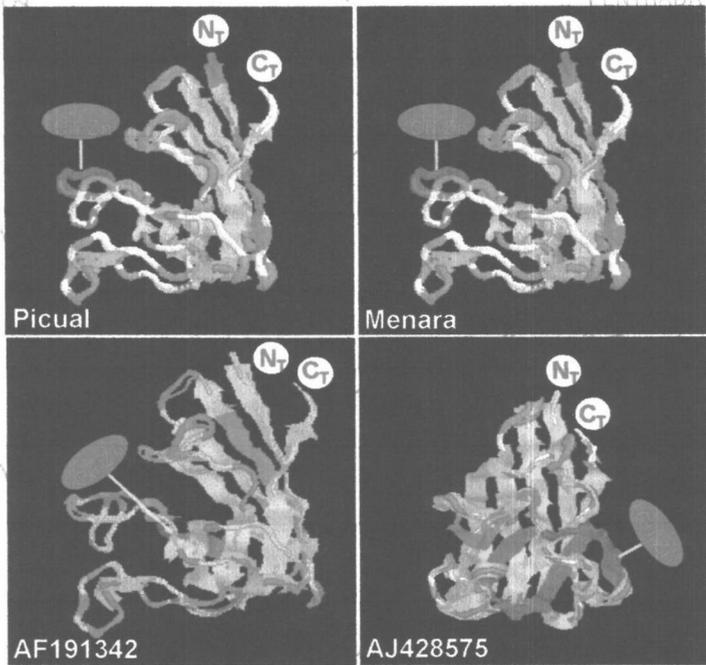


*Utilización de marcadores relacionados con la
alergenicidad y la biosíntesis de lípidos para la
discriminación entre cultivares de olivo*

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 9/3/05
ENTRADA NUM. 915



*Tesis doctoral
Hamman Khalifa Abdel Mounim
Granada, 2005*

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento 616511438
N.º Copia 117829203



Biblioteca Universitaria de Granada



01255426

UNIVERSIDAD DE GRANADA
18 FEB 2005
COMISION DE TUTORADO

Universidad de Granada



**Estación Experimental del Zaidín
C.S.I.C.**

**Departamento de Bioquímica, Biología Celular y
Molecular de Plantas**

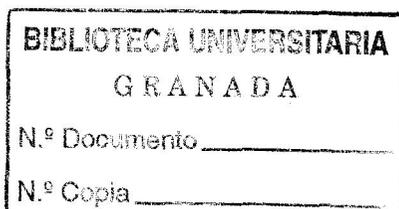


***Utilización de marcadores relacionados con la
alergenicidad y la biosíntesis de lípidos para la
discriminación entre cultivares de olivo***

Tesis doctoral

Hamman Khalifa Abdel Mounim

Granada, 2005



Este trabajo ha sido realizado en la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), gracias a la concesión de una beca predoctoral de la Agencia Española de Cooperación Internacional, y ha sido financiado por los proyectos CAO99-003 (INIA), BMC2000-1484 (Ministerio de Ciencia y Tecnología) y BFV 2004-00601/BFI (Ministerio de Educación y Ciencia).

A mis padres y a mi hermana

A Yolanda

*“El grosor de los muros es menos importante
que la voluntad de conquistarlos”*

Tucidides

(Historiador y escritor. Atenas, 460 A.C.-395 A.C.)

Agradecimientos

¡Por fin llega la hora! Llega el momento más especial y dulce de mi vida y me gustaría compartirlo con todas aquellas personas e instituciones que han contribuido a que esta memoria salga a flote. En una labor de esta envergadura, lleno de venturas y aventuras, resulta siempre difícil citar a todas las personas que han hecho realidad este sueño, gracias a su apoyo y generosidad. ¡Pero intentaré no olvidar a ninguna!

Las primeras líneas de estos agradecimientos las dedico a mis directores de tesis, la Prof. María Isabel Rodríguez García y el Dr. Juan de Dios Alché Ramírez por brindarme la gran oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio, por depositar su absoluta confianza en mí, por su continuo apoyo y por proporcionarme la carta de aceptación por la cual se me concedió una Beca predoctoral de la AECI. Gracias a su talento me entregué al mundo de la ciencia e investigación y di mis primeros pasos en la rama de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas. Resulta sinceramente difícil expresar el valor de su excelente dedicación, consejos, comprensión y paciencia. ¡Sinceramente me siento orgulloso de haber formado parte de su grupo de investigación y sería siempre un gran honor desarrollar actividades juntos en el futuro si Alá quiere!

A la Dra. Fatima Chibi, mi profesora de Biología Vegetal durante mi periodo de licenciatura en la Facultad de Ciencias y Técnicas (Tánger, Marruecos), le debo mi más sincera gratitud y respeto por haberme presentado a mis directores de tesis, animarme y ofrecerme su ayuda en todos los instantes. También es una oportunidad de expresar mis agradecimientos a todos los profesores de la misma Universidad de Tánger, en especial Dres. Lebbadi, Szyah, Aarab, Benani, y El ouai por su simpatía.

A la Dra. Carmen Lluch, mi tutora por su amabilidad, su generosidad y por haberme salvado en numerosas ocasiones de intrincados mecanismos burocráticos que conllevo desarrollar esta tesis doctoral.

Me considero igualmente afortunado por haber contado durante estos años con el apoyo y la amistad de mi segunda familia: mis compañeros y compañeras de grupo de Biología del polen de la Estación Experimental del Zaidín. A la Dra. Adela Olmedilla Arnal por su apoyo moral y sus animosos y valiosos consejos. A Concepción Martínez Sierra (Conchita) y Rosa María Duque Reinoso por su ayuda y por los momentos inolvidables que hemos pasado juntos en el laboratorio. A Antonio J. Castro, Rafal y Wang por su amabilidad, orientación y su dedicación inestimable desde mi incorporación en el grupo. A Mohamed por haberme brindado su apoyo incondicional en multitud de ocasiones. A Amada, nuestra nueva doctora, sin ella mi trabajo en el laboratorio hubiera sido aburrido. A mis compis recién llegados José Carlos, Cyntia y Mariam por su amistad y compartir buenos momentos y risas dentro y fuera del Centro. ¡Muchas gracias J.Carlos a ti y a Mari Carmen por los datos estadísticos! A Raúl que ya no está en el grupo, pero tendremos la oportunidad de pasarlo bien y brindar copas junto a el y a su novia Quina pronto durante la celebración de la boda. ¡felicidades guapos! Al resto de personas que realizaron estancias en nuestro laboratorio, en particular las Dras. Adriana (Argentina) y Alicia (Madrid).

Al director de la Estación Experimental del Zaidín Dr. Juan Luis Ramos por ofrecernos todos los medios necesarios para que las tesis y los trabajos de investigación se desarrollen en las mejores condiciones. A todos los investigadores y compañeros de la Estación Experimental del Zaidín, en especial José Angel, Juande (el rubio), Pepe

Palma, Camilo con los cuales he practicado fútbol sala y tuvimos ocasión de celebrar goles y victorias ¡Aunque sin levantar copas y recibir medallas! un especial recuerdo para Jesús Navas, Andrés Belfer y María Jesús Delgado, Chouhira, Lamiae, Morad, Alvaro, Pieter, Carlota, Mamen, Rosa, Wilson, Astrid. A los genios de informáticos que tenemos: Cesar y Javi

Me gustaría expresar mis agradecimientos al Dr. Pedro Romero y al Dr. Jessus Mohamed por la cesión de sueros de pacientes alérgicos al polen de olivo. Al Dr. Rafal Butowt por su colaboración inestimable en llevar a cabo experimentos de RT-PCR a tiempo real. A los Dres. Ababri (Ministerio de Agricultura, Marruecos) y Ayad (Dirección de Protección de Vegetales, Tánger) por sus contactos y gestión con la dirección de la Estación Experimental de Aïn Taoujdat con objeto de permitirme la colección de polen y fruto de genotipos marroquíes de olivo. A la Dra. Carmen del Río (CIFA "Alameda del Obispo", Córdoba) por colaborar en la colección de polen y de cultivares españoles de olivo. Al Dr. Carlos Lahoz (Fundación Jiménez Díaz, Madrid) por la cesión del anticuerpo anti-Ole e 1. A la Prof. Rosalía Rodríguez (Universidad Complutense de Madrid) por su amabilidad al cedernos los anticuerpos anti-Ole e 3 y anti-Ole e 6. A D. José Manuel García y a la dirección de Oleícola Granadina S.A. (OLIGRA) por los análisis de aceites de oliva, así como al Dr. Arturo Cert (Instituto de la Grasa, CSIC, Sevilla) por sus datos de ácidos grasos en cultivares.

Mis agradecimientos a la Agencia Española de Cooperación Internacional por la concesión de una beca predoctoral para la realización de este trabajo. ¡A ver si hay suerte y me conceden otra para realizar mi proyecto posdoctoral!

Mi especial gratitud a toda mi familia por apoyarme y animarme en cada momento de este viaje largo y duro. A mi querida Madre por su cariño, su paciencia, su confianza. Gracias a ella he hecho realidad mis sueños. A mi padre por cuidarme, animarme. Gracias a su orientación y preciosos consejos he podido afrontar todos mis problemas. ¡Os deseo lo mejor de este mundo. A mi Samia, esta guapísima hermana que tanto la quiero. ¡Te deseo cielo una vida larga de éxitos! A mis abuelos Abdel Salam y Kadouj por sus oraciones continuas, a mis tíos y tías Rafia, Naziha, Rafika, Simo, Chakir, Kamal, Mustafa y Nazira por sus valiosos consejos y los momentos dulces. A mis primos y primas, en especial Achraf. ¡Te hecho de menos mucho campeón! A todos mis amigos y amigas, en particular a mi querido Adil. Una historia de 20 años llena de recuerdos y momentos emocionantes. ¡Un abrazo para ti y otro para Ana! Al chef Aziz y Chakib por esta gran amistad.

Dejo estas últimas líneas para mi querida Yolanda, Con toda seguridad ha sido la persona que más ha soportado mis momentos complicados y mis desánimos durante los años que duró esta tesis. ¡Te quiero bombón! Un abrazo fuerte para Esther y mis simpáticos tíos Pepe (mi bombero preferido) y María, sin olvidar el resto de la familia Lunar y Franco.

سُورَةُ التِّيْمِ كِيَّةِ وَعَايَاتُهَا ٨

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وَالْتِيْسِ وَالزَّرِيْتُوْنَ ﴿١﴾ وَطُوْرِ سِيْنِيْنَ ﴿٢﴾ وَهَذَا الْبَلَدِ الْاَمِيْنِ ﴿٣﴾ لَقَدْ
خَلَقْنَا الْاِنْسَانَ فِيْ اَحْسَنِ تَقْوِيْمٍ ﴿٤﴾ ثُمَّ رَدَدْنَاهُ اَسْفَلَ سَافِلِيْنَ
﴿٥﴾ اِلَّا الَّذِيْنَ اٰمَنُوْا وَعَمِلُوا الصَّالِحَاتِ فَلَهُمْ اَجْرٌ غَيْرٌ مَّمْنُوْنٍ ﴿٦﴾
فَمَا يَكْذِبُكَ بَعْدَ الْاَدْيِيْنَ ﴿٧﴾ اَلَيْسَ اللّٰهُ بِاَحْكَمِ الْحَاكِمِيْنَ ﴿٨﴾



En el nombre de Allah, el misericordioso, el compasivo (1) Por el fruto de la higuera y del olivo (2) Por el monte Sinin (3) Por esta tierra segura (4) Que en verdad creamos al hombre en la mejor armonía (5) y luego lo convertimos en uno de los más bajos (6) Excepto los que creen y llevan a cabo las acciones de bien, porque ellos tendrán una recompensa que no cesa (7) ¿ Y cómo podrás, después de esto, negar la Rendición de cuentas? (8) ¿ Acaso no es a Allah el más justo de los jueces?

Sura de los higos (95). El noble Corán y su traducción-comentario en lengua española.





Con objeto de discriminar entre cultivares de olivo (*Olea europaea* L.), se analizó mediante técnicas bioquímicas y moleculares la expresión de cinco genes previamente caracterizados en olivo: a) genes relacionados con la alergenicidad (*Ole e 1*, *Ole e 3*, *Ole e 5*, *Ole e 6*) y b) un gen implicado en la biosíntesis de lípidos (*Stearoyl-ACP desaturasa*). Como material vegetal, se utilizó polen y mesocarpo maduro de siete cultivares; cinco españoles (*Lucio*, *Picual*, *Loaime*, *Hojiblanca*, *Arbequina*) y dos genotipos marroquíes (*Picholine marocaine* y *Menara*). Los resultados obtenidos con el alérgeno mayoritario del polen de olivo (*Ole e 1*) muestran la existencia de una variabilidad considerable a nivel de la expresión tanto de la proteína como de los transcritos correspondientes en el polen de los cultivares estudiados. A nivel de la secuencia nucleotídica y la secuencia aminoácidica de dicho alérgeno se han detectado microheterogeneidades en numerosas posiciones. Este alto grado de polimorfismo afecta a varios loci epitópicos de reconocimiento por células T, al número de motivos de glicosilación, y puede explicar la respuesta alérgica diferencial de pacientes sensibles al polen de olivo. El grado de polimorfismo detectado es sensiblemente superior entre cultivares diferentes que dentro de un mismo cultivar, estableciéndose relaciones filogenéticas claras entre los cultivares analizados. En el caso de las otras tres proteínas alérgicas, *Ole e 3*, *Ole e 5* y *Ole e 6*, la expresión fue similar en todos los cultivares estudiados. Con respecto a *Stearoyl-ACP desaturasa*, el patrón de expresión de los transcritos en mesocarpo maduro presentaba diferencias cuantitativas importantes a nivel intercultivar. Los cultivares *Picual* y *Loaime* presentan un nivel

mayor de transcritos de la enzima en comparación con el resto de los cultivares estudiados. Dicho patrón de expresión muestra una correlación positiva con la concentración del ácido oleico en el aceite extraído de cada cultivar.

Por otro lado, en la búsqueda de argumentos fiables que puedan servir para determinar la función biológica de uno de los marcadores relacionados con la alergenicidad como es Ole e 6, se realizó un estudio extenso basado en la aplicación de técnicas bioquímicas, de biología molecular y celular, para el análisis de expresión de este alérgeno durante el desarrollo del polen de olivo. Los resultados indican que la síntesis tanto de la proteína como de sus transcritos tiene lugar en polen maduro. También, se ha sido detectado una expresión mínima de Ole e 6 en otro tipo de tejido vegetativos como es el mesocarpo.

En conclusión, los genes Ole e 1 y Stearoyl-ACP desaturasa pueden ser utilizados como marcadores potenciales para la identificación de cultivares de olivo. Finalmente, se plantea a nivel clínico la posibilidad de diseñar vacunas inmunoterapéuticas individualizadas para la desensibilización de pacientes atópicos al olivo, en las cuales se tenga en cuenta la composición y concentración de los alérgenos que forman parte del extracto a inyectar, discriminando varietalmente la composición de éstos.

Lista de abreviaturas

A₂₆₀: Absorbancia a 260 nm.

A₂₈₀: Absorbancia a 280 nm.

BCIP: 5-bromo,4-chloro,3-indolylphosphate.

BSA: Bovin serum albumin.

Ca²⁺: Iones calcio.

cDNA: DNA complementario.

DAPI: 4',6-diamidine-2-phenylindole.

DEPC: Diethyl pyrocarbonate.

Dig-11-dUTP: Digoxigenin-11-2'-deoxy-uridine-5'-triphosphate.

DNA: Ácido desoxiribonucleico

DNasa: Desoxiribonucleasa.

dNTP's: Deoxyribonucleoside triphosphates.

DTT: Dithiothreitol.

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid.

EGTA: Ethyleneglycoltetraacetic acid..

LB: Luria Bertani.

M-MLV: Mouse-Moloney murine leukemia virus.

MOPS: Morpholinopropane sulphonic acid.

mRNA: RNA mensajero.

NBT: Nitroblue tetrazolium.

Oligo dT: Oligo deoxytimidine.

PBS: Phosphate-buffered saline.

PCR: Polymerase chain reaction.

pI: Punto isoeléctrico.

PMSF: Phenyl methyl sulfonyl fluoride.

PVDF: Polyvinylidene fluoride.

PVP: Polyvinyl pyrrolidone.

RNA: Ácido ribonucleico.

RNasa A: Ribonucleasa A.

RT-PCR: Reverse transcriptase-polymerase chain reaction.

SDS: Sodium dodecyl sulfate.

SDS-PAGE: SDS-polyacrilamide gel electrophoresis.

SPTs: Skin Prick Tests.

SSC: Standard saline citrate.

SSR: Simple sequence repeats.

TBE: Tris-buffered EDTA.

TBST: Tris-buffered saline Tween 20.

TEMED: N,N,N,N'-tetra-methyl-ethylenediamine.

TESPA: 3-aminopropyltriethoxy-silane.

UV: Ultravioleta.



