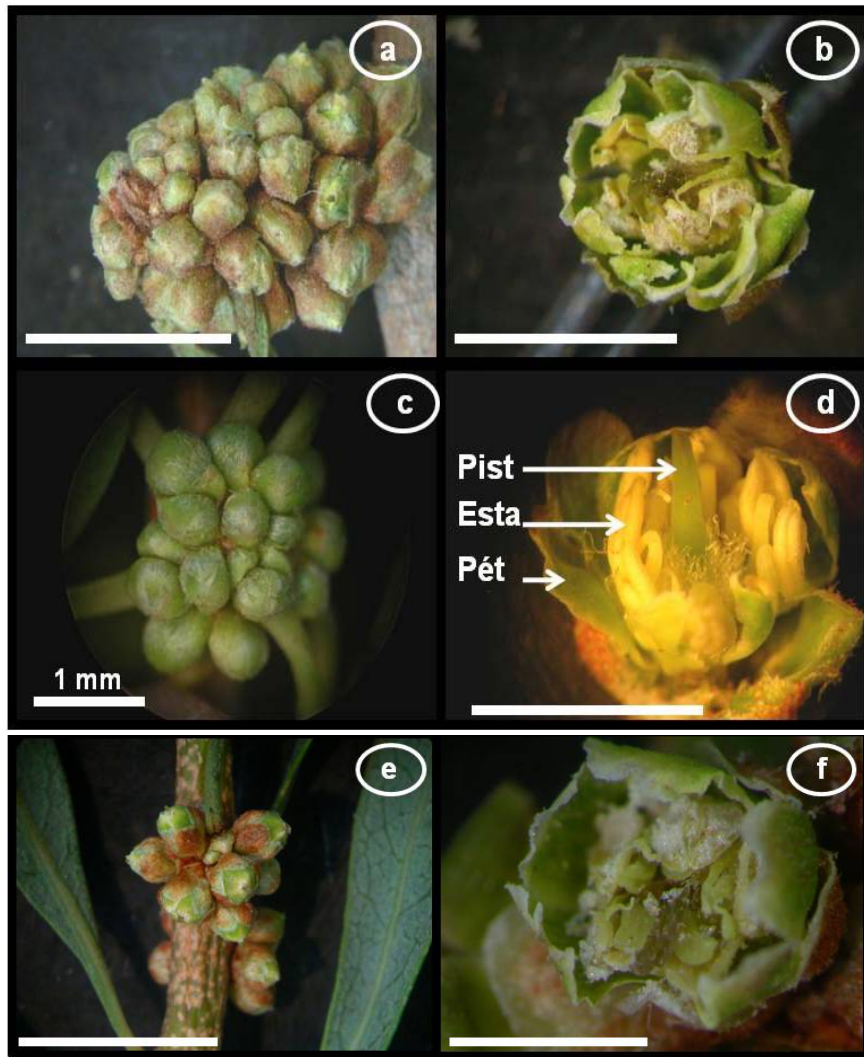


Figura 19. Inflorescencias y flores de argán. a: botones florales de la subespecie *Argania* fruto grande, jóvenes sésiles y axilares agrupados en glomérulo; b: flor abierta de la subespecie *Argania* fruto grande; c: botón floral de la subespecie *Argania* sin fruto; d: flor abierta de la subespecie *Argania* sin fruto, donde se observan más de 5 estambres. Esta: estambre, Pét: pétalo, Pist: pistilo. e: botones florales de la subespecie *Argania* hojas pequeñas, f: flor abierta de la subespecie *Argania* hojas pequeñas.

IV-Resultados



4.1.2. Descripción varietal atendiendo al tipo de ramas: espinas y espaciado de los entrenudos

A continuación, continuamos nuestro análisis varietal atendiendo al estudio de las ramas de las diferentes subespecies. Atendiendo a la presencia de espinas en sus ramas (Fig. 21), la subespecie *Argania* hojas pequeñas se caracteriza con unas ramas muy espinosas. La subespecie *Argania* fruto alargado tiene espinas en sus ramas pero en menor cantidad. Las otras 5 subespecies de la zona estudiada, no tienen espinas. En cuanto al espaciado de sus entrenudos, se realizaron 100 medidas distribuidas en diferentes partes del árbol y las medias de estas medidas están recogidas en la figura 20. Se observa que la variedad *Argania* fruto grande tiene el mayor espacio entrenudos, siendo *Argania* árbol pequeño la que tiene menor espacio entrenudos. El resto de variedades presenta un espaciado intermedio entre el de estas dos variedades.

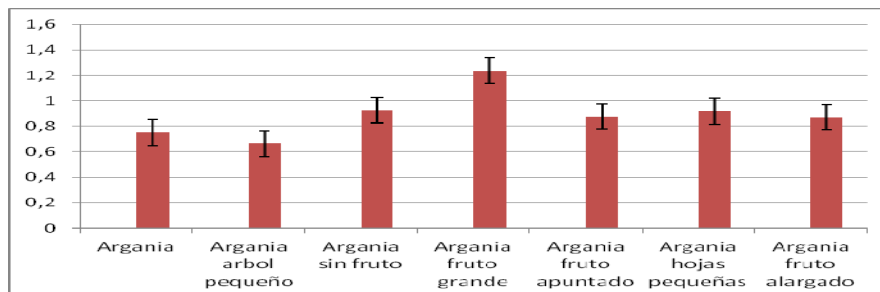


Figura 20. Valores medios del espacio entrenudos (en cms) de las diferentes variedades de argán.

IV-Resultados



Argania árbol pequeño



Argania hojas pequeñas



Argania fruto apuntado



Argania



Argania fruto grande



Argania fruto alargado



Argania sin fruto

Figura 21. Ramas de las diferentes subespecies de Argan.



4.1.3. Análisis comparativo varietal de los caracteres morfológicos de la antera y del grano del polen

Con objeto de profundizar en nuestro estudio para la identificación varietal del Argán se llevó a cabo el análisis de la morfología de las anteras y del polen procedente de 4 variedades: Argania, Argania hojas pequeñas, Argania fruto grande y Argania sin fruto. Estos estudios se llevaron a cabo mediante el empleo de microscopía óptica (MO) y microscopía electrónica de transmisión (MET). Se estudiaron únicamente estas cuatro subespecies debido al mayor volumen de trabajo que suponía la utilización de estas metodologías.

4.1.3.1. Análisis citológico mediante microscopía óptica (MO).

En primer lugar se realizó un estudio preliminar de las dimensiones y estructura de las anteras completas de las 4 variedades descritas anteriormente. En primer lugar se realizaron medidas de longitud y anchura total de la antera y del espesor de su epidermis. Para ello se utilizaron 25 anteras, de cada una de ellas se realizaron 20 cortes que fueron observados a microscopía óptica. Las medidas fueron realizadas a partir de las fotos realizadas bajo las mismas condiciones y utilizando el mismo aumento. Los resultados están recopilados en la figura 22.

IV-Resultados



Como se puede observar en la figura, la longitud de la antera de la variedad Argania fruto grande es bastante mayor que en las otras variedades. La anchura de las anteras de las diferentes variedades son muy similares sin embargo. Esto provoca que la relación longitud/anchura en la variedad Argania fruto grande sea mayor que en el resto de variedades, en las que esta relación está mucho más conservada. No encontramos tampoco grandes diferencias en el espesor de la epidermis de las distintas variedades.

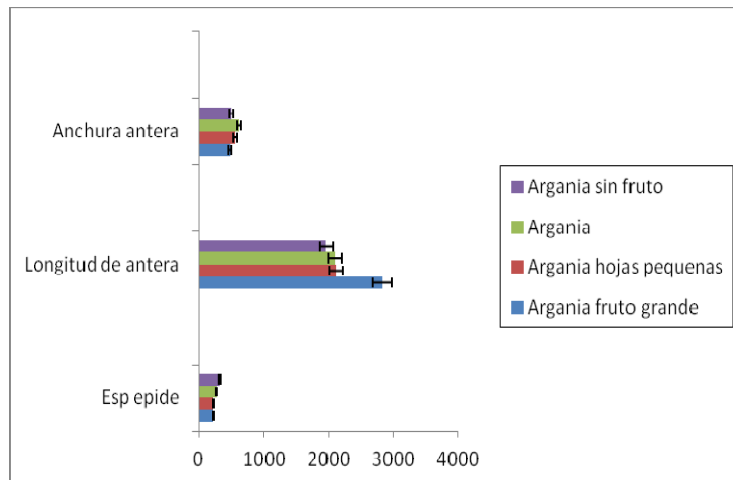


Figura 22. El gráfico representa las medias de las medidas en μm del espesor de la epidermis, la longitud y la anchura de la antera de las cuatro subespecies de argán. Las fotos fueron realizadas utilizando las mismas condiciones de captura.

En cuanto a su morfología, las anteras de las cuatro variedades poseen cuatro lóbulos conectados por un tejido conectivo que encierra los granos de polen. Se observa en todas las variedades que la antera posee una pared constituida desde el exterior al interior por diferentes tejidos:

IV-Resultados



exoteico, endoteico y tapetum. Se observaron diferencias entre las diferentes variedades en las medidas de anchura y longitud de las anteras y de su epidermis.

A continuación se estudiaron los tejidos de la antera y los granos de polen en el interior de la antera, analizando sus características morfológicas, entre otras, el número de sus aperturas. Los resultados se pueden observar en las figuras 23-26 donde se muestran cortes de las anteras de las diferentes variedades.

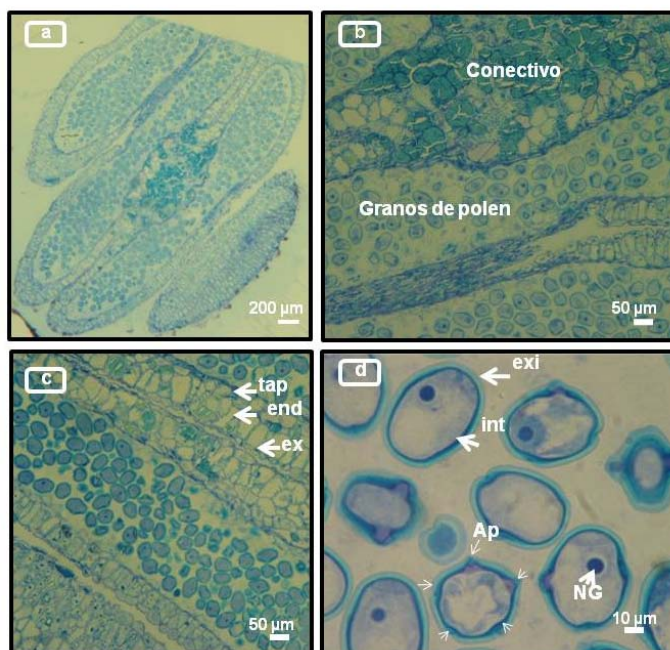


Figura 23. Secciones de anteras (1 μ m) de la subespecie *Argania fruto grande* observadas a microscopio óptico tras de una tinción con una solución azul de toluidina/metileno. tap: tapetum; end: endoteico; ex: exoteico; Ap: apertura; NG: núcleo generativo. a: corte transversal de la antera. b: representa un corte transversal de la

IV-Resultados



antera donde se observa el tejido conectivo entre los lóbulos de la antera. c: representa un corte transversal de una antera, donde se observa la antera con una pared exterior constituida por tres capas que son respectivamente del exterior al interior: exoteico; endoteico y tapetum. d: granos de polen, se aprecian granos de polen sin apertura o con 2, 3 y 5 aperturas. En la pared del polen se observa la exina (exi) y intina (int).

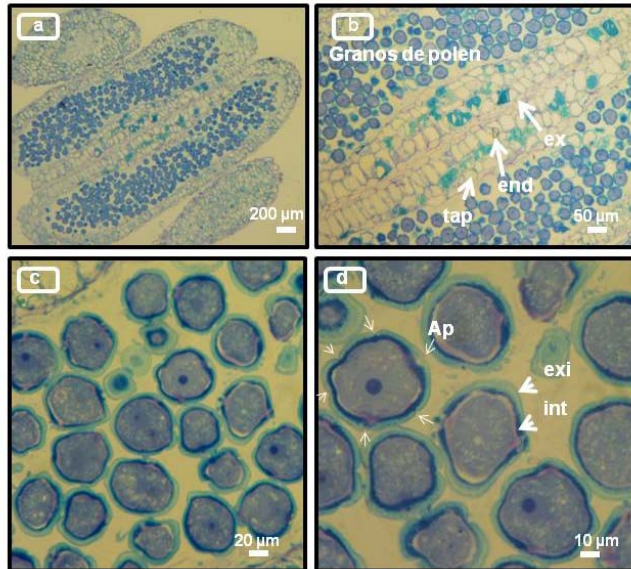


Figura 24. Secciones de anteras (1 μ m) de la subespecie *Argania fruto grande* observadas a microscopio óptico tras de una tinción con una solución azul de toluidina/ metileno. tap: tapete; end: endoteico; ex: exoteico; Ap: apertura; NG: núcleo generativo. a: un corte transversal de la antera donde se aprecia la antera con dos lóbulos que encierran los granos de polen. b: corte transversal de la antera donde se aprecia el interior de la antera y su pared. c: corte transversal de una antera, se observan diferentes granos de polen, d: granos de polen sin apertura ó con 2, 3, 5 y 6 aperturas. En la pared del polen se distinguen la exina y la intina.

IV-Resultados

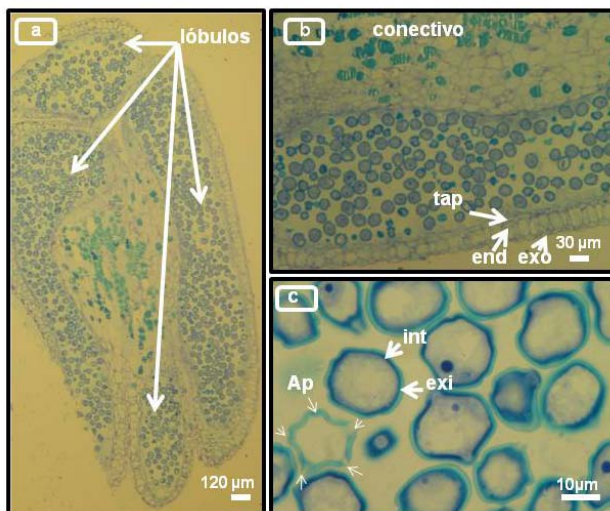


Figura 25. Secciones de anteras ($1\mu\text{m}$) de la subespecie *Argania* sin fruto observadas a Microscopio óptico; después de una tinción de los cortes con una solución azul de toluidina/ metileno. tap: tapete; end: endoteico; ex: exoteico; Ap: apertura. a: corte transversal de la antera donde se aprecia la antera con cuatro lóbulos conectados por un tejido conectivo que encierran los granos de polen. b: representa un corte transversal de la antera donde se aprecia la antera con una pared constituida del exterior al interior por: exoteico (exo); endoteico (endo) y un tapetum. c: corte transversal de una antera, se observan los granos de polen de diferentes tamaños, d: granos de polen, se aprecian granos de polen sin apertura ó con 2, 3, 4 y 5 aperturas. En la pared del polen se observa la exina e intina.

IV-Resultados

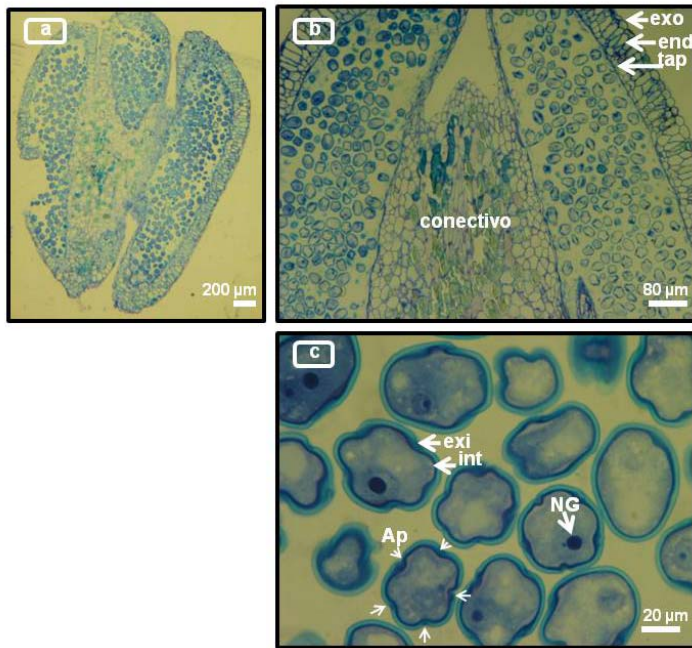


Figura 26. Secciones de anteras (1 μ m) de la subespecie *Argania* hojas pequeñas observadas a microscopio óptico; después de una tinción de los cortes con una solución azul de toluidina/ metileno (tap: tapete; end: endoteco; exo: exoteco; Ap: apertura; NG: nucleo generativo).

Con respecto a los granos de polen, dependiendo del corte, se observaron granos de polen con diferente número de aperturas. Se estudiaron las distintas muestras, y se realizó un conteo del número de aperturas en las distintas variedades que queda recogido en la figura 27. El número máximo encontrado de 6.

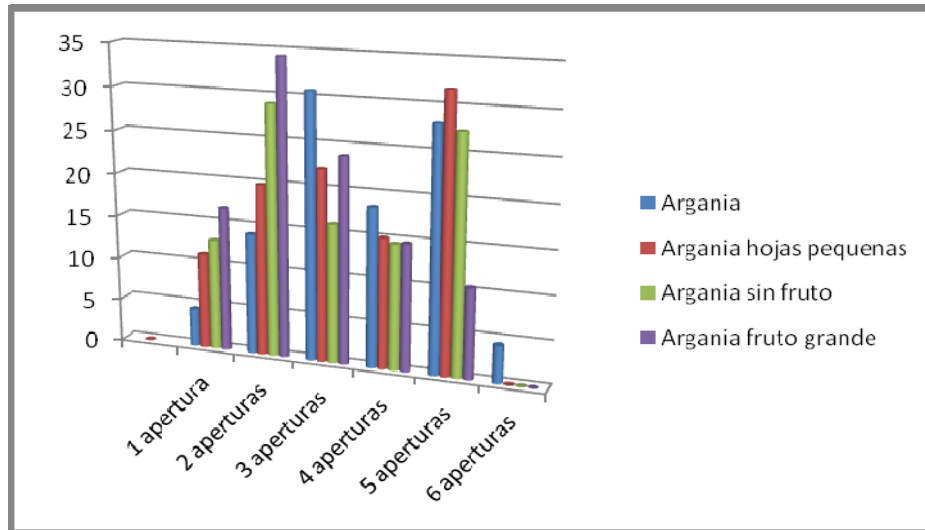


Figura 27. Representa los valores medios del porcentaje de pólenes con distintos números de aperturas en las cuatro subespecies de *Argania spinosa L.*

Siguiendo nuestro estudio morfológico del polen, en la pared del polen de todas las variedades se puede diferenciar claramente la exina y la intina. Se observa también dentro de los granos de polen los dos núcleos generativo y vegetativo. Sin embargo, no es posible a microscopía óptica encontrar otras diferencias a nivel de variedad. Por ello profundizamos nuestro análisis a nivel de microscopía electrónica de transmisión.

4.1.3.2. Análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión (MET).

A continuación se estudiaron los granos de polen de las diferentes variedades al microscopio electrónico de transmisión. En primer lugar se realizaron unas primeras medidas de las dimensiones del polen: longitud y

IV-Resultados



anchura o eje polar y diámetro ecuatorial, que están recogidas en la figura 28 y en la tabla 5. A partir de esos valores se calculó el coeficiente entre el eje polar y el diámetro ecuatorial. Este valor se calculó para determinar la categoría de forma al que pertenecían los granos de polen de cada subespecie basándose en un sistema de clasificación universalmente aceptado (Valdés et al., 1987). Dicha tasa varió entre 1,30 en *Argania* fruto grande y 1,14 en *Argania* sin fruto.

Subespecie	Longitud polen(μm)	Anchura polen(μm)	Coficiente L/A
<i>Argania</i>	20,26	16,10	1,25
<i>Argania</i> hojas pequeñas	21,83	17,51	1,25
<i>Argania</i> fruto grande	21,56	16,54	1,30
<i>Argania</i> sin fruto	16,80	14,71	1,14

Tabla 5. Valores medios de longitud y anchura de los granos de polen de las diferentes variedades, a partir de los cuales se calculó el coeficiente L/A para ver el tipo de polen del que se trataba de acuerdo a su forma.

IV-Resultados

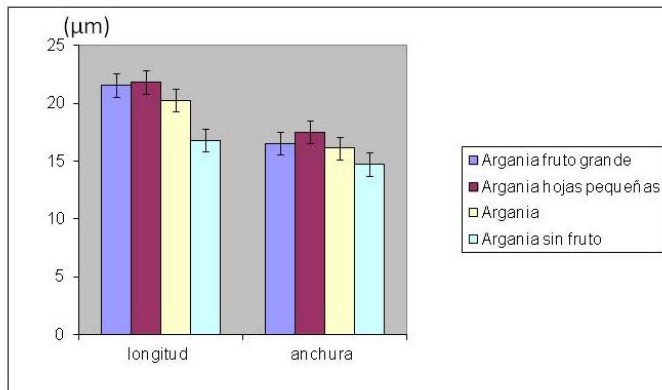


Figura 28. El grafico representa las medidas en μm de la longitud y anchura de polen de las cuatro variedades.

De acuerdo a la clasificación de Valdés, todos los granos de polen en las subespecies estudiadas tienen una forma subprolada (elíptica, eje polar/diámetro ecuatorial = 1,14-1,33).

En segundo lugar en nuestro estudio al MET se atendió principalmente a la pared del grano de polen. Se utilizó este carácter porque se caracteriza por una amplia variabilidad en su morfología. La pared del grano de polen en su zona interapertural está muy organizada y en ella se pueden diferenciar sus diferentes componentes, descritos en detalle en la Introducción. Así, para profundizar en la identificación varietal se realizó un estudio estadístico del espesor de las diferentes capas de la pared del polen (Tabla 6 y Figura 29). Estos análisis se realizaron sobre 84 muestras de pólenes para cada variedad. Las figuras 30 a 33 muestran pólenes de las diferentes variedades, en las que se puede ver como se han realizado las diferentes medidas de los diferentes componentes.

IV-Resultados



Se observan claras diferencias entre las subespecies. La exina que es la capa externa de la pared: La subespecie *Argania* fruto grande se caracteriza por un mayor espesor del tectum (550 nm) y de las columelas (460 nm); la subespecie *Argania* se diferencia por un espesor superior de la capa basal (623 nm), de la endexina (572 nm) y la intina (317 nm). En cuanto la subespecie *Argania* hojas pequeñas, la diferencia se aprecia en las dimensiones de los granos de polen, mayores que en el resto (21,82 μm y 17,51 nm). Por el contrario, la subespecie *Argania* sin fruto se diferencia del resto en que las dimensiones de sus granos de polen son inferiores (16,80 μm y 14,71 nm) y además porque posee una intina muy delgada (70 nm).

Subespecie	Espesor Tectum (μm)	Espesor Columela (μm)	Espesor Capa basal (μm)	Espesor Endexina (μm)	Espesor Intina (μm)
<i>Argania</i>	0,52	0,41	0,62	0,573	0,32
<i>Argania</i> hojas pequeñas	0,44	0,25	0,38	0,545	0,11
<i>Argania</i> fruto grande	0,55	0,468	0,59	0,534	0,20
<i>Argania</i> sin fruto	0,52	0,22	0,43	0,52	0,07

Tabla 6. Los espesores en μm de las diferentes capas que constituyen la pared del polen en diferentes subespecies.

IV-Resultados

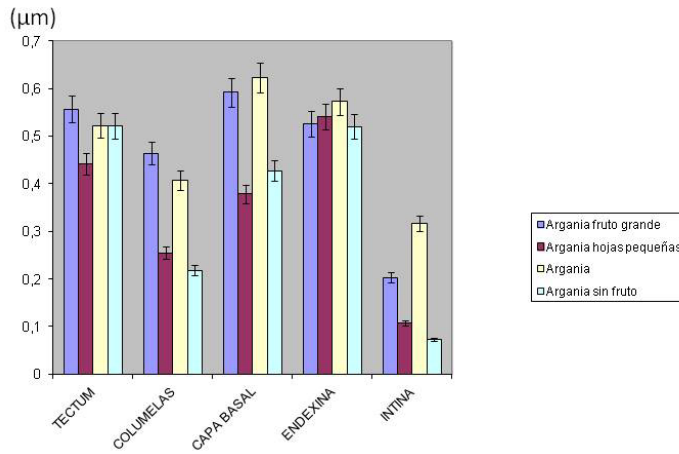


Figura 29. El gráfico representa las medidas en (μm) de las diferentes capas que constituyen la pared del polen de las cuatro variedades estudiadas.

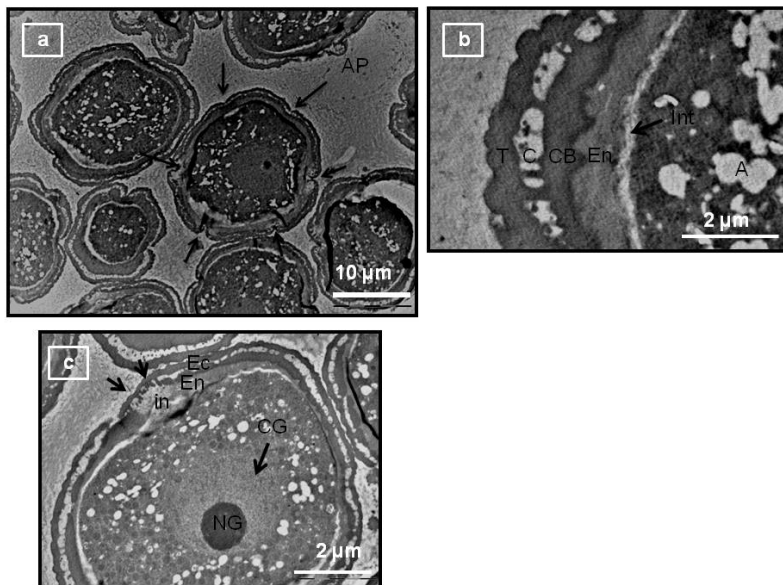


Figura 30. Secciones de granos de polen de argán (*Argania*) observadas al microscopio electrónico de transmisión. T: tectum; C: columelas; CB: capa basal; En: endexina; Int: intina; A: almidón. Ec: ectexina; En: endexina; CG: célula generativa; NG: núcleo generativo.

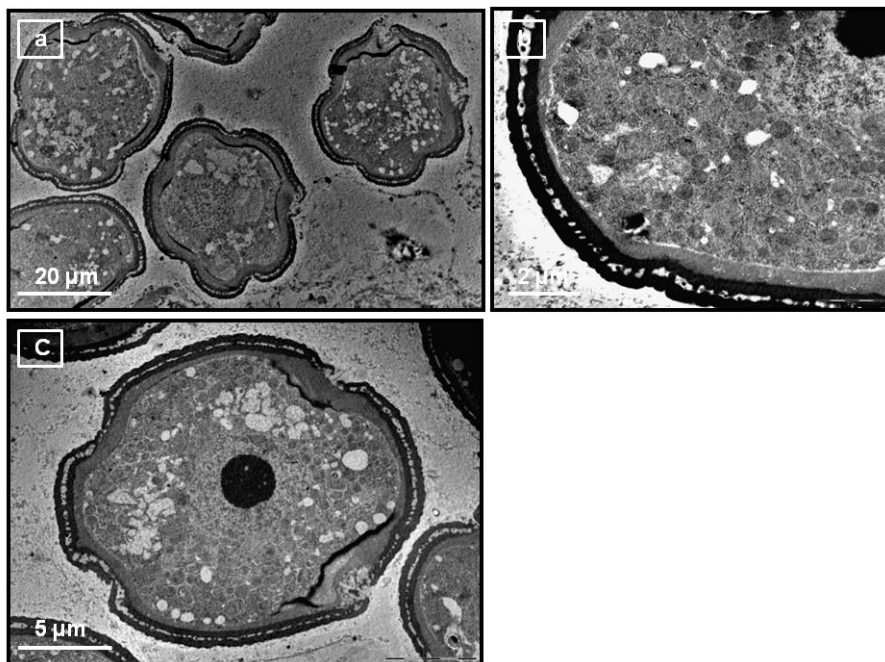


Figura 31. Secciones de granos de polen de argán (*Argania* hojas pequeñas) observadas al microscopio electrónico de transmisión. a: granos de polen con 5 aperturas, b: se observan los compartimentos de la pared del grano de polen con una intina delgada, c: un polen de argán con 4 aperturas, donde se aprecia la desorganización de la pared con un engrosamiento de la intina.

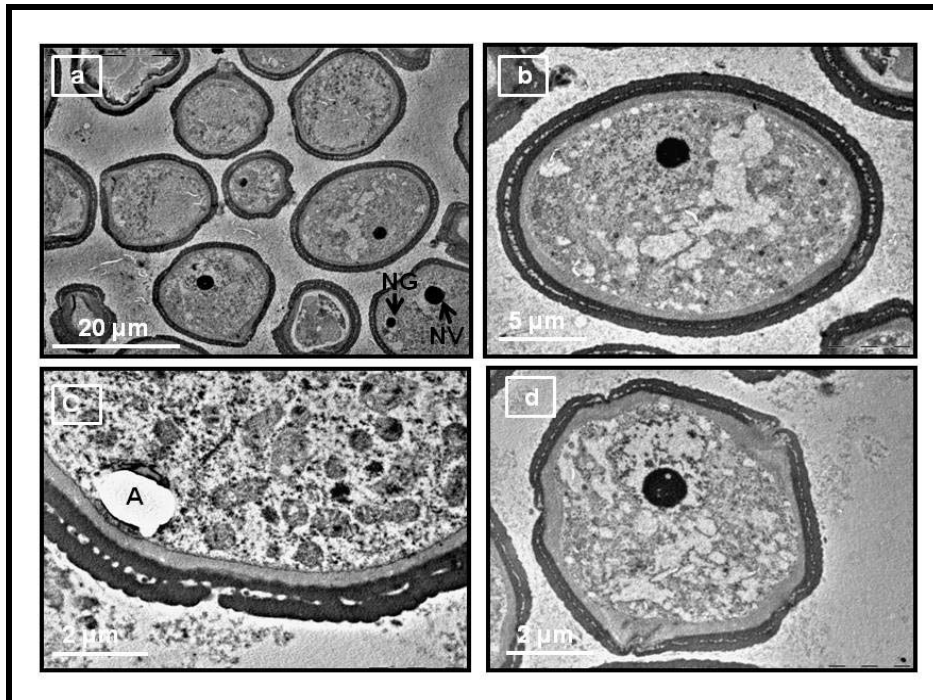


Figura 32. Secciones de granos de polen de argán (*Argania* sin fruto) observadas al microscopio electrónico de transmisión. a: granos de polen con 2, 3 y 4 aperturas, así como grano de polen sin aperturas; NG: núcleo generativo de tamaño pequeño; NV: núcleo vegetativo de tamaño grande. b: un grano de polen inaperturado. d: un polen con 5 aperturas. A: grano de almidón.

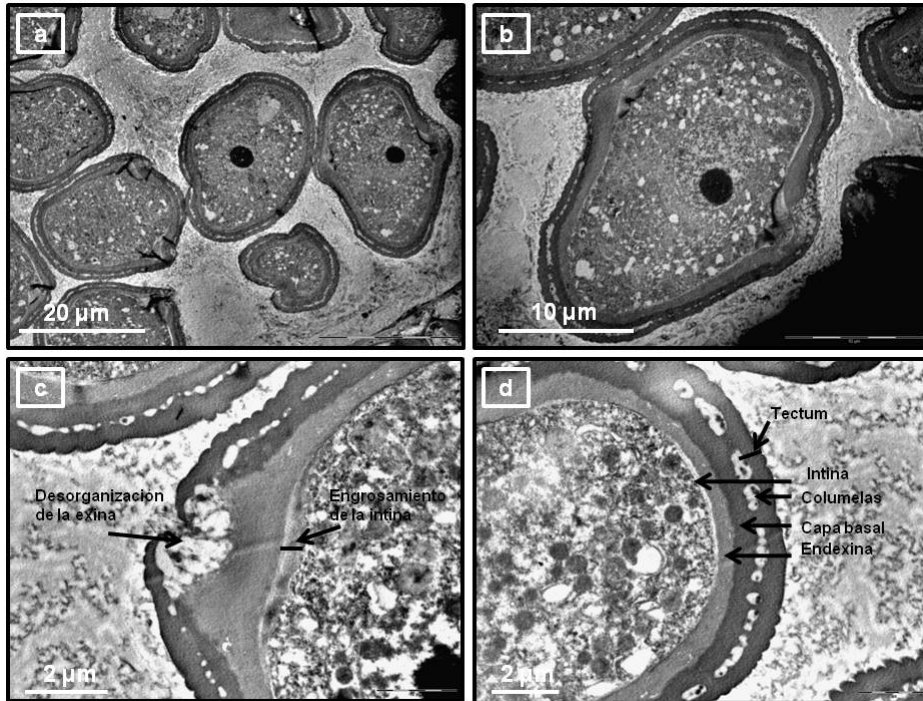


Figura 33. Secciones de granos de polen de argán (*Argania fructuosa*) observadas al microscopio electrónico de transmisión. a: granos de polen con 2 y 3 aperturas, b: un grano de polen con 2 aperturas. c: representa la imagen de una apertura donde se ve la exina desorganizada y la intina que se engruesa. d: se ven las diferentes partes que constituyen la pared del polen.

