

I Proj. 24/24

5/47

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha <u>4/5/01</u>
ENTRADA N.º <u>1847</u>

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL



BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento <u>613378487</u>
Nº Copia <u>15526198</u>

APROXIMACIÓN A LA FUNCIÓN BIOLÓGICA DEL ALERGENO
MAYORITARIO DEL POLEN DEL OLIVO (OLE E 1).
IMPLICACIONES CLÍNICAS Y AMBIENTALES.

TESIS DOCTORAL

ANTONIO J. CASTRO LÓPEZ

Granada, 2001

**APROXIMACIÓN A LA FUNCIÓN BIOLÓGICA DEL ALERGENO
MAYORITARIO DEL POLEN DEL OLIVO (OLE E 1).
IMPPLICACIONES CLÍNICAS Y AMBIENTALES.**

Memoria que presenta el Licenciado en Ciencias Biológicas D. Antonio
Jesús Castro López para optar al grado de Doctor.

Fdo.: Antonio J. Castro López



Vº Bº

LOS DIRECTORES DEL TRABAJO



Fdo.: Dra. M. I. Rodríguez García
Investigador Científico del C.S.I.C.



Fdo.: Dr. Juan de Dios Alché Ramírez
Científico Titular del C.S.I.C.

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas de la Estación experimental del Zaidín (CSIC), gracias a una beca predoctoral FPD e I de la Junta de Andalucía (Consejería de Educación y Ciencia). Dicho trabajo ha sido financiado por la DGES (MEC), a través de los proyectos de investigación PGC PB95-0080 y OLI96-2160, y por el INIA, a través del proyecto CA099-003.

Agradecimientos



Con la satisfacción del deber cumplido, me gustaría dedicar estas líneas para expresar mi más sincera gratitud hacia todos aquellos que han contribuido con su esfuerzo y generosidad a que esta tesis haya visto finalmente la luz.

Mis primeras palabras de agradecimiento son para la doctora María Isabel Rodríguez García, por haber depositado su confianza en mí en todo momento desde mi incorporación a su equipo, y por sus excelentes consejos y labor de dirección y orientación en el siempre difícil mundo de la investigación. Al Dr. Juan de Dios Alché Ramírez, por iluminar el camino en los momentos de "oscuridad intelectual", y por su infinita paciencia, a pesar de los reiterados dolores de cabeza de los que me siento responsable. Me considero afortunado por haber contado con el apoyo y amistad de ambos durante todo este tiempo.

Igualmente, deseo expresar mi gratitud al Dr. José María Ramos Clavero quién, desde su labor como tutor, me ha facilitado en todo momento los interminables trámites burocráticos que conlleva la realización de un trabajo como éste.

La buena sintonía dentro de un laboratorio es, a mi entender, fundamental para que un trabajo de esta envergadura llegue a buen término. En este sentido me considero afortunado por haber contado con la amistad y apoyo de todos mis compañeros y compañeras del grupo de Biología del Polen de la Estación Experimental del Zaidín durante todos estos años. Me gustaría comenzar agradeciendo a Matilde Garrido Ortiz (Mati) sus sabios consejos en el manejo y mantenimiento del microscopio electrónico, uno más de la familia, y al que he intentado mimar desde mi llegada. A Concepción Martínez Sierra (Conchita) y Rosa María Duque Reinoso (simplemente Rosa) les debo su inestimable ayuda en el laboratorio, además de amenizar con sus tertulias las largas mañanas delante del ordenador. A las Dra. Adela Olmedilla Arnal y M^a Carmen Fernández Fernández, por sus animosos consejos y su interés por mi trabajo en todo momento. A los Drs. Mohammed M' rani Alaoui (Moha para los amigos) y Lamiae Azbaid (ya de vuelta en su natal Marruecos) por su amistad y compartir tantos buenos momentos dentro y fuera del laboratorio. A Mounim Hamman Khalifa y Amada Pulido Regadera (los pezqueñines del grupo), por su interés y los buenos momentos.

Al Dr. Francisco Muñoz del Castillo (Hospital Reina Sofía, Córdoba), por su inestimable ayuda para conseguir los sueros de pacientes alérgicos al olivo utilizados en este trabajo, y al Dr. Víctor Alché Ramírez (Hospital Clínico de Baza, Granada), sin el cuál no hubiera sido posible llevar a cabo los ensayos SPT.

Deseo expresar también mi gratitud a los Drs. Rosalía Rodríguez (Universidad Complutense, Madrid), Carlos Lahoz (Fundación Jiménez Díaz, Madrid), Florentino Polo (ALK-Abelló, Madrid) y Frances M. Dewey (Department of Plant Sciences, Oxford) por su amabilidad al cedernos los anticuerpos y el clon de Ole e 1 utilizados en esta tesis.

Al Prof. Hugh Dickinson, en cuyo laboratorio en Oxford llevé a cabo una estancia entre los meses de Enero y Marzo del pasado año, por su interés en mi trabajo, y al Dr. Simon Hiscock, por su inestimable ayuda dentro y fuera del laboratorio durante todo ese tiempo. De esos días guardo muy buenos recuerdos y algunos resultados que han sido presentados en esta memoria.

Al Dr. José Palma (Departamento de Bioquímica de la EEZ) por su pericia con el sistema de FPLC, que nos permitió purificar la proteína Ole e 1, y al Dr. Javier Corpas Aguirre (del mismo grupo), por estar siempre dispuesto a echar una mano y oír mis numerosas preguntas. Al Dr. Juan Pedro Martínez Camacho por su inestimable ayuda en el diseño de los análisis estadísticos, y a todos mis antiguos compañeros del grupo de "saltamonteros" del Departamento de Genética, por su inquebrantable amistad desde mis tiempos de estudiante. Es grato comprobar que siempre podré contar con vosotros.

A Mailla, mi mujer, por su apoyo e infinita paciencia durante todos estos años. Ella, más que nadie, ha tenido que soportar mis desánimos y momentos de duda, y sin su cariño este momento nunca habría llegado. A mi familia, especialmente mis padres y hermanas, incansables en sus muestras de ánimo y apoyo. Para todos ellos nunca tendré suficientes palabras de agradecimiento.

Finalmente, deseo dar las gracias a todas aquellas personas de la Estación experimental del Zaidín que de una forma u otra me han ayudado y han seguido mi trabajo.

De nuevo, gracias a todos por vuestra ayuda e interés, desde el convencimiento de que sin vosotros este trabajo nunca se habría hecho realidad.

A Mailla
A mis padres y hermanas

*“Esos árboles tan frescos, tan copados,
tan hermosos, que cuando nos muestran su fruto
verde, dorado y negro (...) es una de las más
agradables vistas que puedan gozarse.”*

(Miguel de Cervantes Saavedra, 1547-1616)

Índice



CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1.	ANTECEDENTES DEL TEMA.....	3
1.2.	EL OLIVO COMO MODELO DE ESTUDIO EN BIOLOGÍA VEGETAL.	4
	<i>El olivo: breve historia de un cultivo milenario.....</i>	4
	<i>Algunos datos sobre el olivar hoy en el mundo, en España y en Andalucía.....</i>	5
	<i>Un poco de botánica.....</i>	7
	<i>¿Por qué el polen de olivo?.....</i>	9
1.3.	EL GAMETOFITO MASCULINO EN ANGIOSPERMAS.....	10
	<i>¿Cómo se forma un grano de polen?.....</i>	11
	<i>¿Cómo germina un grano de polen?.....</i>	13
	<i>Expresión génica durante el desarrollo del grano de polen.....</i>	14
1.4.	MARCADORES DE VARIEDADES EN EL OLIVAR.....	15
1.5.	POLEN Y ALERGIA.....	17
	<i>¿Qué es la alergia respiratoria?.....</i>	17
	<i>El polen como vector causante de alergia respiratoria.....</i>	17
	<i>Caracterización bioquímica y molecular de los alérgenos.....</i>	20
	<i>Proteínas alérgicas en el polen de olivo.....</i>	23
	<i>Función biológica de los alérgenos en el grano de polen.....</i>	25
	<i>Diagnóstico y tratamiento de la alergia.....</i>	27
1.6.	TESIS A PLANTEAR.....	29

CAPÍTULO 2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1.	MATERIAL.....	33
	<i>Material Vegetal.....</i>	33
	<i>Sueros de Pacientes Alérgicos.....</i>	34
2.2.	MÉTODOS DE LABORATORIO.....	34
	PROTOCOLO 1. <i>Estudio morfométrico de la flor de olivo durante su desarrollo.....</i>	34
	PROTOCOLO 2. <i>Tinción de células esporógenas con DAPI.....</i>	35
	PROTOCOLO 3. <i>Extracción de proteínas totales de polen de olivo.....</i>	36
	PROTOCOLO 4. <i>Extracción de proteínas totales de anteras de olivo.....</i>	36

PROTOCOLO 5. Purificación del alérgeno Ole e 1.....	37
PROTOCOLO 6. Cuantificación proteica.....	39
PROTOCOLO 7. Ensayos de actividad esterasa in vitro en extractos proteicos.....	39
PROTOCOLO 8. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.....	40
PROTOCOLO 9. Ensayos de actividad esterasa en geles de poliacrilamida.....	42
PROTOCOLO 10. Tinción de proteínas totales con azul Coomassie.....	44
PROTOCOLO 11. Secado de geles.....	44
PROTOCOLO 12. Isoelectroenfoque (IEF) de la fracción purificada correspondiente a Ole e 1.....	45
PROTOCOLO 13. Western blot.....	47
PROTOCOLO 14. Revelado de actividad fosfatasa alcalina mediante NBT/BCIP.....	50
PROTOCOLO 15. Revelado de actividad fosfatasa alcalina mediante CDP-Star.....	51
PROTOCOLO 16. Aislamiento de ARN total de polen de olivo.....	52
PROTOCOLO 17. Aislamiento de ARN total de anteras de olivo.....	53
PROTOCOLO 18. Cuantificación de los ácidos nucleicos.....	55
PROTOCOLO 19. Electroforesis de ARN en condiciones desnaturalizantes.....	55
PROTOCOLO 20. Northern blot.....	57
PROTOCOLO 21. Electroforesis de ADN.....	59
PROTOCOLO 22. Aislamiento de ADN a partir de geles de agarosa.....	60
PROTOCOLO 23. RT-PCR.....	62
PROTOCOLO 24. Inclusión en parafina para microscopía óptica.....	64
PROTOCOLO 25. Procesamiento convencional de muestras para TEM.....	67
PROTOCOLO 26. Procesamiento de muestras para TEM mediante criotécnica.....	69
PROTOCOLO 27. Inmunolocalización de proteínas alérgicas.....	70
PROTOCOLO 28. Tinción de secciones de anteras de olivo mediante el uso de colorantes inespecíficos.....	73
PROTOCOLO 29. Síntesis de sonda Ole e 1 mediante PCR.....	73
PROTOCOLO 30. Hibridación in situ a microscopía óptica.....	75
PROTOCOLO 31. RT-PCR in situ.....	77
PROTOCOLO 32. Pruebas SPT (Skin Prick Test).....	80
2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	81

CAPÍTULO 3. RESULTADOS

3.1. ESTUDIO MORFOMÉTRICO DE LA FLOR DE OLIVO DURANTE SU DESARROLLO.....	85
--	----

3.2.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL ALÉRGENO OLE E 1 DURANTE EL DESARROLLO DEL GRANO DE POLEN Y LA GERMINACIÓN <i>IN VITRO</i>	90
	<i>Síntesis y acumulación de la proteína Ole e 1 durante el desarrollo del grano de polen de la antera</i>	90
	<i>Expresión de los transcritos de Ole e 1 durante al germinación in vitro del grano de polen de olivo</i>	100
	<i>Inmunolocalización del alérgeno Ole e 1 en el grano de polen de olivo y en tejidos de la antera</i>	100
3.3.	ENSAYOS DE ACTIVIDAD ESTERASA EN EL POLEN DE OLIVO.....	103
3.4.	EL ALÉRGENO OLE E 1 COMO MARCADOR MOLECULAR DE VARIEDADES EN EL OLIVAR.....	107
	<i>Análisis bioquímico en diferentes cultivares de olivo</i>	107
	<i>Análisis molecular en diferentes cultivares de olivo</i>	109
	<i>Análisis celular en diferentes cultivares de olivo</i>	111
3.5.	ANÁLISIS DE LA REACCIÓN CRUZADA ENTRE OLE E 1 Y PLA L 1.....	113
3.6.	IMPLICACIONES CLÍNICAS.....	116

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

	<i>Los estudios morfométricos llevados a cabo en la flor de olivo son útiles para determinar, de manera fiable, los diferentes estadios de desarrollo del grano de polen dentro de la antera</i>	123
	<i>La expresión del gen OLE E 1 está regulada a nivel transcripcional</i>	125
	<i>La síntesis y almacenamiento del alérgeno Ole e 1 tiene lugar en el retículo endoplasmático rugoso, dentro del grano de polen</i>	130
	<i>La proteína alérgica Ole e 1 está presente en la pared del grano de polen y en el tapetum de la antera</i>	132
	<i>Aproximación a la función biológica del alérgeno mayoritario del polen de olivo</i>	134
	<i>Ole e 1 muestra reacción cruzada con el alérgeno mayoritario de <i>Plantago lanceolata</i>, Pla l 1</i>	140
	<i>Antigenicidad de la proteína Ole e 1 en varios cultivares de olivo: implicaciones clínicas, agronómicas y medioambientales</i>	142

CONCLUSIONES.....	147
ANEXOS.....	151
BIBLIOGRAFÍA.....	169

Resumen



Con objeto de obtener pruebas sobre la posible función biológica del alergeno mayoritario del polen del olivo (Ole e 1), se analizaron los niveles y localización de la proteína y sus transcritos durante el desarrollo del grano de polen dentro de la antera, y durante la germinación y crecimiento del tubo polínico *in vitro*. Los resultados obtenidos muestran que la expresión de Ole e 1 está controlada a nivel transcripcional: tanto la proteína, con tres variantes, como los transcritos se acumulan durante los estadios finales de la maduración del grano de polen, alcanzando niveles máximos justo antes de que se produzca la dehiscencia de la antera. La síntesis proteica tiene lugar en los ribosomas adosados a las cisternas del retículo endoplasmático rugoso, y coincide con el momento en el que el RER muestra un elevado grado de diferenciación con relación a su tamaño y contenido. Tanto los transcritos como la proteína están presentes en las microsporas en desarrollo (gametofito) y en células del *tapetum* (esporofito). La proteína se localiza también en la exina de la pared del grano de polen maduro y, al contrario que la que se localiza en el interior de las cisternas de RER (de origen gametofítico), dicha proteína procede con toda probabilidad del *tapetum*. De los resultados obtenidos en este estudio se deduce que la proteína Ole e 1 debe desempeñar un papel clave en la germinación del tubo polínico. Varios datos apoyan esta hipótesis: 1) la síntesis y acumulación de la proteína se produce durante las etapas finales de la maduración del grano, alcanzando los niveles máximos justo antes de la antesis, 2) la proteína, aunque presenta niveles cuantitativos muy diferentes, está presente en el polen de todas las variedades de olivo analizadas, y 3) existe una síntesis *de novo* tanto de transcritos como de proteína durante la germinación *in vitro* y posterior crecimiento del tubo polínico. Dicha función podría estar relacionada con la existencia de un gradiente osmótico necesario para la hidratación del grano o en el establecimiento de interacciones entre el polen y las células de la papila del estigma, aunque este último punto deberá ser aclarado en futuras investigaciones.

Por otra parte, los análisis bioquímicos y clínicos llevados a cabo con sueros de pacientes alérgicos al polen del olivo, y con extractos de polen de diez cultivares diferentes determinaron una serie de implicaciones inmediatas: 1) existen variedades de olivo que presentan un mayor potencial alergogénico que otras, lo que sugiere que el alergeno Ole e 1 es inicialmente un buen candidato como marcador para la detección de variedades de olivo, 2) cabría la posibilidad de utilizar variedades de bajo contenido alergénico con fines ornamentales, y 3) el uso de mezclas comerciales de polen puede conducir a errores de diagnóstico y

éxitos limitados en la inmunoterapia mediante vacunación. Dichos efectos negativos podrían ser corregidos con la estandarización de los extractos utilizados con fines de diagnóstico, y un tratamiento mediante vacunas personalizado en el que se tendría en cuenta las variaciones intraespecíficas en el contenido alergénico del polen.

Introducción

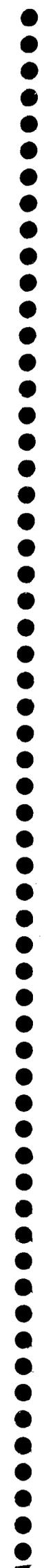


Capítulo primero

[Illegible text]

[Illegible text]

[Illegible text]



Capítulo Primero

Introducción

"Olea quae prima omnium arborum est"

Lucius J. M. Columela (siglo I d. C.)

1.1. ANTECEDENTES DEL TEMA

Desde que Camerarius estableciera la existencia de la sexualidad en *Mercurialis annua* a finales del siglo XVII, y Kölreuter (1761) describiera la obtención de semillas por polinización artificial en diversas especies, la embriología reproductiva de las plantas se ha ido consolidando como ciencia hasta llegar a nuestros días, y su avance ha transcurrido paralelo al desarrollo del instrumental y la puesta a punto de nuevas técnicas. Entre los hitos más significativos en la historia de la embriología vegetal se incluyen los hallazgos de Amici (1824, 1830) y Schleiden (1837, 1845) sobre la existencia del tubo polínico y la formación del embrión, las observaciones de Hofmeister (1849) y Strasburger (1879, 1884) sobre la formación del gametofito femenino y el endospermo, la organización del saco embrionario y el descubrimiento de la singamia, o el descubrimiento de la doble fecundación por Nawaschin (1898) y Guignard (1899), entre otros (ver revisión en Maheshwari, 1950).

Existe actualmente un buen conocimiento básico del polen de olivo en cuanto a su morfología así como de las etapas de su ontogenia y desarrollo. El primer estudio acerca de los procesos gaméticos en el olivo fue realizado por Bradley y Griggs (1963), y hasta finales de los años 70 no surgen los primeros estudios ultraestructurales (Pacini y Juniper, 1979a, b). Recientemente, se han comenzado a estudiar los procesos de autoincompatibilidad polen-pistilo y la respuesta del olivo a la polinización cruzada y su relación con la fructificación (Rapoport y Rallo, 1991; Cuevas, 1992; Cuevas y col., 1995).



Nuestro grupo en Granada viene trabajando desde hace más de 15 años en aspectos relacionados con la biología del polen del olivo, aportando resultados interesantes sobre la ontogenia y estructura de la exina y aperturas (Fernández y Rodríguez-García, 1988, 1989, 1995), el tránsito de sustancias a través de la pared del grano de polen (Fernández y Rodríguez-García, 1990), la repoblación ribosómica y la presencia de nucleoloides en la microspora de olivo (Rodríguez-García y Fernández, 1987; Alché y col., 1994), la naturaleza de los cuerpos nucleares durante la profase meiótica (Olmedilla y col., 1997), el comportamiento de las sustancias de reserva durante la maduración del grano de polen (Fernández y Rodríguez-García, 1994) y la diferenciación del retículo endoplasmático durante el desarrollo del polen (Rodríguez-García y Fernández, 1990) y su relación con el almacenamiento de proteínas alergénicas (Rodríguez-García y col., 1995a, b; Fernández y col., 1996).

Si se compara con los estudios morfológicos y celulares realizados hasta la fecha, la información disponible acerca de los procesos de desarrollo del grano de polen a nivel molecular es muy escasa. Con objeto de avanzar en el conocimiento de estos procesos en el olivo, así como en la búsqueda de marcadores que aceleren los programas de mejora vegetal, se requiere una aproximación multidisciplinaria. Por ello, recientemente, nuestro grupo ha comenzado a interesarse y a estudiar algunos aspectos relacionados con la ontogenia del grano de polen de olivo bajo una perspectiva molecular, además de celular (Alché y col., 1999, 2001).

1.2. EL OLIVO COMO MODELO DE ESTUDIO EN BIOLOGÍA VEGETAL

El olivo: breve historia de un cultivo milenario

El cultivo del olivo (*Olea europaea* L.), pieza indiscutible en el rompecabezas de la agricultura mediterránea junto al trigo y la vid, se remonta hacia los años 4000-3000 a. C. y su origen se sitúa en Siria e Irán según De Candolle, aunque otros autores señalan las colonias fenicias de Palestina y Líbano como origen más probable. La etimología de la palabra olivo en las distintas lenguas del área mediterránea deriva del griego "Elaia" –que a su vez proviene de la palabra semítica "Ulu"–, que luego se transformó en el sustantivo latino "Oleum" y que más tarde dio origen al vocablo "Oli" de las lenguas romances.

La referencia más fiable y antigua corresponde al aceite importado a Egipto durante el periodo de la IV Dinastía –2.600 años a. C.– procedente de Siria y Palestina, y la existencia de un olivo sagrado en Heliópolis durante las Dinastías V y VI. Biblos, la antigua y mítica ciudad, mantuvo relaciones comerciales con Egipto y a través de este intercambio comercial el cultivo del olivo se extendió al Norte de África. Desde Oriente Medio, el olivar se expandió hacia Occidente gracias al comercio de fenicios, al fundar sus colonias, y a los navegantes púnicos, tras la fundación de Cartago. El



olivo fue llevado desde Egipto a Grecia por Cécrope, fundador de Atenas, en 1582 a. C. Los griegos consagraron el olivo a Atenea y lo hicieron símbolo de sabiduría, de abundancia y de paz, mejorando los procedimientos de extracción del aceite. En el siglo VII a. C. fue introducido en Italia y alcanzó su máximo esplendor dentro del Imperio Romano durante los siglos II y III d. C. Al tiempo que los griegos primero y, más tarde, los romanos extendían el cultivo del olivo por la costa septentrional del Mediterráneo, los tirios, procedentes de Fenicia y fundadores de Cartago, desarrollaron el cultivo en la costa meridional. Los cartagineses convirtieron el cultivo del olivo en una ciencia y transmitieron dichos conocimientos a las tribus beréberes y a los nómadas del este de Argelia.

El cultivo del olivo fue probablemente introducido en la península ibérica, islas Baleares e islas Canarias por los comerciantes fenicios, en su búsqueda de los metales preciosos de Tartessos, aunque se desconoce el momento exacto. La referencia más antigua sobre el olivo en España pertenece al libro *De bello hispanico*, escrito por un autor anónimo coetáneo de Julio César. En este libro se hace referencia a que la capital Bética ya estaba rodeada por olivares en el siglo I a. C., que siglos después constituirían el famoso Aljarafe árabe. La llegada de Escipión y sus legiones romanas supuso la primera edad de oro del olivar andaluz, llegando a ser un cultivo tan común en la península que el emperador Adriano adoptó la rama de olivo como símbolo de la *Hispania Romana*. El avance que se produjo en la olivicultura durante la dominación visigoda se afianzó con la llegada de los árabes, que mejoraron las técnicas de cultivo y obtención de aceite, y fueron descubridores de una gran variedad de usos culinarios y medicinales, muchos de los cuáles siguen vigentes hoy en día. La palabra árabe "Zaitum" derivó al castellano como "Az-Zait", que significa "jugo de la oliva" y de ahí derivó posteriormente a los vocablos aceite y aceituna. En la primera mitad del siglo XVI el área cultivada de olivos sobrepasó los límites actuales, tal y como indican los numerosos restos de olivares repartidos en la actualidad por toda la geografía peninsular (March y Ríos, 1989).

Algunos datos sobre el olivar hoy en el mundo, en España y en Andalucía

El patrimonio oleícola mundial se estima en unos 750 millones de olivos, de los que 715 millones –el 95% del total– se reparten entre países de la Cuenca Mediterránea, llegando a ocupar una superficie total de 8.5 millones de ha (Fig. 1.1). Aproximadamente 700 millones de olivos corresponden a cultivo de secano y, de los 10 millones de toneladas en que se estima la producción mundial anual, el 90 % se destina a la producción de aceite (COI, 1995). El 10 % restante de la producción mundial –1.000.000 ha– se dedica al consumo directo, bajo cualquiera de las numerosas modalidades de aceituna de mesa existentes.

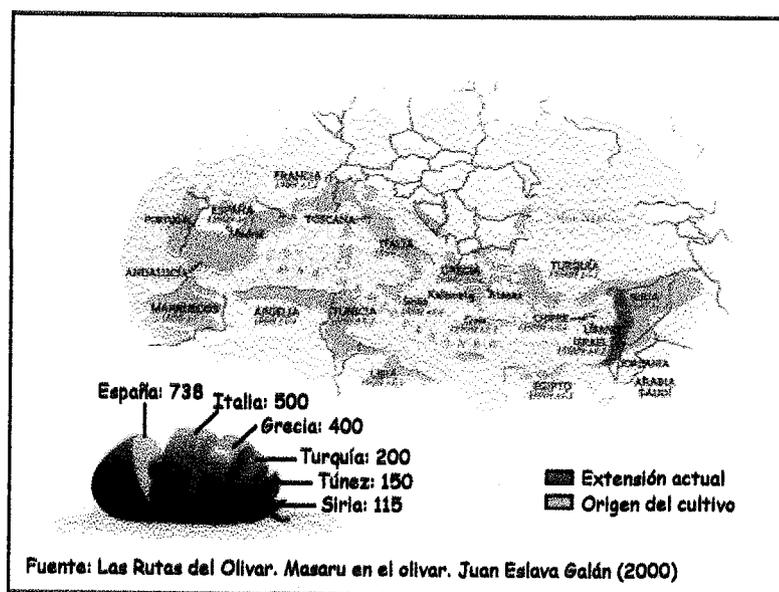


FIGURA 1.1. Principales productores de aceite de oliva (en miles de t anuales).

Actualmente, existen en España más de 2.147.000 ha dedicadas al cultivo del olivo, de las que 1.953.777 ha se destinan a la producción de aceite. Esto supone un 12 % de la superficie total cultivada en España, lo que convierte a nuestro país en el primer productor mundial de aceite –565.000 t– y aceituna de mesa –240.000 t– (MAPA, 1993). En Andalucía existen cultivadas 1.296.000 ha de olivar, lo que representa un 33 % de la superficie total cultivada en esta comunidad y un 60 % de la superficie total dedicada a este cultivo en España, que la convierten en la principal región en la producción nacional de aceite –80 % de la producción total– y aceituna de mesa –75 % de la producción total– (MAPA, 1993).

El mapa del olivar en España (Fig. 1.2) se caracteriza por la presencia de 262 variedades cultivadas, de las que 24 se identifican como variedades *principales*, constituyendo la base de las plantaciones en al menos una comarca, aunque es frecuente la presencia de variedades *difundidas* y *locales* como árboles aislados en varias o una única comarca (Barranco y Rallo, 1985). Por otro lado, un reducido número de cultivares son predominantes en sus áreas de origen como ocurre con la variedad “Picual” en Jaén, “Hojiblanca” en Córdoba y Málaga, y “Manzanilla de Sevilla” en el Aljarafe sevillano (Barranco y Rallo, 1984). Además de por la enorme diversidad y particular distribución, el olivar español se caracteriza por su antigüedad, que se remonta la inicio del cultivo en nuestro país, y por su homogeneidad genética, debido a los procedimientos de propagación vegetativa utilizados y a la baja tasa de mutación en esta especie (Barranco, 1997).

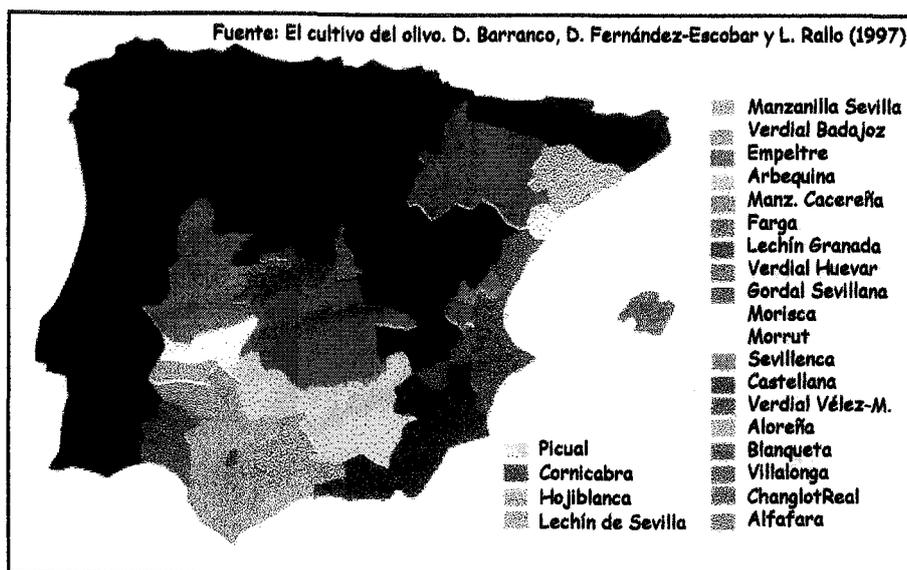
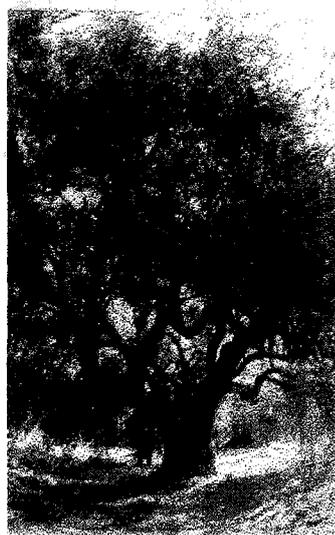


FIGURA 1.2. Variedades principales de olivo cultivadas en España.

Un poco de botánica

El origen del olivo se remonta a la Era Terciaria en algún punto de Asia Menor, aunque existen discrepancias en cuanto a las especies que han intervenido en el proceso de hibridación de esta planta. La idea más extendida es que, a partir de la variedad silvestre o acebuche (*Olea europaea* L. subsp. *sylvestris*), y mediante su transformación progresiva y mejora, se obtuvo una variedad más compacta, sin espinas y rica en aceite que conocemos hoy en día como olivo cultivado (*Olea europaea* L. subsp. *sativa*). No obstante, para algunos autores, la imposibilidad de interconversión de ambos por cultivo regular del primero y degeneración y abandono del segundo, supone una seria traba a esta hipótesis.



Fuente: Las Rutas del Olivar. Masaru en el olivar. Juan Eslava Galán (2000)

FIGURA 1.3. Olivo milenario situado en la localidad de Fuentebuena y considerado como el de mayor tamaño del mundo.



El olivo es un árbol polimórfico, con fases juvenil y adulta, de copa redondeada y densa, siempre verde y muy longevo, que puede permanecer productivo durante cientos de años. Alcanza una altura media de 4-8 m y presenta generalmente un sistema radicular poco profundo, donde frecuentemente se acumulan reservas. El tronco es liso y gris en individuos jóvenes y nudoso, rugoso y agrietado en la vejez (March y Ríos, 1989). En su base emite vástagos que permiten a la planta regenerarse de forma vegetativa. Las hojas son simples, enteras, lanceoladas, opuestas, con una gruesa cutícula y de color verde oscuro en el haz y con vellosidad abundante y color plateado en el envés. El limbo de la hoja tiene una longitud de 3-9 cm y una anchura de 1-1,8 cm, la nervadura central es muy marcada y el peciolo es muy corto.

El ciclo vegetativo del árbol se manifiesta después del reposo invernal y su crecimiento es lento, alcanzando la madurez al cabo de 5 años y un desarrollo pleno a los 20 años. Las inflorescencias del olivo son de forma paniculada, con 10-40 flores, y surgen en las axilas de los nudos de crecimiento vegetativo del año previo a la floración (King y Hesse, 1938; Rivera, 1941). En dichas inflorescencias, encontramos flores de dos tipos: perfectas ó hermafroditas e imperfectas ó estaminíferas, es decir, con ovario rudimentario o ausente (Uriu, 1959). La flor es pequeña y actinomorfa, con simetría regular y ligeramente pedunculada (Fig. 1.4). Presenta un cáliz gamosépalo y en forma de copa, una corola formada por cuatro pétalos de color blanco o blanco amarillento y soldados en su base, dos estambres opuestos cuyas anteras están formadas por dos tecas, cada una de las cuales contiene una gran cantidad de polen (Morettini, 1972), y un gineceo compuesto de un ovario súpero, un estilo corto (Altamura y col., 1982a) y un estigma bilobulado o papiloso bien desarrollado (Morettini, 1972) y húmedo (Altamura y col., 1982b). El ovario consta de dos lóculos, cada uno de los cuales contiene dos óvulos anátropos, aunque solamente uno de los cuatro será fecundado y formará la semilla.

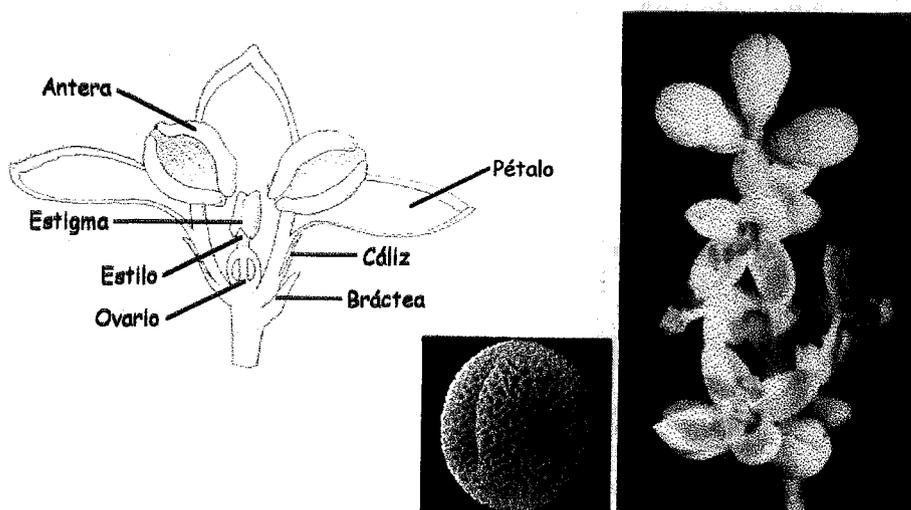


FIGURA 1.4. Aspecto de una flor perfecta o hermafrodita y un grano de polen de olivo. (Fotos cortesía de la Dra. M. C. Fernández).



El fruto del olivo es una drupa (Fig. 1.5), de forma elipsoidal y presenta una longitud de 10-40 mm y una anchura de 6-20 mm (Do Amaral Franco y Da Rocha Alfonso, 1972). Constituye el único fruto comestible dentro de la familia *Oleaceae* (Heywood, 1978), que agrupa a 29 géneros diferentes distribuidos por las regiones templadas y tropicales de todo el mundo, y en la que también se incluyen especies forestales o de interés ornamental como el fresno (*Fraxinus*), el jazmín (*Jasminum*), el aligustre (*Ligustrum*) o la lila (*Syringa*).

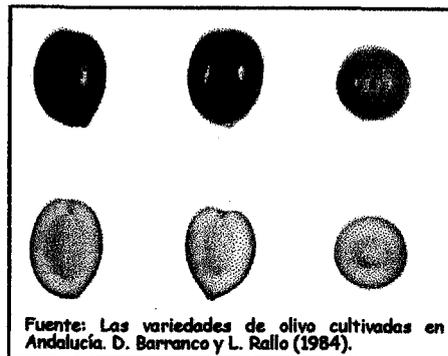


FIGURA 1.5. Fruto de olivo (aceituna) de la variedad Picual.

¿Por qué el polen de olivo?

Podemos plantearnos la siguiente pregunta: ¿qué hace del olivo, y más concretamente del polen de olivo, un modelo interesante para su estudio frente a otros modelos clásicos en el estudio de la biología vegetal como *Arabidopsis* o *Brassica*?. La respuesta incluye argumentos muy diferentes:

1. Es incuestionable la importancia del olivar en todos los países de la cuenca mediterránea. En España, y especialmente en Andalucía, constituye un cultivo de gran importancia *agronómica* y *social*, dado que requiere una mano de obra abundante y contribuye de esta manera a estabilizar el empleo en las zonas rurales. A este hecho se unen su importancia *ecológica*, siendo útil en la conservación del suelo fértil, y las propiedades beneficiosas del aceite de oliva para la salud. La incidencia de este tipo de aceites en la prevención de accidentes cardiovasculares está provocando un incremento en su demanda año tras año. No obstante, y a pesar de estas perspectivas halagüeñas, la realidad es que el futuro del olivar es aún incierto dada su baja productividad, que se sitúa en torno a los 1.000 Kg/ha en secano y 2.100 Kg/ha en regadío (MAPA, 1990), y debido a la competencia procedente de otros aceites vegetales con menores costes de producción.



2. El polen juega un papel crucial en la reproducción sexual de las plantas. Por tanto, el conocimiento de aquellos aspectos relacionados con la ontogenia del grano de polen, su estructura y función, es esencial para desarrollar programas eficaces de mejora vegetal y obtener así variedades más productivas. El potencial de manipulación del grano de polen incluye: el control de los fenómenos de incompatibilidad, el aislamiento de las células espermáticas con objeto de mejorar la fecundación dirigida, la transformación de polen mediante micromanipulación o técnicas de biolística, y la obtención de plantas haploides a partir del cultivo *in vitro* de anteras o microsporas. En el caso del olivo, el conocimiento de los procesos que determinan la formación del fruto incidirá en la obtención de variedades con un mayor rendimiento y, por tanto, en una mejora de las cosechas.
3. Constituye un sistema biológico simplificado (1 a 3 células), fácil de manipular, y en el que es posible estudiar todas las cuestiones claves de la biología actual como son: la división celular, diferenciación, mecanismos de control génico, muerte celular programada, resistencia a estrés, etc.
4. El polen de olivo constituye una de las causas de mayor incidencia en la alergia respiratoria estacional en Andalucía debido a que su principal vía de dispersión es el viento y a la existencia de miles de ha dedicadas a su cultivo. Bajo este punto de vista, resulta especialmente interesante el estudio en detalle de aquellos aspectos clínicos relacionados con los procesos alérgicos causados por el polen de olivo. Esto permitiría seleccionar aquellas variedades que presentan una menor capacidad alérgica para ser utilizadas con fines ornamentales, o para ser cultivadas en zonas densamente pobladas sin que exista detrimento en la productividad.
5. La escasez de información sobre los procesos que tienen lugar durante la ontogenia del grano de polen a nivel molecular en esta especie proporciona un vasto campo de investigación básica que explorar.

1.3. EL GAMETOFITO MASCULINO EN ANGIOSPERMAS

Todo ser vivo procede de otro similar a él. Esta afirmación implica que la reproducción constituye una de las características básicas de cualquier ser vivo, independientemente de su naturaleza o complejidad. La reproducción sexual constituye la forma más extendida entre las especies para perpetuarse en el tiempo y da lugar a individuos mejor adaptados que sus progenitores, haciendo posible la *evolución* en su sentido más darwiniano.



Durante el ciclo de vida de las Angiospermas existe alternancia entre una generación diploide –*esporofito*–, que constituye la parte visible y más duradera de la planta, y una generación haploide –*gametofito*–, efímera en el tiempo y cuya función es la producción de las células reproductoras o *gametos*. Con excepción de algunas especies primitivas, el gametofito masculino –el grano de polen– se reduce a una estructura microscópica, formada por unas pocas células, que depende del esporofito para su desarrollo.

¿Cómo se forma un grano de polen?

La ontogenia del grano de polen, que en el caso del olivo dura aproximadamente unas 6 semanas (Fernández, 1986), transcurre en unas estructuras especializadas denominadas anteras, y consta de dos procesos consecutivos: la *microsporogénesis*, mediante el cual se forman las microsporas a partir de las células madre del polen, y la *microgametogénesis*, que da lugar a la formación de las células gaméticas (Fig. 1.6). El conjunto del proceso supone profundos cambios metabólicos, sometidos a una fina regulación génica, que permiten a la célula controlar su ciclo celular y diferenciarse de sus células progenitoras para formar los gametos masculinos.