Apéndices

- *Agradecimientos*
- *Resumen*
- *Lista de Abreviaturas*
- *Índice*

1. Introducción	1
1.1. <i>Origen del cultivo de olivo</i>	3
1.2. <i>Descripción botánica y difusión de cultivares de olivo</i>	5
1.3. <i>El patrimonio oleícola en el mundo</i>	8
1.4. <i>El cultivo de olivo en España</i>	10
1.5. <i>El cultivo de olivo en Marruecos</i>	12
1.6. <i>Ciclo reproductor del olivo</i>	15
1.7. <i>Expresión génica en el gametofito masculino del olivo</i>	18
1.8. <i>Olivo y alergia</i>	19
1.9. <i>Marcadores moleculares en el olivar</i>	27
2. Objetivos	31
3. Materiales y Métodos	35
3.1. <i>Materiales vegetales</i>	37
• <i>Anteras en diferentes estadios del desarrollo</i>	
• <i>Polen maduro</i>	
• <i>Mesocarpo durante el desarrollo</i>	
• <i>Hojas jóvenes</i>	
• <i>Aceite extra virgen de cultivares</i>	
3.2. <i>Métodos</i>	39
3.2.1. <i>Análisis de proteínas</i>	40



• Extracción de proteínas totales	
• Cuantificación de proteínas totales	
• Electroforesis de proteínas mediante SDS-PAGE	
• Tinción de geles con azul Coomassie	
• Secado de geles	
• Transferencia de geles SDS-PAGE a membranas	
• Detección de proteínas mediante Inmunoblot	
• Detección de glicoproteínas con concavalina A	
3.2.2. Análisis de transcritos/secuencias DNA	47
• Extracción de RNA total	
• Extracción de DNA genómico a partir de hojas	
• Cuantificación de ácidos nucleicos	
• Northern Blot	
• Amplificación mediante RT-PCR	
• Amplificación mediante RT-PCR a tiempo real	
• Síntesis de sondas DNA marcadas con digoxigenina	
• Análisis de los productos de amplificación mediante electroforesis	
• Extracción de DNA a partir de geles de agarosa	
3.2.3. Clonación y secuenciación de productos de PCR	60
• Preparación de células competentes DH5 α	
• Clonación de productos de PCR	
• Obtención de DNA plasmídico (Minipreps) mediante lisis alcalina	
• Reactivos preparativos para la secuenciación de productos de PCR	
3.2.4. Herramientas y métodos bioinformáticos utilizados	64
3.2.5. Estudios celulares	65
• Determinación del estadio del desarrollo del polen con DAPI	
• Preparación de muestras para microscopía	
• Hibridación in situ	



• <i>Amplificación de productos génicos mediante RT-PCR in situ</i>	
• <i>Inmunocitoquímica</i>	
3.2.6. <i>Determinación de la reactividad de pacientes sensibles al olivo frente a extractos monovarietales de polen</i>	77
4. Resultados	79
4.1. <i>Descripción pomológica de los cultivares de olivo</i>	81
4.2. <i>Expresión de genes relacionados con la alergenicidad en polen de olivo</i>	91
4.2.1. <i>Alérgeno mayoritario Ole e 1</i>	91
• <i>Expresión de Ole e 1 en cultivares</i>	
• <i>Búsqueda de polimorfismo en Ole e 1</i>	
• <i>Relaciones genéticas entre los cultivares basadas en la secuencia de Ole e 1</i>	
• <i>Análisis de los epítomos de reconocimiento por células T y de los perfiles de antigenicidad, hidrofiliicidad y de la estructura 2D</i>	
• <i>Reactividad antigénica de Ole e 1 a un panel de anticuerpos monoclonales</i>	
4.2.2. <i>Alérgeno Ole e 3 (Polcalcina)</i>	121
• <i>Expresión de Ole e 3 en cultivares</i>	
• <i>Búsqueda de polimorfismo en Ole e 3</i>	
4.2.3. <i>Alérgeno Ole e 5 (Cu/Zn SOD)</i>	125
• <i>Expresión de Ole e 5 en cultivares</i>	
• <i>Búsqueda de polimorfismo en Ole e 5</i>	
• <i>Expresión de Ole e 5 durante el desarrollo del grano de polen</i>	
4.2.4. <i>Alérgeno Ole e 6</i>	129
• <i>Expresión de Ole e 6 en cultivares</i>	
• <i>Búsqueda de polimorfismo en Ole e 6</i>	
• <i>Expresión de Ole e 6 durante el desarrollo del grano de polen</i>	



• <i>Inmunolocalización de Ole e 6 en polen maduro</i>	
• <i>Localización de los transcritos de Ole e 6 en polen maduro</i>	
4.2.5. <i>Análisis de la reactividad de pacientes al polen de cultivares</i>	139
• <i>Pruebas SPTs</i>	
• <i>Western blot con sueros de pacientes sensibles al polen de olivo</i>	
4.3. <i>Expresión de genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos en el fruto de olivo</i>	143
4.3.1. <i>Perfil proteico del mesocarpo de los cultivares estudiadas</i>	143
4.3.2. <i>Expresión de Stearoyl-ACP desaturasa en cultivares</i>	144
4.3.3. <i>Composición en ácidos grasos del aceite de oliva en cultivares</i>	145
4.4. <i>Expresión de alérgenos en mesocarpo</i>	146
4.4.1. <i>Caracterización del alérgeno Ole e 5 en mesocarpo</i>	147
4.4.2. <i>Caracterización del alérgeno Ole e 6 en mesocarpo</i>	148
5. <i>Discusión</i>	151
5.1. <i>Utilización de los caracteres morfológicos para la discriminación entre los cultivares estudiados</i>	153
5.2. <i>La expresión del alérgeno mayoritario Ole e 1 es diferencial en el polen de los cultivares estudiados</i>	154
• <i>Origen del polimorfismo detectado en Ole e 1</i>	
• <i>Influencia del polimorfismo detectado en Ole e 1 sobre la hidrofiliidad, la antigenicidad y la estructura secundaria y terciaria de la molécula</i>	
• <i>La variabilidad genética de Ole e 1 podría explicar su papel biológico como molécula de señalización: una nueva perspectiva</i>	
5.3. <i>Los niveles de expresión de los alérgenos (Ole e 3, Ole e 5 y Ole e 6) en el polen maduro de los cultivares estudiados no presenta diferencias</i>	

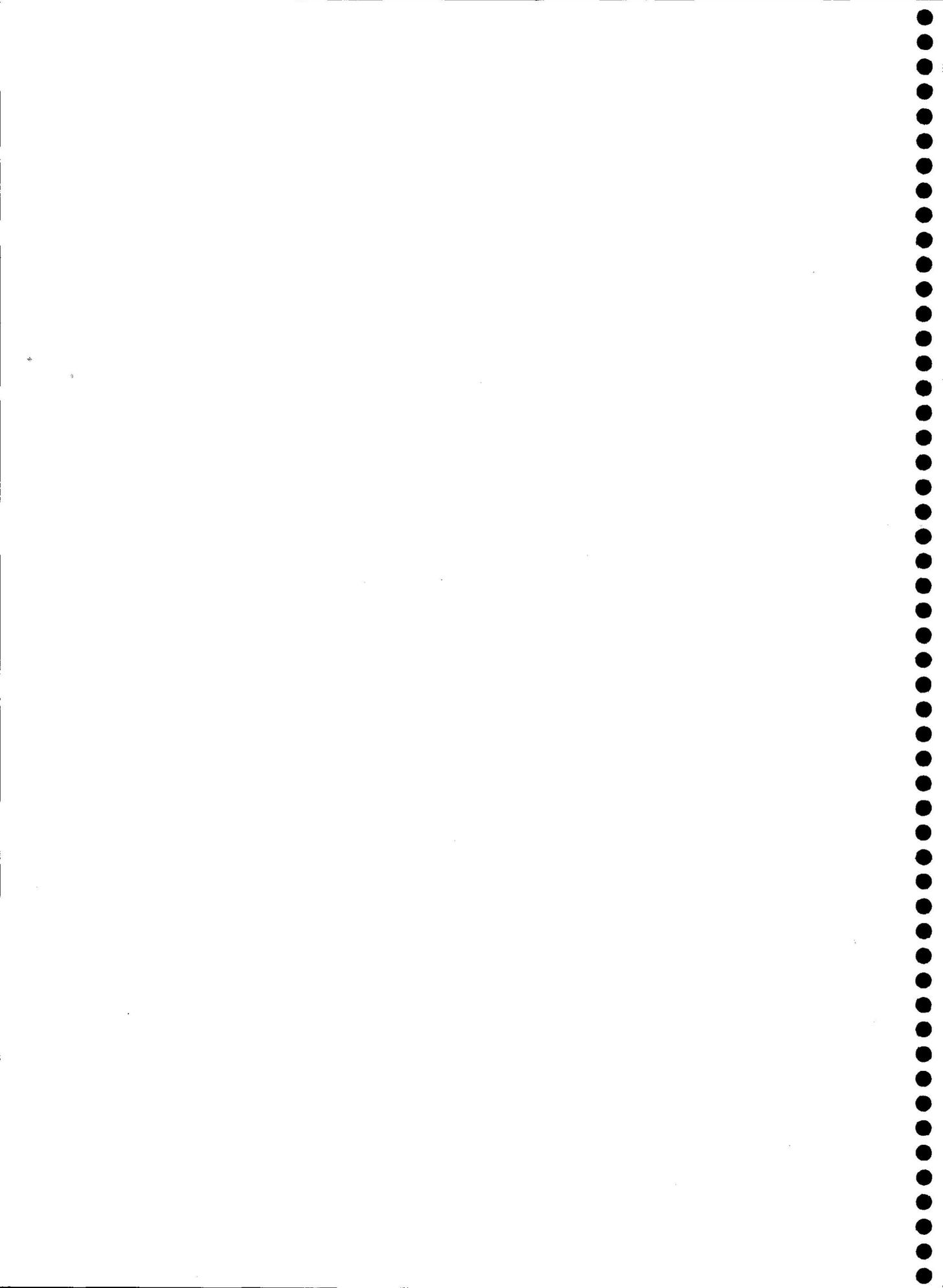


<i>significativas.</i>	166
<i>5.4. La expresión de Ole e 5 tiene lugar durante toda la microsporogénesis y gametogénesis, mientras que la de Ole e 6 se inicia a partir de la mitosis asimétrica</i>	168
<i>5.5. Los pacientes alérgicos presentan respuestas diferenciales a tests de reactividad in vivo e in vitro frente- a extractos de polen de los cultivares estudiados</i>	170
<i>5.6. Perspectivas de la utilización de alérgenos específicos de cultivares en la diagnosis y tratamiento de la alergia al polen de olivo</i>	174
<i>5.7. ¿Se expresan los alérgenos de polen de olivo en tejidos del fruto?</i>	178
<i>5.8. La Stearoyl-ACP desaturasa del fruto puede constituir un buen marcador para la discriminación molecular de cultivares de olivo</i>	180
6. Conclusiones	183
7. Bibliografía	187



Introducción

Capítulo 1





1.1 Origen del cultivo de olivo

La aparición y el cultivo del olivo se remontan a la prehistoria y aún no se ha podido determinar con certeza su origen. Varios historiadores suponen que el olivo es originario de Persia, otros del Nilo, mientras que otros indican que procede del valle de Jordán. De Candolle (1883) sitúa el origen geográfico de esta planta en Siria. Esta tesis está soportada por Vavilov (1951) que supone la región de Siria e Irán como origen, incluyendo otras especies agrícolas importantes como el *Triticum durum*, *Vicia faba* y *Lactuca sativa*. Otros historiadores como Almeida (1963), Zohary y Spiegel-Roy (1975), creen que el cultivo de olivo se inició en las colonias fenicias de Palestina y Líbano. Almeida apoya igualmente la hipótesis de que el olivo es originario del norte de Afganistán, donde existe una biodiversidad grande de *Oleaceae* y supone que la especie *Olea europaea* es descendiente de *Olea cuspidata*, mientras que otros coinciden que el cultivo de olivo es originario del área geográfica que va desde el sur del Cáucaso hasta las altiplanicies de Irán, Palestina y las costas de Siria y que luego, se expandió por Chipre hacia Anatolia y, a través de Creta, hacia Egipto, hasta ocupar todos los países de la cuenca mediterránea. En cualquier caso, existe una concordancia entre los referidos historiadores y otros autores (Acerbo, 1937; Ciferri, 1942) respecto a que la propagación del olivo desde su zona de origen fue causada por la difusión de la cultura de oriente a occidente.

Numerosas civilizaciones de la cuenca mediterránea cooperaron a través de la historia en la propagación del olivo: egipcios, fenicios, griegos, hebreos, cartagineses, romanos, árabes e hispanos. Los egipcios, ya hace más de 5000 años, sabían emplear el aceite de oliva para iluminar sus templos, y fueron los primeros en utilizar procedimientos naturales semejantes a los actuales en la extracción del aceite. Era también frecuente administrar baños con aceite perfumado y la utilización de coronas ornamentales construidas con ramas de olivo para la imposición de las momias faraónicas entre los años 980 y 715 a.C.



En la época fenicia, el olivo fue difundido por las islas griegas a partir del siglo XVI a.C, y luego por la península helénica entre los siglos XVI y XI a.C. La leyenda de los griegos cuenta que la diosa de la sabiduría Pailas Atenea hizo surgir el olivo en la Acrópolis de un golpe de lanza. Los helenos contaban la disputa que había estallado entre Neptuno y Minerva en el Olimpo, para decidir para quien sería el reino de "Atica". Júpiter propuso que Atica se concedería a quien presentase el regalo más importante para la humanidad. Así, Neptuno, con un poderoso golpe de tridente, consiguió que surgiera del suelo un caballo rápido como el viento, ejemplo de vigor, con el que haría a los ejércitos invencibles. Por su parte Minerva hizo brotar un olivo de donde se obtendría el aceite, alimento de los hombres, fuente de luz, símbolo de la abundancia, remedio para las heridas y óleo de unción. El entusiasmo reinó en la cara de Júpiter que decidió al final que "Atica" sería para Minerva y que su capital se llamaría Atenas. Los griegos fueron los encargados de introducir el olivo en Italia, donde llegó a adaptarse fácilmente. A partir del siglo VI a.C el cultivo se difunde en todas las regiones de la cuenca mediterránea, pasando a Sicilia, Túnez y Trípoli. Se cuenta que pudo llegar a Italia tres siglos antes de la caída de Troya o en la época del legendario rey de Roma, Lucio Tarquinio (616 a 578 a.C). En la isla de Sicilia, el olivo se cultivó a gran escala, empleando los sistemas griegos de olivicultura. Los romanos consideraron poseer el olivo (Óleum) como un lujo y atribuyeron a su aceite los secretos de la belleza, utilizándolo particularmente para el cuidado de los cabellos y de la tez.

El olivo existió en Iberia desde tiempos muy antiguos, ya que se han encontrado huesos de aceituna en algunos yacimientos de la época neolítica. En Hispania romana, el olivo llegó a cultivarse ampliamente, aunque los impuestos exigidos por Roma a los olivicultores provocaron un progresivo declive. Después de la tercera guerra púnica, la olivicultura vuelve a extenderse en la



Bética, difundiéndose hacia las zonas centrales y costeras de la Península Ibérica.

Durante los ocho siglos de la dominación árabe en España, el cultivo conoció una evolución notable, y fueron los árabes quienes difundieron nuevos cultivares para usos culinarios y medicinales. Además, algunas palabras castellanas relacionadas con el olivo provienen del árabe, como por ejemplo aceituna (Zaitun) y aceite (Al Zait). El aprecio de los árabes musulmanes por el olivo fue importante de tal manera que aparece mencionado en su libro santo: el "Corán".

Después del descubrimiento de América por Cristóbal Colón en 1492, el olivo se desplazó y colonizó el nuevo mundo. La introducción en Perú y México tuvo lugar alrededor de 1560 y en California en 1769. En la actualidad, el olivar se extiende también por otros países como Argentina, Chile, China, Japón, Sudáfrica y Australia.

1.2 *Descripción botánica y difusión de cultivares de olivo*

El olivo (*Olea europaea* L.) pertenece a la familia botánica *Oleaceae*, representadas por árboles o arbustos algunos de ellos trepadores, y se encuentran distribuidas por las regiones tropicales y templadas de ambos hemisferios y comprenden alrededor de 29 géneros y cerca de 600 especies. Figuran entre ellas plantas de interés económico u hortícola por sus maderas, por los aceites o esencias o por sus valores ornamentales, como por ejemplo los géneros *Chionanthus*, *Fraxinus*, *Ligustrum*, *Osmanthus*, *Phillyrea*, *Piconia*, *Syringa* y *Olea* (Heywood, 1978). El género *Olea* comprende 20 especies distribuidas por la cuenca mediterránea, el norte y el sur de África, Asia tropical y central, Australia, Nueva Zelanda y Polinesia.

En la especie *Olea europaea* L., se incluyen todos los olivos cultivados e igualmente los silvestres (acebuches). Es un árbol de 4 a 8 metros de altura con



el tronco liso y gris en el periodo juvenil y rugoso y nudoso en la madurez (March y Rios, 1989). La forma de la raíz del olivo depende por una parte del origen del árbol y por otra de las condiciones del suelo. Cuando el árbol resulta de una semilla se genera una raíz principal que domina el sistema radical durante los primeros años. En los árboles producidos por el enrizamiento de estaquillas (sistema más común para la reproducción del olivo) se forman numerosas raíces adventicias. La profundidad y la extensión lateral del sistema radical y el grado de ramificación dependen del tipo y la profundidad del suelo y de la aireación (Fernández y col., 1991). Las hojas son persistentes y normalmente sobreviven dos o tres años aunque permanecen también en el árbol hojas de mayor edad. Pueden ser coriáceas, elípticas, oblongas o lanceoladas, de 3 a 9 cm de longitud, de pecíolo corto, de color verde oscuro en el haz y blanquecinas en el envés. Las yemas son igualmente de color blanquecino. A nivel de las inflorescencias, las flores pueden ser perfectas o imperfectas. Las perfectas son hermafroditas o bisexuales, formadas de estambres y pistilo bien desarrollados. Las flores imperfectas son estaminíferas y tienen un ovario rudimentario o ausente (Uriu, 1959). El proceso de floración tiene lugar en los meses de abril a mayo, dando lugar a flores blanquecinas, pequeñas y actinomorfas con simetría regular y distribuida en racimillos axilares más cortos que las hojas. El cáliz es gamosépalo, de color blanco verdoso y se mantiene junto a la base del ovario después de la caída de la corola. Esta última está compuesta por cuatro pétalos blanco-amarillentos que insertan en su base dos estambres en orientación opuesta, y cuyas anteras con dos lóculos contienen numerosos granos de polen (Morettini, 1972). El pistilo está formado por un ovario súpero, un corto estilo y un estigma bilobulado, papiloso y húmedo (Altamura y col., 1982). Se distinguen a nivel del ovario dos cavidades, cada una de las cuales contiene dos primordios seminales u óvulos anátropos. Sólo uno de ellos llega a ser fecundado por el grano de polen.



El resultado de la doble fecundación es un fruto de tipo drupa de forma elipsoidal o globosa, y llega a medir en madurez de 1 a 4 cm de longitud y 0.6 a 2 cm de diámetro. En el fruto se distinguen tres tejidos principales: el endocarpo o hueso en cuyo interior se encuentra la semilla, el mesocarpo o pulpa donde se almacena el aceite y el exocarpo o capa exterior. En la tabla 1, se presenta un resumen breve de la descripción botánica del olivo (*Olea europaea*):

Descripción botánica del olivo	
Familia botánica	<i>Oleaceae</i> .
Nombre científico	<i>Olea europaea</i> L.
Árbol	De 4 a 8 metros de altura, con el tronco el liso y gris en el periodo juvenil y rugoso y nudoso en la vejez.
Hojas	Persistentes, coriáceas, elípticas, oblongas o lanceoladas.
Inflorescencias	Flores blanquecinas, pequeñas y actinomorfas con simetría regular y distribuida en racimillos axilares.
Flores	Perfectas o estaminíferas.
Cáliz	Gamosépalo, de color blanco verdoso.
Corola	Compuesta por cuatro pétalos blanco-amarillentos.
Pistilo	Formado por un ovario súpero, un corto estilo y un estigma bilobulado, papiloso y húmedo.
Fruto	Drupa de forma elipsoidal o globosa.

Tabla 1. Descripción botánica de olivo.

Existen varias hipótesis sobre el origen de las primeras formas cultivadas de olivo y su propagación. Algunos autores consideran que el olivo cultivado deriva de la selección y la difusión del olivo silvestre (acebuche) que formaba un grupo homogéneo y que estaba confinado al este de la cuenca mediterránea. El proceso de domesticación de este olivo según esta teoría se produciría en Oriente Medio 3700 años a.C. Acerbo (1937) supone que algunos árboles



salvajes y espontáneos fueron al origen de la obtención de las primeras formas cultivadas de olivo. Otro grupo de historiadores defiende la hipótesis de que el olivo cultivado puede proceder de hibridaciones entre ciertas formas silvestres y otras especies (Ciferri, 1942; Chevalier, 1948; Turril, 1951).