A continuación se realizó un estudio sobre el número de aperturas de cada subespecie. Para ello se utilizaron 140 muestras de pólenes para cada subespecie. Los resultados están recogidos en la figura 34. El análisis de los resultados muestra que únicamente la subespecie *Argania* presenta polen con 6 aperturas (representa cerca de 4.38% del total del polen). Mientras que en las subespecies *Argania fructuosa* y *Argania sin fruto*,

IV-Resultados



los granos de pólenes con 2 aperturas se encuentran en un mayor porcentaje (34.26%), en la subespecie Argania, los granos de polen con 3 aperturas representan el mayor porcentaje (30,70%). Los granos de polen con 5 aperturas representan el mayor porcentaje (31.74%) en la subespecie Argania hojas pequeñas y el menor porcentaje (10.48%) en Argania fruto grande. En las otras dos subespecies Argania y Argania sin fruto, el porcentaje de granos de polen con 5 aperturas son los segundos más abundantes respectivamente (28.07%) y (27.41%).

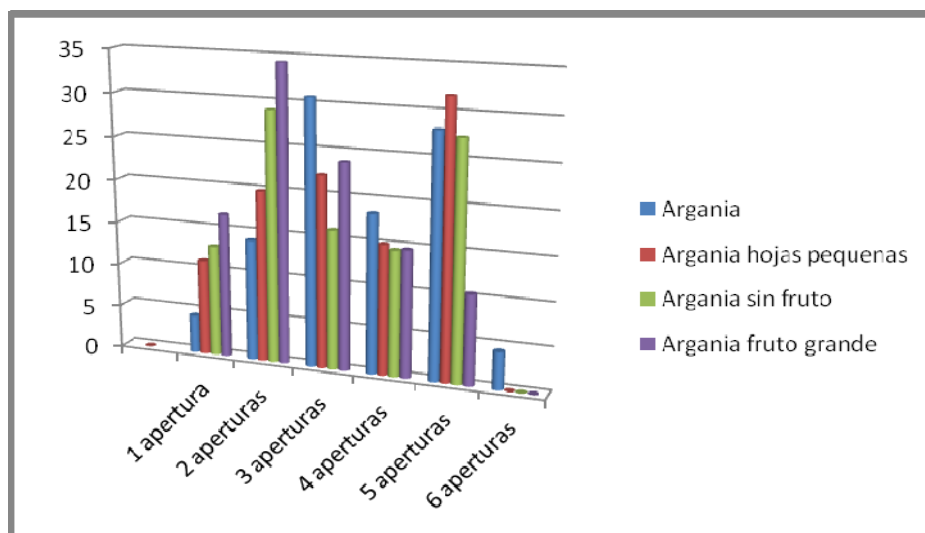


Figura 34. Representa el porcentaje de pólenes con diferentes números de aperturas en las cuatro subespecies de *Argania spinosa* L.

IV-Resultados



4.2. Identificación de isoenzimas de SOD en semillas y hojas de Argania spinosa L.

4.2.1. Estudio espectrofotométrico de la actividad SOD en semillas y hojas de variedades de Argania spinosa L.

En primer lugar en nuestro análisis, se cuantificó la actividad total SOD en semillas utilizando el método de Fridovich et al., (1975) ligeramente modificado. Los resultados se pueden observar en las tablas 7 para semillas y 8 para hojas.

Variedades	Unidades de SOD en 1 ml
Mezcla de Chouhiya (EC)	1928.26
Mezcla de Agadir (EA)	1824.06
Argania fruto alargado	69.12
Argania fruto grande	478.08
Argania hojas pequeñas	139.00

Tabla 7. Actividad SOD *in vitro* en 1 ml de extracto proteico crudo de la semilla en diferentes variedades.

Variedades	Unidades de SOD en 1 ml
Argania sin fruto	11945.86
Argania	93.12
Argania hojas pequeñas	400.96
Argania fruto alargado	63.16

IV-Resultados



Argania fruto apuntado	548.00
Argania árbol pequeño	5082.68
Argania fruto grande	4730.24

Tabla 8. Actividad SOD *in vitro* en 1 ml de extracto crudo de la hoja en diferentes subespecies.

Atendiendo a los resultados, la actividad SOD medida en semillas varía enormemente entre unas variedades y otras, tanto en semillas como en hojas y también dentro de una misma variedad de semillas a hojas. En semillas, encontramos una mayor actividad en las mezclas que en las variedades individuales, mientras que en las hojas, la actividad es máxima en Argania sin fruto. Dentro de una misma variedad, los valores para hojas y semillas son similares o del mismo orden para las distintas variedades, salvo en Argania fruto grande donde hay 10 veces más en semillas.

4.2.2. Actividad SOD en semillas

Para continuar con nuestro estudio varietal basado en análisis isoenzimático, analizamos las isoenzimas SODs presentes en semillas de *Argania spinosa* L. de las distintas variedades. En primer lugar se realizó una separación electroforética de las proteínas de extractos de semillas de Argan. El perfil proteico del gel SDS-PAGE que se muestra en la figura 46 no mostró ninguna diferencia clara entre las subespecies de argán.

IV-Resultados



Todas las subespecies dieron un perfil proteico de 3 bandas proteicas mayoritarias.

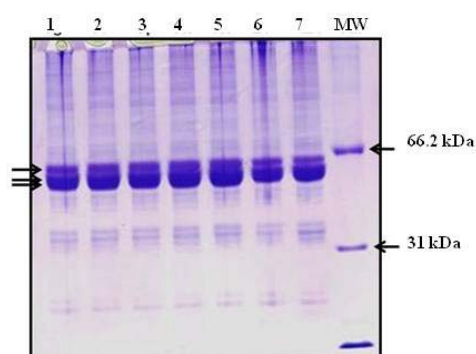


Figura 35. SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras teñido con Coomassie de extractos crudos proteicos de semillas de diferentes variedades: 1: Argania fruto grande; 2: Argania fruto apuntado; 3: Argania hojas pequeñas; 4: Argania fruto alargado; 5: Argania; 6: Argania mezcla de Chouihiya; 7: Argania mezcla de Agadir.

4.2.2.1. Detección de la actividad SOD en geles nativos de poliacrilamida.

A continuación se procedió a la detección de la actividad SOD en geles nativos de los extractos proteicos de semillas de las distintas variedades utilizando el método de Beauchamp y Fridovich (1971). Los resultados pueden observarse en la figura 36.

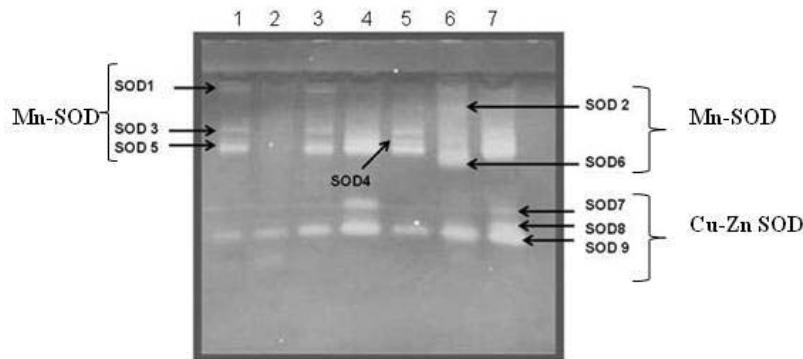


Figura 37. Ensayo de actividad SOD sobre gel nativo de poliacrilamida al 12% de extractos crudos de semillas de las variedades Argania (1), Argania fruto apuntado (2), Argania hojas pequeñas (3), Argania fruto grande (4), Argania fruto alargado (5), Argania mezcla de Agadir (6), Argania mezcla de Chouhiya (7).

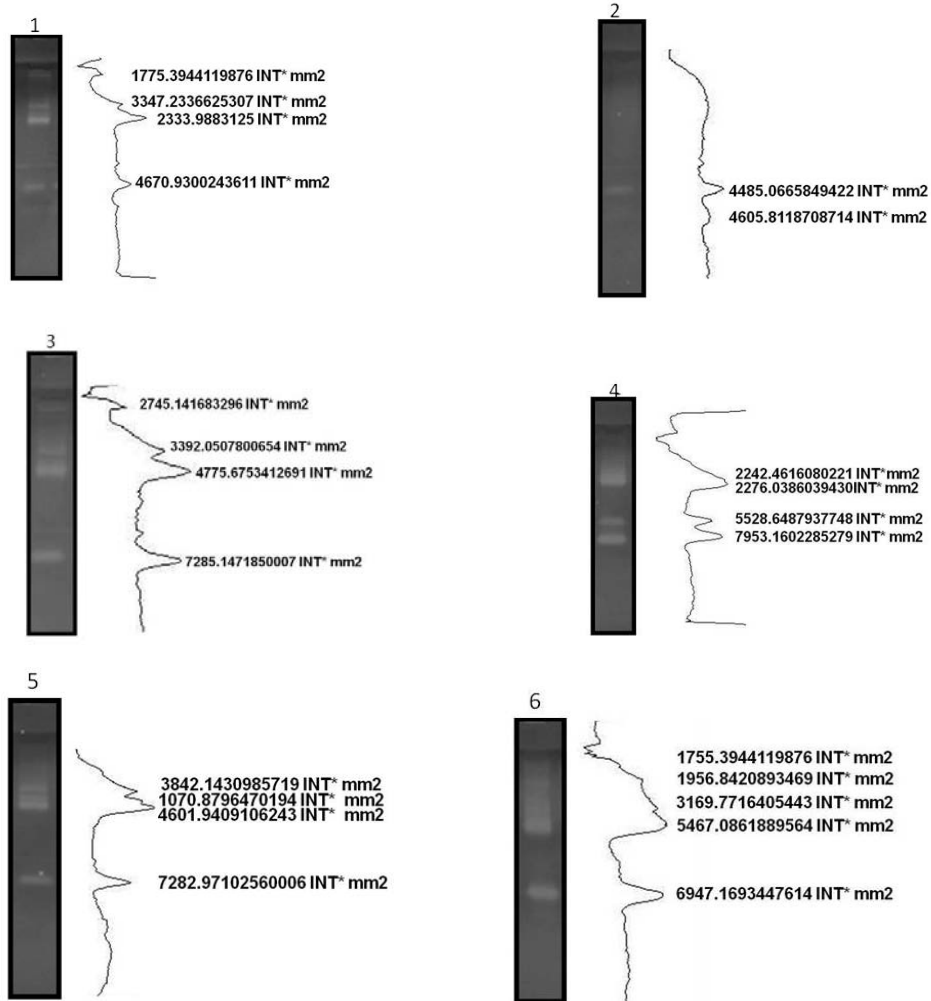
Se detectaron hasta 9 bandas diferentes con actividad SOD positiva a las que hemos denominado SOD1, SOD2, SOD3, SOD4, SOD5, SOD6, SOD7, SOD8 y SOD9 atendiendo en el orden únicamente a su peso molecular. Las diferencias entre las variedades en la presencia de las diferentes bandas y en su intensidad son evidentes. SOD9 esta presente en todas las variedades. Las subespecies Argania y Argania hojas pequeñas presentaron cuatro bandas que se corresponden con SOD1, SOD3, SOD5 y SOD9; en Argania fruto apuntado se identificaron 2 bandas, SOD1 muy débil y SOD9; en Argania fruto grande hay 4 bandas correspondientes a SOD4, SOD5, SOD7 y SOD9; en Argania fruto alargado; 4 bandas correspondientes a SOD3, SOD4, SOD5 y SOD9; en

IV-Resultados



la mezcla de Agadir; 3 bandas SOD2, SOD6 y SOD9 y en la mezcla de Chouhiya 4 bandas SOD5, SOD7, SOD8 y SOD9.

A continuación se procedió al análisis densitométrico de las bandas para cada una de las variedades, cuyo resultado se puede ver en la figura 38.



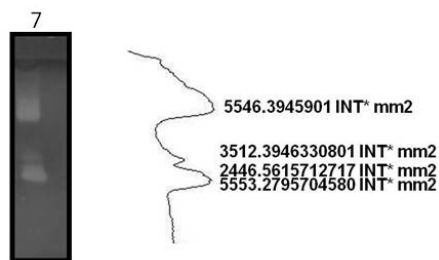


Figura 38. Análisis densitométricos de las bandas con actividad SOD en geles nativos en los extractos de semillas de las variedades, 1: Argania, 2: Argania fruto apuntado, 3: Argania hojas pequeñas, 4: Argania fruto grande, 5: Argania fruto alargado, 6: Argania mezcla de Agadir y 7: Argania mezcla de Chouhiya.

4.2.2.2. Identificación del tipo de SOD mediante ensayos de inhibición con KCN y H₂O₂

Con objeto de identificar los tipos de SODs presentes en las diferentes variedades (Mn-SODs, Fe-SODs y Cu-Zn-SODs), se realizaron previamente a los geles de actividad unos ensayos de inhibición con KCN y H₂O₂ como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Los resultados están recogidos en la figura 39. Tras estos ensayos de inhibición se comprobó que las bandas de menor peso molecular, correspondientes a SOD7, SOD8 y SOD9 desaparecían tanto con la inhibición con KCN como con H₂O₂ en todas las variedades estudiadas. Esas bandas por tanto se corresponderían con Cu-Zn SODs, sin embargo

IV-Resultados



las bandas con un peso molecular superior (SOD1 a SOD6) que siguen presentes tras ambos ensayos de inhibición se corresponderían con MnSODs.

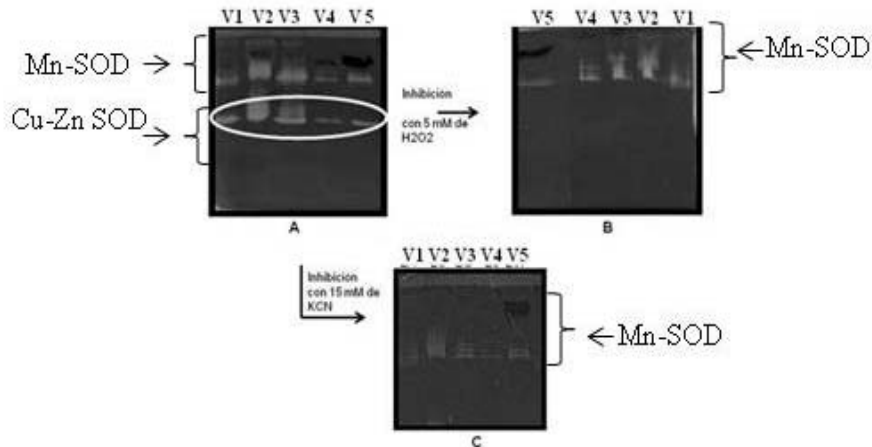


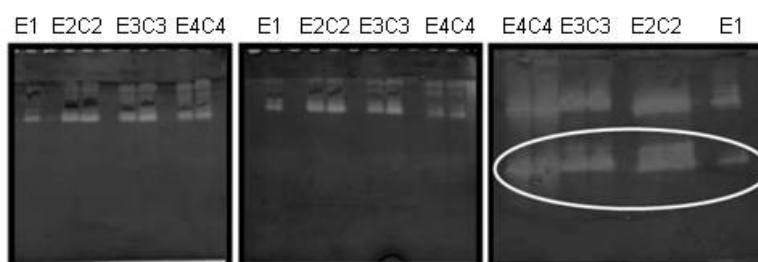
Figura 39. Ensayos de inhibición con KCN y H₂O₂ para identificación de tipos de SODs sobre geles de actividad SOD de extractos de diferentes variedades: V1 (Argania mezcla de Agadir), V2 (Argania mezcla de Chouihya); V3 (Argania fruto grande); V5(Argania hojas pequeñas); V4 (Argania fruto alargado).

En el caso de 3 de las variedades (Argania fruto alargado apuntado, Argania fruto grande, mezcla de Agadir; mezcla de Chouihya se realizaron los mismos ensayos pero tomando muestras del endospermo y del cotiledón para ver si se encontraba alguna diferencia entre ellos. Los resultados en la figura 40, no muestran diferencia alguna entre las muestras tomadas del endospermo y del cotiledón de cada una de estas

IV-Resultados



variedades.



Inhibición con 15mMKCN Inhibición con 5 Mm H₂O₂

Figura 40. Ensayos de inhibición con KCN y H₂O₂ para identificación de tipos de SODs sobre geles de actividad SOD de extractos de endospermo (E) y cotiledón (C) de las siguientes variedades: de las subespecies *Argania* fruto alargado apuntado (E1), *Argania* fruto grande (E2; C2), mezcla de Agadir (E4; C4); mezcla de Chouhiya (E3, C3).

Teniendo en cuenta el análisis densitométrico y los resultados de los tests de inhibición se puede ver la diferencia cuantitativa en la presencia de las diferentes SODs presentes en las distintas variedades. Los resultados están recogidos en la tabla 9.

	Mn-SOD	Cu/Zn SOD
Argania	61.48% (SOD1; SOD3 y SOD5)	38.52% (SOD9)
Argania fruto grande	25% (SOD4 y SOD5)	75% (SOD7 y SOD9)

IV-Resultados



Argania hojas pequeñas	60% (SOD1; SOD3 y SOD5)	40% (SOD9)
Argania fruto apuntado		100% (SOD9)
Argania fruto alargado	56.64% (SOD3; SOD4 y SOD5)	43.36% (SOD9)

Tabla 9. Porcentaje de actividades SODs en semillas de las variedades analizadas.

Como se puede observar en la tabla, el porcentaje de isoformas Mn-SOD y Cu-Zn SOD varía para cada una de las variedades estudiadas. En Argania, Argania hojas pequeñas y Argania fruto alargado las isoformas Mn-SODs están presentes en un mayor porcentaje que las isoformas Cu/Zn-SOD, aunque la distribución de la actividad de las diferentes isoformas es diferente de unas a otras variedades. En Argania fruto grande sin embargo las isoformas Cu/Zn-SOD son más abundantes, como también ocurre en la variedad Argania fruto apuntado, donde solo se detecta actividad de una isoforma Cu/Zn SOD.

4.2.2.3. Detección de isoformas SOD mediante inmunobloting

Para seguir con nuestro análisis varietal de SODs se utilizó un anticuerpo policlonal comercial disponible frente a una Cu-Zn SOD

IV-Resultados



citoplasmática para identificar isoformas de SODs mediante inmunoblotting. Los resultados se pueden observar en la figura 41.

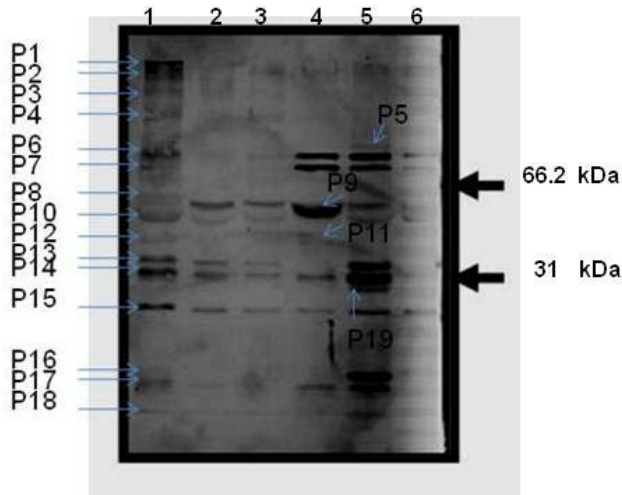


Figura 41. Inmunoblotting de extractos de proteínas de semillas de las distintas variedades incubado con anticuerpo policlonal comercial frente a Cu-Zn SOD cloroplastídica. Variedades utilizadas: 1: Argania hojas pequeñas, 2: Argania fruto grande, 3: Argania fruto apuntado, 4: Argania, 5: mezcla de Berkane-Chouihya y 6: mezcla de Agadir.

La reacción con el anticuerpo policlonal Cu-Zn SOD cloroplastídica mostrada en el blot revela hasta 19 bandas. En la subespecie Argania hojas pequeñas (línea 1) se ven hasta 15 bandas (P1: 232.03 kDa ; P2: 291.07 kDa; P3: 217.80 kDa; P4: 157.34 kDa; P6: 84.96 kDa; P7: 71.81 kDa; P8: 55.75 kDa; P10: 47.78 kDa; P12: 41.44 kDa; P13: 36.52 kDa; P14: 33.61 kDa; P15: 26.73 kDa; P16: 17.05 kDa; P17:

IV-Resultados



15.81 kDa y P18: 13.38 kDa) con una señal fuerte en las bandas P1; P2; P4; P6; P13; P10; P14; P15 y P17. En la subespecie *Argania fruto grande* (línea 2) se revelan hasta 7 bandas (P4; P9; P10; P13; P14; P15 y P17) con una señal fuerte en las bandas P9; P13; P14 y P15. En la subespecie *Argania fruto apuntado* (línea 3) se observan en el blot hasta 9 bandas (P1; P4; P6; P7; P8; P10; P13; P14 y P15) con una señal fuerte en la banda P8. En la subespecie *Argania* (línea 4) se revelan 9 bandas (P1; P6; P7; P9; P11: 48.27 kDa; P12; P14; P15 y P17) con una señal fuerte en las bandas P6; P7 y P9. En la mezcla de Berkane- Chouhiya (línea 5) se ven en el blot hasta 14 bandas (P1; P2; P5: 80 kDa; P6; P7; P8; P10; P13; P14; P19: 30.61 kDa; P15) con una señal fuerte en las bandas P6; P7; P13; P14; P19; P15; P16 y P17. En la mezcla de Agadir (línea 6) se ven en el blot hasta 5 bandas todas con una señal baja (P5; P6; P8; P10 y P15).

4.2.3. Actividad SOD en hojas

4.2.3.1. Detección de actividad SOD en geles nativos de poliacrilamida.

En paralelo a los estudios en semillas, se procedió a la detección de la actividad SOD en geles nativos de los extractos proteicos de hojas de las distintas variedades utilizando igualmente el método de Beauchamp y Fridovich (1971). Los resultados pueden observarse en la figura 42.

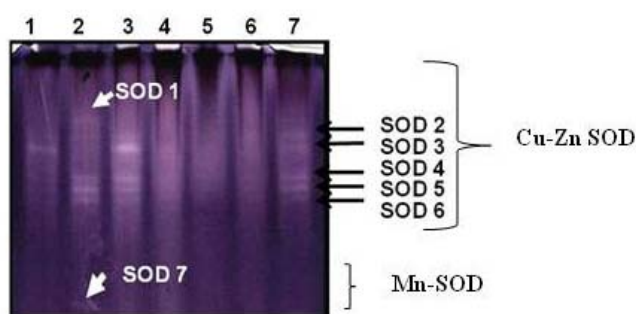


Figura 42. Ensayo de actividad SOD en un gel nativo al 12% de acrilamida de los extractos crudos de hojas de las distintas variedades de *Argania spinosa* L. (1): *Argania* fruto grande, (2): *Argania* fruto apuntado, (3): *Argania*, (4): *Argania* árbol pequeño, (5): *Argania* hojas pequeñas, (6): *Argania* sin fruto, (7): *Argania* fruto alargado,.

Se detectaron hasta 7 bandas diferentes con actividad SOD positiva a las que hemos denominado SOD1, SOD2, SOD3, SOD4, SOD5, SOD6 y SOD7. Destaca el hecho de que estas bandas son visibles claramente únicamente en 4 de las variedades estudiadas y que como ocurría con las semillas, las diferencias entre las variedades en la presencia de las diferentes bandas y su intensidad son evidentes. En *Argania* se observan las bandas SOD3; SOD4 y SOD5. En *Argania* fruto apuntado se observan en el gel hasta 5 bandas, SOD1, SOD4, SOD5, SOD6 y SOD7. En *Argania* fruto alargado, SOD2, SOD3, SOD4, SOD5 y SOD6.

A continuación se procedió al análisis densitométrico de las bandas para cada una de las variedades, cuyo resultado se puede ver en la figura 43.

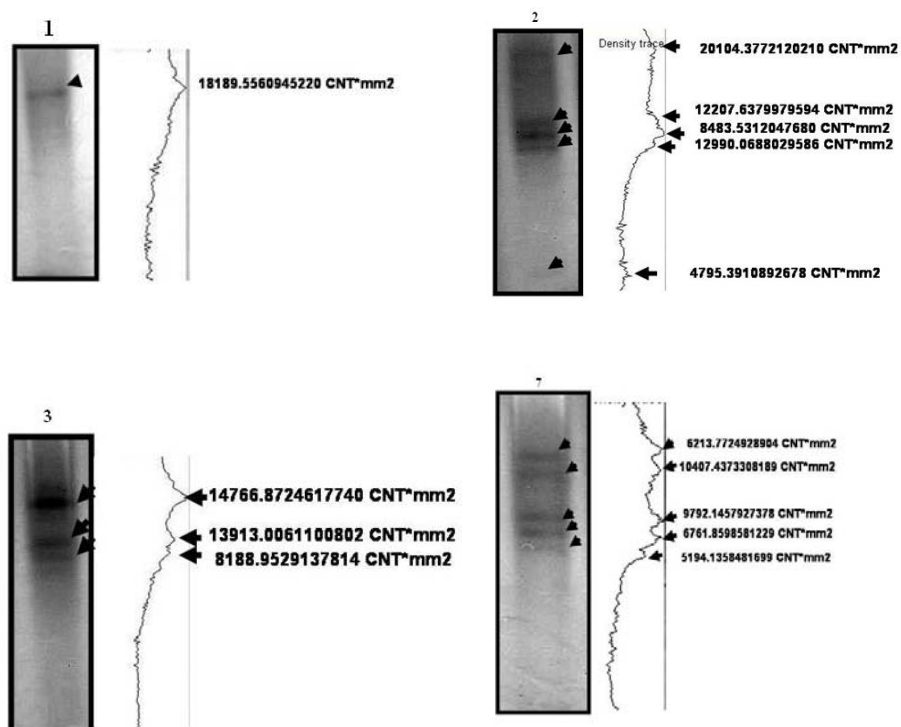


Figura 43. Análisis densitométrico de las bandas con actividad SOD en gels nativos en los extractos de hojas de las variedades: (1): Argania fruto grande, (2): Argania fruto apuntado, (3): Argania, (7): Argania fruto alargado.

IV-Resultados



4.2.3.2. Identificación del tipo de SODs en hoja mediante ensayos de inhibición con KCN y H₂O₂

Para identificar los tipos de SODs presentes en los diferentes extractos de hojas, se realizaron los ensayos de inhibición con KCN y H₂O₂ al igual que se habían realizado en semillas. Los resultados están recogidos en la figura 44.

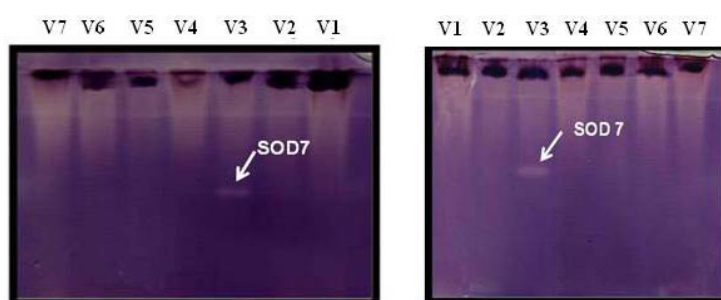


Figura 44. Ensayos de inhibición con KCN y H₂O₂ para identificación de tipos de SODs sobre geles nativos de extractos de hojas de diferentes variedades: V1: Argania hojas pequeñas, V2: Argania fruto grande, V3: Argania fruto apuntado, V4: Argania sin fruto, V5: Argania fruto alargado, V6: Argania árbol pequeño, V7: Argania. A) Inhibición previa con 15 mM de KCN. B) Inhibición previa con 5 mM de 5mM de H₂O₂.

Los resultados para ambos tipos de inhibición fueron idénticos, la desaparición de todas las bandas excepto las correspondiente a SOD7 de la subespecie Argania fruto apuntado. SOD7 por tanto sería una Mn-SOD mientras que el resto de las bandas corresponderían por tanto a Cu-Zn SODs.

IV-Resultados



Los resultados de los ensayos de inhibición extractos de hojas y los análisis densitométricos realizados, están recogidos en la tabla , donde se muestra el porcentaje de actividad de cada banda con actividad SOD para cada variedad y el tipo de SOD al que pertenece.

	Cu-Zn SOD						Mn-SOD
	SOD1	SOD2	SOD3	SOD4	SOD5	SOD6	SOD7
Argania fruto apuntado	34,31%			20.8%	14.48%	22.17%	8.18%
Argania			40.08%	37.73%	22.21%		
Argania fruto alargado		16.18%	27.12%	25.52%	17.64%	13.53%	

Tabla 10. Porcentaje de actividad de las diferentes SODs presentes en extractos de hoja de las diferentes variedades: Argania fruto apuntado, Argania y Argania fruto alargado.

IV-Resultados



4.2.3.3. Detección de isoformas SOD mediante inmunoblotting

Al igual que se había realizado para semillas se continuó con el análisis varietal de SODs utilizando el anticuerpo policlonal comercial disponible frente a una Cu-Zn SOD citosólica con objeto de identificar isoformas de SODs mediante inmunoblotting. Los resultados se pueden observar en la figura 56.

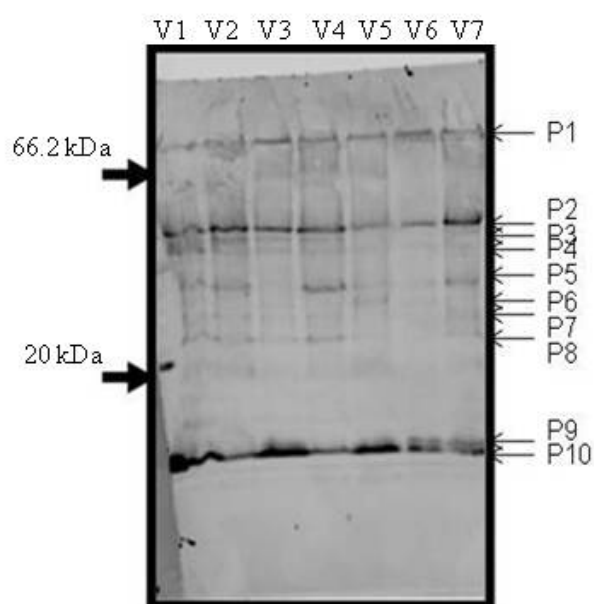


Figura 45. Inmunoblotting de extractos de proteínas de hoja de las distintas variedades utilizando un anticuerpo policlonal comercial frente a Cu-Zn SOD cloroplastídica. V1: Argania, V2: Argania árbol pequeño, V3: Argania fruto alargado, V4: Argania sin fruto, V5: Argania fruto apuntado, V6: Argania fruto grande, V7: Argania hojas pequeñas.

IV-Resultados



El inmunoblot incubado con el anticuerpo policlonal comercial frente a Cu,Zn SOD cloroplastídica muestra hasta 10 bandas reactivas (P1: 255.97 KDA, P2: 111.92 KDA, P3: 95.58 KDA, P4: 86.51 KDA, P5: 54.97 KDA, P6: 48.33 KDA, P7: 39.79 KDA, P8: 31.68 KDA, P9: 16.48 KDA y P10: 14.78 KDA). Existen pequeñas diferencias en las intensidades relativas de las distintas bandas entre las variedades. En la subespecie Argania, Argania árbol pequeño y Argania sin fruto se ven en el blot 9 bandas (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8 y P10). Las bandas correspondientes a P2 y P10 son muy intensas en todas las variedades. P5 no aparece en la variedad Argania fruto alargado, sin embargo la banda P6 es muy intensa. En las subespecies Argania fruto apuntado y Argania fruto grande no aparece la banda P8.

4.3. Análisis de la actividad esterasa en semillas de argán.

Las esterases han sido utilizadas para identificación varietal en especies como olivo. En este capítulo, iniciamos su caracterización para su posible utilización con este mismo fin en argán.