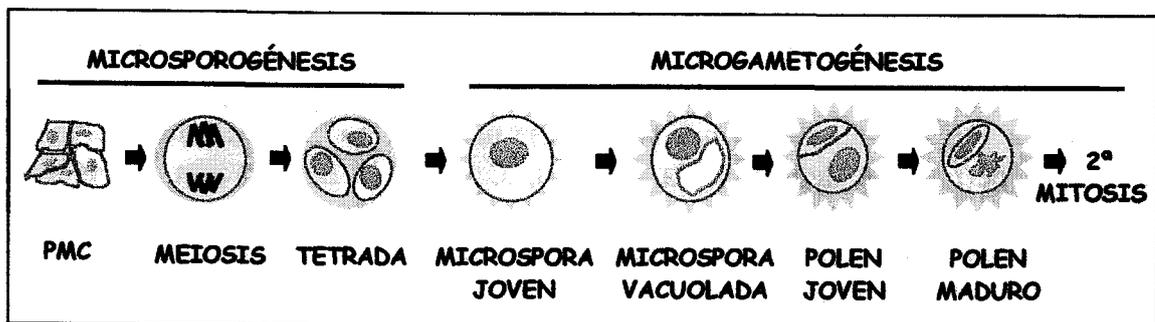


FIGURA 1.6. Etapas en el desarrollo del grano de polen de olivo dentro de la antera. PMC= células madre del polen.

Durante la microsporogénesis, las células madre del polen (diploides), que inicialmente constituyen una masa compacta de células comunicadas entre sí mediante conexiones citoplasmáticas, sufren una división meiótica que da lugar a la formación de células haploides denominadas *microsporas*. Inicialmente, la primera división meiótica origina grupos de dos células, individualizadas o no dependiendo de la especie, que se denominan *diadas* y, tras la segunda división, aparecen grupos de cuatro células que reciben el nombre de *tetradas*. Dichas células permanecen unidas por una pared de calosa (1,3 β glucano), tradicionalmente considerada como una barrera impermeable (Heslop-Harrison y Mackenzie, 1967) aunque existen evidencias que sugieren que dicho aislamiento es selectivo (Rodríguez-García y Majewska-



Sawka, 1992). Con el inicio de la formación de la exina –la capa externa de la futura pared del grano de polen– se considera finalizada esta primera fase y se inicia la microgametogénesis.

Tras la degradación de la pared de calosa que rodea la tetraeda, las microsporas se liberan en el lóculo de la antera y comienzan a crecer e incrementar su volumen rápidamente, lo que conduce a un cambio en su forma. A este crecimiento contribuye la aparición en el citoplasma de numerosas vacuolas de pequeño tamaño que se van fusionando hasta originar una única vacuola central de gran tamaño, que llega a ocupar casi todo el volumen celular, relegando el citoplasma a la periferia mientras el núcleo es desplazado hacia una de las aperturas.

Al final de este largo periodo de interfase se produce una división mitótica marcadamente asimétrica que da lugar a dos células hermanas diferentes en tamaño, contenido y función, la *célula generativa* y la *célula vegetativa*, estando ambas rodeadas por la pared de la microspora original. Parece existir una relación entre el lugar que ocupa la apertura germinativa y la localización de la célula generativa recién formada, expresada en la “ley de la distancia más larga” (Huynh, 1976), dado que ésta se desplaza hacia la apertura por donde más tarde germinará el grano, durante la fase de maduración del polen. El resultado de la división asimétrica es ya, por definición, polen. La célula vegetativa constituye la mayor parte del volumen del grano mientras que la célula generativa, que apenas recibe una pequeña porción del citoplasma de la microspora, permanece dentro de la primera. Durante la maduración del grano de polen se sintetiza la *intina*, capa interna a la exina, formada por celulosa y pectinas, y que corresponde a la pared celular propiamente dicha. El metabolismo de la célula vegetativa se incrementa notoriamente, con una elevada síntesis de ARNm y proteínas, con objeto de proveer al grano de las sustancias de reserva necesarias para la germinación y crecimiento del tubo polínico (Knox, 1984; Cresti y Keijzer, 1985; Derksen y col., 1995). Le sigue un periodo de crecimiento lento hasta que el grano alcanza su tamaño máximo, justo antes de la *antesis* o dehiscencia de las anteras, y la liberación del polen.

En algunas plantas (Ej.: familias *Cruciferae*, *Poaceae* y *Asteraceae*), la célula generativa sufre una segunda mitosis antes de que se produzca la antesis, dando lugar a la formación de un grano de polen *tricelular*, consistente en dos células espermáticas y una célula vegetativa. En la mayoría de las especies, sin embargo, la célula generativa completa su división después de la antesis, durante el crecimiento del tubo polínico a través del estilo femenino, y hablamos entonces de polen *bicelular*. En el olivo, cuyo polen es bicelular, se ha observado recientemente que el núcleo vegetativo sale al tubo polínico en primer lugar, tras lo cual se produce la salida del núcleo generativo, que alcanza y adelanta al primero (M’rani-Alaoui, 2000). Transcurridas 7 horas desde el inicio de la germinación, el núcleo generativo se divide en el tubo polínico y da lugar a



dos núcleos espermáticos, mientras que el núcleo vegetativo comienza a presentar signos de degeneración.

Durante el proceso de maduración de la microspora, el *tapetum* o tapete —la capa más interna de la pared de la antera, que rodea al tejido esporógeno— desempeña un papel fundamental. Se han descrito dos tipos: a) periplasmoidal o ameboide, como el de *Tradescantia bracteata* (Mephram y Lane, 1969) o *Helianthus annuus* (Horner, 1977), y b) secretor o glandular, como el de *Alium cepa* (Risueño y col., 1969), *Citrus limon* (Horner y Lersten, 1971) o el olivo (Pacini y Juniper, 1979b). Durante la meiosis de las células madre del polen, las células del *tapetum* adquieren características propias de un tejido secretor como son: retículo endoplásmico abundante, elevado número de dictiosomas, progresiva vacuolización y lisis de la pared celular. El *tapetum* aporta nutrientes, enzimas, hormonas, etc a las microsporas en desarrollo, así como precursores de *esporopolenina* (Heslop-Harrison, 1968; Risueño y col., 1969), principal componente de la exina o pared estructurada del grano de polen (Risueño y col., 1969; Dickinson, 1976a, b). Al final de la fase de maduración del grano de polen, este tejido degenera y libera al lóculo de la antera diversos productos lipídicos y proteicos de degradación, que se depositan en la pared del polen y constituyen el material conocido como *pollenkit* y *trifinas*, mejorando la adhesividad del grano. Algunos autores también atribuyen al *tapetum* un papel causal en la esterilidad masculina (Harvey y col., 1972; Heslop-Harrison, 1972; Laser y Lersten, 1972; Majewska y col., 1993).

Al final del proceso de maduración y justo antes de la antesis, el grano de polen sufre un proceso de deshidratación, reduciendo su contenido entre un 6 y un 60 %, en función de la especie (Kerhoas y col., 1987). Esta pérdida de agua induce un estado metabólico quiescente en el grano de polen, que le confiere una gran tolerancia frente al estrés ambiental.

¿Cómo germina un grano de polen?

Una vez que el grano de polen entra en contacto con la superficie del estigma se hidrata nuevamente y germina, dando lugar a un tubo polínico que transporta los núcleos espermáticos a través del estilo hasta llegar al saco embrionario, donde tiene lugar la doble fecundación. Para que el grano de polen germine es necesario un medio adecuado, que presente unas condiciones de pH, molaridad, $[Ca^{2+}]$, temperatura y humedad apropiadas. Aunque el estigma constituye el medio idóneo para la germinación del grano de polen, también es posible hacer que germine *in vitro*. De esta forma, en el caso del olivo, se puede alcanzar un elevado porcentaje de germinación (alrededor del 50 %) a partir de polen recién liberado, que disminuye ligeramente (40 %) cuando partimos de polen almacenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 año (M'rani-Alaoui, 2000).



El proceso de hidratación se lleva a cabo de manera controlada y consta de dos fases en *Brassica* (Franklin-Tong y col., 1996; Hiscock y col., 1995): una fase inicial de reconocimiento entre polen y estigma, en la que existe un intercambio de señales (Doughty y col., 1993), y una segunda fase donde se forma una protuberancia de la intina en una de las regiones aperturales que pone en contacto la pared del grano con las papilas del estigma, lo que provoca la entrada de agua hacia el grano de polen (Shivanna y col., 1991). Durante esta fase de hidratación se activan genes específicos (Muschietti y col., 1994) que probablemente regulan el proceso.

El siguiente cambio que se detecta es la movilización de pectinas y proteínas de la región apertural por donde emerge el tubo polínico (Heslop-Harrison y Heslop-Harrison, 1992). Éste penetra entre las papilas del estigma (Elleman y col., 1992), utilizando para ello una cutinasa presente en la intina y en el ápice del tubo (Hiscock y col., 1994). En el olivo, los lípidos de reserva presentes en el grano se disponen junto a la región apertural por donde va a emerger el tubo polínico y su presencia disminuye a medida que crece el mismo (M'rani-Alaoui, 2000). La temprana polarización de estos cuerpos lipídicos hace de los mismos un excelente marcador que permite distinguir aquellos granos de polen activados que van a germinar de los que no germinan.

Expresión génica durante el desarrollo del grano de polen

El análisis cuantitativo del número de genes que se expresan durante el desarrollo del gametofito masculino da una idea aproximada de la complejidad de la expresión génica y de la capacidad sintética asociada al genoma haploide. Así, se estima que la población de ARN mensajeros presentes en el grano de polen al final de su desarrollo es el producto de unos 20.000 genes, frente a los 30.000 genes que se expresan en el esporofito, lo que indica que la simplicidad del gametofito es sólo aparente. Aproximadamente un 10 % de estos genes son específicos del grano de polen (Willing y Mascarenhas, 1984; Willing y col., 1988), mientras que un 10 % de los genes gametofíticos también se expresan en tejidos esporofíticos.

Muchos de estos genes gametofíticos se incluyen en el grupo de los denominados *genes tempranos*, dado que comienzan a expresarse poco después de la meiosis, siendo los niveles de transcritos indetectables en el polen maduro. Se asume que dichos genes podrían codificar proteínas del citoesqueleto y proteínas necesarias para la síntesis de la pared o la acumulación de almidón. Por otro lado, coincidiendo con el inicio de la división mitótica asimétrica de la microspora, se activa la transcripción de un grupo de *genes tardíos* cuyos ARNs mensajeros se acumulan en el grano de polen hasta alcanzar un máximo justo antes de la apertura de la antera (Mascarenhas, 1990; Twell, 1994), y tiene lugar una elevada síntesis y almacenamiento de proteínas (Mascarenhas, 1989, 1993; McCormick, 1993). Se cree que las proteínas que codifican dichos genes desempeñan una función importante durante la maduración del grano de polen y su posterior hidratación y germinación. No



vegetales pero apenas se ha utilizado en el olivar, debido probablemente a la escasa información existente a cerca de los procesos de desarrollo de esta planta a nivel molecular. Además, el establecimiento de la identidad varietal a este nivel podría ser importante con relación a los distintivos de calidad y las posibles denominaciones de origen, de gran importancia en la comercialización de los productos derivados del olivar. Hasta el momento, la búsqueda de marcadores moleculares en el olivo ha sido abordada fundamentalmente mediante el uso de isoenzimas y mediante análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD).

La utilización de isoenzimas como marcadores bioquímicos se ha llevado a cabo con éxito en diversas especies de interés hortícola como el melocotón (Byrne y Littleton, 1989), la almendra (Cerezo y col., 1989), la chirimoya (Pascual y col., 1993), el mango (Degani y El Batsri, 1990), el manzano (Weeden y Lamb, 1985) y la uva (Parfitt y Arulsekar, 1989). En el olivo, Pontikis y col. (1980) identificaron por primera vez 27 cultivares de olivo analizando 16 sistemas enzimáticos en polen, mientras que Ouazzani y col. (1993) identificaron 33 de 44 cultivares de olivo mediante el análisis de 9 sistemas enzimáticos en hojas. Más recientemente, Trujillo y col. (1995) han utilizado diversos sistemas enzimáticos en polen, entre los que figuran el enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), esterasa (EST), glucosa fosfato isomerasa (GPI), leucina aminopeptidasa (LAP) y enzima málico (ME), para la identificación de 132 de las 155 variedades analizadas.

Aunque los análisis isoenzimáticos han demostrado que existe un elevado nivel de polimorfismo en el olivo, es frecuente que exista una expresión diferencial de los genes que codifican dichos enzimas en función del ambiente, especificidad del tejido, u otros factores, que podría dificultar la interpretación de los resultados. El análisis directo del ADN mediante análisis RADP (Random Amplified Polymorphic DNA), ha sido aplicado recientemente al olivar (Bogani y col., 1994; Fabbri y col., 1995; Caruso y col., 2000; Wiesman y col. 2000; Perri y col., 2000) y ha demostrado ser de gran utilidad en la identificación de variedades de olivo. No obstante, presenta el inconveniente de que la amplificación se produce al azar y, por tanto, se desconoce la función de las secuencias que se amplifican.

En este trabajo, proponemos la utilización de clones de ADN, previamente caracterizados y cuyos productos (proteínas) tienen funciones o propiedades biológicas conocidas, para llevar a cabo análisis de expresión entre las distintas variedades con objeto de detectar diferencias. Este es el caso del alérgeno mayoritario del polen del olivo, Ole e 1.



obstante, existen genes cuya expresión no se ajusta exactamente a ninguno de los patrones descritos anteriormente.

Para el análisis de la actividad de los genes gametofíticos se han seguido diversas estrategias, entre las que destacan: a) el análisis de mutantes, obtenidos en programas de mutagénesis que incluyen el uso de agentes mutagénicos físicos, químicos o biológicos, b) el estudio de la segregación de isoenzimas, y c) el análisis de la síntesis *in vivo* de ARN. Así mismo, el número de genes específicos del polen clonados en los últimos años, a partir de bibliotecas substractivas y mediante técnicas de DD-PCR, aumenta en progresión geométrica (ver revisión en Twell, 1994). Finalmente, además de la caracterización y análisis de expresión de dichos genes, se están llevando a cabo estudios con objeto de determinar qué elementos regulan dicha expresión, a través del análisis de las secuencias promotoras y reguladoras, y el estudio del papel de determinados factores de transcripción y aquellos mecanismos de control post-transcripcional.

1.4. MARCADORES DE VARIEDADES EN EL OLIVAR

La expansión de cultivares de olivo, su hibridación, selección de descendencia y clonación ha originado una gran diversidad de cultivares autóctonos, productos del azar, en todas las regiones oleícolas del mundo (Zohary and Spiegel Roy, 1975), incluidos todos los países productores del área mediterránea (Barranco y Rallo, 1984, 1985; Bottari y Spina, 1953; Leitão, 1988; Loussert y Brousse, 1980; Morettini, 1972; Valdeyron y Crossa-Raynaud, 1950). Tradicionalmente, las distintas variedades han sido identificadas y diferenciadas sobre la base de caracteres morfológicos cuantitativos y/o cualitativos (tamaño y coloración del fruto, tamaño y forma de las hojas, etc.) y mediante el uso de caracteres agronómicos (resistencia a clorosis férrica y salinidad, composición acídica del aceite, etc.). Dado que la mayor dificultad en el inventariado del olivar reside en la existencia de diversos nombres o denominaciones locales para una misma variedad, es necesario algún sistema de identificación que establezca la sinonimia entre los mismos y el área de cultivo real de cada variedad. Por ello, el esquema pomológico empleado por Barranco y Rallo (1984), que incluye caracteres del árbol, rama, hoja, inflorescencia, fruto y endocarpo, ha sido de gran utilidad en los trabajos preliminares de inventariado de cultivares de olivo. No obstante, aunque efectivos, estos métodos presentan dificultades prácticas debido al efecto fluctuante que ejerce el medio ambiente sobre la expresión de la mayoría de los caracteres morfológicos analizados.

Por el contrario, los marcadores bioquímicos y moleculares apenas si se ven afectados en su expresión por el ambiente, y pueden ser fácilmente detectados en una gran variedad de tejidos de una manera sencilla y rápida. El uso de estos marcadores, que conlleva gran precisión, eficacia, y rapidez, ha sido aplicado en diferentes especies



1.5. POLEN Y ALERGIA

¿Qué es la alergia respiratoria?

El sistema inmune de una fracción considerable de la población humana tiende a reaccionar de forma exacerbada e inapropiada frente a determinados elementos extraños que no son considerados patógenos y que, por lo tanto, resultan inofensivos para el organismo. Este fenómeno recibe el término de *hipersensibilidad* y, en aquellos casos en los que la respuesta es inmediata y está mediada por anticuerpos del tipo IgE, hablamos de *hipersensibilidad de tipo I* o, más comúnmente, de *alergia*.

El primer encuentro entre un *alergeno*, es decir, un antígeno capaz de inducir una respuesta inmune inmediata mediada por IgE, y el sistema inmunitario, no produce síntoma alguno pero el organismo en cuestión queda sensibilizado. En posteriores encuentros, se produce la respuesta de los mastocitos de los tejidos y los basófilos de la sangre, que liberan un conjunto de sustancias químicas (histamina, leucotrienos, etc.), englobadas bajo la denominación común de *mediadores alérgicos*, que desencadenan los síntomas propios de la alergia (Brostoff y Hall, 1991). Estos síntomas son dispares y varían en función del punto exacto por el que el alérgeno entra en contacto con el sistema inmunitario. Una de las causas más frecuentes de alergia son los alérgenos inhalados, entre los que se incluyen el polen, las esporas de algunos hongos y los ácaros del polvo. En las vías respiratorias superiores, se origina un cuadro de rinitis alérgica, más comúnmente conocida como "*fiebre del heno*", caracterizado por estornudos, rinorrea, obstrucción de las vías nasales, prurito conjuntival y faríngeo, y lagrimeo. Cuando el antígeno logra llegar a las vías respiratorias inferiores, provoca constricción y obstrucción de los bronquios, contribuyendo a la aparición de los síntomas que desembocan en el asma bronquial. La rinitis alérgica suele tener carácter estacional debido a su relación con los pólenes que permanecen en el aire, aunque también puede ser perenne si el individuo se encuentra en un entorno de exposición crónica (ej.: frente a los ácaros del polvo).

El polen como vector causante de alergia respiratoria

El polen de plantas constituye una de las principales causas de alergia respiratoria — que en este caso particular se denomina *polinosis*— junto con los ácaros presentes en el polvo, debido a la presencia en el grano de un elevado número de proteínas alergénicas cuyo origen, localización y papel biológico son objeto de controversia en la actualidad. Aunque todos los pólenes son potencialmente alergogénicos, existen únicamente unas 100 especies de plantas superiores cuyo polen es considerado de gran importancia desde el punto de vista de su alergenicidad (Matthiesen y col., 1991; ver tabla 1.1).



TABLA 1.1. Plantas cuyo polen presenta interés desde el punto de vista alérgico.

PHYLUM	CLASE	ORDEN	GÉNEROS	
GYMNOSPERMAE	Coniferae	Pinales	<i>Crytomeria</i> *	
			<i>Juniperus</i> <i>Cupressus</i>	
ANGIOSPERMAE (Dicotiledóneas)	Hamamelidanae	Hamamelidales	<i>Platanus</i>	
		Urticales	<i>Ulmus</i> <i>Morus</i> <i>Parietaria</i> *	
			Fagales	<i>Fagus</i> <i>Quercus</i> * <i>Alnus</i> * <i>Betula</i> * <i>Carpinus</i> <i>Corylus</i> *
		Salicales		<i>Populus</i>
		Caryophyllales		<i>Chenopodium</i> <i>Kochia</i> <i>Salsola</i> <i>Amaranthus</i>
				Rutanae
			Lamianae	Oleales
		Scrophulariales		<i>Plantago</i>

Aquellos géneros o grupos especialmente relevante desde el punto de vista alérgico están marcados con un asterisco (*).



TABLA 1.1. Continuación.

PHYLUM	CLASE	ORDEN	GÉNEROS
ANGIOSPERMAE (Dicotiledóneas)	Asteranae	Asterales	<i>Ambrosia</i> * <i>Artemisia</i> * <i>Chrysanthemum</i> <i>Taraxacum</i> <i>Xanthium</i>
ANGIOSPERMAE (Monocotiledóneas)	Commelinanae	Poales (Familia Poáceas*) = Gramíneas	<i>Agrostis</i> <i>Alopecurus</i> <i>Anthoxanthum</i> <i>Avena</i> <i>Bouteloua</i> <i>Bromus</i> <i>Cynodon</i> <i>Dactylis</i> <i>Festuca</i> <i>Holcus</i> <i>Lolium</i> <i>Paspalum</i> <i>Phleum</i> <i>Phragmites</i> <i>Poa</i> <i>Secale</i> <i>Sorghum</i> <i>Zea</i>

Aquellos géneros o grupos especialmente relevante desde el punto de vista alérgico están marcados con un asterisco (*).

Este hecho se explica porque para que un determinado polen sea capaz de inducir los síntomas propios de la alergia en un sujeto atópico, han de coincidir una serie de factores (Thommen, 1931): a) la existencia en el grano de uno o más componentes alérgicos capaces de inducir la respuesta inmune, b) la dispersión debe ser llevada a cabo por el aire (polinización anemófila), c) la cantidad de polen que produce la planta de origen debe ser elevada [según Pacini (1990), dada la baja probabilidad que tiene un grano de polen transportado por el aire de llegar a fecundar el estigma apropiado, aquellas plantas que presentan una polinización anemófila, se



han visto favorecidas desde el punto de vista evolutivo por un incremento en la cantidad de polen que producen], d) el polen debe de poder ser desplazado a largas distancias (únicamente aquellos granos de un tamaño menor de 50 μm pueden ser distribuidos por el viento a través de grandes distancias), y e) debe pertenecer a una especie con una amplia distribución geográfica o estar localmente muy extendida.

A escala mundial, el polen de gramíneas (con mención especial a *Phleum pratense* y *Poa pratensis*) constituye la causa principal de polinosis. En Europa, el polen de algunas especies arbóreas pertenecientes a las familias *Betulaceae* (abedul, aliso), *Corylaceae* (avellano, carpe) y *Fagaceae* (haya, roble) es el responsable directo del 22 % de todas las enfermedades alérgicas estacionales en el norte y centro del continente (Jarolim y col., 1989) mientras que, en el área mediterránea, son los pólenes de *Parietaria judaica* y *Olea europaea* los que presentan una mayor importancia desde el punto de vista alergogénico. La incidencia debido al polen de ciprés (*Cupresaceae*) y *Platanus*, así como al polen de *Quenopodium album* (*Quenopodiaceae*), ambrosía y artemisa (*Asteraceae*) y álamo (*Salicaceae*), aunque existen algunas referencias, no ha sido bien estudiado (D'Amato, 1992). Por otro lado, se han documentado algunos casos de alergia a pólenes de especies con una distribución limitada como en el caso de *Trifolium* (Déchamps y Deviller, 1990), aunque en ningún caso deben considerarse como causas significativas de polinosis en Europa.

El polen de gramíneas (de gran incidencia en toda la geografía, con especial mención al polen de *Lolium* y *Phleum*), de *Parietaria* (el de mayor incidencia en las provincias próximas al Mediterráneo) y de olivo (de gran incidencia en Andalucía) constituye la causa principal de rinitis alérgica y asma en España (Corbi y col., 1985; Dreborg y col., 1986; Subiza y col., 1986, 1989). Es frecuente una sensibilización conjunta entre gramíneas y *Parietaria*, o entre *Parietaria* y olivo, en el área mediterránea, entre gramíneas y *Betula alba* en las costas atlántica y cantábrica, y entre gramíneas y olivo en el centro y sur peninsular. Otros pólenes, como los de *Betula alba*, *Platanus hybrida*, *Plantago lanceolata*, *Artemisia sp.* y *Chenopodium album*, presentan también alguna incidencia aunque notablemente menor (Hernández de Rojas y col., 1991). Finalmente, algunos pólenes responsables de un gran número de casos de alergia en otros países europeos, como es el caso del polen de *Ambrosia*, carecen de importancia en España, dada su escasa presencia.

Caracterización bioquímica y molecular de los alergen

La identificación, purificación y caracterización de los alergen presentes en el polen resulta de gran utilidad para la estandarización de los procedimientos usados en el diagnóstico de afecciones alérgicas motivadas por polen (Løwenstein, 1987), el estudio de la respuesta inmunológica (Ekramoddoullah y col., 1986) y para determinar si existe relación entre la estructura molecular de la proteína y su antigenicidad.



Hasta el momento, han sido identificados, purificados y caracterizados bioquímicamente numerosos alérgenos polínicos (Matthiesen y col., 1991; Rohac y col., 1991; Avjioglu y col., 1994; ver tabla 1.2). Constituyen un grupo heterogéneo de proteínas o glucoproteínas hidrosolubles, de pequeño tamaño (el peso molecular está comprendido en un rango de 5-70 kDa) y de naturaleza ácida en la mayoría de los casos (el punto isoelectrico oscila generalmente entre 4 y 6), sin que aparentemente exista ninguna relación entre las propiedades intrínsecas de las mismas y su carácter alérgico (Vrtala y col., 1990), aunque ciertas similitudes en la secuencia aminoacídica entre alérgenos de especies emparentadas filogenéticamente podrían explicar las reacciones cruzadas que tienen lugar (Ipsen y Hansen, 1990, 1991).

TABLA 1.2. Algunos de los alérgenos presentes en polen clonados hasta la fecha.

ESPECIE	ALERGENO	pI	Mw (kDa)*	REFERENCIA
<i>Alnus glutinosa</i>	Aln g 1	4-6	17	Breiteneder y col. (1992)
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	Amb a 1	-	38	Rafnar y col. (1991)
	Amb a 2	-	38	Rogers y col. (1991)
	Amb a 5	-	12	Ghosh y col. (1993)
<i>Ambrosia psilostachya</i>	Amb p 5	-	-	Ghosh y col. (1994)
<i>Ambrosia trifida</i>	Amb t 5	8,3	4,4	Ghosh y col. (1991)
<i>Apium graveolens</i>	Api g 1	-	16,2	Breiteneder y col. (1995)
	Api g 4	-	15	Scheurer y col. (2000)
<i>Betula verrucosa</i>	Bet v 1	4-6	17	Breiteneder y col. (1989)
	Bet v 3	-	-	Seiberler y col. (1994)
	Bet v 5	9,0	33	Karamloo y col. (1999)
	Profilina	-	-	Valenta y col. (1991)
<i>Carpinus betulus</i>	Car b 1	4-6	17	Larsen y col. (1992)
<i>Chamaecyparis obtusa</i>	Cha o 1	-	-	Suzuki y col. (1996)
	Cha o 2	-	50	Mori y col. (1999)
<i>Corylus avellana</i>	Cor a 1	4-6	17	Breiteneder y col. (1993)

(*) Peso molecular aproximado de la proteína tras su separación electroforética mediante SDS-PAGE.



TABLA 1.2. Continuación.

ESPECIE	ALERGENO	pI	Mw (kDa)*	REFERENCIA
<i>Crytomeria japonica</i>	Cry j 1	9,2	41-45	Sone y col. (1994)
	Cry j 2	-	37	Komiyama y col. (1994)
<i>Cupressus arizonica</i>	Cup a 1	-	-	Aceituno y col. (2000)
<i>Cynodon dactylon</i>	Cyn d 7	-	-	Suphioglu y col. (1997)
<i>Dactylis glomerata</i>	Dac g 1	-	-	Walsh y col. (1989)
<i>Glycina mas</i>	Profilina	-	-	Rihs y col. (1999)
<i>Helianthus annuus</i>	Profilina	-	-	Asturias y col. (1998)
<i>Hordeum vulgare</i>	Hor v 9	-	30	Astwood y Hill (1996)
<i>Juniperus ashei</i>	Jun a 1	-	-	Midoro-Horiuti y col. (1999)
	Jun a 2	-	43	Yokoyama y col. (2000)
<i>Lolium perenne</i>	Lol p 1	5,9	34	Griffith y col. (1991b)
	Lol p 2	5,2	11	Perez y col. (1990)
	Lol p 9	-	-	Sidoli y col. (1993) Singh y col. (1991)
<i>Nicotiana tabacum</i>	Profilina	-	-	Mittermann y col. (1995)
<i>Oryza sativa</i>	Ory s 1	-	-	Xu, y col. (1995)
<i>Parietaria judaica</i>	Par j 1	-	10-13	Costa y col. (1994) ^g
<i>Phleum pratense</i>	Phl p 2	-	11	Dolecek y col. (1993)
	Phl p 5a	-	38	Bufe y col. (1994)
	Phl p 5b	-	32	Bufe y col. (1995)
	Phl p 6	4,9	11	Petersen y col. (1995)
	Phl p 13	-	55-60	Suck y col. (2000)
	Profilina	-	-	Valenta y col. (1994)
<i>Poa pratensis</i>	Poa p 9	9,1	29	Silvanovich y col. (1991)

(*) Peso molecular aproximado de la proteína tras su separación electroforética mediante SDS-PAGE.



TABLA 1.2. Continuación.

ESPECIE	ALERGENO	pI	Mw (kDa)*	REFERENCIA
<i>Sorghum halepense</i>	Sor h 1	-	-	Avjioglu y col. (1993)
<i>Syringa vulgaris</i>	Syr v 1	-	20	Batanero y col. (1994a)
<i>Triticum sp</i>	Profilina	-	-	Rihs y col. (1994)

(*) Peso molecular aproximado de la proteína tras su separación electroforética mediante SDS-PAGE.

En los últimos 10 años se ha incrementado de manera espectacular la información que se dispone acerca de estas proteínas, gracias al avance de las técnicas basadas en el ADN recombinante, que han permitido la identificación y caracterización de dichos alérgenos de un modo más rápido y eficiente que los métodos tradicionales de purificación de proteínas empleados hasta ese momento (Avjioglu y col., 1994).

Proteínas alérgicas en el polen de olivo

El polen de olivo es responsable directo de un número creciente de problemas asociados con la alergia respiratoria, y su incidencia sobre la población humana está claramente relacionada con la distribución geográfica de dicho cultivo. Así, el polen de esta especie representa una de las causas principales de rinitis alérgica estacional, comúnmente denominada “fiebre del heno”, y asma, en aquellos lugares donde su cultivo está ampliamente extendido, tal es el caso de algunos países de la cuenca mediterránea –España, Francia, Italia, Grecia, Marruecos e Israel, fundamentalmente– así como de ciertas regiones de los EEUU –California y Arizona–, Australia, Sudáfrica, Chile y Argentina (Bousquet y col., 1985; Gioulekas y col., 1991; Wheeler, 1992; Liccardi y col., 1996; Florido y col., 1999).

A partir de extractos de polen de olivo, Vela y col. (1982) y Blanca y col. (1983) llevaron a cabo estudios preliminares en los que determinaron la presencia de hasta 40 componentes alérgicos diferentes en el grano. Hasta la fecha, únicamente 8 de estos componentes han sido identificados, aislados y caracterizados (ver tabla 1.3).

Entre estos, destacan las proteínas alérgicas denominadas Ole e 1 y Ole e 2, de acuerdo a la nomenclatura aprobada por la IUIS, consideradas los *alérgenos principales o mayoritarios* del polen de olivo (Lauzurica y col., 1988a, b), es decir, aquellos para los que se detecta IgE en más del 50 % de los paciente atópicos.



TABLA 1.3. Alergenos de polen de olivo aislados y caracterizados hasta el momento.

ALERGENO	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIAS
Ole e 1*	Alergeno mayoritario del polen de olivo Peso molecular = 17-19 kDa, pI= 5-5.6 Presenta tres variantes de glucosilación Microheterogeneidades en su secuencia de aa Homología con productos genes <i>LAT52</i> y <i>Zmc13</i>	Lauzurica y col. (1988a, b) Wheeler y col. (1990) Batanero y col. (1994b) Villalba y col. (1993, 1994) Lombardero y col. (1994)
Ole e 2* (profilina)	Panalergeno. Proteína ubicua y conservada. Peso molecular = 8 kDa Control de la polimerización de actina	Asturias y col. (1997) Ledesma y col. (1998a)
Ole e 3*	Peso molecular = 9,2 kDa, pI= 4.2-4.3 Capacidad de unión a iones Ca^{2+} Propuesta de familia: POLCALCINAS	Batanero y col. (1996) Ledesma y col. (1998b)
Ole e 4	Diversas isoformas Peso molecular = 32 kDa, pI= 4.65-5.1 Sin homología relevante	Boluda y col. (1998)
Ole e 5	Peso molecular = 16 kDa, pI= 5.1-6.5 Homología con SODs de otras especies	Boluda y col. (1998) Martínez y col. (1999)
Ole e 6*	Peso molecular = 10 kDa, pI= 4.2 Elevado contenido es Cys Sin homología relevante	Batanero y col. (1997)
Ole e 7	Elevado grado de polimorfismo Peso molecular = 9,8-10,3 kDa Sin homología relevante	Tejera y col. (1999)
Ole e 8*	Peso molecular = 18,8 kDa Capacidad de unión a iones Ca^{2+} Sin homología relevante	Ledesma y col. (2000)

Los alergenos del polen de olivo que han sido clonados aparecen marcados con un asterisco (*).

La proteína Ole e 1 fue aislada, purificada y caracterizada bioquímicamente al final de la década de los 80 y comienzo de los 90 (Lauzurica, 1988a; Villalba y col., 1990, 1993). Se trata de una glucoproteína de naturaleza acídica y un peso molecular de 17-19 kDa, con diferentes variantes de glucosilación (Batanero y col., 1994b), y que presenta microheterogeneidades en distintas posiciones de su secuencia que



determinan la variación en los valores de pI (Wheeler y col., 1990; Villalba y col., 1993, 1994). Asimismo, se ha detectado la presencia de determinantes antigénicos comunes y/o reacción cruzada con alérgenos de polen de otras especies de la familia *Oleaceae* (Bousquet y col., 1985; Obispo y col., 1993; Martín-Orozco y col., 1994; Fernández y col., 1996), así como con extractos de polen de otras especies (Vela y col., 1982; González y col., 1987; Kernermann y col., 1992; Baldo y col., 1992; Carreira y col., 1994). Se ha utilizado una batería de anticuerpos monoclonales frente a dicha proteína (Lauzurica y col., 1988b; Lombardero y col., 1992) con objeto de mapear los determinantes antigénicos de dicha molécula y, más recientemente, para determinar su localización dentro del grano de polen (Martín-Orozco y col., 1994; Rodríguez-García y col., 1995a, b).

Por otro lado, se han aislado, secuenciado y expresado en *E. coli* varios clones de ADNc que codifican dicho polipéptido (Lombardero y col., 1994; Villalba y col., 1994). Números de acceso a GenBankTM/EMBL: S75766 y X76395, respectivamente). Recientemente, uno de dichos clones ha sido utilizado en la levadura *Pichia pastoris* para sintetizar *in vitro* una proteína recombinante que es biológicamente activa (Huecas y col., 1999). Esta aproximación permitió obtener grandes cantidades del alérgeno puro y biológicamente activo, que podría ser utilizada con fines clínicos y de diagnóstico.

Función biológica de los alérgenos en el grano de polen

Dado el enorme interés que presentan las proteínas alérgicas desde el punto de vista clínico, su estudio se ha centrado básicamente en la búsqueda de métodos de diagnóstico fiables y rápidos, y en el desarrollo de una terapia adecuada en cada caso, por lo que en la mayoría de los casos se desconoce su significado biológico. Estas proteínas son rápidamente liberadas del grano de polen al entrar en contacto con las membranas de la mucosa de las vías respiratorias superiores, ocasionando la respuesta inmune inmediata y los síntomas asociados a la misma (Howlett y col., 1973). Se asume, por tanto, que su función podría estar relacionada con el reconocimiento polen-estigma, el fenómeno de autoincompatibilidad y/o la germinación del grano de polen, aunque no podemos descartar una función estructural. El desarrollo de la biología molecular durante la última década ha supuesto un salto cuantitativo y cualitativo en el conocimiento de la estructura y propiedades moleculares de estas proteínas y, en determinados casos, su aplicación junto con las técnicas propias de la biología celular, ha permitido una aproximación a su función biológica (ver tabla 1.4)



TABLA 1.4. Aproximación a la función biológica de algunos alérgenos presentes en el polen.

ESPECIE	ALERGENO	PROPIEDADES	REFERENCIA
<i>Apium graveolens</i>	Api g 1 Profilina	Homología con Bet v 1 Control polimerización actina	Breiteneder y col. (1995) Scheurer y col. (2000)
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	Amb a 1	Homología con pectato liasa fúngica	Turcich y col. (1993)
<i>Betula verrucosa</i>	Bet v 1 Bet v 3 Bet v 4 Bet v 5	Actividad ribonucleasa Proteína de unión a Ca ²⁺ Proteína de unión a Ca ²⁺ Homología con el enzima isoflavona reductasa	Bufe y col. (1996) Seiberler y col. (1994) Engel y col. (1997) Karamloo y col. (1999)
<i>Brassica rapa</i>	Bra r 1	Proteína de unión a Ca ²⁺	Okada y col. (1998, 1999)
<i>Cryptomeria japonica</i>	Cry j 1 Cry j 2	Actividad pectato liasa Actividad polimetilgalacturonasa	Taniguchi y col. (1995) Ohtsuki y col. (1995)
<i>Cupressus arizonica</i>	Cup a 1	Sitio activo del enzima pectato liasa	Aceituno y col. (2000)
<i>Cynodon dactylon</i>	Cyn d 7	Proteína de unión a Ca ²⁺	Suphioglu y col. (1997)
<i>Glycina mas</i>	Profilina	Control polimerización actina	Rihs y col. (1999)
<i>Helianthus annuus</i>	Profilina	Control polimerización actina	Asturias y col. (1998)
<i>Juniperus ashei</i>	Jun a 1	Sitio activo del enzima pectato liasa	Midoro-Horiuti y col. (1999)
<i>Lolium perenne</i>	Lol p 11	Homología con inhibidor de tripsina	van Ree y col. (1995b)
<i>Nicotiana tabacum</i>	Profilina	Control polimerización actina	Mittermann y col. (1995)
<i>Olea europaea</i>	Ole e 3 Ole e 5 Ole e 8 Profilina	Proteína de unión a Ca ²⁺ Homología con SODs Proteína de unión a Ca ²⁺ Control polimerización actina	Batanero y col. (1996) Boluda y col. (1998) Ledesma y col. (2000) Asturias y col. (1997)
<i>Phleum pratense</i>	Phl p 5b Phl p 13 Profilina	Actividad ribonucleasa Homología con poligalacturonasas Control polimerización actina	Bufe y col. (1995) Suck y col. (2000) Valenta y col. (1994)
<i>Triticum sp</i>	Profilina	Control polimerización actina	Rihs y col. (1994)



Existe un grupo de proteínas alergénicas, cuya característica común es la presencia en su secuencia de varios motivos estructurales de unión a Ca^{2+} , para el que se ha propuesto el nombre de *polcalcinas* (Batanero y col., 1996). El Ca^{2+} está implicado en numerosos procesos metabólicos clave dentro de la célula y juega un papel fundamental en la transmisión de señales intracelulares.

Otro grupo de alérgenos polínicos que merece especial atención es el de las *profilinas*, caracterizadas como panalérgenos y responsables de la reactividad cruzada existente entre muchas especies vegetales (Grote, 1988; Valenta y col., 1991, 1992). Se trata de proteínas de bajo peso molecular que intervienen en la polimerización de los filamentos de actina, gracias a su capacidad de unión a los monómeros de dicha proteína, y cuya presencia ha sido confirmada en el polen (Valenta y col., 1993).