El olivo silvestre se distingue del cultivado por varias características: la sección de las ramas es cuadrangular, y éstas son más o menos espinescentes, las hojas aovado-oblongas y los frutos pequeños con una pulpa muy reducida. Las formas cultivadas, aunque son diversas, suelen tener ramas cilíndricas, las hojas lanceoladas y frutos de mayor tamaño y con una pulpa carnosa. Estas diferencias pomológicas han conducido algunos autores a clasificar el acebuche y el olivo cultivado en subespecies distintas: El primero *Olea europaea* Subsp. *Sylvestris* o Subsp. *oleaster* y el segundo *Olea europaea* Subsp. *sativa*. Otro grupo de botánicos (Pereira, 1939; Amaral y Rocha, 1972; Pignatti, 1982) les trata como variedades botánicas diferentes: El olivo acebuche *Olea europaea* var. *Oleaster* y el cultivado *olea europaea* var. *sativa* o *Olea europaea* var. *europaea*. Finalmente, otros autores soportan que el acebuche provenga de individuos cultivados que han revertido al estado salvaje considerando a ambos como un único taxón (Morettini, 1972; Dionigi, 1973).

La formación de nuevos cultivares de olivo según Zohary y Spiegel-Roy (1975), fue el fruto de cruzamientos entre las poblaciones autóctonas bien adaptadas al medio y las formas seleccionadas y difundidas a lo largo del Mediterráneo. Este largo proceso ha conducido a la introgresión de genes (Harlan, 1966) de manera diversificada y espontánea, y esto es lo que explica la gran biodiversidad observada en el olivo.

1.3 El patrimonio oleícola en el mundo

Según las estadísticas del Consejo Oleícola Internacional (COI) del año 2000 patrimonio oleícola mundial se estima aproximadamente en 930 millones



de olivos, de los cuales 840 se localizan en el área mediterránea (figura 1). Estos datos se encuentran en continua progresión debido al incremento del consumo mundial. En cuanto a la superficie de este cultivo es alrededor de 10 millones de hectáreas, lo que representa una densidad media de 80 olivos por ha, aunque este dato es variable según los países e incluso las comarcas, las condiciones climáticas, topográficas y los objetivos de la producción buscados. En el mundo sólo unos 50 millones de olivos se benefician de las aportaciones de agua de riego.

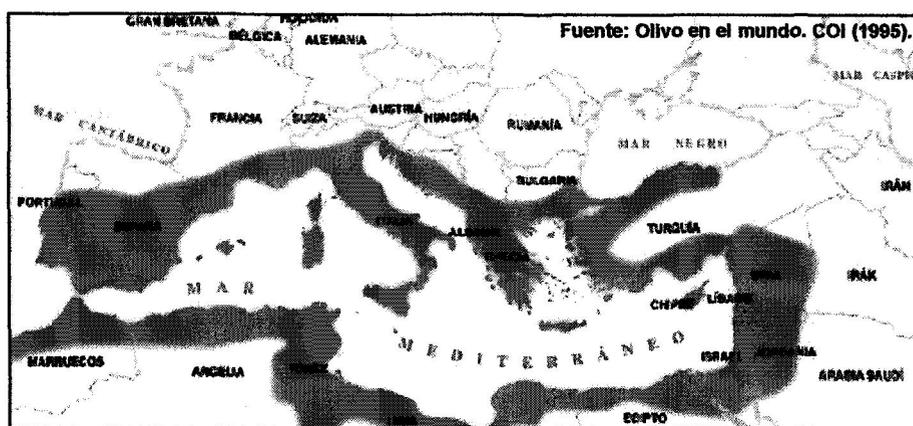


Figura 1. Repartición de olivo en el área mediterránea.

■ : Olivo

La producción del olivar en el mundo alcanza una media anual de 10 millones de toneladas de aceitunas, de las que 90 % se utilizan para la extracción de aceite y el resto para la elaboración de las diferentes modalidades de aceitunas de mesa (COI, 2002). Por otro lado alrededor de 46 % de la producción de aceitunas de mesa y 86% de la producción de aceite se obtiene de los países del sur de Europa (España, Italia, Grecia, Portugal, Francia). En el norte de África, gracias a programas de desarrollo para la ampliación de las superficies destinadas a la olivicultura, se ha permitido incrementar la producción olivícola notablemente. Por ejemplo en países como Túnez, la superficie cultivada con el olivar ya supera los 1.6 millones de hectáreas.



En el mundo existen más de 1200 cultivares diferentes de *Olea europaea* L, distribuidas en 24 países, y se les atribuyen más de 3000 denominaciones distintas (Bartolini y col., 1998).

1.4 El cultivo de olivo en España

En España, existen más de 210 millones de olivos cultivados sobre más de 2.2 millones de hectáreas. Alrededor de 2 millones de hectáreas se destinan a la producción de aceite de oliva y el resto se utiliza para el consumo. España es el primer país productor tanto de aceitunas de mesa (434.800 toneladas) como de aceite de oliva (850.000 toneladas) (Campaña 2002/2003, EFEAGRO). El olivar en España se reparte en casi todo el territorio con excepción de Galicia, Asturias y Cantabria. La región olivarera más importante sin duda es Andalucía con más de 1.300.00 hectáreas, lo que constituye el 33% de la superficie agrícola cultivada y el 60 % del olivar nacional. También es la zona donde se obtiene la mayor producción de aceite (80% de la producción total) y de aceitunas de mesa (75 % de la producción total) (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación - MAPA- 1993).

En España, al igual que diversos países oleícolas de la cuenca mediterránea, el olivo se caracteriza por la existencia de un gran número de cultivares muy antiguos y que están cultivados en áreas restringidas. Existen actualmente en España cuatro grandes colecciones varietales o bancos de germoplasma de olivo, la primera se localiza en la finca "Alameda del Obispo" del actual Centro de Investigación y Formación Agraria (CIFA) de Córdoba, que comprende más de 350 cultivares provenientes de 16 países. La catalogación de los genotipos del referido banco fue realizada en base a caracteres pomológicos (Barranco y Rallo 1985) o agronómicos bien definidos (del Río y Caballero, 1994). Otros bancos de germoplasma se encuentran en la Estación de Olivicultura y Elaiotecnia (Jaén), en el Centro Agropecuario Mas



Bové (CAMB) de Reus (Tarragona) y en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) de Valencia. Barranco y Rallo (1984), establecieron un esquema fiable basado sobre los caracteres morfológicos del árbol, rama, hoja, inflorescencia, fruto y endocarpio. Este estudio permitió la catalogación de 262 cultivares de olivo diferentes en España (Barranco y col., 1998). Esta gran diversidad es debida posiblemente a varios factores como la escasa presión de selección ejercida por el hombre a dicho cultivo. Según algunos autores (Oliveros y Jordana, 1968), los cultivares más importantes de España se remontan al siglo XV. Entre los numerosos cultivares existentes en España, se han identificado 24 como principales, que forman las bases de las plantaciones de sus respectivas comarcas, aunque es frecuente también encontrar otros cultivares difundidos en una o varias comarcas (Barranco y Rallo, 1985). En general, estos cultivares están bien arraigados en sus supuestas áreas de origen, sin embargo algunos han podido extenderse a otras regiones vecinas. Por ejemplo, el cultivar Picual originario de Jaén, se extendió a varias comarcas españolas (figura 2).

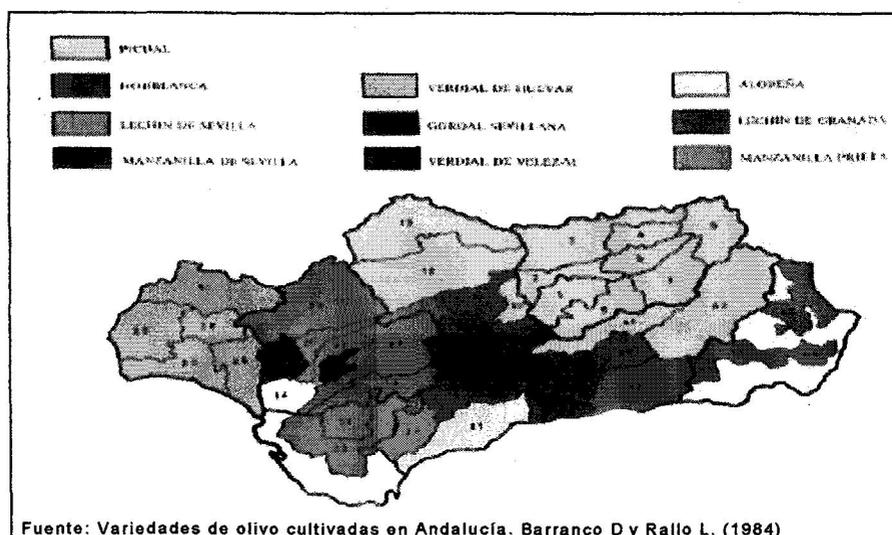


Figura 2. Cultivares principales de olivo en Andalucía.



1.5 El cultivo de olivo en Marruecos

En Marruecos existen más de 50 millones de olivos distribuidos sobre 580.000 hectáreas, lo que representa 55 % del patrimonio arborícola nacional. Dicha superficie está creciendo a un ritmo de 10 % anuales. Las zonas olivareras más importantes son la zona norte (Fés, Meknes, Taounate) y la zona central (Haouz, Tadla), que representan 41 % y 31 % respectivamente de la superficie total cultivada de olivo (figura 3).

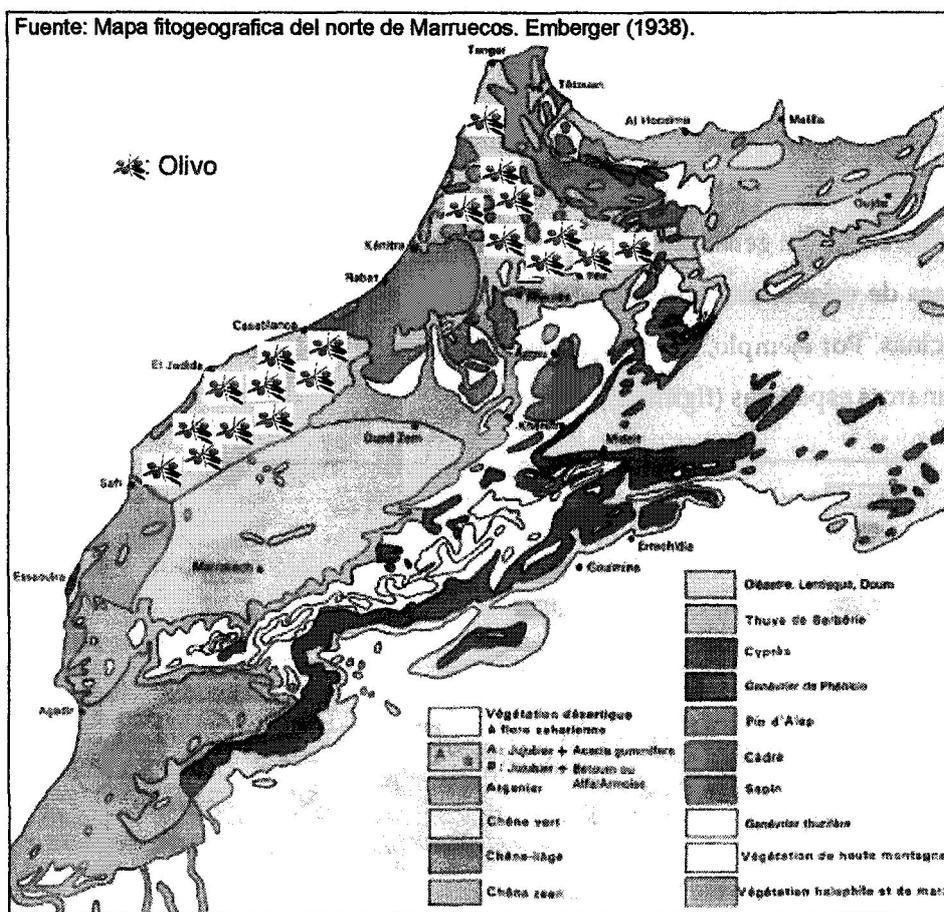


Figura 3. Mapa fitogeográfico del norte de Marruecos, mostrando las zonas olivareras más importantes.



La producción durante la campaña agrícola 2002/2003 fue de 800.000 toneladas, lo que generó 80.000 toneladas de aceite y 110.000 toneladas de aceitunas de mesa, lo que coloca a Marruecos como segundo exportador mundial de aceitunas de mesa (Dirección de Protección de Plantas (DPV), Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (2003), Marruecos). Sin embargo, el sector sufre numerosas dificultades como por ejemplo los cambios climáticos, la dispersión de las plantaciones de olivo y el bajo rendimiento en aceite de los cultivares cultivados.

En 1927, el Institut National de Recherche Agronomique (INRA, Marruecos) estableció dos colecciones de cultivares de olivo: una en la Estación Experimental de Aïn Taoujdat (Meknes) y otra en la Estación Experimental de Menara (Marrakech). Estas colecciones han sido el origen de algunos estudios de prospección y de evaluación del patrimonio local. Dichos estudios han podido ser ampliados gracias a la adopción de nuevas estrategias, basadas en la utilización de marcadores pomológicos y agronómicos (Chahbar, 1984; Moukhli, 1990; Boulouha, 1992) culminando con la identificación de 90 cultivares autóctonos y extranjeros cultivados en Marruecos.

En virtud de la decisión adoptada por el COI en su 79ª reunión (Italia, 1998), el ministerio de Agricultura de Marruecos inauguró en el año 2002 el segundo banco mundial de germoplasma de olivo en la Estación experimental de Tassaout (Marrakech), que comprende cultivares autóctonos de los países participantes en el proyecto (Marruecos, Argelia, Túnez, Grecia, Chipre, Egipto, Eslovenia, Francia, España, Croacia, Israel, Italia, Portugal, Siria y la antigua Yugoslavia).

En general, el mapa de cultivares locales de olivo en Marruecos se caracteriza por la existencia de un sólo cultivar autóctono dominante, denominado Picholine marocaine, que representa el 96 % de las plantaciones del país. A partir de 1920, la denominación "Picholine marocaine" ha



substituido a otras denominaciones que predominaban en las grandes zonas oleícolas del país como Zit, Zitoun, Bouchouika, Khoubzi., etc. (Maestratti, 1922; Tornezy, 1922). Picholine marocaine es un cultivar que tiene una serie de ventajas como su gran poder de adaptación, su resistencia a temperaturas bajas y su doble uso. Sin embargo, dicho cultivar presenta varios inconvenientes como su sensibilidad a algunas enfermedades (*Cycloconium oleaginum*, *Pseudomonas savastanoi*, *Verticillium dahliae*), su fuerte índice de alternancia y su bajo contenido en aceite, que no sobrepasa el 20 %, mientras que este porcentaje es de 28 % en otros cultivares como Picual o Frantoio. El resto del patrimonio (4 %) esta constituido por diferentes cultivares como Meslala, Dahbia y Picholine de Languedoc y algunos cultivares españoles e italianos (Picual, Manzanilla, Gordal de Sevilla, Frantoio., etc.) (tabla 2).

Cultivar/Propiedad	Peso medio del fruto en g	Ratio pulpa/hueso	Contenido de la materia fresca en aceite (%)
Picholine marocaine	3.6	4.8	22
Dahbia	3.33	5.48	17.18
Arbequina	1.44	2.46	23.13

Tabla 2. Comparación entre algunos caracteres de cuatro cultivares de olivo pertenecientes a Marruecos (Picholine marocaine, Dahbia) y a España (Picual, Arbequina). Fuente: ENA-SODEA. Marruecos (1999).

En la región olivarera central (Haouz) se han establecido planes de selección clonal a partir del cultivar Picholine marocaine. Dichos planes se han basado en dos criterios fundamentales como son la productividad y la regularidad de la producción, y han permitido conocer la existencia de una considerable variabilidad. Algunos de los genotipos seleccionados como Menara, Haouzia o K26 entraban en productividad a partir del tercer año y



tenían una producción de dos a tres veces más alta que la de Picholine marocaine (INRA, 1995).

En los años 90, se establecieron otros programas oleícolas en Marruecos, consistentes en la mejora genética de los materiales seleccionados a partir del cultivar local, mediante técnicas de cruzamientos con algunos cultivares extranjeros (Arbequina, Manzanilla de Sevilla, Picholine de Languedoc y Leccino), conocidos por su calidad, su alto contenido del aceite y su resistencia a *Cycloconium oleaginum*. Dichos programas condujeron a la obtención de un nuevo material genético potencial, y se pudo asistir a la entrada en producción de varios cruzamientos desde el segundo año y el aumento hasta 50 % del contenido en aceite de los frutos.

Recientemente, se están realizando nuevos estudios para la identificación de los genotipos del cultivar Picholine Marocaine, basados en la utilización de técnicas bioquímicas como el análisis de la expresión de sistemas enzimáticos en extractos foliares (Ouazzani y col., 1995) y moleculares como por ejemplo la detección de marcadores de DNA nuclear denominados ISSR (Essadki y Ouazzani, 2003) o la detección de polimorfismo en la expresión de genes previamente caracterizados en olivo (Hamman-Khalifa y col., 2003a,b; Hamman-Khalifa y col., 2004).

Las nuevas perspectivas del sector en Marruecos, consisten en intensificar el patrimonio para llegar a ocupar un millón de hectáreas en el horizonte de 2010, mediante la plantación de 42.000 ha anuales, la modernización de las técnicas de extracción de aceite y la promoción de su calidad (INRA, 1999).

1.6 *Ciclo reproductor del olivo*

La forma tradicional más extendida de propagación del olivo es por vía vegetativa, evitándose de esta manera el largo periodo juvenil de esta especie. Por esta razón los programas clásicos de mejora vegetal del olivar son escasos y



de bajo rendimiento. Por ello no deja de tener interés el conocimiento en profundidad del ciclo reproductor de dicha planta, principalmente si se tiene en cuenta que el objetivo principal es la obtención de un fruto de apreciada cualidad nutritiva y con beneficio para la salud y de grandes rendimientos económicos como es la aceituna. Por estas razones el estudio tanto del gametofito masculino (polen) y femenino (óvulo) como del fruto del olivo ha despertado el interés de numerosos investigadores (Rodríguez-García y col., 1987, 89, 90; Fernández y col., 1994; Alché y col., 1999; Butowt y col., 2003).

El olivo, al tratarse de una planta con flor, tiene un ciclo reproductivo sexual propio de Angiospermas. La flor constituye el órgano reproductor donde se encuentran las estructuras sexuales masculinas (anteras) y femeninas (carpelos). La antera contiene cuatro cavidades que constituyen el lugar de formación de los gametofitos masculinos o granos de polen, mediante una meiosis a partir de microsporocitos o células madres de microsporas). La primera división meiótica conduce a la formación de dos células denominadas diadas, y después de una segunda división se forman cuatro células haploides llamadas microsporas, rodeadas por una pared de calosa formando una tetrada. Inicialmente, se forma una pared primaria denominada primexina que corresponde al primer esbozo de la gruesa pared del futuro grano de polen o exina. Posteriormente, la calosa es degradada con la acción de una calasa sintetizada a nivel del tapetum. Las microsporas ya liberadas en el lóbulo de la antera aumentan rápidamente su volumen y entran en un largo periodo de interfase durante el que se producen cambios celulares importantes entre los que hay que destacar la vacuolización del citoplasma y que conducen a una división asimétrica, originando dos células desiguales en tamaño y función: la célula vegetativa y la célula generativa. En el olivo, ésta última sufre una segunda división mitótica simétrica para producir dos núcleos espermáticos,



destinadas a realizar la doble fecundación que caracteriza el ciclo reproductivo de las Angiospermas.