4.3.1. Ensayos espectrofotométricos de la actividad esterasa no específica en extractos de semillas

La actividad esterasa no específica se determinó *in vitro* midiendo a 405 nm la cantidad de p-nitrofenol liberado a partir de la hidrólisis del ester

IV-Resultados



butirato de p-nitrofenilo (PNB) en presencia de los extractos de semillas de acuerdo al protocolo de Purdy y Kolattukudy (1973). Para ello se realizaron estas medidas espectrofotométricas cada 30 minutos. Como era esperable, la actividad esterasa aumenta con el tiempo en las distintas muestras analizadas durante el tiempo de medición. La actividad esterasa difiere de una muestra a otra, siendo la máxima la correspondiente a *Argania fruto grande*, 0.85375, a los 120 minutos. Esa medida máxima, la hemos considerado como 100% de actividad. La actividad en las distintas muestras se clasifican de mayor a menor en el siguiente orden: *Argania fruto grande*, mezcla de Couhiya, mezcla de Agadir y *Argania hojas pequeñas*.

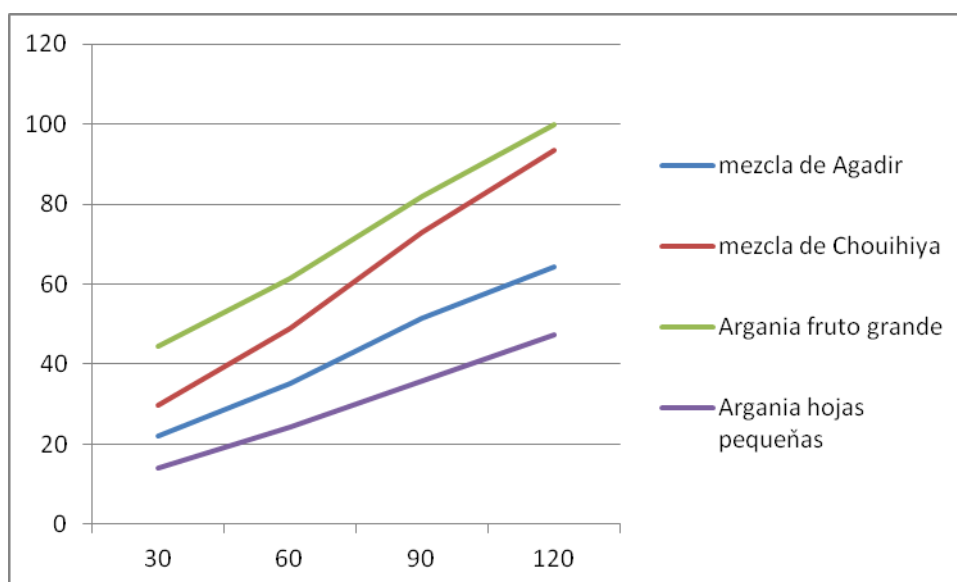


Figura 46. El gráfico representa el porcentaje de actividad esterasa (eje y) en función de los diferentes tiempos de medida (eje x) de los extractos de semillas de las variedades: mezcla de Agadir, mezcla de Chouhiya, *Argania fruto grande* y *Argania hojas pequeñas*.

IV-Resultados



4.3.2. Actividad esterasa en geles de poliacrilamida en condiciones seminativas

Se ensayó la actividad esterasa inespecífica de las distintas muestras sobre geles de poliacrilamida al 12%. El método se basa en que las esterases inespecíficas hidrolizan un éster derivado del naftaleno liberando un compuesto α -naftol que se acopla rápidamente a una sal diazoica, lo que produce un precipitado de color marrón-negrusco. Se detectaron actividades esterases como bandas de color marrón en todas las subespecies estudiadas como puede observarse en la figura 47.

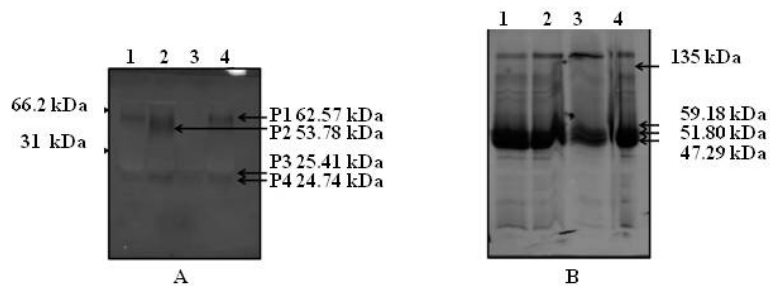


Figura 47. Actividad esterasa no específica en geles de poliacrilamida a partir de extractos de semillas de variedades de argán: 1: mezcla de Agadir, 2: mezcla de la región de Chouhiya, 3: Argania hojas pequeñas, 4: Argania fruto grande. [A] Perfil electroforético de la actividad esterasa NE. [B]: SDS PAGE paralelo teñido con azul Coomassie.

Se detectaron hasta 4 bandas diferentes con actividad esterasa positiva a las que hemos denominado P1, P2, P3 y P4 en orden creciente de peso

IV-Resultados



molecular, con los siguientes pesos moleculares aproximados de 62.57 KDa (P1) y de 53.78 KDa (P2). Las bandas P3 y P4 tienen un peso molecular aproximadamente de 25.41 y 24.74 KDa respectivamente. La mezcla de Agadir (SA) presenta tres bandas proteicas con actividad esterasa P1, P3 y P4, La mezcla de Chouhiya, 3 bandas correspondientes a P2, P3 y P4, con una señal fuerte en las bandas P3 y P4. La subespecie *Argania* hojas pequeñas 2 bandas, P3 y P4. Para la subespecie *Argania* fruto grande, la actividad esterasa se expresa a nivel de las bandas P1, P3 y P4.

A continuación se procedió al análisis densitométrico de las bandas para cada una de las variedades, cuyo resultado se puede ver en la figura 48.

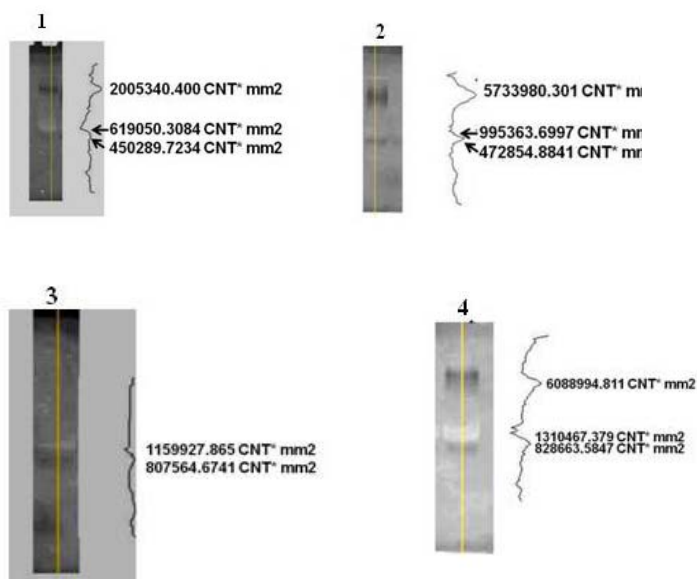


Figura 48. Análisis densitométrico de las bandas con actividad esterasa en geles de poliacrilamida al 12% de extractos de semillas de las variedades: *Argania* mezcla de

IV-Resultados



Agadir (1), Argania mezcla de Chouhiya (2), Argania hojas pequeñas (3) y Argania fruto grande (4).

4.4. Proteínas de almacenamiento en semillas de argán

Debido a su gran importancia desde el punto de vista nutricional del contenido proteico de las semillas, se procedió al estudio de las proteínas de almacenamiento en el argán, principalmente las 11S ya que son mayoritarias en muchas especies.

4.4.1. Análisis de la solubilidad de las proteínas de almacenamiento de las semillas de argán.

La clasificación general de las proteínas de almacenamiento de todas las especies se basa en su diferente solubilidad en distintas soluciones. Para caracterizar las proteínas de almacenamiento en la semilla de argán, primero se separaron en la semilla el cotiledón y el endospermo, y a partir de ellos las proteínas fueron extraídas con diferentes soluciones de extracción: agua destilada, 0.5 M NaCl, 2-isopropanol, 70% (v/v) de ácido acético, 0.1 M NaOH y 0.1 M de borato sódico pH 10, 1% de SDS (w/v) y 50 mM DTT. Los diferentes extractos obtenidos fueron sometidos a SDS-PAGE en condiciones reductoras. Los resultados son visibles en la figura 49. Muchas proteínas son extraídas con agua o solución salina, por lo que podríamos clasificarlas como

IV-Resultados



globulinas y albúminas respectivamente, sin embargo perfiles similares se observan en medio ácido y entonces se corresponderían con glutelinas y el tampón 0.1 M de borato sódico pH 10, 1% de SDS (w/v) y 50 mM DTT. No aparecen bandas de proteínas ni cuando se extrae con isopropanol ni con álcalix. Los perfiles de las proteínas de almacenamiento del cotiledón y del endospermo son similares.

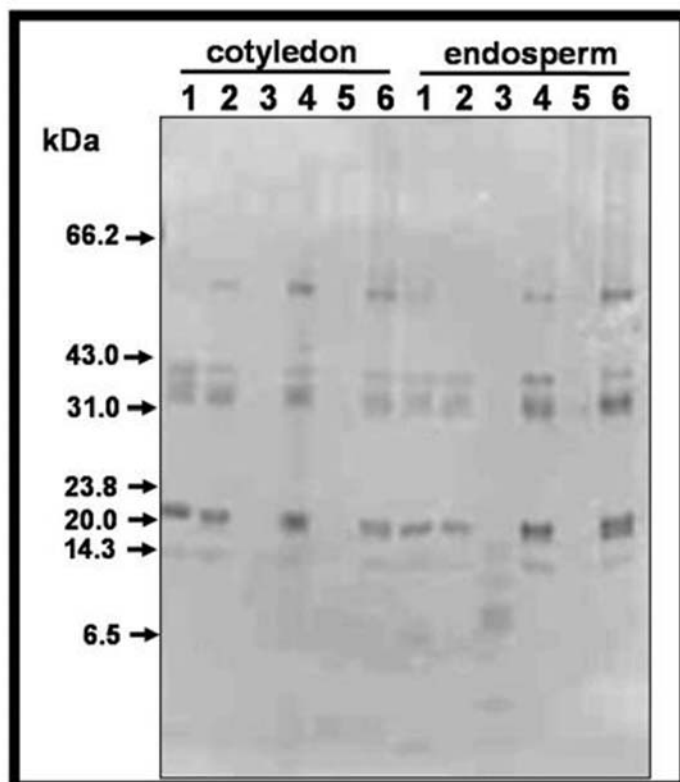


Figura 49. Solubilidad de las proteínas de almacenamiento de cotiledón y endospermo de *Argania spinosa L.*, en diferentes soluciones. SDS-PAGE en condiciones reductoras, gel teñido con Coomassie. Soluciones empleadas: agua destilada (1), 0.5 M NaCl (2), 2-

IV-Resultados



isopropanol (3), 70% (v/v) de ácido acético (4), 0.1 M NaOH (5) y 0.1 M de borato sódico pH 10, 1% de SDS (w/v) y 50 mM DTT (6).

4.4.2. Análisis bioquímico de las proteínas 11 S en la semilla de argán

Para el estudio de las proteínas 11S en las semillas de argán, a partir del extracto crudo, las proteínas fueron separadas electroforéticamente mediante SDS- PAGE bajo condiciones reductoras y bajo condiciones no reductoras. Los blots fueron incubados posteriormente con el anticuerpo primario de proteínas de almacenamiento tipo 11 S de olivo (*Olea europea* L.) denominado P1 disponible en el grupo. Los resultados son visibles en la figura 50.

SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, mostró tres polipéptidos a los que hemos denominado Pro1, Pro2 y Pro3 (figura 50A, línea 1) que fueron reconocidos por el anticuerpo en un blot paralelo (figura 50B, línea 1). Los geles SDS-PAGE en condiciones reductoras mostraron 6 polipéptidos a los que hemos denominado P1, P2, P3, P4, P5 y P6 (figura 50A, línea 2). Todos estos péptidos, excepto el P6, fueron reconocidos por el anticuerpo en el blot correspondiente (figura 50B, línea 2), aunque la señal para P5 fue muy débil.

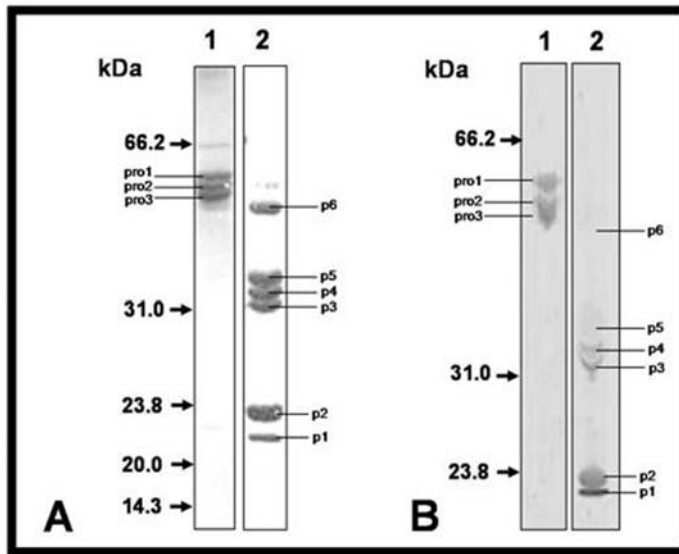


Figura 50. Separaciones electroforéticas de proteínas de almacenamiento de semillas de Argan. (A) Geles teñidos con Coomassie, línea 1: SDS-PAGE a partir del extracto bajo condiciones no reductoras, línea 2: SDS-PAGE bajo condiciones reductoras. (B) Blots equivalentes a los anteriores, incubados con el anticuerpo P1 frente a globulinas 11S, línea 1: bajo condiciones no reductoras, línea 2: bajo condiciones reductoras.

4.4.3. Purificación de componentes individuales de las proteínas 11S en la semilla de argán

Los diferentes componentes individuales de las proteínas 11S fueron purificadas mediante electroforesis secuencial a partir de las diferentes bandas escindidas del SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras del extracto crudo. Esas bandas fueron resueltas posteriormente mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras y reductoras. Los resultados bajo condiciones no reductoras pueden observarse en la figura 51.

IV-Resultados

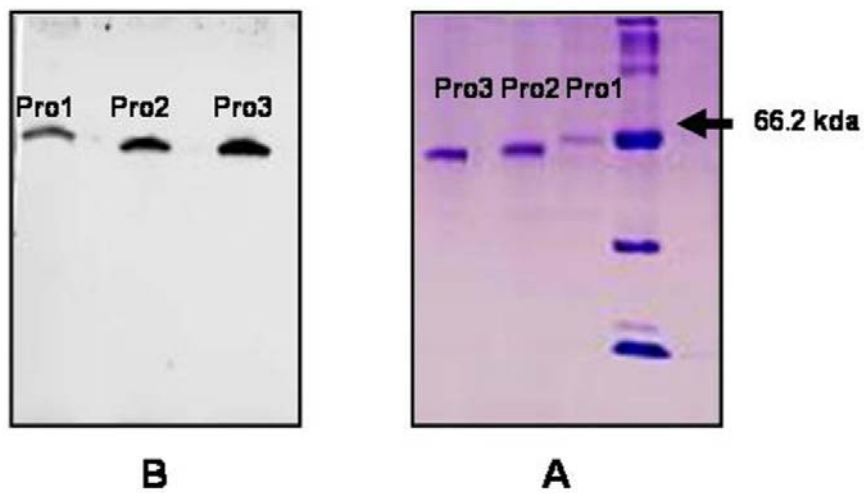


Figura 51. SDS- PAGE bajo condiciones no reductoras de las 3 bandas purificadas pro1, pro2 y pro3 de proteínas 11 S de semillas maduras (A) gel teñido con Coomassie, (B) blot paralelo incubado con el anticuerpo P1.

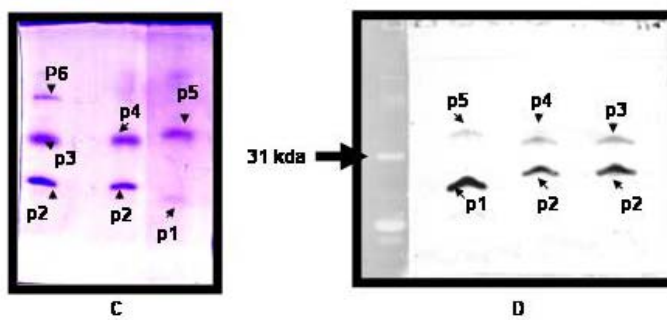


Figura 52. SDS- PAGE bajo condiciones reductoras de las 3 bandas purificadas pro1, pro2 y pro3 de proteínas 11 S extraídas de semillas maduras (A) gel teñido con Coomassie, (B) blot correspondiente incubado con el anticuerpo P1.

IV-Resultados



Los resultados de la separación mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras de las bandas escindidas se observan en la figura 52.

Forma precursora	Péptidos que lo integran
Pro 1 (62.18 kDa)	p1 (20.21 kDa)
	p5 (40.67 kDa)
Pro 2 (57.40 kDa)	p2 (22.83 kDa)
	p3 (34.12 kDa)
Pro 3 (52.76 kDa)	p2 (22.83 kDa)
	p4 (36.74 kDa)

Tabla 11. Las formas precursoras de las proteínas de almacenamiento 11S de la semilla de *Argania spinosa* L. y los péptidos que lo integran (P1, P2, P3, P4 y P5).

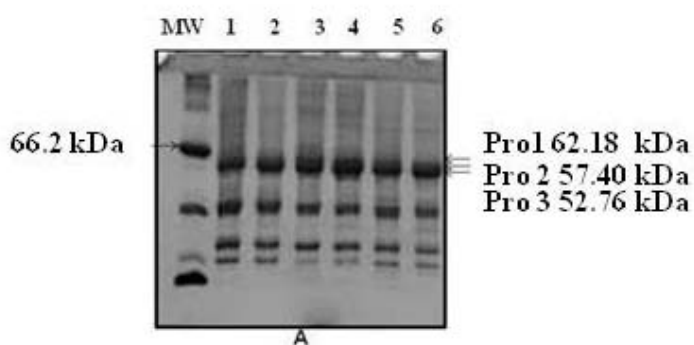
A partir de la banda correspondiente a Pro1 se obtuvieron dos péptidos p1 y p5, a partir de la banda Pro 2, los péptidos p2 y p3 y a partir de Pro3, los péptidos p2 y p4. Las formas precursoras y los péptidos que lo integran y sus pesos moleculares, están también recogidos en la tabla 11.

IV-Resultados



4.4.4. Identificación varietal en base a las proteínas 11S de semillas de argán

Con objeto de analizar la posible utilización de las proteínas 11S para la identificación varietal en argán, se analizaron las proteínas 11 S mediante separaciones electroforéticas bajo condiciones reductoras y no reductoras a partir de extractos de semillas de las diferentes variedades utilizadas en los estudios pomológicos, exceptuando Argania sin fruto, del que no se disponen de semillas. Los resultados están recogidos en la figura 53.



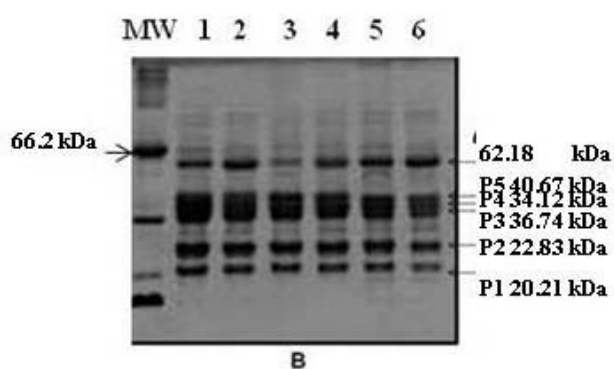


Figura 53. Análisis varietal de las proteínas 11S de las semillas de argán, geles teñidos con Coomassie. (A) SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras (B) SDS-PAGE bajo condiciones reductoras. Variedades estudiadas: Argania (1), Argania árbol pequeño (2), Argania fruto alargado (3) Argania fruto grande (4), Argania hojas pequeñas (5) y Argania fruto apuntado (6)

No se encontraron diferencias significativas en relación a la presencia de proteínas 11S de semillas entre las diferentes variedades, ni bajo condiciones reductoras ni bajo condiciones no reductoras.

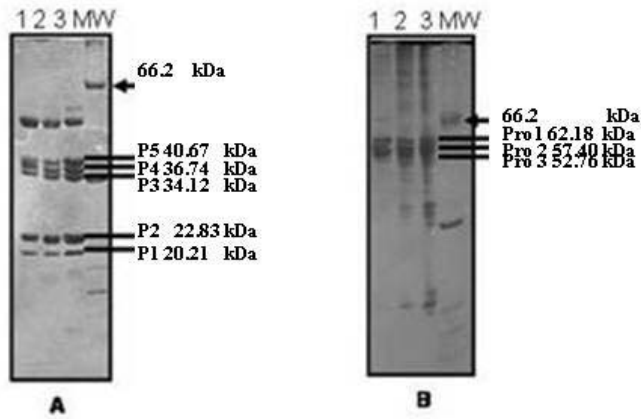
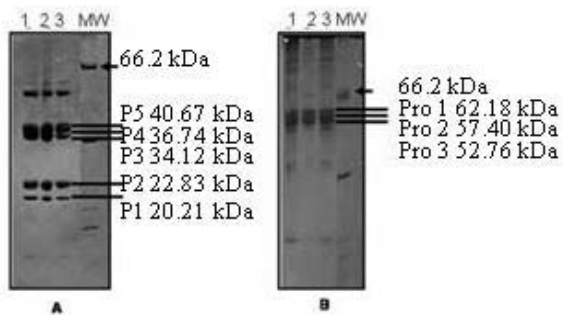


Figura 54. Análisis varietal de las proteínas 11S del cotiledón de semillas de argán, geles teñidos con Coomassie, (A) SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras. (B) SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras. Variedades analizadas: Argania hojas pequeñas (1), Argania fruto grande (2) y Argania (3).



IV-Resultados



Figura 55. Análisis varietal de las proteínas 11S del endospermo de semillas de argán, geles teñidos con Coomassie, (A) SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras. (B) SDS-PAGE bajo condiciones reductoras. Variedades analizadas: Argania hojas pequeñas (1), Argania fruto grande (2) y Argania (3).

También se analizó si existía alguna diferencia entre las proteínas 11S presentes en el endospermo y en el cotiledón en tres de las anteriores variedades: Argania, Argania fruto grande y Argania hojas pequeñas. Como se puede observar en los perfiles proteicos del cotiledón (figura 54) y del endospermo (figura 55) y en sus correspondientes blots (figura 56) obtenidos bajo condiciones no reductoras y reductoras y no muestran diferencias entre distintas variedades. Todas las formas precursoras descritas anteriores como los péptidos que las integran, están presentes tanto en el cotiledón como en el endospermo de estas 3 variedades.

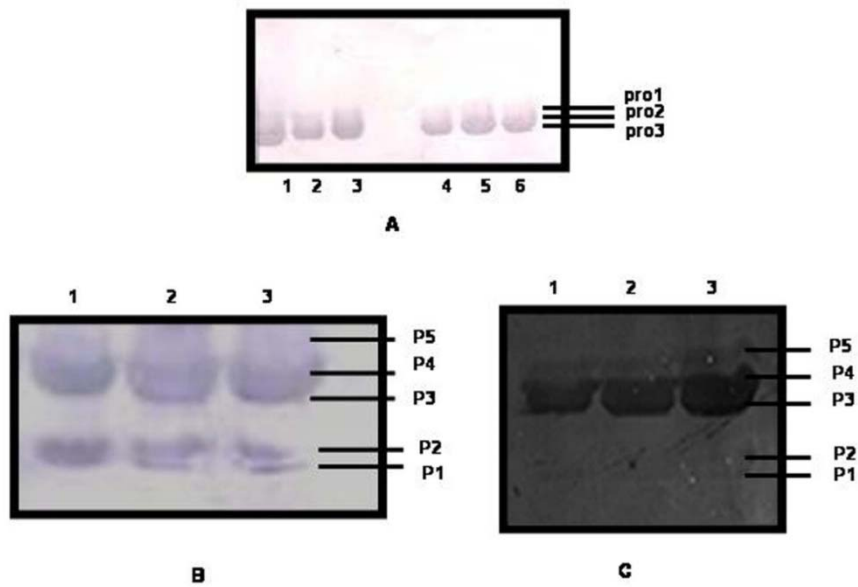


Figura 56. Blots de proteínas 11S utilizando anticuerpo P1 de muestras de proteínas del cotiledón y del endospermo de las variedades Argania (1), Argania hojas pequeñas (2) y Argania fruto grande (3) obtenidos a partir de geles SDS-PAGE (A) en condiciones no reductoras (cotiledón (1, 2 y 3) y del endospermo (4, 5 y 6)), (B) en condiciones reductoras de las muestras del cotiledón y en condiciones reductoras del endospermo (C).

4.4.5. Detección de proteínas en semillas durante la maduración de la semilla de argán.

Siguiendo con nuestro estudio de las proteínas de almacenamiento en las semillas de argán y debido a la importancia del uso de las semillas de argán para alimentación del ganado, se estudió la acumulación de proteínas y lípidos durante el proceso de maduración de la semilla, tanto

IV-Resultados

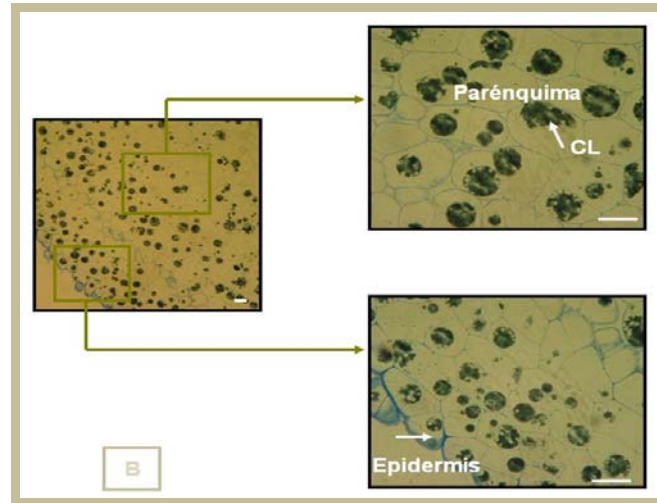
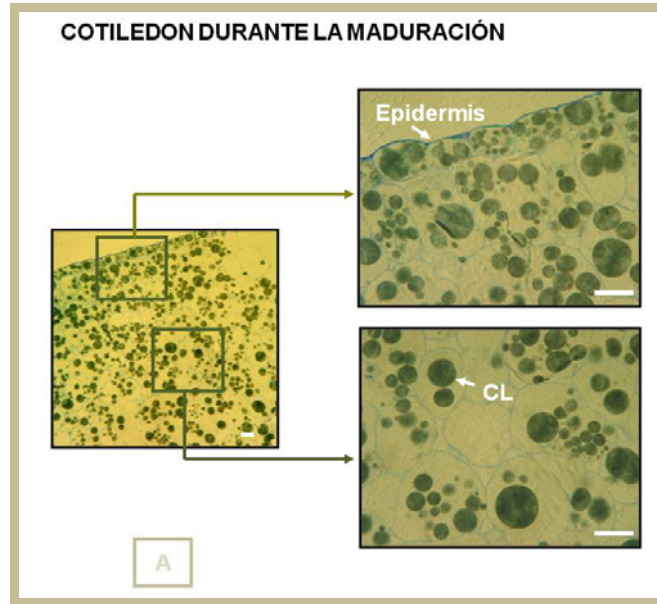


en el cotiledón como en el endospermo. Para la detección de proteínas se utilizó una tinción con azul de metileno/toluidina. Para el estudio a lo largo del proceso de maduración de la semilla se definieron claramente 4 estadios de desarrollo. Los resultados están recogidos en las figuras 57 y 58.

No es hasta el estadio III que se pueden observar pequeños cuerpos proteicos en el cotiledón. Estos están presentes únicamente en las células parenquimáticas, son pequeños y aparecen intensamente teñidos de azul (Fig. 57C). Los cuerpos proteicos se hacen mucho más abundantes en el estadio 4, y en este estadio los encontramos presentes en las células parenquimáticas sobretodo pero también en la epidermis, donde aparecen como cuerpos teñidos de azul, de diferente tamaño.

Utilizando la tinción con azul de metileno/toluidina que no es específica de lípidos, se pueden observar ya desde el estadio I abundantes cuerpos lipídicos en el cotiledón, tanto en las células parenquimáticas como en la epidermis. Posteriormente en el estadio II los cuerpos proteicos parecen menos abundantes, aumentando de nuevo en el estadio III, pero sobretodo, están presentes en una gran cantidad en el estadio IV.

En cuanto al endospermo, los resultados son similares, aunque los cuerpos proteicos son un poco menos abundantes en comparación con el cotiledón. También se observan abundantes cuerpos lipídicos, al igual que ocurría en el cotiledón.



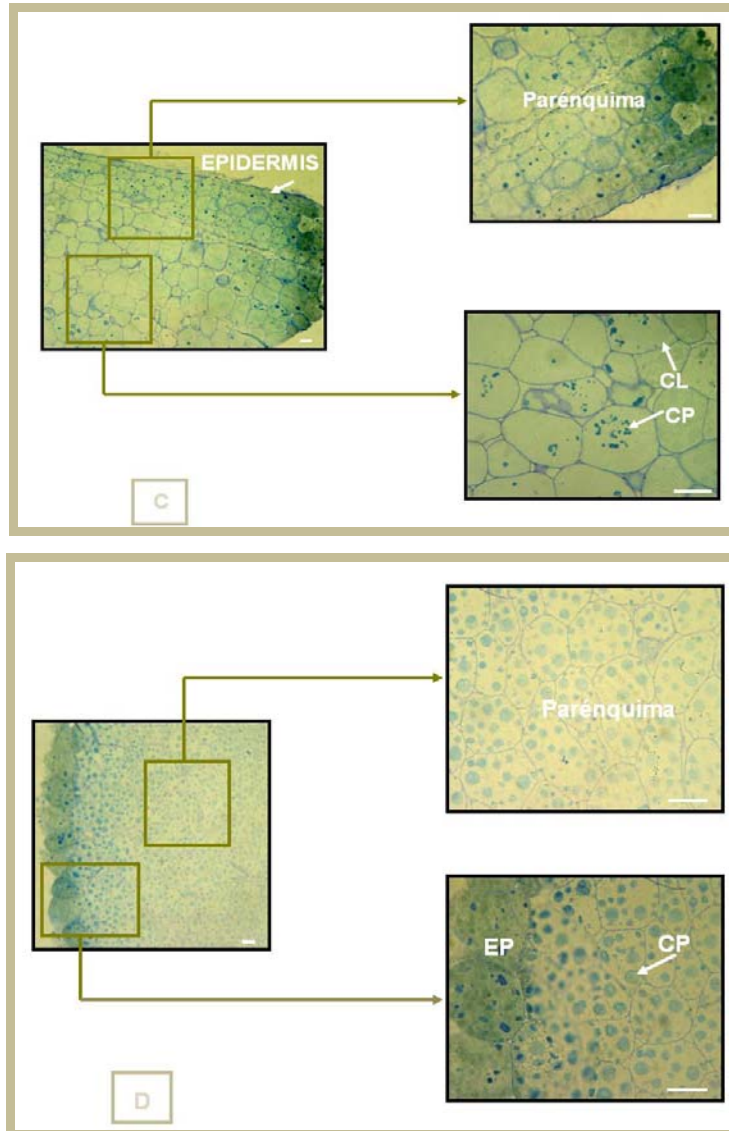
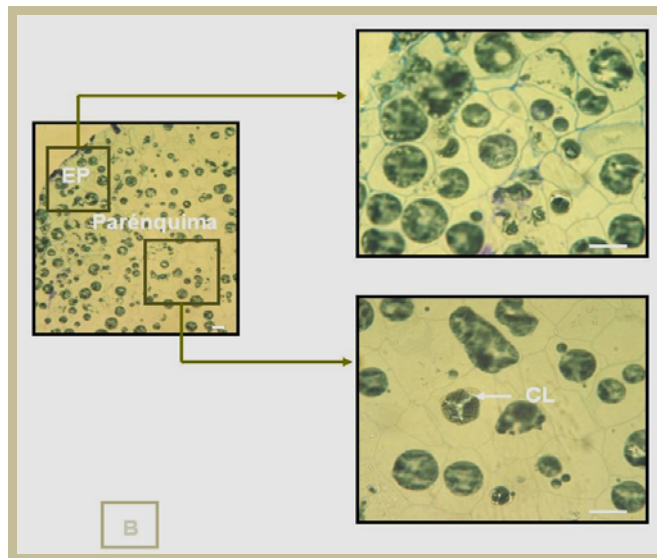
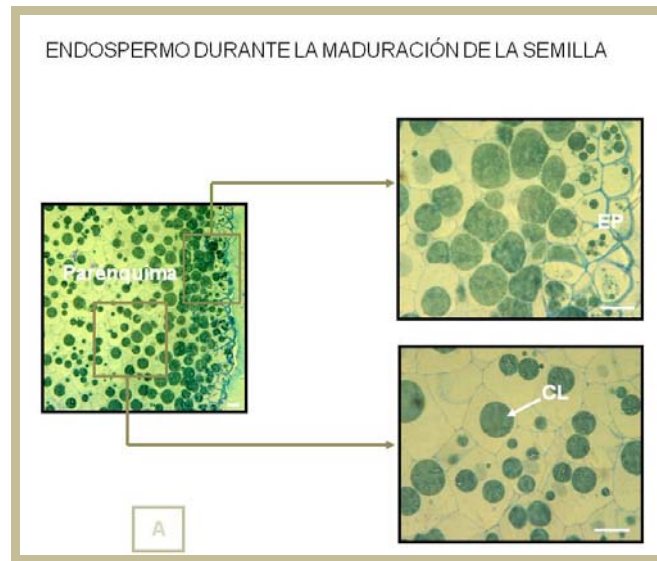


Figura 57. Detección de proteínas en el cotiledón durante la maduración de la semilla sobre cortes teñidos con Azul de metileno/ toluidina. A: estadio I, B: estadio II, C: estadio III, D: estadio IV. CP: cuerpos proteicos, CL: cuerpos lipídicos. EP: epidermis.