Finalmente, hay un reducido grupo de alérgenos en los que se ha detectado algún tipo de actividad enzimática o bien presentan similitud en su secuencia aminoacídica con algún enzima conocido (ver tabla 1.4). En este grupo se incluyen las dos proteínas alergénicas mayoritarias del cedro japonés (*Crytomeria japonica*) y el alérgeno mayoritario de la hierba timotea (*Phleum pratense*) y del abedul (*Betula verrucosa*) entre otros. Basándose en la actividad ribonucleasa que presentan los dos últimos polipéptidos, algunos autores han atribuido a estas proteínas un papel clave en la relación huésped-patógeno en los procesos de patogénesis en la planta.

En el olivo, como hemos visto anteriormente, Ole e 2 ha resultado ser una profilina, mientras que Ole e 3 y Ole e 8 presentan en su secuencia motivos de unión a Ca^{2+} . Por otro lado, la proteína alergénica Ole e 5 presenta homología con varias enzimas CuZn-superóxido dismutasas (SODs) en el extremo N-terminal de su secuencia aminoacídica, y el alérgeno Ole e 1 muestra entre un 35 % y un 40 % de homología con los polipéptidos codificados por el gen *LAT52* de polen de tomate y el gen *Zmc13* de polen de maíz, para los que se ha postulado un papel clave en los procesos de hidratación y/o germinación del grano de polen (Muschietti y col., 1994). El análisis de expresión génica de ambos genes durante el desarrollo y/o germinación del grano de polen podría aportar algún indicio sobre la función biológica de ambas proteínas.

Diagnóstico y tratamiento de la alergia

La incidencia de afecciones alérgicas y asma se ha incrementado de manera significativa y constante durante los últimos 30 años, hasta el punto de alcanzar proporciones epidémicas. Según un informe publicado recientemente en la revista PM-Farma (1996), se estima que entre un 15 y un 20 % de la población europea padece actualmente algún tipo de afección alérgica, con valores similares a los descritos en otros países industrializados como EE.UU. y Japón.



Las causas de este notable incremento se desconocen por el momento. En un estudio llevado a cabo por Geller-Bernstein y col. (1996), estos autores observaron que el porcentaje de pacientes alérgicos al polen de olivo entre la población judía de Israel, llegada desde lugares muy diversos durante el último siglo, es significativamente mayor que entre la población árabe. Situaciones similares se han descrito en otros tres lugares: en Italia, donde la sensibilización al polen de olivo disminuye en aquellas regiones donde la densidad del olivar es menor (Negrini, 1989; Vargiu y col., 1989); en Australia, donde la sensibilización al olivo es mayor entre inmigrantes que entre la población nativa (Leung y col., 1994); y en Croacia (Cvitanovic y col., 1993), donde el número de individuos alérgicos es mayor entre inmigrante procedentes de países donde el olivo no es un cultivo regular que entre la población autóctona. Por tanto, la exposición de una determinada población al polen de olivo durante varias generaciones, aparentemente disminuye el número de individuos que son alérgicos a dicho polen. Este hecho indica la aparición de una cierta tolerancia entre la población autóctona o bien, una desensibilización espontánea. Así, diversos estudios muestran que existe un incremento de la frecuencia de los antígenos HLA-DQ2 y HLA-DR7 entre los individuos sensibilizados al polen de olivo, mientras que el antígeno HLA-DR4 prevalece en aquellos que no lo son, lo que sugiere la posibilidad de que éste último tenga un papel protector (Cárdaba y col., 1993, 1996; Geller-Bernstein y col., 1996).

Finalmente, algunos autores proponen que algunas de estas proteínas (Ej.: *Bet v 1*) son inducida por estrés y que el incremento del estrés al que están sometidas las plantas en las zonas urbanas explicaría parcialmente el incremento de enfermedades alérgicas (Scheiner, 1992). A favor de esta hipótesis están los estudios de Breitenbach y col. (1992), que muestran que la cantidad del alérgeno *Bet v 1* en el polen de abedul (*Betula verrucosa*) recolectado a partir de árboles de regiones muy contaminadas es significativamente mayor que el procedente de áreas menos contaminadas.

El diagnóstico de este tipo de hipersensibilidad incluye una serie de pruebas específicas entre las que figuran los denominados SPTs, ensayos de tipo RAST, tests de liberación de histamina, y pruebas de provocación conjuntival, nasal o bronquial [ver revisión en: *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, 17th edition. Beers, M. H. & Berkow, R. (eds.). Edición en Internet: www.merck.com/pubs/mmanual/]. En la mayor parte de los casos, el tratamiento incluye la inmunoterapia o vacunación, aún cuando la exposición al agente causante de la alergia sea temporal y el tratamiento medicamentoso sea capaz de reducir suficientemente los síntomas. La vacunación con alérgenos, también denominada hiposensibilización o desensibilización, se basa en la inyección repetida del antígeno por vía subcutánea en dosis gradualmente crecientes. Diversos estudios sobre los efectos a largo plazo indican que este tratamiento previene la aparición y/o progresión de asma en un porcentaje significativo de pacientes alérgicos (Bauer, 1993; Jacobsen y col., 1996; Valovirta, 1997).



Tanto las vacunas como los sistemas de diagnóstico que se comercializan actualmente se obtienen mediante extracción acuosa a partir de la fuente primaria del antígeno (Ej.: polen). En el momento de evaluar la calidad de éstos hay que tener en cuenta dos aspectos: la complejidad en su composición, dado que cualquier proteína puede actuar potencialmente como alérgeno, y la estandarización de los extractos, debido a la gran variedad de procedimientos de extracción existentes. Dicha estandarización se realiza siguiendo las directrices de la OMS (WHO Expert Committee on Biological Standardization. Guidelines for the preparation and establishment of reference materials and reference reagents for biological substances. WHO Technical Report Series, No. 626, 1978), a través de la IUIS, y requiere una caracterización de los extractos mediante procedimientos *in vitro*, como SDS-PAGE, IEF o CIE. Igualmente, debe expresarse la potencia de cada extracto en unidades de eficacia clínica. Para ello, se han establecido distintas unidades comparativas como las denominadas SQ, HEP y BU en Europa, y las unidades AU o BAU en EE.UU.

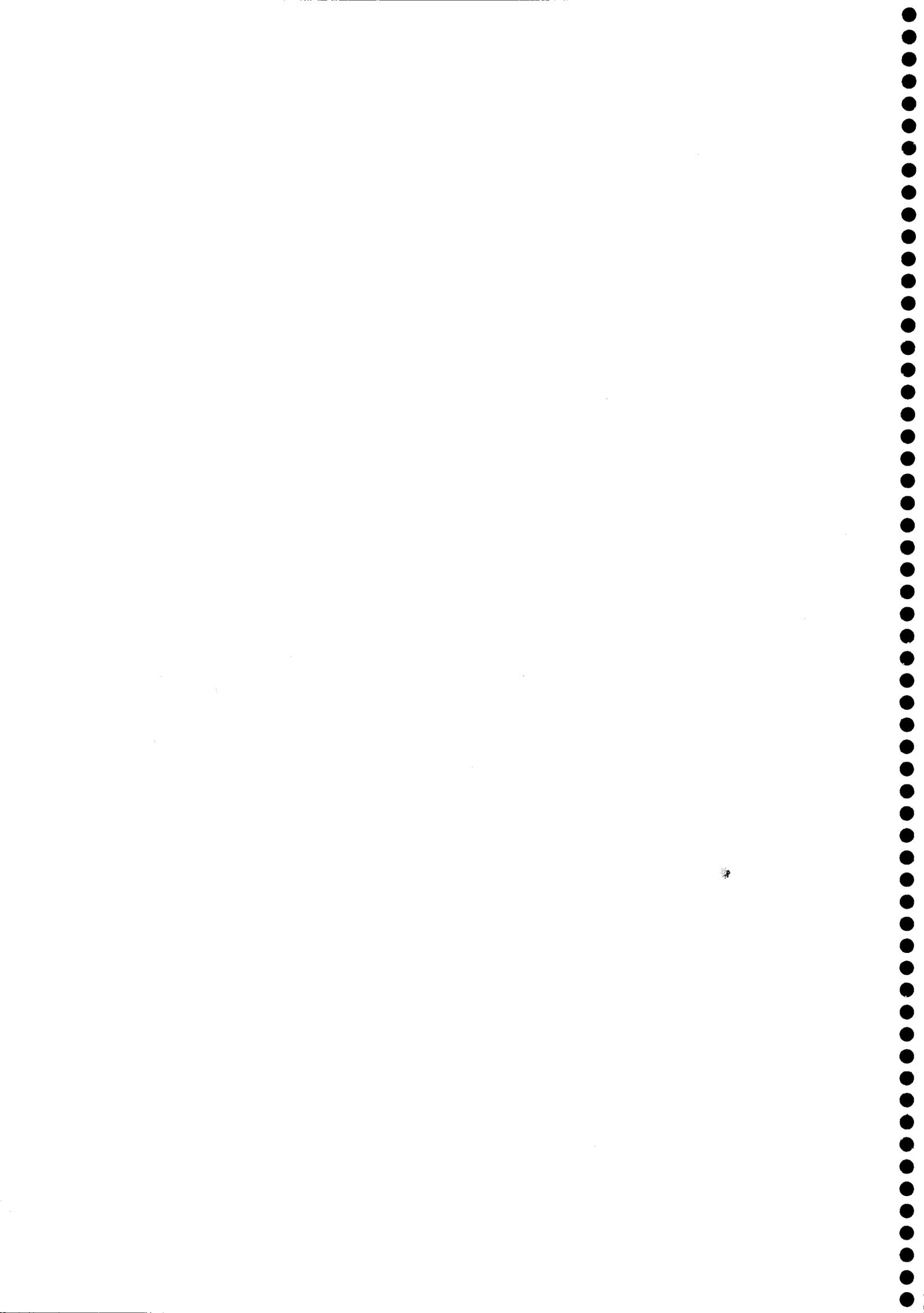
1.6. TESIS A PLANTEAR

En este trabajo se pretende llevar a cabo una aproximación a la función biológica del alérgeno mayoritario del polen del olivo, Ole e 1, en el grano de polen. Para ello:

1. Se analizará el patrón de expresión temporal y espacial de dicho gen así como de la proteína correspondiente, durante las diferentes etapas del desarrollo del grano de polen dentro de la antera, así como durante su germinación *in vitro*.
2. El alérgeno Ole e 1 muestra una cierta homología en el extremo N-terminal de su secuencia aminoacídica con un enzima cutinasa aislada del polen de *Brassica napus* L. (Dr. Simon Hiscock, Department of Plant Sciences, University of Oxford. Comunicación personal). Teniendo en cuenta la posibilidad de que Ole e 1 sea la proteína homóloga al enzima aislado en *Brassica*, se determinará si dicha proteína alérgica presenta actividad enzimática esterasa.

Por otro lado, se pretende también determinar el carácter antigénico de Ole e 1 y otras proteínas alérgicas presentes en el grano de polen maduro distintos cultivares de olivo. En este caso:

1. Se analizará la antigenicidad de distintos cultivares de olivo en pacientes atópicos aquejados de rinitis alérgica al polen de esta especie.
2. Se caracterizará la proteína alérgica Ole e 1 en varios cultivares de olivo con el fin de determinar la validez de la misma como marcador molecular de variedades en el olivar.



Material y Métodos



Capítulo segundo

UNIVERSIDAD DE GRANADA

24 ABR. 2001

COMISION DE DOCTORADO



Faint, illegible text located below the main photograph, possibly a caption or a page number.

Capítulo Segundo

Material y Métodos

"Any living cell carries with it the experiences of a billion years of experimentation by its ancestors"

Max Delbrück (1906-1981)

2.1. MATERIAL

A. MATERIAL VEGETAL

Para llevar a cabo el presente trabajo de investigación se recolectaron primordios florales de olivo (*Olea europaea* L.) de la variedad Picual, seleccionados en la provincia de Granada. La recolección del material se realizó durante los meses de Abril y Mayo del periodo comprendido entre 1997 y 2000. Las anteras fueron diseccionadas bajo una lupa binocular y fijadas para su posterior estudio morfológico (Protocolo 1), procesadas para microscopía óptica (Protocolo 24) o bien, congeladas inmediatamente en N₂ líquido y almacenadas a -80 °C hasta su posterior uso. Debido a su reducido tamaño, los botones florales correspondientes a los estadios iniciales del desarrollo (estadio premeiótico y meiosis) fueron procesados completos, siguiendo las mismas pautas que se han descrito anteriormente. Así mismo, se recolectaron sépalos y hojas jóvenes, que fueron almacenados en N₂ líquido y usados posteriormente como controles en algunos de los experimentos llevados a cabo.

Por otro lado, al final de cada periodo de desarrollo floral (meses de Mayo y Junio) y coincidiendo con la antesis, se llevó a cabo la recolección de polen maduro de olivos correspondientes a las variedades de aceite Arbequina, Frantoio, Lechín de Granada, Picual y Picudo, y a las variedades de mesa Gordal Sevillana, Hojiblanca, Manzanilla de Sevilla, Loaime y Lucio. El polen de todas las variedades estudiadas, excepto Picual, Loaime y Lucio, se obtuvo en colaboración con el Dr. Julián Cuevas (Escuela Politécnica, Universidad de Almería). Tras la recolección, el material fue filtrado en el laboratorio mediante un tamiz (con un diámetro de poro de 150 µm) con



el fin de eliminar anteras, sépalos y otros restos florales, procesado para microscopía (Protocolos 25 y 26) o bien, congelado en N₂ líquido y almacenado a -80 °C hasta su posterior uso. Todos los cultivares estudiados son originarios de Andalucía (España) o están representados en la región (tal es el caso del cultivar Arbequina, procedente de Cataluña, España), a excepción de la variedad italiana Frantoio.

En los ensayos de actividad esterasa se utilizaron extractos crudos de polen maduro de *Brassica oleraceae* como control. El polen se obtuvo a partir de plantas crecidas en invernadero bajo condiciones controladas de temperatura y humedad. Para ello, se recolectaron flores completas con anteras dehiscentes y, con ayuda de un pincel, se depositó el polen sobre una superficie limpia (papel de aluminio). Después de ser filtrado a través de un tamiz (con un diámetro de poro de 150 µm), el polen fresco se utilizó para preparar los extractos proteicos (Protocolo 3) utilizados en los ensayos posteriores (Protocolos 7 y 9).

En los estudios de reactividad cruzada con *Plantago lanceolata*, se utilizaron anteras en un estadio maduro, obtenidas a partir de flores recolectadas durante los meses de Junio y Julio del 2000 en la provincia de Granada. Dichas anteras fueron diseccionadas y procesadas para microscopía electrónica de transmisión (Protocolo 25) o bien, congeladas en N₂ líquido y almacenadas a -80 °C hasta su posterior uso.

B. SUEROS DE PACIENTES ALÉRGICOS

Un total de 14 sueros procedentes de otros tantos pacientes, diagnosticados como hipersensibles al polen de olivo en distinto grado, han sido utilizados en el presente trabajo. Dichos pacientes fueron localizados en colaboración con el Dr. Francisco Muñoz del Castillo (Hospital Reina Sofía, Córdoba), y seleccionados a partir de su historial clínico.

2.2. MÉTODOS DE LABORATORIO

PROTOCOLO 1. *Estudio morfométrico de la flor de olivo durante su desarrollo*

PROCEDIMIENTO:

1. Se recolectaron 10 botones florales de una misma rama de olivo¹ (variedad Picual) durante los días 14, 15, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 27, 28, 29 y 30 de Abril y los días 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15 y 18 de Mayo de 1998.
2. Se midió la longitud (mm) y anchura (mm) de cada botón floral (Anexo 1) utilizando para ello un calibre convencional (precisión 1/20 mm). Los datos fueron procesados estadísticamente, tal y como se describe en el apartado 2.3.



3. A continuación, las muestras fueron fijadas en fijador Carnoy² y se determinó el estadio de desarrollo mediante aplastado y tinción con DAPI (ver detalles en Protocolo 2).

REACTIVOS:

- ① **Fijador Carnoy:** etanol + ácido acético (3:1).

① **Notas:**

¹ En un mismo olivo podemos encontrar flores en distintos estadios de desarrollo en función de la orientación de la rama en el árbol. Con objeto de minimizar el error que conllevaría hacer un muestreo al azar, todas las muestras fueron tomadas de un mismo árbol y, dentro de éste, de una misma rama.

² El material fijado en solución de Carnoy puede ser almacenado a 4 °C durante largo tiempo.

PROTOCOLO 2. *Tinción de células esporógenas con DAPI*

PROCEDIMIENTO:

1. Sobre un portaobjetos, cortar el ápice de la antera¹ con una cuchilla de afeitar o un escalpelo. Empujar suavemente hacia el exterior el contenido de la misma con la ayuda de una aguja enmangada, sobre una gota de solución de trabajo de DAPI.
2. Incubar la preparación durante 10-15 min. a temperatura ambiente.
3. Poner un cubreobjetos sobre la muestra y observar en un microscopio óptico Axioplan (Zeiss), equipado con un sistema de epifluorescencia, utilizando un sistema de filtros con excitación ultravioleta.

REACTIVOS:

- ① **Solución de trabajo de DAPI:** 1 ml de la solución de DAPI 10 µg/ml, 0.1 ml de Triton X-100 y 9 ml de H₂O destilada.
- ② **Solución de DAPI 10 µg/ml:** diluir una solución de DAPI de 1 mg/ml en tampón McIlvaine (dilución 1:1000).
- ③ **Tampón de McIlvaine:** citrato sódico 0.1 M, fosfato disódico 0.2 M y Triton X-100 al 1 % (v/v), pH 4.0.



PROTOCOLO 3. *Extracción de proteínas totales de polen de olivo*¹

PROCEDIMIENTO:

1. Poner en un recipiente de cristal 1 gr de polen y añadir 10 ml de tampón de extracción y 200 μ l de PMSF² 100 mM. Dejar en agitación a 4 °C durante 10 h.
2. Clarificar el sobrenadante mediante centrifugación a 12.000 g durante 30 min., x 2. Filtrar el extracto final a través de un filtro de 0.2 μ m y almacenar en alícuotas a -20 °C hasta su posterior uso.

REACTIVOS:

- ① **Tampón de extracción:** Tris-ClH 10 mM, pH 8.0. Guardar a 4 °C.
- ② **PMSF**  **100 mM:** preparar en isopropanol. Almacenar a -20 °C.

① Notas:

¹ Extracción de proteínas totales en condiciones nativas.

² El PMSF es un agente inhibidor de proteasas. Antes de su uso, calentar con el fin de disolver los cristales que se forman durante su almacenamiento prolongado a bajas temperaturas.

PROTOCOLO 4. *Extracción de proteínas totales de anteras de olivo*¹

PROCEDIMIENTO:

1. Pesar 0.1 gr de material.
2. Poner dicho material en un mortero, enfriado previamente con N₂ líquido, y añadir unos mg de arena de cuarzo estéril². A continuación, moler hasta conseguir que el material se transforme en un polvillo fino, añadiendo N₂ líquido.
3. Añadir el polvillo a un tubo estéril de 1.5 ml y homogeneizar en 200 μ l de tampón de extracción. Añadir 20 μ l de PMSF³ 100 mM.
4. Centrifugar a 12.000 g durante 10 min. a 4°C.
5. Hacer alícuotas de 100 μ l del sobrenadante y guardar a -20 °C hasta su posterior uso.

**REACTIVOS:**

- ① **Tampón de extracción:** Tris-CIH 50 mM, pH 7.5, cloruro sódico 300 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 al 2 % (v/v), ácido ascórbico 5 mM y DTT 100 mM. Guardar a 4 °C.
- ② **PMSF**  **100 mM:** preparar en isopropanol. Almacenar a -20 °C.

① Notas:

- ¹ Protocolo para extracción de proteínas totales en condiciones nativas.
- ² La arena de cuarzo facilita la rotura de los tejidos vegetales.
- ³ El PMSF es un agente inhibidor de proteasas. Antes de su uso, calentar con el fin de disolver los cristales que se forman durante su almacenamiento prolongado a bajas temperaturas.

PROTOCOLO 5. Purificación del alergeno Ole e 1

PROCEDIMIENTO:

1. Llevar a cabo la extracción de proteínas totales de polen de olivo (variedad Picual) siguiendo los pasos del protocolo 3, descrito anteriormente. Partir de 5 gr de polen y homogeneizar en 50 ml de tampón de extracción y 1 ml de PMSF¹ 100 mM.
2. Después de filtrar los extractos (filtros de 0.2 µm), clarificar añadiendo 1 vol. de éter dietílico. Agitar bien la mezcla y centrifugar a 12.000 g durante 2 min.
3. Tomar la fase acuosa inferior con una pipeta y pasarla a un tubo de centrifuga limpio. Añadir sulfato amónico hasta obtener un 60 % de saturación. Dejar en agitación durante 1 h, a 4 °C.
4. Centrifugar a 3.000 g durante 40 min. Eliminar el sobrenadante y dejar secar el precipitado.
5. Resuspender² en 2 ml de tampón Tris-CIH 10 mM, pH 8.0 y añadir 40 µl de PMSF 100 mM. Dializar³ en 1 litro del mismo tampón a 4 °C durante 2 días.
6. Añadir 3 vol. de acetona fría y dejar precipitar toda la noche a -20 °C. Centrifugar a 0 °C y a 10.000 g durante 5 min..
7. Eliminar el sobrenadante y dejar secar el precipitado. Resuspender en 2 ml de tampón Tris-CIH 10 mM, pH 8.0.



8. Separar las distintas fracciones proteicas mediante FPLC⁴, a partir de 200 μ l de extracto, de acuerdo a la siguiente tabla:

TABLA 2.1

VOLUMEN ELUIDO*	FRACCIONAMIENTO
10 ml	2 fracciones x 5 ml
3 ml	6 fracciones x 0.5 ml
4 ml	20 fracciones x 0.2 ml
7 ml	7 fracciones x 1 ml
Volumen total= 24 ml N° total de fracciones= 35	

* El extracto fue eluido en tampón tris-ClH 10 mM, pH 8.0.

REACTIVOS:

- ① **Tampón de extracción:** Tris-ClH 10 mM, pH 8.0. Guardar a 4 °C.
- ② **PMSF**  **100 mM:** preparar en isopropanol. Almacenar a -20 °C.
- ③ **Éter dietílico**
- ④ **Sulfato amónico**
- ⑤ **Acetona fría (-20 °C)**

① **Notas:**

- ¹ El PMSF es un agente inhibidor de proteasas. Antes de su uso, calentar con el fin de disolver los cristales que se forman durante su almacenamiento prolongado a bajas temperaturas.
- ² Si permanece material sin disolver, centrifugar durante 15 min. a 3.000 g.
- ³ Para eliminar el sulfato amónico, dializar los extractos proteicos en cassettes de diálisis Slide-A-Lyzer-10 kDa (Pierce) siguiendo las instrucciones del manual. Durante la diálisis renovar el tampón 3 veces.
- ⁴ Se utilizó una columna de exclusión molecular Superosa 12 (Pharmacia LKB) en un sistema de FPLC (Pharmacia LKB).



PROTOCOLO 6. *Cuantificación proteica*

PROCEDIMIENTO:

1. Preparar la siguiente mezcla de cada una de las muestras que van a ser cuantificadas: 5 μl del extracto proteico y 795 μl de H_2O destilada.
2. Preparar una curva patrón con muestras de 1, 2, 4, 8, 16 y 32 μg de la proteína estándar (BSA) a partir de una solución de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y completar con H_2O destilada hasta un volumen de 800 μl .
3. Añadir 200 μl del colorante Bradford y mezclar¹ invirtiendo los tubos.
4. Transcurridos un mínimo de 5 min., medir la DO_{595} , en un espectrofotómetro (Ej.: UV-1603, Shimadzu, Japón), de las diferentes concentraciones estándar de BSA y determinar la curva patrón. A partir de los valores de densidad óptica obtenidos para las diferentes muestras, extrapolar los valores de concentración.

REACTIVOS:

- ① Colorante de Bradford²: guardar a 4 °C.
- ② Solución de BSA 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$: almacenar a -20 °C.

① Notas:

¹ Evitar la formación de espuma.

² La cuantificación proteica se llevó a cabo mediante el método de Bradford (1976) siguiendo las indicaciones del manual Bio-Rad, USA Protein Assay (Bio-Rad, USA).

PROTOCOLO 7. *Ensayos de actividad esterasa in vitro en extractos proteicos*

PROCEDIMIENTO:

1. Preparar la siguiente mezcla de reacción (volumen final = 1 ml):
 - 980 μl de tampón de reacción
 - 10 μl del substrato (PNB)
 - 10 μl del extracto proteico¹



2. Dejar las muestras a temperatura ambiente² un mínimo de 30 min. y medir la absorbancia a 405 nm (A_{405}) en un espectrofotómetro (Ej.: UV-1603, Shimadzu, Japón).³

REACTIVOS:

- ① **Tampón fosfato sódico 0.05 M, pH 7.0**
- ② **Solución de PNB al 1.76 % (p/v) en acetonitrilo** 
- ③ **Solución de Triton X-100 al 0.4 % (v/v) en tampón fosfato sódico 0.05 M, pH 7.0**
- ④ **Tampón de reacción:** 17.8 ml de tampón fosfato sódico 0.05 M, pH 7.0, y 2 ml de Triton X-100 al 0.4 % (v/v).

① **Notas:**

¹ Ajustar la cantidad de extracto proteico si fuera necesario.

² Si hay actividad esterasa en el extracto, éste cambiará de color y se tornará ligeramente amarillento.

³ Una medida de absorbancia > 0 indica presencia de actividad butirato esterasa, que será tanto mayor cuanto mayor sea la medida de A_{405} .

PROTOCOLO 8. *Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida*¹

PROCEDIMIENTO:

1. Montar los moldes (a modo de sándwich) para la polimerización de los geles.
2. Preparar el gel separador y el gel concentrador. Aplicar vacío a ambas soluciones².
3. Añadir 75 μ l de persulfato amónico al 10 % y 7.5 μ l de TEMED a la solución del gel separador. Llenar los moldes de polimerización con dicha solución.³
4. Añadir 50 μ l de N-butanol saturado en H₂O y dejar polimerizar.⁴
5. Una vez polimerizado el gel, eliminar el N-butanol con H₂O destilada. Repetir el paso 3 con la solución correspondiente al gel concentrador, añadiendo 50 μ l de persulfato amónico al 10 % y 5 μ l de TEMED. Colocar los peines, cuidando que no queden atrapadas burbujas de aire y dejar polimerizar.



6. Para preparar las muestras, tomar aproximadamente 30 μ gr del extracto crudo o la fracción purificada correspondiente, completar con H₂O destilada hasta 10 μ l y añadir otros 10 μ l de tampón de muestras 2x.
7. Hervir las muestras a 95 °C durante 3 min. Cargar dichas muestras y los marcadores correspondientes (Ej.: Kaleidoscope Polypeptide Standards, Bio-Rad, USA) en los pocillos, sin llegar a rebasar la altura de éstos.
8. Conectar a voltaje constante (200 V) durante 45 min.⁵

REACTIVOS:

- ❶ **Tampón del ánodo:** Tris-CIH 200 mM, pH 8.9.
- ❷ **Tampón del cátodo:** Tris-CIH 100 mM, pH 8.25, Tricina 100 mM y SDS al 0.1 % (p/v).
- ❸ **Gel separador (15 %):** 2 ml de acrilamida A, 2 ml de tampón del gel y 2 ml de la solución de glicerol al 50 % por cada minigel.
- ❹ **Gel concentrador (4 %):** 0.25 ml de acrilamida B, 0.75 ml de tampón del gel y 2 ml de H₂O destilada por cada minigel.
- ❺ **Tampón del gel:** Tris-CIH 3 M, pH 8.45, y SDS al 0.3 % (p/v).
- ❻ **Solución de acrilamida A:** acrilamida ☠ al 48 % (p/v) y bis-acrilamida ☠ al 1.5 % (p/v).
- ❼ **Solución de acrilamida B:** acrilamida al 46.5 % (p/v) y bis-acrilamida al 1.5 % (p/v).
- ❽ **Tampón de muestras 2x:** Tris-CIH 50 mM, SDS al 4 % (p/v), glicerol al 12 % (v/v), β -mercaptoetanol ☠ al 2 % (v/v) y azul de bromofenol al 0.01 % (p/v). Ajustar el pH a 6.8.
- ❾ **Persulfato amónico al 10 % (p/v)**
- ❿ **TEMED**
- ⓫ **Solución de glicerol al 50 % (v/v)**

⓬ **Notas:**

- ¹ Según Schägger y von Jagow (1987).
- ² El O₂ inhibe la polimerización de la acrilamida.
- ³ Dejar aproximadamente 1.5 cm para añadir el gel concentrador.
- ⁴ El N-butanol crea una película aislante, evitando que entre el aire mientras el gel polimeriza. Por otro lado, permite que la superficie de polimerización sea absolutamente plana.



⁵ La electroforesis de proteínas se llevó a cabo en un sistema "Mini Protean II" (Bio-Rad, USA) siguiendo las indicaciones del manual que acompaña a dicho equipo.

PROTOCOLO 9. *Ensayos de actividad esterasa en geles de poliacrilamida*

PROCEDIMIENTO:

ETAPA 1: ELECTROFORESIS EN CONDICIONES SEMINATIVAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA¹

1. Montar los moldes (a modo de sándwich) para la polimerización de los geles.
2. Preparar el gel separador y el gel concentrador. Desgasificar ambas soluciones².
3. Añadir 40 µl de persulfato amónico al 10 % y 5 µl de TEMED a la solución del gel separador. Llenar los dos moldes con dicha solución.
4. Añadir 50 µl de N-butanol saturado en H₂O y dejar polimerizar.³
5. Una vez polimerizado el gel, eliminar el N-butanol con H₂O destilada. Repetir el paso 3 con la solución del gel concentrador, añadiendo 25 µl de persulfato amónico al 10 % y 5 µl de TEMED.
6. Para preparar las muestras, tomar aproximadamente 30 µgr de proteínas totales, completar con H₂O destilada hasta 10 µl y añadir otros 10 µl del tampón de muestras 2x hasta obtener un volumen final de 20 µl.
7. Cargar dichas muestras⁴ en los pocillos sin que se llegue a rebasar la altura de éstos. Conectar a voltaje constante (100 V) durante 45 min.⁵

ETAPA 2: RENATURALIZACIÓN PROTEICA

8. Lavar el gel en solución de renaturalización⁶ durante 20 min. x 3.

ETAPA 3: DETECCIÓN DE ACTIVIDAD BUTIRATO Y ACETATO ESTERASA

9. Incubar el gel a 37 °C en la solución de tinción correspondiente durante 1-3 h.⁷
10. Lavar el gel en H₂O destilada durante unos min. para detener la reacción.

REACTIVOS:

- ❶ **Tampón del ánodo:** Tris-ClH 25 mM, pH 8.3, y glicina 192 mM.



- ② **Tampón del cátodo:** Tris-ClH 25 mM, pH 8.3, glicina 192 mM y SDS al 0.1 % (p/v).
- ③ **Tampón de separación 4x:** Tris- ClH 1.5 M, pH 8.8.
- ④ **Tampón de concentración 4x:** Tris- ClH 0.5 M, pH 6.8.
- ④ **Solución de acrilamida** ☠ al 30 % (30 % T, 2.7 % C): 29.2 gr acrilamida y 0.8 gr de bis-acrilamida en 100 ml de H₂O destilada.
- ⑤ **Tampón de muestras 2x:** Tris-ClH 50 mM, pH 6.8, SDS al 4 % (p/v), glicerol al 12 % (v/v), β-mercaptoetanol ☠ al 2 % (v/v) y azul de bromofenol al 0.01 % (p/v).
- ⑥ **Gel de separación (15 %):** 2.53 ml de acrilamida al 30 %, 1.265 ml del tampón de separación 4x, 49.5 µl de SDS al 10 % (p/v), 495 µl de glicerol al 50 % (v/v) y 600 µl de H₂O destilada por cada minigel.
- ⑦ **Gel de concentración (4 %):** 250 µl de acrilamida al 30 %, 500 µl del tampón de concentración 4x, 20 µl de SDS al 10 % (p/v) y 1.23 ml de H₂O destilada por cada minigel.
- ⑧ **Tampón de renaturalización:** Triton X-100 al 2.5 % (v/v) en tampón fosfato sódico 0.05 M, pH 7.0.
- ⑨ **Solución de tinción butirato esterasa:** 5 ml de α-naftil butirato ☠ (Sigma, USA) al 1 % (v/v) en acetona, 200 mg de la sal "Fast Blue RR" ☠ (Sigma, USA) y 100 ml de tampón fosfato sódico 0.1 M, pH 7.0.
- ⑩ **Solución de tinción acetato esterasa:** 60 mg de α-naftil acetato ☠ (Sigma, USA) en 1 ml de acetona, 200 mg de la sal "Fast Blue RR" (Sigma, USA) y 100 ml de tampón fosfato sódico 0.1 M, pH 7.0.

① **Notas:**

- ¹ Según Laemli (1970), con ligeras modificaciones.
- ² El O₂ inhibe la polimerización de la acrilamida.
- ³ El butanol crea una película aislante, evitando que entre el aire mientras el gel polimeriza. Por otro lado, permite que la superficie de polimerización sea absolutamente plana.
- ⁴ No hervir las muestras.
- ⁵ La electroforesis de proteínas se llevó a cabo en un sistema "Mini Protean II" (Bio-Rad, USA), siguiendo las indicaciones del manual que acompaña a dicho equipo.
- ⁶ De esta forma, extraemos el SDS del gel.
- ⁷ Incubar el gel en un recipiente de cristal cubierto con un plástico y papel de aluminio para evitar la luz. Si transcurridas 1-3 h no aparece señal en el gel, prolongar la incubación el tiempo necesario.



PROCOLO 10. *Tinción de proteínas totales con azul Coomassie*

PROCEDIMIENTO:

1. Una vez separadas las proteínas mediante electroforeis (Protocolo 8), teñir el gel en una solución de tinción durante 1 h y en agitación.¹
2. Lavar con H₂O destilada.
3. Desteñir el gel para eliminar el exceso de colorante.

REACTIVOS:

- ① **Solución de tinción:** ácido acético al 10 % (v/v), metanol  al 25 % (v/v) y azul de Coomassie al 0.1% (p/v).
- ② **Solución para desteñir:** etanol al 25 % (v/v) y ácido acético al 10 % (v/v).

① Notas:

¹ Si transcurrido ese tiempo no aparecen bandas de proteínas, dejar el gel en la solución de tinción durante una noche.

PROCOLO 11. *Secado de geles*

PROCEDIMIENTO:

1. Tras teñir el gel con azul de Coomassie (Protocolo 10), dejar el gel durante una noche en una solución de glicerol al 3 % (v/v).
2. Colocar un trozo de papel de celofán humedecido con H₂O sobre una placa de metacrilato, poner el gel y, sobre éste, otro pedazo de celofán humedecido, cuidando que no queden burbujas entre ambos.
3. Poner el molde de la segunda placa de metacrilato, que encaja con la primera, y sujetar el celofán con unas pinzas tal y como se muestra en la figura 2.1, cuidando de no tensarlo excesivamente.

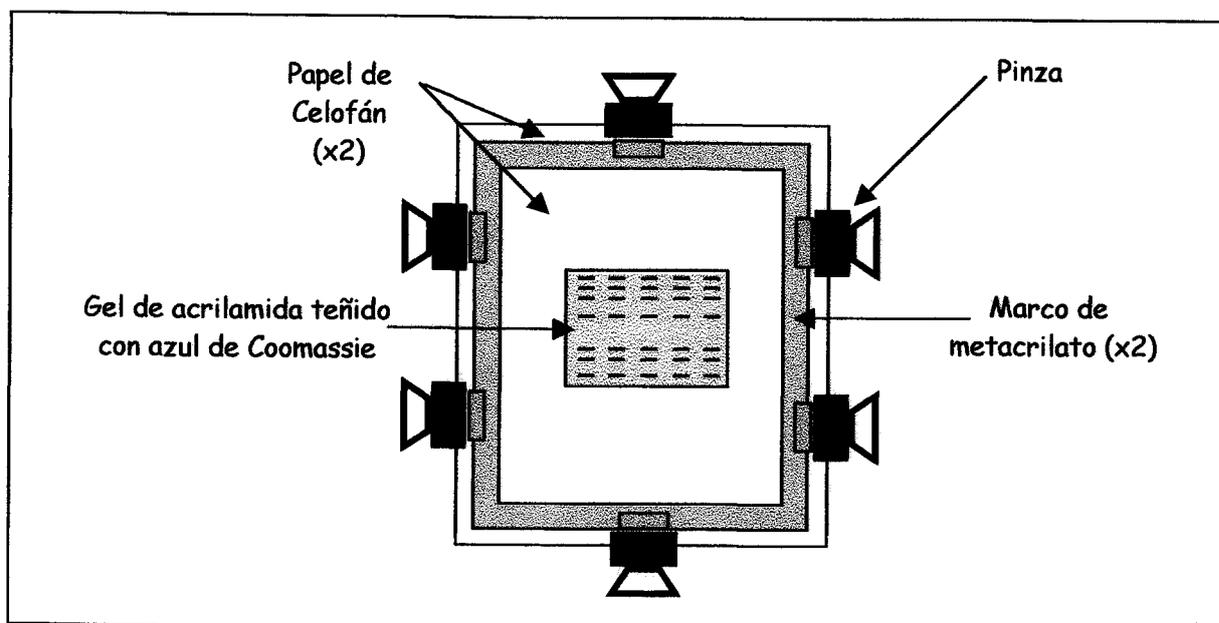


FIGURA 2.1. Sistema de secado de geles.

4. Dejar secar sobre una superficie plana. Una vez seco, es posible obtener una imagen digitalizada del gel mediante un escáner.

PROTOCOLO 12. *Isoelectroenfoque (IEF) de la fracción purificada correspondiente a Ole e 1*

PROCEDIMIENTO:

1. Montar el molde del gel, tal y como se muestra en la figura 2.2. Añadir 1.5 ml de H₂O al cristal y, a continuación, colocar una lámina de plástico (Bio-Rad, USA) sobre el cristal¹, cuidando que no queden burbujas de aire entre ambas. Finalmente, disponer el cristal sobre la bandeja de metacrilato cuidando que el plástico quede hacia abajo.
2. Preparar el gel de la siguiente forma:
 - Mezclar en un matraz 6.5 ml de una solución de acrilamida al 40 %, 3.0 ml de una solución de bis-acrilamida al 2 %, 4.67 ml de una solución de glicerol al 87 %, 15 ml de la solución de ácido glutámico y 9.0 ml de H₂O destilada.
 - Añadir rápidamente los anfólitos a la mezcla anterior (pH 3.5-10 = 930 µl + pH 4-6 = 67 µl + pH 5-7 = 67 µl).
 - Aplicar vacío a la mezcla anterior durante 10 min.²



- Añadir 600 μl de una solución de persulfato amónico al 1 %, 20 μl de TEMED y 20 μl de una solución de riboflavina al 1 %.
3. Transferir la mezcla al molde por capilaridad mediante una pipeta y dejar polimerizar durante al menos 1 h.³
 4. Abrir el molde y extraer el gel con cuidado⁴. Eliminar cualquier resto acuoso que aparezca sobre los bordes y superficie del mismo.
 5. Disponer el gel en el centro del bloque de refrigeración del tanque de electroforesis.⁵
 6. Cortar dos bandas de papel Whatman n° 17 y disponerlas de forma paralela y alineada respecto a los electrodos, en ambos extremos del gel. Saturar una de las bandas (cátodo) con una solución de hidróxido sódico 1 M y la otra (ánodo) con una solución de ácido fosfórico 1 M, evitando que ambas soluciones mojen el gel.
 7. Aplicar las muestras (10 μl) y los marcadores (IEF Standards pH 4.45-9.6, Bio-Rad, USA) sobre pedacitos rectangulares (10 x 5 mm) de papel de filtro Whatman n° 3 MM, situados en el centro del gel.
 8. Correr el gel a voltaje constante (600 V) durante 2 h, a 4°C.⁶
 9. Teñir el gel con una solución de azul de Coomassie durante unos min. y lavar a continuación con H₂O destilada.