Paralelamente al desarrollo del gametofito masculino, tiene lugar aunque con un ligero desfase en el tiempo, otro proceso a nivel del ovario que consiste en la formación de megasporas mediante meiosis a partir de megasporocitos o células madres de megasporas. Tres de las cuatro megasporas formadas a partir de la célula madre degeneran mientras que la megaspora superviviente sufre un alargamiento importante en su tamaño para formar un saco embrionario. Después de tres divisiones mitóticas sucesivas, se generan en dicho saco tres antípodas y una ovocélula flanqueada por dos sinérgidas en la zona micropilar y dos núcleos polares en la zona central (Rapoport, 1997).

La fertilización de la ovocélula está precedida por un proceso de transporte de los granos de polen de las anteras a la superficie del estigma o polinización que conduce a su vez a la germinación del polen y al crecimiento del tubo polínico. Este último penetra por las papilas estigmáticas para llegar al saco embrionario, donde las dos células espermáticas son liberadas para dar lugar a la doble fecundación. Esta se produce cuando una de las dos células indicadas fusiona con la ovocélula para formar un cigoto diploide y la otra con los dos núcleos polares para generar un endospermo triploide. El cigoto constituye la primera célula de la generación esporofítica y su destino consiste en la formación de una semilla mediante una rápida actividad mitótica y que finalmente va a dar lugar al fruto. Durante dicho proceso, el endospermo y algunas partes del embrión inician un almacenamiento masivo de nutrientes como carbohidratos, proteínas y grasas necesarios para la formación de los futuros órganos (raíz, hipocotilo, cotiledones, tallo) (Raghavan, 1997). En el caso de olivo, la semilla se encuentra dentro del endocarpo o hueso, el cual está rodeado por el mesocarpo o pulpa (tejido de almacenamiento de aceite). Los



tejidos del fruto se desarrollan a partir del ovario por los procesos de división, expansión y diferenciación celular (Rapoport, 1997).

1.7 Expresión génica en el gametofito masculino del olivo

En un trabajo pionero, Mascarenhas, (1990) distinguió entre dos tipos de genes que se expresan durante el desarrollo gametofítico en el grano de polen, dependiendo de su patrón de expresión: genes de expresión temprana y genes de expresión tardía. Los transcritos de los genes de expresión temprana se sintetizan directamente después de la meiosis y su expresión se reduce o cesa completamente cuando el polen esta maduro. Los transcritos de los genes de expresión tardía se sintetizan a partir de la mitosis asimétrica de las microsporas y continúan acumulándose mientras el polen madura. En general se ha asumido que los genes de expresión temprana codifican proteínas relacionadas con la organización del citoesqueleto, con la síntesis de la pared o la acumulación del almidón, mientras que los genes de expresión tardía codifican proteínas necesarias durante la maduración del polen, la germinación y/o el crecimiento del tubo polínico (McCormick, 1993).

En los últimos cinco años, se esta acelerando el ritmo de las investigaciones que tienen como objetivo el estudio de la expresión de nuevos genes implicados en fases claves del desarrollo del gametofito masculino de olivo. Entre dichos genes se desatacan los relacionados con la alergenicidad como Ole e 1 y Ole e 3. La expresión del alérgeno mayoritario Ole e 1 tiene lugar en estadios tempranos del desarrollo de la antera (tetraada) tanto en los tejidos gametofíticos como esporofíticos (Alché y col., 1999; 2002), mientras que la síntesis de Ole e 3 ocurre exclusivamente en el polen maduro (Alché y col., 2003).



1.8 Olivo y alergia

Entre los vectores implicados en la alergia respiratoria, se puede citar el polen de numerosas plantas. Es muy probable que dichos agentes alergogénicos procedan de un extraordinario proceso de adaptación a numerosos factores que agrupan las condiciones medioambientales, la interacción con otros organismos y el mecanismo de dispersión por el viento, agua o por animales (Hormaza y Herrero, 1995). En la actualidad, se conoce un centenar de pólenes potencialmente alergogénicos, especialmente aquellos transportados por el aire (anemófilos). El polen de olivo (*Olea europaea* L.) es uno de los principales vectores causantes de procesos alérgicos (hipersensibilidad tipo I), principalmente en países del área mediterránea (España, Italia, Grecia e Israel) y algunas aéreas de América del norte (California), donde el olivo es extensamente cultivado (Wheeler, 1992; Liccardi y col., 1996). En Marruecos, un estudio llevado a cabo en una serie de 640 pacientes (Yazidi y col., 2001), reveló que el polen de olivo ocupa el primer rango entre los factores causantes de polinosis en dicho país.

La gravedad de los síntomas asociados a la alergia al polen de olivo varía en función de múltiples parámetros, como las estaciones, la concentración del polen y la duración de exposición del individuo. En general, los pacientes sensibles expuestos a altas concentraciones de polen de olivo (más de 4000 granos/m³ en Jaén, sur de España) (Florido y col., 1999) pueden presentar un síndrome irritativo de las vías altas con estornudos, rinorrea, obstrucción de las vías nasales y faringitis hasta los más graves correspondientes al asma. El diagnóstico de la alergia al polen de olivo agrupa un conjunto de ensayos clínicos, entre los que se puede destacar los denominados SPTs (Skin prick tests), que pueden ser realizados en forma dérmica o intradérmica, las pruebas de tipo RAST (Radio allergosorbent test), pruebas de liberación de histamina y las pruebas de provocación conjuntival, bronquial o nasal. En relación al



tratamiento de dicha alergia se sugiere en la mayoría de los casos el empleo de vacunas con alérgenos (inmunoterapia con alérgenos) que consiste en la inyección subcutánea repetida de extractos proteicos crudos del polen de olivo y en dosis gradualmente crecientes (ver revisión en: *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, 17th edition). En la actualidad, existen nuevas aproximaciones que se están aplicando con éxito como por ejemplo la utilización de alérgenos recombinantes (Chapman y col., 2000; Valenta, 2002).

La caracterización de los alérgenos de polen se basaba anteriormente en la aplicación de métodos bioquímicos laboriosos como la electroforesis o la cromatografía. La introducción de nuevas aproximaciones, eficientes y rápidas, basadas en el DNA recombinante (Avjioglu y col., 1994), como por ejemplo el screening de la expresión de genotecas de mRNA con sueros de pacientes alérgicos al polen de especies conocidas o con anticuerpos específicos a proteínas alérgicas, ha simplificado la caracterización y el análisis de los dominios inmunoreactivos de dichas proteínas, y ha conducido al crecimiento del número de las moléculas clonadas y secuenciadas (Chapman, 1991). Sin embargo, la función biológica de la mayoría de ellas sigue siendo desconocida, aunque se especula que puede estar relacionada con la formación y/o la germinación del grano de polen, el reconocimiento polen-pistilo, el fenómeno de auto-incompatibilidad o igualmente algún papel estructural.

El perfil antigénico del polen de olivo (*Olea europaea* L.), se caracteriza por la presencia de numerosas proteínas alergénicas con un patrón de punto isoeléctrico comprendido entre 4 y 9.5. En general, la mayoría de estas proteínas son de naturaleza ácida y algunas presentan varias isoformas. Blanca y col., (1983) detectaron hasta 40 alérgenos diferentes en dicha especie, sin embargo, hasta esta fecha sólo diez han sido purificados y caracterizados, habiendo sido denominados Ole e 1 a Ole e 10 (Rodríguez y col., 2001; Barral y



col., 2004), según las recomendaciones de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS) (King y col., 1995; Larsen y Lowenstein, 1996):

Ole e 1: Fue la primera proteína alergénica aislada, purificada y caracterizada en el polen de olivo (Villalba y col., 1990, 1993). Se trata de un alérgeno principal o mayoritario con una prevalencia de más de 70 % de los pacientes alérgicos al olivo (Lauzurica y col., 1988a, b). La proteína tiene un peso molecular de 18-22 kDa, es de naturaleza acídica y representa más de 10 % de los extractos proteicos crudos totales (Villalba y col., 1990). Existen varias formas del alérgeno Ole e 1 (Batanero y col., 1994a): forma glicosilada de 20.0 kDa (85% de la proteína total) y no glicosilada de 18.5 kDa (10 %) (Villalba y col., 1993). Es destacable también la presencia de dos variantes minoritarias de 22 kDa y de 40 kDa (5%), correspondientes a una forma hiperglicosilada y a un dímero de la glicoproteína respectivamente (Wheeler y col., 1990). Existen evidencias en la literatura de la implicación de algunos epítomos presentes en el motivo de glicosilación en reacciones cruzadas entre Ole e 1 y otras glicoproteínas como ascorbato oxidasa y peroxidasa (Batanero y col., 1994a).

Por otro lado, se ha realizado la secuenciación de varios clones cDNAs que codifican este alérgeno (Villalba y col., 1994; Lombardero y col., 1994) (GenBank™/EMBL: números de acceso X76395 y S75766 respectivamente). Dichos clones, así como las proteínas correspondientes, presentan microheterogeneidades en varias posiciones. La secuencia de Ole e 1 presenta una homología relevante (24-34%) con otras proteínas del polen de maíz, tomate, centeno, abedul, arroz, *Arabidopsis* etc. Además, Ole e 1 posee algunos determinantes epitópicos comunes con alérgenos del polen de otras especies de *Oleaceae* como Syr v 1 de *Syringa vulgaris* (Batanero y col., 1994b), Lig v 1 de *Ligustrum vulgare* (Batanero y col., 1996a; Fernández y col., 1996), así como con extractos crudos de polen de otras plantas (Carreira y col., 1994). Otros estudios realizados sobre Ole e 1 incluyen el mapeo antigénico de la proteína, llevado a



cabo por Lombardero y col., (1992) utilizando un panel de anticuerpos monoclonales, y la identificación de tres regiones de la proteína que pueden ser consideradas como epítopos de reconocimiento para células T (Cárdaba y col., 1998). En relación a la estructura tridimensional de Ole e 1, González y col., (2002) utilizaron una batería de 9 monoclonales, así como 2 isoformas de Ole e 1 y 2 isoformas de Ole e 1-like proteins de dos miembros de la familia de *Oleaceae* (*Ligustrum vulgare* y *Syringa vulgaris*), expresados todos con métodos recombinantes como herramientas para determinar la influencia de la disposición tridimensional, del componente de carbohidrato y de las microheterogeneidades sobre la estructura antigénica de Ole e 1. Los resultados indicaron por un lado que el componente de carbohidrato no está involucrado significativamente en el reconocimiento de los monoclonales y por otro lado la presencia de una diversidad importante en la respuesta alérgica de los "Ole e 1-like proteins".

Ole e 2: Es la primera proteína perteneciente a la familia de profilinas que ha sido caracterizada, clonada y expresada a partir de polen de olivo (GenBank™/EMBL numero de acceso: Y12425, Y12429 y Y12430) (Asturias y col., 1997). Se trata de una proteína de 15-18 kDa con un alto grado de polimorfismo en su secuencia (Asturias y col., 1997), al igual que ocurre en las profilinas de otras plantas como tabaco (Mittermann y col., 1996). El papel de esta familia de proteínas en las reacciones alérgicas también ha sido detectado en otras especies (Valenta y col., 1991). Ole e 2 es un alérgeno mayoritario (Rodríguez y col., 2002), responsable de 74,6 % de los casos de polinosis al olivo (Quiralte y col., 2002), por lo que se considera un alérgeno mayoritario. Además, esta implicado en un gran número de reacciones cruzadas por lo que se considera un panalérgeno (Lombardero y col., 2002; Focke y col., 2003; Asero y col., 2004).



Ole e 3: Se trata de otro panalérgeno (Lombardero y col., 2002) caracterizado, clonado y expresado (GenBank™/EMBL numero de acceso: O81092) (Ledesma y col., 1998). Tiene una prevalencia de 37.8 % en los pacientes sensibles al polen de olivo (Quiralte y col., 2002). La proteína tiene un peso molecular de 9.2 kDa, y en su secuencia se observa la presencia de dos dominios de unión a iones Ca^{2+} , similares a aquellos de la calmodulina y la parvalbumina (Batanero y col., 1996b). Para ésta y otras proteínas homólogas presentes en el polen de diversas especies, se ha acuñado el termino "polcalcinas" (Ledesma y col., 1998).

Ole e 4: Este alérgeno fue purificado, caracterizado y parcialmente secuenciado (GenBank™/EMBL numero de acceso: P80741). Se trata de una glicoproteína de 32 kDa de naturaleza acídica (pI 4.65-5.1) y sin homología relevante con otras proteínas publicadas en las diferentes bases de datos. La prevalencia de Ole e 4 en pacientes atópicos diagnosticados es de 80 % (Boluda y col., 1998). Otras proteínas similares a Ole e 4 fueron también detectadas mediante ensayos de immunoblotting en polen de algunas especies de *Oleaceae*, como *Syringa vulgaris*, *Fraxinus excelsior* y *Ligustrum vulgaris* (Martínez y col., 1999), así como en polen de algunas plantas ornamentales, pertenecientes a la familia de *Eleagnaceae* como *Eleagnus angustifolia* u olivo ruso (Lluch-Bernal y col., 2001).

Ole e 5: El alérgeno Ole e 5 ha sido purificado, caracterizado y parcialmente secuenciado (GenBank™/ EMBL numero de acceso: P80740) (Boluda y col., 1998). Se trata de una proteína de 16 kDa, de naturaleza acídica (pI 5.1-6.5) y con una homología relevante con las Cu/Zn superóxido dismutasas (Cu/Zn SODs) de otras especies como espinaca (Sakamoto y col., 1990), piña (Lin y col., 2000) y maíz (Cannon y Scandalios, 1989). Las SODs constituyen una familia de metaloenzimas que catalizan la desproporción de radicales superóxido en los sistemas biológicos y forman por lo tanto una parte



importante de los sistemas de detoxificación celular. La incidencia de Ole e 5 en reacciones de tipo I es de 35 % (Boluda y col., 1998). Varias SODs han sido identificadas como alérgenos en diferentes especies, como *Hevea Brasilensis* (Rhis y col., 2001) y *Aspergillus fumigatus* (Mayer y col., 1997).

Ole e 6: Se trata de una pequeña proteína de 50 aminoácidos (10 kDa) de naturaleza ácida (pI 4.2). Su implicación en procesos alérgicos no es alta (47,9 %) pero significativa (Quiralte y col., 2002). En su secuencia es observable la presencia de seis cisteínas que forman dos motivos estructurales de tipo Cys-X-X-X-Cys-X-X-X-Cys. Ole e 6 es el único alérgeno de polen de olivo cuya estructura tridimensional ha sido determinada (Treviño y col., 2004).

Ole e 7: Es una proteína de 9.8 a 10.3 kDa, que exhibe un grado muy alto de polimorfismo, altamente hidrofílica y que tiene una prevalencia de 47 % en los pacientes alérgicos al olivo (Tejera y col. 1999; Quiralte y col., 2002). Se han caracterizado dos isoformas de Ole e 7 que comparten homologías con proteínas de transferencia de lípidos (lipid transfer proteins (LTPs)). No existen evidencias de reacciones alérgicas cruzadas relacionadas con Ole e 7. Sin embargo, la existencia de una homología de 30-50 % entre los LTPs de olivo y los de manzana, melocotón, tabaco y girasol, permite postular la posibilidad de la presencia de determinantes antigénicos compartidos. En efecto, según estudios recientes, se ha relacionado este alérgeno con casos de anafilaxia u otro tipo de reacciones alérgicas alimentarias (Florido y col., 2002).

Ole e 8: Se trata de otro alérgeno de la familia de polcalcinas caracterizado a partir del polen de olivo. El cDNA aislado codifica una proteína de 171 aminoácidos (18.8 kDa), que contiene cuatro segmentos de doce residuos cada uno, con capacidad de unión a iones Ca^{2+} similares a los presentes en los miembros de la subfamilia de EF-hand Ca^{2+} -binding proteins (Kawasaki y Kretsinger, 1995). Ole e 8 posee una homología considerable con THC2, Jun o 2



y calmodulina o "calmodulin-related proteins" a nivel de los dominios de unión de Ca^{2+} (Ledesma y col., 2002).

Ole e 9: Es una proteína de 46.4 kDa que desempeña una actividad β -1,3-endoglucanasa, usando laminarina como sustrato. Es responsable de 65 % de los casos de alergia al polen de olivo por lo que se puede considerar un alérgeno mayoritario. Se trata de un miembro de la familia PR "Pathogenesis related proteins". El análisis de los cDNAs de Ole e 9 (Huecas y col., 2001) muestra una homología de 39 %, 33 % y 32 % con β -1,3-glucanasas de mimbrera, trigo y *Arabidopsis thaliana* respectivamente. Recientemente, Palomares y col., (2003) han expresado en levadura un segmento C-terminal de 101 aminoácidos de Ole e 9 que muestra capacidad de inducir la respuesta alérgica en pacientes.

Ole e 10: Es el último alérgeno que ha sido aislado y caracterizado en el polen de olivo hasta la fecha. Los estudios de alergenidad *in vivo*, muestran que su prevalencia es de 55 % en los pacientes con polinosis al olivo. La proteína tiene bajo peso molecular (10.8 kDa), un pI ácido (5.8) y consiste en una única cadena polipeptídica de 102 aminoácidos. La secuencia polipeptídica de Ole e 10 muestra una homología de 53 % con el dominio C-terminal de Ole e 9 que es responsable de una importante reactividad cruzada entre los dos alérgenos. Se han podido determinar también varios epitopos de células B compartidos entre Ole e 10 y otros alérgenos de especies de *Oleaceae*, *Gramineae*, *Betulaceae*, así como algunas proteínas de látex, tomate, kiwi y melocotón (Barral y col., 2004).