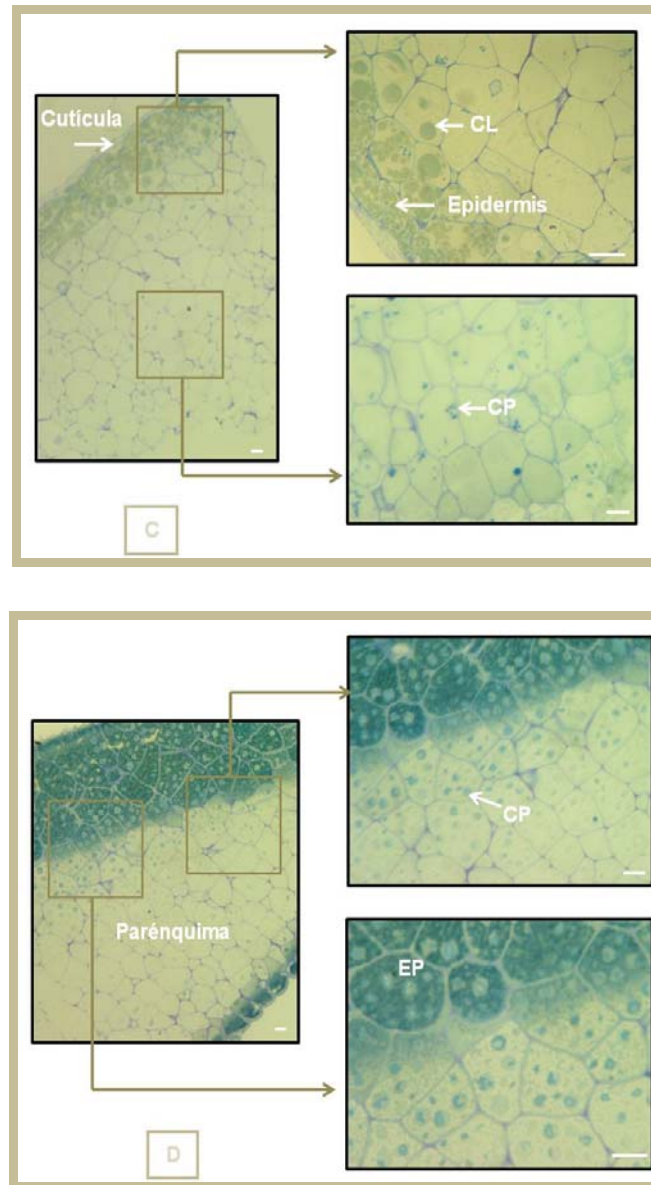


Figura 58. Detección de proteínas del endospermo durante la maduración de la semilla mediante tinción con azul de metileno/toluidina. A: estadio I, B: estadio II, C: estadio III, D: estadio IV. CP: cuerpos proteicos, CL: cuerpos lipídicos. EP: epidermis.

IV-Resultados



4.5. Análisis de aceite de argán: composición en ácidos grasos, esteroides y capacidad antioxidante

Debido a la alta importancia económica del aceite de argán se procedió al análisis de la composición de 3 muestras de aceite de 3 regiones bien alejadas geográficamente (Agadir; Essaouira y Chouhiya).

Los resultados obtenidos se encuentran en la tabla 12 donde se observan diferencias claras en la capacidad antioxidante de los aceites de diferentes localizaciones geográficas. El índice de peróxidos es superior a 25 meq O₂/Kg en las fracciones de aceite de Chouhiya y Essaouira. La absorción de ultra violeta a $\lambda=270$ nm y $\lambda=232$ nm es muy superior en la fracción de Essaouira en comparación con las fracciones de Agadir y Chouhiya.

El análisis de esteroides en las muestras de aceite de argán (tabla 13), mostró un bajo contenido en colesterol en las muestras de aceite de las 3 localizaciones: Agadir (0.1 %), Chouhiya (0.3%) y Essaouira (0.2 %). Los esteroides más abundantes en todas las muestras, presente en porcentajes por encima del 35%, fueron el β sitosterol, destacando sobretodo en la muestra de Essaouira (43.6%) y el Δ^7 -Estigmasterol principalmente en las fracciones de Chouhiya y Agadir (49.5% y 47.3% respectivamente). Las fracciones de Chouhiya y Agadir no contienen 24-metileno-colesterol, mientras que la fracción de Essaouira contiene un 0.2%. No se encontró tocoferol alfa, beta ni gamma ni en la muestra de

IV-Resultados



Chouhiya ni en la Essaouira. Y en esta última no se detectó tampoco tocoferol Δ . Se aprecia también un porcentaje inferior de Δ^7 -avenasterol en la fracción de Essaouira.

El análisis de la composición en ácidos grasos (tabla 14) mostró un porcentaje muy importante de ácido oleico (C18:1) (por encima del 40%) y ácido linoleico (C 18:2) (alrededor del 35%) en las tres muestras. El ácido linolénico (C18:3) aunque minoritario presenta en la fracción de Essaouira el porcentaje más alto, siendo este del 0.8%.

	Chouhiya (Provincia de Berkane)	Agadir	Essaouira
Índice de peróxidos	> 25.0 meq O ₂ /Kg	5.2 meq O ₂ /Kg	> 25.0 meq O ₂ /Kg
Absorción al ultravioleta K λ 270	0.24	0.34	0.42
Absorción al ultra violeta K λ 232	3.01	2.54	5.83
F(K)= F (K266, K270, K274)	0.01	0.02	0.03

Tabla 12. Propiedades antioxidantes de muestras de aceite de argán de las tres regiones alejadas geográficamente.

IV-Resultados



Composición en esteroides	Chouihya (Provincia de Berkane)	Agadir	Essaouira
Colesterol	0.3%	0.1%	0.2%
Brassicasterol	<0.1%	<0.1%	<0.1%
24-Metilencolesterol	-	-	0.2%
Campesterol	0.4%	0.5%	5.3%
Campestanol	0.3%	0.1%	0.4%
A.Behenico C:22	0.1%	0.1%	0.2%
A.Lignocericico C:24	<0.1%	0.1%	0.1%
α Tocoferol		10.7 mg/Kg	
β -Tocoferol		-	
γ Tocoferol		327.4 mg/Kg	
Δ Tocoferol Eritrodiol + UVAOL	2.6%	25.1 mg/Kg (2.2%)	
Estigmasterol	0.2%	0.1%	5%
Δ 7- Campesterol	1.4%	2.1%	1.1%
Δ 5,23- Estigmastadienol	1.2%	1.3%	1.1%
Clerosterol	0.8%	1.1%	0.9%
β sitosterol	36.6%	37.7%	43.6%
Sitostanol	0.5%	0.6%	0.8%

IV-Resultados



Δ 5- Avenasterol	2.3%	2.6%	1.8%
Δ 5,24- Estigmastadienol	1.3%	1.7%	1.2%
Δ 7- Estigmastenol	49.5%	47.3%	35.1%
Δ 7- Avenasterol	5.3%	4.7%	3.4%
Beta sitosterol Aparente	42.6%	44.9%	49.3% Δ

Tabla 13. Composición en esteroides de muestras de aceite de argán de las tres regiones alejadas geográficamente.

Composición en Ácidos grasos	Chouhiya (Provincia de Berkane)	Agadir	Essaouira
A. Láurico C12	-	-	-
A. Mirístico C14	0.2%	<0.02%	0.1%
A. Palmítico C16	12.4%	12%	12.8%
A. Palmitoleico C16:1	0.1%	0.1%	0.1%
A. Margárico C17	0.1%	0.1%	0.1%
A. Margaroleico C17:1	<0.1%	<0.1%	<0.1%
A. Esteárico C18	6.2%	5.4%	6.1%
A. Oleico C18:1	44.7%	45.8%	42.5%
A. Linoleico C18:2	35.4%	35.8%	36.5%

IV-Resultados



A. Linolénico C18: 3	0.2%	0.1%	0.8%
A. Araquico C:20	0.3%	0.4%	0.5%
A. Gadoleico C20:1	0.3%	0.3%	0.3%

Tabla 14. Composición en ácidos grasos de muestras de aceite de argán de las tres regiones alejadas

4.6. Optimización de métodos de cultivo in vitro de argán para favorecer su propagación en la Naturaleza

Con objeto de optimizar las condiciones de cultivo de argán, hemos utilizados diferentes métodos y condiciones de cultivo *ex -vitro* e *in vitro*

4.6.1. Germinación *ex-vitro* de las semillas

Para los ensayos de germinación *ex-vitro* se utilizaron diferentes tratamientos previos de las semillas:

- escarificar mecánicamente las semillas a nivel del micropilo,
- sumergir las semillas en lejía al 40% durante 4 días,
- sumergir las semillas en una solución de KNO₃ al 0.1% durante 4 días,

El seguimiento de la germinación de las semillas en los semilleros fue controlado diariamente, los resultados pueden observarse en la figura 59.

IV-Resultados

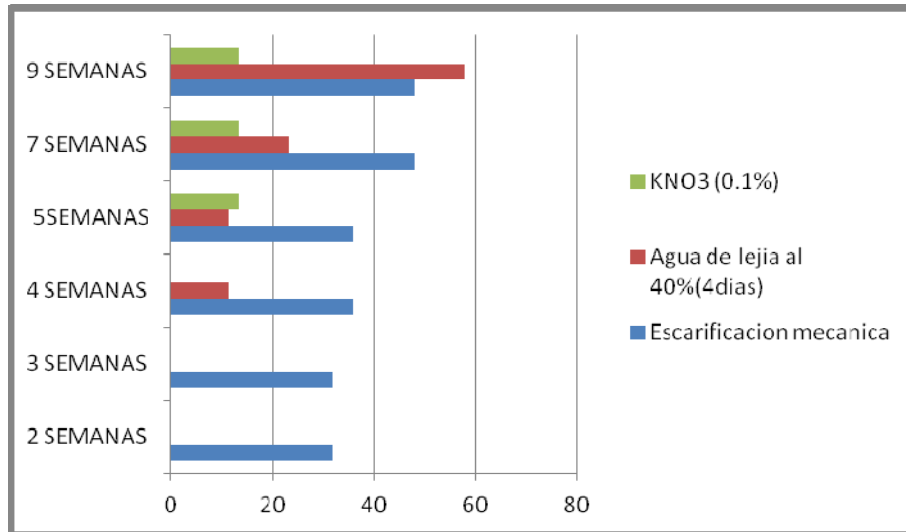


Figura 59. Porcentaje de semillas germinadas *ex vitro* de las semillas de argán (*Argania spinosa* L.) tras diferentes tratamientos: tratadas con agua de lejía al 40%, nitrato de potasio al 0.1% o escarificadas al nivel del micrópilo.

Tras 2 semanas, el 30% de las semillas escarificadas y tratadas con agua ya estaban germinadas. El porcentaje subió lentamente hasta la semana 9 en la que se consiguió un 48% de germinación. Hasta 4 semanas después no empezaron a germinar las semillas tratadas con agua de lejía. Sin embargo, se alcanzó un porcentaje del 60% de germinación tras 9 semanas. En el caso de las semillas tratadas con KNO₃ no fue hasta después de 5 semanas que las semillas germinaron y el porcentaje de germinación fue muy bajo, del 15% y no se incrementó con el tiempo de cultivo.

IV-Resultados



4.6.2. Germinación *in vitro* de las semillas

En los ensayos de cultivo *in vitro*, las semillas de argán fueron escarificadas y esterilizadas para después ser cultivadas en dos medios de cultivo diferente, el medio MS y un medio MS modificado en el que se habían incorporado menos sales, en concreto se había la mitad de macronutrientes al que denominamos MS/2.

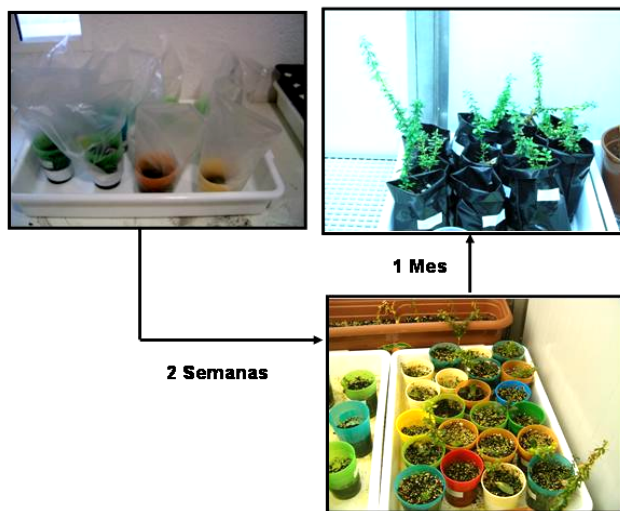


Figura 60. Semillas de argán cultivadas en un medio de Murashige y Skoog durante 15 días y transferidas a semilleros.

Los porcentajes de germinación pueden observarse en las figuras 61 y 62. La germinación empezó a los 3 días de cultivo en los dos medios, MS y MS/2. Sin embargo el porcentaje de germinación en el medio MS/2 fue mayor (44%) que en el medio MS (25%).

IV-Resultados

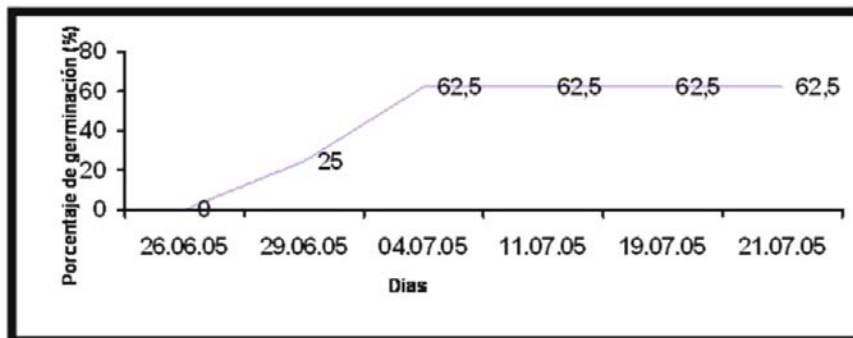


Figura 61. Porcentaje de germinación de la semilla de argán cultivada en el medio de Murashige y Skoog.



Figura 62. Porcentaje de germinación de la semilla de argán cultivada en un medio de Murashige y Skoog y Murashige y Skoog reducido en sales.

Además, cuando se utilizó el medio MS/2 se observó un mejor estado vegetativo de la plántula y un mayor crecimiento. El seguimiento del proceso se puede observar en la figura 63.



Figura 63. Evolución macroscópica de la germinación de las semillas cultivadas en A) un medio de Murashige & Skoog y B) en un medio de Murashige & Skoog reducido en sales.

Tras la puesta en cultivo se realizó un seguimiento del desarrollo de la radícula y el cotiledón en su longitud, así como del grosor del cotiledón. Las imágenes fueron analizadas mediante el software “Análisis Doc”. Los resultados pueden observarse en la figura 64. Los resultados

IV-Resultados



muestran una mayor longitud de la radícula y grosor del cotiledón cuando se utiliza el medio MS reducido en sales.

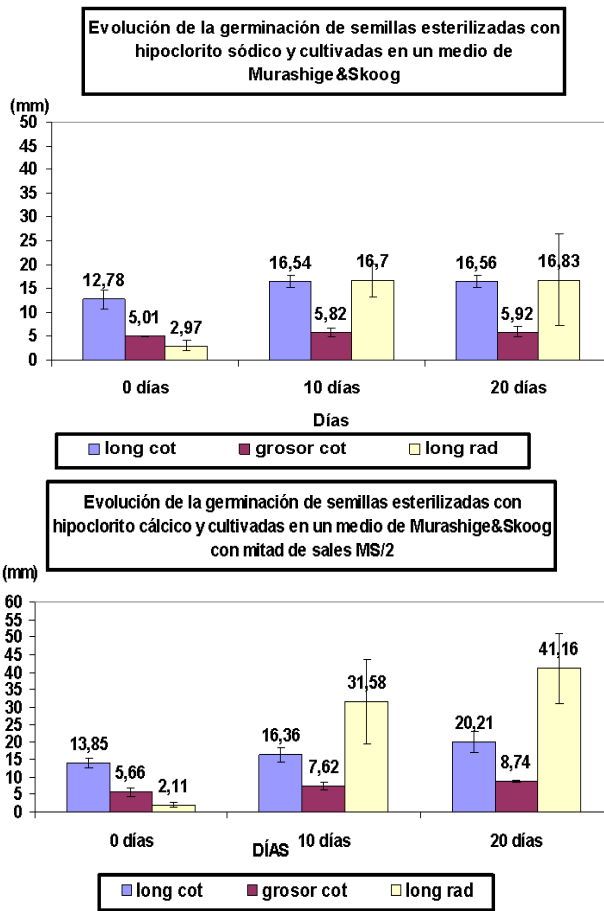


Figura 64. Gráficos de la evolución de la longitud de la radícula y de la longitud y el grosor del cotiledón durante la germinación *in vitro* de las semillas de argán en un medio de Murashige & Skoog y B) en un medio de Murashige & Skoog reducido en sales.

IV-Resultados



4.6.3. Efecto de la adición de hormonas al medio de cultivo.

Para optimizar las condiciones de germinación *in vitro*, realizamos 2 ensayos independientes en los que incorporamos distintas hormonas al medio de cultivo:

1. Giberelinas (Acido giberélico, GA₃)
2. Combinación de acido naftalenacético (ANA), una auxina sintética y Bencil amino Purina (BAP), una citoquinina sintética.

4.6.3.1. Adición de giberelinas.

La germinación empezó tras de 3 días de cultivo, como se puede apreciar en la figura 65. Las plántulas presentaban un buen estado vegetativo aunque crecían anormalmente en longitud. Como se puede observar tras 23 días de cultivo, presentaban un tallo más largo.

IV-Resultados

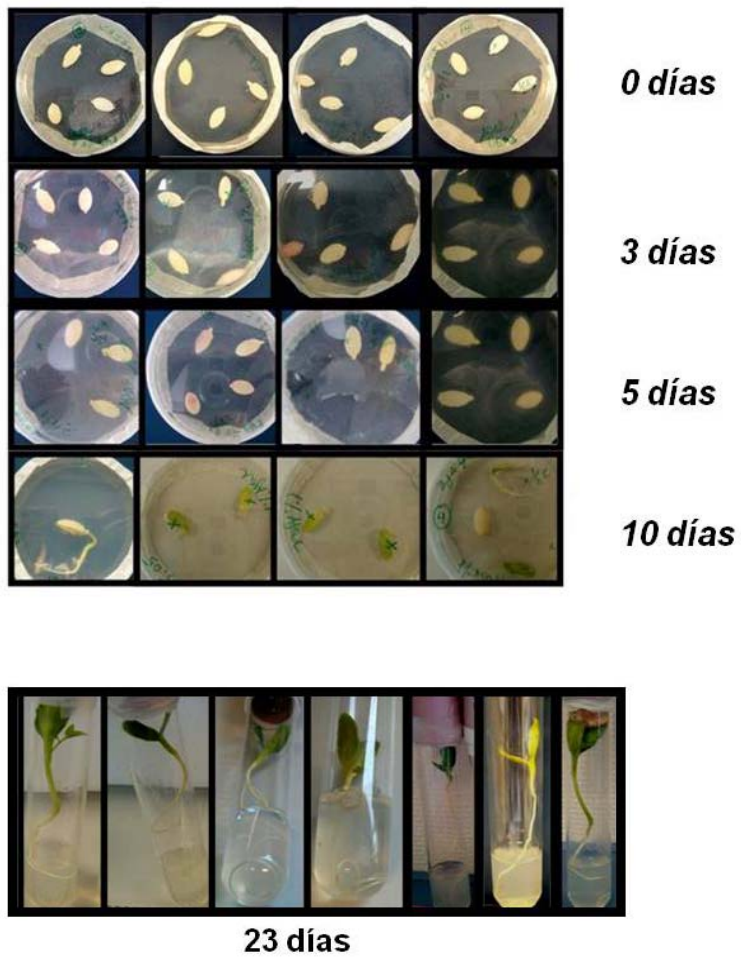


Figura 65. Semillas de *Argania spinosa* L. germinadas en un medio de cultivo *in vitro* que contiene 1% de Agar y 8.67 μ M de giberelina (GA_3).

IV-Resultados



4.6.3.2. Efecto de ANA y BAP

Cuando las semillas/embriones se cultivaron en un medio con estas dos hormonas, se produjo un desarrollo de raíces apreciable, acompañado de un mayor desarrollo de raíces secundarias. Los resultados se muestran en la figura 66.



Figura 66. Plántulas de *Argania spinosa* L. Cultivadas *in vitro* en un medio con hormonas (ANA (20%) y BAP (80%)) a una concentración final de 5 mg/ml.

IV-Resultados



4.6.3.3. Efecto de la imbibición

También se realizó un ensayo de imbibición previa a la germinación. Para ello las semillas fueron imbibidas en agua y posteriormente cultivadas *in vitro*. La germinación empezó después de 5 días de cultivo. Las plántulas presentaban un buen estado vegetativo. Los resultados se muestran en la figura 67.

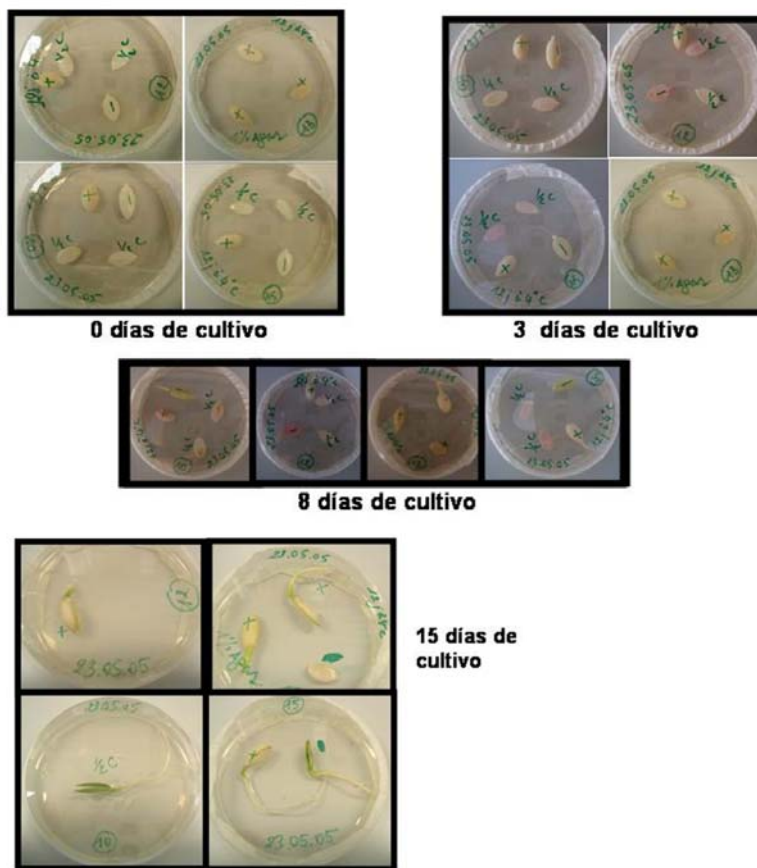


Figura 67. Semillas cultivadas *in vitro* después de una imbibición con agua.

IV-Resultados



4.6.3.4. Efecto del frío

Se ensayó también el efecto de un pretratamiento con frío de las semillas sobre su capacidad de germinación. En este caso, la germinación comenzó tras 3 días de cultivo. En las semillas cultivadas sin endospermo se aprecia una mayor germinación en comparación con las semillas cultivadas con endospermo. Los resultados se muestran en la figura 68.



3 días de cultivo



8 días de cultivo

IV-Resultados

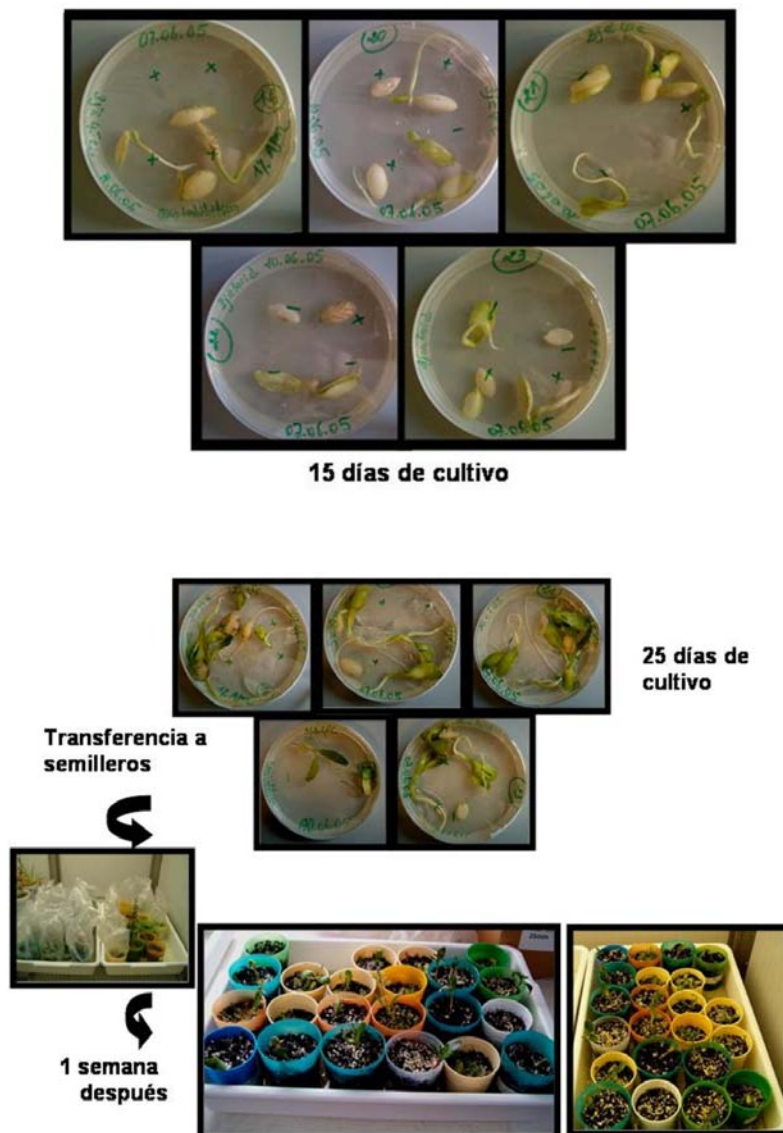


Figura 68. Semillas cultivadas *in vitro* después de un tratamiento de 3 días a 4° C.

IV-Resultados



4.6.4. Análisis macroscópico, citológico del proceso de germinación *in vitro*

Para conocer mejor el proceso de germinación *in vitro*, se realizó primero un análisis macroscópico del proceso, que fue completado con un análisis histológico y citológico mediante microscopía óptica para determinar los cambios histológicos y celulares a nivel del cotiledón y la radícula.

En la figura 69 se puede observar a nivel macroscópico, la semilla de argán.



Figura 69. Fotos de semilla entera, semilla sin tegumento, endospermo y cotiledón de *Argania spinosa* L. La barra representa 1 cm.

Este material de partida, los embriones a tiempo 0, es decir previamente a su cultivo *in vitro* (figuras 70 y 71) fueron estudiados a nivel histológico, para ver posteriormente los cambios que se producían durante el proceso de germinación. Para su estudio se diseccionaron

IV-Resultados



cotiledón y endospermo, que fueron incluidos y estudiados independientemente.

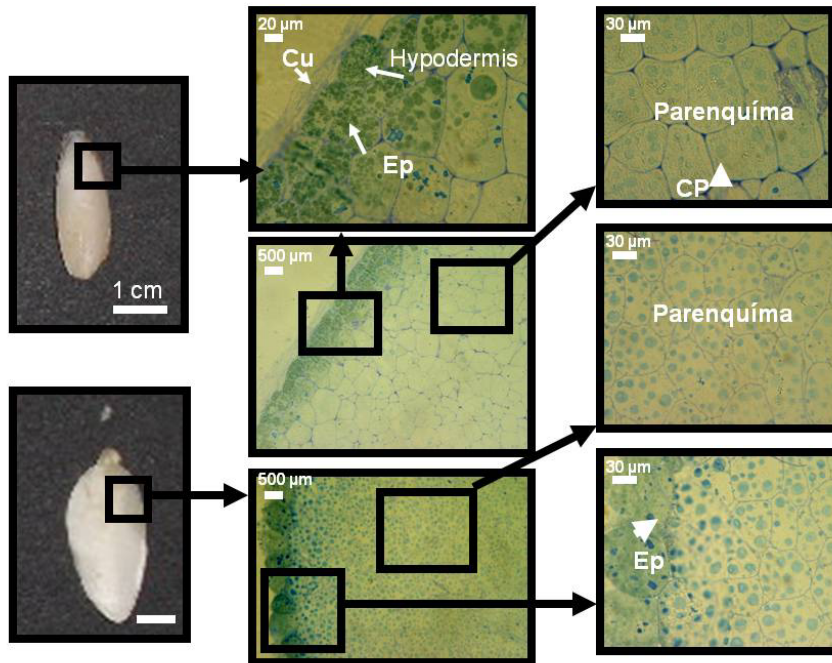


Figura 70. Cortes transversales del endospermo (foto de arriba) y cotiledón (foto de abajo) de 1 µm, teñidos con azul de toluidina/ azul de metileno. Cu: cutícula, Ep: epidermis.

En el endospermo se pueden diferenciar diferentes tejidos, desde el exterior al interior se observa la cubierta, la epidermis, la hipodermis y un tejido parenquimatoso. La epidermis está formada por una capa doble de células alargadas. Las células del tejido equivalente al parénquima, precursoras de los demás tejidos, están muy poco diferenciadas y

IV-Resultados



presentan una forma alargada y abundancia de diferente tamaño que por su tinción positiva parecen cuerpos de naturaleza proteica.

En el cotiledón se distinguen una epidermis que en este caso es una monocapa y un tejido parenquimatoso igualmente cargado de cuerpos de naturaleza proteica.

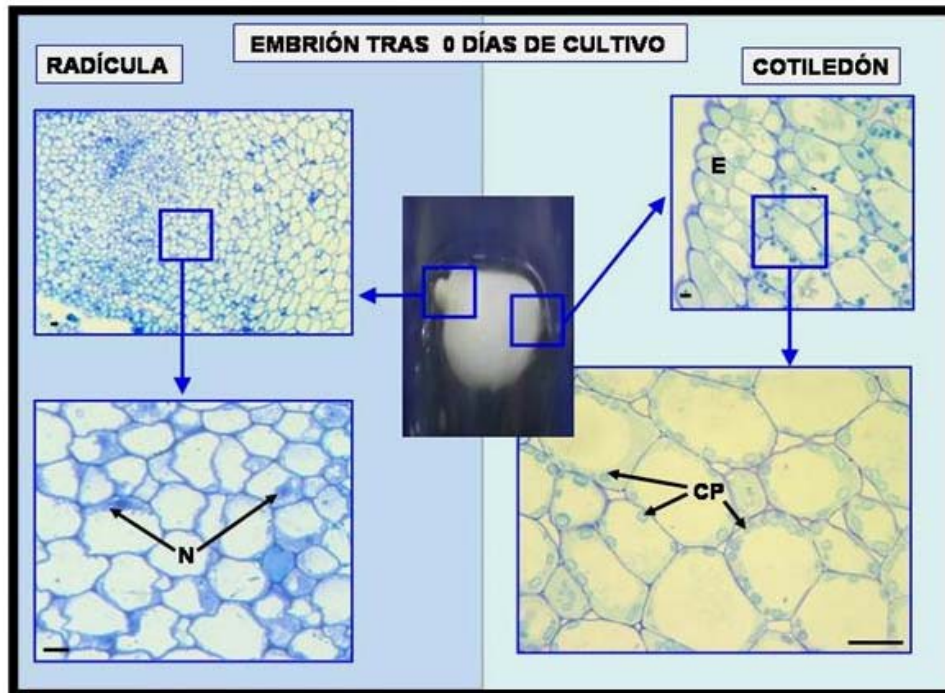


Figura 71. Cortes transversales de 1 μ m del cotiledón y la radícula de semillas el día 0 de cultivo *in vitro*, teñidos con Azul de metileno/Azul de toluidina y observados a microscopio óptico: Núcleo, CP: Cuerpos proteicos, E: Epidermis.