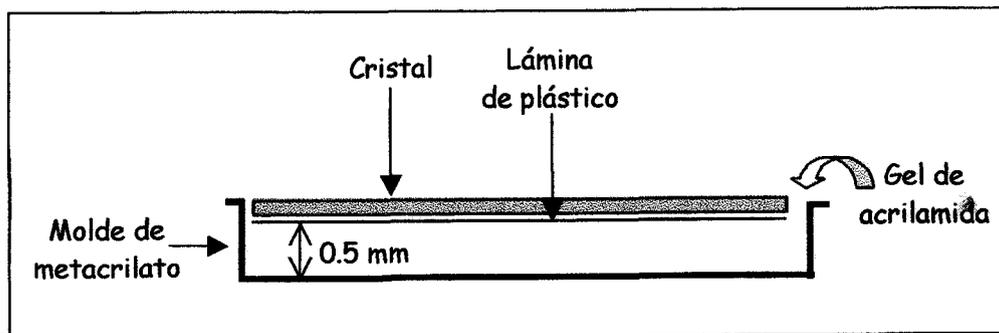


FIGURA 2.2. Esquema del sistema de llenado del molde de metacrilato con un gel de acrilamida mediante capilaridad.

REACTIVOS:

- ① Soluciones de acrilamida al 40 % (p/v) ☠ y de bis-acrilamida al 2% (p/v) ☠
- ② Solución de glicerol al 87 % (v/v)



- ③ **Ácido glutámico:** 235 mgr en 200 ml de H₂O destilada.
- ④ **Anfolitos (Bio-Rad, USA)**
- ⑤ **Persulfato amónico al 1 % (p/v)**
- ⑥ **Solución de riboflavina al 1% (p/v)**
- ⑦ **TEMED**
- ⑧ **Tampón del ánodo:** ácido fosfórico 1 M.
- ⑨ **Tampón del cátodo:** hidróxido sódico 1 M.
- ⑩ **Solución de azul de Coomassie:**
 - Añadir 2 gr de azul de Coomassie en 400 ml de ácido sulfúrico 2 M.
 - Diluir con 400 ml de H₂O destilada.
 - Filtrar la solución anterior utilizando papel Whatman nº 1 y añadir 89 ml de hidróxido potásico 10 M y 120 ml de una solución de TCA al 100 % (p/v).

⑪ **Notas:**

- ¹ Colocar la cara hidrófoba del plástico en contacto con el cristal.
- ² El O₂ inhibe la polimerización de la acrilamida.
- ³ Cuidar que no se formen burbujas mientras se vierte el gel sobre el molde. Para ello, el frente del gel debería avanzar de forma homogénea a lo largo de todo el ancho del molde. Añadir al final del gel unas gotas de N-butanol, que forman una película aislante que evita que entre el aire.
- ⁴ El gel tiene un grosor de 0.5 mm, por lo que debe ser manejado con sumo cuidado.
- ⁵ Poner una gota de H₂O destilada entre la superficie del bloque y el gel para permitir la transferencia de calor.
- ⁶ El IEF se llevó a cabo en un sistema "IEF 1415" (Bio-Rad, USA), siguiendo las instrucciones del manual que acompaña a dicho equipo.

PROTOCOLO 13. *Western blot*

PROCEDIMIENTO:

ETAPA 1: TRANSFERENCIA

1. Una vez separadas las proteínas (Protocolo 8), equilibrar el gel en tampón de transferencia durante 30 min.



2. Pretratamiento de la membrana de PVDF¹:
 - Mojar la membrana en metanol.
 - Eliminar el metanol y añadir H₂O destilada. Dejar agitando durante 3-5 min.
 - Equilibrar la membrana en tampón de transferencia durante 10 min.
3. Montar los cassettes de transferencia.²
4. Transferir³ a 100 V durante 1.5 h. Una vez finalizada la transferencia, secar la membrana sobre papel secante (poner las proteínas hacia arriba) y guardar a 4 °C hasta su posterior uso, o bien continuar con la inmunodetección.

ETAPA 2: INMUNODETECCIÓN

5. Bloquear la membrana en solución de bloqueo durante 2-5 h, a 4 °C.
6. Incubar con el anticuerpo primario específico (ver tabla), a temperatura ambiente:

TABLA 2.2

ANTICUERPO PRIMARIO ⁴	DILUCIÓN	TIEMPO	MATERIAL
① Anticuerpo monoclonal anti-Ole e 1	1:200	12h	Extractos crudos de anteras de olivo en distinto estadio de desarrollo
② Anticuerpo policlonal Anti-Ole e 1	1:2000	1h	Extracto crudo de polen maduro de olivo (Picual)
③ Anticuerpo monoclonal anti-Ole e 1	1:1000	12h	Extractos crudos de polen maduro de olivo (distintas variedades)
④ Anticuerpo monclonal anti-Pla I 1	1:50	12h	Extracto crudo de polen maduro de olivo (variedad Picual)
⑤ Sueros de pacientes alérgicos al olivo	1:1000	12h	Extractos crudos de polen maduro de olivo (distintas variedades)



TABLA 2.2. Continuación.

ANTICUERPO PRIMARIO ⁴	DILUCIÓN	TIEMPO	MATERIAL
⑥ Anticuerpos monoclonales anti-cutinasa	1:100	12h	Extracto crudo de polen maduro de olivo (Picual)
⑦ Anticuerpo monoclonal anti-Ole e 1	1:2000	12h	Extracto crudo de polen de <i>Brassica oleraceae</i>
⑧ Anticuerpo policlonal Anti-Ole e 1	1:2000	1h	Extracto crudo de polen de <i>Brassica oleraceae</i>

7. Lavar con TBST durante 10 min. x 2.

8. Incubar con el anticuerpo secundario (ver tabla) a temperatura ambiente:

TABLA 2.3

ANTICUERPO SECUNDARIO	DILUCIÓN	TIEMPO	MATERIAL
① Anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón, conjugado con fosfatasa alcalina (SIGMA)	1:2000	2h	Extractos crudos de anteras de olivo en distinto estadio de desarrollo
② Anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo, conjugado con fosfatasa alcalina (SIGMA)	1:2000	1h	Extracto crudo de polen maduro de olivo (variedad Picual)
③ Anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón, conjugado con fosfatasa alcalina (SIGMA)	1:2500	2h	Extractos crudos de polen maduro de olivo (distintas variedades)
④ Anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón, conjugado con fosfatasa alcalina (SIGMA)	1:1000	3h	Extracto crudo de polen maduro de olivo (variedad Picual)



TABLA 2.3. Continuación.

ANTICUERPO SECUNDARIO	DILUCIÓN	TIEMPO	MATERIAL
⑤ a) Anticuerpo de ratón anti-IgE de humano (SIGMA)	1:1000	1h	Extractos crudos de polen maduro de olivo (distintas variedades)
b) Anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón, conjugado con fosfatasa alcalina (SIGMA)	1:1000	1h	
⑥ Anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón, conjugado con fosfatasa alcalina (SIGMA)	1:2000	1h	Extracto crudo de polen maduro de olivo (variedad Picual)
⑦ Anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón, conjugado con fosfatasa alcalina (SIGMA)	1:2000	2h	Extracto crudo de polen de <i>Brassica oleraceae</i>
⑧ Anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo, conjugado con fosfatasa alcalina (SIGMA)	1:2000	1h	Extracto crudo de polen de <i>Brassica oleraceae</i>

9. Lavar con TBST durante 10 min. x 2.

10. Llevar a cabo la detección de la señal según se describe en el protocolo 14.

REACTIVOS:

- ① **Tampón de transferencia:** Tris-ClH 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20 % (v/v). El pH debería estar comprendido entre 8.1 y 8.4.
- ② **Solución de bloqueo:** leche en polvo al 3 % (p/v) en tampón TBST.
- ③ **TBST:** Tris-ClH 10 mM, pH 7.4, cloruro sódico 150 mM y Tween 20 al 0.3 % (v/v).
- ④ **Metanol** 

① **Notas:**

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



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

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

⁴ Todos los anticuerpos primarios ensayados son monoclonales. Los anticuerpos anti-Ole e 1 fueron cedidos por el Dr. Carlos Lahoz (Fundación Jiménez Díaz, Madrid) y el anticuerpo 2A10 por el Dr. Florentino Polo (ALK-Abelló S.A., Madrid). Finalmente, los anticuerpos CU3-GA11.EA8, CU3-CF3.DE4, CU3-GD8.BB1 y CU1-CH12 (cortesía de la Dra. Frances M. Dewey, Department of Plant Sciences, University of Oxford, UK) son específicos frente a una cutinasa del hongo *Fusarium sp.*

PROTOCOLO 14. *Revelado de actividad fosfatasa alcalina mediante NBT/BCIP*

PROCEDIMIENTO:

1. Tras incubar con el anticuerpo secundario, lavar la membrana con tampón de lavado durante 15 min. x 2, a temperatura ambiente.
2. Equilibrar la membrana en tampón de activación durante 2-5 min., a temperatura ambiente.
3. Preparar la solución de NBT/BCIP (Amresco, USA):
 - Añadir 66 µl de NBT en 10 ml de tampón de activación alcalino y agitar.
 - Añadir 33 µl de BCIP y agitar. Usar dentro de la hora siguiente a su preparación.
4. Incubar la membrana con el substrato hasta que aparezca la señal¹. Lavar con H₂O destilada.

REACTIVOS:

- ① **BCIP:** disolver 0.5 gr de BCIP en 10 ml de dimetilformamida  pura. Almacenar a 4 °C.
- ② **NBT:** disolver 0.5 gr de NBT en 10 ml de una solución de dimetilformamida al 70 % (v/v). Almacenar a 4 °C y en oscuridad.
- ③ **Tampón de activación de la fosfatasa alcalina:** cloruro sódico 100 mM, cloruro de magnesio 5 mM y Tris-CIH 100 mM, pH 9.5.
- ④ **Tampón de lavado:** ácido maleico 0.1 M, cloruro sódico 0.15 M y Tween 20 al 0.3 % (v/v), pH 7.5.

**① Notas:**

¹ La desfosforilación del sustrato BCIP por el enzima fosfatasa alcalina origina la aparición del producto BCI que se une al NBT y forma un compuesto insoluble de color violáceo.

PROTOCOLO 15. *Revelado de actividad fosfatasa alcalina mediante CDP-Star*¹

PROCEDIMIENTO:

1. Tras incubar con el anticuerpo secundario, lavar con tampón de lavado durante 15 min. x 2, a temperatura ambiente.
2. Equilibrar en tampón de activación durante 2-5 min., a temperatura ambiente.
3. Diluir el sustrato CDP-Star en 2-3 ml de tampón de detección (dilución 1:100) e incubar la membrana durante 5 min.
5. Eliminar el exceso de líquido, evitando que la membrana se seque totalmente.
6. Exponer la membrana a una película fotográfica (Ej.: Hiperfilm ECL, Amersham, UK) durante 1-5 min. en un cassette de autorradiografía.
7. Revelar la película.

REACTIVOS:

- ① **Tampón de lavado:** ácido maleico 0.1 M, cloruro sódico 0.15 M y Tween 20 al 0.3 % (v/v), pH 7.5.
- ② **Tampón de activación de la fosfatasa alcalina:** cloruro sódico 100 mM, cloruro de magnesio 5 mM y Tris-ClH 100 mM, pH 9.5.

① Notas:

¹ La desfosforilación del sustrato CDP-Star (Boehringer-Mannheim, Alemania) por el enzima fosfatasa alcalina conduce a la formación del anión metaestable fenolato de dioxetano, que se descompone y emite luz a 466 nm.



PROTOCOLO 16. *Aislamiento de ARN total de polen de olivo*¹

PRINCIPIO:

La tecnología RNeasy (Quiagen) aprovecha las propiedades de unión selectiva de una membrana de gel de sílice. Un tampón de alto contenido en sales permite la unión eficiente de hasta 100 µg de especies de ARN de una longitud mayor de 200 pb a dicha membrana. Esquemáticamente, el proceso se resume en la figura 2.3.

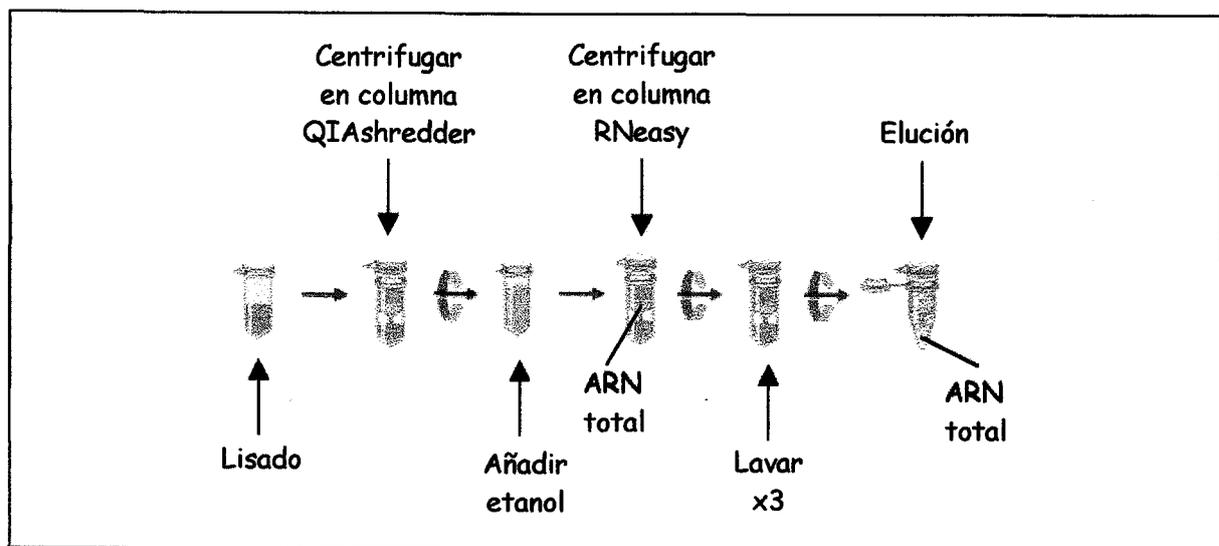


FIGURA 2.3. Aislamiento de ARN total de polen de olivo mediante el sistema RNeasy Plant Kit (Quiagen).

PROCEDIMIENTO:

1. Homogeneizar 0.1 gr de polen en un mortero con N₂ líquido hasta reducir el material a un polvillo fino.
2. Añadir 500 µl de tampón de lisis RLT y 5 µl de β-mercaptoetanol  y homogeneizar la mezcla en un tubo de 1.5 ml. Incubar a 56 °C durante 1-3 min.
3. Aplicar el homogenado a una columna "QIAshredder" y centrifugar 2 min. a 12.000 g.
4. Transferir la fracción filtrada a un nuevo tubo de 1.5 ml y añadir 225 µl de etanol.
5. Aplicar la muestra a una columna "RNeasy spin" y centrifugar durante 15 seg. a 8.000 g.



6. Descartar la fracción filtrada, añadir 700 µl de tampón de lavado RW1 en la columna y centrifugar como en el paso anterior.
7. Poner la columna en un tubo nuevo de 2 ml. Añadir 500 µl de tampón de lavado RPE y centrifugar durante 15 seg. a 8.000 g.
8. Añadir 500 µl de tampón RPE en la columna y centrifugar 2 min. a 12.000 g.
9. Eluir el ARN con 30-50 µl de H₂O-DEPC² ☠ centrifugando durante 1 min. a 8.000 g. Guardar a -20 °C hasta su posterior uso.

① **Notas:**

¹ La extracción de ARN total se llevó a cabo usando el sistema comercial "RNeasy Plant Total RNA" (Quiagen), siguiendo las instrucciones del manual "RNeasy Plant Handbook". Además de las columnas, se incluyen todas las soluciones necesarias para llevar a cabo la extracción.

² El ARN es degradado por enzimas ribonucleasas, muy estables y activas. El DEPC es un inhibidor de RNAsas.

PROTOCOLO 17. *Aislamiento de ARN total de anteras de olivo*

PROCEDIMIENTO:

1. Homogeneizar 0.1 gr de tejido en un mortero con N₂ líquido hasta reducir el material a un polvillo fino.
2. Poner dicho polvillo en un tubo de 2 ml libre de RNAsas y añadir 750 µl de fenol y 750 µl de tampón de extracción.
3. Agitar unos seg. y dejar en hielo unos min., agitando ocasionalmente. Centrifugar a 12.000 g durante 5 min.
4. Transferir el sobrenadante a un tubo de 2 ml nuevo y añadir 0.5 ml de fenol/cloroformo (1:1). Voltar y centrifugar a 12.000 g durante 5 min. a temperatura ambiente.
5. Añadir 700 µl de isopropanol¹ y dejar a -20 °C toda la noche.
6. Centrifugar a 12.000 g durante 15 min. Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 500 µl de H₂O-DEPC.
7. Añadir 500 µl de cloruro de litio 4 M y dejar toda la noche a 4 °C.²



8. Centrifugar a 12.000 g durante 15 min. y eliminar el sobrenadante. Resuspender el precipitado en 400 μ l de H₂O-DEPC.
9. Añadir 40 μ l de acetato sódico 3 M, pH 5.2, y 1 ml de etanol al 100 %. Dejar a -20 °C durante una noche.
10. Centrifugar a 12.000 g durante 15 min. y eliminar el sobrenadante.
11. Añadir 1 ml de etanol al 70 % y centrifugar a 12.000 g durante 5 min.
12. Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 50 μ l de H₂O-DEPC.

REACTIVOS:

- ① **Tampón de extracción:** Tris-ClH 100 mM, pH 8.5, cloruro sódico 100 mM, EDTA 20 mM y SLS al 1 % (p/v). Guardar a temperatura ambiente.
- ② **Fenol** ☠
- ③ **Fenol/cloroformo (1:1)** ☠
- ④ **Isopropanol**
- ⑤ **Cloruro de litio 4 M**
- ⑥ **Acetato sódico 3 M, pH 5.2**
- ⑦ **Etanol al 70 % (v/v)**
- ⑧ **Etanol al 100% (v/v)**
- ⑨ **H₂O-DEPC**³ ☠ : DEPC al 0.1 % (v/v) en H₂O destilada. Autoclavar para eliminar el DEPC.

① **Notas:**

¹ En este paso precipitan los ácidos nucleicos (ARN y ADN).

² En este paso precipita el ARN.

³ El ARN es degradado por enzimas ribonucleasas, muy estables y activas. El DEPC es un inhibidor de RNAsas.



PROTOCOLO 18. *Cuantificación de ácidos nucleicos*

PROCEDIMIENTO:

1. Diluir cada muestra (dilución 1:100 ó 1:50) en H₂O-DEPC hasta un volumen final de 500 µl.
2. Medir la absorbancia a 260 nm (A₂₆₀) y 280 nm (A₂₈₀) de cada muestra en un espectrofotómetro (Ej.: UV-1603, Shimadzu, Japón).
3. Para calcular la concentración de ARN¹ en µg/ml, multiplicar el valor de A₂₆₀ x 40 x factor de dilución. Para calcular la concentración de ADN² de doble cadena en µg/ml, multiplicar el valor de A₂₆₀ x 50 x factor de dilución.
4. El cociente A₂₆₀/A₂₈₀ proporciona una estimación de la pureza³ del ARN.
5. La integridad⁴ del ARN se puede determinar en un gel de agarosa al 1 % en tampón TBE (Protocolo 21).

REACTIVOS:

- ① H₂O-DEPC⁵  : DEPC al 0.1 % (v/v) en H₂O destilada. Autoclavar para eliminar el DEPC.

① Notas:

- ¹ A₂₆₀=1 corresponde a 40 µg de ARN por ml.
- ² A₂₆₀=1 corresponde a 50 µg de ADN de doble cadena por ml.
- ³ Una muestra de ARN ó ADN puro presenta un valor A₂₆₀ / A₂₈₀ de 1.7-2.0.
- ⁴ Si no hay degradación, en el gel aparecen 2 bandas nítidas correspondientes al ARN ribosómico 28S y 18S, respectivamente. Para visualizar el ARN en el gel, se utilizó el programa Quantity One 4.1.0, incorporado en el sistema de documentación de geles Gel.Doc 1000/2000 (Bio-Rad, USA).
- ⁵ El ARN es degradado por enzimas ribonucleasas, muy estables y activas. El DEPC es un inhibidor de RNAsas.

PROTOCOLO 19. *Electroforesis de ARN en condiciones desnaturalizantes*¹

PROCEDIMIENTO:

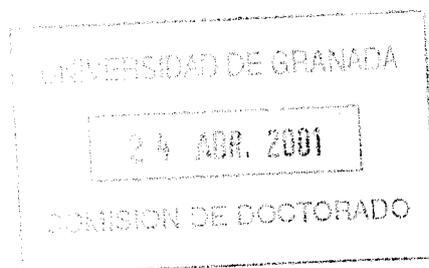
1. Tratar el tanque de electroforesis, bandeja y peine con una solución de hidróxido sódico² 0.1 M durante 6 h. Lavar con H₂O-DEPC.



2. Preparar el gel de agarosa según se describe a continuación:
 - Añadir 1 gr de agarosa en 35.99 ml de H₂O-DEPC.
 - Fundir en el microondas y dejar enfriar unos min.
 - Añadir 5 ml de MOPS 10x, 9 ml de formaldehído al 38 % y 10 µl de la solución de bromuro de etidio.
 - Verter la mezcla en una bandeja y dejar solidificar³ durante 30 min.
3. Preparar las muestras⁴ según se describe a continuación:
 - Mezclar el ARN (aproximadamente 2-5 µgr) con 1 vol. de tampón de desnaturalización.
 - Incubar las muestras a 65 °C durante 2 min. y enfriar en hielo inmediatamente.
 - Centrifugar durante 5 min. a 12.000 g.
 - Añadir 1/10 vol. de tampón de muestras 10x en cada tubo.
4. Cargar las muestras y correr el gel a 110 V durante 1 h, en una cubeta de electroforesis "Minisub DNA Cell" (Bio-Rad, USA).⁵

REACTIVOS:

- ① Solución de hidróxido sódico 0.1 M
- ② Tampón MOPS 10x: MOPS 0.2 M, acetato sódico 50 mM y EDTA 5 mM.
- ③ Solución de formaldehído al 38 % (p/v) ☠
- ④ Tampón de desnaturalización: tampón MOPS 0.7x y formaldehído al 9.2 % (p/v).
- ⑤ Tampón de electroforesis 1x: tampón MOPs 1x y formaldehído al 3 % (p/v).
- ⑥ Tampón de muestras 10x: glicerol al 50 % (v/v), EDTA 1 mM, pH 8.0, azul de bromofenol al 0.25 % (p/v), xilenocianol al 0.25 % (p/v) y H₂O-DEPC.
- ⑦ Solución de bromuro de etidio ☠ al 0.5 % (p/v)
- ⑧ H₂O-DEPC⁶ ☠ : DEPC al 0.1 % (v/v) en H₂O destilada. Autoclavar para eliminar el DEPC.



**① Notas:**

- ¹Protocolo según Jones (1995), con algunas modificaciones.
- ²El tratamiento con hidróxido sódico debería eliminar cualquier actividad RNasa presente en el equipo.
- ³Colocar el peine en el gel cuidando que no toque con el fondo de la cubeta con objeto de evitar fugas al cargar las muestras en los pocillos.
- ⁴Tratar los marcadores moleculares (Ej.: RNA Markers, 0.28-6.58kb, Promega, USA) como una muestra más.
- ⁵Si no hay degradación, en el gel aparecen 2 bandas nítidas correspondientes al ARN ribosómico 28S y 18S, respectivamente. Para visualizar el ARN en el gel, se utilizó el programa Quantity One 4.1.0, incorporado en el sistema de documentación de geles Gel.Doc 1000/2000 (Bio-Rad, USA).
- ⁶El ARN es degradado por enzimas ribonucleasas, muy estables y activas. El DEPC es un inhibidor de RNasas.

PROTOCOLO 20. *Northern blot*¹

PROCEDIMIENTO:**ETAPA 1: TRANSFERENCIA**

1. Tras la electroforesis (Protocolo 19), lavar el gel con H₂O-DEPC durante unos min.
2. Transferir el ARN a una membrana de nylon mediante capilaridad, de acuerdo al esquema que se muestra en la figura 2.4, durante 6-18 h y utilizando tampón de transferencia.²

ETAPA 2: HIBRIDACIÓN

3. Lavar la membrana en tampón de lavado durante unos min. y dejar secar a temperatura ambiente³.
4. Prehibridar la membrana a 42 °C con tampón de hibridación durante 4-6 h.
5. Desnaturalizar la sonda⁴ Ole e 1 a 95 °C durante 10 min. Enfriar inmediatamente en hielo y poner en 10 ml de tampón de hibridación. Hibridar a la misma temperatura (42 °C) durante toda la noche.

ETAPA 3: INMUNODETECCIÓN

6. Lavar la membrana en tampón de lavado 2x durante 5 min. x 2, a temperatura ambiente.
7. Lavar la membrana en tampón de lavado 0.1x durante 15 min. x 2.



8. Incubar la membrana en solución de bloqueo durante 4 horas, a temperatura ambiente.
9. Diluir el anticuerpo anti-digoxigenina (dilución 1:10.000) en solución de bloqueo e incubar la membrana durante 1 h, a temperatura ambiente.
10. Lavar con tampón de lavado durante 15 min. x 2.
11. Equilibrar con tampón de activación de la fosfatasa alcalina y llevar a cabo la detección con CDP-Star (Protocolo 15).

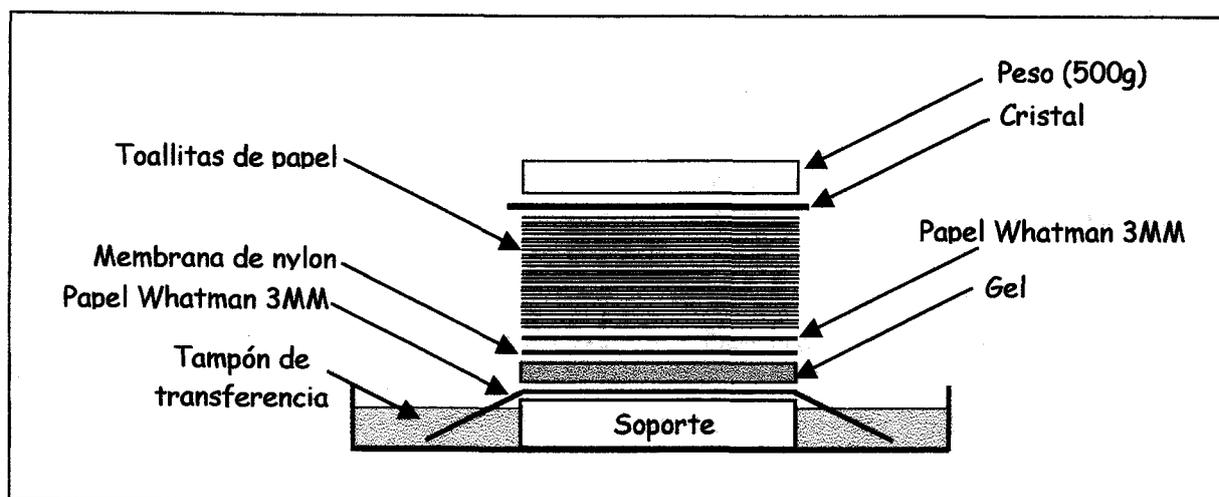


FIGURA 2.4. Esquema de la transferencia de ácidos nucleicos a una membrana de nylon mediante capilaridad.

REACTIVOS:

- ① **Tampón de transferencia:** hidróxido sódico 7.5 mM.
- ② **Tampón de hibridación:** fosfato potásico 25 mM, pH 7.4, SSC 5x, Denhardt's 5x, ADN de esperma de salmón a una concentración de 50 µg/ml, formamida  al 50 % (v/v) y H₂O-DEPC.
- ③ **SSC 20x:** cloruro sódico 3 M y citrato sódico 0.3 M. Ajustar pH a 7.0 con una solución de hidróxido sódico 10 M. Autoclavar.
- ④ **Solución de SDS al 10 % (p/v):** calentar a 68 °C para facilitar su disolución. Ajustar el pH a 7.2 con ClH concentrado.
- ⑤ **Tampón de lavado:** ácido maleico 0.1 M, cloruro sódico 0.15 M y Tween 20 al 0.3 % (v/v), pH a 7.5.



- ⑥ **Tampón de lavado 0.1x:** SSC 0.1x y SDS al 0.1 % (v/v).
- ⑦ **Tampón de lavado 2x:** SSC 2x y SDS al 0.1 % (v/v).
- ⑧ **Solución de bloqueo:** agente de bloqueo (Boehringer-Mannheim, Alemania) al 10 % (p/v) en tampón de lavado.
- ⑨ **Tampón de activación de la fosfatasa alcalina:** cloruro sódico 100 mM, cloruro de magnesio 5 mM y Tris-ClH 100 mM, pH 9.5.
- ⑩ **H₂O-DEPC⁵**  : DEPC al 0.1 % (v/v) en H₂O destilada. Autoclavar para eliminar el DEPC.

⑪ **Notas:**

- ¹ La transferencia se llevó a cabo según Sambrock y col. (1989). La hibridación se realizó de acuerdo al protocolo descrito en "The DIG System User's Guide for Filter Hybridization" (Boehringer-Mannheim, Alemania), con ligeras modificaciones.
- ² Hidroliza parcialmente el ARN incrementando la velocidad y eficiencia de transferencia de ARNs de gran tamaño (>2,3 Kpb).
- ³ Dado que el ARN transferido en un tampón alcalino se une de manera irreversible a una membrana de nylon, no es necesario ningún tratamiento de fijación después de la transferencia.
- ⁴ 60 pmol (5-25 ngr/ml) de sonda ADN marcada con digoxigenina y sintetizada mediante PCR a partir del clon *Ole 3c*, tal y como se describe en el protocolo 28.
- ⁵ El ARN es degradado por enzimas ribonucleasas, muy estables y activas. El DEPC es un inhibidor de RNasas.

PROTOCOLO 21. *Electroforesis de ADN*

PROCEDIMIENTO:

1. Preparar el gel de agarosa según se describe a continuación:
 - Añadir 0.5 gr de agarosa en 50 ml de tampón TBE 1x.
 - Fundir en el microondas y dejar enfriar unos min.
 - Añadir 1 µl de la solución de bromuro de etidio.
 - Verter la mezcla en una bandeja y dejar solidificar¹ durante 30 min.
2. Preparar las muestras² mezclando 1 vol. de ADN (10 µl de la reacción de PCR) con 1/6 vol. del tampón de muestras 6x.



3. Una vez solidificada la agarosa, retirar el peine y llenar la cubeta de electroforesis con tampón TBE 1x.
4. Cargar las muestras y correr el gel a voltaje constante (80 V) durante 1 h, en una cubeta de electroforesis "Minisub DNA Cell" (Bio-Rad, USA).³

REACTIVOS:

- ① **Tampón TBE 10x:** Tris-ClH 890 mM, pH 8.0, ácido bórico 890 mM y EDTA 20 mM.
- ② **Tampón de muestras 6x:** glicerol o Ficoll al 15 % (v/v), azul de bromofenol al 0.25 % (p/v) y xilenocianol al 0.25 % (p/v).
- ③ **Solución de bromuro de etidio**  **al 0.5 % (p/v)**

① Notas:

- ¹ Colocar el peine en el gel cuidando que no toque con el fondo de la cubeta con objeto de evitar fugas al cargar las muestras en los pocillos.
- ² Tratar los marcadores moleculares de tamaño (Ej.: λ /Hind III, MBI Fermentas, Lituania) como una muestra más.
- ³ Para visualizar el ADN en el gel, se utilizó el programa Quantity One 4.1.0, incorporado en el sistema de documentación de geles Gel.Doc 1000/2000 (Bio-Rad, USA).

PROTOCOLO 22. *Aislamiento de ADN a partir de geles de agarosa*

PRINCIPIO:

El sistema Prep-A-Gene DNA Purification (Bio-Rad, USA) se basa en la utilización de una matriz de sílice con unas propiedades de unión selectiva a ADN en función del tamaño de los fragmentos. Esta matriz presenta una gran capacidad de unión a ADN (>0,2 μ g de ADN por cada μ l de matriz en suspensión) y junto con el uso de filtros y tampones específicos permite el aislamiento rápido y eficiente de ADN a partir de geles de agarosa.

PROCEDIMIENTO:

1. Estimar la concentración del ADN que queremos aislar, comparando nuestro ADN con otro de concentración conocida (Ej.: λ /Hind III, MBI Fermentas, Lituania).



2. Cortar la banda de ADN del gel con ayuda de un escalpelo. Poner la banda de agarosa en un tubo de 1.5 ml y centrifugar durante unos seg. a 12.000 g.
3. Pesar el gel y estimar su volumen.¹
4. Calcular la cantidad de matriz de sílice necesaria² y añadir 3 vol. (gel + matriz) de la solución "DNA Purification kit binding buffer"³. Calentar a 37-55 °C durante unos min. para facilitar la disolución de la agarosa.
5. Añadir la matriz de sílice, mezclar bien e incubar durante 5-10 min. a temperatura ambiente (agitar ocasionalmente para facilitar la unión del ADN a la matriz).
6. Centrifugar a 12.000 g durante 30 seg. y eliminar el sobrenadante. Resuspender el precipitado (matriz + ADN) en un volumen de "DNA Purification kit binding buffer" equivalente a 25 veces la cantidad de matriz añadida.
7. Centrifugar como en el paso anterior y eliminar el sobrenadante. Lavar el precipitado (matriz + ADN) 2 veces en un volumen de "DNA Washing buffer" equivalente a 25 veces la cantidad de matriz utilizada.
8. Eliminar el sobrenadante, cuidando que no queden restos del mismo.⁴
9. Resuspender el precipitado (matriz + ADN) en al menos 1 vol. de "Elution buffer". Incubar durante 5 min. a 37-50 °C.
10. Centrifugar a 12.000 g durante 30 seg. y transferir el sobrenadante (ADN) a un tubo de 0.5 ml nuevo.⁵

① **Notas:**

- ¹ Asumir que 1 gr de gel equivale aproximadamente a 1 ml.
- ² Añadir 5 µl de matriz por cada µgr de ADN.
- ³ Este tampón incluye perclorato sódico, que facilita la disolución de la agarosa.
- ⁴ El etanol y una alta concentración de sales pueden inhibir determinadas enzimas.
- ⁵ En este paso de elución se recupera al menos un 85 % del ADN. Un segundo paso de elución permite recuperar un 10-15 % adicional. En este punto, el ADN está listo para su transformación, digestión mediante enzimas de restricción y secuenciación.



PROTOCOLO 23. *RT-PCR*

PROCEDIMIENTO:

ETAPA 1: TRANSCRIPCIÓN REVERSA.

1. Preparar la siguiente mezcla de reacción:

- 1-5 µgr de ARN total
- 10-50 pmol del adaptador-oligo dT¹
- H₂O-DEPC hasta un volumen final de 20 µl

2. Incubar la mezcla anterior a 70 °C durante 10 min. y enfriar en hielo durante 5 min.²

3. Añadir los siguientes componentes (se muestran las concentraciones finales):

- Tampón del enzima M-MVL RT 1x
- Mezcla de dNTPs 0.5 mM
- H₂O-DEPC hasta un volumen final de 37.5-39.5 µl

4. Centrifugar unos seg. e incubar los tubos a 37 °C durante 2 min.

5. Añadir 0.5-2.5 µl del enzima transcriptasa reversa M-MVL³ (Promega) e incubar la mezcla final durante 1 h a 37 °C en un termociclador "Progene Thermocycler" (Techne, Cambridge, UK).

ETAPA 2: AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR

6. Preparar la siguiente mezcla de reacción (se muestran las concentraciones finales para un volumen de reacción de 50 µl):

- Tampón de la polimerasa 1x
- Mezcla dNTPs 1 mM
- 25 ng del oligo específico (Ole e 1)⁴
- 25 ng del adaptador-oligo dT
- 10 µl de ADNc procedente de la reacción anterior
- H₂O destilada



7. Incubar a 94 °C durante 3 min en un termociclador "Progene Thermocycler" (Techne, Cambridge, UK) y disminuir la temperatura a 80 °C⁵. Añadir 0.5 µl unidad del enzima EcoTaq ADN polimerasa (C. Viral, España).⁶
8. Continuar con el programa de amplificación siguiente⁷:
 - 94 °C, 1 min. } 30 ciclos
 - 57 °C, 2 min. }
 - 72 °C, 1 min. }
9. Incubar las muestras a 72 °C durante 10 min. y mantener la reacción a 4 °C.
10. Analizar los productos de reacción en un gel de agarosa, tal y como se describe en el protocolo 21.
11. Purificar los productos de PCR mediante el sistema "Prep.-A-Gene DNA purification system" (Bio-Rad, USA, USA), tal y como se describe en el protocolo 22.
12. Secuenciar los productos de PCR de acuerdo al método de Sanger y col. (1977).⁸

CONTROLES: para determinar la equivalencia en la cantidad de ARN inicial de cada muestra, amplificar 10 µl de ADNc procedente de la reacción RT de cada una de dichas muestras mediante 10, 20 y 30 ciclos de PCR (con objeto de asegurar una tasa de amplificación exponencial) de 94 °C durante 1 min., 60 °C durante 1 min. y 72 °C durante 1.5 min. cada uno, utilizando 25 ng de los oligos Ubi 1 y Ubi 2.⁹

REACTIVOS:

- ① Tampón del enzima M-MLV RT (5x)
- ② Transcriptasa reversa M-MLV (Promega, USA)
- ③ Mezcla de dNTPs 10 mM
- ④ Adaptador-oligo dT 1 µM
- ⑤ Tampón de la ADN polimerasa (10x)
- ⑥ EcoTaq ADN polimerasa (C. Viral)
- ⑦ Oligo Ole e 1 sense 1 µM



⑧ **H₂O-DEPC**¹⁰ ☠ : DEPC al 0.1 % (v/v) en H₂O destilada. Autoclavar para eliminar el DEPC.