En la tabla 3, se resumen los caracteres relevantes de los diez alérgenos de polen de olivo ya citados:

Alergeno	Pm (kDa)	pI	Expresión recombinante		Características	Referencias
			E. coli	P. pastoris		
Ole e 1	17-20	5-5.6	Si	Si	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Expresión diferencial en cultivares de olivo. ✓ Presencia de 3 regiones de reconocimiento por células T. ✓ Utilización de micropartículas biodegradables poly (DL-lactide glycolide) como vehículo para Ole e 1. ✓ Implicación de las cisteínas 19,22,43,78 y 90 en la formación de los tres puentes disulfuro de Ole e 1. ✓ La síntesis y la acumulación tiene lugar en RER. ✓ Localización de los transcritos mediante RT-PCR in situ. ✓ Incremento de niveles de la proteína tras la emergencia del tubo polínico. Posible homología funcional con Lat52. 	(Hamman-Khalifa y col., 2003a). (Cárdaba y col., 1998). (Batanero y col., 2003). (González y col., 2000). (Alché y col., 1999). (Alché y col., 2002). (Alché y col., 2004).
Ole e 2	15-18	-	Si	No	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 1^{er} alergeno de olivo perteneciente a la familia de profilinas. Presencia de varias isoformas. ✓ Control de polimerización de actina. Regulación de transducción de señal en la ruta de fosfolipasa C. 	(Asturias y col., 1997). (Theriot y Mitchison, 1993). (Sathish y col. 2004).
Ole e 3	9.2	4.2-4.3	Si	No	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Pertenece a la familia de policalcinas (unión a Ca²⁺). ✓ La proteína está ausente en otros tejidos (anteras, hojas). Expresión tardía durante el desarrollo del polen de olivo. 	(Batanero y col., 1996b). (Alché y col., 2003).
Ole e 4	32	4.65-5.1	No	No	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Glicoproteína sin homología relevante. ✓ Alergeno mayoritario. 	(Boluda y col., 1998; Carnés y Fernández-Caldas, 2002).
Ole e 5	16	5.1-6.5	No	No	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Homología con SODs de otras especies. ✓ presencia de 4 isoformas en polen de olivo. 	(Boluda y col., 1998). (Alché y col., 1998).
Ole e 6	10	4.2	No	Si	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Contenido alto en cisteína y homología con NTP-CysR de tabaco. 1^{er} alergeno cuya estructura 3D ha sido determinada 	(Batanero y col., 1997; Treviño y col., 2004).
Ole e 7	9.8-10.3	-	No	No	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Presencia de 2 isoformas con homología a LTPs. ✓ Asociación con alergia alimentaria. 	(Tejera y col., 1999). (Florido y col., 2002).
Ole e 8	18.8	-	Si	No	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Familia de policalcinas. Presencia de Ole e 8-like proteins en otras <i>Oleaceae</i>. 	(Ledesma y col., 2000; 2002).
Ole e 9	46.6	4.8-5.4	No	Si	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Alto grado de polimorfismo y homología con glucanasas de mimbrera, trigo y <i>Arabidopsis</i>. 	(Huecas y col., 2001; Palomares y col., 2003).
Ole e 10	10.8	5.8	No	No	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Homología con Ole e 9. Reacción cruzada con proteínas de látex, tomate, kiwi y melocotón. 	(Barral y col., 2004).

Tabla 3: Resumen de propiedades de los diez alérgenos caracterizados en el polen de olivo hasta la fecha.





1.9 *Marcadores moleculares en el olivar*

Uno de los principales objetivos de los programas de mejora vegetal en olivo es la conservación y la protección de la diversidad genotípica y fenotípica presente en el germoplasma de esta especie, primordial para la evaluación de individuos con características agronómicas relevantes. Sin embargo, debido al largo periodo juvenil de dicho cultivo, los programas clásicos de mejora hoy en día son escasos y de bajo rendimiento. La identificación y la caracterización de los cultivares de olivo en el mundo se han basado en su mayor parte en caracteres morfológicos y agronómicos, como la forma de hoja, superficie de semilla, color de fruto, etc. (Tous y Romero 1993; Cimato y col., 1993). En este sentido, Barranco y Rallo, (1984) establecieron un esquema pomológico, que incluyó caracteres del árbol, rama, hoja, inflorescencia, fruto y endocarpo, mostrando su eficacia para la prospección e inventario de los cultivares de olivo. Como resultado de este estudio se discriminaron 262 cultivares sólo en España. En otro país mediterráneo, Túnez, una treintena de cultivares fueron catalogados, procedentes de semillas obtenidas con cruzamientos no controlados (hibridación libre) según características pomológicas de las aceitunas (peso medio del fruto, relación pulpa/hueso y rendimiento graso del fruto) y de propiedades fisicoquímicas de los aceites extraídos (composición en ácidos grasos y polifenoles) (Fourati y col., 2003). En el mismo sentido, otro estudio basado en la composición lipídica de la pulpa y del hueso fue llevado a cabo para discriminar entre cultivares cultivados en Marruecos (El Antari y col., 2003). Sin embargo, aunque los caracteres fenológicos y fisicoquímicos constituyen un parámetro importante para la discriminación en olivo, la influencia de factores medioambientales en su expresión limita su fiabilidad (Hamrick y col., 1992).

En las dos últimas décadas, se están adoptando nuevos procedimientos básicamente moleculares y bioquímicos para la identificación y la



discriminación de cultivares de olivo, aprovechando la ventaja que ofrece el polimorfismo existente en varios sistemas enzimáticos y en el material genético de la planta. Dichas técnicas han permitido la evaluación de individuos con propiedades de interés agronómico u oleotécnico en tiempos récord, evitando las costosas prácticas de forzado de crecimiento y el acorte del periodo de juvenilidad. Algunas de estas aproximaciones fueron llevadas a cabo mediante la utilización de isoenzimas. De hecho, Ouazzani y col., (1993) analizaron el determinismo genético y las condiciones de expresión de nueve sistemas enzimáticos en extractos foliares de 44 cultivares diferentes, mientras que otros autores identificaron algunos marcadores bioquímicos relacionadas con los fenotipos isoenzimáticos del polen (Pontikis y col., 1980; Trujillo y col., 1990), entre los que figuran una esterasa, una glucosa fosfato isomerasa y un enzima málico (Trujillo y col., 1995). Sin embargo, los marcadores identificados por estas técnicas generan limitaciones, en particular en el caso de cultivares estrechamente emparentadas (Ouazzani y col., 1995). Por ello, la introducción de marcadores de DNA, está permitiendo ofrecer un número notable de marcadores genéticos, que pueden ser importantes para la discriminación varietal, independientemente de factores medioambientales. En efecto, dichos marcadores provienen o bien del polimorfismo del DNA nuclear o bien del polimorfismo de DNA citoplásmico (mitocondrial y cloroplastídico). Este segundo tipo es más estructural (Petit y col., 1993) y ofrecen la ventaja de ser transmitidos por vía materna y de tener un grado de evolución lento, lo que permite poner en evidencia los eventos históricos que hayan contribuido a la estructura genética de las poblaciones.

Los marcadores de DNA pueden ser clasificados según criterios genéticos en dos grandes grupos: a) Marcadores co-dominantes y revelados individualmente, como los marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) y los marcadores SSR (Simple Sequence Repeats) y b)



Marcadores dominantes, como los marcadores tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) o los marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Ver revisión de Santoni y col., 2000). De hecho, el polimorfismo de los marcadores RAPD (Williams y col., 1990; Welsh y col., 1991), ha sido empleado con éxito para la protección de patentes en plantas (Baird y col., 1996) y para la detección de biodiversidad en varios cultivos comerciales, como el mango (López-Valenzuela y col., 1997), la manzana (Landry y col., 1994) y el melocotón (Lu y col., 1996; Warburton y Bliss, 1996).

Los marcadores RAPD fueron los primeros en ser utilizados para la identificación y la catalogación de cultivares de olivo (Bogani y col., 1994; Fabbri y col., 1995; Vergari y col., 1998; Claros y col., 2000; Khadari y col., 2001; Belaj y col., 2001; Sanz-cortés y col., 2001). En un estudio reciente, Bautista y col., (2003) han podido identificar 22 cultivares de olivo usando 10 marcadores potenciales, denominados SCARs (Sequence Characterised Amplified Region) basados en la secuenciación de los marcadores RAPD (Adam-Blondon y col., 1998; Negi y col., 2000). Otras herramientas moleculares con gran potencial discriminatorio en el olivo se concentran en la detección de secuencias nucleares, denominadas *microsatélites*, es decir repeticiones de di-tri o tetranucleótidos en tándem, como por ejemplo las secuencias SSR (Rallo y col., 2000; Cipriano y col., 2002) o las secuencias ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) (Pasqualone y col., 2001; Essadki y Ouazzani, 2003). En efecto, los marcadores SCARs, SSR y ISSR son muy informativos y pueden indicar con certeza las diferencias intercultivares, incluso en el caso de cultivares estrechamente emparentados. Además, son fáciles de manipular y raramente plantean problemas en la reproducibilidad, como en el caso de los marcadores RAPD, los cuales no se dirigen a regiones concretas del genoma, sino que amplifican simultáneamente varios *loci*. Esto permite la detección de una biodiversidad importante y la realización de una genotipo rápido. Las técnicas



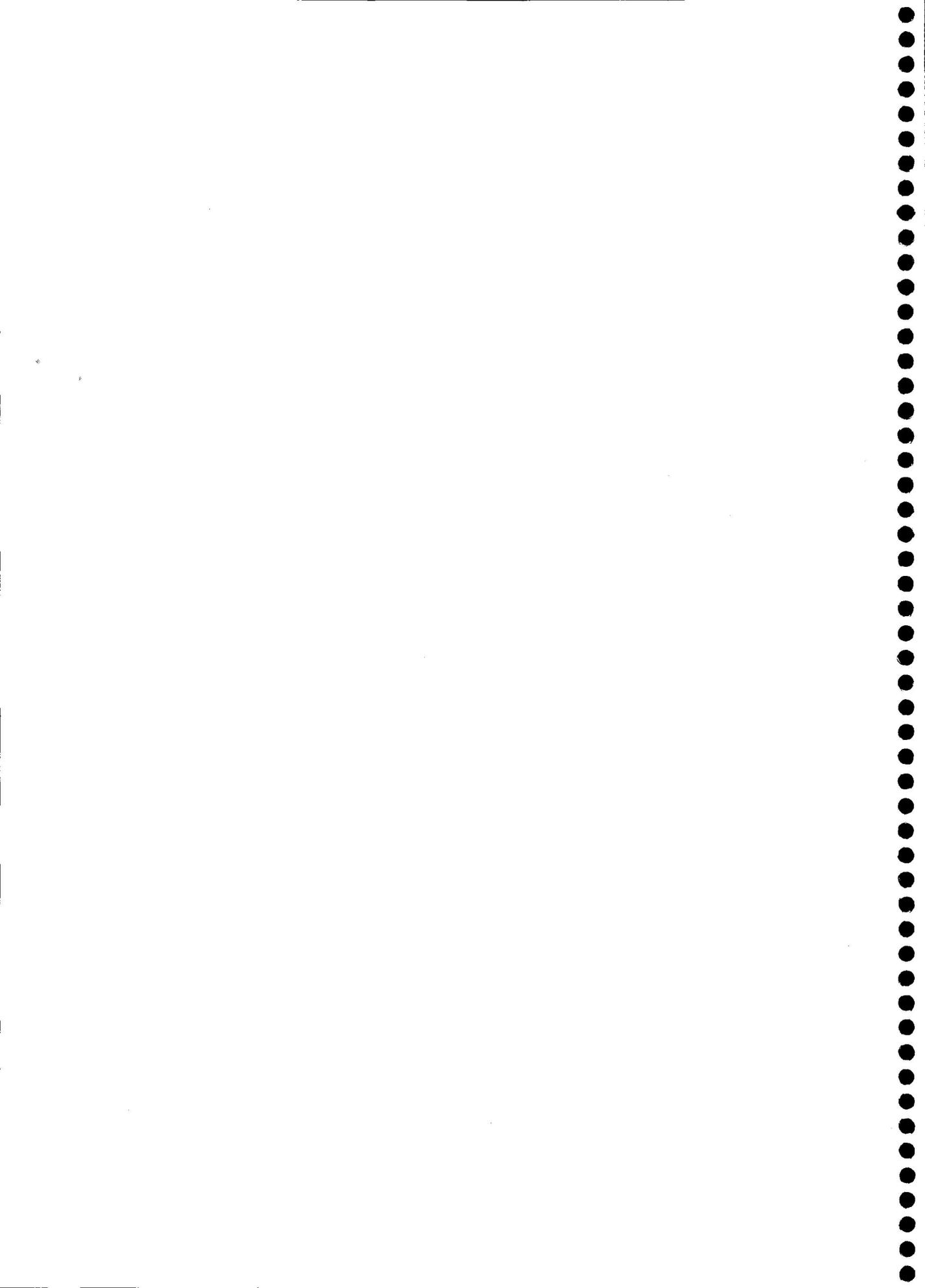
SSR y ISSR fueron también utilizadas para la caracterización (Huellas genéticas o fingerprinting) de cultivares en colecciones de olivo, aprovechando la dispersión de las secuencias microsatélites a nivel del genoma (Hess y col., 2000; Vargas y col., 2001). En otro estudio, de la Rosa y col., (2003) utilizaron 4 tipos distintos de marcadores de DNA (RAPD, AFLP, RFLP, SSR) para el mapeo genético de dos cultivares altamente heterocigóticos: Leccino y Dolce Agogia.

Aunque los procedimientos citados son sencillos a nivel experimental, presentan en la mayoría de los casos limitaciones en relación con la reproducibilidad del polimorfismo encontrado. Además las secuencias amplificadas carecen en general de significado biológico, ya que son en su mayoría no codificantes. Por ello, en nuestro grupo se están aplicando otras alternativas que consisten en la utilización de genes implicados en diversos procesos biológicos en olivo como stearoyl-ACP desaturasa, oleoyl-ACP desaturasa y enoyl-ACP reductasa implicados en la biosíntesis y el almacenamiento de lípidos (Hatzopoulos y col., 2002) así como Ole e 1 y otros marcadores relacionado con la alergenicidad (Castro y col., 2003) para la discriminación entre cultivares de olivo. Esta vía abre nuevas perspectivas en la búsqueda de marcadores moleculares y supone un ahorro apreciable en el tiempo y en el coste para la identificación de patrones de interés agronómico o clínico.



Objetivos

Capítulo 2





En esta tesis doctoral, se plantean dos objetivos principales:

a- Búsqueda de marcadores moleculares para la identificación de cultivares españoles y marroquíes de olivo. Se planteó la posibilidad de utilizar genes relacionados con la alergenicidad y la biosíntesis de lípidos en olivo. Esta labor se llevó a cabo mediante:

- ❖ Aplicación de los parámetros pomológicos establecidos por Barranco y Rallo (1984) en la identificación de siete cultivares de olivo.
- ❖ Análisis de la expresión de 4 genes previamente caracterizados en olivo, relacionados con la alergenicidad: Ole e 1, Ole e 3, Ole e 5, Ole e 6 en polen maduro de los siete cultivares.
- ❖ Estudio de la influencia del polimorfismo localizado al nivel de la secuencia del alérgeno mayoritario Ole e 1 sobre las propiedades antigénicas y alergénicas del mismo.
- ❖ Análisis de la expresión de un gen relacionado con la biosíntesis de ácidos grasos: Stearoyl-acyl carrier protein (ACP) desaturasa, en mesocarpo maduro de las siete cultivares de estudio y de las posibles implicaciones de la expresión de dicho enzima en la calidad del aceite de oliva.

b- Aproximación a la función biológica de los alérgenos de olivo, centrando nuestra atención en Ole e 5 y Ole e 6. Para ello se siguió el siguiente esquema:

- ❖ Análisis de la expresión de Ole e 5 y Ole e 6 en diferentes estadios del desarrollo de anteras, así como en polen maduro.



- ❖ Localización a nivel celular de la proteína de Ole e 6 y de los transcritos correspondientes mediante técnicas de inmunocitoquímica, hibridación *in situ* y amplificación de los productos génicos *in situ* (RT-PCR-IS).

- ❖ Detección mediante RT-PCR y RT-PCR-IS de los transcritos correspondientes a Ole e 5 y a Ole e 6 en mesocarpo.



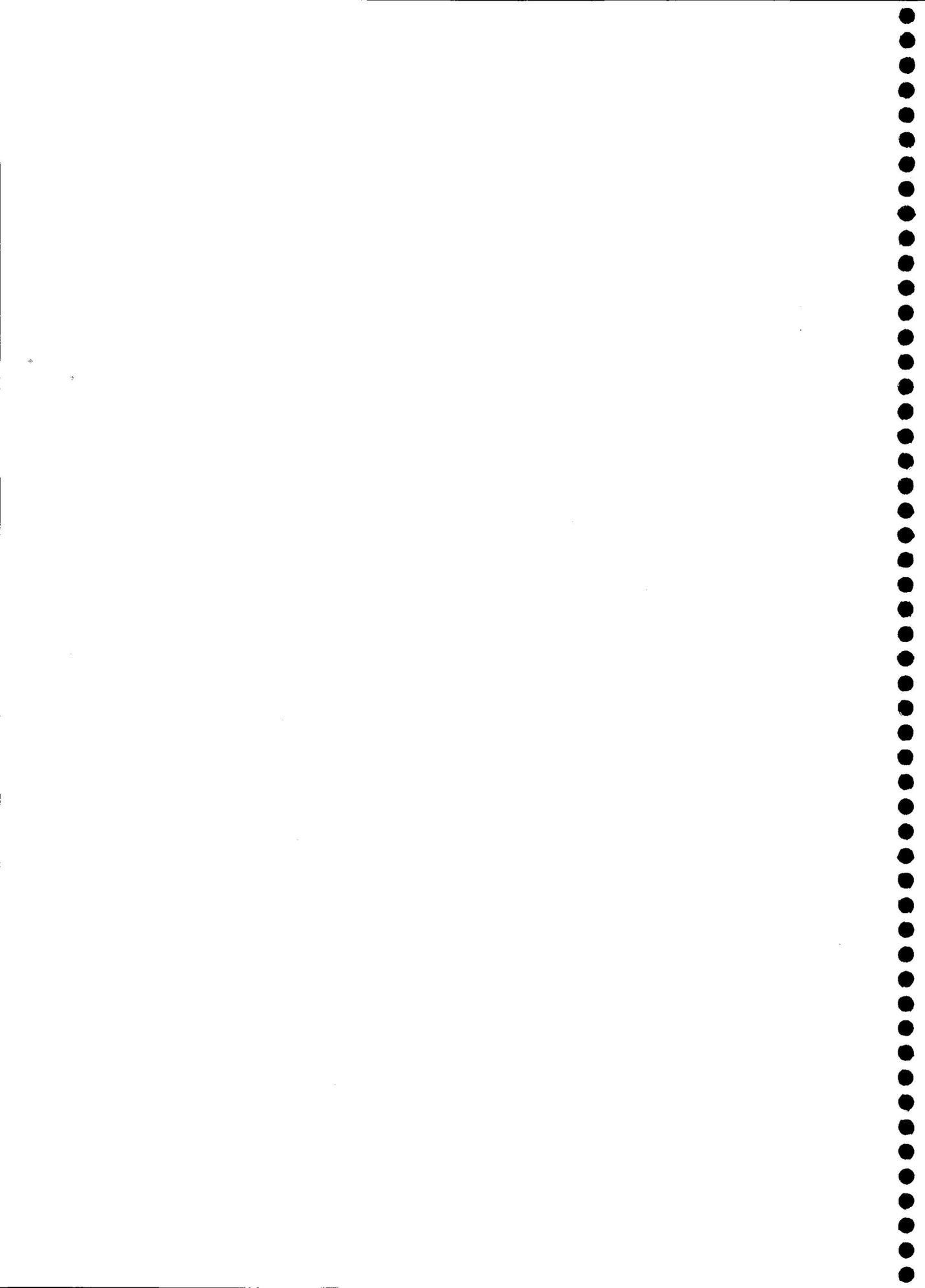
Materiales & Métodos

Capítulo 3

UNIVERSIDAD DE GRANADA

18 ENE. 2005

COMISION DE DOCTORADO





3.1 *Materiales vegetales*

El material vegetal utilizado en este trabajo procede de árboles de olivo (*Olea europaea* L.) de diferentes cultivares españoles (Lucio, Picual, Loaime, Hojiblanca, Arbequina, Bella de España) y marroquíes (Picholine marocaine y uno de sus clones más representados en el sur de Marruecos, Menara), así como de acebuche (*Olea europaea* L. var. *sylvestris*) bien caracterizados según los caracteres pomológicos definidos por Barranco y Rallo (1984), enclavados en las siguientes colecciones:

- ❖ Banco mundial de germoplasma de olivo (BGMO) del CIFA "Alameda del Obispo" (Junta de Andalucía) en Córdoba.
- ❖ Estación Experimental de Aïn Taoujdat (Meknes, Marruecos).