IV-Resultados



En la radícula se observan unas células isodiamétricas de forma irregular.

Tras 5 días de cultivo, se observa un aumento del tamaño del cotiledón (Figura 72), este crecimiento se produce fundamentalmente en sentido longitudinal. En paralelo también se produce un cambio en la coloración del cotiledón, que pasa a ser verde/amarillento. A su vez igualmente se observa un crecimiento longitudinal de la radícula.

A nivel histológico se observa que las células de la epidermis se están dividiendo y forman una capa engrosada. Las células del parénquima también se están dividiendo y presentan cuerpos lipídicos. La radícula muestra un principio de organización estructural, en donde se aprecian detalles de los haces vasculares en formación.

Tras 10 días de cultivo (Figura 73), los cotiledones poseen una coloración claramente verde, y una estructura microscópica bastante similar a la de las hojas. La radícula ha experimentado un crecimiento notable, alcanzando una longitud similar a la del cotiledón. En el aspecto microscópico del cotiledón se observa la epidermis que presenta varias capas de células que se están dividiendo y tienen muchos cuerpos proteicos. El parénquima muestra numerosos cuerpos proteicos y lipídicos. Además se observan vasos conductores en el cotiledón lo que indica que está comenzando a adquirir características similares a las de la hoja. En los cortes transversales de la radícula se observan también los vasos conductores con el xilema y el floema bien definidos.

IV-Resultados



Tras 20 días de cultivo (Figuras 74 y 75), el cotiledón es prácticamente idéntico en su morfología macroscópica a una hoja joven, mientras que la radícula tiene un gran desarrollo, superando ampliamente en longitud al cotiledón y tiene un aspecto más rígido. En el aspecto microscópico, los cotiledones presentan dos epidermis, la epidermis inferior presenta estomas. Además se observa una amplia capa de células similares al mesófilo, formando una parénquima de carácter intermedio entre lagunar y en empalizada. La epidermis superior tiene menos estomas.

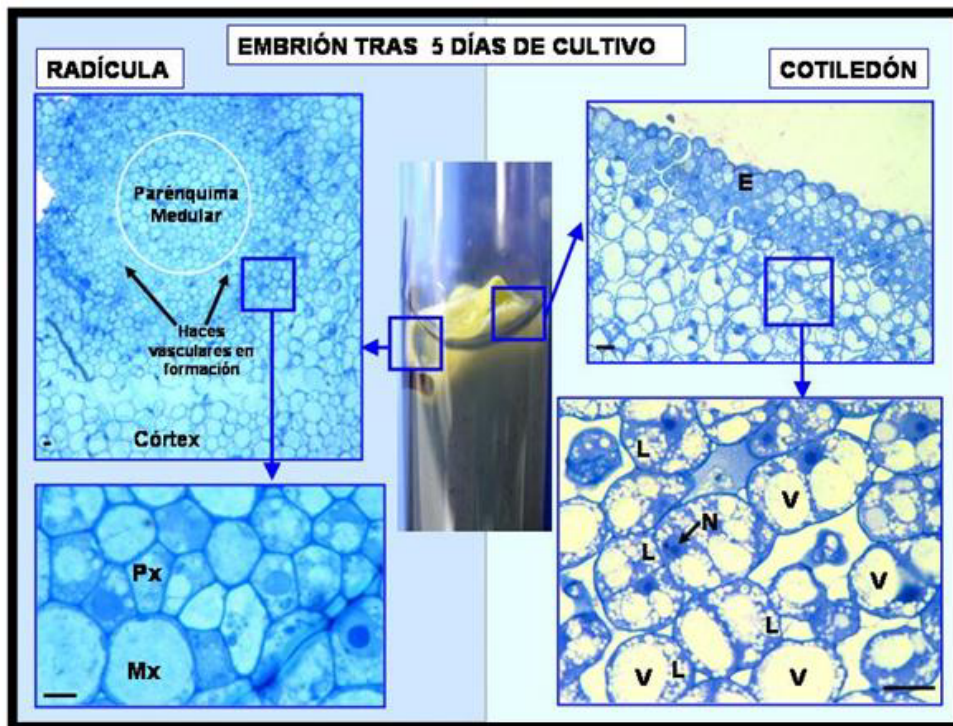


Figura 72. Cortes transversales de 1 μ m de la radícula y cotiledón de semilla cultivada 5 días *in vitro*, teñidos con Azul de metileno/Azul de toluidina y observados a microscopio

IV-Resultados



óptico. E: Epidermis, V: Vacuola, L: Cuerpos lipídicos, N: Núcleo, PX: Protoxilema, MX: Metaxilema.

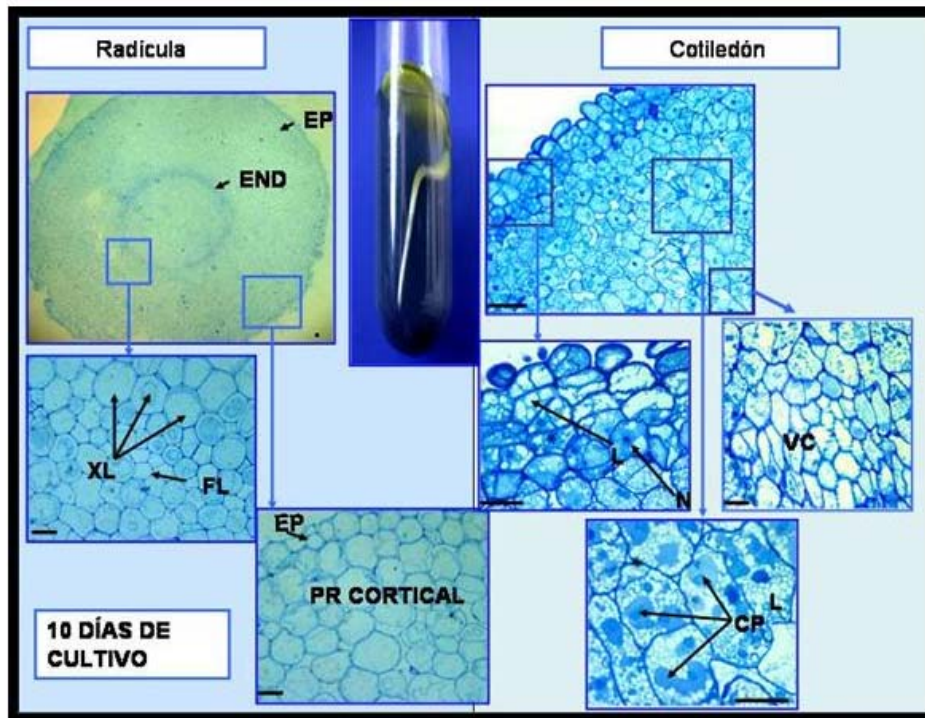


Figura 73. Cortes transversales de 1 μ m del cotiledón y de la radícula teñidos con Azul de metileno/Azul de toluidina y observados a microscopio óptico. PR: Parénquima, EP: Epidermis, XL: Xilema, FL: Floema, VC: Vasos conductores, N: Núcleo, L: Cuerpos lipídicos, CP: Cuerpos proteicos, PM: Parénquima medular.

IV-Resultados

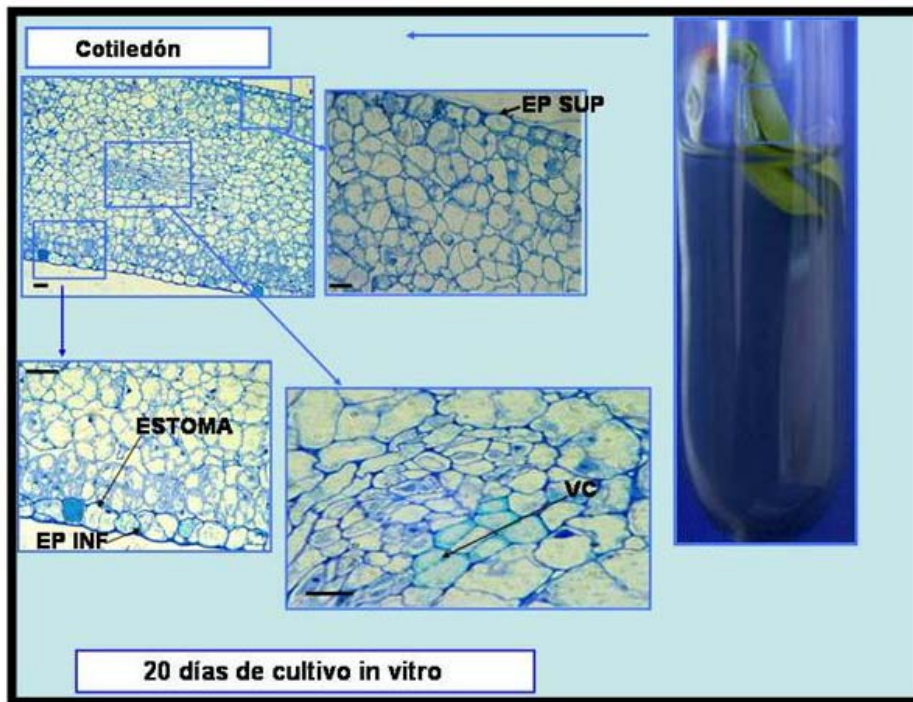


Figura 74. Cortes transversales del cotiledón teñidos con Azul de metileno/Azul de toluidina y observados a microscopio óptico. EP SUP: Epidermis superior, EP INF: Epidermis inferior, VC: Vasos conductores.

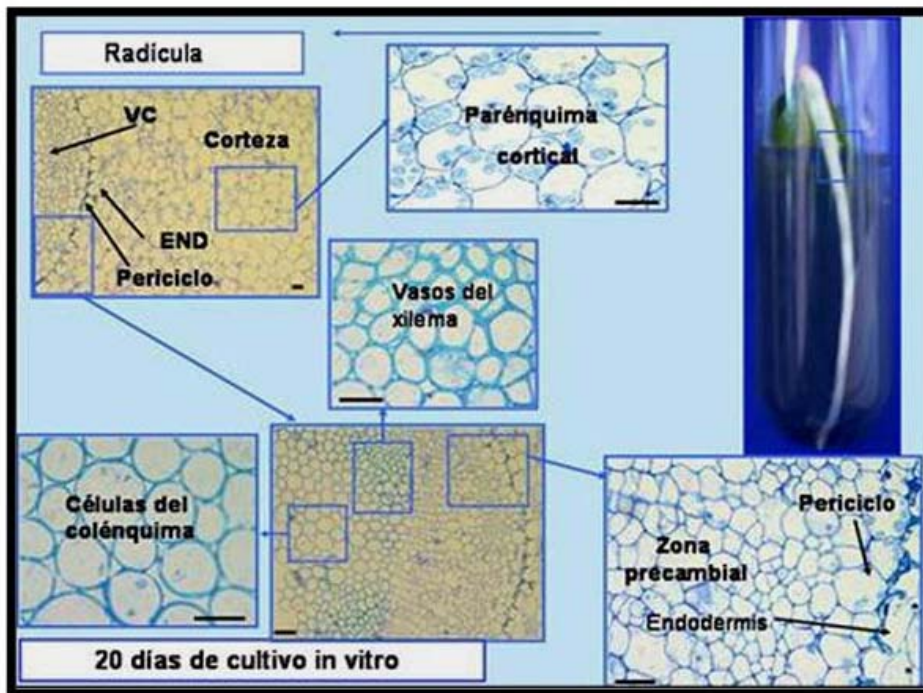


Figura 75. Cortes transversales de la radícula teñidos con Azul de metileno/Azul de toluidina y observados a microscopio óptico.

4.7. Detección de lípidos durante la maduración de la semilla de argán.

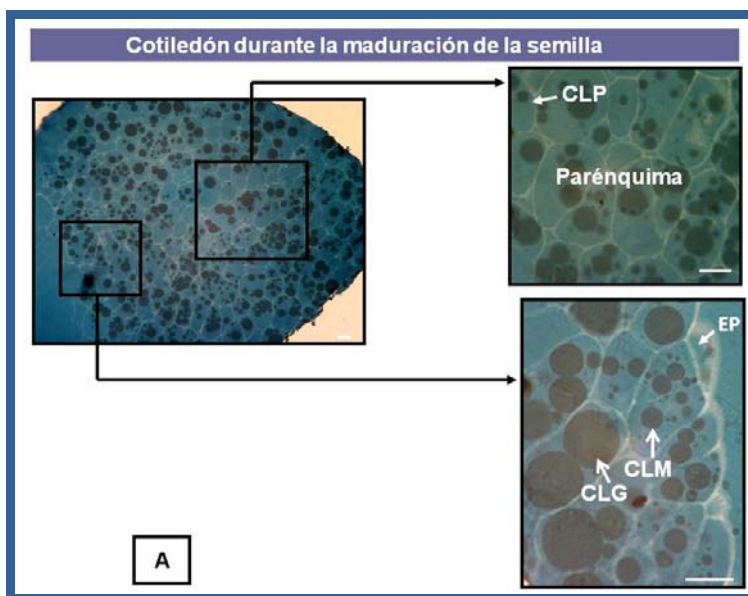
Debido a la importancia del uso de las semillas de argán para obtención de aceites, se estudió la acumulación de lípidos durante el proceso de maduración de la semilla, tanto en el cotiledón como en el endospermo. Se utilizó una tinción con Sudan-Black para poner de manifiesto los lípidos en cortes tisulares. Para el estudio a lo largo del

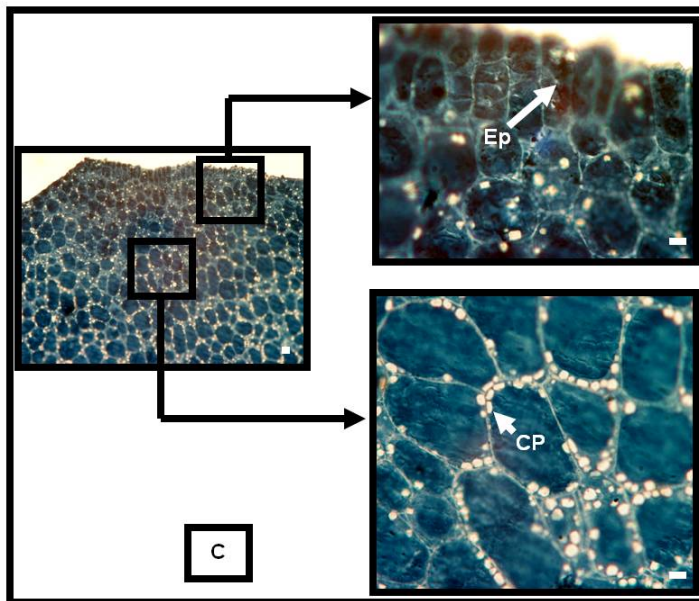
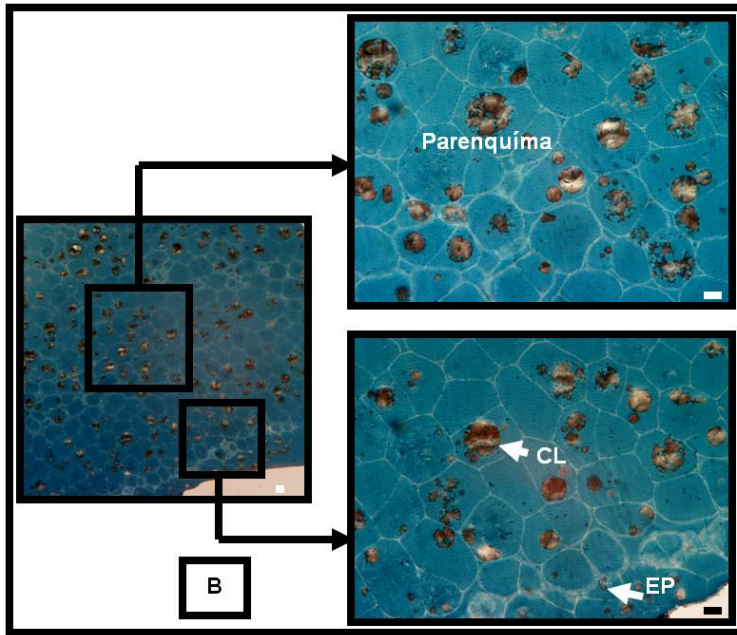
IV-Resultados



proceso de maduración de la semilla se utilizaron los 4 estadios de desarrollo, ya utilizados para los estudios de acumulación de cuerpos proteicos. Los resultados están recogidos en las figuras 76 y 77.

Se pueden observar ya desde el estadio I abundantes cuerpos lipídicos en el cotiledón, tanto en las células parenquimáticas como en la epidermis. En este estadio I están presentes cuerpos lipídicos de muy diversos tamaños grandes, medianos y pequeños. Estos cuerpos lipídicos eran particularmente abundantes en las 2 o 3 capas celulares que se encontraban por debajo de la epidermis.





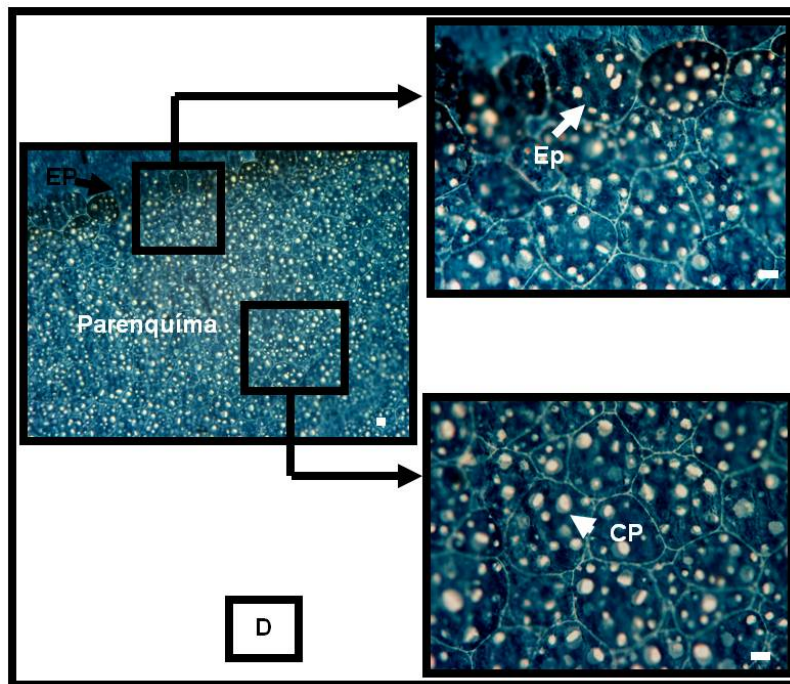
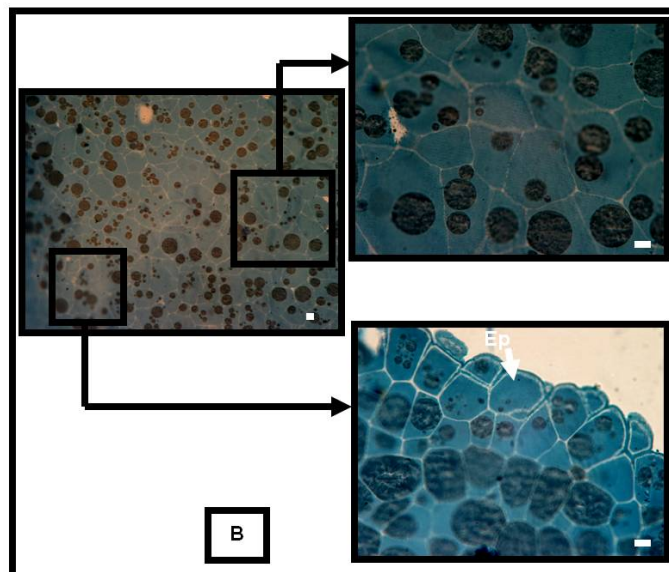
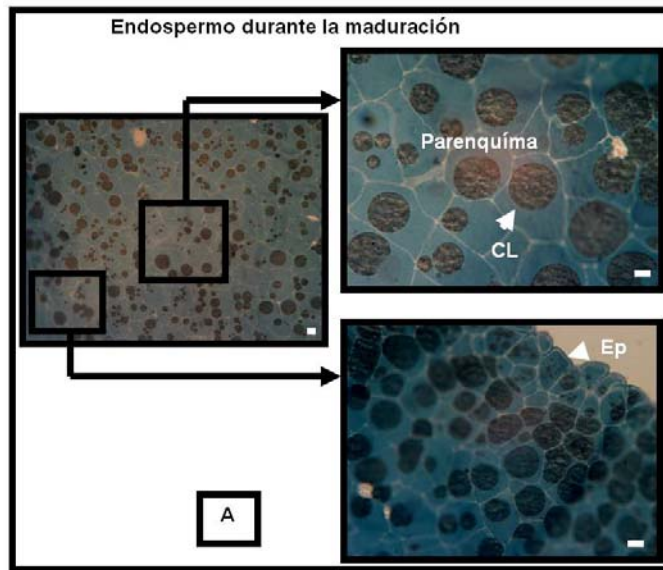


Figura 76. Detección de lípidos durante el desarrollo del cotiledón durante la maduración de la semilla mediante tinción con sudan black. A: estadio I, B: estadio II, C: estadio III, D: estadio IV. CP: cuerpos proteicos, CL: cuerpos lipídicos. EP: epidermis.



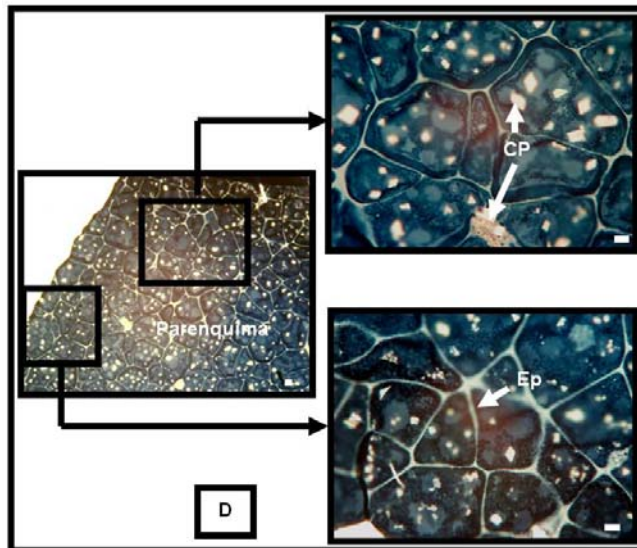
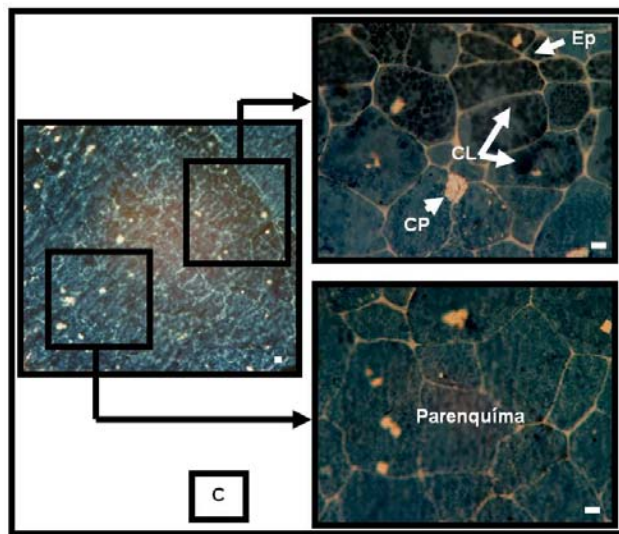


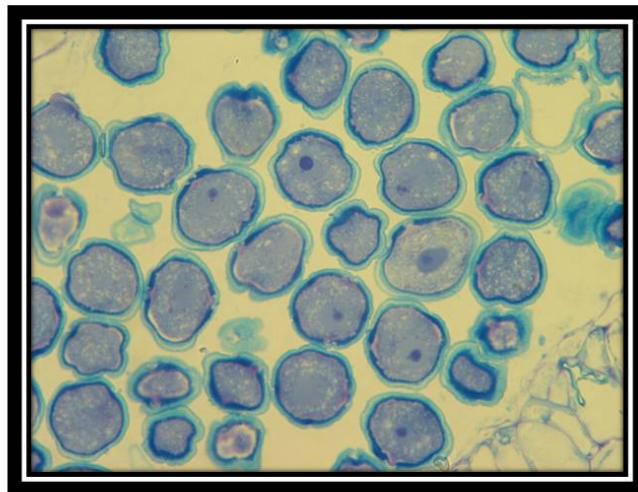
Figura 77. Detección de lípidos en el endospermo durante la maduración de la semilla mediante tinción con Sudan Black. A: estadio I, B: estadio II, C: estadio III, D: estadio IV. CP: cuerpos proteicos, CL: cuerpos lipídicos.

IV-Resultados



IV-Resultados





Discusión





5.1. El argán posee una amplia variabilidad morfológica.

Aunque no se ha realizado una prospección sistemática de todas las regiones ricas en argán de Marruecos, ni incluso de la totalidad de la región de Chouihya (Berkane, Marruecos), el análisis preliminar ha permitido distinguir un mínimo de 6 variantes morfológicas del árbol con características claramente diferenciales, según el sistema morfológico aplicado, que fue desarrollado para discriminar entre cultivares de olivo (Barranco et al 2005) y adaptado en este trabajo para discriminar entre variantes de argán. Es por ello altamente probable la existencia de otras numerosas variantes morfológicas de esta planta, de lo que se deduce que el argán posee un amplio germoplasma. En el caso del olivo, del que se supone la existencia de varios miles de variedades a lo largo del mundo, la amplia variabilidad es consecuencia de un proceso histórico que ha implicado numerosos ciclos de selección humana conjugada con retrocruzamientos con formas silvestres (Rallo 2005). Dicho proceso no es en principio asumible al argán, dado que no se trata de una especie cultivada significativamente, sino eminentemente silvestre, y no estaría sujeta por tanto a una selección humana de intensidad comparable al olivo. El gran interés ecológico y socio-económico de esta especie haría recomendable la realización de trabajos específicos más amplios de prospección y caracterización, así como el establecimiento de colecciones estables de germoplasma, de forma similar a otras numerosas especies de interés (FAO, 2010).



En este trabajo consideramos que las 6 variantes morfológicas descritas, y que han mostrado además diferencias significativas en el contenido y la expresión de distintos marcadores moleculares, podrían ser consideradas subespecies/variedades de la especie *Argania spinosa* L. El criterio seguido para tal denominación coincide con el definido por el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (ICBN) (McNeill et al. 2006). Según este código, se define una subespecie como un rango taxonómico formado por individuos de la misma especie que son capaces de cruzarse y producir descendencia fértil. Sin embargo, no se entrecruzan en la naturaleza debido a aislamiento geográfico u otros factores (<http://en.wikipedia.org/wiki/Subspecies>). Las diferencias entre subespecies son usualmente menores que las que existen entre especies, pero mayores que las que existen entre variedades. Por otra parte, una variedad botánica consiste en un rango taxonómico inferior al de especie, caracterizado por una apariencia diferencial con respecto a otras variedades ([http://en.wikipedia.org/wiki/Variety_\(botany\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Variety_(botany))). Las variedades mantienen la capacidad de hibridar libremente entre ellas, si es que llegan a ponerse en contacto, aunque generalmente se encuentran separadas geográficamente. En el caso de las variantes morfológicas descritas en este trabajo, es difícil discriminar si se trata de uno u otro de los rangos infraespecíficos descritos, puesto que sólo se han obtenido datos parciales sobre su distribución y carecemos de datos reales sobre la capacidad de entrecruzamiento. No han sido registrados en este trabajo otros datos de gran interés potencial como pudieran ser índices de producción, resistencia a altas/bajas temperaturas etc.



En cualquier caso, las subespecies/variedades descritas poseen caracteres morfológicos suficientemente diferenciales entre sí, referentes tanto a parámetros del árbol, como especialmente a las características del fruto. Dichas características podrían ser clave para el desarrollo de futuros cruzamientos dirigidos a usos preferenciales como alimento ganadero (ej. frutos esencialmente de gran tamaño y alta proporción mesocarpo/endocarpo) o a la producción directa de aceite (ej. baja relación mesocarpo/endocarpo) en los denominados “candidate plus trees” (Ait et al 2010, 2011; Bellefontaine 2010). Es bastante difícil establecer similitudes entre las variantes morfológicas descritas en el presente trabajo y aquellas descritas previamente por otros autores como El Moussadik et al (1995), Ferradous (1995), Bani-Aameur et al (1999), Bani-Aameur y Ferradous (2001), Ait Aabd et al (2011), Bani-Aameur (2004), a pesar de que en algunos casos han sido utilizados parámetros similares del fruto y del endocarpo. Sin embargo, las prospecciones pueden corresponder a regiones geográficamente diferentes, y a ello se une el hecho de que el uso de marcadores morfológicos es ampliamente subjetivo y depende claramente de factores ambientales. Este hecho incide en la necesidad de que sean desarrollados marcadores genéticos altamente discriminativos para esta planta, especialmente de tipo RAPD y SSR. En la actualidad, los análisis del germoplasma del argán pueden considerarse bastante deficitarios, con sólo algunas menciones al uso de este tipo de marcadores en la literatura (Majourhat et al 2008). Este hecho ha sido debido fundamentalmente a la ausencia de “sets” de marcadores apropiados para la discriminación en esta especie.



Mientras estos métodos se desarrollan suficientemente en el argán, el presente trabajo demuestra la utilidad de otros métodos de discriminación y diferenciación alternativos o complementarios, como son el uso de parámetros morfométricos de las ramas, la antera y el grano de polen. Métodos similares han sido desarrollado exitosamente en el caso del olivo (Hammami et al 2011a,b; 2012; Rosati et al 2012) y podrían adaptarse con facilidad al argán.

5.2. El argán posee una fenología floral compleja, que suscita el que existan aún numerosas incógnitas sobre su biología reproductiva.

La fenología floral del argán puede considerarse compleja, dado que ha sido demostrado que el número de glomérulos florales sufre tremendas variaciones relacionadas con la estacionalidad, las precipitaciones, la zona de la rama floral en donde se sitúen las inflorescencias y el árbol concreto en el que se realice el estudio (Bani-Aameur 2002). Las diferencias encontradas en la morfología floral en este trabajo son además bastante acusadas, e incluyen cambios sustanciales en el número de estambres, en la disposición súpera/tamaño del gineceo y diferencias morfológicas importantes en los granos de polen de las distintas subespecies/variedades.

Trabajos previos que incluyen diversos tratamientos de polinización han mostrado que es necesaria la intervención de polinizadores para una polinización adecuada, y que el cuajado de frutos es significativamente superior en experimentos de polinización cruzada y polinización abierta que en autopolinización (Nerd et al 1998). Estos resultados parecen indicar la



posible existencia de mecanismos de autoincompatibilidad en esta planta que precisarían ser analizados en detalle, aunque existen indicios de protandria y alogamia preferencial (ver revisión de Bellefontaine 2010). La polinización parece ser esencialmente entomófila. Aunque Nerd et al (1998) indican la participación de diversas especies de insectos, el estudio tuvo lugar en Israel, y no existen datos sobre los polinizadores potenciales en el caso de las regiones marroquíes. La ausencia de floración en una de las subespecies/variedades descritas en esta memoria, aunque ha sido corroborada a lo largo de varios años consecutivos, puede corresponder a una característica general ya descrita por Bani-Aameur (2002) para esta especie, por la que no todos los árboles florecen todos los años. En el caso del olivo y otras numerosas especies como el aguacate, mango, manzano, naranjo etc., esta alternancia también denominada vecería es frecuente, siendo en muchos casos salvable mediante prácticas agronómicas adecuadas (Navarro-García 1989; Fernández-Escobar et al 1999). No es descartable la presencia de árboles infértiles debido a alteraciones genéticas que impidan la floración o el desarrollo de los gametos.