① **Notas:**

- ¹ Añadir 10 μ mol de adaptador-oligo dT (5'-GACTCGAGTCGACATCGA(T)₁₇-3') por cada μ gr de ARN total.
- ² El tratamiento a 70 °C elimina las posibles estructuras secundarias en el ARNm.
- ³ Añadir 100 unidades (U) del enzima por cada μ gr de ARN total. El enzima M-MLV RT se suministra a una concentración de 200 U/ μ l. Se define la unidad como la cantidad de enzima que incorpora 1 nanomol de dNTPs en forma de ácido insoluble después de una incubación durante 10 min. a 37 °C, utilizando poli (rA)-oligo (dT)₅₀ como cebador.
- ⁴ El oligo *Ole e 1* sense (5'-ACCTCCAGTTTCTCAATTTTCAC-3') fue diseñado en base a la secuencia del clon 3c (Villalba y col. 1994). El oligo fue sintetizado en el Servicio de Síntesis de Oligonucleótidos del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra (CSIC, Granada) mediante un Oligo 1000 DNA Synthesizer (Beckman).
- ⁵ Protocolo de amplificación "Hot Start".
- ⁶ El enzima EcoTaq ADN polimerasa se suministra a una concentración de 5 U/ μ l. Se define la unidad como la cantidad de enzima que incorpora 10 nanomoles de dNTPs en forma de ácido insoluble después de una incubación durante 30 min. a 72 °C.
- ⁷ La temperatura y el tiempo de "annealing" deben ser determinados empíricamente.
- ⁸ Los oligos Ubi 1 (5'-ATGCAGAT(C/T)TTTGTGAAGAC-3') y Ubi 2 (5'-ACCACCACG(G/A)AGACGG-AG-3') fueron diseñados para amplificar el gen de la ubiquitina (Watts y Moore, 1989), una proteína muy conservada que se expresa de forma constitutiva. Los oligos fueron sintetizados en el Servicio de Síntesis de Oligonucleótidos del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra (CSIC, Granada) mediante un Oligo 1000 DNA Synthesizer (Beckman)
- ⁹ La secuenciación fue realizada por el Servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra (CSIC, Granada), utilizando para ello un equipo ABI 373 XL Stretch acoplado a un termociclador PE 9600 (PE Biosystems), y el kit de secuenciación "ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" (PE Biosystems).
- ¹⁰ El ARN es degradado por enzimas ribonucleasas, muy estables y activas. El DEPC es un inhibidor de RNasas.

PROTOCOLO 24. *Inclusión en parafina para microscopía óptica*

PROCEDIMIENTO:

ETAPA 1: TRATAMIENTO DE LOS PORTAOBJETOS CON EL ADHESIVO APES

1. Tratar los portaobjetos con mezcla sulfocrómica durante 1 noche.
2. Lavar los portaobjetos con H₂O destilada x3. Dar un cambio con H₂O bidestilada y secar los portas a 40 °C en una estufa.



3. Tratar los portas con una solución del adhesivo APES durante 5 min.
4. Lavar con acetona durante 2 min. x 2 y con H₂O bidestilada durante 2 min. x 2.
5. Dejar secar temperatura ambiente. Numerar los portaobjetos.

ETAPA 2: FIJACIÓN

6. Preparar el fijador.
7. En un recipiente de plástico adecuado, añadir unos ml de fijador sobre el material que queremos fijar y dejar en hielo durante 30 min.
8. Extraer el aire del material en fijador en una campana de vacío durante 10-15 min. a 4 °C. ¹
9. Hacer un cambio de fijador y dejar las muestras fijando toda la noche a 4 °C.

ETAPA 3: DESHIDRATACIÓN

10. Lavar en tampón cacodilato 0.1 M, pH 7.2, durante 15 min. x 3.

11. Deshidratar las muestras mediante cambios sucesivos en:

- Etanol al 30 % durante 1.5 h, a 4 °C.
- Etanol al 50 % durante 1.5 h, a 4 °C.
- Etanol² al 70 % durante 1 día, a 4 °C.
- Etanol al 90 % durante 1.5 h, a 4 °C.
- Etanol al 100 % durante 12 h, a 4 °C.
- Etanol al 100 % durante 1 h, a temperatura ambiente.
- Xileno durante 5 min., a temperatura ambiente.

ETAPA 4: INFILTRACIÓN EN PARAFINA

12. Poner en una estufa un vaso de precipitado con parafina (lentejas), un matraz con xileno y otro vaso con las muestras, a 58 °C.
13. Mezclar la parafina y el xileno (1:1) con las muestras y dejar 3 días a 58 °C.
14. Realizar 3 cambios³ de parafina de 3 días cada uno. Tras el último cambio, dejar solidificar la parafina a temperatura ambiente.

**ETAPA 5: MICROTOMÍA**

15. Fijar en un portamuestras el bloque de parafina que contiene la pieza que queremos cortar.
16. Tallar una pirámide alrededor de la pieza y fijar el portamuestras con la pieza en el brazo del microtomo (Fuji Optical Works LTD, Japón).
17. Limpiar (mediante un disolvente orgánico, por ejemplo xileno), montar y alinear la cuchilla en el brazo móvil del microtomo.
18. Realizar las secciones (1-3 μm de grosor), que se colocan sobre una gota de H_2O DEPC en portas previamente tratados con APES. Secar los portas a 37 °C en una estufa, de forma que las secciones queden perfectamente estiradas y sin superponerse unas con otras.
19. Teñir las secciones (Protocolo 28), o bien continuar con la hibridación *in situ* (Protocolo 30).

REACTIVOS:

- ① **Mezcla sulfocrómica**  : mezclar (1:1) ácido sulfúrico concentrado y una solución saturada de dicromato potásico (20 gr de dicromato potásico en 80 ml de ácido sulfúrico y 20 ml de H_2O destilada).
- ② **Ácido sulfúrico**
- ③ **Solución del adhesivo APES al 3 % (v/v) en acetona**
- ④ **Tampón cacodilato sódico**  **0.2 M, pH 7.2**
- ⑤ **Paraformaldehído**  **y solución comercial de glutaraldehído**  **al 25 % (v/v)**
- ⑥ **Fijador [paraformaldehído al 4 % (p/v) y glutaraldehído al 0.2 % (v/v) en tampón cacodilato al 0.1 % (p/v)]:**
 - Pesar 1 gr de paraformaldehído.
 - Disolver el paraformaldehído en 12.5 ml de tampón cacodilato sódico 0.2 M, pH 7.2. Adicionar hidróxido sódico 10 M gota a gota para facilitar la disolución.
 - Dejar enfriar unos min. en hielo y añadir 0.2 ml de la solución de glutaraldehído.
 - Ajustar el pH a 7.2 con NaOH 1 M y añadir H_2O destilada hasta un volumen final de 25 ml.

**7 Parafina (lentejas)****8 Xileno****9 Etanol al 30 % (v/v), 50 %, 70 %, 90 % y 100 %****10 H₂O-DEPC⁴  : DEPC al 0.1 % (v/v) en H₂O destilada. Autoclavar para eliminar el DEPC.****11 Notas:**

¹ Facilita la entrada del fijador en los tejidos y evita que las muestras floten.

² Podemos transportar las muestras o almacenarlas a 4 °C y en etanol al 70 % durante largos periodos de tiempo.

³ El número de cambios en parafina y el tiempo de infiltración dependerá de las características del tejido que estemos procesando. Así por ejemplo, si existen barreras que impiden la entrada de la parafina en los tejidos, habrá que prolongar el tiempo de infiltración y realizar un mayor número de cambios. Las condiciones indicadas son las idóneas para el material utilizado en este trabajo.

⁴ El ARN es degradado por enzimas ribonucleasas, muy estables y activas. El DEPC es un inhibidor de RNasas.

PROTOCOLO 25. *Procesamiento convencional de muestras para MET*

PROCEDIMIENTO:**ETAPA 1: FIJACIÓN**

1. Fijar las muestras durante 6 h, a 4 °C. Durante este tiempo, desgasificar¹ las muestras durante 15 min. x 3.
2. Hacer un cambio de fijador y dejar fijando toda la noche a 4 °C.
3. Lavar en tampón cacodilato 0.1 M, pH 7.2, durante 30 min. x 3, a 4 °C.

ETAPA 2: DESHIDRATACIÓN

4. Deshidratar las muestras mediante cambios sucesivos en:

- Etanol al 30 % durante 1 h, a 4 °C.
- Etanol al 50 % durante 1 h, a 4 °C.
- Etanol al 70 %² durante 1 día, a -20 °C.
- Etanol al 90 % durante 6 h, a -20 °C.



- Etanol 100 % durante 2 días x 2, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

ETAPA 3: INFILTRACIÓN EN UNICRYL³

5. Infiltrar las muestras mediante cambios sucesivos en:

- Etanol 100 % + Unicryl (1:1) durante 2 días x 2, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Unicryl durante 1 semana a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Unicryl durante 1 día a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6. Poner el material infiltrado en resina en el fondo de cápsulas de gelatina y polimerizar con luz UV durante 2-3 días, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.⁴

ETAPA 4: MICROTOMÍA

7. Fijar en un portamuestras el bloque de resina que contiene la muestra que queremos cortar.
8. Tallar bajo la lupa una pirámide alrededor de la pieza y fijar en el brazo de un ultramicrotomo "ULTRACUT E" (Reichert-Jung, Alemania) el portamuestras con la pieza.
9. Montar y alinear la cuchilla respecto a la muestra. Aproximar manualmente la pieza a la cuchilla de vidrio con pasos de 1-3 μm , hasta que se produzca el primer corte.
10. Obtener secciones ultrafinas (70 nm de grosor) que se colocan sobre una rejilla de níquel de 200 agujeros, recubierta con una fina película de Formvar al 0.3 % (p/v) en cloroformo para facilitar la adhesión de dichos cortes. Secar las rejillas a temperatura ambiente.

REACTIVOS:

- ① **Tampón cacodilato sódico** ☠ 0.2 M, pH 7.2
- ② **Paraformaldehído** ☠ y **solución comercial de glutaraldehído** ☠ al 25 % (v/v)
- ③ **Fijador [paraformaldehído al 4 % (p/v) y glutaraldehído al 0.2 % (v/v)]:**
 - Pesar 1 gr de paraformaldehído.
 - Disolver el paraformaldehído en 12.5 ml de tampón cacodilato sódico 0.2 M, pH 7.2. Adicionar hidróxido sódico 10 M gota a gota para facilitar la disolución.
 - Dejar enfriar unos min. en hielo y añadir 0.2 ml de la solución de glutaraldehído.



- Ajustar el pH hasta 7.2 con NaOH 1 M y añadir H₂O destilada hasta un volumen final de 25 ml.

④ Etanol al 30 % (v/v), 50 %, 70 %, 90% y 100 %

⑤ Resina Unicryl  (BioCell International, UK)

① Notas:

- ¹ Para facilitar la penetración del fijador en los tejidos y evitar que las muestras floten.
- ² Podemos almacenar las muestras en etanol al 70 % a 4 °C durante largos periodos de tiempo.
- ³ El número de cambios en resina y el tiempo de inclusión dependerá de las características del tejido que estemos procesando. Así por ejemplo, si existen barreras que impiden la entrada de la resina en los tejidos, habrá que prolongar el tiempo de inclusión y realizar un mayor número de cambios. Las condiciones indicadas son las idóneas para el material utilizado en este trabajo.
- ⁴ Alternativamente, podemos polimerizar la resina Unicryl a 60 °C durante 2-3 días, aunque no es recomendable para HIS y para la inmunolocalización de proteínas termosensibles.

PROTOCOLO 26. *Procesamiento de muestras para MET mediante criotécnicas*

PROCEDIMIENTO:

ETAPA 1: CRIOFIJACIÓN

1. Fijar las muestras mediante inmersión en propano líquido a -180 °C en una unidad KF80 (Reichert-Jung).

ETAPA 2: CRIOSUBSTITUCIÓN

2. Eliminar el H₂O de las muestras, en una unidad FSU 010 (Balzers), mediante cambios sucesivos en:
 - Acetona¹ pura durante 8 h, a -90 °C.
 - Acetona pura durante 8 h, a -60 °C.
 - Acetona pura durante 8 h, a -30 °C.
 - Acetona pura a -20 °C.

ETAPA 3: INFILTRACIÓN EN UNICRYL

3. Infiltrar las muestras mediante cambios sucesivos en:



- Acetona pura + Unicryl (3:1) durante 20 días, a -20 °C.
- Acetona pura + Unicryl (1:1) durante 20 días, a -20 °C.
- Acetona pura + Unicryl (1:3) durante 20 días, a -20 °C.
- Unicryl durante 20 días, a -20 °C.

4. Poner el material en el fondo de cápsulas de gelatina, añadir resina nueva y polimerizar con luz UV durante 2-3 días, a -20 °C.²

ETAPA 4: MICROTOMÍA

Ver detalles en el protocolo 25.

REACTIVOS:

- ① Propano líquido
- ② Acetona pura
- ③ Resina Unicryl  (BioCell International, UK)

④ Notas:

- ¹ Utilizamos acetona como agente deshidratante porque: a) su punto de congelación permite trabajar a temperaturas muy bajas, b) su poder disolvente es mayor que el del metanol (el otro disolvente comúnmente utilizado), y c) es miscible con la mayoría de los medios de inclusión.
- ² Alternativamente, podemos polimerizar la resina Unicryl a 60 °C durante 2-3 días, aunque no es recomendable para HIS y para la inmunolocalización de proteínas termosensibles.

PROTOCOLO 27. *Inmunolocalización de proteínas alergénicas*

PROCEDIMIENTO:

ETAPA 1: INMUNOCITOQUÍMICA

1. Lavar las rejillas con las muestras en PBS 1x durante 5 min.
2. Bloquear los sitios de unión inespecíficos durante 15 min. incubando las rejillas en una solución de bloqueo.
3. Incubar las secciones con el anticuerpo primario específico (ver tabla), diluido en solución de bloqueo:



TABLA 2.4

ANTICUERPO PRIMARIO ¹	DILUCIÓN	TIEMPO	MATERIAL
Anticuerpo monoclonal anti-Ole e 1	1:10	1h	Secciones semifinas de anteras de olivo en el estadio de microspora vacuolada (variedad Picual)
Anticuerpo monoclonal anti-Ole e 1	1:10	1h	Secciones ultrafinas de polen maduro de olivo (variedad Picual)
Anticuerpo monoclonal anti-Ole e 1	Puro	12h	Secciones ultrafinas de polen maduro de olivo (variedades Picual, Arbequina, Frantoio y Gordal)
Anticuerpo monoclonal anti-Ole e 1	Puro	12 h	Secciones ultrafinas de polen maduro de <i>Plantago lanceolata</i>
Anticuerpo monoclonal anti-Pla I 1	Puro	12h	Secciones ultrafinas de polen maduro de olivo (variedad Picual)

4. Lavar las rejillas en solución de bloqueo durante 5 min. x 3.
5. Incubar las secciones con un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón (dilución 1:50) conjugado con oro de 20 nm, durante 2 h.
6. Lavar las rejillas en PBS 1x durante 5 min. x 3, y en H₂O bidestilada durante 5 min. x 3.
7. Secar las rejillas a temperatura ambiente.

ETAPA 2: A) VISUALIZACIÓN PARA MICROSCOPIA ÓPTICA

8. Amplificar la señal de marcado mediante plata ("Silver Enhancement Kit", BioCell International, UK). Visualizar los resultados en microscopio óptico Axioplan (Zeiss) que presenta una óptica de campo oscuro.

B) CONTRASTADO PARA MET

9. Teñir los cortes con una solución de acetato de uranilo durante 30 min. y en oscuridad.²



10. Colocar las rejillas con los cortes en una solución de citrato de plomo en medio alcalino³ durante 5 min.
11. Lavar las rejillas en H₂O bidestilada. Dejar secar a temperatura ambiente.
12. Observar los resultados en un microscopio electrónico de transmisión EM10C (Zeiss).

CONTROLES NEGATIVOS: omitir la incubación con el anticuerpo primario.

REACTIVOS:

- ① **Tampón PBS 10x:** cloruro sódico 1.3 mM, cloruro potásico 30 mM, fosfato disódico 80 mM y fosfato potásico 15 mM, pH a 7.4.
- ② **Solución de bloqueo:** BSA al 2 % (p/v) y suero de cabra al 1 % en PBS 1x.
- ③ **Solución de acetato de uranilo al 5 % (p/v):** filtrar, y almacenar la solución en oscuridad a 4 °C. Centrifugar durante 2 min. a 12.000 g antes de usar.
- ④ **Solución de citrato de plomo:**
 - Mezclar 1.33 gr de nitrato de plomo y 1.67 gr de citrato trisódico y agitar durante 1 min.
 - Dejar reposar durante 30 min.
 - Añadir 8 ml de hidróxido sódico 1 M y completar con H₂O bidestilada hasta 50 ml.

① **Notas:**

¹ El anticuerpo monoclonal anti-Ole e 1 fue cedido por el Dr. Carlos Lahoz (Fundación Jiménez Díaz, Madrid) y el anticuerpo monoclonal 2A10, desarrollado frente al alérgeno Pla 1 1 del polen de *Plantago lanceolata*, por el Dr. Florentino Polo (ALK-Abelló S.A., Madrid).

² La luz provoca la formación de cristales de acetato de uranilo.

³ Tinción según Reynold (1963). El citrato de plomo puede precipitar con el CO₂ del aire. Para evitarlo, se colocan las rejillas en el interior de una placa Petri cerrada, protegido con lentes de hidróxido sódico.

PROTOCOLO 28. *Tinción de secciones de anteras de olivo mediante el uso de colorantes inespecíficos*

PROCEDIMIENTO:

1. Colocar el portaobjetos con las secciones sobre una placa térmica a 40 °C y añadir una gota de la solución colorante.



2. Dejar durante 30 seg. y eliminar el exceso de colorante con H₂O bidestilada.
3. Secar las preparaciones a temperatura ambiente y observar los resultados en un microscopio óptico Axioplan (Zeiss).

REACTIVOS:

1. **Solución de colorante:** azul de metileno al 0.5 % (p/v), azul de toluidina al 0.5 % y bórax al 1 % (p/v). Filtrar la solución antes de usar.

PROTOCOLO 29. *Síntesis de sonda Ole e 1 mediante PCR*¹

PROCEDIMIENTO:

1. Preparar la siguiente mezcla de reacción (volumen final de reacción = 100 µl):
 - Tampón de la polimerasa 1x
 - Mezcla dNTPs 1x
 - Oligo T7 0.1 µM
 - Oligo SP6 0.1 µM
 - 0.1-1 µgr del clon de ADNc Ole 3c:438 pb
 - H₂O destilada hasta un volumen de 99 µl
2. Incubar las muestras a 94 °C durante 3 min. en un termociclador "Progene Thermocycler" (Techne, Cambridge, UK) y disminuir la temperatura a 80 °C.²
3. Añadir 1 µl del enzima EcoTaq ADN polimerasa³ (C. Viral) y continuar con el programa de amplificación siguiente:
 - 94 °C, 1 min. } 35 ciclos
 - 47 °C, 1 min. }
 - 72 °C, 1 min. }
4. Incubar las muestras a 72 °C durante 10 min. adicionales y mantener la reacción a 4°C.
5. Precipitar el fragmento amplificado con etanol absoluto.⁴
6. Cuantificar la sonda y determinar su pureza.⁵

**REACTIVOS:**

- ① **Tampón de la ADN polimerasa (10x)**
- ② **EcoTaq ADN polimerasa (C. viral)**
- ③ **Mezcla de dNTPs 10x:** DIG-11-dUTP 70 μ M, dTTP 130 μ M, dATP 200 μ M, dCTP 200 μ M y dGTP 200 μ M.
- ④ **Oligo T7 1 μ M**
- ⑤ **Oligo SP6 1 μ M**
- ⑥ **Minipreps del clon de ADNc Ole 3c:438 pb**
- ⑦ **Etanol absoluto**

① Notas:

¹ La síntesis de sonda Ole e 1 se llevó a cabo mediante PCR (Fig. 2.5) partir del clon de ADNc 3c:438 pb (cedido por la Dra. Rosalía Rodríguez, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Complutense, Madrid), insertado en el plásmido pGEM-4Z (Promega, USA). Para ello se utilizaron los oligos T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') y SP6 (5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3'), y DIG-11-dUTP (Boehringer-Mannheim, Alemania) en la mezcla de reacción, de acuerdo a Leitch y col. (1994).

² Protocolo "Hot Start".

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

⁴ De acuerdo a procedimientos estándar (Sambrook y col., 1989).

⁵ Ver protocolo 18.

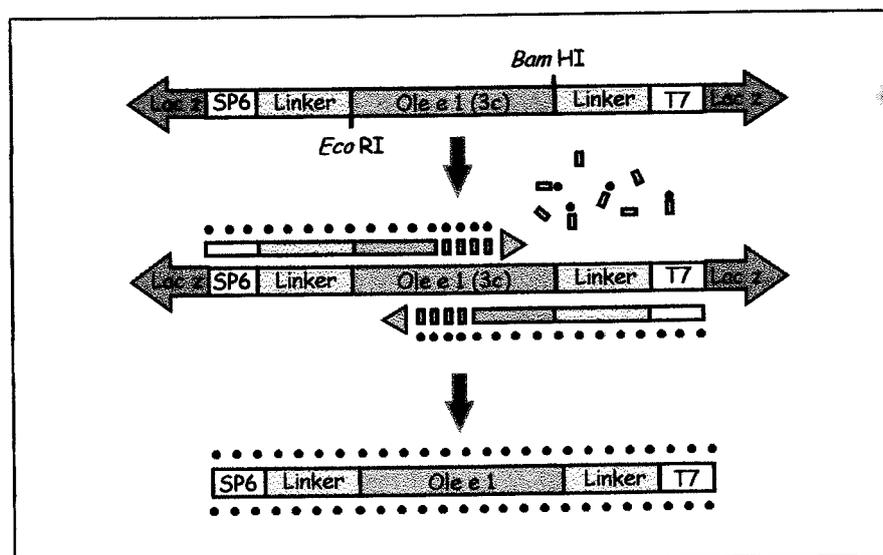


FIGURA 2.5. Síntesis de sonda Ole e 1 marcada con digoxigenina, mediante PCR.



PROTOCOLO 30. *Hibridación in situ a microscopía óptica*

PROCEDIMIENTO:

1. Precalentar 200 ml de tampón de la proteinasa K a 37 °C durante unas horas. Añadir 200 µl de una solución de proteinasa K a una concentración de 1 mgr/ml (Promega, USA) al tampón (concentración final= 1 µgr/ml).
2. Desparafinar las muestras mediante el siguiente tratamiento: xilol (1 min.), etanol al 100 % (v/v) (2 min.), etanol al 90 % (v/v), 70 %, 50 %, 30 % y 10 % (1 min. en cada solución) y H₂O-DEPC (1 min. x 3).
3. Incubar las muestras en la solución de proteinasa K durante 30 min., en agitación.¹
4. Lavar los portaobjetos con H₂O-DEPC durante 1 min. x 3, para detener la reacción.
5. Incubar las muestras en una solución de TEA durante 10 min., a temperatura ambiente. Añadir 500 µl de anhídrido acético² puro y dejar otros 10 min., en agitación.
6. Rehidratar las muestras mediante sucesivos cambios en: etanol al 10 % (v/v), 30 %, 50 %, 70 %, 90 % (1 min. en cada solución) y 100 % (2 min.).
7. Secar los portas a temperatura ambiente y preparar las soluciones A y B.
8. Desnaturalizar la sonda³ (solución A) a 95 °C durante 5 min. y enfriar en hielo durante unos min.⁴ Precalentar la solución B a 37° C y, finalmente, mezclar las soluciones A y B, en proporción 1:9.
9. Aplicar la mezcla A + B sobre las muestras (aproximadamente 60 µl por muestra), cubrir con un cubreobjetos e incubar a 42 °C durante toda la noche.⁵
10. Lavar los portas en:
 - SSC 4x durante 10 min. x 4, a la temperatura de hibridación.
 - SSC 2x durante 15 min. x 2, a temperatura ambiente.
11. Incubar las muestras con una solución de bloqueo durante 2 h. Lavar los portas con PBS-Tween 20 al 0.1 % durante 1 min.



12. Incubar con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Boehringer-Mannheim, Alemania) en solución de bloqueo (dilución 1:10.000) a temperatura ambiente.
13. Lavar los portas con PBS-Tween 20 al 0.1 % durante 5 min. x 2 y en tampón de detección durante 5 min. x 2, a temperatura ambiente.
14. Detectar la señal utilizando NBT/BCIP (Amresco, USA) como sustrato del enzima. Para ello, poner una gota sobre la muestra, cubrir con un cubreobjetos y dejar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16 h.
15. Lavar los portas en H₂O destilada durante 5 min. Montar las preparaciones con DePX y observarlas en un microscopio óptico Axioplan (Zeiss).

CONTROLES NEGATIVOS: omitir la sonda en la solución de hibridación y/o el anticuerpo anti-digoxigenina.

REACTIVOS:

- ① **Tampón de la proteinasa K:** Tris-ClH 0.1 M, pH 7.5, y EDTA 50 mM, en H₂O-DEPC.
- ② **TEA 0.1 M, pH 8.0**
- ③ **Anhídrido acético**
- ④ **Solución A:** DTT 60 mM y 5 ng/μl de sonda ADN marcada.
- ⑤ **Solución B:** formamida  al 50 %, NaCl 300 mM, Tris-ClH 10 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM, Ficoll al 0.02 % (p/v), PVP al 0.02 % (p/v), BSA al 0.02 %, sulfato de dextrano al 10 % (p/v) y DTT 60 mM.
- ⑥ **SSC 20x:** cloruro sódico 3 M y citrato sódico 0.3 M, pH 7.0.
- ⑦ **Solución de bloqueo:** BSA al 3 % (p/v) en tampón PBS-Tween 20 al 0.1 % (v/v).
- ⑧ **Tampón PBS 10x:** cloruro sódico 1.3 mM, cloruro potásico 30 mM, fosfato disódico 80 mM y fosfato potásico 15 mM, pH a 7.4.
- ⑨ **Tampón de detección:** Tris-ClH 100 mM, pH 9.5, cloruro sódico 100 mM, cloruro de magnesio 5 mM y levasimol⁶ 1 mM.
- ⑩ **H₂O-DEPC⁷**  : DEPC al 0.1 % (v/v) en H₂O destilada. Autoclavar para eliminar el DEPC.

**① Notas:**

- ¹ Permeabilización: la proteinasa K digiere las proteínas unidas a los ácidos nucleicos, haciéndolos más accesibles a la sonda.
- ² Acetilación: el anhídrido acético neutraliza moléculas cargadas positivamente, reduciendo la unión no específica de la sonda.
- ³ La síntesis de sonda Ole e 1 se llevó a cabo mediante PCR (Protocolo 28) partir del clon de ADNc 3c:438 pb (Villalba y col., 1994), insertado en el plásmido pGEM-4Z (Promega, USA). Para ello se utilizaron los oligos T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') y SP6 (5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3'), y DIG-11-dUTP (Boehringer-Mannheim, Alemania) en la mezcla de reacción, de acuerdo a Leitch y col. (1994).
- ⁴ Para evitar que las dos cadenas de ADN vuelvan a unirse.
- ⁵ La hibridación ha de llevarse a cabo en una cámara húmeda sellada, para evitar que las preparaciones se sequen, y en oscuridad, debido a que la luz incrementa el grado de ionización de la formamida.
- ⁶ El levasimol es un inhibidor de fosfatasa endógenas, presentes en la mayoría de los tejidos, que podrían dar lugar a falsos positivos.
- ⁷ El ARN es degradado por enzimas ribonucleasas, muy estables y activas. El DEPC es un inhibidor de RNAsas.

PROTOCOLO 31. RT-PCR-IS

PROCEDIMIENTO:**ETAPA 1: TRANSCRIPCIÓN REVERSA**

1. Incubar las muestras (secciones ultrafinas sobre rejillas de níquel) en una solución de proteinasa K¹ (Promega, USA) durante 15 min. a 37 °C.
2. Lavar las rejillas con solución de parada durante 5 min. A continuación, lavar en PBS durante 5 min. x 3.
3. Transferir² las rejillas a tubos de PCR de 0.5 ml, cada uno de los cuales contiene un adaptador-oligo dT (5'-GACTCGAGTCGACATCGA(T)₁₇-3') en H₂O-DEPC, a una concentración final de 40 ngr/l.
4. Incubar a 70 °C durante 10 min.³
5. Añadir la solución de dNTPs a una concentración final de 0.5 mM, el tampón de reacción 5x, 2.5 µl del enzima transcriptasa reversa M-MLV⁴ (Promega, USA) y H₂O-DEPC hasta un volumen final de 100 µl.
6. Incubar durante 10 min. a temperatura ambiente y durante 2 h a 42 °C en un termociclador "Progene Thermocycler" (Techne, Cambridge, UK).
7. Incubar a 70 °C durante 15 min. y enfriar en hielo durante 1 min.



ETAPA 2: AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR

8. Transferir las rejillas a tubos nuevos de PCR de 0.5 ml, cada uno de los cuales contiene 100 µl de tampón PCR 1x, solución de dNTPs 1x, 25 ng de cada cebador (Ole e 1⁵ sense y oligo dT), 1 µl de EcoTaq ADN polimerasa (C. Viral) y H₂O bidestilada hasta un volumen final de 100 µl.

9. Continuar con el programa de amplificación siguiente:

- 94 °C, 1 min. } 20 ciclos
- 57 °C, 2 min.⁶ }
- 72 °C, 1 min. }

10. Incubar las rejillas a 72 °C durante 10 min. y mantener la reacción a 4 °C.

ETAPA 3: INMUNODETECCIÓN

11. Lavar las rejillas en SSC 0.1x, a 45 °C durante 20 min. x 2.

12. Incubar las rejillas en solución de bloqueo durante 3 h, a temperatura ambiente.

13. Incubar las secciones en una solución del anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con partículas de oro de 10 nm, diluido 1:50 en solución de bloqueo, durante 1 h y a temperatura ambiente.

14. Lavar las rejillas en tampón PBS durante 5 min. x 3 y en H₂O bidestilada durante 5 min. x 3.

15. Teñir las secciones con una solución de acetato de uranilo durante 10 min.

16. Observar los resultados en un microscopio electrónico de transmisión EM10C (Zeiss).

CONTROLES NEGATIVOS: omitir la reacción de transcripción reversa y/o el cebador Ole e 1 de la reacción de PCR.

REACTIVOS:

- ① **Solución de proteinasa K:** proteinasa K a una concentración de 10 µgr/ml en Tris-ClH 0.1 M, pH 7.5, EDTA 50 mM y H₂O-DEPC.
- ② **Tampón del enzima RT (5x) + Transcriptasa reversa M-MLV (Promega, USA)**



- ③ **Mezcla de dNTPs 10 mM y mezcla de dNTPs marcados 10x** [1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 1 mM dATP, 0,75 mM dTTP y 0,25 mM dig-11-dUTP (Boehringer-Mannheim, Alemania)].
- ④ **Adaptador-oligo dT 1 μ M y Oligo Ole e 1 1 μ M**
- ⑤ **Tampón de la ADN polimerasa (10x) + EcoTaq ADN polimerasa (C. Viral)**
- ⑥ **Solución de parado:** glicina 0.1 M en tampón PBS 1x.
- ⑦ **Solución de bloqueo:** BSA al 3 % (p/v) en tampón PBS 1x.
- ⑧ **Acetato de uranilo al 5 % (p/v)**
- ⑨ **Soluciones de lavado:** SSC 20x (cloruro sódico 3 M y citrato sódico 0.3 M, pH 7.0) y PBS 10x (cloruro sódico 1.3 mM, cloruro potásico 30 mM, fosfato disódico 80 mM y fosfato potásico 15 mM, pH 7.4).
- ⑩ **H₂O-DEPC⁶ ** : DEPC al 0.1 % (v/v) en H₂O destilada. Autoclavar para eliminar el DEPC.

⑪ **Notas:**

- ¹ El pretratamiento con proteinasa K se lleva a cabo mediante flotación de las rejillas en el tampón correspondiente, de forma que las secciones se sitúen en contacto con el mismo. El enzima digiere las proteínas unidas a los ácidos nucleicos, haciéndolos más accesibles.
- ² Al manipular las rejillas, evitar tocar las secciones con las pinzas.
- ³ El tratamiento a 70 °C elimina las posibles estructuras secundarias en el ARNm.
- ⁴ Añadir 100 unidades (U) del enzima por cada μ gr de ARN total. El enzima M-MLV RT se suministra a una concentración de 200 U/ μ l. Se define la unidad como la cantidad de enzima que incorpora 1 nanomol de dNTPs en forma de ácido insoluble después de una incubación durante 10 min. a 37 °C, utilizando poli (rA)-oligo (dT)₅₀ como cebador.
- ⁵ El oligo Ole e 1 sense (5'-ACCTCCAGTTTCTCAATTTTCAC-3') fue diseñado en base a la secuencia⁵ del clon 3c (Villalba y col. 1994).
- ⁶ La temperatura y el tiempo de "annealing" deben ser determinados empíricamente.
- ⁷ El ARN es degradado por enzimas ribonucleasas, muy estables y activas. El DEPC es un inhibidor de RNasas.

PROTOCOLO 32. *Pruebas SPT (Skin Prick Test)*

PROCEDIMIENTO:

1. Se llevó a cabo una serie de ensayos SPT en 30 pacientes atópicos al polen de olivo¹. Para ello se utilizaron extractos proteicos de polen de olivo



correspondientes a 10 cultivares diferentes (Picual, Picudo, Lechín de Granada, Arbequina, Frantoio, Gordal Sevillana, Lucio, Loaime, Hojiblanca y Manzanilla de Sevilla), preparados tal y como se describe en el protocolo 3. Estos extractos fueron diluidos en una solución salina a una concentración final de 1 µgr/ml en todos los casos y aplicados por vía cutánea.

2. Transcurridos 20 min. desde la inoculación, se delimitó la zona afectada por el eritema correspondiente a cada uno de los ensayos y en cada uno de los pacientes tratados. Finalmente, se calculó el área de reacción (mm²) correspondiente a cada uno de los ensayos y de cada paciente mediante el programa de análisis de imagen "Scan Pro 5.0" (Sigma, USA).
3. Los datos obtenidos (Anexo 2) fueron procesados estadísticamente, tal y como se describe en el apartado 2.3.

CONTROLES: Para cada paciente se llevó a cabo un control negativo (tampón salino) y dos controles positivos: histamina hidroclicida (dilución 1:1000), y un extracto proteico de polen de olivo de origen comercial ("Kit Bencard para SPT y escarificación", BAYERN, Alemania).

REACTIVOS:

- ① **Tampón de extracción:** Tris-CIH 10 mM, pH 8.0. Guardar a 4 °C.
- ② **Tampón salino:** cloruro sódico al 0.9 % (p/v) y glicerol al 50 % (v/v) en H₂O destilada.
- ③ **Extracto comercial:** extracto proteico de polen de olivo en cloruro sódico al 6 % (p/v), fenol al 0.5 % (v/v) y glicerol al 50 % (v/v).

① **Notas:**

- ¹ Todos los pacientes atópicos mostraban alergia preferente al olivo y en una medida similar. En todos los casos en los que los pacientes se encontraban bajo tratamiento con fármacos antihistamínicos, dicho tratamiento se suspendió al menos 48 h antes de efectuarse la prueba. Estos experimentos se realizaron bajo la supervisión del Dr. Víctor Alché Ramírez (Hospital Clínico de Baza, Granada).

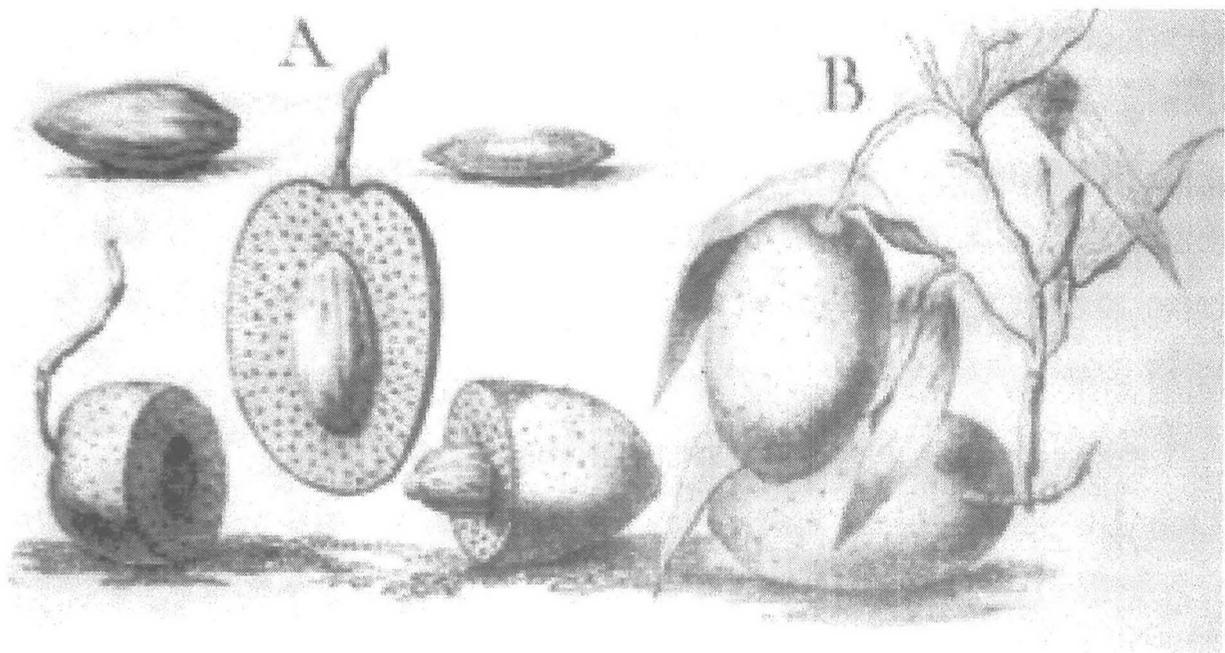
2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en el presente trabajo se llevó a cabo mediante el programa Statistica 5.1 para Windows. Los gráficos que se presentan en el apartado de resultados fueron realizados con el programa Statistica 5.1 para Windows, o bien en la hoja de cálculo Microsoft Excel 97 para Windows.



Además de la estadística descriptiva [número de observaciones (N), media y error estándar (EE)], se utilizaron los tests estadísticos siguientes: test de normalidad de Shapiro-Wilks, análisis de la varianza (ANOVA) de Friedman y análisis de correlación de Spearman.

Resultados

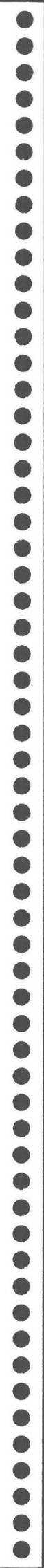


Capítulo tercero

1944

1944

1944



Capítulo Tercero

Resultados

"I don't mind you thinking slowly: I mind you publishing faster than you think"

Wolfgang Pauli (1900-1958)

3.1. ESTUDIO MORFOMÉTRICO DE LA FLOR DE OLIVO DURANTE SU DESARROLLO

Con objeto de poder determinar con cierta precisión las diferentes etapas de la ontogenia y el desarrollo del grano de polen de olivo dentro de la antera, se llevó a cabo un estudio morfométrico de la flor a lo largo del periodo de floración en dicha especie (Fig. 3.1), siguiendo para ello el protocolo que se describe con detalle en el capítulo anterior.

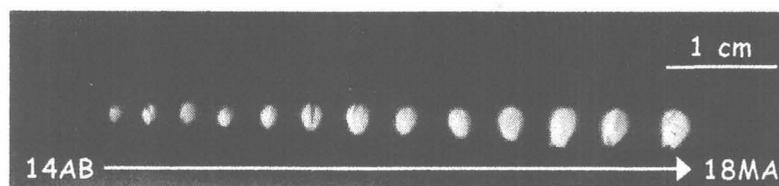
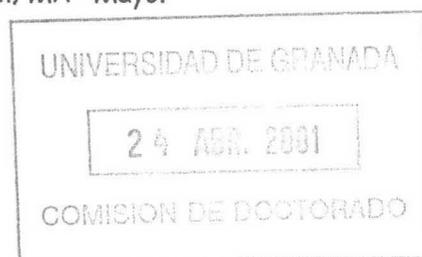


FIGURA 3.1. Primordios florales de olivo en distintos estadios de desarrollo de la antera. AB= Abril; MA= Mayo.





La figura 3.2A muestra los resultados de las mediciones efectuadas en aquellos caracteres morfométricos analizados. Se observa que, durante el desarrollo del polen dentro de la antera, existe un incremento gradual de la longitud y anchura media del primordio floral, estando ambos parámetros correlacionados positivamente [r (coeficiente de correlación)= 0.993; E.E. $_r$ = 0.025; B (coeficiente de regresión)= 1.322; E.E. $_B$ = 0.034; p = 0.000], tal y como se observa en la figura 3.2B.