• Anteras en diferentes estadios del desarrollo

Para la realización del estudio de investigación propuesto, se recogieron flores de olivo del cultivar español Picual en intervalos de 2 días durante el periodo de floración de los años 2002 y 2003 (entre abril y mayo). Las flores se recolectaron preferentemente de una misma rama para conseguir el mayor porcentaje posible de muestras del mismo estadio de desarrollo. Dichas flores fueron diseccionadas bajo lupa binocular con el fin de aislar anteras que fueron posteriormente fijadas, procesadas para microscopía óptica o directamente congeladas en N₂ líquido y almacenadas a -80 °C.

• Polen maduro

Se procedió a recolectar polen maduro de los cultivares seleccionados durante el periodo comprendido entre los años 2001 y 2003. El método de recolección consistió en introducir ramas que contienen inflorescencias dentro



de bolsas de papel (resistente a las precipitaciones). Después de 3 a 5 días, se agitaron dichas bolsas manualmente para precipitar el polen en el fondo. El material recolectado fue filtrado a través de tamices de 150 μm y de 50 μm con objeto de eliminar restos florales (anteras, sépalos, pétalos., etc) y hojas. Posteriormente el polen tamizado fue procesado para microscopía o bien congelado en N_2 líquido y guardado a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ para su uso en la extracción de proteínas y RNA total.

- *Mesocarpo durante el desarrollo*

Frutos del cultivar Picual durante su desarrollo fueron recolectados entre los meses de julio a diciembre de los años 2002 y 2003 y fueron diseccionados con un escalpelo estéril con objeto de separar la semilla y el mesocarpo. Este último fue procesado para microscopía o bien congelado inmediatamente en N_2 líquido y guardado a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su posterior uso.

- *Hojas jóvenes*

Se recolectaron hojas jóvenes del cultivar Picual, y de acebuche (*Olea sylvestris*) para la realización de extracciones de DNA genómico.

- *Aceite extra virgen de cultivares*

Las muestras de aceite extra virgen monovarietal fueron obtenidas de diversas almazaras (OLIGRA Granada y de Marruecos) y extraídas a partir de aceitunas negras (maduras) y fueron procesadas para el análisis de su composición en ácidos grasos.



3.2 Métodos

En este trabajo se han aplicado métodos bioquímicos, moleculares y celulares y que se detallan a continuación:

3.2.1 Análisis de proteínas

• Extracción de proteínas totales

Se utilizaron diferentes protocolos para la extracción de proteínas totales dependiendo del tipo de tejido:

❖ Anteras

1º- Moler 0.1 g de anteras en un mortero con la adición frecuente de N₂ líquido. Añadir el polvo resultante a 1 ml de un tampón de extracción^(a) y añadir 20 µl de Fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF)^(b).

2º- Mezclar en un agitador "vortex" y centrifugar directamente a 10.000 g durante 10 min.

3º- Recuperar el sobrenadante y filtrar a través de una membrana de 0.2 µm (SARSTEDT) y guardar a -20 °C.

Reactivos:

^(a) *Tampón de extracción: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM ácido ascórbico, 100 mM DTT y 2 % Triton X-100.*

^(b) *Fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF): 100 mM PMSF en isopropanol.*

Notas

PMSF: Inhibidor de proteasas.

❖ Polen maduro

1º- Incubar 0.5 g de polen maduro en 5 ml de un tampón de extracción^(a). Añadir 100 µl de PMSF e incubar a 4 °C en agitación durante 8 h.

2º- Centrifugar a 10.000 g durante 2 x 15 min. 3º- Filtrar el sobrenadante a través de una membrana de 0.2 µm. Almacenar los extractos en alícuotas a -20 °C.



Reactivos

^(a) *Tampón de extracción: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0.*

❖ Fruto (mesocarpo)

1º- Moler 0.5 g de mesocarpo en un mortero con la adición frecuente de N₂ líquido. Añadir el polvo resultante a 5 ml de un tampón de extracción^(a).

2º- Agitar vigorosamente con Vortex hasta conseguir una solución homogénea. Centrifugar a 10.000 g durante 15 min.

3º- Filtrar el sobrenadante a través de membranas de 0,2 µm. Repartir en alícuotas y guardar a -20 °C.

Reactivos

^(a) *Tampón de extracción: 12.5 % 1M Tris-HCl, PH 7.0, 7.7% SDS y 10 % β-mercaptoetanol.*

• Cuantificación de proteínas totales

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de Bradford (1976).

1º- Para obtener la curva patrón: preparar seis diluciones diferentes en un volumen total de 800 µl (1µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml y 25 µg/ml) a partir de una solución madre de BSA^(a).

2º- Para la preparación de las muestras (extractos proteicos crudos): añadir 5 µl de muestra a 795 µl de H₂O destilada.

3º- Añadir a cada dilución 200 µl de reactivo Bradford (BioRad) e incubar 5 min a temperatura ambiente.

4º- Realizar 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).

5º- Establecer una recta de regresión a partir de los datos obtenidos de la curva patrón, en la cual se interpolan los valores de la concentración de las proteínas presentes en cada una de las muestras.



Reactivos

(a) Solución madre de BSA: 1mg/ml BSA.

• **Electroforesis de proteínas mediante SDS-PAGE**

Se utilizó un equipo de electroforesis Mini-Protean II (BioRad).

1º- Preparar gel separador y gel concentrador como se detalla en la tabla siguiente:

Componente	SDS-PAGE 12 %	
	Gel concentrador	Gel separador
Acrilamida*	0.4 ml	2.43 ml
Tampón**	1.67 ml	3.34 ml
Glicerina	—	1.06 ml
Persulfato amónico***	70 µl	70 µl
TEMED	7 µl	7 µl
Agua destilada	Hasta 5 ml	Hasta 10 ml

*Acrilamida (50 %): 48 % Acrilamida y 1.48 % Bis-Acrlamida.

**Tampón de geles: 3 M Tris-HCl, pH 8.45 y 0.3 % SDS.

***Persulfato amónico: 10 % persulfato amónico en agua destilada.

2º- Adicionar persulfato amónico y N,N,N,N'-tetra-methyl-ethylenediamine (TEMED) al gel separador. Mezclar bien y aplicar en los moldes de cristal del equipo de electroforesis.

3º- Añadir 3 a 5 gotas de iso-Butanol saturado al 50 % con H₂O destilada a la superficie del gel y dejar polimerizar durante 30 min a temperatura ambiente.

4º- Eliminar el iso-Butanol mediante varios lavados con H₂O destilada.

5º- Añadir persulfato amónico y TEMED al gel concentrador. Incorporar los peines correspondientes al sistema de electroforesis y dejar polimerizar 1 a 2 h a temperatura ambiente.



6º- Para la preparación de las muestras, mezclar 30-60 µg de extractos proteicos crudos con tampón de carga 5x^(a) en relación 4/1. Desnaturalizar las mezclas durante 5 min a 95 °C en un baño termostatzado.

7º- Cargar las muestras y los marcadores de peso molecular en las calles correspondientes del gel concentrador.

8º- Rellenar los tanques del aparato con los tampones correspondientes^(b) y correr los geles a 120 V constantes.

Reactivos

^(a) *Tampón de carga 5x*: 1.51 % Tris, 10 % SDS, 30 % glicerina, 0.05 % azul de bromofenol y 5 % β-mecrptoetanol.

^(b) *Tampones de electroforesis*:

— *Tampón de ánodo*:: 200 mM Tris-HCl, pH 8.3.

— *Tampón de cátodo*:: 100 mM Tris, 100 mM Tricina y 0.1 % SDS.

Notas

El iso-Butanol impide el contacto de la superficie del gel separador con el aire, favoreciendo su polimerización.

• *Tinción de geles con azul Coomassie*

1º- Tefñir el gel con una solución de azul Coomassie^(a) durante 1 a 2 h en agitación.

2º- Lavar el gel durante 5 min con H₂O destilada.

3º- Desteñir con solución de distinción^(b) durante una noche.

Reactivos

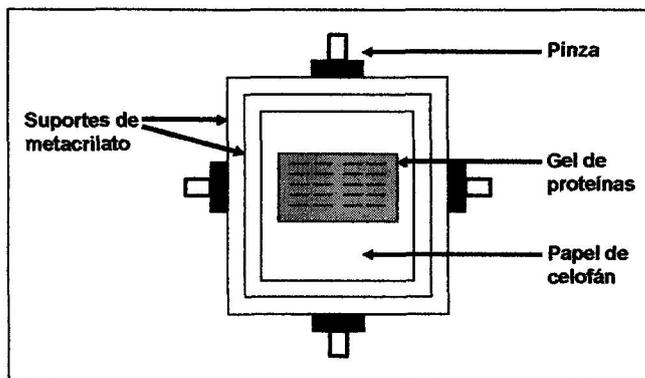
^(a) *Solución de azul Coomassie*: 25 % metanol, 10 % ácido acético y 0.1 % Azul coomassie R-250 (BioRad).

^(b) *Solución de distinción*: 20 % metanol, 7 % ácido acético y 3 % glicerina.



- **Secado de geles**

1º- Después del proceso de destinción de los geles SDS-PAGE, lavar los geles en H₂O destilada durante 5 min y colocarlos entre 2 piezas de papel celofán empapado en una solución de glicerina al 3% en H₂O según el siguiente esquema:



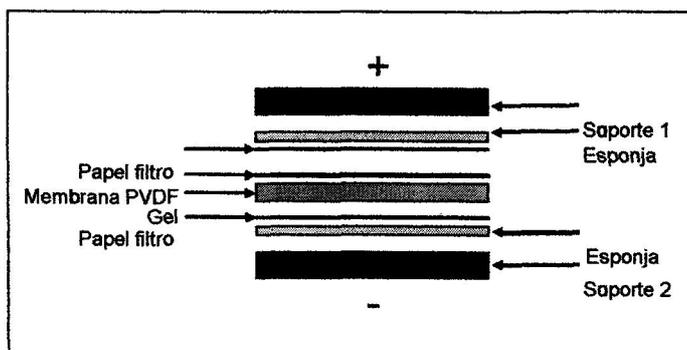
2º- Dejar secar el gel a temperatura ambiente toda la noche.

- **Transferencia de geles SDS-PAGE a membranas**

1º- Después de realizar una electroforesis SDS-PAGE, equilibrar el gel en tampón de transferencia^(a) durante 30 min.

2º- Incubar brevemente una membrana de PVDF (Biotrace™ 0.45 µm, PALL) en metanol. Lavar con H₂O durante unos segundos y equilibrar a continuación en el tampón de transferencia durante 5 min.

3º- Transferir el gel a la membrana utilizando un equipo Mini Trans-Blot (BioRad) según el esquema siguiente:



4º- Llenar el tanque del sistema con el tampón de transferencia preenfriado a 4 °C.

5º- Aplicar un voltaje constante de 120 V durante 90 min a 4 °C.

Reactivos

(a) Tampón de transferencia: 25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 20 % metanol. El pH debe ser alrededor de 8.3.

Notas

Se puede realizar la transferencia del gel a 30 V durante toda la noche a 4 °C.

• Detección de proteínas mediante Immunoblot

1º- Después de la transferencia de geles SDS-PAGE a membranas, equilibrar la membrana en tampón TBST^(a) durante 5 min y bloquearla a continuación con una solución de bloqueo^(b) durante 1 h a temperatura ambiente.

2º- Diluir el anticuerpo primario correspondiente al alérgeno a detectar (ver tabla) en la misma solución de bloqueo. Incubar durante 4 h a temperatura ambiente.



Anticuerpo 1 ^º	Dilución
Monoclonal Anti-Ole e 1 (10 H1)	1:500
Monoclonal Anti-Ole e 1 (10 H3)	1:100
Monoclonal Anti-Ole e 1 (20 G7)	1:100
Monoclonal Anti-Ole e 1 (21 F5)	1:100
Monoclonal Anti-Ole e 1 (14 D5)	1:100
Monoclonal Anti-Ole e 1 (3 F2)	1:100
Monoclonal Anti-Pla L 1 (6 G10)	1:50
Monoclonal Anti-Pla L 1 (2 A10)	1:50
Policional anti-Ole e 3	1:250
Policional anti-Ole e 6	1:250

3º- Lavar la membrana dos veces durante 15 min con TBST.

4º- Diluir el anticuerpo secundario específico en tampón TBST (ver tabla).

Incubar la membrana durante 1 h a temperatura ambiente.

Anticuerpo 2 ^º	Dilución
Anti-ratón IgG-AP	1:2000
Anti-conejo IgG-AP	1:3000
Anti-conejo IgG-AP	1:3000

5º- Lavar la membrana dos veces durante 15 min con TBST.

6º- Incubar la membrana con 1/2 ml de NBT-BCIP (Amresco) durante 5 a 10



min a temperatura ambiente.

7º- Parar la reacción colorimétrica mediante un corto lavado con TBST.

Reactivos

(a) TBST: diluir TBS 10x a 1:10. Adicionar 0.1 % Tween-20.

TBS 10x: 10 mM Tris-HCl, pH a 7.4 y 57 mM NaCl.

(b) Solución de bloqueo: 3 % leche desnatada en polvo en TBST.

Notas

Los anticuerpos secundarios que vienen en la tabla son de Sigma.

En el caso de inmunoblot con sueros de pacientes alérgicos al polen de olivo, se utiliza un anti-humano IgE (Sigma) diluido a 1:200 como primario y el anti-ratón IgG-AP (Sigma) diluido 1:2000 como secundario.

• **Detección de glicoproteínas con concavalina A**

La lectina concavalina A se une específicamente a los azúcares (manosa) de las glicoproteínas.

1º- Equilibrar el blot de proteínas en tampón TBST durante 5 min y bloquearlo a continuación con una solución de bloqueo^(a) durante 1 h a temperatura ambiente.

2º- Diluir lectina Concavalina A conjugada con peroxidasa (Sigma) a una concentración final de 20 µg/ml en tampón TBST. Incubar la membrana en esta dilución durante 4 h a temperatura ambiente.

3º- Lavar la membrana dos veces durante 15 min con TBST.

4º- Incubar la membrana con 5 ml diaminobenzidina (DAB)^(b) (Sigma) durante 5 min a temperatura ambiente.

5º- Parar la reacción de detección mediante un corto lavado con TBST.

Reactivos

(a) Solución de bloqueo: 3 % BSA en TBST.

(b) Para preparar 10 ml del substrato diaminobenzidina: disolver 6 mg de diaminobenzidina en (9 ml 2M Tris-HCl, pH 7.5, 1 ml 0.03 % CoCl₂). Añadir 100 µl de 3% H₂O₂.



3.2.2 Análisis de transcritos/secuencias DNA

- ***Extracción de RNA total***

La extracción de RNA total se llevó a cabo a partir de los mismos tejidos utilizados para la extracción de proteínas totales. A continuación se detalla el protocolo seguido para cada tipo de tejido:

- ❖ ***Anteras***

- 1º- Moler 0.1 g de anteras en un mortero con la adición frecuente de N₂ líquido, hasta conseguir un polvillo fino.
- 2º- Homogeneizar el polvillo conseguido en 0.7 ml de un tampón de extracción^(a). Incubar a 56 °C en un baño termostatzado durante 1 min.
- 3º- Centrifugar a 10.000 g durante 10 min.
- 4º- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y añadir 0.7 ml de fenol. Mezclar bien y centrifugar a 10.000 g durante 10 min.
- 5º- Recoger el sobrenadante en otro tubo nuevo y añadir el mismo volumen de fenol/cloroformo (1:1). Mezclar bien y centrifugar a 10.000 g durante 5 min.
- 6º- Añadir al sobrenadante el mismo volumen de isopropanol preenfriado a -20 °C. Mezclar suavemente invirtiendo el tubo e incubar a -20 °C durante 30 min.
- 7º- Centrifugar a 10.000 g durante 15 min.
- 8º- Eliminar el sobrenadante. Secar el precipitado a 37 °C durante 10 min y resuspender a continuación en 60 µl de H₂O-DEPC.
- 9º- Añadir 20 µl de una solución de LiCl^(b). Agitar suavemente e incubar a 4 °C durante 4 h.
- 10º- Centrifugar a 10.000 g a 4 °C durante 15 min.
- 11º- Eliminar el sobrenadante y añadir 1 ml de etanol 75% preenfriado a -20 °C. Centrifugar a 10.000 g a 4 °C durante 2 min.
- 12º- Descartar el sobrenadante y secar el precipitado a 37 °C durante 10 min.
- 13º- Resuspender el RNA en 50 µl de H₂O-DEPC. Cuantificar el RNA y guardar a -80 °C.



Reactivos

(a) *Tampón de extracción: 100 mM Tris-HCl, pH 8.5, 100 mM NaCl, 20 mM EDTA y 1% SLS (Sodium Lauryl sarcosine).*

(b) *Solución de LiCl: 8M LiCl.*

Notas

La incubación de la muestra a 56 °C favorece la extracción del RNA.

El fenol permite la extracción de la fracción proteica del tejido.

El LiCl es una sal que permite la precipitación específica de RNA de cadena simple.

❖ **Polen maduro**

1º- Moler 0.1 g de polen maduro en un mortero preenfriado con N₂ líquido, adicionando frecuentemente N₂ líquido.

2º- Homogenizar el polvillo resultante en 0.7 ml de tampón de extracción^(a). Incubar a 56 °C en un baño termostatzado durante 1 min.

3º- Terminar el procedimiento tal y como se describe para las anteras.

Reactivos

(a) *Tampón de extracción: 100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 10 mM EDTA, 100 mM LiCl y 1 % SDS.*

❖ **Fruto (mesocarpo)**

Debido al alto contenido en lípidos presente en el mesocarpo de olivo, se utilizó un kit comercial RNeasy (Quiagen) para la extracción de RNA total, siguiendo las recomendaciones del fabricante:

1º- Moler 0.1 g de mesocarpo en un mortero con la adición frecuente de N₂ líquido, hasta reducir el tejido a un polvo fino. Añadir 450 µl de tampón RLT y 4.5 µl de β- mercaptoetanol. Homogenizar bien en un agitador "vortex" y incubar durante 3 min a 56 °C.

2º- Añadir el lisado a una columna "QIAshredder spin". Centrifugar a 10.000 g durante 2 min.



- 3°- Transferir la fracción filtrada a un nuevo tubo y añadir 0.5 volumen (225 µl) de etanol absoluto.
- 4°- Aplicar la muestra a una columna "RNeasy spin" y centrifugar a 10.000 g durante 15 seg.
- 5°- Eliminar la fracción filtrada. Añadir a la columna 700 µl de tampón RW1. Centrifugar como en la etapa anterior.
- 6°- Transferir la columna a otro tubo y añadir 500 µl de tampón de lavado RPE. Centrifugar como en la etapa anterior.
- 7°- Añadir otros 500 µl del tampón RPE y centrifugar a 10.000 g durante 2 min.
- 8°- Poner la columna en un nuevo tubo e incorporar 30 a 50 µl de H₂O-DEPC.
- 9°- Eluir el RNA total mediante una centrifugación a 10.000 g durante 1 min. Guardar el RNA a -80 °C.