Los análisis morfométricos realizados sobre preparaciones histológicas de los tejidos reproductivos masculinos (anteras y polen) han revelado igualmente una gran variabilidad en esta planta tanto entre como dentro de las subespecies/variedades estudiadas. Algunas de esas diferencias incluyen el número de aperturas presentes en el grano de polen, que pueden oscilar entre 1 y 6 en distintas proporciones y el tamaño de los granos. Estas observaciones corroboran análisis anteriores llevados a cabo por Bani-Aameur (2002), en muestras de pólenes procedentes de Ait Melloul, Argana



y Ait Baha (Sudeste de Marruecos) que igualmente muestran variaciones similares. Las diferencias observadas pueden ser consideradas altamente fiables, dada su repetitividad, y el hecho de que todas las muestras fueron recolectadas y procesadas en condiciones idénticas. El número de medidas realizadas para cada subespecie/variedad es suficientemente elevado para garantizar la estabilidad de los datos obtenidos. Las diferencias observadas podrían corresponder a diferencias genéticas resultado de procesos adaptativos frente a situaciones ambientales como la alternancia entre periodos de sequedad/hidratación, que pueden ser contrarrestados por la denominada “harmomegata” del grano de polen. En cualquier caso, los pólenes observados corresponden en todos los casos a pólenes prolados, con aperturas colpo-poradas, con colpos perforados en el centro por donde germina el tubo polínico (M’Rani-Alaoui et al 2003), y características similares al resto de pólenes de las Ebenales (Geeraerts et al 2009), lo que permite su rápida identificación.

La presente memoria describe por primera vez la utilización de parámetros ultraestructurales de la pared del polen a microscopia de transmisión para caracterizar las subespecies/variedades analizadas. Los parámetros analizados a microscopia electrónica de transmisión de los constituyentes de la pared del polen son bastante discriminativos y han permitido determinar claramente las diferencias entre subespecies/variedades. Aparte de las diferencias morfométricas entre subespecies/variedades, han sido detectadas diferencias en la densidad electrónica de distintas capas de la pared del polen, que podrían reflejar diferencias potenciales en la composición química (Punt et al 2007), aún por



determinar. El uso potencial de métodos alternativos como la autofluorescencia de la pared del grano de polen, ya utilizada en otras especies (Castro et al 2010) queda aún por explorar igualmente en esta especie.

5.3. La optimización de métodos de análisis proteico y de actividad enzimática en tejidos de argán permite abordar nuevos estudios sobre la biología reproductiva y la estabilidad y usos del aceite y las semillas.

La composición del aceite de argán y la determinación de los parámetros bioquímicos que lo caracterizan son algunos de los tópicos mejor estudiados en relación con esta planta. Sin embargo, el conocimiento a nivel molecular es prácticamente inexistente. En la actualidad, son 18 las secuencias nucleotídicas accesibles en la base de datos GenBank del NCBI, correspondientes a 12 productos proteicos, en su mayor parte relacionados con el metabolismo lipídico. Como trabajo preliminar a un futuro análisis bioquímico/molecular más profundo, ha sido analizada en el presente estudio la posible presencia de actividades enzimáticas clave como superóxido dismutasas y diversas esterasas.

En relación a las SODs, tanto los ensayos espectrofotométricos de actividad como los ensayos de actividad en gel han permitido demostrar la presencia de niveles relativamente elevados de ésta en los tejidos analizados, así como la presencia de claras diferencias intervarietales que implican tanto a los niveles totales de actividad como a la distribución de isoformas. En el caso del argán, los métodos utilizados han permitido



detectar hasta 9 isoformas en semillas, tres de ellas correspondientes a Cu,Zn-SODs y cuatro a Mn-SODs, mientras que en el caso de hojas se observaron respectivamente hasta seis isoformas de Cu,Zn-SOD y una de Mn-SOD. El número y tipo de isoenzimas de SOD puede cambiar en función de la especie vegetal, edad del desarrollo y condiciones ambientales de la planta (Bridges and Salin 1981; Bowler et al 1994; Kliebenstein et al 1998; Alscher et al 2002). Además, hay especies vegetales donde se ha encontrado sólo una isoforma como en girasol donde únicamente se ha encontrado Cu,Zn-SOD (Corpas et al 1998). El sistema enzimático SOD de hojas de olivo ha sido caracterizado por Corpas et al (2006). Dicho sistema comprende tres isoenzimas, una Mn-SOD, una Fe-SOD y una Cu,Zn-SOD. En el caso del argán, la elevada actividad antioxidante SOD comparativamente observada en los tejidos analizados puede ser un reflejo de la gran capacidad adaptativa de esta planta a un entorno relativamente hostil, con numerosos estreses abióticos potenciales, que contribuya a su supervivencia.

Desconocemos la localización celular y subcelular de las SODs analizadas en los tejidos del argán. En este trabajo se ha utilizado un anticuerpo comercial desarrollado frente a la forma cloroplastídica de la Cu,Zn-SOD de *Arabidopsis*, que es capaz de reconocer formas citosólicas del enzima a elevadas concentraciones (Zafra 2007). Los experimentos de inmunoblotting han tenido como resultado un elevado número de bandas reactivas al anticuerpo, con pesos moleculares aparentes en buena relación con los pesos moleculares descritos para diversas Cu,Zn-SODs, y con los descritos previamente para este enzima en su forma citosólica en el polen

V-Discusión



del olivo y otras especies (Alché et al 1998; Butteroni et al 2005). Algunas de las bandas reactivas poseen pesos moleculares que podrían ser compatibles con formas diméricas/tetraméricas de distintas isoformas de SODs descritas en la literatura, que podrían incluir tanto Cu,Zn-SODs como Mn-SODs. Son necesarios estudios adicionales que permitan definir mejor la reactividad del anticuerpo, por lo que se ha optado por descartar el uso del anticuerpo para estudios de inmunolocalización hasta que sean ensayados o generados anticuerpos de mayor especificidad. En plantas, las Cu,Zn-SODs se localizan en peroxisomas, cloroplastos, citosol y apoplasto (Sandalo y del Río 1987, 1988; Salin 1988; Kanematsu y Asada 1991; Ogawa et al 1996; Ogawa et al 1997; Sandalo et al 1997; Corpas et al 1998; del Río et al 2002), mientras que las Mn-SODs se encuentran en peroxisomas y mitocondrias (Braum y Scandalios 1981; del Río 1983; Palma et al 1986; Sandalo y del Río 1987; Bowler et al 1994; Corpas et al 1998; del Río et al 2003.). No han sido detectadas Fe-SODs en los tejidos analizados del argán, que en otras plantas se han encontrado en el cloroplasto (Salin 1988; Asada 1994), o en peroxisomas (Droillard y Paulin 1990). Sería del mayor interés la clonación y secuenciación de la forma completa de estas enzimas, lo que permitiría su comparación con secuencias ya conocidas en especies arbóreas como el olivo (Butteroni et al 2005 –GenBank AJ428575-; Boluda et al 1998; Tejera et al 1999 -GenBank P80740-; Alché et al -GenBank AF191342-; Corpas et al. -GenBank AF426829-), en algunas de las cuales ha sido detectada la presencia de microheterogeneidades y de una forma delecionada de Cu,Zn-SOD (Zafra 2007).



Tanto los ensayos espectrofotométricos de actividad como los ensayos de actividad en gel han permitido también demostrar la presencia de niveles relativamente elevados de actividad esterolítica en los tejidos analizados, así como la presencia de claras diferencias intervarietales que implican tanto a los niveles totales de actividad como a la distribución de isoformas. Los resultados obtenidos identifican la presencia de la actividad de forma general, aunque no han llegado a identificar y clasificar desde el punto de vista funcional las distintas enzimas esterases, que ofrecen una elevadísima variabilidad en plantas. Un estudio reciente (Rejón 2012; Rejón et al 2012) ha permitido la identificación de hasta 20 bandas con actividad esterolítica en el polen del olivo, pertenecientes a distintos grupos funcionales (carboxil-esterases, acetil-esterases, acetil-colín-esterases y lipasas), gracias a la utilización de una amplia batería de sustratos e inhibidores específicos. En el caso de la semilla del olivo, y en este caso, del argán sería de gran interés conocer dicha distribución, principalmente en el caso de las lipasas, que potencialmente tendrían un papel relevante en la fisiología de dicha semilla, especialmente durante el crecimiento y la germinación, además de poseer relevantes aplicaciones biotecnológicas y una potencial implicación en la estabilidad del aceite (Quettier y Eastmond 2009; Barros et al 2010; Megahed 2011). La localización subcelular de estas esterases proveerá en futuros experimentos de pruebas experimentales que nos permitan aproximarnos a la función biológica de estas enzimas. Esta localización subcelular puede ser abordada mediante métodos histoquímicos



previos a la infiltración de los tejidos para su procesamiento a microscopía electrónica de transmisión (Rejón et al 2012).

5.4. Las semillas de argán contienen importantes cantidades de proteínas de almacenamiento de tipo 11S que les confieren un elevado poder nutricional.

El interés en las proteínas de almacenamiento de semillas es creciente debido a que representan un parámetro de calidad nutricional en numerosos cultivos (Milisavljević et al 2004). Las SSPs son las proteínas consumidas mayoritariamente por los humanos, aunque en el caso de algunas plantas como el olivo, estas proteínas no son generalmente utilizadas para nutrición animal o humana, a pesar de que las semillas están altamente enriquecidas en SSPs. En el caso del argán, no hemos detectado la existencia de conocimiento básico en relación a la posible presencia de SSPs o de la existencia de detalles sobre sus características bioquímicas.

Los resultados que se muestran en esta memoria demuestran claramente que las semillas maduras de argán pertenecen mayoritariamente a la familia 11S de proteínas de almacenamiento de semillas. En relación a su solubilidad, las proteínas 11S del argán son diluidas masivamente en agua y soluciones salinas diluidas, por lo que de acuerdo con los criterios clásicos definidos por Osborne (1924), deberían ser consideradas globulinas. Este tipo de proteínas son las proteínas de almacenamiento 11-12S más comunes en las dicotiledóneas. Son denominadas también leguminas por su amplia presencia entre las legumbres, como los guisantes

V-Discusión



(*Pisum sativum*), la soja (*Glycine max*), habas (*Vicia faba*), y judías (*Phaseolus vulgaris*). Están presentes sin embargo en muchas otras dicotiledóneas como por ejemplo en las familias *Brassicaceae*, *Compositae*, y *Cucurbitaceae* familias), así como en cereales como la avena y el arroz (Shewry et al 1995). Existen sin embargo excepciones a esta característica. Así, el olivo es una excepción en la que las proteínas 11S presents han sido consideradas prolaminas en terminus de solubilidad. Otras excepciones incluyen las proteínas 11S del arroz, que aunque pertenecen a la familia 11-12S de globulinas, son definidas como glutelinas en términos de solubilidad (Shewry et al 2002).

La información obtenida sobre estas proteínas está de acuerdo con el modelo bioquímico existente para estas proteínas, aunque en este caso se han detectado tres péptidos precursores (en lugar de dos, como ocurre en numerosas especies) compuestos a su vez por subunidades menores compuestas por hasta 5 péptidos diferentes de menor tamaño, en combinaciones α/β formadas por una α -proteína con Ip ácido de mayor tamaño combinada con una β -proteína menor de carácter más básico, unidas por puentes disulfuro, y generalmente acumuladas como complejos hexaméricos (Shewry et al 1995; Milsavljevic et al 2004; Fujiwara et al 2002; Bharali et al 2003). Sobre la base de los tamaños moleculares observados, podrían asignarse los péptidos p5, p3 y p4 a α -proteínas y p1, p2 a β -proteínas, aunque esta aseveración debería ser corroborada experimentalmente determinando el punto isoeléctrico mediante isoelectroenfoque (Alché et al 2006). La variabilidad y heterogeneidad de los pares de subunidades es una característica descrita para muchas de estas proteínas,



denominadas “legumin-like proteins”, por ejemplo la glicinina (Nielsen et al 1989) y la castanina (Collada et al 1991).

No han sido detectadas claras diferencias en los perfiles proteicos de proteínas 11S entre las subespecies/variedades analizadas, lo que sugiere que la síntesis de proteínas 11S está altamente conservada. Prueba de ello es igualmente el hecho de que el anticuerpo p1 sea capaz de reconocer las proteínas 11S en el olivo, argán y otras diversas especies (Alché et al 2006). En el caso del argán, todas las bandas resueltas mediante SDS-PAGE tanto en condiciones desnaturalizantes y no-reductoras, como reductoras fueron reconocidas por el anticuerpo, con la excepción de la banda P6 que mostró sólo una débil señal. En este caso, esta baja reactividad puede deberse probablemente a diferencias en la secuencia primaria de la proteína.

Este tipo de diferencias e incluso las posibles diferencias mínimas presentes entre subespecies/variedades (y que no han sido detectadas mediante electroforesis unidimensional), podrían ser analizadas si recurrimos a métodos analíticos más discriminativos como la electroforesis bidimensional, especialmente si se acopla al análisis de péptidos mediante espectrometría de masas. A este respecto se han descrito diferencias notables en la composición de las proteínas de tipo 11S entre diferentes especies, así como la presencia de formas mutadas y de variantes electroforéticas (Tai y Bush 1997; Maruyama et al 2003; Yin et al 2003; Fukuda et al 2005; Hou et al 2005). Este polimorfismo podría deberse tanto a la presencia de familias multigénicas como ser el resultado de fenómenos de proteólisis o de modificaciones post-traduccionales.



Es de gran interés el análisis de la presencia y distribución de las proteínas de almacenamiento a lo largo de la formación de la semilla y posteriormente, su movilización durante la germinación. En este trabajo, describimos la progresiva acumulación de proteínas de almacenamiento de semillas en cuerpos proteicos. Es notable la estrecha relación entre el metabolismo proteico y lipídico en términos de acumulación de los triglicéridos en forma de cuerpos lipídicos que rodean a los cuerpos proteicos, y que son claramente distinguibles mediante tinciones histoquímicas de gran especificidad. Estos datos pueden aportar numerosos detalles que permitan establecer el estado metabólico de la semilla, seleccionar el estadio óptimo para la recolección dependiendo su destino (alimentación animal o elaboración de aceite), así como diseccionar los eventos de germinación *in vitro* seleccionando el estadio o características que definan la tasa de germinación óptima, etc. En el caso del olivo, existen diversos estudios realizados al respecto por parte del grupo de investigación (Alché et al 2006; Wang et al 2007; Zienkiewicz et al 2010, 2011) que muestran el camino a seguir en el caso del argán, partiendo de los resultados iniciales mostrados en este trabajo.

Igualmente, futuros trabajos deberán abordar para el argán los estudios de digestibilidad y de alergenicidad potencial actualmente en curso en el caso del olivo y otras especies con semillas de interés potencial en alimentación animal y humana (Ben-Ali 2011a,b)



5.5. El aceite de argán posee una composición diferencial con respecto a otros aceites alimentarios ampliamente utilizados, y una gran variabilidad entre muestras.

Independientemente del método de obtención del aceite de argán, bien tradicional (artesanal) o semi-industrial, el aceite de argán está siendo cada vez mejor considerado como un aceite comestible con alto valor dietético, así como otros numerosos usos (Moukal 2004; Stussi et al 2005; Bellefontaine 2010). El método de extracción del aceite de argán es complejo en sí mismo y necesita mucho labor y experiencia sobre todo en la etapa de torrefacción de las semillas, etapa muy crítica en la determinación de la calidad de aceite (Hilali et al. 2005). Además del método tradicional manual, detallado en el apartado de “Introducción”, actualmente se extrae aceite por métodos semi-industriales mediante presión mecánica en frío (Charrouf et al 1997; Charrouf y Guillaume, 1999, 2008). Este último método de extracción incrementa la calidad nutricional del aceite y preserva sus propiedades nutricionales.

Marfil (2008) revisa los distintos componentes que forman parte del aceite de argán, distinguiendo entre la fracción saponificable (ácidos grasos, triacilglicéridos) y la fracción insaponificable (esteroles, alcoholes triterpénicos, hidrocarburos, minerales y elementos traza, ésteres no glicéridos y antioxidantes). Los aceites analizados en este trabajo (de tres procedencias diferentes), muestran ligeras diferencias en su composición, que son consistentes con los parámetros analizados por esta investigadora. Básicamente es destacable el elevado contenido en ácidos oleico y linoleico,

V-Discusión



el bajo contenido en ácidos grasos saturados como palmítico y esteárico, así como en colesterol. El aceite de argán contiene niveles de tocoferoles delta y gamma muy altos, comparando con los de aceite de oliva, aportando así propiedades antioxidantes muy apreciables. La coloración rojiza de la muestra de aceite de la región de Essaouira es probablemente debida a la presencia de carotenoides.

Ninguna de las tres muestras determinadas en este trabajo cumplió globalmente la normativa marroquí 08.5.090 (Tabla 15) para su denominación como aceite de argán virgen extra, virgen fino o virgen corriente, por lo que serían asignados a la denominación de aceites de argán virgen lampante. En cuanto a algunos parámetros individuales, el aceite procedente de Agadir sí cumpliría la normativa correspondiente a aceite de argán virgen extra para absorción al ultravioleta 270, mientras que no lo harían los otros dos aceites.

En ningún caso ha podido ser determinado el origen del material utilizado para la elaboración del aceite en cuanto a subespecie/variedad, siendo probable que el aceite analizado sea el resultado de la mezcla de más de un origen. A esta gran variabilidad en cuanto al material de partida se une el hecho de que la composición del aceite y su calidad son estrechamente dependientes del procedimiento de procesado, de forma que se observa una notable disminución de la calidad en los aceites procesados tradicionalmente, frente a los procedimientos semi-industriales o parcialmente mecanizados (Marfil 2008).



CRITERIOS DE CALIDAD				
	Aceite de argán virgen extra	Aceite de argán virgen fino	Aceite de argán virgen corriente	Aceite de argán virgen lampante
Grado de acidez (% m/m) expresado en ácido oleico	≤ 1,0	≤ 2,0	≤ 3,3	> 3,3
Índice de peróxidos en meq O ₂ activo /Kg aceite	≤ 20	≤ 20	≤ 20	Sin límite
Absorción 270 nm	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,30	Sin límite
ΔK	≤ 0,01	≤ 0,01	≤ 0,01	Sin límite
CRITERIOS ORGANOLÉPTICOS				
Color	Característico del producto designado			
Olor y sabor	Exento de olor, sabor extraño o rancidez			
CONTAMINANTES				
Humedad y materias volátiles (% m/m)	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,3
Impurezas solubles en éter de petróleo	≤ 0,3	≤ 0,3	≤ 0,3	≤ 0,4

Tabla 15. Límites máximos establecidos para los criterios de calidad y contaminantes del aceite de argán según la norma marroquí 08.5.090 (adaptado de Marfil 2008).

Sin embargo, sería esperable que, una vez definido un proceso de extracción homogéneo, el rendimiento graso, la composición de los aceites así como sus características organolépticas y otras fueran altamente dependientes del origen varietal, como ocurre en el olivo (Tous et al 2005). Hasta la fecha, solo existen algunas evidencias al respecto. Así, las variaciones observadas en la composición de ácidos grasos se atribuyen a diversos factores como el genotipo y las condiciones ambientales (Huyghebaert y Ahaendricks 1974; Nerd et al 1994). Diversos autores han relacionado la proporción de los ácidos palmítico y linoleico con un aumento de la altitud, mientras que la de oleico aumenta con la pluviosidad (Maurin et al 1992; Rahmani 2005). En el caso de los aceites analizados en este trabajo, los datos confirman la tendencia indicada al menos en el caso



de los ácidos palmítico y linoleico, que registran valores decrecientes en las muestras de aceite de Essaouira (Tamanar: 255 m de altitud), Chouihya (Aklim: 100 m) y Agadir (11 m).

El aceite de argán ha demostrado tener capacidades terapéuticas o preventivas frente a diversas patologías, que incluyen la hipercolesteronemia, la diabetes, obesidad, hipertensión, patologías cardiovasculares, cáncer, enfermedad inflamatoria intestinal, etc. (Charrouf y Guillaume 1999, 2007, 2008; Moukal 2004; Stussi et al 2005; Cherki 2006; Marfil 2008; Adlouni 2010; Mekhfi et al 2012). Gran parte de estas propiedades han sido atribuidas hasta ahora a la presencia de componentes con carácter antioxidante en el aceite que mitigan los efectos sobre moléculas clave susceptibles de oxidación como determinadas vitaminas, enzimas etc. (Drissi et al 2004; Cherki et al 2005; Amzal et al 2008), a la modulación de la resistencia a insulina y el metabolismo glucídico (Samane et al 2006, 2009), a efectos antiproliferativos sobre células cancerosas (Samane et al 2006; Bennani et al 2007), etc. Tampoco hay que olvidar el posible efecto de determinados iones como el cobre, presentes en altas concentraciones en el aceite de argán (Marfil 2008) sobre determinados riesgos coronarios (Ghayour-Mobarhan et al 2009)

Existen crecientes pruebas de que los aceites para consumo humano contienen pequeñas cantidades de péptidos y compuestos proteicos. Una revisión de Hidalgo y Zamora (2006) discute los tipos de péptidos y proteínas que presentan estos aceites, la metodología estandarizada y validada para su determinación, y las ventajas y riesgos del incremento en su contenido en relación con la estabilidad de los aceites y su posible



alergenicidad, ya que el contenido en estos componentes está ampliamente influenciado por los métodos de extracción y procesado. En el caso del aceite de oliva, Hidalgo et al (2002) determinaron el contenido proteico en aceites vírgenes y refinados de distintas procedencias, encontrando cantidades entre 7–51 μg proteína/100 g de aceite. La proporción aminoacídica presente en los aceites, determinada mediante espectrometría de masas, puede servir como carácter discriminativo de la especie de procedencia del aceite (Lerma-García 2007), permitiendo distinguir al menos 8 especies (incluido el olivo). El contenido proteico de los aceites de oliva también afecta a parámetros como la turbidez y la estabilidad fisicoquímica y oxidativa de éste (Hidalgo et al., 2006. Koidis y Boskou 2006).

En el caso del aceite de oliva, existen algunos datos en la literatura referentes al tipo de proteínas presentes en dicho aceite. En general se trata de proteínas de pesos moleculares relativamente bajos (10-40kDa), y existen indicios de que pueden ser responsables de actividades enzimáticas presentes en el aceite como lipooxigenasa y polifenol oxidasa (Ver revisión de Hidalgo et al., 2006). Dado que la semilla es la estructura con mayor contenido proteico de todo el fruto, y que de forma generalizada ésta se incluye en el proceso de extracción del aceite, existe una gran probabilidad de que algunas de esas proteínas sean proteínas de almacenamiento de semillas. Algunas otras proteínas caracterizadas en el fruto y que podrían estar presentes en el aceite podrían ser diversas formas de oleosinas (Alché et al., 1999; Giannoulia et al., 2007). Estas hipótesis no han sido aún confirmadas. En el caso del argán no ha sido determinado según nuestro



conocimiento el contenido proteico presente en el aceite. Dado que parte de las proteínas presentes en la semilla pueden formar parte del aceite final, tras su proceso de elaboración, tanto las SODs como las esterasas y las proteínas de almacenamiento de semillas podrían estar potencialmente presentes en el aceite, quizá contribuyendo a su estabilidad, contenido en antioxidantes, propiedades nutricionales, probióticas y saludables del aceite. El uso de semillas de argán o extractos modificados podría por tanto constituir otra alternativa terapéutica de interés en diversas enfermedades (Samane et al 2006).

5.6. El desarrollo de nuevos métodos de propagación del argán mediante germinación (*in vitro*) de semillas permitirá mitigar la deforestación y fomentar nuevos usos de esta especie.

El argán desempeña un papel fundamental desde un punto de vista etnobotánico en la economía local de los pueblos bereberes, aunque su extensión se encuentra en la actualidad en un estado de regresión debido fundamentalmente a la sobreexplotación. Entre las estrategias dirigidas a recuperar esta especie se encuadran aquellas destinadas a mejorar las prácticas agronómicas/forestales de propagación. Por una parte, se han desarrollado experimentos de propagación vegetativa mediante estaquillas, y por otra parte diversos métodos para el enraizamiento de semillas completas o micropropagaciones (Nouaim et al 2002; Bellefontaine 2010). Los métodos ensayados han sido capaces de regenerar plantas en mayor o menor medida, aunque en prácticamente todos los casos se han encontrado



genotipos recalcitrantes o con porcentajes reducidos de éxito. Es por ello conveniente la optimización de las condiciones utilizadas para cada uno de los genotipos existentes y el desarrollo de protocolos alternativos que permitan discernir el efecto de los diferentes parámetros implicados en la propagación de la planta.

En el caso de germinación en condiciones *ex vitro* y condiciones de invernadero, diversos trabajos han permitido alcanzar tasas relativamente elevadas de éxito en la germinación de semillas y determinar el efecto de parámetros como el frío, la salinidad, la adición de promotores de germinación como el ácido giberélico y el nitrato potásico, el tratamiento con agua a elevada temperatura, la adición de componentes antifúngicos, el genotipo materno etc. (Bani-Aameur y Sipple-Michmerhuizen 2001; Nouaim et al 2002; Alouani y Bani-Aameur 2004; Al-Menaie et al 2007, 2008). Los experimentos descritos en esta memoria incluyen tratamientos alternativos como la escarificación mecánica en la zona del micrópilo, así como escarificación química con KNO_3 y lejía, que han tenido un éxito relativo. Sin embargo, el retraso de varias semanas inherente al inicio de la germinación nos indujo a ensayar formas de cultivo *in vitro* alternativas, capaces en un primer paso de eliminar totalmente las cubiertas que limitan dicha germinación, como se describen en el apartado correspondiente.

Los estudios pioneros realizados en embriones de argán por Bousselme et al (2001) consiguieron determinar unas condiciones adecuadas de crecimiento para las plántulas y evaluar el efecto de diversas auxinas sobre éste, mientras que Reda Tazi et al (2001, 2003) fueron capaces de determinar el efecto del estrés hídrico y salino sobre el

V-Discusión



crecimiento y enraizamiento de la plántula a partir de las almendras aisladas en condiciones estériles. A partir de estas condiciones iniciales, el presente estudio ha conseguido reproducir tasas altas de germinación utilizando un medio de cultivo MS con concentración reducida de sal, y lo que es más importante, determinar el efecto positivo de la adición de ANA y BAP sobre dicho crecimiento, y especialmente sobre el desarrollo de raíces secundarias, destinado a aportar una adaptación máxima a la hora de transferencia de las plántulas a semilleros. En este caso, y como se muestra en el apartado correspondiente, se obtuvo una tasa de enraizamiento secundario cercana al 100%, en clara diferencia con experimentos anteriores de Nouaim et al (2002), que consiguieron tasas mucho más reducidas. Estas dos hormonas así como otras giberelinas ya han sido utilizadas con mayor o menor éxito para promover el enraizamiento de otras especies como el olivo nativo (*Elaeocarpus robustus* Roxb.) (Rahman et al 2003), *Aristolochia longa* L. (Saidi et al 2009) y pistacho (*Pistacia vera* L.) (Chatibi et al 1995).

El método desarrollado ha permitido por otra parte la realización en condiciones adecuadas de una caracterización histológica de la germinación de la semilla. Este estudio, que ha determinado que los patrones histológicos de diferenciación de las plántulas son similares a la mayoría de las Angiospermas, permitirá evaluar en un futuro nuevos métodos de cultivo y el efecto de diferentes agentes físicos, químicos, hormonales etc., gracias a la utilización de marcadores celulares como pueden ser la presencia de cuerpos lipídicos y cuerpos proteicos, ya utilizados en el caso del olivo (Zienkiewicz et al 2010) y mostrados en esta memoria para el argán.

V-Discusión



Sin duda, el desarrollo de todos estos métodos contribuirá a eliminar las barreras existentes para la reproducción de la especie, uno de los factores más limitantes para su regeneración. Otras acciones adicionales para su sostenibilidad incluyen numerosas propuestas, como el desarrollo de cooperativas, la mejora de las condiciones sociales (especialmente de la mujer), el desarrollo de técnicas de recolección del fruto que respeten el árbol, de un mercado en condiciones justas, de programas de regeneración, de programas de búsqueda de valor añadido, así como programas de mejora varietal etc., son el objeto de amplio debate (Stussi et al 2005; Bellefontaine 2010).





Conclusiones



VI-Conclusiones



1. La adaptación y aplicación al argán de un sistema de clasificación de cultivares de olivo basado en parámetros morfológicas del árbol, hoja, fruto completo y endocarpo ha permitido distinguir 6 variantes morfológicas de *Argania spinosa* (L.) Skeel en la región de Chouihya (Berkane, Marruecos), que hemos denominado argán (genérico), argán de árbol pequeño, argán de fruto alargado, argán de hojas pequeñas, argán de fruto apuntado, argán de fruto grande y argán sin fruto. Su asignación a subespecies o variedades es dependiente de estudios futuros sobre distribución geográfica y capacidad de hibridación.
2. El argán posee una fenología floral compleja y variable en cuanto al número de glomérulos florales, distribución y número de estambres y características morfológicas del gineceo. El uso por primera vez en esta planta de métodos de análisis morfométrico a MET ha permitido caracterizar la existencia de una amplia variabilidad en su polen en relación a sus diámetros polar y ecuatorial así como en el número de aperturas. Todas estas diferencias morfológicas reflejan claras adaptaciones a un ambiente extremo y cambiante, así como las diferencias genéticas existentes.
3. El estudio de las actividades enzimáticas superóxido dismutasa y esterasa mediante análisis isoenzimático en diversos tejidos del argán ha permitido detectar amplias variaciones en las actividades totales y en la distribución y proporción relativa de isoformas

VI-Conclusiones



presentes en las 6 variantes morfológicas de la planta, que aseguran sin duda una buena modulación de la capacidad antioxidante y esterolítica de la planta en respuesta a las diferencias ambientales. Estas capacidades pueden ser trasladadas al aceite.

4. El argán posee proteínas de almacenamiento de semillas 11S de tipo legumina, similares a las presentes en las semillas de diversas Angiospermas. Estas proteínas, que hemos caracterizado a nivel bioquímico como globulinas en términos de solubilidad, y de las que ha sido propuesto un modelo de organización en subunidades α/β , constituyen un importante aporte nutricional para el ganado, contribuyendo además probablemente a las capacidades saludables del aceite.

5. El extensivo análisis químico de aceites de argán de varias procedencias geográficas ha permitido observar una gran variabilidad en numerosos parámetros, así como la presencia de características comunes y diferenciales respecto a otros aceites de uso alimentario, que incluyen un elevado contenido en ácidos grasos oleico y linoleico, y bajo contenido en ácidos grasos saturados como palmítico y esteárico, así como en colesterol. Finalmente, los aceites analizados contiene niveles muy altos de tocoferoles delta y gamma, aportando así propiedades antioxidantes muy apreciables. La estabilidad de los aceites es sin embargo escasa, afectando su calidad

VI-Conclusiones



y dificultando su catalogación en las categorías superiores de la norma marroquí.

6. Se han desarrollado procedimientos alternativos a los existentes para la germinación *ex vitro* e *in vitro* de la semilla y el embrión del argán que han permitido obtener tasas relevantes de germinación y enraizamiento, que niveles adecuados de enraizamiento secundario. El sistema ha permitido realizar un extensivo análisis histológico y estructural de la germinación *in vitro*. Estas mejoras contribuirán al futuro diseño de estrategias de propagación eficiente para mitigar la regresión de esta especie y para la selección de variedades mejoradas.





Bibliografía

VII-Bibliografía





Adlouni A. 2010 . L'huile d'argan, de la nutrition à la santé. *Phytothérapie* 8:89-97.

Ait Aabd N, El Ayadi F, Msanda F, El Mousadik A. 2010. Genetic variability of argan tree and preselection of the candidate plus trees. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj* 38(3):293-301.

Ait Aabd N, El Ayadi F, Msanda F, El Mousadik A. 2011. Evaluation of agromorphological variability of Argan tree under different environmental conditions in Morocco: Implication for selection. *Int. J. Biodiv. Conserv.* 3(3):73-82.

Alché JD, Castro AJ, Rodríguez-García MI. 1999. Expression of oleosin genes in the olive (*Olea europaea* L.) anther. En: *Anther and pollen: from Biology to Biotechnology*. Clements C, Pacini E, Audran JC (eds.). Springer-Verlag. Pp. 91-99

Alché JD, Corpas FJ, Rodríguez-García MI, del Río LA. 1998. Identification and immunolocalization of superoxide dismutase isoenzymes of olive pollen. *Physiol. Plant.* 104:772-776.

Alché JD, Jimenez-Lopez 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 Chem.* 54:5562-5570.

Allen RD, Cohen EA, Vonder-Haar RA, Adams CA, Ma DP, Nessler CL, Thomas TL. 1987. Sequence and expression of a gene encoding an albumin storage protein in sunflower. *Mol. Gen. Genet.* 210:211-218.