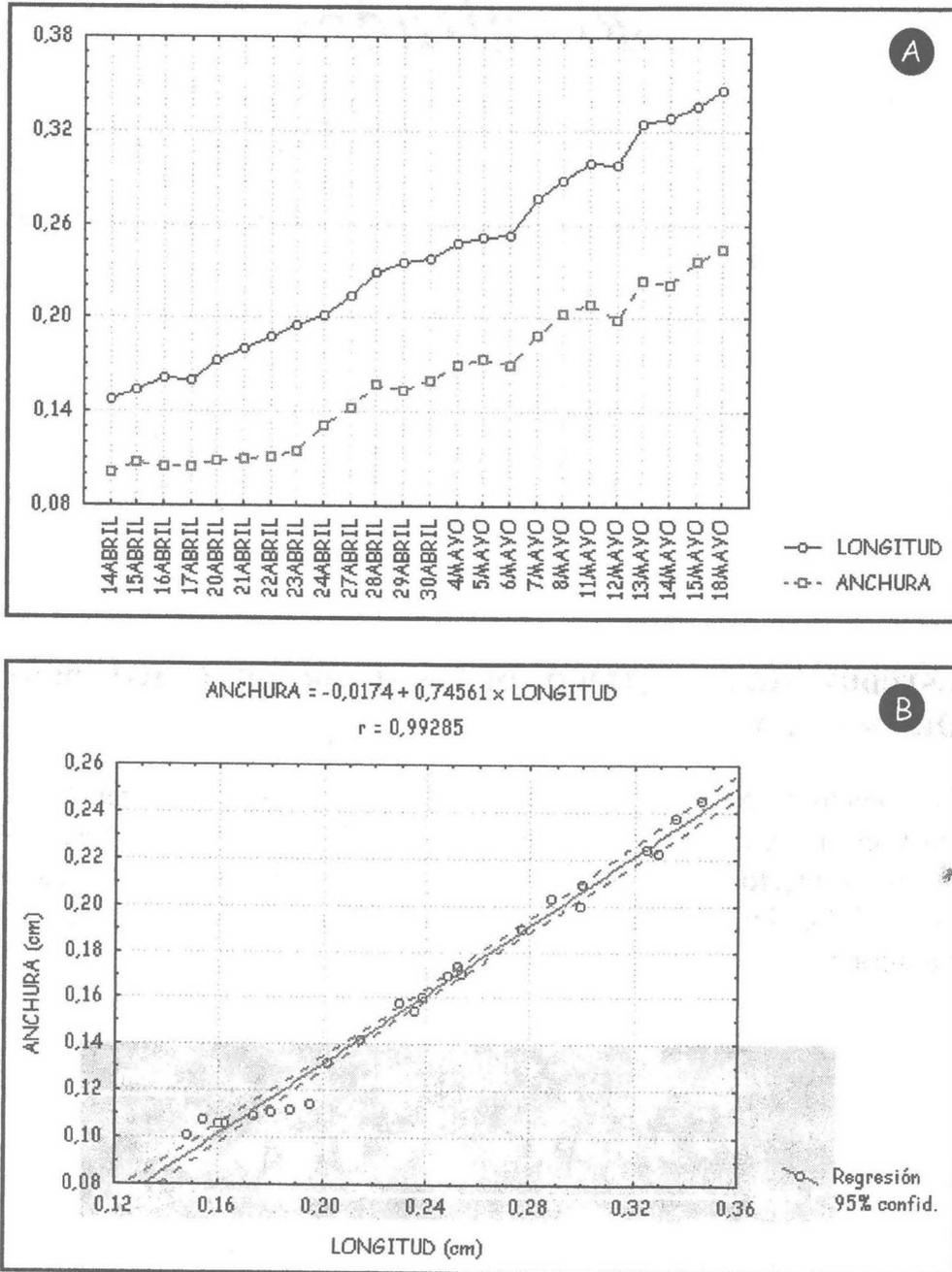


FIGURA 3.2. **A:** Variación de la longitud y anchura promedio de la flor de olivo durante el desarrollo de la antera. **B:** Análisis de regresión de la anchura (cm) sobre la longitud (cm) de la flor durante el desarrollo de la antera de olivo. r = coeficiente de correlación.



Tras determinar, mediante tinción con DAPI, la fase de desarrollo del grano de polen de olivo dentro de la antera en todas las muestras analizadas (Protocolo 2), y basándonos en los valores promedio de longitud y anchura de la flor obtenidos, se establecieron 7 intervalos bien definidos (Tabla 3.1).

TABLA 3.1. Estadios del desarrollo del polen de olivo en la antera, en función del tamaño medio de la flor.

ESTADIO	TAMAÑO FLOR				FASE DE DESARROLLO
	Longitud (cm)		Anchura (cm)		
	Media	Intervalo	Media	Intervalo	
1	0.1478	<0.1478	0.1011	<0.1011	PreR'
2	0.1588	0.1536-0.1600	0.1063	0.1056-0.1076	R'
3	0.1765	0.1730-0.1800	0.1098	0.1090-0.1106	R'-TE
4	0.1949	0.1876-0.2020	0.1222	0.1120-0.1320	TE
5	0.2220	0.2144-0.2296	0.1499	0.1422-0.1576	TE-MJ
6	0.2561	0.2356-0.2880	0.1745	0.1546-0.2030	M
7	0.3224	0.3000-0.3460	0.2228	0.2090-0.2450	P

PreR' = estadio premeiótico; R' = meiosis; TE= tetrada; MJ= microspora joven; M= microspora; P= polen.

Así, los primordios florales del estadio número 1, correspondientes a la fase premeiótica, presentan una longitud media de 0.1478 cm y una anchura promedio de 0.1011 cm. El segundo estadio se corresponde a células en división meiótica, incluyendo las diferentes etapas que comprende el proceso, y las dimensiones promedio de los botones florales son 0.1588 cm –longitud– y 0.1063 cm –anchura–. El estadio número 3 comprende células al final de la meiosis y tetradas recién formadas. La longitud media de la flor es de 0.1765 cm y la anchura promedio es de 0.1098 cm. El siguiente estadio, el número 4, incluye únicamente tetradas que presentan una gruesa pared de calosa común que engloba al conjunto. El tamaño medio del primordio floral es 0.1949 cm –longitud– x 0.1222 cm –anchura–.

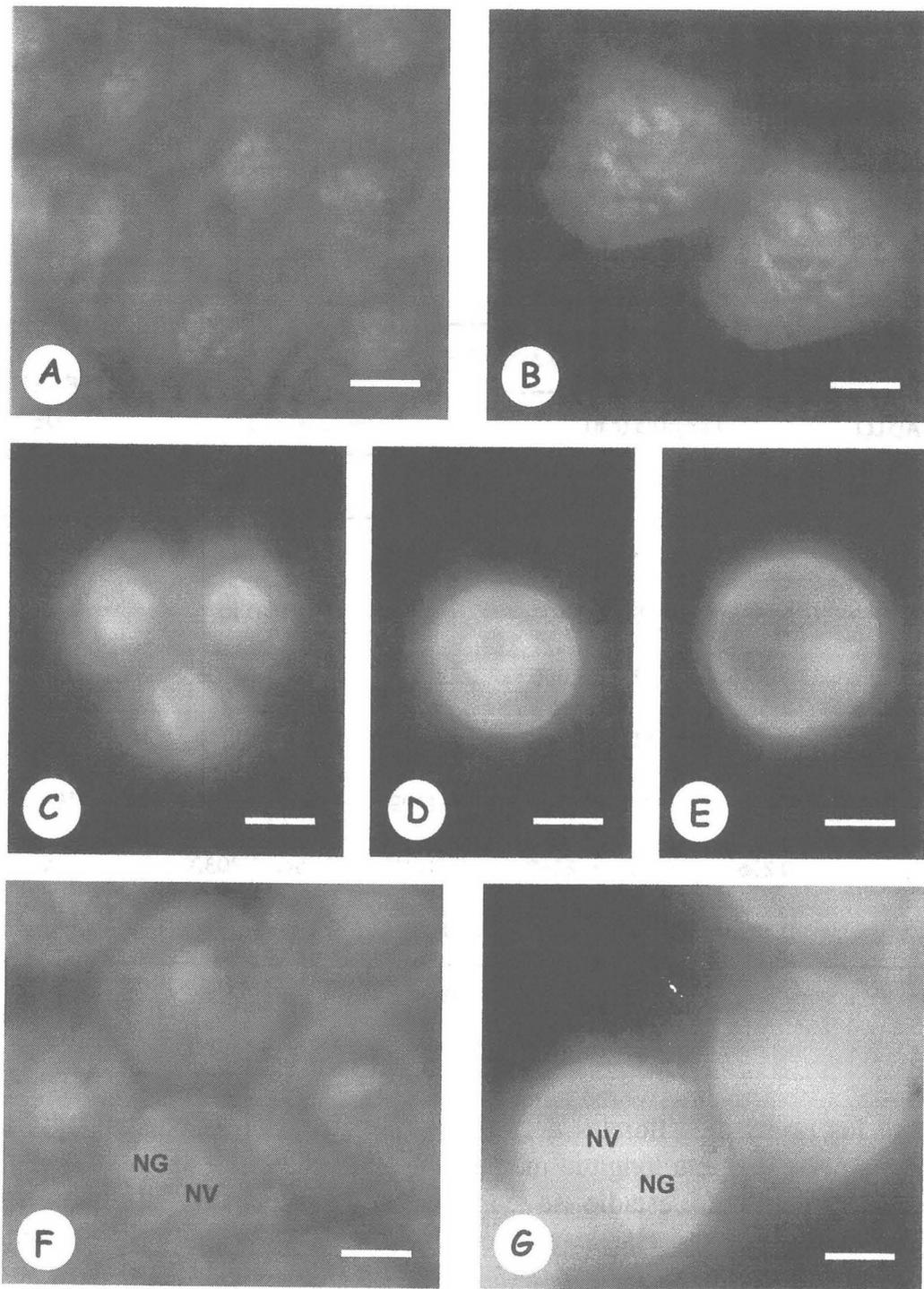


FIGURA 3.3. Desarrollo del grano de polen de olivo dentro de la antera. Tinción con DAPI. A: Células madre del polen (PMC). B: Meiosis (Paquitene). C: Tetradas. D: Microspora joven. E: Microspora vacuolada. F: Polen joven-medio. G: Polen maduro. NG= núcleo generativo, NV= núcleo vegetativo. Barras= 10 μ m.



En el estadio 5 encontramos tetradas y microsporas jóvenes recién liberadas que presentan una pared propia incipiente. Las medidas promedio de la flor son 0.2220 cm –longitud– y 0.1499 cm –anchura–. Las células del estadio número 6 se encuentran en la fase de microspora, con un contenido variable de pequeñas vacuolas en el citoplasma, que se van fusionando hasta formar una única gran vacuola que llega a ocupar la mayor parte del citoplasma mientras el núcleo permanece en la periferia. Los primordios florales en este estadio presentan una longitud media de 0.2561 mm y una anchura promedio de 0.1745 cm. Finalmente, las anteras correspondientes al estadio 7 contienen de forma mayoritaria, granos de polen bicelulares, en distintos estadios de maduración. Los botones florales presentan un tamaño medio de 0.3224 cm –longitud– x 0.2228 cm –anchura–.

Cronológicamente, según el estudio realizado en el presente trabajo y tomando como referencia el cultivar Picual, la floración en el olivo tiene lugar en los meses de Abril y Mayo y presenta una duración aproximada de 40-45 días. Transcurridos 5 días-1 semana desde el inicio de la floración, los botones florales son perfectamente visibles y presentan anteras en desarrollo con células madre del polen indiferenciadas en su interior (Fig. 3.3A). En un momento determinado del desarrollo las células madre del polen comienzan a dividirse, mediante meiosis (Fig. 3.3B), dando lugar cada una de ellas a cuatro células hijas. Este periodo es considerablemente corto y transcurridos 3-4 días, la meiosis concluye y la gran mayoría de las anteras observadas muestran la presencia de tetradas en su interior (Fig. 3.3C). A partir de este momento, comienzan a formarse los primeros depósitos de la exina (pared del polen) y seguidamente se degrada la pared de calosa que engloba a las cuatro microsporas que forman la tetrada. De esta forma, las microsporas quedan libres en el lóculo de la antera.

El estadio de microspora aparece de forma predominante desde el día 11 de la recolección hasta el 22, siendo la fase vacuolada la que domina este periodo. Durante esta fase, la célula aumenta el volumen citoplasmático considerablemente, tal y como puede apreciarse si comparamos las figuras 3.3D y E. Finalmente, en los 20 o 25 días finales de la floración encontramos que la mayoría de las anteras poseen granos de polen bicelular en distinto estadio de maduración (Fig. 3.3F-G). Así, inicialmente aparecen granos jóvenes, en los que se observa que la célula generativa está desplazada a la periferia junto al núcleo vegetativo, redondeado y de aspecto más laxo que el núcleo generativo. Durante el proceso de maduración del grano, tanto la célula generativa como el núcleo vegetativo se desplazan lentamente hacia la apertura por donde va a germinar el tubo polínico. Paralelamente, la célula generativa cambia su forma hasta adquirir el aspecto de huso, mientras que el núcleo vegetativo adopta una forma lobulada.



3.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL ALERGENO *Ole e 1* DURANTE EL DESARROLLO DEL GRANO DE POLEN Y LA GERMINACIÓN *IN VITRO*

Síntesis y acumulación de la proteína Ole e 1 durante el desarrollo del grano de polen dentro de la antera

Para llevar a cabo los análisis de expresión de la proteína alergénica Ole e 1 se prepararon extractos crudos a partir de polen maduro y primordios florales y anteras en distintos estadios de desarrollo (Protocolos 3 y 4, respectivamente). La inmunodetección se llevó a cabo tras incubar las membranas con un anticuerpo monoclonal anti-Ole e 1, seguido de un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina (Protocolo 13). Finalmente, se detectó la señal usando NBT/BCIP como substrato del enzima (Protocolo 14).

La figura 3.4 muestra los perfiles proteicos de extractos crudos de anteras correspondientes a los diferentes estadios de desarrollo del grano de polen previamente establecidos, después de separar los polipéptidos en un gel de poliacrilamida (Protocolo 8) y llevar a cabo una tinción con azul Coomassie (Protocolo 10). Puede observarse la presencia de numerosos polipéptidos en los tejidos de la antera, siendo posible distinguir claramente algunas proteínas mayoritarias, con un peso molecular entre 28 y 70 kDa. En el polen maduro, el patrón de bandas difiere notablemente, y destacan dos proteínas mayoritarias de 17 y 19 kDa, respectivamente

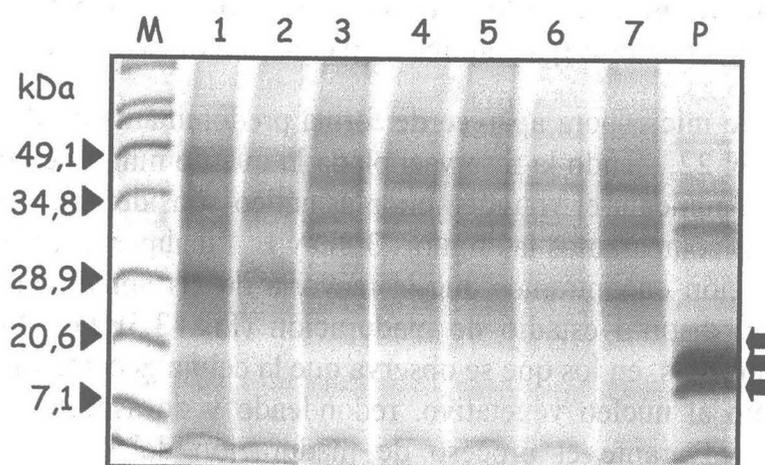


FIGURA 3.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % a partir de extractos crudos de anteras en distintos estadios de desarrollo y polen maduro de olivo. Tinción de proteínas totales con azul Coomassie. M: marcadores de peso molecular; 1: estadio premeiótico; 2: meiosis; 3: meiosis-tetrada; 4: tetrada; 5: tetrada-microspora joven; 6: microspora; 7: polen en antera; P: polen maduro liberado de la antera.



Los resultados de inmunodetección de la proteína Ole e 1 durante el desarrollo del grano de polen en la antera se muestran en la figura 3.5.

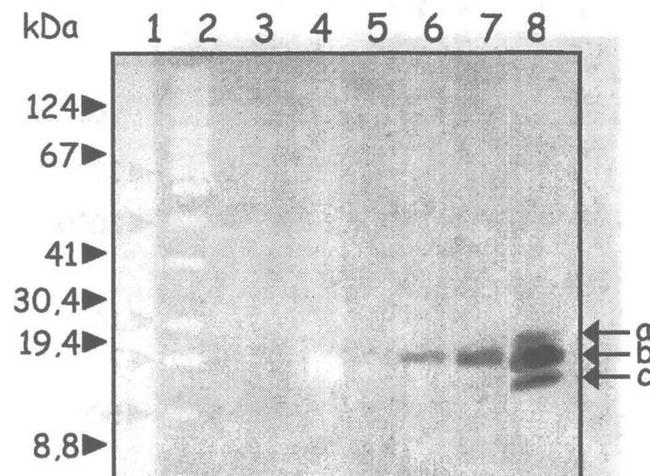


FIGURA 3.5. Inmunodetección del alérgeno Ole e 1 en membrana, mediante un anticuerpo monoclonal, a partir de extractos crudos de anteras en los estadios premeiótico (1), meiosis (2), meiosis-tetrada (3) tetrada (4), tetrada-microspora joven (5), microspora (6) y polen en antera (7), y extractos de polen maduro liberado de la antera (8).

El anticuerpo monoclonal fue capaz de reconocer hasta 3 proteínas diferentes, todas ellas en un rango de peso molecular comprendido entre 17 y 21 kDa. Dichos polipéptidos representan, de acuerdo con Batanero y col. (1994b), 3 variantes de una misma proteína con diferente grado de glucosilación. La banda c, que corresponde a la variante de menor peso molecular, representaría la forma no glucosilada, mientras que las isoformas a y b corresponden a la proteína diglucosilada y monoglucosilada, respectivamente.

Tanto el número como la intensidad de las bandas se incrementa cuantitativamente a lo largo de las últimas etapas de maduración del grano de polen, acumulándose masivamente en el polen maduro liberado de la antera. Así, la banda correspondiente a la proteína monoglucosilada (b) aparece a partir del estadio número 6 (microspora) en adelante, mientras que los polipéptidos a y c se detectan en polen maduro, aunque aparecen en cantidad sensiblemente menor también en el estadio 7 (polen dentro de la antera). No existe presencia del alérgeno en ninguna de sus



variantes durante los estadios iniciales del desarrollo, que comprende desde el estadio premeiótico hasta la fase de microspora joven.

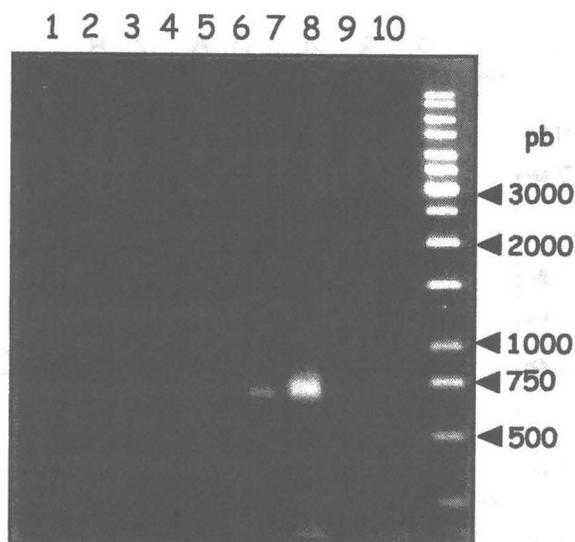
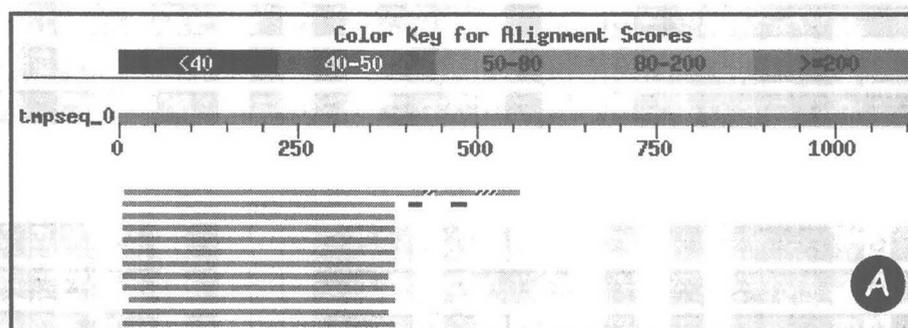


FIGURA 3.6. Análisis de los transcritos de *Ole e 1* en tejidos de olivo mediante RT-PCR, a partir de ARN total de anteras en el estadio premeiótico (1), meiosis (2), meiosis-tetrada (3) tetrada (4), tetrada-microspora joven (5), microspora (6), polen en antera (7), polen maduro liberado de la antera (8), pétalos (9) y hojas (10). A la derecha de la figura se muestran los marcadores de tamaño en pares de bases (pb).

Por otro lado, los niveles de transcritos correspondientes a la proteína *Ole e 1* fueron analizados mediante RT-PCR (Protocolo 23) durante los distintos estadios de desarrollo, a partir de ARN total procedente de anteras y polen maduro (Protocolos 17 y 16, respectivamente). No se detectó señal correspondiente a transcritos de *Ole e 1* en los estadios tempranos del desarrollo de la antera (1-4) ni en los controles llevados a cabo a partir de extractos de ARN total de pétalos y hojas (Fig. 3.6). Una banda de aproximadamente 612 pares de bases aparece en el estadio 5, correspondiente a la fase de tetrada-microspora joven, y la intensidad de la misma se incrementa progresivamente en los estadios 6 (microspora), 7 (polen en antera), y en polen maduro liberado de la antera (8), alcanzando la máxima expresión en este último.



El alineamiento BLAST (Altschul y col., 1990) de la secuencia de nucleótidos del fragmento, obtenido mediante amplificación por RT-PCR, en la base de datos nr (que incluye todas aquellas secuencias no redundantes presentes en GenBank + EMBL + DDBJ + PDB salvo las secuencias EST, STS, GSS y HTGS), mostró que dicho fragmento presenta una homología del 94 % sobre 423 nucleótidos de la secuencia publicada por Lombardero y col. en 1994 (más un 81 % de homología en 143 nucleótidos adicionales. Número de acceso a GenBank= S75766), y un 94 % de homología sobre 392 nucleótidos de la secuencia publicada por Villalba y col. ese mismo año (número de acceso a EMB= Y12426), tal y como muestran las figuras 3.7 y 3.8.



	(bits)	Value
gb S75766.1 S75766 Ole e 1= main olive allergen [<i>Olea europaea</i>]	630	e-178
emb X76395.1 OEOLE3C <i>Olea europaea</i> OLE3c mRNA	579	e-162
emb Y12426.1 OEALLE105 <i>Olea europaea</i> mRNA for major allergen	571	e-160
emb Y12428.1 OEALL1012 <i>Olea europaea</i> mRNA for major allergen	555	e-155
emb Y12427.1 OEALL1013 <i>Olea europaea</i> mRNA for major allergen	547	e-153
emb X76541.1 SVS28 <i>S. vulgaris</i> S28 mRNA	428	e-117
emb X76540.1 SVS46 <i>S. vulgaris</i> S46 mRNA	420	e-115
emb X77787.1 LVL1MAAG <i>L. vulgare</i> L1 mRNA for major allergen	414	e-113
emb X76396.1 OEOLE5C <i>Olea europaea</i> OLE5c mRNA	412	e-112
emb X77788.1 LV10MAAG <i>L. vulgare</i> L10 mRNA for major allergen	412	e-112
emb X76539.1 SVS38 <i>S. vulgaris</i> S38 mRNA	406	e-111
emb X76397.1 OEOLE1C <i>Olea europaea</i> OLE1c mRNA	381	e-103

FIGURA 3.7. A: Análisis de la secuencia obtenida de Ole e 1 según el programa BLAST N 2.1.1. Esquema gráfico con asignación de diferentes colores en función del número de nucleótidos alineados. B: Secuencias que muestran una homología significativa con la secuencia de Ole e 1 obtenida mediante RT-PCR, y sus números de acceso a GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).



	1 10 20 30
Ole e 1 RT-PCR	A C C T N C C G A C	A G G T T T A T T G	C G A N A C A T G C
Ole e 1 S75766	- - - - - C	A G G T T T A T T G	T G A T A C A T G T
Consensus	A C C T n C C G A C	A G G T T T A T T G	y G A n A C A T G v
 40 50 60
Ole e 1 RT-PCR	C G T G C T G G A T	T C A T T A C T G A	A C T T A G C G A G
Ole e 1 S75766	C G T G C T G G A T	T C A T T A C T G A	A C T T A G C G A A
Consensus	C G T G C T G G A T	T C A T T A C T G A	A C T T A G C G A t
 70 80 90
Ole e 1 RT-PCR	T T C A T C C C A G	G T G C C A G T G T	A C G C C T C C A A
Ole e 1 S75766	T T C A T C C C A G	G T G C C A G T G T	A C G C C T C C A A
Consensus	T T C A T C C C A G	G T G C C A G T G T	A C G C C T C C A A
 100 110 120
Ole e 1 RT-PCR	T G C A A A G A C A	G G G A G A A T G G	A G A C A T A A C A
Ole e 1 S75766	T G C A A A G A G A	A A A A G A A T G G	A G A C A T A A C A
Consensus	T G C A A A G A s A	r r A G A A T G G	A G A C A T A A C A
 130 140 150
Ole e 1 RT-PCR	T T T A C T G A G G	T N G G T T A C A C	A A G A G C G G A A
Ole e 1 S75766	T T T A C A G A G G	T G G G T T A C A C	A A G A G C G G A A
Consensus	T T T A C w G A G G	T n G G T T A C A C	A A G A G C G G A A
 160 170 180
Ole e 1 RT-PCR	G G A C T N T A N A	G C A T G C T C G T	G G A A C G T G A T
Ole e 1 S75766	G G A C T C T A C A	G C A T G C T C G T	G G A A C G T G A T
Consensus	G G A C T n T A n A	G C A T G C T C G T	G G A A C G T G A T
 190 200 210
Ole e 1 RT-PCR	C A C A A G A A C G	A G T T T T G T G A	A A T C A C A C T G
Ole e 1 S75766	C A C A A G A A T G	A G T T C T G T G A	A A T C A C A C T G
Consensus	C A C A A G A A v G	A G T T y T G T G A	A A T C A C A C T G
 220 230 240
Ole e 1 RT-PCR	A T T T C A A G T G	G C A G A A A A G A	T T G T N A T G A A
Ole e 1 S75766	A T T T C A A G T G	G T A G C A A A G A	T T G T A A T G A A
Consensus	A T T T C A A G T G	G y A G m A A A G A	T T G T n A T G A A

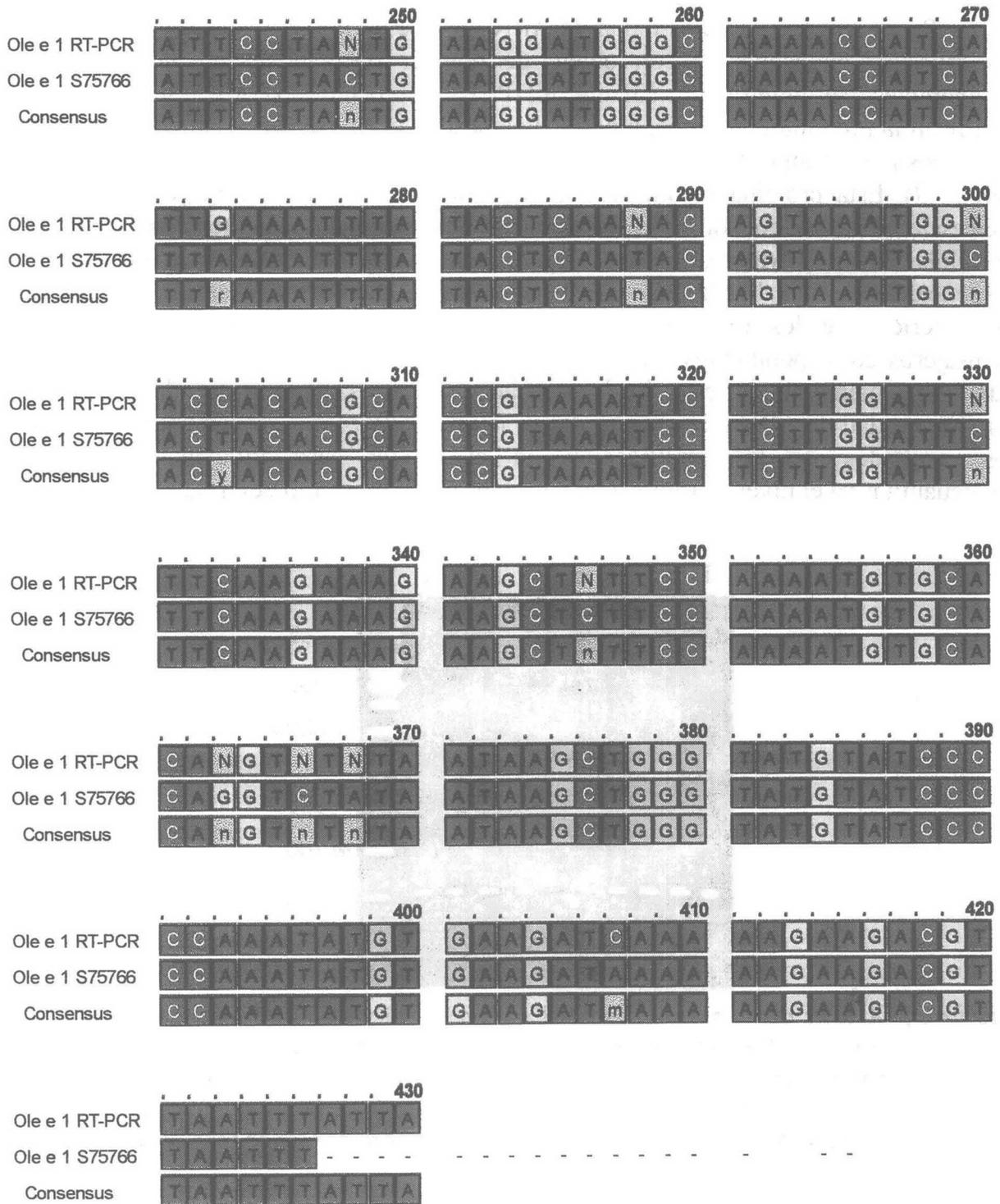


FIGURA 3.8. Esquema de alineamiento parcial (secuencia consenso), llevado a cabo mediante el programa Omega 1.1.3, entre la secuencia publicada para Ole e 1 (número de acceso a GenBank= AF75766) y el producto de RT-PCR secuenciado, en la región de mayor homología.



Para asegurar que la cantidad de ARN total de partida era equivalente en todas las muestras analizadas, y con objeto de obtener resultados semicuantitativos o comparables, se amplificó mediante RT-PCR (Protocolo 23) los transcritos que codifican la proteína ubiquitina, a partir de muestras cuantificadas y equivalentes a las utilizadas para la amplificación de los transcritos correspondientes al alérgeno Ole e 1 (Fig. 3.9). Esta proteína es uno de los denominados "house keeping genes", que se expresan de manera constitutiva en todos los tejidos, independientemente del estado de la célula (Watts y Moore, 1989; Xia y Mahon, 1998). Los resultados muestran la presencia de hasta 5 bandas que corresponden a las distintas formas (monomérica a pentamérica) de los transcritos, aunque únicamente se aprecian claramente los mensajeros correspondientes a la forma monomérica. La intensidad de las bandas es cuantitativamente similar en todos los estadios analizados, por lo que podemos asumir que la cantidad de ARN total de partida fue la misma. Por tanto, podemos concluir que los resultados de la amplificación en el primer caso reflejan de manera semicuantitativa el nivel de transcritos presentes en cada estadio del desarrollo.

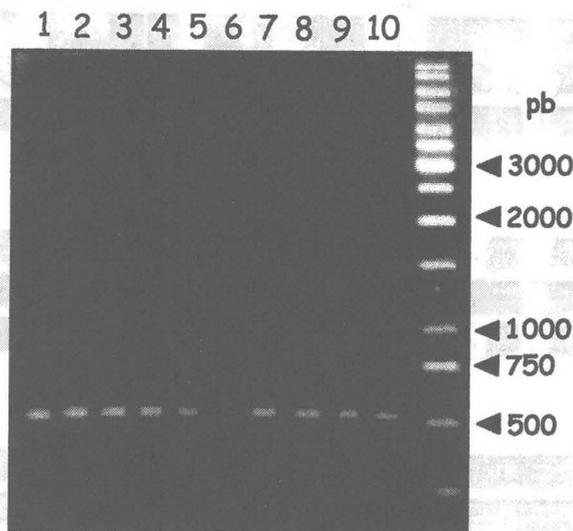


FIGURA 3.9. Análisis de los transcritos de ubiquitina en tejidos de olivo mediante RT-PCR, a partir de ARN total de anteras en el estadio premeiótico (1), meiosis (2), meiosis-tetrada (3) tetrada (4), tetrada-microspora joven (5), microspora (6), polen en antera (7), polen maduro liberado de la antera (8), pétalos (9) y hojas (10). A la derecha de la figura se muestran los marcadores de tamaño en pares de bases (pb).

Otra cuestión de especial interés era conocer la distribución espacial de los transcritos correspondientes a Ole e 1 en tejidos específicos de la antera de olivo. Para ello, se llevó a cabo la síntesis mediante PCR de sonda ADN marcada con digoxigenina, a partir del clon Ole e 1 3c (Protocolo 29). Dicha sonda se utilizó en experimentos de hibridación *in situ* (HIS) no radiactiva a microscopía óptica sobre secciones de parafina (Protocolos 24 y 30). Los resultados de la hibridación se muestran en la figura 3.10:

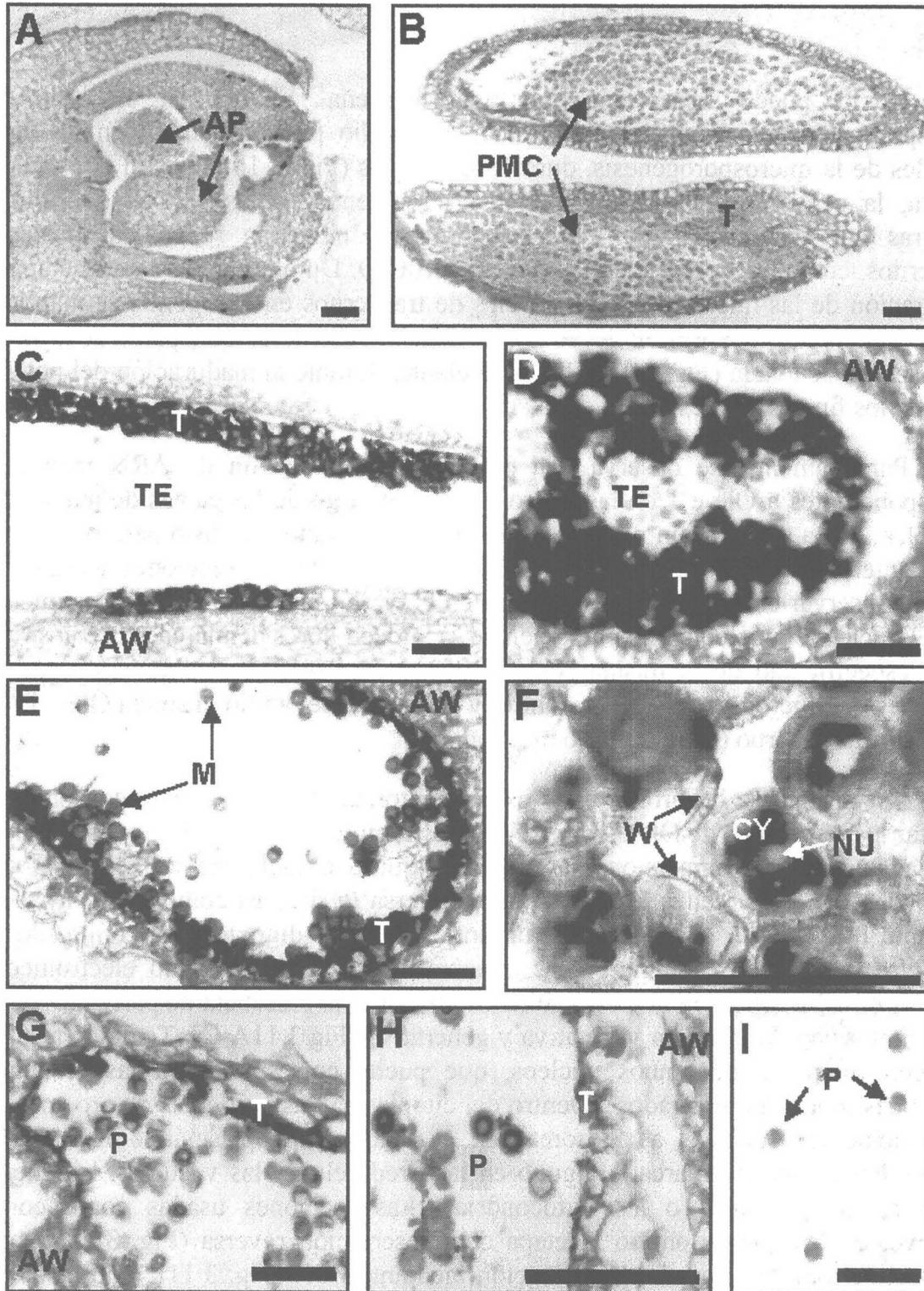


FIGURA 3.10. Hibridación *in situ* a microscopía óptica de los transcritos de *Ole e 1* sobre secciones de anteras de olivo en estadios diferentes de su desarrollo. La señal aparece como un precipitado de color oscuro. A: primordio floral completo en estadio premeiótico. B: meiosis. C-D: tetradas. E-F: microsporas. G-H: grano de polen. I: control negativo por omisión de la sonda en la mezcla de hibridación (polen maduro). AP= primordio de antera; AW= pared de la antera; CY= citoplasma; M= microsporas; NU= nucleolo; P= polen; PMC= células madre del polen; T= tapetum; TE= tetradas; W= pared de la microspora. Barras= 100 μ m.



Como puede observarse, no aparece señal alguna en las secciones correspondientes a primordios florales en el estadio premeiótico, ni en las etapas iniciales de la microsporogénesis, durante la meiosis (Fig. 3.10A-B). En el estadio de tetrada, la señal aparece localizada mayoritariamente en las células del *tapetum* mientras que, las células del tejido esporógeno, muestran reducidos niveles de transcritos, como puede verse en las figuras 3.10C-D. Durante las diferentes etapas de maduración de las microsporas, los niveles de transcritos en el *tapetum* se mantienen elevados, aunque su expresión decae al comenzar su degeneración a partir de la fase de microspora vacuolada (Fig. 3.10G-H) en adelante, durante la maduración del polen en los estadios finales del desarrollo de la antera.

Paralelamente, se observa una progresiva acumulación de ARN mensajeros correspondientes a Ole e 1 en las microsporas a lo largo de las etapas de maduración del polen, hasta alcanzar un nivel máximo cuando el grano está listo para ser liberado de la antera (Fig. 3.10E, G-H). Un mayor aumento de las secciones teñidas, nos permite observar como la señal se localiza en el citoplasma de la microspora mientras que, el núcleo, el nucleolo y la pared celular, aparecen libres de marcado, demostrando así la especificidad de la misma (Fig. 3.10F). No se observó coloración alguna en secciones que fueron usadas como control y en las que se omitió la sonda Ole e 1 (Fig. 3.10I) o el anticuerpo (resultados no mostrados).