Notas

El RNA es muy sensible a la degradación con enzimas estables y muy activas, denominadas ribonucleasas o RNasas. Entre las recomendaciones necesarias para inactivar dichas enzimas se destacan:

Extracción del RNA a muy baja temperatura.

Hornear los morteros, los tubos y las puntas a 140 °C durante 2 horas.

Tratamiento de H₂O con DEPC (inactivador de RNasas): Añadir 0.1% DEPC a H₂O bidestilada. Agitar bien e incubar a temperatura ambiente toda una noche. Autoclavar a continuación para inactivar el DEPC.

• *Extracción de DNA genómico a partir de hojas*

- 1°- Moler 0.5 g de hojas en un mortero con la adición frecuente de N₂ líquido, hasta conseguir un polvo fino. Añadir el resultante a 5 ml de un tampón de extracción CTAB^(a) precalentado a 60 °C. Incubar a 60 °C en un baño termostatzado durante 30 min y agitando ocasionalmente.
- 2°- Añadir 5 ml de fenol. Mezclar bien y centrifugar a 2.000 g durante 15 min a temperatura ambiente en un rotor SS-34 (RC5C, Sorvall).
- 3°- Recoger el sobrenadante en un nuevo tubo e añadir un mismo volumen de fenol/cloroformo (1:1). Mezclar y centrifugar a 2.000 g durante 10 min a



temperatura ambiente.

4º- Recoger la fase superior en un nuevo tubo e incorporar un mismo de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Centrifugar a 2.000 g durante 5 min a temperatura ambiente.

5º- Recoger la fase superior en un tubo nuevo y añadir 2 volúmenes de isopropanol. Mezclar invirtiendo el tubo e incubar a -20 °C durante 2h.

6º- Recuperar el DNA genómico de una de las siguientes formas:

- Cuando la concentración del DNA es importante, se aprecia un material blanquecino. Recoger dicho material con una espátula y añadir 10 ml de un tampón de lavado^(b).
- Cuando la concentración del DNA es inferior, se observa un material difuso. Centrifugar a 1.000 g durante 2 min. Añadir 10 ml de un tampón de lavado.
- Cuando la concentración del DNA es baja, no se distingue ningún material en el medio. Centrifugar a 10.000 g durante 2 min. Añadir 10 ml de un tampón de lavado.

7º- Incubar durante 20 min a temperatura ambiente. Centrifugar a 2.000 g durante 10 min.

8º- Eliminar el sobrenadante y dejar el pellet secándose bien a temperatura ambiente.

9º- Resuspender el DNA con 1 ml de tampón TE^(c). Añadir RNAsa A a una concentración final de 10 µg/ml e incubar a 37 °C durante 30 min. Guardar El DNA a -20 °C.

Reactivos

^(a) *Tampón de extracción CTAB: 2 % CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) (p/v), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 y 0.2 % β-mercaptoetanol.*



(b) *Tampón de lavado*: 10 mM acetato amónico y 76 % etanol.

(c) *Tampón TE*: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 y 1 mM EDTA.

- **Cuantificación de los ácidos nucleicos**

1º- Diluir una alícuota de 5 µl de DNA o RNA total 1:100 con H₂O-DEPC.

2º- Medir la absorbancia (A) a 260 nm y a 280 nm con un espectrofotómetro (UV-1603, Shimadzu)

3º- Para determinar la concentración de los ácidos nucleicos, utilizar las dos relaciones siguientes:

- Para el DNA: $A_{260} \times 50 \times$ factor de dilución. (100 en este caso).
- Para el RNA: $A_{260} \times 40 \times$ factor de dilución. (100 en este caso).

4º- Para estimar el grado de pureza de los ácidos nucleicos, calcular el valor relativo A_{260}/A_{280} .

- **Northern Blot**

- ❖ **Electroforesis en condiciones desnaturizantes**

1º- Preparar un gel de agarosa (1.1%): Para 50 ml, añadir 0.55 g de agarosa a 36 ml de H₂O-DEPC y disolver en microondas hasta conseguir una solución clara.

2º- Dejar enfriar unos minutos a temperatura ambiente y añadir 9 ml de formaldehído (36-38%), 5 ml de una solución MOPS 10x^(a) y 2 µl de una solución 10 mg/ml de bromuro de etidio.

3º- Aplicar la solución a una bandeja de electroforesis (BioRad) y dejar solidificar durante 30 min a temperatura ambiente.

4º- Para la preparación de muestras, adicionar a 10-15 µg de RNA total un mismo volumen de un tampón de desnaturización^(b). Mezclar e incubar a 65 °C durante 5 min.

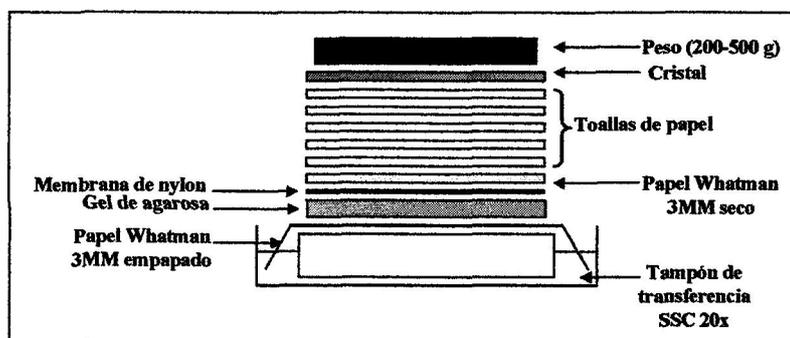
5º- Transferir los tubos de muestras directamente a hielo durante 2 min.



Centrifugar unos segundos y añadir 1/5 volumen de un tampón de carga 5x^(c).
6º- Cargar las muestras en las calles correspondientes del gel. Rellenar los tanques del aparato de electroforesis Minisub DNA Cell (BioRad) con un tampón de electroforesis^(d). Aplicar un voltaje constante de 40 V hasta que el colorante azul del tampón de carga recorre los dos tercios de la longitud del gel.

❖ Transferencia

- 1º- Lavar el gel dos veces durante 10 min con H₂O-DEPC.
- 2º- Equilibrar el gel dos veces durante 10 min con una solución SSC 20x^(e).
- 3º- Transferir el gel mediante capilaridad a una membrana de nylon (Biodyne^R Plus Membrane 0.45 µm, PALL) durante 16 h utilizando SSC 20x como tampón de transferencia:



❖ Hibridación

- 1º- Recuperar la membrana y realizar un lavado con una solución SSC 2x durante 5 min. Hornear la membrana a 80 °C durante 2 h.
- 2º- Prehibridar la membrana con 10 ml de un tampón High-SDS^(f) a 50 °C durante 1 h.
- 3º- Desnaturalizar la sonda DNA ^(g) correspondiente a los transcritos a analizar a 95 °C durante 10 min. Incubar inmediatamente en hielo durante 2 min.
- 4º- Eliminar el tampón de prehibridación y añadir la sonda diluida en el



tampón High-SDS (10 a 20 ng/ml). Hibridar a 50 °C durante una noche.

❖ Detección de los transcritos

1º- Recuperar la sonda y guardarla a -20 °C hasta un posterior uso. Lavar la membrana dos veces durante 5 min a temperatura ambiente con un tampón de lavado 2x^(h).

2º- Lavar durante 15 min dos veces a 68 °C con un tampón de lavado 0.1x⁽ⁱ⁾.

3º- Equilibrar la membrana durante 2 min con tampón 1^(j).

4º- Bloquear la membrana durante 45 min a temperatura ambiente con 10 ml de solución de bloqueo (tampón 2)^(k).

5º- Diluir el anticuerpo anti-digoxigenina-AP (Roche) 1:10.000 en el mismo tampón de bloqueo. Incubar durante 60 min a temperatura ambiente.

6º- Lavar la membrana durante 15 min dos veces con el tampón 1.

7º- Equilibrar la membrana durante 3 min con tampón 3^(l).

8º- Diluir el sustrato quimiluminiscente (CDP-Star) de la fosfatasa alcalina (Roche) 1:100 en tampón 3. Añadir la solución a la membrana e incubar durante 5 min a temperatura ambiente.

9º- Eliminar el sustrato y revelar la reacción quimiluminiscente mediante autoradiografía con una película fotográfica (HTU-7, AGFA).

Reactivos

^(a) MOPS 10x: 200 mM MOPS, 50 mM acetato sódico, 10 mM EDTA. Ajustar el pH a 7.0. Filtrar a través de una membrana de 0.2 µm.

^(b) Tampón de desnaturalización: 0.7x MOPS y 9.2 % formaldehído.

^(c) Tampón de carga 5x: 50 % glicerina, 1 mM EDTA, pH 8.0, 0.25 % azul de bromofenol y 0.25% xilenocianol. Autoclavar.

^(d) Tampón de electroforesis: MOPS 1x.

^(e) SSC 20x: 3 M NaCl y 0.3 M citrato monosódico. Ajustar el pH a 7.0. Autoclavar.

^(f) Tampón High SDS: 7 % SDS, 50 % formamida, SSC 5x, 2 % agente de bloqueo (Blocking reagent) (Roche), 50 mM fosfato monosódico y 0.1 % N-lauroylsarcosina. Ajustar el pH a 7.



(e) *Sonda DNA marcada con digoxigenina: Sintetizar la sonda mediante PCR a partir de minipreps según se indica en el método de síntesis de sondas DNA marcadas con digoxigenina.*

(f) *Tampón de lavado 2x: SSC 2x y 0.1 % SDS.*

(g) *Tampón de lavado 0.1x: SSC 0.1x y 0.1 % SDS.*

(h) *Tampón 1: 150 mM NaCl y 100 mM ácido maleico. Ajustar el pH a 7.5 y adicionar 0.3 % Tween-20.*

(i) *Tampón 2: Diluir el agente de bloqueo 10 % a 1:10 en tampón 1.*

Blocking reagent 10 %: 10 % agente de bloqueo en tampón 1. Autoclavar.

(j) *Tampón 3: 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl y 50 mM MgCl₂. Autoclavar.*

Notas

La temperatura de hibridación depende de varios factores como el tamaño del transcrito a detectar, la composición del tampón de hibridación, el tipo de sonda, etc.

La temperatura de prehibridación e hibridación para las sondas Ole e 1 y Stearoyl-ACP desaturasa es 50°C.

La temperatura de prehibridación e hibridación para las sondas Ole e 3 y Ole e 6 es de 45°C.

• ***Amplificación mediante RT-PCR***

❖ ***Transcripción inversa***

1º- Para una reacción de 100 µl, mezclar en un tubo de PCR 2 a 5 µg de RNA total y 50 ng de un adaptador oligo dT: 5'-ACTCGAGTCGAACATCGA(T)17-3'.

Incubar durante 5 min a 70 °C. Enfriar inmediatamente en hielo durante 1 min.

2º- Incorporar en el mismo tubo los componentes siguientes: tampón de transcriptasa inversa M-MLV 1x (Promega), 1 mM dNTP's, 1 µl de transcriptasa inversa M-MLV (200 U/µl) (Promega) y H₂O-DEPC hasta 100 µl.

3º- Incubar a 42 °C durante 1 h.

❖ ***Amplificación mediante PCR***

1º- Para una reacción de 50 µl, mezclar los siguientes componentes: tampón EcoTaq 1x, 0.1 mM dNTP's, 100 ng cDNA, 5 pmol de cada cebador y H₂O bidestilada hasta 49.5 µl.

2º- Realizar en un termociclador (Progene Thermocycler, Techne) el programa



de amplificación siguiente: desnaturalizar el cDNA a 95 °C durante 3 min y disminuir la temperatura a 80 °C. Adicionar en el tubo de PCR 0.5 µl de Ecotaq (5U/µl) DNA polimerasa (C.Viral). Continuar con el siguiente programa:

95 °C (1min) }
Tm °C (x min) } 25 a 35 ciclos + 72 °C durante 10 min.
72 °C (1min) }

Notas

Para los controles negativos, se omite la etapa de transcripción inversa.

Tm representa la temperatura de fusión de los cebadores. Se calcula a partir de la siguiente relación: $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$. Siendo A, T, G, C el número de bases de cada tipo presente en el oligonucleótido.

El tiempo de la etapa de fusión de los cebadores es función del tamaño de la secuencia de DNA a amplificar, normalmente es de 1 min para las secuencias de menos de 1 Kpb.

Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados en base a secuencias conocidas de los diferentes genes estudiados:

Ubiquitina:

Oligo sense: 5'-ATGCATCTTTGTGAAGAC-3' Tm: 50

Oligo antisense: 5'-ACCACCACGGAGACGGAG-3' Tm: 60

Temperatura de amplificación utilizada: 57 °C.

Ole e 1 (GenBank™/EMBL X76395):

Oligo sense: 5'-ACCTCCAGTTTCTCAATTCAC-3' Tm: 62

Oligo antisense: 5'-GACTCGAGTCGAACATCGA(T)17-3' Tm: 92

Temperatura de amplificación utilizada: 59 °C.

Ole e 3 (GenBank™/EMBL AF015810):

Oligo sense: 5'-CCGACGATCCACAGGAAGTAGC-3' Tm: 70

Oligo antisense: 5'-CTTGGCAACGTCCTTGACTAATCC-3' Tm: 60

Temperatura de amplificación utilizada: 65 °C.

Ole e 5 (GenBank™/EMBL AF426829):

Oligo sense: 5'-CCTGGACTTCATGCTTCCAT-3' Tm: 60

Oligo antisense: 5'-TCTTCCGCCAGCGTTCCAGTG-3' Tm: 70

Temperatura de amplificación utilizada: 60 °C.



Ole e 6 (GenBank™/EMBL U86342)

Oligo sense: 5'-ATGTTACGACACCTGCCACA-3' Tm: 60

Oligo antisense: 5'-TGGACCCAAAACCTGAACCT-3 Tm: 58

Temperatura de amplificación utilizada: 57 °C.

Stearoyl-ACP desaturasa (GenBank™/EMBL U58141)

Oligo sense: 5'-ATGTCCAACCCGTCCAGAAAG-3' Tm: 64

Oligo antisense: 5'-CCCATTCCTTAGCACCAGAA-3' Tm: 60

Temperatura de amplificación utilizada: 58 °C.

• ***Amplificación mediante RT-PCR a tiempo real***

❖ ***Transcripción inversa***

1º- Para la obtención de cDNAs, se incorporan en un tubo de PCR los siguientes componentes: 3 a 5 µg de RNA total, 100 ng oligos "Random Hexamers Primers" (48190-011, Invitrogen), tampón 1x (Invitrogen), 1mM dNTP's, 30 U inhibidor de RNasa (Promega), 5 mM DTT, 200 U Enzima Superscript III (Invitrogen) y H₂O-DEPC hasta 20 µl.

2º- Incubar la reacción de transcripción inversa a 50 °C durante 1 h y a continuación a 70 °C durante 15 min.

❖ ***Amplificación mediante PCR***

1º- Llevar a cabo la PCR en un termociclador (Applied Biosystems GenAmp 5700), mediante el uso de un kit QuantiTect SYBR Green PCR (Quiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2º- Realizar en siguiente programa de PCR:

{ 95 °C (10 min).
40 ciclos de [95 °C (15 sec), 60 °C (70 sec)].
Llevar la reacción a 4 °C.



3º- Cuantificar la expresión de los transcritos con el método relativo delta-delta (??) (Livak y Schmittgen, 2001).

Notas

Para determinar la equivalencia de la cantidad de cDNA de partida utilizado para cada muestra, se realiza la amplificación simultánea de los transcritos correspondientes al ribosómico S17 de tomate, puesto que se trata de un gen constitutivo y conservado.

Los cebadores utilizados fueron diseñados mediante el programa PrimerExpress (Perkin Elmer) en base a secuencias conocidas:

17S de tomate (GenBank™/EMBL X51576):

S17 sense: 5'-TCATGATAACTCGACGGATCGCAC-3'

S17 antisense: 5'-CGGAATCGAACCCCTAATTCTCCGT-3'

Ole e 1 (GenBank™/EMBL X76395):

Ole e 1 sense: 5'-TGATACATGCCGTGCTGGAT-3'

Ole e 1 antisense: 5'-CCTGGGATGAACTCGCTAAGTT-3'

En la cuantificación en tiempo real existen dos métodos de análisis de datos: cuantificación absoluta o relativa. La cuantificación absoluta determina el número exacto de copias inicial de molde, relacionando la señal de PCR con una curva estándar de DNA o RNA patrón de concentración conocida. En la cuantificación relativa, la señal de PCR del molde problema se compara con otra muestra. Esta forma de cuantificar es más rápida y menos tediosa y es el tipo de cuantificación empleado en este trabajo.

En las experiencias de cuantificación los datos de salida obtenidos a partir de las muestras problema se procesan normalizándolos con la señal aportada por un control normalizador, que generalmente, está representado por un gen constitutivo (housekeeping) de expresión elevada y fisiológicamente constante. Los resultados normalizados se comparan con los aportados con una de las muestras, el control interno. Esta muestra dependerá del tipo de experimento a realizar. En los primeros ciclos de la amplificación el aumento del DNA es prácticamente inapreciable y el fondo (background) de la reacción es lo que se muestra. Conforme aumenta el número de ciclos comienza la amplificación específica de moléculas de DNA, dando lugar a la fase de crecimiento geométrico, hasta que algún reactivo o componente de la amplificación limita el proceso y originando una fase lineal y posteriormente a la fase meseta o "plateau".

El dato más importante de cada muestra a cuantificar es el denominado C_t (Threshold cycle) y representa en número de ciclo en el cual, la línea de la gráfica intercepta la línea base. Esta última se puede calcular manualmente o automáticamente. En el siguiente gráfico se puede apreciar una representación más sencilla de la figura anterior. Cuanto más pequeño es el valor de C_t , mas cantidad de muestra inicial existía en la mezcla de PCR, es decir, más expresado está el gen estudiado. El RNA 18S es un gen altamente expresado en los tejidos, así que su valor de C_t es muy bajo. El nivel de expresión del RNA 18S nos da una idea



comparativa entre diferentes tejidos del nivel de metabolismo.

El método delta-delta ($\Delta\Delta$) es la manera más apropiada para analizar la cuantificación relativa en la expresión génica, utilizando PCR a tiempo real. Para ello, se requiere del empleo de algunas ecuaciones y suposiciones que están bien descritos en Applied Biosystems Users Bulletin No. 2 (P/N 4303859). En el artículo Livak y Schmittgen (2001) se obtiene más información sobre el método. El valor de la expresión de una muestra viene dada por la expresión " $2^{-\Delta\Delta CT}$ ", donde el valor de " $\Delta\Delta CT$ " se calcula con la siguiente función:

$$\Delta\Delta CT_{\text{muestra A}} = \Delta CT_{\text{muestra}} - \Delta CT_{\text{control interno}}$$

$$\Delta\Delta CT_{\text{muestra A}} = (C_{T \text{ muestra}} - C_{T \text{ constitutivo (18S)}}) - (C_{T \text{ control interno}} - C_{T \text{ constitutivo (18S)}})$$

Donde ΔCT es la diferencia entre el C_T de la muestra problema y el C_T del gen constitutivo. De esta manera se normalizan los valores del gen problema a nivel celular. El resultado de la fórmula muestra la mayor o menor proporción en que se expresa el gen problema en una muestra determinada con respecto a una muestra de referencia, por ejemplo una muestra no sometida a tratamiento.