Allen RD, Webb RP, Schake SA. 1997. Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. *Free Radic. Biol. Med.* 23:473-479.

Al-Menaie HS, Bhat NR, AboEl-Nil M, Al-Shatti A. 2008. Nursery Production Techniques for Argan (*Argania Spinosa* L.). *Eur. J. Sci. Res.* 23(4):639-643.

VII-Bibliografía



Al-Menaie HS, Bhat NR, AboEl-Nil M, Al-Dosery SM, Al-Shatti AA, Gamalin P, Suresh N. 2007. Seed germination of argan (*Argania spinosa* L.). Amer.-Euras. J. Sci. Res. 2(1):1-4

Alouani M, Bani-Aameur F. 2004. Argan (*Argania spinosa* (L.) Skeels) seed germination under nursery conditions: effect of cold storage, gibberelic acid and mother-tree genotype. Ann. For. Sci. 61:191-194.

Alscher RG, Erturk N, Heath LS. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. J. Exp. Bot. 53:1331-1341.

Altenbach SB, Kwo CC, Staraci LC, Pearson KW, Wain WC, Georgescu A, Townsend J. 1992. Accumulation of a Brasil nut albumin in seeds of transgenic canola results in enhanced levels of seed protein methionine. Plant Mol. Biol. 18:235-245.

Altenbach SB, Pearson KW, Leung FW, Sun SSM. 1987. Cloning sequence analysis of a cDNA encoding a Brasil nut protein exceptionally rich in methionine. Plant Mol. Biol. 8:239-250.

Amzal H, Alaoui K, Tok S, Errachidi A, Charof R, Cherrah Y, Benjouad A. 2008. Protective effect of saponins from *Argania spinosa* against free radical-induced oxidative haemolysis. Fitoterapia. 79(5):337-344.

Anisimova I, Flodo RJ, Tathan AS, Shewry PR. 1994. Heterogeneity and polymorphism of sunflower seed 2S albumins. Biotech. Biotechnol. Equip. 7:63-69.

Archibad EEA. 1939. The development of the ovule and seed of jointed cactus (*Opuntia aurantiaca*, L.). S. Afr. J. Sci. 36:195-211.

Arizawa M, Kinghorn AD, Cordell GA, Phoebe CH, Fansworth NR. 1985. Plants anticancer agents XXXVI: Schottenol glucoside from *Baccharis cordofolia* and *Ipomopsis agregata*. Planta Medica. 6:544-545.

Asada K. 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. En: Causes of photo oxidative stress and

VII-Bibliografía



amelioration of defense systems in plants. Foyer CH, Mullineaux PM (eds). CRC. Press. Inc. Boca Raton FL. USA. Pp.77-104.

Aung UT, McDonald MB. 1995. Changes in esterase activity associated with peanut (*Hypogea* L.) seed deterioration. *Seed Sci. Techn.* 23(1):101-111.

Bani-Aameur F. 2000. Phenological phases of *Argania spinosa* L. flower. *For. Genet.* 7:333- 338.

Bani-Aameur F. 2002. Variation of pollen grain size, fertility and pore number in *Argania spinosa* L. Skeels (*Sapotaceae*). *Forest Genet.* 2(9):115-118.

Bani-Aameur F. 2002. *Argania spinosa* L. Skeels flowering phenology. *Gen. Res. Crop. Evol.* 49:11-19.

Bani-Aameur F. 2004. Morphological diversity of argan (*Argania spinosa* L.) Skeels populations in Morocco. *Forest Genet.* 11(3-4):311-316.

Bani-Aameur F. Alouani M. 1999. Viabilité et dormance des semences d'arganier. *Ecol. Medit.* 25:75-86.

Bani-Aameur F, Ferradous A. 2001. Fruit and stone variability in tree argan (*Argania spinosa* L. Skeels) population. *For. Genet.* 8(1):39-45.

Bani-Aameur F, Ferradous A, Dupuis P. 1999. Typology of fruits and stones of *Argania spinosa* (*Sapotaceae*). *For. Genet.* 6(4):213-219.

Bani-Aameur F, Sipple-Michmerhuizen J. 2001. Germination and seedling survival of argan (*Argania spinosa* L.) under experimental saline conditions. *J. Ar. Environ.* 49:533-540.

Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G. 1987. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *Crit. Rev. Biochem.* 22:111-180.

Barranco D. 1994. Caracterización del material vegetal en olivo. *Fruticultura.* 62. Sup: 3-7.

VII-Bibliografía



Barranco D, Rallo L. 1984. Las variedades de olivo cultivadas en Andalucía. Ministerio Agricultura. Junta de Andalucía. Madrid. España. 384pp.

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

Barros M, Fleuri LF, Macedo GA. 2010. Seed lipases: sources, applications and properties – a review. Braz. J. Chem. Eng. 27(1). <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-66322010000100002>

Bartsh H, Nair J, Owen RW. 1999. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. Carcinog. 20:2209-2218.

Battino. 1929. Recherches sur l'huile et sur quelques autres produits de l'arganier. Librairie le Français. Paris.

Baum JA, Scandalios JG. 1979. Developmental expression and intracellular localization of superoxide dismutase in maize. Differ. 13:133-140.

Baum JA, Scandalios JG. 1981. Isolation and characterization of the cytosolic and mitochondrial superoxide dismutase of maize. Arch. Biochem. Biophys. 206:249-264.

Beauchamp C, Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal. Biochem. 44(1):276-287.

Beccari JB. 1745. De frumento de bononiensi scientarium et artium. Instituto atque. Academia commentarii. Bologna. 2:122-127.

Bechtel DB, Wilson JD, Shewry PR. 1991. Immunocytochemical localization of the wheat storage protein triticin in developing endosperm tissue. Cereal. Chem. 68:573-577.



Bellefontaine R. 2010. De la domestication à l'amélioration variétale de l'arganier (*Argania spinosa* L. Skeels?). *Sécheresse*. 21(1):42-53.

Benabid A. 1985. Les écosystèmes forestiers, préforestiers et pré-steppiques du Maroc: diversité, répartition biogéographique et problèmes posés par leurs aménagement. *For. Medit.* 7(1):53-64.

Ben-Ali S. 2011. Caracterización de proteínas de almacenamiento en la semilla del olivo y en subproductos de la extracción del aceite. Memoria "Master of Science" en Olivicultura y Elaiotecnia. Universidad de Córdoba/CIHEAM

Ben-Ali S. 2011. Caractérisation quantitative et qualitative des protéines de réserve des graines d'olives. Memoria "Master of Science" en Agriculture Durable. Ministère de l'Agriculture et de l'Environnement (IRESA), Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche scientifique et Institut Supérieur Agronomique de Chott Mariem. République Tunisienne.

Bennani H, Drissi A, Giton F, Kheuang L, Fiet J, Adlouni A. 2006. Antiproliferative effect of polyphenols and sterols of virgin argan oil on human prostate cancer cell lines. *Cancer Detect. Prev.* 31(1):64-69.

Berka S, Harfouche A. 2001. Effets de quelques traitements physico-chimiques et de la température sur la faculté germinative de la graine d'arganier. *Rev. For. Fr.* 53(2):125-130.

Bhattacharya J, Khuspe SS. 2000. *In vitro* and *in vivo* germination of papaya (*Carica papaya* L.) seeds. *Sci. Hortic.* 91:39-49.

Bharali S, Chrungoo NK. 2003. Amino acid sequence of the 26 kDa subunit of legumin-type seed storage protein of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench): Molecular characterization and phylogenetic analysis. *Phytochemistry*. 63:1-5.

Blackman SA, Brown KL, Manalo JR, Roos EE. 1996. Embryo culture as a means to rescue deteriorated maize seeds. *Crop Science*. 36:1693-1698.

VII-Bibliografía



Bollini R, Vitale A, Chrispeels MJ. 1978. Characterization and subcellular localization of vicilin and phytohemagglutinin, the two major reserve proteins of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta*. 142:291-298.

Boluda L, Alonso C, Fernández-Caldas E. 1998. Purification, characterization and partial sequencing of two new allergens of *Olea europaea*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 101:210-216.

Boudy P. 1950. Monographies et traitements des essences forestières. En *Economie forestières*. Vol II. Fasc I. Larose. Pp 122-134. Paris.

Boudy P. 1952. *Guide forestier en Afrique du Nord*. La Maison Rustique. Paris.

Bousselmane F, Kenny L, Chlyah H. 2001. Optimisation des conditions de culture pour l' enracinement *in vitro* de l' arganier (*Argania spinosa* L.). *CR. Acad. Sci. Paris. Sciences de la vie.* 324:995-1000.

Bowler C, Camp MV, Montagu MV, Inzé D. 1994. Superoxide dismutase in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13:199-218.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:680-685.

Braun-Blanquet J, Maire R. 1924. Études sur la végétation et la flore marocaine. *Mém. Soc. Sc. Nat. Maroc.* 8:1-239.

Bregelius FR, Traber MG. 1999. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB. J.* 13:1145-1155.

Bridges SM, Salin ML. 1981. Distribution of iron-containing superoxide dismutase in vascular plants. *Plant Physiol.* 68:275-278.

Bueno P, Varela J, Giménez- Gallego G, del Río LA. 1995. Peroxisomal copper, zinc superoxide dismutase. Characterization of the isoenzyme from watermelon cotyledons. *Plant Physiol.* 108:1151-1160.



Butteroni C, Afferni C, Barletta B, Iacovacci P, Corintia S, Brunetto B, Tinghino R, Ariano R, Panzani RC, Pini C, Di Felice G. 2005. Cloning and Expression of the *Olea europaea* Allergen Ole e 5, the Pollen Cu/Zn Superoxide Dismutase. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 137:9-17.

Campbell S, Stone W, Whaley S, Krishnan K. 2003. Development of gamma γ -tocopherol as a colorectal cancer chemopreventive agent. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 47:249-259.

Carretero B, Rodríguez-García MI. 1995. The pollen grain wall as a site for passage of lanthanum in tomato, *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae). *Amer. J. Bot.* 82:31-36.

Casey R, Domoney C, Ellis N. 1986. Legume storage proteins and their genes. In Mifflin (ed). *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*. Vol 3. Oxford University Press. Pp. 1-95.

Casey R, Domoney C, Smith AM. 1993. Biochemistry and molecular biology of seed products. In *Pea: Genetics Molecular Biology and Biotechnology*. Casey R, Davies DR (eds). CAB International. Wallingford. Pp. 121-164.

Castro AJ, Rejón JD, Fendri M, Jiménez-Quesada MJ, Zafra A, Jiménez-López JC, Rodríguez-García MI, Alché JD. 2010. Taxonomical discrimination of pollen grains by using confocal laser scanning microscopy (CLSM) imaging of autofluorescence. En: *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education Vol. 1*. Méndez-Vilas A, Díaz-Álvarez J (eds.). Formatex Research Center. Badajoz. Pp:607-613.

Charrouf Z, Guillaume D. 1999. Ethnoeconomical, ethnomedical and phytochemical study of *Argania spinosa* skeels. *J. Ethnopharmacol.* 67:7-14.

Charrouf Z, El Kabous A, Nouaim R, Bensouda Y, Yaméogo R. 1997. Étude de la composition chimique de l'huile d'Argan en fonction de son mode d'extraction. *Al Biruniya Reviews in Marine Pharmacology.* 13:35-39.

VII-Bibliografía



Charrouf Z, Guillaume D. 2007. Phenols and polyphenols from *Argania spinosa*. Amer. J. Food Technol. 2(7):679-683.

Charrouf Z, Guillaume D. 2008. Argan oil : Occurrence, composition and impact on human health. Eur. J. Lipid. Sci. Technol. 110:632-636.

Charrouf Z, Hafidi A, El Hadrami I, Ajana H. 1999. Composition phénolique de la pulpe des fruits d'arganier (*Argania spinosa* L. Skeels) et relation avec leurs caractéristiques morphologiques. Agrochimica. 43 :137-150.

Chatibi A, Kchouk ML, Ben Abdellah F, Zemni H, Ghorbel A. 1995. Rooting improvement of *Pistacia vera* L. cv. Mateur by *in vitro* culture of apices and cutting. Acta Hort. 419:213-219.

Cherki M, Berrougui H, Drissi A, Adlouni A, Hhalil A. 2006. Argan oil: Which benefits on cardiovascular diseases?. Pharmacol. Res. 54:1-5.

Cherki M, Derouiche A, Drissi A, El Messal M, Bamou Y, Idrissi-Ouadghiri A, Khalil A, Adlouni A. 2005. Consumption of argan oil may have an antiatherogenic effect by improving paraoxonase activities and antioxidant status: Intervention study in healthy men. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 15(5):352-360.

Ching-Nen, Shu-Mei Pan. 1996. Assay of superoxide dismutase activity by combining electrophoresis and densitometry. Bot. Bull. Acad. Sin. 37:107-111.

Chrispeels MJ. 1991. Sorting of proteins in the secretory system. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42:21-53.

Christen S, Woodall AA, Shigenaga MK, Southwell-Keely PT, Duncan MW, Ames BN. 1997. Gamma-tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO (X) and complements alpha-tocopherol: physiological implications. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 94:3217-3223.

VII-Bibliografía



Collada C, Caballero RG, Casado R, Aragoncillo C. 1991. Seed storage proteins in *Fagaceae*: similarity between *Castanea* globulins and *Quercus* glutelins. *Plant Sci.* 75:145-154.

Coney RV, Franke AA, Harwood PJ, Hatch-Pigott V, Custer LJ, Mordan LJ. 1993. Gamma-tocopherol detoxification of nitrogen dioxide: Superiority to alpha-tocopherol. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 90:1771-1775.

Corpas FJ. 1992. Metabolismo del oxígeno activado y de los ureidos en peroxisomas de hojas de *Pisum sativum L.* en condiciones de salinidad. Tesis doctoral. Universidad de Granada.

Corpas FG, Ocaña AF, Carreras A, Valderrama R, Luque F, Esteban FJ, Serrano MR, Chaki M, Pedrajas JR, Sandalio LM, del Rio LA, Barroso JB. 2006. The expression of different superoxide dismutase forms is cell-type dependent in olive (*Olea europaea L.*) leaves. *Plant Cell. Physiol.* 47(7):984-994.

Corpas FJ, Sandalio LM, del Rio LA, Trelease RN. 1998. Copper-zinc superoxide dismutase is a constituent enzyme of the matrix of peroxisomes in the cotyledons of oil seed plants. *New Phytol.* 138:307-314.

Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Leido EO, Hernández JA, León AM, Sevilla F, del Rio LA. 1991. Subcellular distribution of superoxide dismutase in leaves of ureide-producing leguminous plants. *Physiol. Plant.* 82:285-291.

Cotton. 1888. Étude sur la noix d'argan. Nouveau principe immédiat. *J. Pharm. Chim.* 18:298.

Crespo MB, Camuñas E, Cristóbal JC. 2007. Precisiones corológicas y taxonómicas sobre la flora de Alicante. *Flora Montiberica.* 36:52-64.

Crouch ML, Tenbarger KM, Simon AE, Ferl R. 1983. cDNA clones for *Brassica napus* seed storage proteins: evidence from nucleotide sequence analysis that both subunits of napin are cleaved from a precursor polypeptide. *J. Mol. Appl. Genet.* 2(3):273-283.

VII-Bibliografía



Daza MC, Sandalio LM, Quijano-Rico M, Luis A, del Rio LA. 1993. Isoenzyme pattern of superoxide dismutase in coffee leaves from cultivars susceptible and resistant to the rust *Hemileia vastatrix*. J. Plant Physiol. 141(5):521–526.

Del Río LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Gómez M, Barroso JB. 2002. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. J. Exp. Bot. 53:1255-1272.

Del Río LA, Lyon DS, Olah I, Glick B, Salin ML. 1983. Immunocytochemical evidence for a peroxisomal localization of manganese superoxide dismutase in leaf protoplasts from a higher plant. Planta. 158:216-224.

Del Rio LA, Sandalio LM, Altomare DA, Zilinskas BA. 2003. Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. J. Exp. Bot. 54:923-933.

Dickinson CD, Hussein EHA, Nielsen NC. 1989. Role of post translational cleavage in glycinin assembly. Plant Cell. 1:459-469.

Drissi A, Girona J, Cherki M, Godas G, Derouiche A, El Messal M, Saile R, Kettani A, Solà R, Msana L, Adluni A. 2004. Evidence of hypolipemiant and antioxidant properties of argan oil derived from the argan tree (*Argania spinosa*). Clin. Nutr. 23:1159-1166.

Droillard MJ, Paulin A. 1990. Isozymes of superoxide dismutase in mitochondria and peroxisomes isolated from petals of carnation (*Dianthus Caryophyllus*) during senescence. Plant Physiol. 94:1187-1192.

Duranti M, Guerrieri N, Takajashi T, Cerietti P. 1988. The legumin-like storage proteins of *Lupinus albus* seeds. Phytochem. 27:15-23.

El-Aboudi A, Peltier JP, Carlier G, Doche B. 1992. La carte de la végétation des Ait Baha (Anti-Atlas occidental, Maroc) et son intérêt pour l'édaphologie. Feddes Repert. 103:121-126.

VII-Bibliografía



El Moussadik A, Fakir S. 1995. Analyse de la variabilité des populations endémiques d'arganier (*Argania spinosa* L.). Actes du Colloque international sur l'arganier. Université Ibn Zhor. Agadir. Pp. 63-68.

El Oualidi J. 1985. L'arganier (*Argania spinosa* L.) Skeels. Mémoire de Maitrise de Biologie des Organismes et des Populations. Université de Science. Languedoc. Montpellier.

Ehrig FR. 1974. Die Arganie: Charakter, ökologie und wirtschaftliche Bedeutung eines Tertiär Reliktes in Marroko. Petermanns Geogr. Mitt. 118:117-125.

Emberger L. 1924. A propos de la distribution géographique de l'arganier. Bull. Soc. Sc. Nat. Maroc. 4:151-153.

Emberger L. 1925. Le domaine naturel de l'arganier. Bull. Soc. Bot. France. Paris. 72:770- 774.

Emberger L. 1938. Les arbres du Maroc et comment les reconnaître. Larose. Paris.

Emberger L. 1939. Aperçu général sur la végétation du Maroc. Commentaire de la carte phytogéographique du Maroc au 1/500 000. Bern, Veröffentlichungen. Geobotanischen. Institutes Rübél.

Emberger L. 1960. Traité de botanique systématique. En : Vol 2. Les végétaux vasculaires. Chaudefaud Emberger M (ed). Mason. Paris. Pp. 852-855.

Engler A. 1897. Die natürlichen Pflanzenfamilien. Leipzig.

Entwistle J, Knudson S, Muller M, Cameron-Mills V. 1991. Amber codon suppression: The *in vivo* analysis of two C-hordein genes from barley. Plant Mol. Biol. 17:1217-1231.

Ericson ML, Rodin J, Lenman M, Glimellus K, Josefsson LG, Rask L. 1986. Structure of the rapeseed 1.7 S storage protein napin and its precursor. J. Biol. Chem. 261:14576-14581.



FAO. 2010. The Second Report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. Commission on genetic resources for food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, 2010.

Farines M, Charrouf M, Soulier J. 1981. The sterols of *Argania spinosa* seed oil. *Phytochem.* 20:2038-2039.

Fendri M, Trujillo I, Trigui A, Rodríguez-García MI, Alché Ramírez JD. 2010. Simple sequence repeat identification and endocarp characterization of olive tree accessions in a tunisian germplasm collection. *HortSci.* 45(10):1429-1436.

Fernández MC, Rodríguez- García MI. 1990. Passage of lanthanum through the pollen wall of *Olea europaea* during pollen development. *Plant Cell. Rep.* 8:667-761.

Fernández-Escobar R, Moreno R, García-Creus M. 1999. Seasonal changes of mineral nutrients in olive leaves during the alternate-bearing cycle. *Scientia Hort.* 82(1-2):25–45.

Ferradous A. 1995. Diversité génétique de quelques caractères morphologiques du fruit et de la graine d'arganier (*Argania spinosa* L.). Tesis D.E.S. Universidad Ibn Zhor. Agadir.

Fink RC, Sandalios JG. 2002. Molecular evolution and structure-function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases. *Arch. Biophys.* 399:19-36.

Fridovich I. 1986. Superoxide dismutase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 58:61-97.

Fridovich I. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science.* 201:875–880.

VII-Bibliografía



Fridovich I, Kellog EW. 1975. Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J. Biol. Chem.* 250(22):8807-8812.

Fujiwara T, Nambara E, Yamagishi K, Goto D, Naito S. 2002. Storage proteins. En: *The Arabidopsis Book*, Somerville C, Meyerowitz E. (eds). American society of plant biologists: Rockville MD.

Fukuda T, Maruyama N, Kanazawa A, Abe J, Shimamoto Y, Hiemori M, Tsuji H, Tanisaka T, Utsumi S. 2005. Molecular analysis and physicochemical properties of electrophoretic variants of wild soybean Glycine soja storage proteins. *J. Agric. Food Chem.* 53:3658-3665.

Gabriel JM, Moris G. 2002. *Biología vegetal*. 1ª edición. Bellisco. Ediciones Técnicas y Científicas. Madrid.

Galau GA, Wang HY, Hughes W. 1992. Cotton Mat5-A (C164) Gene and Mat5-D cDNAs encoding methionine-rich 2S albumin storage proteins. *Plant Physiol.* 99:779-782.

Galili G, Herman EM. 1997. Protein bodies: storage vacuoles in seeds. *Adv. Bot. Res.* 25:113-140.

Gatehouse JA, Croy RRD, Boulter D. 1984. The synthesis and structure of pea storage proteins. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 1:287-314.

Geeraerts A, Raeymaekers JAM, Vinckier S, Pletsers A, Smets E, Huysmans S. 2009. Systematic palynology in *Ebenaceae* with focus on *Ebenoideae*: Morphological diversity and character evolution. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 153(3-4):336-353.

Gentil L. 1906. La nature. En *L'arganier ou l'arbre du Souss* (Maroc). Pp. 171-174.

Ghayour-Mobarhan M, Shapouri-Moghaddam A, Azimi-Nezhad M, Esmaili H, Parizadeh SM, Safarian M, Kazemi-Bajestani SM, Khodaei GH, Hosseini SJ, Parizadeh SM, Ferns GA. 2009. The relationship between established coronary risk factors and serum copper and zinc

VII-Bibliografía



concentrations in a large Persian cohort. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 23(3):167-175.

Giannoulia K, Banilas G, Hatzopoulos P. 2007. Oleosin gene expression in olive. *J. Plant Physiol.* 164:104-107.

Gomez LD, Noctor G, Knight, MR, Foyer, CH. 2004. Regulation of calcium signalling and gene expression by glutathione. *J. Exp. Bot.* 55:1851-1859.

Gubisová M, Klcová L. 2012. Use of *in vitro* culture for improving germination of forage and grain legume seeds. *Bioversity International – FAO.* Issue No.141. Pp. 15-18.

Hall TC, Mcleester RC, Bliss FA. 1977. Equal expression of the maternal and paternal alleles for polypeptide subunits of the major storage protein of the bean *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 59:1122-1124.

Halliwell B.1989. Superoxide iron vascular endothelium and reperfusion injury. *Free Radic. Res. Commun.* 6(5):315-318.

Halliwell B, Gutteridge JMC.1985. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford: Clarendon Press. Pp:162-164.

Halliwell B, Gutteridge JMC. 2001. Micronutrients: Oxidant/antioxidant status. *Br. J. Nutri.* 85, suppl 2:S67-S74.

Hammami SBM, de la Rosa R, Sghaier-Hammami B, León L, Rapoport HF. 2012. Reliable and relevant qualitative descriptors for evaluating complex architectural traits in olive progenies. *Scientia Hort.* 143:157–166.

Hammami SBM, León L, Rapoport HF, de la Rosa R. 2011a. Early growth habit and vigour parameters in olive seedlings. *Sci. Hortic. (Amsterdam)* 129(4):761-768.

Hammami SBM, Manrique T, Rapoport HF. 2011b. Cultivar-based fruit size in olive depends on different tissue and cellular processes throughout growth. *Sci Hortic (Amsterdam)* 130(2):445-451.



Hammami SBM, Rapoport HF. 2012. Quantitative analysis of cell organization in the external region of the olive fruit. Submitted 2012

Hara-Nishimura I, Takeuchi Y, Inoue K, Nishimura M. 1993. Vesicle transport and processing of the precursor to 2S albumin in pumpkin. *J. Plant. 4*:793-800.

Harris N, Henderson J, Abbot SJ, Mulcrone J, Davies JT. 1993. Seed development and structure. En: *Seed storage compounds: biosynthesis, interaction and manipulation.* Shewry PR, Stobart AK (eds). Clarendon Press. Oxford. Pp:2-21.

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

Hidalgo FJ, Alaiz M, Zamora R. 2002. Low molecular weight polypeptides in virgin and refined olive oils. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 79:685–689.

Hidalgo FJ, Zamora R. 2006. Peptides and proteins in edible oils: Stability, allergenicity, and new processing trends. *Trends Food Sci. Technol.* 17(2)56-63.

Higgins TJV, Chandler PM, Randall PJ, Spencer D, Beach LR, Blagrove RJ, Kortt RJ, Inglis AS. 1986. Gene structure, protein structure, and regulation of the synthesis of a sulfur-rich protein in pea seeds. *J. Biol. Chem.* 261:11124-11130.

Hilali M, Charrouf Z, El aziz A, Hachimi L, Guillaume D. 2005. Influence of origin and extraction method on Argan oil physic-chemical characteristics and composition. *J. Agric. Food Chem.* 53:2081-2087.

Hodgson EK, Fridovich I. 1975. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: Inactivation of the enzyme. *Biochem.* 14:5294-5299.

Host G. 1781. *Nachrichten von Marokkosund. En den Jahren 1760 bis 1768.* Christian Gottlab Press. Kopenhagen. Pp: 304-305.



Hou A, Liu K, Catawatharakul N, Tang X, Nguyen V, Keller WA, Tsang EW, Cui Y. 2005. Two naturally occurring deletion mutants of 12S seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 222:512-520.

Hou WC, Lu YL, Liu SY, Lin YH. 2003. Activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in leaves of different cultivars of *Liriope spicata* L. on 10% SDS-PAGE gels. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 44:37-41.

Hull G, Halford NG, Kreis M, Shewry PR. 1991. Isolation and characterization of genes encoding rye prolamins containing a highly repetitive sequence motif. *Plant Mol. Biol.* 17:1111-1115.

Huyghebaert A, Hendricks H. 1974. Quelques aspects chimiques, physiques et technologiques de l'huile d'argan. *Oléagineux.* 1:29-31.

Iglesias Andreu LG, Luna Rodríguez M. 2008. Polimorfismo isoenzimático en la población de *Pinus hartwegii* Lindl. del Cofre de Perote, Ver., México. *Ecosistemas.* 17(1):115-122.

Irwin SD, Keen JN, Findlay JBC, Lord JM. 1990. The *Ricinus communis* 2S albumin precursor: A single preprotein may be processed in to two different heterodimeric storage proteins. *Mol. Gen. Genet.* 222:400-408.

Jaaska V. 1980. Electrophoretic survey of seedling esterases in wheat in relation to their phylogeny. *Theor. Appl. Genet.* 56:273-284.

Javady T, Arzani K. 2001. Pollen morphology of five Iranian olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *J. Agric. Sci. Technol.* 3:37-42.

Jirong P, Nicholas PH. 2002. The role of GA-mediated signaling in the control of seed germination. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:376-381.

Kahler AL, Allard RW, Miller RD. 1984. Mutation rates for enzyme and morphological loci in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Genet.* 106:729-734.

VII-Bibliografía



Kanematsu S, Asada K. 1991. Chloroplast and cytosol isozymes of CuZn-superoxide dismutase: their characteristic amino acid sequences. *Free Radic. Res. Commun.* 12–13:90-383.

Kasarda DD, Autran JC, Lew EJJ, Nimmo CC, Shewry PR. 1983. N-terminal amino acid sequences of w-gliadins and w-secalins: Implications for the evolution of prolamin genes. *Bioch. Biophys. Acta.* 747:138-150.

Khallouki F, Spiegelhalder B, Bartsch H, Owen RW. 2005. Secondary metabolites of the argan tree (Morocco) may have disease prevention properties. *Afr. J. Biotechnol.* 4(5):381-388.

Khallouki F, Younas C, Soulimani R, Oster T, Charrouf Z, Spieglehalder B, Batsch H, Owen RW. 2003. Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, squalene, sterols, tocopherols and chemopreventive effects. *Ene. J. Cancer prev.* 12:67-75.

Kliebenstein DJ, Monde RA, Last RL. 1998. Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiol.* 118:637-650.

Knox RB. 1984. Pollen- pistil interactions. En: Cellular interactions. Linskens HF, Heslop- Harrison (ed). *Encycl. Plant Physiol.* 17:508-608.

Koidis A, Boskou D. 2006. The contents of proteins and phospholipids in cloudy (veiled) virgin olive oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108:323–328.

Kortt AA, Caldwell JB. 1990. Low molecular weight albumins from sunflower seed: Identification of a methionine-rich albumin. *Phytochem.* 29 :2805-2810.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.

L'africain JL. 1956. Description de l'Afrique (nouvelle edition traduite de l'italien par Epaulard A). Vol II. Maison neuve. Paris.

VII-Bibliografía



Lanza B, Marsilio V, Martinelli N. 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: 24-219.

Lanza B, Marsilio V, Martinelli N. 1996. Olive pollen ultrastructure: characterization of exine pattern through image analysis-scanning electron microscopy (IA-SEM). *Sci. Hort.* 65:283–294.

Leclerc L. 1877. Traduction du traité des simples d’Ibn El Beithar. Institut Nationale de France. Paris. Vol 23. Pp :53-54, Pp :230-239, Pp :244-245.

Lee EH, Faulhaber D, Hauson KM, Ding W, Peters S, Kodali S, Granstein RD. 2004. Dietary lutein reduces ultraviolet radiation- induced inflammation and immunosuppression. *J. Invest. Dermatol.* 122:510-517.

Lending CR, Chesnut RS, Shaw KL, Larkins BA. 1992. Synthesis of zeins and their potential for amino acid modification. En: *Plant protein engineering.* Shewry PR, Gutteridge S (eds). Cambridge University Press. Cambridge. Pp: 209-218.

Lerma-García MJ. 2007. Classification of vegetable oils according to their botanical origin using amino acid profiles established by direct infusion mass spectrometry. *Rapid Comm. in Mass Spectr.* 21(22).

Maire R. 1939. Les arganiers des Beni Snassen. *Botaniska Notiser.* Sweden.

Majourhat K, Hafidi A, Piqueras A, Martínez-Gómez P. 2007. Multiplicación *in vitro* de la especie oleaginosa argania (*Argania spinosa* L. *Skeels*) procedente de Marruecos. *Actas de Horticultura.* 48:647-649.

Majourhat K, Jabbar Y, Hafidi A, Martínez-Gómez P. 2008. Molecular characterization and genetic relationships among most common identified morphotypes of critically endangered rare Moroccan species *Argania spinosa* (*Sapotaceae*) using RAPD and SSR markers. *Ann. Forest Sci.* 65(8):805

VII-Bibliografía



Mandujano MC, Montana C, Rejas-Aréchiga M. 2005. Breaking seed dormancy in *Opuntia rastrera* from the Chihuahuan desert. *J. Ar. Environ.* 62:15-21.

Marfil R. 2008. Parámetros de calidad y componentes con interés nutricional del aceite de argán (*Argania spinosa*). Tesis Doctoral Universidad de Granada.

Marjet ML, Françoise G, Kees R, Alfons GJ, Voragen, Harry JW. 1997. Partial purification and characterization of pectin methylesterase from green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 45(3):572-577.

Martens J, Fretz TA. 1980. Identification of eight crabapples by pollen surface sculpture. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105(2): 257–263.

Maruyama N, Fukuda T, Saka S, Inui N, Kotoh J, Miyagawa M, Hayashi M, Sawada M, Moriyama T, Utsumi S. 2003. Molecular and structural analysis of electrophoretic variants of soybean seed storage proteins. *Phytochemistry* 64:701-708.

Maschke O. 1859. Über den bau und die bestandtheile der kleberblaschen in *Bertholletia*, deren entwicklung in *Ricinus*, nebst einigen bemerkungen über amyloplasten. *Botanische Zeitung.* 17:409-447.

Maurin R. 1992. L'huile d'argan: *Argania spinosa* L. Skeels, Sapotacea. *Rev. Fr. Corps Gras.* 56:139-146.

McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244:6049-6055.

McNeill J, Barrie FR, Burdet HM, Demoulin V, Hawksworth DL, Marhold K, Nocolson DH, Prado J, Silva PC, Skog JE, Wiersema JH, Turland NJ. (2006). International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code). *Regnum Vegetabile* 146. A.R.G. Gantner Verlag KG.