Así mismo, se llevaron a cabo experimentos de RT-PCR *in situ* con objeto de detectar los transcritos de Ole e 1 a nivel ultraestructural. Para ello, las muestras fueron criofijadas mediante inmersión en propano líquido e incluidas en resina Unicryl (Protocolo 26). Tras realiza la transcripción inversa *in situ*, así como la amplificación mediante PCR *in situ*, e incubar con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con partículas de oro, se examinaron las muestras bajo un microscopio electrónico de transmisión EM 10C (Zeiss). Los resultados muestran la presencia de partículas de oro en el citoplasma de la célula vegetativa y generativa (Fig.3.11A-C). También apareció un ligero marcado de ambos núcleos, que puede corresponder a las secuencias genómicas (datos no mostrados). Dentro del citoplasma, las partículas de oro aparecen frecuentemente asociadas a ribosomas en el retículo endoplasmático rugoso (Fig. 3.11B). No se detectó marcado alguno en la pared celular, las vacuolas, los cuerpos lipídicos, los plastidios o las mitocondrias. Las secciones usadas como control negativo, en las que se omitió la etapa de transcripción reversa (Fig. 3.11D) o los cebadores necesarios para la amplificación mediante PCR (Fig. 3.11E), no mostraron señal significativa.

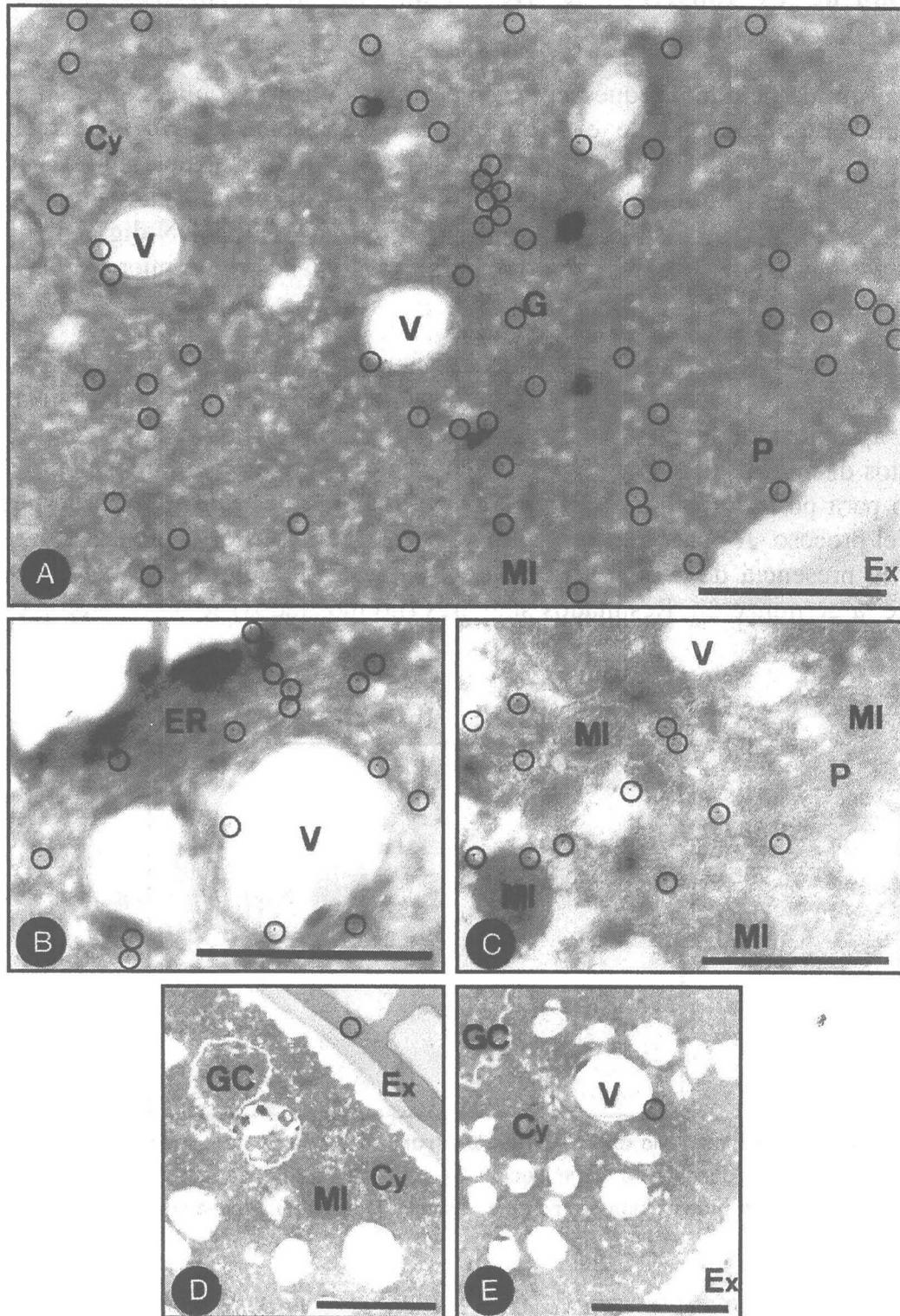


FIGURA 3.11. A-C: Detección de transcritos del alérgeno Ole e 1 (círculos) mediante RT-PCR *in situ* en secciones ultrafinas de granos de polen maduro de olivo. D-E: Controles negativos. Cy= citoplasma; ER= retículo endoplasmático; Ex= exina; G= aparato de Golgi; GC= célula generativa; Mi= mitocondria; P= plastidio; V= vacuola. Barra= 1 μ m.



Expresión de los transcritos de Ole e 1 durante la germinación in vitro del grano de polen de olivo.

Con el fin de determinar qué ocurre en el grano de polen con la expresión del gen que codifica la proteína Ole e 1 durante la germinación *in vitro*, se realizaron experimentos de Northern blot (Protocolo 20) con ARN total obtenido a partir de muestras de polen a diferentes intervalos de tiempo de germinación de acuerdo a M'rani-Alaoui (2000). La sonda utilizada fue la misma sonda ADN-dig generada por PCR que se usó en los experimentos de hibridación *in situ* a microscopía óptica descritos anteriormente.

La figura 3.12 muestra los resultados obtenidos en dichos análisis. En todos los estadios analizados, y como resultado de la hibridación, aparece una única banda de un tamaño aproximado de 800 pares de bases (flecha). Se observa que el nivel de transcritos disminuye ligeramente durante la primera hora de la germinación del tubo polínico para posteriormente alcanzar un nivel máximo de expresión 2h después del inicio del proceso. A partir de este punto, el nivel de transcritos comienza a disminuir aunque la presencia de ARNm sigue siendo elevada transcurridas 8 horas desde el inicio de la germinación. Resultados similares (no mostrados) se obtuvieron mediante RT-PCR.

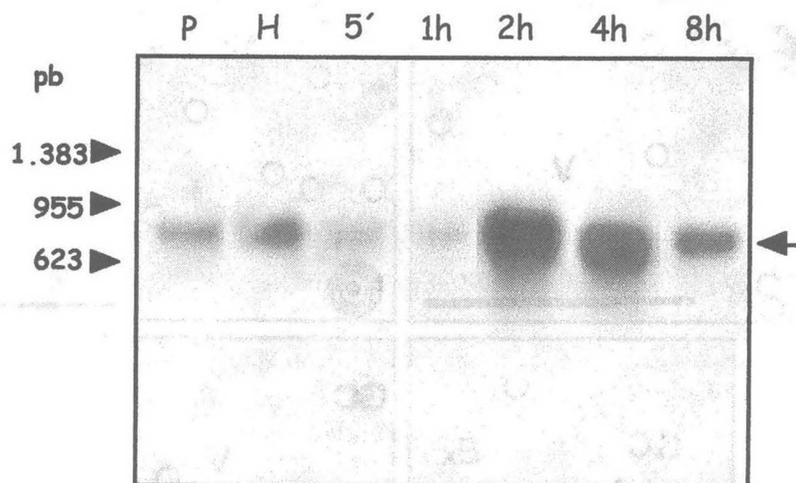


FIGURA 3.12. Northern blot de la expresión de los transcritos de Ole e 1 a diferentes intervalos de tiempo durante la germinación *in vitro* del grano de polen de olivo. P= polen maduro; H= hidratación del polen en cámara húmeda; pb= pares de bases.

Inmunolocalización del alérgeno Ole e 1 en el grano de polen de olivo y en tejidos de la antera

Con objeto de determinar la localización celular precisa del alérgeno mayoritario Ole e 1 en el grano de polen maduro de olivo y en tejidos de la antera, se procesaron



muestras para MO y MET, tal y como se describe en los protocolos 24 y 26, respectivamente. La inmunolocalización de la proteína se llevó a cabo incubando las secciones con un anticuerpo monoclonal anti-Ole e 1, seguido de un anticuerpo secundario conjugado con partículas de oro de 20 nm (ver detalles en protocolo 27). Finalmente, se llevó a cabo una amplificación de la señal mediante plata, y las muestras se estudiaron con posterioridad en un microscopio óptico Axioplan (Zeiss), utilizando para ello una óptica de campo oscuro, o bien las muestras fueron teñidas con acetato de uranilo, y observadas bajo un microscopio electrónico de transmisión EM 10C (Zeiss).

Los estudios de inmunolocalización a microscopía óptica mostraron un marcado intenso en las células del *tapetum* durante el estadio de microspora confirmando, por tanto, la presencia de esta proteína en tejidos esporofíticos de la antera (Fig. 3.13), mientras que las microsporas mostraron un marcado menor.

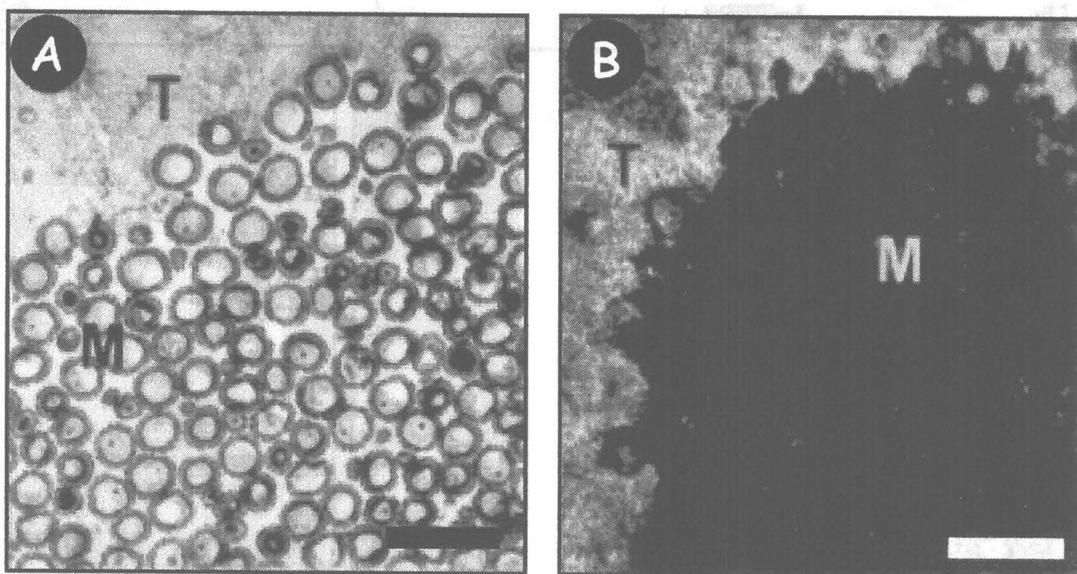


FIGURA 3.13. Secciones seriadas de anteras de olivo en el estadio de microspora vacuolada. A: Tinción con azul de toluidina. B: Inmunolocalización a microscopía óptica de campo oscuro del alergeno Ole e 1. El *tapetum* aparece intensamente teñido con plata (áreas blancas sobre fondo negro). M= microsporas; T= *tapetum*. Barras= 50 μ m.

Por otro lado, la utilización de criotécnicas nos ha permitido completar los resultados previos de inmunolocalización de la proteína alergénica en el grano de polen, obtenidos mediante técnicas convencionales. Los resultados confirman la localización del alergeno Ole e 1 en el interior de las vesículas del retículo endoplasmático rugoso (REr), dentro del citoplasma de la célula vegetativa (Fig. 3.14A).

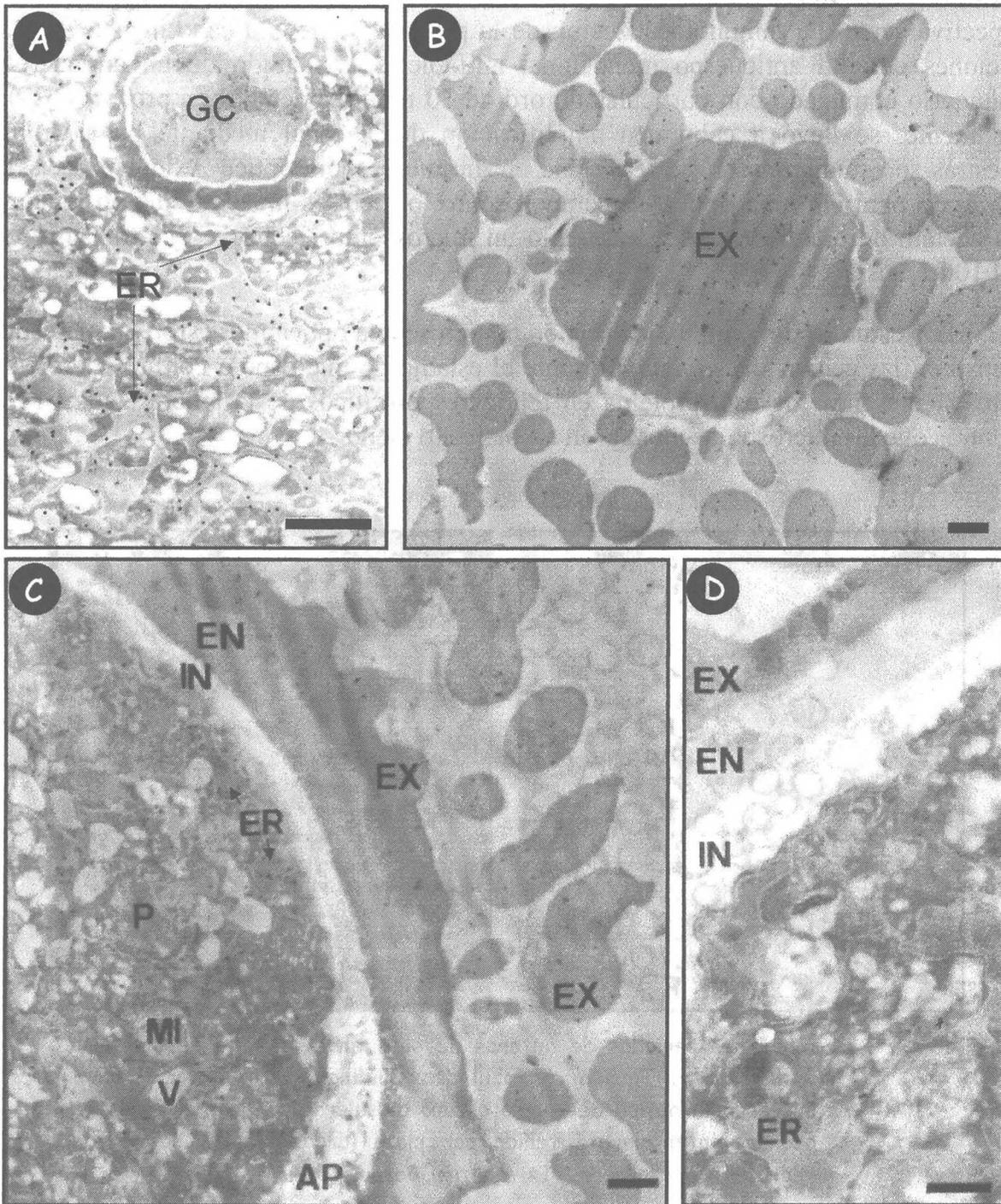


FIGURA 3.14. A-C: Inmunolocalización a microscopía electrónica de transmisión del alérgeno Ole e 1 en secciones de polen maduro de olivo mediante un anticuerpo monoclonal anti-Ole e 1. Las partículas de oro aparecen localizadas en el retículo endoplasmático rugoso y en la ectexina. No se observa señal en la célula generativa, organelas, aperturas y endexina. D: Control negativo preparado mediante omisión del anticuerpo primario. AP= apertura; CG= célula generativa; EN= endexina; ER= retículo endoplasmático; EX= ectexina; IN= intina; MI= mitocondria; P= plastidio; V= vacuola. Barras= 1 μ m.



No obstante, y a diferencia de resultados previos, la utilización de protocolos basados en el procesamiento de muestras a bajas temperaturas permitió detectar la presencia del alérgeno mayoritario en la pared celular del grano de polen maduro. Tal y como muestran las figuras 3.14B-C, la proteína alérgica está presente en gran cantidad en la parte más externa de la exina –ectexina–, mientras que la parte interna de la misma –endexina–, la intina y las regiones aperturales aparecen libres de marca. El resto de compartimentos celulares (núcleo, plastidios, mitocondrias, dictiosomas, vesículas de Golgi, cuerpos lipídicos y pared celular), así como la célula generativa en su totalidad, aparecen libres de partículas. Los controles negativos, en los que se omitió el anticuerpo primario, tampoco mostraron un marcado significativo (Fig. 3.14D).

3.3. ENSAYOS DE ACTIVIDAD CUTINASA EN EL POLEN DE OLIVO

Se llevaron a cabo ensayos de actividad cutinasa *in vitro* y también en geles de poliacrilamida con objeto de determinar si el alérgeno mayoritario Ole e 1 pertenece a dicho grupo de proteínas enzimáticas. Para ello, previamente se aisló y purificó parcialmente dicha proteína mediante FPLC (Protocolo 5) y la fracción proteica correspondiente al alérgeno (que se muestra como un pico muy pronunciado en la figura 3.15A) fue separada en un gel de poliacrilamida (Protocolo 8).

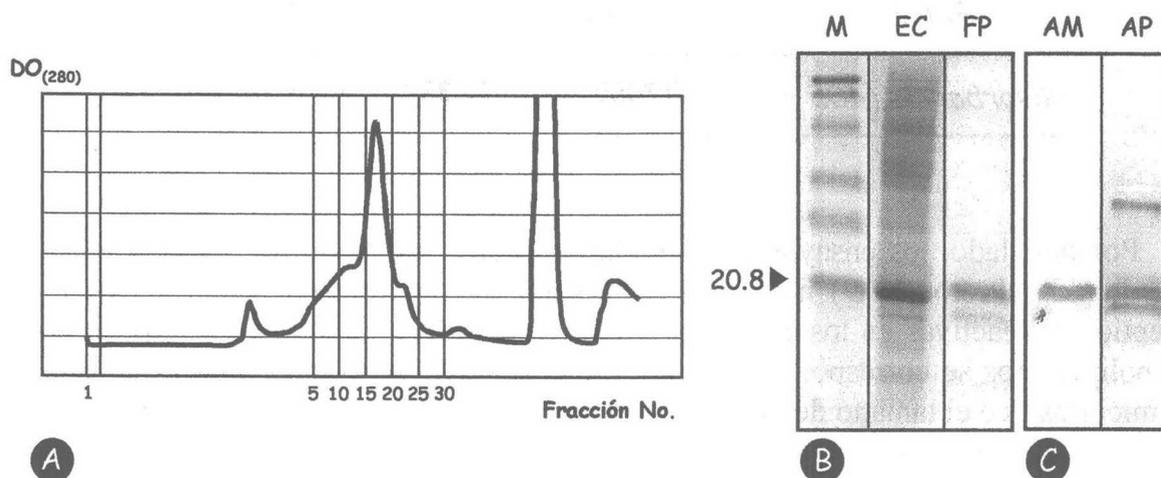
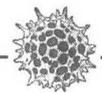


FIGURA 3.15. Purificación parcial de la proteína alérgica Ole e 1. A: Perfil de elución mediante FPLC de los extractos purificados de polen maduro de olivo. B: Electroforesis en gel de poliacrilamida de la fracción purificada nº 16 y tinción de proteínas totales mediante azul de Coomassie. M= marcadores de peso molecular; EC= extracto crudo de polen maduro; FP= fracción purificada. C: Inmunodetección de la proteína alérgica Ole e 1. AM= anticuerpo monoclonal; AP= suero policlonal.



El perfil proteico de dicha fracción muestra la presencia de un único polipéptido cuyo peso molecular, en torno a los 18-20 kDa, coincide con el de la proteína alergénica Ole e 1 (Fig. 3.15B). Dichas proteínas fueron transferidas a un filtro de nylon que se probó posteriormente con un anticuerpo monoclonal anti-Ole e 1 y un suero policlonal de conejo (ver detalles en protocolo 13). Ambos anticuerpos fueron capaces de reconocer las tres variantes de la proteína alergénica. Además, los ensayos con el suero policlonal mostraron al presencia de una banda polipeptídica adicional, probablemente como resultado de la unión no específica del anticuerpo (Fig.3.15C).

Los ensayos de actividad butirato esterasa *in vitro* a partir de extractos crudos de polen maduro de olivo (Protocolo 7) mostraron la existencia de un elevado nivel de dicha actividad enzimática en el grano (Tabla 3.2). El resultado, no obstante, fue negativo cuando se ensayó la fracción purificada correspondiente a Ole e 1, mientras que los extractos de *Brassica*, utilizados como control positivo, mostraron un nivel de actividad incluso superior a los de olivo dado que, aunque el valor de absorbancia fue menor, el extracto de polen de *Brassica* utilizado en los ensayos era hasta 4 veces más diluido que el de polen de olivo.

TABLA 3.2. Resultados de los ensayos de actividad butirato esterasa *in vitro*, a partir de extractos crudos de polen de *Brassica* y olivo, y de la fracción purificada que incluye Ole e 1.

Extracto	<i>Brassica</i>	Olivo	Ole e 1
Absorbancia (405 nm)	0.7055	0.8337	-0.1610

Por otro lado, los ensayos de actividad butirato y acetato esterasa en geles de poliacrilamida (Protocolo 9) mostraron en ambos casos la presencia de dos bandas polipeptídicas reactivas en los extractos crudos de polen de olivo (Fig. 3.16). Uno de estos polipéptidos se corresponde con una proteína de un peso molecular de unos 50 kDa, mientras que el tamaño del segundo es similar al de la proteína alergénica Ole e 1 (aproximadamente 18 kDa). No obstante, la intensidad de esta última banda no se corresponde a la esperada, dado que la proteína Ole e 1 está presente en gran cantidad en el grano, por lo que cabría esperar una actividad esterasa mayor de la que muestran los resultados obtenidos. No se detectó actividad alguna en el extracto correspondiente a la fracción proteica purificada.

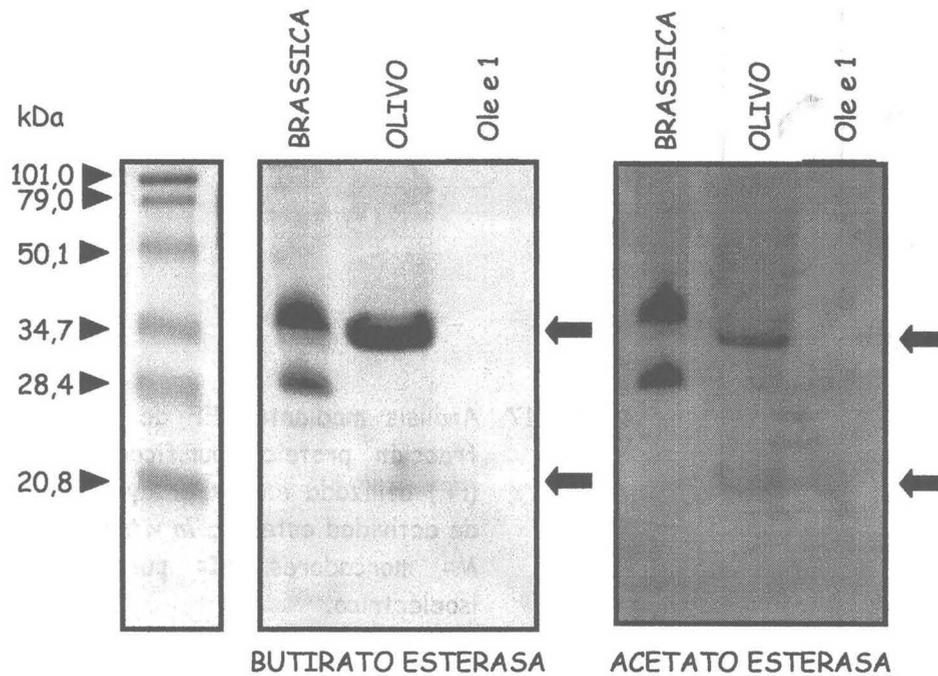


FIGURA 3.16. Ensayos de actividad butirato y acetato esterasa en geles de poliacrilamida, a partir de un extracto crudo de polen maduro de olivo y de la proteína alergénica Ole e 1, purificada parcialmente mediante FPLC. En ambos ensayos se utilizó un extracto de polen de *Brassica napus* como control positivo.

Estos resultados conducen a la hipótesis de la existencia de un polipéptido adicional purificado junto a Ole e 1, que muestra actividad esterasa. Para esta hipótesis se llevó a cabo una electroforesis en gradiente de pH (Protocolo 12), a partir de la fracción proteica purificada utilizada en los ensayos de actividad esterasa *in vitro*. De esta forma, fue posible distinguir la presencia de hasta 10 polipéptidos diferentes en dicha fracción (Fig. 3.17). Destacan dos bandas comprendidas en un rango de pI entre 5 y 6 que, de acuerdo con estudios previos (Lauzurica y col., 1988a), podrían corresponder al alergeno Ole e 1.

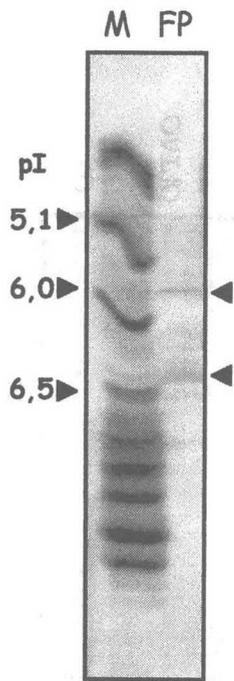
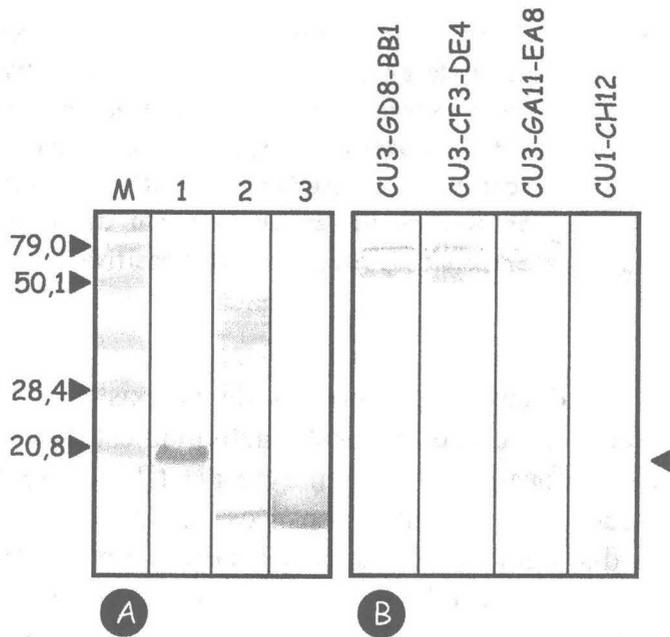


FIGURA 3.17. Análisis mediante IEF de la fracción proteica purificada (FP) utilizada en los ensayos de actividad esterasa *in vitro*. M= marcadores. pI= punto isoeléctrico.





En experimentos posteriores de inmunodetección sobre membrana se probaron 28 anticuerpos monoclonales diferentes, todos ellos desarrollados frente a una cutinasa del hongo *Fusarium*. En todos los casos el anticuerpo reconoce dos bandas polipeptídicas de un peso molecular mayor de 50 kDa. Un tercer polipéptido de menor tamaño, con un peso molecular en torno a los 18-20 kDa, aparece en 4 de los anticuerpos ensayados (Fig.3.18B). Sin embargo, no hubo reacción cruzada cuando se probó un anticuerpo monoclonal y un antisuero policlonal anti-Ole e 1 en extractos proteicos de polen maduro de *Brassica* (Fig. 3.18A).

3.4. EL ALERGENO OLE E 1 COMO MARCADOR MOLECULAR DE VARIEDADES EN EL OLIVAR

Análisis bioquímico en diferentes cultivares de olivo

Con objeto de determinar si existen diferencias cuantitativas y/o cualitativas entre cultivares con respecto a la presencia del alergeno mayoritario del olivo en el polen, se realizaron análisis de SDS-PAGE (Protocolo 8) a partir de extractos crudos de polen maduro de olivo de 10 variedades diferentes (Arbequina, Frantoio, Gordal Sevillana, Hojiblanca, Lechín de Granada, Loaime, Lucio, Manzanilla de Sevilla, Picual y Picudo).

Después de teñir los geles correspondientes (Protocolo 10), se observa que el perfil proteico de los extractos crudos de polen de las distintas variedades de olivo analizadas es similar en todos los casos, mostrando la presencia de un gran número de bandas proteicas dentro de un amplio rango de peso molecular (Fig. 3.19A). No obstante, se aprecian diferencias cuantitativas claras con respecto a un grupo de polipéptidos de un peso molecular de 17-20 kDa, entre los que encontramos el alergeno mayoritario Ole e 1. Los resultados de densitometría muestran que este grupo de proteínas representa un porcentaje importante del total de proteínas presentes en el grano de polen en los cultivares Hojiblanca, Lechín de Granada, Loaime, Lucio, Manzanilla de Sevilla, Picual y Picudo (el porcentaje mayor se corresponde al cultivar Lechín de Granada, en el que dicho grupo de polipéptidos representa hasta un 23 % del total de las proteínas presentes en el grano). En comparación, la presencia de dichas proteínas en los extractos crudos de las variedades Arbequina, Frantoio y Gordal Sevillana es sensiblemente menor (el porcentaje menor se corresponde al cultivar Arbequina, en el que dicho grupo de polipéptidos representa un 3 % del total de las proteínas presentes en el grano).

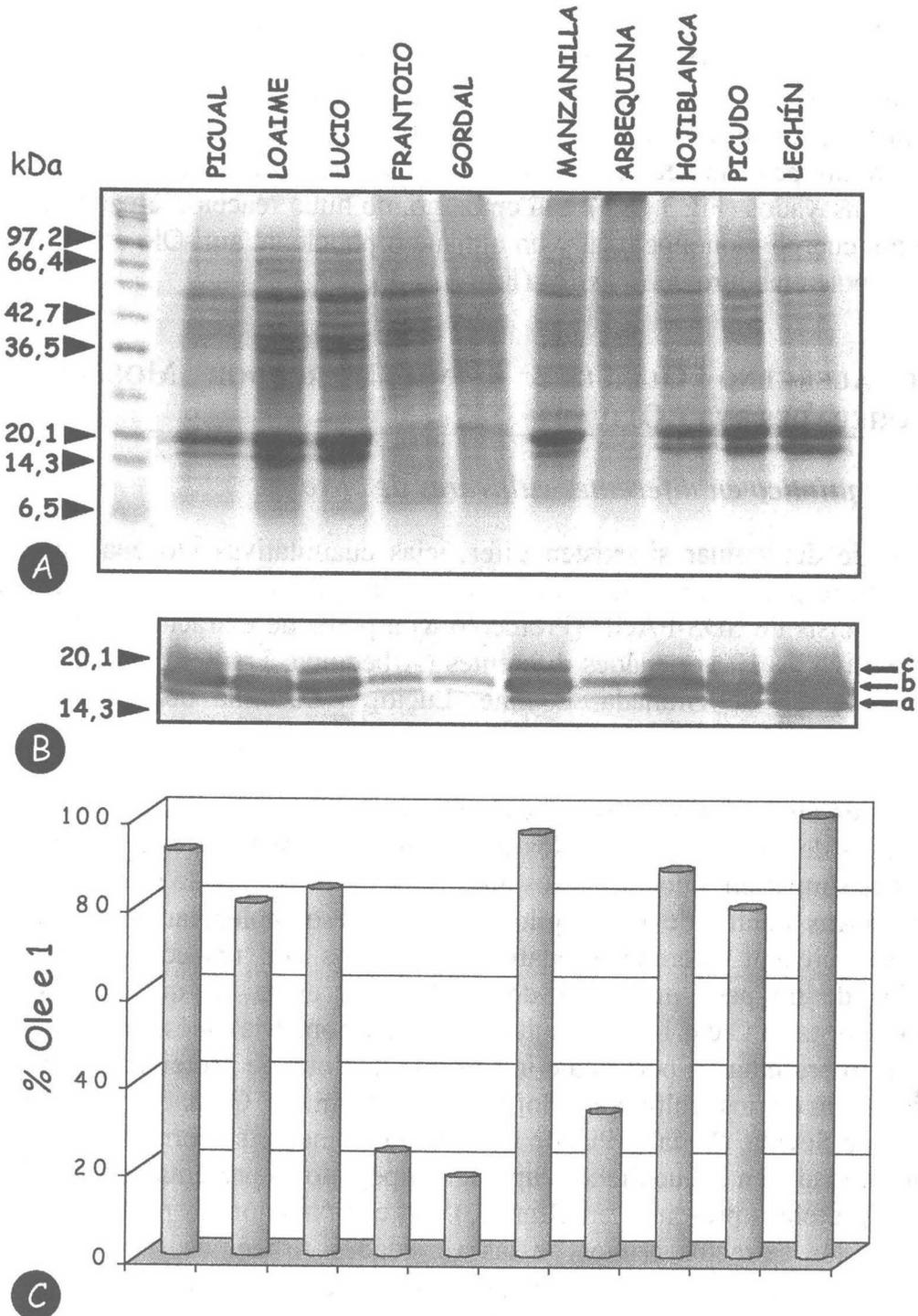


FIGURA 3.19. SDS-PAGE e inmunodetección de la proteína Ole e 1 en extractos crudos de polen de 10 cultivares de olivo. A: Gel de gradiente (7.5-20%) de poliacrilamida y tinción de proteínas totales mediante azul Coomassie. B: Inmunodetección de Ole e 1 mediante un anticuerpo monoclonal anti-Ole e 1. C: Gráfico de los datos de densitometría, en porcentajes relativos referidos al cultivar de mayor contenido en Ole e 1 (Lechín de Granada).



La figura 3.19B muestra los resultados de la inmunodetección de la proteína alergénica mediante un anticuerpo monoclonal anti-Ole e 1. Tres bandas inmunoreactivas aparecen dentro del rango de peso molecular de 17-20 kDa, correspondientes a las tres variantes descritas anteriormente. Aunque todas las variedades analizadas muestran la presencia de bandas reactivas, su intensidad relativa varía significativamente. Los porcentajes de alérgeno, en referencia a la variedad con una densidad óptica mayor (Lechín de Granada, 100%) se representan en la figura 3.19C. Podemos distinguir dos grandes grupos: los cultivares Hojiblanca, Lechín de Granada, Loaime, Lucio, Manzanilla de Sevilla, Picual y Picudo muestran niveles altos de la proteína alergénica *Ole e 1* en todas sus variantes o isoformas (porcentajes relativos del 87.6 %, 100 %, 80 %, 83.2 %, 96 %, 91.8 % y 79 % respectivamente) mientras que, las variedades Arbequina, Frantoio y Gordal Sevillana y mostraron un nivel reducido de proteína (porcentajes relativos del 32.8 %, 23.5 % y 17.8 % respectivamente). Además de diferencias cuantitativas, se observa que existen también diferencias cualitativas con respecto a las distintas isoformas de la proteína presentes en el polen de las distintas variedades analizadas, aunque dichas diferencias podrían estar motivadas por el bajo nivel de dichas variantes de la proteína.

Análisis molecular en diferentes cultivares de olivo

Así mismo, se llevaron a cabo análisis de RT-PCR a partir de ARN total de polen maduro de cada una de las variedades, para determinar si las diferencias observadas en cuanto a la presencia de la proteína alergénica estaban correlacionadas con posibles cambios en los niveles de transcritos en los distintos cultivares analizadas. Como resultado de la amplificación se pudo observar una banda de aproximadamente 600 pares de bases en 7 de las 10 variedades estudiadas.

Los resultados mostraron inicialmente la ausencia de transcritos en aquellas variedades que presentaban niveles bajos de la proteína (Arbequina, Frantoio y Gordal Sevillana), y una gran cantidad de transcritos en aquellos cultivares en los que la presencia del alérgeno *Ole e 1* era masiva (Hojiblanca, Lechín de Granada, Loaime, Lucio, Manzanilla de Sevilla, Picual y Picudo), tal y como puede observarse en la figura 3.20A. No obstante, cuando el número de ciclos de amplificación se incrementó hasta 40, fue posible observar la presencia de transcritos también en aquellos cultivares de bajo contenido en el alérgeno (resultados no mostrados), por lo que se pudo establecer que las diferencias eran únicamente cuantitativas.

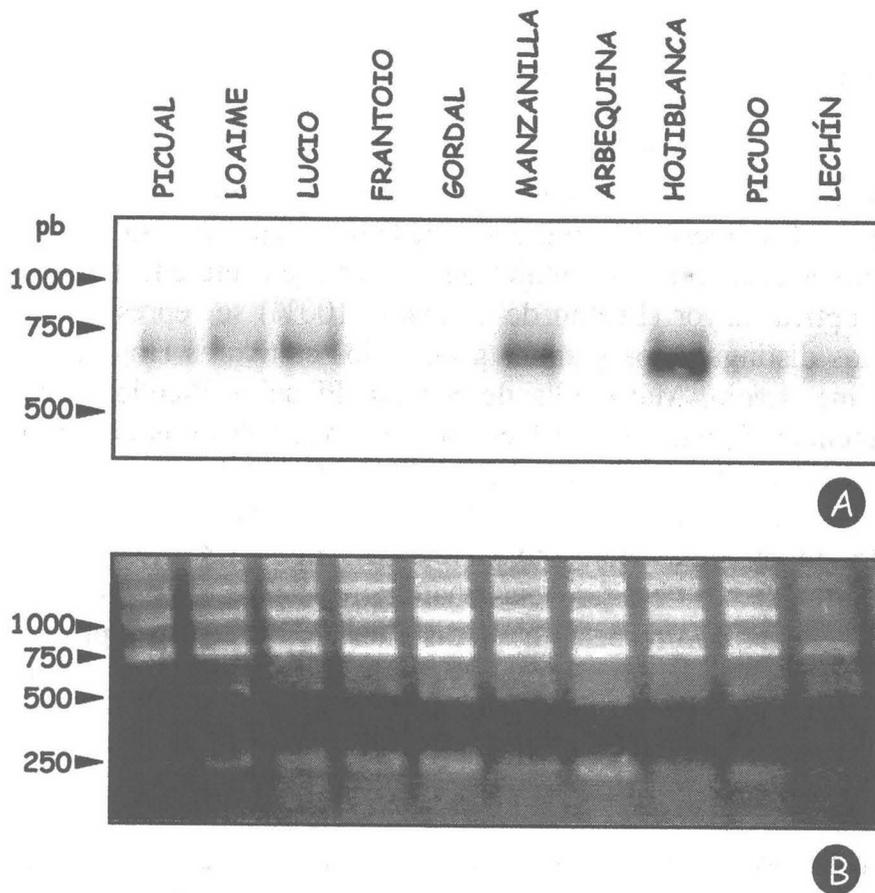
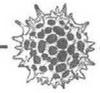


FIGURA 3.20. A: Análisis de expresión del alergeno Ole e 1 mediante RT-PCR, a partir de ARN total de polen de 10 variedades de olivo. B: Análisis de expresión de ubiquitina mediante RT-PCR, a partir de muestras equivalentes a las anteriores, tras 20 ciclos de amplificación (Calles 1-10 como en A).