Para aplicar este método necesitamos que la eficiencia de la reacción de PCR de los genes problema y del gen constitutivo sea muy similar. Ésta se puede medir a partir del coeficiente de regresión lineal del valor C_T frente al logaritmo de la cantidad inicial de DNA. Para ello, se realizan amplificaciones de las muestras con diluciones seriadas (1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000).

Síntesis de sondas DNA marcadas con digoxigenina

1º- Para una reacción de 50 μ l, mezclar en un tubo de PCR los componentes siguientes:

Tampón EcoTaq 10x	5 μ l
2.5 mM dATP	2 μ l
2.5 mM dGTP	2 μ l
2.5 mM dCTP	2 μ l
2.5 mM dTTP	3.25 μ l
1mM Dig-11-dUTP	1.75 μ l
Minipreps	100 a 200 ng
Oligo SP6 [™]	50 ng
Oligo T7 [™]	50 ng
H ₂ O-DEPC	Hasta 49.5 μ l



2°- Realizar la amplificación mediante PCR tal y como se ha descrito anteriormente.

Notas

Para la síntesis de sondas DNA marcadas con digoxigenina se utilizaron los siguientes cebadores:

*SP6: 5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3'

**T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

• *Análisis de los productos de amplificación mediante electroforesis*

1°- Para un gel a 1 % de agarosa, añadir 0.5 g de agarosa (BioRad) a 50 ml de un tampón TBE^(a) y fundir en microondas hasta conseguir una solución homogénea. Enrasar de nuevo a 50 ml.

2°- Enfriar durante unos minutos a temperatura ambiente y verter el gel en una bandeja de electroforesis (BioRad), poniendo el correspondiente peine. Dejar el gel polimerizando 15-30 min.

3°- Añadir a las muestras a analizar un tampón de carga 5x^(b) en relación 4:1. Mezclar bien y cargar las muestras y los marcadores de tamaño en sus correspondientes calles.

4°- Llenar los tanques de un equipo de electroforesis (Minisub DNA Cell, BioRad) con TBE y aplicar un voltaje constante de 90 V hasta que el colorante azul del tampón de carga transcurre los dos tercios de la longitud del gel.

5°- Incubar el gel durante 15 a 30 min en 100 ml de H₂O destilada que contiene 5 µl de una solución 10 mg/ml de bromuro de etidio.

6°- Lavar el gel en H₂O destilada durante 10 min y observar con luz UV (260 nm) en un transiluminador.

7°- Registrar y analizar las bandas obtenidas en un equipo BioRad mediante el software Quantity One.



Reactivos

- (a) TBE: 50 mM Tris-HCl, pH 8.2, 2.5 mM EDTA y 50 mM ácido bórico.
- (b) Tampón de carga 5x: 40 % sacarosa y 0.25 % azul de bromofenol.

- **Extracción de DNA a partir de geles de agarosa**

- 1º- Añadir 500 µl de fenol a cada 0.2 g de bandas cortadas. Moler el gel en un mortero hasta conseguir una solución homogénea.
- 2º- Transferir la solución obtenida en un tubo Eppendorf (1.5 ml) y enfriarlo inmediatamente en N₂ líquido. Centrifugar a 10.000 g durante 10 min.
- 3º- Recuperar el sobrenadante y adicionar 200 µl de fenol/cloroformo (1:1). Mezclar bien y centrifugar a 10.000 g durante 5 min.
- 4º- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo. Adicionar 1/10 volumen de una solución 3M acetato sódico, pH 5.2 y 1 ml de etanol absoluto preenfriado a -20 °C. Incubar a -20 °C durante 30 min. Centrifugar a 10.000 g durante 15 min.
- 5º- Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con 1 ml de etanol 70 % preenfriado a -20 °C. Centrifugar a 10.000 g durante 2 min.
- 6º- Eliminar el sobrenadante y secar el precipitado a 37 °C durante 15 min.
- 7º- Resuspender El DNA con 10 µl de H₂O bidestilada o tampón TE y cuantificar el DNA.

3.2.3 Clonación y secuenciación de productos de PCR

- **Preparación de células competentes DH5α**

- 1º- Inocular 1ml de glicerol de células *E. coli* (DH5α) en un matraz estéril que contiene 100 ml de un medio Psi^(a). Incubar en agitación a 37 °C durante 16 h.
- 2º- Transferir el cultivo a hielo durante 15 min. Centrifugar a 2.500 g durante 5 min.
- 3º- Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 40 ml de un tampón TfbI^(b). Incubar durante 15 min en hielo.



4º- Centrifugar como en la etapa 2.

5º- Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 4 ml de un tampón TbfII^(c). Repartir en alícuotas de 100 µl y almacenar inmediatamente a -80 °C hasta su posterior uso.

Reactivos

^(a) Medio Psi: 5 g/l Extracto de levadura (Gibco), 20 g/l bactotripton (Gibco) y 5 g/l sulfato de magnesio. Ajustar el pH a 7.6 con KOH y autoclavar.

^(b) Tampón TbfI: 2.94 g/l acetato potásico, 12.1 g/l RbCl₂, 1.47 g/l CaCl₂, 10 g/l MgCl₂, 15 % glicerina (v/v). Ajustar el pH a 5.8 con 0.2 M ácido acético. Filtrar a través de un filtro 0.2 µm.

^(c) Tampón TbfI: 2.1 g/l MOPS, 11 g/l CaCl₂, 1.21 g/l RbCl₂, 15 % glicerina (v/v). Ajustar el pH a 6.5 con 1M NaOH. Filtrar a través de un filtro 0.2 µm.

Notas

Para la preparación de gliceroles de DH5α: añadir 200 µl de glicerina a 800 µl del cultivo. Almacenar inmediatamente a -80 °C hasta un posterior uso.

• **Clonación de productos de PCR**

Los productos de PCR han sido clonados en un vector pGEM-T Easy (Promega), siguiendo las recomendaciones del fabricante:

❖ Ligación

1º- Mezclar en un tubo de PCR los componentes siguientes:

Tampón Rapid 2x	5 µl
Producto de PCR	15 ng
Vector pGEM-T Easy	50 ng.
DNA Ligasa T4	1 µl
H ₂ O destilada	hasta 10 µl

2º- Incubar la reacción de ligación a temperatura ambiente durante 1 h o como alternativa a 4 °C durante una noche.



❖ Transformación de células competentes

- 1º- Poner 2 µl del producto de ligación en un tubo Eppendorf (1.5 ml).
- 2º- Descongelar una alícuota de células competentes DH5α y poner 50 µl en el tubo que contiene el producto de ligación. Mezclar suavemente e incubar en hielo durante 20 min.
- 3º- Efectuar un choque térmico a 42 °C durante 50 seg en un baño termostatzado. Transferir el tubo inmediatamente en hielo durante 2 min.
- 4º- Añadir 950 µl de un medio SOC^(a). Incubar en agitación a 37 °C durante 90 min.
- 5º- Sembrar una placa Petri^(b) que contiene LB, Ampicilina, IPTG y X-Gal con 50-100 µl del producto de transformación. Incubar a 37 °C durante una noche

Reactivos

^(a) Medio SOC: 20 g/l Bactotriptona (Gibco), 5 g/l extracto de levadura (Gibco), 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl y 970 ml de H₂O destilada. Autoclavar y enfriar a temperatura ambiente. Añadir 10 ml/l de 2M Mg²⁺ y 10 ml/l de 2M glucosa. Esterilizar mediante filtración.

^(b) Placas con LB/ampicilina/IPTG/X-gal: Preparar medio LB con agar (10 g/l bactotriptona, 5 g/l extracto de levadura, 5 g/l NaCl). Ajustar el pH a 7.0 con 1M NaOH. Añadir 15 g/l agar y autoclavar. Enfriar hasta 50 °C y añadir ampicilina, IPTG y X-gal a una concentración final de 100 µg/ml, 0.5 mM y 80 µg/ml respectivamente. Agitar y repartir en placas Petri. Guardar las placas a 4 °C hasta su posterior uso.

Notas

IPTG es un inductor de la actividad de β-galactosidasa.

X-gal es un sustrato de β-galactosidasa, que una vez metabolizado genera una coloración azul.



• *Obtención de DNA plasmídico (Minipreps) mediante lisis alcalina*

❖ *Minipreps*

- 1º- Inocular una colonia blanca en un tubo Eppendorf que contiene 1.5 ml de medio LB ^(a) y añadir ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml. Incubar en agitación a 37 °C durante una noche.
- 2º- Centrifugar a 10.000 g durante 2 min.
- 3º- Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 100 µl de una solución de lisis^(b). Incubar durante 5 min a temperatura ambiente.
- 4º- Añadir 200 µl de solución I^(c). Mezclar suavemente invirtiendo el tubo e incubar en hielo durante 5 min.
- 5º- Añadir al tubo 150 µl de una solución II^(d). Mezclar suavemente y centrifugar directamente a 10.000 g durante 15 min.
- 6º- Recoger el sobrenadante y adicionar un mismo volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). Agitar y centrifugar a 10.000 g durante 15 min.
- 7º- Recoger el sobrenadante y adicionar 1.5 volúmenes de etanol absoluto preenfriado a -20 °C. Incubar a -20 °C durante 30 min.
- 8º- Centrifugar a 10.000 g durante 15 min.
- 9º- Eliminar el sobrenadante. Lavar el precipitado con un 1 ml etanol 70 % y centrifugar a 10.000 g durante 2 min.
- 10º- Descartar el sobrenadante y secar el precipitado a 37 °C durante 15 min.
- 11º- Resuspender la minipreps en 25 µl de H₂O bidestilada y almacenar a 4 °C.

❖ *Análisis de los insertos*

- 1º- Mezclar los siguientes componentes en un tubo: tampón Eco RI 1x (Fermentas), 5 µl DNA minipreps, 1 µl Eco RI (10 U/µl) (Fermentas) y H₂O destilada hasta 10 µl. Incubar a 37 °C durante 2 horas.



2º- Analizar los fragmentos de restricción mediante electroforesis en gel de agarosa.

Reactivos

- (a) Medio LB: 10 g/l bactotrepóna, 5 g/l extracto de levadura, 5 g/l NaCl. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH.
- (b) Solución de lisis: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 500 mM glucosa y 100 µg/ml RNasa A.
- (c) Solución I: 200 mM NaOH y 1 % SDS.
- (d) Solución II: 3M acetato sódico, pH 5.2.

- **Reactivos preparativos para la secuenciación de productos de clonación**

1º- Preparar las dos reacciones siguientes de secuenciación:

- Tubo 1: 100-200 ng de minipreps y 3.2 µmol de oligo sense específico.
- Tubo 2: 100-200 ng de minipreps y 3.2 µmol de oligo antisense específico.

2º- Congelar las muestras a -20 °C hasta su envío para secuenciar

Notas

La secuenciación fue realizada en el servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra" CSIC. Granada.

3.2.4 Herramientas y métodos bioinformáticos utilizados

Con objeto de buscar homología entre las secuencias aminoacídicas de los marcadores estudiados y las secuencias existentes en la base de datos



GenBank™/EMBL, la predicción de motivos de postraducción y el análisis de los perfiles de antigenicidad, se utilizaron los siguientes programas:

- Blastp: Búsqueda de homología con secuencias aminoacídicas de la base de datos GenBank™/EMBL (Altschul y col., 1990).
- Clustal-X (1.81): Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas (Thompson y col., 1997).
- ScanProsite: Predicción de dominios de postraducción en las secuencias aminoacídicas (Falquet y col., 2002)
- PeptideSelect (Invitrogen): Análisis de los perfiles de hidrofiliidad, antigenicidad y de la estructura secundaria de las proteínas.
- Swiss Model: Predicción de la estructura tridimensional de las proteínas.

Con objeto de buscar homología entre las secuencias nucleotídicas de los genes estudiados y las secuencias de la base GenBank™/EMBL y el establecimiento de estudios filogenéticos se utilizaron los siguientes programas:

- Blastn: Búsqueda de homología con secuencias nucleotídicas de la base de datos GenBank™/EMBL (Altschul y col., 1990).
- Clustal-X (1.81): Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas (Thompson y col., 1997).
- Treeview: Establecimiento de estudios filogenéticos y análisis de relaciones genéticas (Roderic, 1996).

3.2.5 *Estudios celulares*

• Determinación del estadio del desarrollo del polen con DAPI

El estadio del desarrollo del polen se determinó visualizando los núcleos mediante una tinción específica para el DNA con una solución de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) (Vergne y col., 1987).

1º- Fijar 3 a 5 anteras en un fijador Carnoy^(a) durante 10 min a temperatura



ambiente.

2º- Sobre un portaobjetos, añadir una gota de una solución de trabajo DAPI^(b). Cortar con un escalpelo el ápice de cada antera y empujar el contenido (meiocitos) hacia el exterior.

3º- Incubar las muestras durante 20 min a temperatura ambiente en oscuridad.

4º- Poner un cubreobjetos sobre las muestras y observar inmediatamente mediante un juego de filtros UV en un microscopio Axioplan (Zeiss) equipado con un sistema de epifluorescencia.

Reactivos

^(a) Fijador Carnoy: etanol/ácido acético (3:1).

^(b) Solución de trabajo DAPI: 1ml de una solución stock de DAPI, 100 µl Triton X-100 y 9 ml de H₂O bidestilada.

Solución stock de DAPI: 10 µg/ml DAPI en tampón McIlvaine.

Solución de McIlvaine: 0.1 M Citrato sódico, 0.2 M fosfato disódico y 1% Triton X-100 (v/v).

Ajustar el pH a 4.0.

Notas

1. Se pueden dejar las muestras en el mismo fijador a 4 °C durante un largo periodo.

• ***Preparación de muestras para microscopía***

Las muestras para estudios microscópicos fueron fijadas, deshidratadas e incluidas parte en parafina para microscopía óptica y parte en resina Unicryl para microscopía electrónica de transmisión (MET).

➤ ***Inclusión en parafina***

❖ ***Fijación***

1º- Sumergir el material vegetal en un fijador de elección^(a). Incubar a 4 °C durante 30 min.

2º- Aplicar vacío durante 10 min.

3º- Eliminar el fijador y añadir otro nuevo. Incubar a 4 °C durante una noche.



4°- Lavar durante 30 min tres veces con un tampón cacodilato 0.1 M, pH 7.2.

❖ Deshidratación

1°- Deshidratar las muestras en una serie de diluciones de etanol:

- Etanol 30 % a 4 °C durante 1 h.
- Etanol 50 % a 4 °C durante 1 h.
- Etanol 70 % a 4 °C durante un día.
- Etanol 90 % a 4 °C durante 1 h.
- Etanol 100% a 4 °C durante 12 h.
- Etanol 100% a temperatura ambiente durante 1 h.

2°- Incubar en xileno durante 5 min a temperatura ambiente.

❖ Infiltración en Parafina

1°- Incubar en separado parafina y xileno a 58 °C durante dos horas.

2°- Mezclar un mismo volumen de parafina y de xileno. Poner las muestras en un vaso de precipitado y añadir la mezcla. Incubar a 58 °C durante tres días.

3°- Realizar 3 cambios/día con parafina a 58 °C durante tres días.

4°- Tras el último cambio, repartir las muestras en placas *Petri*. Transferir las placas a temperatura ambiente hasta que solidifiquen. Guardarlas a 4°C hasta su posterior uso.

❖ Microtomía

1°- Fijar una pieza de parafina que contiene la muestra sobre un portaobjetos.

2°- Tallar una pirámide alrededor de la muestra con un escalpelo.

3°- Fijar el portamuestras sobre el brazo de un micrótopo (Fuji Optical Works LTD). Montar la cuchilla del micrótopo y realizar secciones de 5 a 7 μm de grosor.



4º- Poner las secciones sobre portaobjetos previamente tratadas con TESPA y secarlas a 37 °C.

Reactivos

^(a) Fijador: 4 % paraformaldehído (p/v) y 0.2 % glutaraldehído (v/v). Disolver 1g de paraformaldehído en 12.5 ml de un tampón 0.2 M cacodilato sódico, pH 7.2. Añadir unas lentejas de NaOH para facilitar la disolución. Enfriar en hielo unos min y añadir 200 µl de 0.2 % glutaraldehído. Ajustar el pH a 7.2 con NaOH 1M. Completar con H₂O destilada hasta 25 ml.

➤ Inclusión en Unicryl

❖ Fijación

- 1º- Sumergir el material vegetal en el fijador^(a). Incubar a 4 °C durante 6 h.
- 2º- Aplicar vacío durante 10 min.
- 3º- Eliminar el fijador y añadir otro fresco. Incubar a 4 °C durante una noche.
- 4º- Lavar las muestras tres veces a 4 °C durante 30 min con un tampón 200 mM cacodilato, pH 7.2.

❖ Deshidratación

Deshidratar las muestras en una serie de diluciones de etanol:

- Etanol 30 % a 4 °C durante 1 h.
- Etanol 50 % a 4 °C durante 1 h.
- Etanol 70 % a -20 °C durante un día.
- Etanol 90 % a -20 °C durante 6 h.
- Etanol 100% a -20 °C durante 2 días (2 veces).

❖ Infiltración en Unicryl

- 1º- Incubar las muestras en una mezcla de etanol 100 %/Unicryl (BioCell



International) (1:1) a -20°C durante dos días.

2°- Incubar las muestras en Unicryl a -20°C durante una semana.

3°- Repartir las muestras en cápsulas de gelatina y realizar una polimerización con luz UV a -20°C durante tres días.

❖ Microtomía

Para microscopía óptica, realizar secciones de 0.7 a 0.9 μm de grosor con un microtomo Ultracut E (Reichert-Jung). Poner los cortes sobre portaobjetos tratados con TESPA y dejar secar a 37°C .

Para microscopía electrónica de transmisión, realizar secciones de 70 a 90 nm de grosor. Poner las secciones sobre rejillas de níquel recubiertas con una película de Formvar^(b) y dejar secar a temperatura ambiente.

Reactivos

^(a) Fijador: 4 % paraformaldehído (p/v) y 0.2 % glutaraldehído (v/v) en tampón 0.2 M cacodilato sódico, pH 7.2.

^(b) Formvar: 0.3 % Formvar (p/v) en cloroformo.

Notas

Tratamiento de portaobjetos con 3-aminopropyltriethoxy-silane (TESPA):

1°- Tratar los portaobjetos con mezcla sulfocrómica^(a) durante 4 horas.

2°- Lavar los portaobjetos tres veces con H_2O destilada. Hacer un último lavado con H_2O bidestilada y secar el material a 40°C .

3°- Incubar los portaobjetos en una solución de TESPA^(b) durante 5 min a temperatura ambiente.

4°- Lavar los portaobjetos dos veces durante 2 min con acetona.

5°- Lavar los portaobjetos dos veces durante 2 min con H_2O bidestilada. Secar a temperatura ambiente.

Reactivos

^(a) Mezcla sulfocrómica: Mezclar un mismo volumen de H_2SO_4 y de una solución saturada de dicromato potásico (10 g dicromato potásico, 80 ml ácido sulfúrico y 20 ml de H_2O).

^(b) Solución de TESPA: 3 % Adhesivo TESPA en acetona.