VII-Bibliografía



Mekhfi H, Belmekki F, Ziyat A, Legssyer A, Bnouham M, Aziz M. 2012. Antithrombotic activity of argan oil: an in vivo experimental study. *Nutrition*. 28(9):937-941.

Mifflin BJ, Field JM, Shewry PR. 1983. Cereal storage proteins and their effects on technological properties En: *Seed Proteins*. Daussant J, Mosse J, Vaughan J. (eds). Academic Press. London. Pp:255-319.

Milisavljević MDJ, Timotijević GS, Radović SR, Brkljacić JM, Konstantinović MM, Maksimović VR. 2004. Vicilin-like storage globulin from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds. *J. Agric. Food Chem.* 52:5258-5262.

Miloudi A, Belkhouja M. 2009. The contribution to the research of the germination conditions of argan seeds (*Argania spinosa* L. Skeels): The particular study of the water pre-soaking duration and the harvest year of seeds effects on the germination. *Eur. J. Sci. Res.* 25(3):376-383.

Mittler R, Vandersuwer S, Gollery M, Van- Breusegen F. 2004. The reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9:490-498.

Mokhtari M, Zakri B. 1998. Limites phytotechniques et physiologiques au bouturage, marcottage et greffage de l' arganier (*Argania spinosa* L.). En: *Actes du colloque International sur les Ressources végétales*. Université Agadir. Agadir. Marruecos. Pp:124-131.

Moore PD, Webb JA, Collinson ME. 1991. *Pollen analysis*. Second edition. Blackwell Sci. Oxford.

Morton FF, Voss GL. 1987. The Argan tree (*Argania sideroxylon*, Sapotaceae), a desert source of edible oil. *Econ. Bot.* 41:221-233.

Moukal A. 2004. L'arganier, *Argania spinosa* L. (Skeels), usage thérapeutique, cosmétique et alimentaire. *Phytothérapie* 5:135-141.

M'rani-Alaoui M, Alché JD, Rodríguez-García MI. 2003. Características morfológicas de la

VII-Bibliografía



pared del polen del argán (*Argania spinosa* L.). *Polen* 13:203-210.

Msanda F. 1993. Ecologie et cartographie des groupements végétaux d'Anzi (Anti Atlas occidental, Maroc) et contribution à l'étude de la diversité génétique de l'Arganier (*Argania spinosa* L. Skeels). Thèse de Doctorat. Université Joseph Fourier. Grenoble. France.

Msanda F, El Aboudi A, Peltier JP. 2005. Biodiversité et biogéographie de l'arganeraie marocaine. *Cah. Agric.* 14(4):357-364.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15(3):473-497.

Murphy RW, Sites JW, Buth DG, Haufler CH. 1990. Proteins I: Isozyme electrophoresis. En: *Molecular systematic.* Hillis DM, Moritz C (eds). Sinauer Associates. Sunderland. Pp: 45-126.

Navarro-García C. 1989. La vecería en el olivo. *Agricultura: Revista agropecuaria*, 682:410-414.

Nerd A, Irijimovich V, Mizrahi Y. 1998. Phenology breeding system and fruit development of argan (*Argania spinosa*, Sapotaceae) cultivated in Israel. *Econ. Bot.* 52:161-167.

Newmark HL. 1997. Squalene, olive oil and cancer risk, a review and hypothesis. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 6:1101-1103.

Nielsen NC, Dickinson CD, Cho TJ, Thanh VH, Scallan BJ, Fischer RL, Sims TL, Drews GN, Goldberg RB. 1989. Characterization of the glycinin gene family in soybean. *Plant Cell.* 1:313-328.

Nouaim R, Mangin MC, Breuil, Chaussod R. 2001. The argan tree (*Argania spinosa* L.) in Morocco: Propagation by seeds, cuttings and *in vitro* techniques. *Agroforestry. Syst.* 54:71-81.

Ogawa K, Kanematsu S, Asada K. 1996. Intra- and extra-cellular localization of 'cytosolic' CuZn-superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyl. *Plant Cell. Physiol.* 37:9-790.



Ogawa K, Kanematsu S, Asada K. 1997. Generation of superoxide anion and localization of CuZn superoxide dismutase in the vascular tissue of spinach hypocotyls: their association with lignifications. *Plant Cell. Physiol.* 38:1118-1126.

Ortiz AD, Gómez O, Ramis C. 2004. Caracterización bioquímica de poblaciones del complejo de Maleza Arroz Rojo en Venezuela. *Agronomía Trop.* 54(3):257- 273.

Ortiz JM, Aguinagalde I, Martín JP. 2000. Identificación varietal. En Nuez F, Carrillo JM (eds). *Los marcadores genéticos en la mejora vegetal.* Editorial UVP. Valencia. España. Pp: 515-559.

Osborne TB. 1924. *The vegetable proteins.* Longmans. Green. London.

Ouazani N, Lumaret R, Villemur P, Guisto F. 1993. Leaf allozyme variation in cultivated and wild olive trees (*Olea europaea L.*). *J. Hered.* 84:34-42.

Pacini E, Vosa CG. 1979. Scanning Electron Microscopy Analysis of Exine Patterns in cultivars of Olive (*Olea europaea L.*). *Ann. Bot.* 44: 745-748.

Palma JM, Lopez-Huertas E, Corpas FJ, Sandalio LM, del Rio LA. 1986. Manganese superoxide dismutase and higher plant chloroplast: a reappraisal of a controverted cellular localization. *J. Plant Physiol.* 125:427-439.

Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Álvarez-Uría M, Fraile B, Anadón R, José-Sáez F. 2002. *Citología e histología vegetal y animal.* 3ª edición. Mcgraw-Hill-Interamericana de España. S.A.U.

Payne PI. 1987. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on breadmaking quality. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38:141-153.

Peltier JP. 1982. *La vegetation du bassin versant de l' oued Sous (Maroc).* Tesis doctoral. Universidad Grenoble. Francia.

VII-Bibliografía



Pendly GK. 2001. Seed germination experiments in *Opuntia* (*Cactaceae*) of the Northern Chihuahuan desert. *Haseltonia*. 8:42-50.

Petchey EM, Koebner RMD, Gale MD. 1990. Genetic characterization of a further homoeoallelic series of grain esterase loci, Est- 6, in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 79:294-296.

Pilcher BL. 1970. Germination seeds of four species of *Opuntia*. *Cactus and Succul. J.* 42:281-282.

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

Potter RL, Petersen JL, Ueckert DN. 1984. Germination responses of *Opuntia* spp. to temperature scarification and other seed treatments. *Wedd. Sci.* 32:106-110.

Punt W, Hoen PP, Blackmore S, Nilsson S, Thomas A. 2007. Glossary of pollen and spore terminology. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 143:1-81.

Quézel P, Barbéro M, Benabid A, Rivas-Martínez S. 1995. Les structures de végétation arborées à *Acacia* sur les revers meridional de l'Anti-Atlas et dans la vallée inférieure du Draa (Maroc). *Phytocoenologia.* 25:279-304.

Rahman MM, Amin MN, Ahmad S, Ahmed R. 2004. *In vitro* rooting performance of native-olive (*Elaeocarpus robustus* Roxb.) under different auxins and high temperature treatments. *J. Biol. Sci.* 4 (3): 298-303.

Rahmani M. 2005. Composition chimique de l'huile d'argane (vierge). *Cahiers Agric.* 14(5):461-465.

Rallo L. 2005. Variedades del olivo en España: una aproximación cronológica. En: variedades del olivo en España (libro I: elaiografía hispánica). Rallo L, Barranco D, Caballero JM, Del Río C, Martín A, Tous



J, Trujillo I (eds.). Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

Raymond MA, Joseph CS, Patricia SE. 1992. Enhanced strawberry seed germination through *in vitro* culture of cut achenes. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 117(2):313-316.

Reda Tazi M, Berrichi A, Haloui B. 2001. Germination et croissance *in vitro* de l'arganier (*Arganis spinosa* L. Skeels) des Beni-Snassen (Maroc oriental) à différentes concentrations en NaCl. Actes Inst. Agron. Vet. (Maroc) 21(3):163-168.

Reda Tazi M, Berrichi A, Haloui B. 2003. Effect of polyethylene glycol on the *in vitro* germination and growth of *Argania spinosa* L. Skeels of Beni-Snassen (Eastern Morocco). Sci. chang. planétaires/Sécheresse. 14(1):23-27.

Rejon JD, Zienkiewicz A, Rodríguez-García MI, Castro AJ. 2012. Profiling and functional classification of esterases in olive (*Olea europaea*) pollen during germination. Ann. Bot. (en prensa). doi:10.1093/aob/mcs174

Rivera D, Ruiz JB. 1978. *Argania spinosa* L. Skeels (*Sapotaceae*) subespontánea en la Península Ibérica. An. Jard. Bot. Madr. 44(1):173.

Rosati A, Caporali S, Hammami SBM, Moreno-Álias I, Paoletti A, Rapoport HF. 2012. Tissue size and cell number in the olive (*Olea europaea*) ovary determine tissue growth and partitioning in the fruit. Funct. Plant Biol. 39:580–587.

Roselli G. 1979. Identificazione di cultivar di olivo da alcuni caratteri del polline. Riv. Ortoflorofruttic. 63:435-45.

Rowley JR. 1981. Pollen wall characters with emphasis upon applicability. Nord. J. Bot. 1:375- 380.

Rowley JR. 1990. The fundamental structure of the pollen exine. Plant syst. Evol. 5:13-29.

VII-Bibliografía



Rowley JR, Skavaria JJ. 1976. Dynamic changes in pollen wall morphology. En: The evolutionary significance of the exine. Ferguson IK, Muller J (eds). New York Academic Press. London. Pp: 39-66.

Roy J, Banerjee N. 2001. Cultural requirements for *in vitro* seed germination, growth and seedling development of *Geodorum densiflorum* L. Indian. J. Exp. Biol. 39(10): 1041-1047.

Saidi F, Cherif HS, Metidji H, Chaouia C, Rouibi A, Mohamed SR, Hamaidi MS, Adulhussain MS. 2010. Essais de multiplication *in vitro* par organogenese indirecte d' une plante medicinale *Aristolochia Longa* L. Agricultura. No:3-4:71-72.

Salin ML. 1988. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiol. Plant.* 72:681-689.

Salin ML, Bridges SM. 1981. Absence of the iron-containing superoxide dismutase in mitochondria from mustard (*Brassica campestris*). *J. Biochem.* 195:229-233.

Samane S, Christon R, Dombrowski L, Turcotte S, Charrouf Z, Lavigne C, Levy E, Bachelard H, Amarouch H, Marette A, Haddad PS. 2009. Fish oil and argan oil intake differently modulate insulin resistance and glucose intolerance in a rat model of dietary-induced obesity. *Metabolism.* 58(7):909-919.

Samane S, Noël J, Charrouf Z, Amarouch H, Selim-Haddad P. 2006. Insulin-sensitizing and anti-proliferative effects of *Argania spinosa* seed extracts. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 3(3):317-327.

Sandalio LM, Dalurzo MG, Romero-Puertas MC, Del-Rio LA. 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot.* 52:2115-2126.

VII-Bibliografía



Sandalio LM, del Rio LA. 1987. Localization of superoxide dismutase in glyoxysomes from *Citrullus vulgaris*. Functional implication in cellular metabolism. J. Plant Physiol. 127:395-409.

Sandalio LM, Del Rio LA. 1988. Intraorganellar distribution of superoxide dismutase in plant peroxisomas (glyoxysomes and leaf peroxisomes). Plant Physiol. 88:1215-1218.

Sandalio LM, López-Huertas E, Bueno P, del Río LA. 1997. Immunocytochemical localization of copper, zinc superoxide dismutase from watermelon (*Citrullus vulgaris* Scharad.) cotyledons. Free Radic. Res. 26:187-194.

Sasson A. 1993. Biotechnologies in developing countries : Present and future. Vol 1. United Nations Educational. Scientific and Cultural Organization. Paris.

Sayanova O, Mekhedov S, Zheinin L, Khoklova T, Ananlev E. 1993. Nucleotide sequence of a barley hordein gene. Genet. 29:1070-1079.

Schousboe PKA. 1801. Beobachtungenüber das Gewächsreich in Morokko. Leipzig.

Schwartz D, Funchsman L, Mc Grath KH. 1965. Allelicisozymes of the pH7.5 esterase in maize. Genet. 52:1265-1268.

Schwartz HM, Biedron SI, Von Holdt MM, Rehm S. 1964. A study of some plant esterases. Phytochem. 3:189-200.

Seidemann J. 2007. Argan oil. Z. Phytother. 28(6):272-278.

Shewry PR, Halford NG, Tatham AS. 1989. The high molecular weight subunits of wheat, barley and rye: Genetics, molecular biology, chemistry and role of wheat gluten structure and functionality. En: Oxford surveys of plant molecular and cell biology. Miflin BJ (ed). Oxford University Press. Oxford. Pp: 163-219.

VII-Bibliografía



Shewry PR, Halford NG. 2002. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J. Exp. Bot.* 2002, 53, 947-958.

Shewry PR, Halford NG, Tathan AS. 1992. The high molecular weight subunits of wheat glutenin. *J. Cereal Sci.* 15:105-120.

Shewry PR, Napier JA, Tathan AS. 1995. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant Cell.* 7:945-956.

Shewry PR, Tathan AS. 1998. Structural and evolutionary relationships of prolamins. En: *Seed proteins.* Casey R, Shewry PR (eds).. Kluwer Academic. Netherlands.

Shivanna KR, Johri BM. 1985. The angiosperm pollen: Structure and function. Wiley Eastern LTD. New Delli.

Sidiras N, Kasioti S. 1996. Effects of seed size and seed substances of lupins on seedling emergence and root system development in relation to sowing depth, soil water and gibberellin. *J. Agron. Crop Sci.* 177:73-83.

Skvarla JJ, Larson DA. 1966. Fine structural studies of *Zea mays* pollen. I. Cell membranes and exine ontogeny. *J. Amer. Bot.* 53:1112–1125.

Smith JSC, Smith OS. 1992. Fingerprinting crop varieties. *Adv. Agron.* 47:85-140.

Stanley RG, Linskens HF. 1974. Pollen, biology, biochemistry, management. Springer-Verlag. Berlin.

Staswick PE. 1994. Storage proteins of vegetative plant tissues. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45:303-322.

Staubmann R, Nube I, Gubitz GM, Steiner W, Read JS. 1999. Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. seeds. *J. Biotech.* 75:117-126.

Stussi I, Henry F, Moser Ph, Danoux L, Jeanmaire Chr, Guillon V, Benoit I, Charrou Z, Pauly G. 2005. *Argania spinosa*- How ecological

VII-Bibliografía



farming, fair trade and sustainability can drive the research for new cosmetic active ingredients. *SÖFW-Journal*. 131:46-58.

Tai HH, Bush RS. 1997. Analysis of lupin seed protein digestibility using gel electrophoresis and immunoblots. *J. Anim. Sci.* 75:1934-1940.

Tejera ML, Villalba M, Batanero E, Rodríguez R. 1999. Identification, isolation, and characterization of Ole e 7, a new allergen of olive tree pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 104:797-802.

Templeman TS, Demaggio AE, Stetler DA. 1987. Biochemistry of fern spore germination: Globulin storage proteins in *Matteucia struthiopteris* L. *Plant Physiol.* 85:343-349.

Thierry L. 1987. L'arganier au Maroc: Sa description, ses méthodes de multiplication et son application en reforestation. Tesis de ingeniero tecnico. Institut provincial d'enseignement supérieur agronomique et technique. Maroc.

Thomas TL. 1993. Gene expression during embryogenesis and germination: An Overview. *Plant Cell.* 5:1401-1410.

Tous J, Del Rio C, Caballero JM, Rallo L (Eds.). 2005. Libro II. Variabilidad y selección. En: variedades del olivo en España. Rallo L, Barranco D, Caballero JM, Del Río C, Martín A, Tous J, Trujillo I (eds.). Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

Travis J, Lybbert J, Barrett BC, Narjisse H. 2002. Market-based conservation and local benefits: the case of argan oil in Morocco. *Ecol. Econ.* 41:125-144.

Tregubov V. 1963. Étude des groupements végétaux du Maroc oriental méditerranéen. *Bull. Mus. Hist. Nat.* 23:121-196.

Trujillo I, Rallo L, Carbonell E, Asins M. 1995. Identifying olive cultivares by isozyme analysis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120(2):318-324.



Tsang EW, Bowler C, Herouart D, Van-camp W, Villarroel R, Genetello C, Van-Montagu M, Inzé D. 1991. Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *Plant Cell.* 3:783-792.

Uchida K, Mizuno H, Hirota K. 1983. Effects of spinasterol and sitosterol in plasma and liver cholesterol levels and biliary and faecal sterol and bile acids excretion in mice. *Jpn. J. Pharmacol.* 33:103-112.

Valdés B, Díez MJ, Fernández I. 1987. Atlas polínico de Andalucía Occidental. Universidad de Sevilla y Diputación de Cádiz.

Van-Camp W, Inzé D, Van-Montagu M. 1997. Regulation and function of tobacco superoxide dismutases. *Free Radic. Biol. Med.* 23:515-520.

Vilasenor IM, Domingo P. 2000. Anticarcinogenicity potential of spinasterol isolated from squash flowers. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 20:99-105.

Wang W, Alché JD, Rodríguez-García MI. 2007. Characterization of olive seed storage proteins. *Acta Physiol. Planta.* 29(5):439-444.

Yamauchi Y, Ogawa M, Kuwahara A, Hamada A, Kamiya Y, Yamag S. 2004. Activation of gibberellin biosynthesis and response pathway by low temperature during imbibitions of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell.* 16:367-378.

Youle RJ, Huang AHC. 1981. Occurrence of low molecular weight and high cysteine containing albumin storage proteins in oil-seeds of diverse species. *An. J. Bot.* 68:44-48.

Yin YQ, Ma DQ, Ding Y. 2003. Analysis of genetic diversity of hordein in wild close relatives of barley from Tibet. *Theor. Appl. Genet.* 107:837-842.

Yurenkova SI, Khotyleva LV, Tsebrikov YV. 1995. Tissue- specific expression of esterase isoenzymes in *Linum usitatissimum* L. *Biol. Planet.* 37(3):375-379.

VII-Bibliografía



Zafra A. 2007. Caracterización preliminar del polimorfismo de la proteína alergénica Ole e 5 en el polen del olivo de distintos cultivares. Memoria DEA. Universidad de Granada.

Zahidi A, Bani-Aameur F. 1997. Germination des amandes d'arganier (*Argania spinosa* L. Skeels) : effet du génotype, de la date de semis et de l'année de récolte. Ann. Rech. For. Maroc. 30:2-16.

Zienkiewicz K, Castro AJ, Alché JD, Zienkiewicz A, Suárez C, Rodríguez-García MI. 2010. Identification and localization of a caleosin in the olive (*Olea europaea* L.) pollen during in vitro germination. J. Exper. Bot. 61(5):1537-1546.

Zienkiewicz A, Jiménez-López JC, Zienkiewicz K, Alché JD, Rodríguez-García MI. 2011. Development of the cotyledon cells during olive (*Olea europaea* L.) in vitro seed germination and seedling growth. Protoplasma 248(4):751-765.





Apéndices

Lista de abreviaturas

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism.

ANA: Alfa-Naftil Acetic acid.

BAP: 6-BenzylAminoPurine

BSA: Bovine Serum Albumin.

DTT: Di-ThioThreitol.

EDTA: Ethylene DiamineTetraacetic Acid.

EGTA: Ethylene Glycol Tetraacetic Acid.

GA3: Gibberellic Acid.

IBA: Indol Butyric Acid.

Ip: Isoelectric Point.

MEB: Microscopio Electrónico de Barrido.

NBT: Nitro-Blue Tetrazolium.

PMSF: Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride.

PNB: p- Nitrophenyl Butyric acid

PVDF: PolyVinyliDene Fluoride

PVPP: PolyVinylPolyPyrrolydone.

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

SDS: Sodium Dodecyl Sulphate.

SDS-PAGE: SDS-Polyacrilamide Gel Electrophoresis.

SOD: Superóxido Dismutasa/ Superoxide Dismutase.

SSP: Seed Storage Protein

SSR: Simple Sequence Repeats

TBST: Tris-Buffered Saline-Tween 20.

TCA: TriChloroAcetic Acid.

TEMED: N, N, N, N- Tetra Methyl EthyleneDiamine.

TESPA: 3-TriEthoxySilylPropylAmine

Preliminary characterization of ssps (Seed Storage Proteins) IN *Argania spinosa* L.

M. Allach¹, M. M'rani¹, I. Sabouni², J. D. Alché^{1*}.

¹Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas. Estación Experimental del Zaidín. CSIC. Profesor Albareda 1, Granada, Spain. ²Departamento de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias,

Universidad de Granada. Campus de Fuentenueva, Granada, Spain.

*Author for correspondence: juandedios.alche@eez.csic.es

Abstract

SSPs (Seed Storage Proteins) of the 11S type have been preliminary characterized in the seeds of the argan tree, an endemic species from Morocco. Protein extracts from mature seeds were prepared by using different solutions in order to assess the solubility of the major protein forms. SSPs of the 11S type were classified as albumins according to the further SDS-PAGE analysis of these extracts. The combination of both reducing- and non-reducing conditions for the SDS-PAGE analysis, together with immunoblot experiments allowed us to determine the presence of three precursor forms of these proteins (pro1, pro2 and pro3), which are composed of six individual peptides (p1 to p6) in different combinations.

Key words: *Argania spinosa*, protein bodies, seed, SSP, 11S.

Introduction

The argan tree (*Argania spinosa* L. -syn. *Argania syderoxylon* L., *Sideroxylon spinosum* L. and *Elaerandron argan* Retz-) is an oleaginous tree endemic to Morocco. The appearance of argan trees dates from the tertiary era (1). The plant is distributed throughout the Atlas mountain chain, as well as in the northern regions of the country (Berkane-Chouhiya). The fruits display different forms (spindle-shaped, oval, drupe, round or globular) (2). They are green when unripe, and turn bright yellow at maturity. The pericarp comprises three layers, the exocarp (skin), mesocarp (outer pulp) and the endocarp (an ovate hard-shelled nut, which encloses 1, 2 or 3 fleshy albumen or argan kernels -the endosperm-). Endosperm is very rich in oils, which are up to date the components of major economical interest, although they also contain a large proportion of proteins. In higher plants, the amount of protein present in seeds varies from ~10% (in cereals) to ~40% (in certain legumes and oilseeds) of the dry weight, forming a major source of dietary protein. A vast majority of these proteins (named seed storage proteins: SSPs) serve to provide amino acids which are used during germination and seedling growth. They are of particular importance because they also determine the quality of seeds for various uses. Storage proteins are formed during seed maturation and set down predominantly in specialized storage tissues (i.e. cotyledon or endosperm), in most cases in the form of protein bodies. Detailed study of seed storage proteins was initiated last century, when Osborne (1924) (3) classified them on the basis of their extraction and solubility into albumins, globulins, prolamins and glutelins. Globulins are the most widely distributed group of SSPs. They have

been studied mainly in legumes. Legumins are the major storage proteins in many other dicots and some cereals. They are stored as large complexes (hexameric structures) in protein bodies. Each subunits in the hexamer is itself composed of a large acidic α - and a small basic β - polypeptide, derived from a single precursor (prolegumin) and linked by a disulphide bond (4-7). In a previous work, we have analyzed the composition and distribution of SSPs of the 11S-type, similar to legumins in the seeds of the olive tree (*Olea europaea* L.) (8). In this paper, we have attempted to perform a preliminary characterization of SSPs in the seed of the argan tree.

Materials and methods

In order to assess solubility characteristics of SSPs, proteins from ground mature seeds were extracted using the following solutions: a) distilled water, b) 0.5 M NaCl, c) 70% (v/v) 2-propanol, d) 60% (v/v) acetic acid, e) 0.1M sodium hydroxide, and f) 0.1 M sodium borate, 1% SDS and 50 mM dithithreitol (DTT).

For SDS-PAGE analytical purposes, crude protein extracts were resolved under denaturing, non-reducing conditions (protein extraction performed using 125 mM Tris-HCl, 0.2% sodium dodecyl sulphate -SDS-) or denaturing, reducing conditions (the same as above, plus 1% 2- β -mercaptoethanol). Identical gels were transferred into PVDF membranes and probed with an antibody to 11S-type SSPs from olive (*Olea europaea* L.) (8). An Alexa 488-conjugated anti-rabbit IgG (Molecular Probes) diluted 1:10.000 served as the secondary antibody and the

detection reaction was performed in a PharoX FX high-resolution fluorescence scanner (Bio-Rad).

All bands reactive to the antibody, corresponding to either complex forms or individual polypeptides, were individually purified as follows: bands were cut out from stained gels, and homogenated in 100 mM Tris-HCl, 0.5% (w/v) SDS, pH 8.2. After centrifugation, the proteins in the supernatant were recovered by cold acetone precipitation, and then electrophoretically separated. Each individual component of 11S proteins was cut out from the stained gels and recovered as above.

Results and discussion

Solubility of SSPs

Figure 1 illustrates the solubility of the major protein forms of both the cotyledon and the endosperm of the argan seed after using different extraction buffers. Solubility experiments determined that the majority of these argan seed proteins were extracted with water and dilute salt solution. Therefore they could be classified as albumins. No major differences were detected in both tissues.

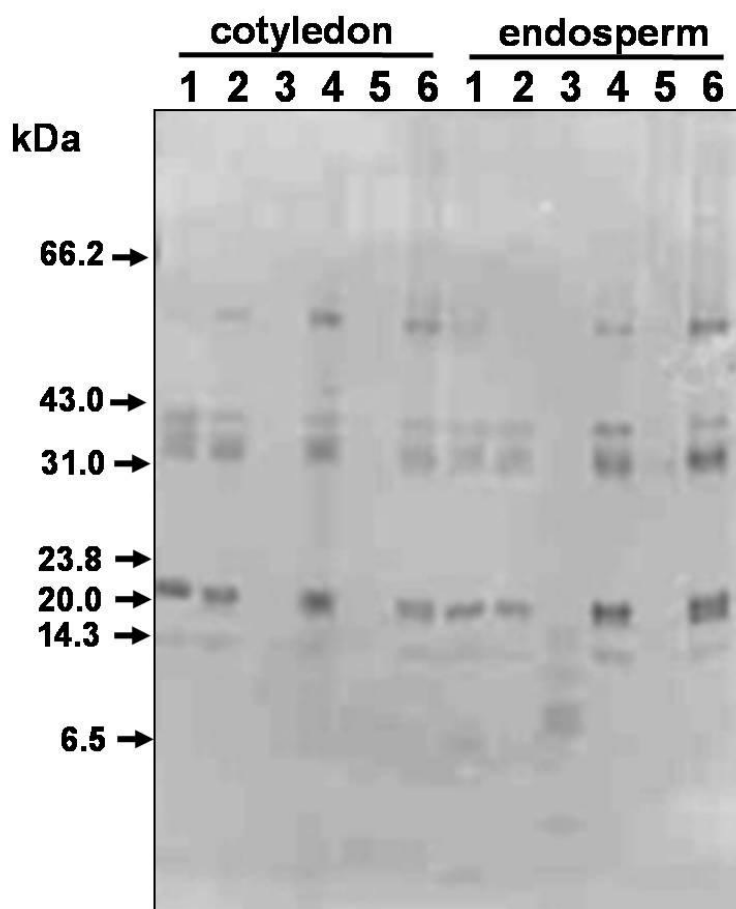


Fig. 1. Solubility of argan seed proteins in different solutions. The proteins were extracted with distilled water (1), 0.5 M sodium chloride (2), 2-isopropanol (3), 70% (v/v) acetic acid (4), 0.1 M sodium hydroxide (5) and a buffered solution (pH10) containing 0.1 M sodium borate, 1% (w/v) SDS and 50 DTT (6). SDS-PAGE gel run under reducing conditions and stained with Coomassie blue.

Peptide composition of the 11S proteins

Precursor forms of these proteins were resolved by SDS-PAGE using non reducing conditions. These forms occurred as 3 polypeptides named pro1, pro2 and pro3 (Figure 2 panel A, lane 1). The analysis of these precursors using denaturing, reducing conditions yielded 6 peptides, which were named p1 to p6 (Figure 2 panel A, lane 2). No major differences

were detected when individualised endosperms, cotyledons or whole seeds were used.

All the above mentioned protein forms were recognized by an antibody raised to SSP- peptides of the 11S type from olive when used in immunoblotting experiments, although some of them (p5 and p6) very weakly.

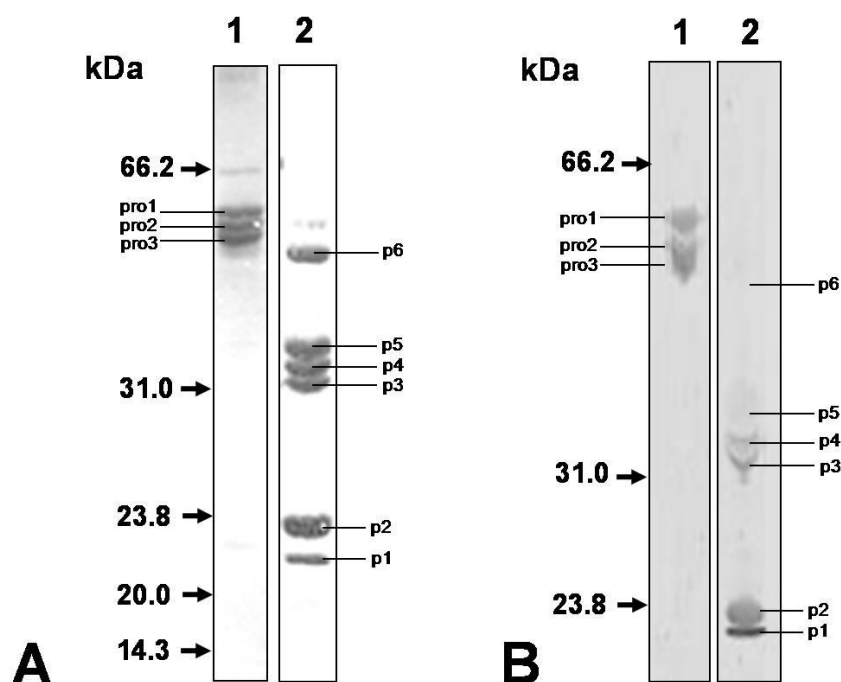


Fig. 2. Panel A: SDS-PAGE gels run under non-reducing (lane 1) and reducing (lane 2) conditions, and stained with Coomassie blue. Panel B, equivalent immunoblots probed with the anti olive SSP antibody.

Our results suggests that the 11S proteins of argania seeds may accumulate as hexameric complexes, the monomers of which consisting of a larger, acidic alpha polypeptide linked via disulphide bridges to a

smaller, basic beta polypeptide. A model of the putative composition of the different forms is presented in Table 1.

Table 1: Peptides likely integrating each one of the precursor forms of the 11S SSPs in the argan tree.

Precursor form	Integrating Peptides
Pro 1 (62.18 kDa)	p1 (20.21 kDa)
	p5 (40.67 kDa)
Pro 2 (57.40 kDa)	p2 (22.83 kDa)
	p3 (34.12 kDa)
Pro 3 (52.76 kDa)	p2 (22.83 kDa)
	p4 (36.74 kDa)

Aknowledgements

This work was funded by Spanish BFU2004-00601/BFI and BFU2008-00629 projects.

M. Allach thanks the research bursary granted by UNESCO/L'ORÉAL and L'ORÉAL Morocco.

References

- Boukhobza, M. & Pichon-prum, N. 1988. L'arganier, ressources économiques et médicinales pour le Maroc. *Phytotherapy* 27, 21-26.
- Jackard, P. 1925. L'arganier Sapotaceae oléagineuse du Maroc. *Pharmaceutica Acta Helvetica* 11, 203-209.
- Osborne, TB. *The vegetable proteins*. Longsman-Green, London. 1924.
- Bharali, S. & Chungoo, NK. 2003. Amino-acid sequence of the 26 kDa subunit of legumin-type seed storage protein of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench): Molecular characterization and phylogenetic analysis. *Phytochemistry* 63, 1-5.

5. Milisavljevic, MDJ., Timotijevic, GS., Radovic,SR., Brkljacic, JM., Konstantinovic, MM.& Maksimovic, VR. 2004. Vicilin-like storage globulin from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds. J. Agric. Food Chem. 52, 5258-5262.
6. Muntz, K. 1998. Deposition of storage proteins. Plant Mol. Biol. 38, 77-99.
7. Shewry, PR., Napier, JA., & Tatham, AS. 1995. Seed storage proteins: Structures and Biosynthesis. Plant Cell 7, 945-956.
8. 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.) J. Agric. Food Chemistry 54, 5562-5570.