Para asegurar que el análisis era semicuantitativo, es decir, que la cantidad de ARN total de partida era equivalente en todas las muestras analizadas, se comparó la intensidad de las bandas resultantes de amplificar mediante RT-PCR los ARN mensajeros que codifican la proteína ubiquitina, a partir de muestras cuantificadas y equivalentes a las utilizadas para la amplificación de los transcritos correspondientes al alergeno Ole e 1 (Fig. 3.20B). Los resultados muestran la presencia de hasta 5 bandas polipeptídicas que se corresponden a las distintas formas (monomérica a pentamérica) de los transcritos. Como puede apreciarse, la intensidad de las bandas es similar en todos los estadios analizados, por lo que podemos asumir que la cantidad de ARN total de partida fue la misma. Por tanto, podemos concluir que los resultados de la amplificación de los transcritos que codifican la proteína alergénica Ole e 1 reflejan de manera semicuantitativa el nivel de ARNm presente en cada variedad analizada.



Análisis celular en diferentes cultivares de olivo

Con objeto de determinar si las diferencias observadas a nivel bioquímico y molecular en cuanto a la mayor o menor presencia de la proteína alergénica Ole e 1 y sus transcritos en el grano de polen se reflejaban a nivel subcelular, se llevó a cabo un estudio comparativo entre las variedades de bajo contenido en dicho alérgeno (Arbequina, Frantoio y Gordal) y el cultivar Picual (de alto contenido en la proteína Ole e 1), utilizado como referencia en gran parte de los estudios ultraestructurales realizados por nuestro grupo. Para ello, muestras de granos de polen maduro fueron procesadas para MET (Protocolo 25) y se llevó a cabo la inmunolocalización de la proteína alergénica, tal y como se describe en el protocolo 27. A continuación se llevó a cabo la cuantificación del marcado resultante (número de granos de oro por unidad de área) a partir de fotomicrografías de los resultados obtenidos en las diferentes variedades analizadas.

Los resultados muestran también que no existen diferencias ultraestructurales aparentes cuando comparamos con el polen del cultivar de referencia Picual. Por el contrario, sí existen diferencias cuantitativas significativas en cuanto al marcado resultante de la inmunolocalización. Así, la proteína alergénica Ole e 1 es más abundante en el cultivar de referencia Picual que en el resto de variedades analizadas, tal y como puede observarse si comparamos las figuras 3.21A-D. Le siguen, de mayor a menor marcado, las variedades Arbequina, Frantoio y Gordal. Estos valores cuantitativos de marcado específico por área (una vez eliminado el ruido de fondo) coinciden exactamente con los resultados de cuantificación de los inmunoblots (ver densitograma de la figura 3.19) y con los niveles de transcritos (ver figura 3.20A) encontrados en cada una de estas variedades.

En todas las variedades analizadas el alérgeno aparece localizado en el citoplasma y en la exina mientras que las organelas, el núcleo vegetativo, la célula generativa, la intina y las aperturas aparecen libres de señal. Dentro del citoplasma, es difícil determinar una localización subcelular más precisa, dada la dificultad para identificar las cisternas de retículo endoplasmático al no ser visibles los ribosomas, debido a que las muestras fueron fijadas únicamente con paraformaldehído y glutaraldehído la inclusión se llevó a cabo en Unicryl.

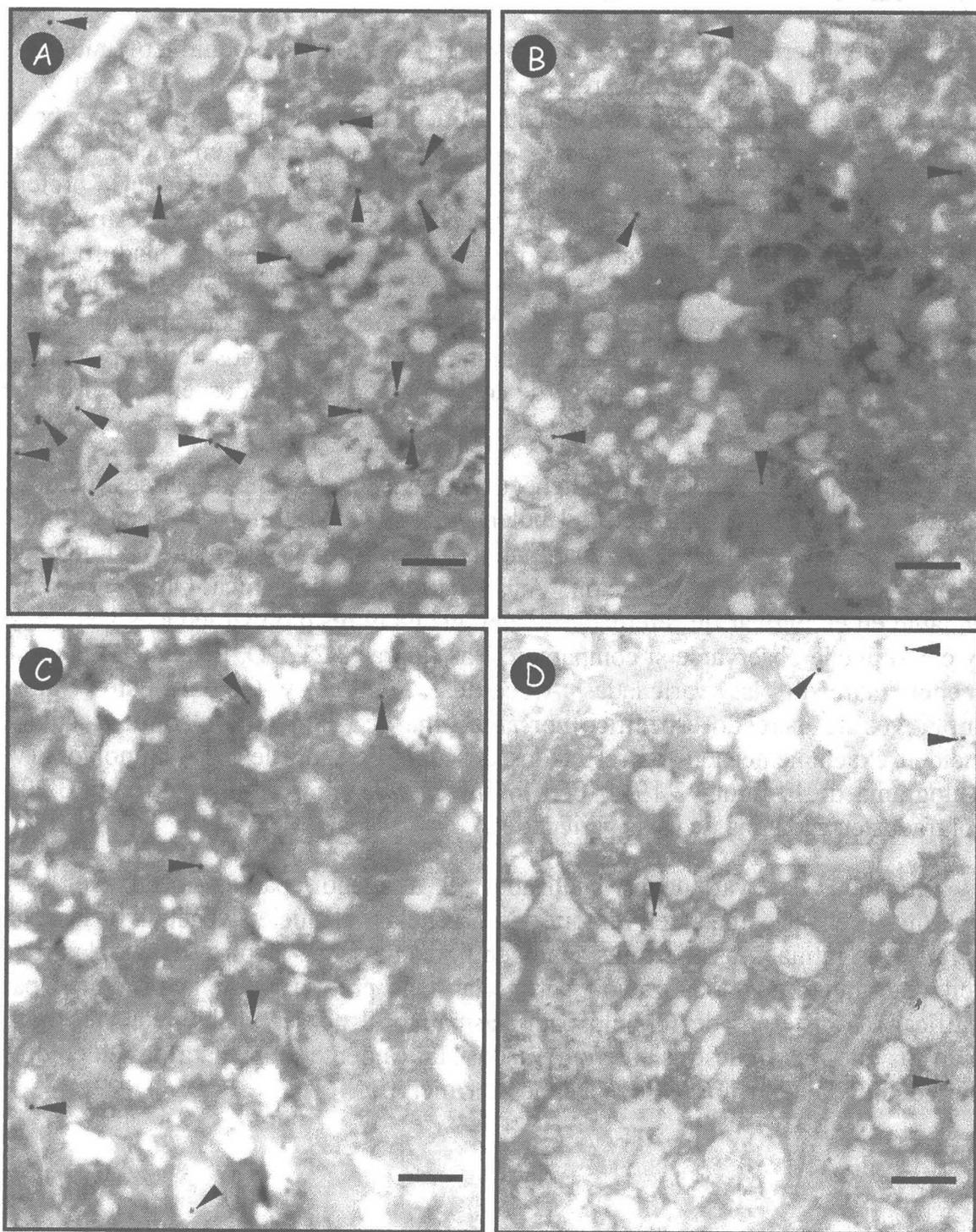


FIGURA 3.21. Ver leyenda en página siguiente.

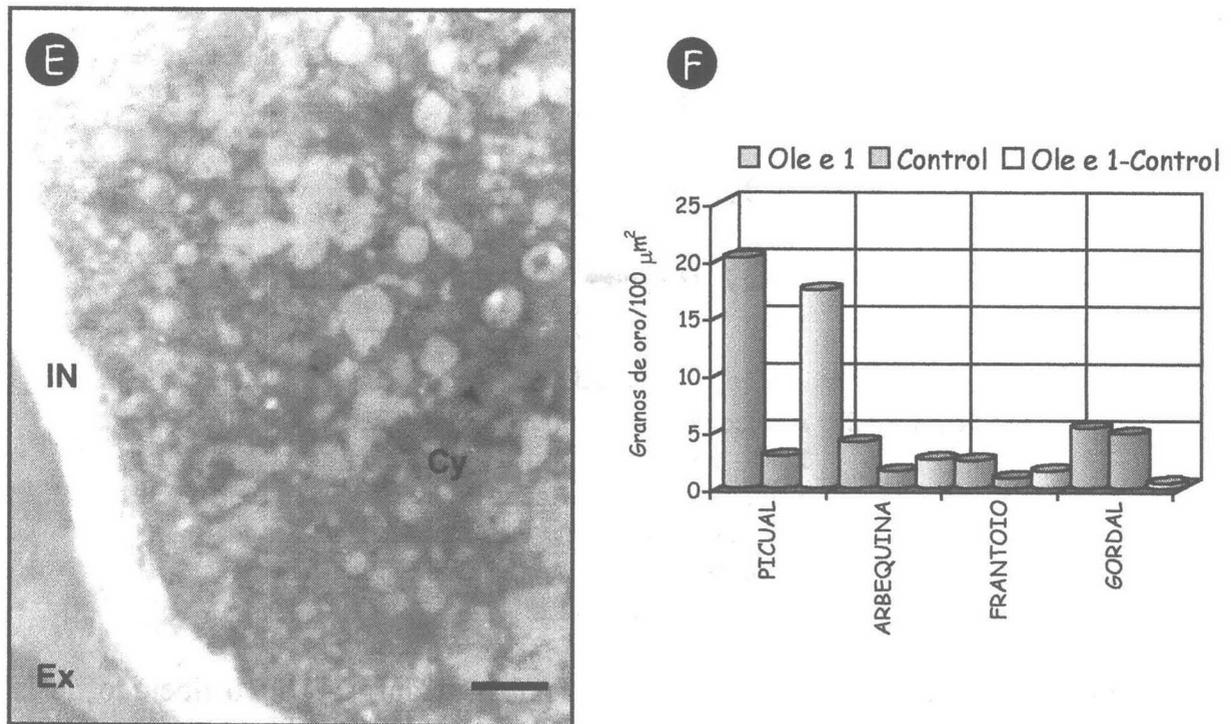


FIGURA 3.21. A-D: Inmunodetección a microscopía electrónica de transmisión de la proteína Ole e 1 (flechas) en polen maduro de olivo de las variedades Picual (A), Frantoio (B), Gordal (C) y Arbequina (D), mediante un anticuerpo monoclonal anti-Ole e 1. E: Control negativo mediante omisión del anticuerpo primario. F: Cuantificación del número de granos de oro por unidad de área en los cuatro cultivares analizados. Ex= exina; IN= intina; Cy= citoplasma. Barras= 1 μm .

3.5. ANÁLISIS DE LA REACCIÓN CRUZADA ENTRE OLE E 1 Y PLA L 1

Con objeto de determinar la existencia de reacción cruzada del alérgeno Ole e 1 y la proteína alérgica mayoritaria de *Plantago lanceolata*, denominada Pla 1, se llevó a cabo un análisis de Western blot (ver detalles en protocolo 13), a partir de un extracto crudo de polen maduro de olivo (variedad Picual), mediante un anticuerpo monoclonal anti-Pla 1 (2A10). Tras incubar con el anticuerpo secundario, la señal se detectó mediante NBT/BCIP (Protocolo 14).

Los resultados mostraron la presencia de reacción cruzada del anticuerpo con 2 polipéptidos de un peso molecular de 18-20 kDa, similar al descrito para el alérgeno Ole e 1 (Fig. 3.22). Además, se observan 2 bandas adicionales de un peso molecular de 68 y 133 kDa, respectivamente, como resultado de la unión del anticuerpo a otras proteínas presentes en el grano de polen de olivo.

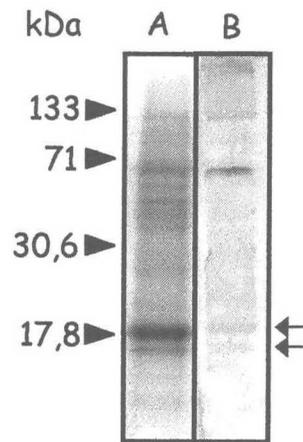


FIGURA 3.22. A: electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 %, a partir de extractos crudos de polen maduro de olivo (variedad Picual), y tinción con azul Coomassie. B: inmunodetección de la proteína Ole e 1 mediante un anticuerpo monoclonal anti-Pla l 1.

Así mismo, se procesaron muestras de polen maduro de olivo liberado de la antera (variedad Picual) y polen maduro dentro de la antera de *Plantago lanceolata* para MET (Protocolo 25). Para la inmunodetección se utilizaron los anticuerpos monoclonales 2A10 (anti-Pla l 1) y anti-Ole e 1, respectivamente.

Desde el punto de vista ultraestructural, existen diferencias importantes entre los pólenes de *Olea europaea* y de *Plantago lanceolata* (Fig. 3.23A-B). Así, se observa la presencia de numerosos gránulos de almidón en *Plantago*, ausentes en el polen maduro de olivo, cuya principal fuente de reserva son los lípidos. Además, a diferencia del polen de olivo, que es bicelular, el polen de *Plantago* es tricelular. Esto es, la segunda división mitótica, que da lugar a las dos células espermáticas, tiene lugar durante al maduración del grano y antes de la germinación.

Los resultados de inmunolocalización muestran que ambas proteínas alergénicas presentan reacción cruzada con los anticuerpos 2A10 y anti-Ole e 1, respectivamente. En el caso del anticuerpo 2A10, se observa un intenso marcado en el citoplasma de la célula vegetativa y en la exina y el material adherido a la misma del grano de polen de olivo (Fig. 3.23C). Por el contrario, la intina, el núcleo vegetativo y la célula generativa aparecen libres de marca. Respecto al anticuerpo anti-Ole e 1, el marcado es significativamente menor en el polen de *Plantago* y se localiza en el citoplasma y el núcleo de la célula vegetativa, y el citoplasma de la célula generativa (Fig. 3.23D). Los controles, en los que se omitió el anticuerpo primario, no mostraron un marcado significativo en ningún caso (datos no mostrados).

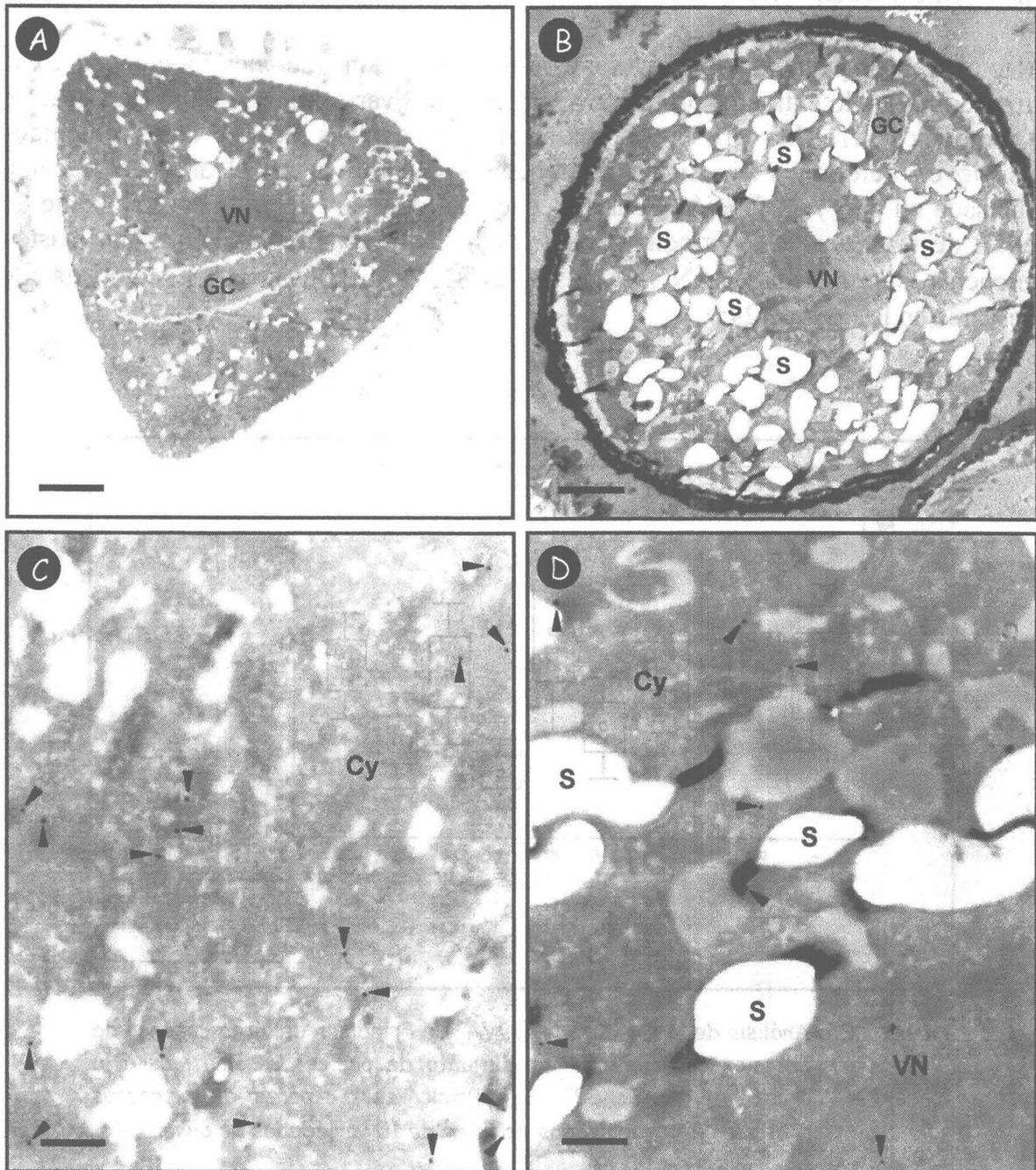


FIGURA 3.23. A: Sección de un grano de polen maduro de olivo (variedad Picual) a MET. B: Sección de un grano polen maduro de *Plantago lanceolata* a MET. C: Reacción cruzada (flechas) del anticuerpo monoclonal 2A10 de *Plantago* en polen maduro de olivo (variedad Picual). D: Reacción cruzada (flechas) del anticuerpo monoclonal anti-Ole e 1 de olivo en polen maduro dentro de la antera de *Plantago lanceolata*. Cy= citoplasma; GC= célula generativa; S= almidón; VN= núcleo vegetativo. Barras= 1 μm (A-B) y 4 μm (C-D).



3.6. IMPLICACIONES CLÍNICAS

Un total de 30 pacientes fueron sometidos a la prueba de alergia cutánea SPT, utilizando para ello extractos proteicos de polen de 10 variedades de olivo (ver detalles en protocolo 32). Una primera aproximación al análisis de los datos obtenidos consistió en determinar si existen diferencias significativas en el área de reacción (expresada en mm^2) en función de la procedencia (cultivar) del extracto, mediante un análisis de la varianza de Friedman. Los resultados obtenidos muestran que existen diferencias significativas (ANOVA $\chi^2_9 = 21.81$, $p < 0.009$), tal y como puede observarse en la figura 3.24:

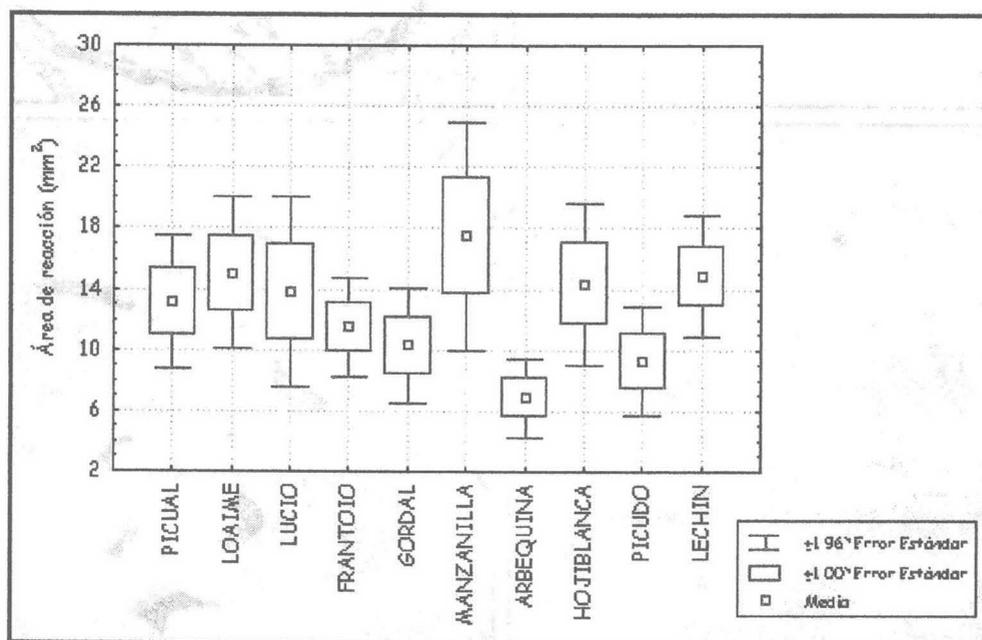


Figura 3.24. Análisis de la varianza (ANOVA) de Friedman del área cutánea de reacción (en mm^2) en un conjunto de pacientes sometidos a la prueba de alergia SPT (Skin Prick Test), a partir de extractos proteicos estandarizados de polen de 10 variedades de olivo.

Otro aspecto de interés analizado fue comprobar si el área de reacción está correlacionada con la cantidad de alérgeno mayoritario Ole e 1 presente en el grano de polen, en aquellas variedades analizadas. Para contestar a esta cuestión se realizaron análisis de correlación de Spearman. Los resultados del análisis (Fig. 3.25) muestran que existe una correlación positiva y significativa ($r_s = 0.72$, $t_8 = 2.94$, $p = 0.019$). Por tanto, podemos concluir que el área de reacción cutánea en los pacientes atópicos



sometidos a la prueba SPT depende de la cantidad de alérgeno mayoritario (Ole e 1) presente en el extracto utilizado en dicho ensayo.

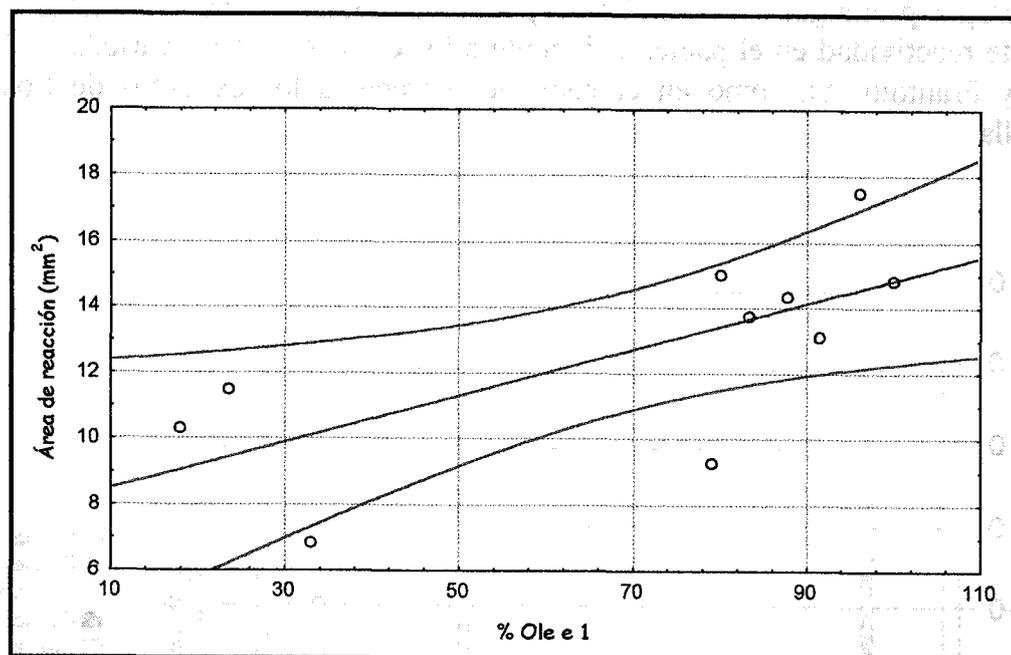


FIGURA 3.25. Análisis de regresión del área de reacción cutánea en pacientes alérgicos sobre la cantidad de alérgeno Ole e 1 (%) presente en el grano de polen de olivo (r = coeficiente de correlación).

En la figura 3.26 se representa la reactividad individualizada de varios pacientes a SPTs, a partir de extractos proteicos crudos de polen de los diez cultivares propuestos como modelo. En los pacientes 1, 2 y 3 aparece reactividad elevada al control positivo (histamina), así como a extractos de *Olea europaea* procedentes de kits comerciales de evaluación de alergia en los que no se especifican los cultivares utilizados como fuente. En el caso de los pacientes 1 y 3, aparece reactividad positiva a diversos cultivares modelo, incluso con valores de área de reacción mayores que los aparecidos frente al extracto comercial (Ej.: a la variedad Loaime en el caso del paciente 1, y a las variedades Loaime y Lechín en el caso del paciente 3). Por el contrario, la reactividad es generalmente reducida a las variedades Arbequina, Frantoio y Gordal en estos tres pacientes. El paciente 2 mostró menor reactividad a todas las variedades analizadas, si comparamos con los resultados obtenidos frente al extracto comercial.



Los pacientes 4, 5 y 6 mostraron una reactividad elevada frente al control positivo (histamina), pero no a extractos de *Olea europaea* procedentes de kits comerciales de evaluación de alergia, al tratarse de pacientes sometidos a inmunoterapia prolongada. Sin embargo puede apreciarse el mantenimiento de una importante reactividad en el paciente 4 frente a los extractos de las variedades Picual, Loaime y Frantoio, así como en el paciente 6 frente a los extractos de Loaime y Manzanilla.

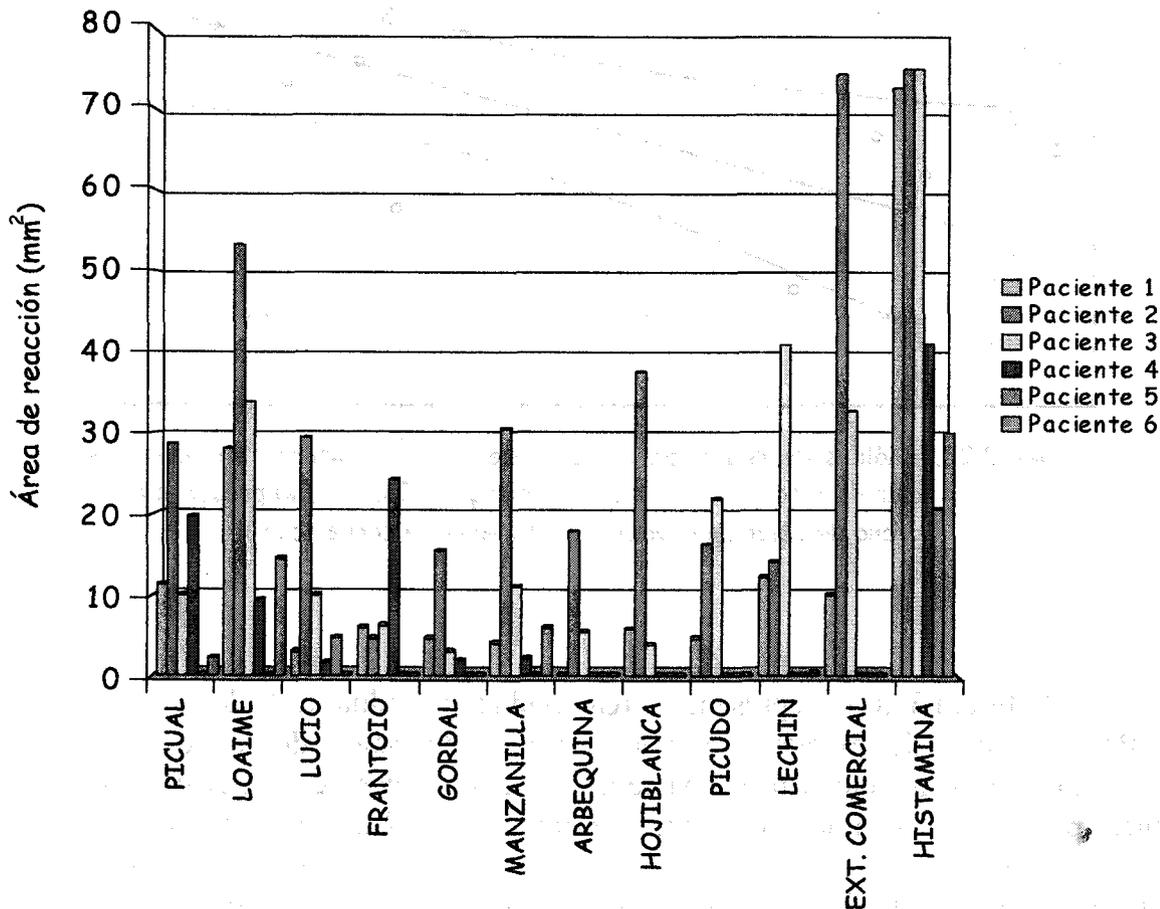


FIGURA 3.26. Representación gráfica de la reactividad individualizada de seis pacientes a SPTs, a partir de extractos crudos de polen de diez cultivares de olivo, un extracto procedente de un kit comercial utilizado en el diagnóstico de alergia al polen de esta especie, e histamina, esta última utilizada como control positivo.

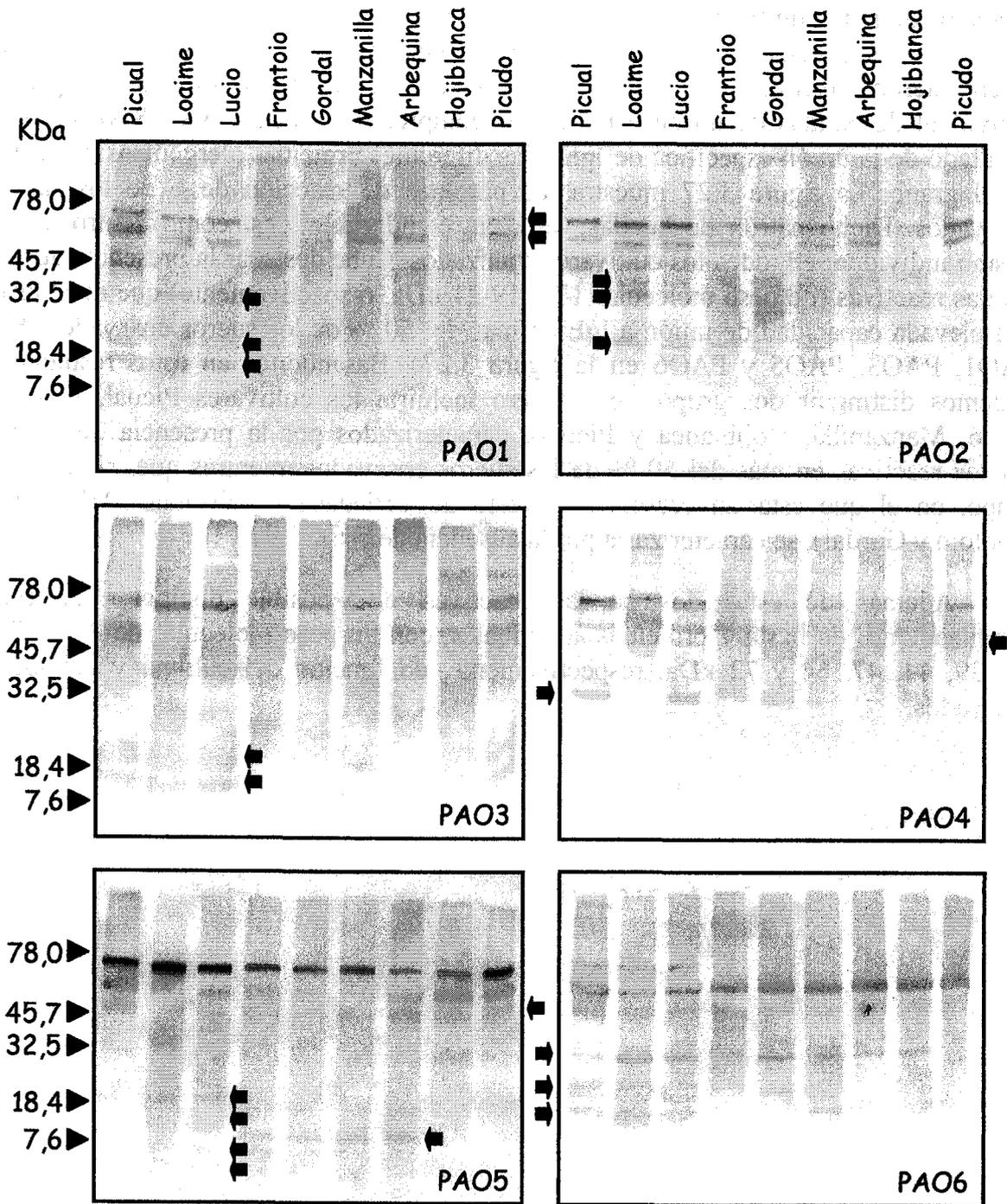


FIGURA 3.27. Western blots de extractos proteicos de polen de 9 variedades de olivo, probados con sueros policlonales de 6 pacientes alérgicos a dicho polen (PAO1-PAO6). Las bandas polipépticas más significativas aparecen señaladas mediante una flecha.



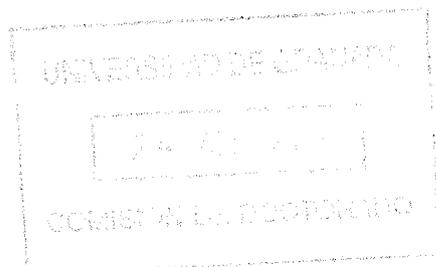
Por otro lado, se llevaron a cabo análisis de Western blot a partir de extractos proteicos de polen de 9 variedades de olivo (ver detalle en protocolo 13). Un total de 14 sueros pertenecientes a otros tantos pacientes atópicos, sensibilizados a dicho polen, fueron ensayados. En todos los casos se observó la aparición de un patrón individual de bandas de un peso molecular comprendido entre 7.6 y 78 kDa, como resultado de la unión específica de IgE a las diferentes proteínas alergénicas presentes en el grano. La figura 3.27 muestra los patrones de reacción de 6 de los sueros ensayados. Dicho patrón de bandas varía entre individuos, así como dentro de un mismo individuo, en todos los cultivares analizados. Cabe destacar la presencia de dos bandas reactivas (de peso molecular 17 y 19-21 kDa, respectivamente) que mostraron una elevada capacidad de unión a IgE en más del 50 % de los sueros ensayados (Ej.: PAO1, PAO3, PAO5 y PAO6 en la figura 3.27). Basándonos en estos resultados, podemos distinguir dos grupos: el primero incluiría los cultivares Picual, Loaime, Lucio, Manzanilla, Hojiblanca y Picudo, caracterizados por la presencia de dichas bandas reactivas en más del 50 % de los sueros ensayados mientras que, el segundo grupo, en el que estarían presentes el resto de variedades analizadas (Arbequina, Frantoio y Gordal), se caracterizaría por la ausencia de éstas.

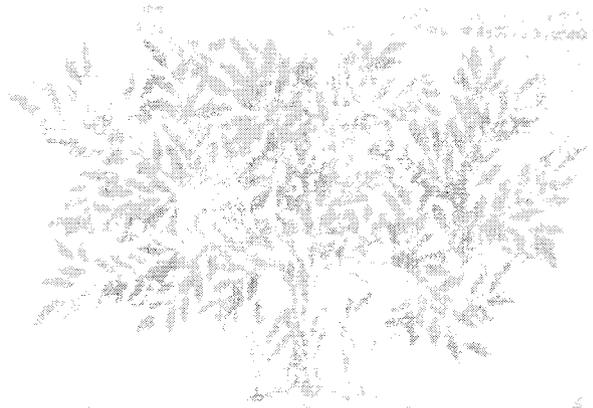
Además de estas dos bandas reactivas, fue posible distinguir distintas combinaciones de hasta 7 proteínas adicionales, con un peso molecular de 8, 12, 24, 32, 39, 44, 47, 64 y 72 kDa, respectivamente, en función del cultivar y del suero ensayados.

Discusión



Capítulo cuarto

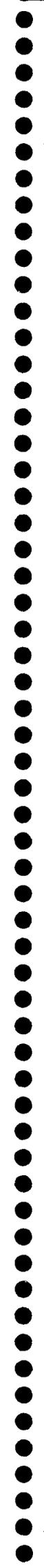




Faint, illegible text or a very low-resolution scan of a document page, appearing as a large, dense, circular halftone pattern.

Faint, illegible text or a very low-resolution scan of a document page, appearing as a horizontal line of text.

Faint, illegible text or a very low-resolution scan of a document page, appearing as a horizontal line of text.



Capítulo Cuarto

Discusión

"But in science the credit goes to the man who convinces the world, not to the man whom the idea first occurs"

Sir Francis Darwin (1848-1925)

Los estudios morfométricos llevados a cabo en la flor de olivo son útiles para determinar, de manera fiable, los diferentes estadios de desarrollo del grano de polen dentro de la antera

La ontogenia del grano de polen es un proceso continuo en el tiempo que transcurre dentro de la antera concomitante al desarrollo de la misma. No obstante, cuando se pretende estudiar en detalle aquellos aspectos directamente relacionados con dichos procesos de desarrollo y diferenciación, es necesario dividir la totalidad del proceso en una serie de estadios concretos, con objeto de poder obtener resultados fiables y fácilmente reproducibles. En el caso del olivo, y basándonos en los criterios propuestos por diversos autores (Knox, 1984; Fernández, 1986), podemos definir los siguientes 7 estadios en el desarrollo del polen: meiosis, tetrada, microspora joven y vacuolada, y grano de polen joven, medio y maduro.

La floración del olivo, en la variedad de referencia aquí estudiada, transcurre durante aproximadamente un mes y medio. Se inicia con la formación de pequeños primordios florales, y finaliza con la dehiscencia de las anteras, que facilita que el polen maduro salga al exterior. Inicialmente, encontramos que la mayor parte de las



anteras presentan células madre del polen (PMC) sin diferenciar respecto de las células del *tapetum* que las rodean. Una vez diferenciadas, las PMC inician la profase meiótica, que tiene una duración aproximada de una semana. La división meiótica propiamente dicha es muy breve, especialmente el tiempo transcurrido entre la primera y segunda división, y el resultado es la formación de tetradas. La interfase de la microspora dura aproximadamente 1 semana, predominando el estadio de microspora vacuolada, que precede a la división mitótica asimétrica que da lugar al grano de polen propiamente dicho. A partir de este momento, se inicia un largo periodo de interfase de unos 20-25 días, durante el cual la mayor parte de las anteras muestran en su interior granos de polen en distinto estadio de desarrollo, que se refleja tanto en la forma y lugar que ocupa el núcleo de la célula vegetativa y la célula generativa como en el grado de desarrollo del RE, población ribosómica, sustancias de reserva, etc. Estas observaciones coinciden en gran parte con los resultados obtenidos en estudios previos (Fernández, 1986), y permiten llegar a la conclusión de que la maduración del polen constituye la etapa de mayor duración (aproximadamente 2/3 partes del total) dentro del proceso de ontogenia y desarrollo del grano.

Aunque este proceso transcurre normalmente durante los meses de Abril y Mayo, el comienzo y el final del mismo, así como la rapidez con la que se desarrolla, viene determinado por la situación geográfica (latitud y altitud) del cultivo y factores de tipo climático, tales como la humedad relativa (que depende a su vez del índice de pluviometría de la zona) o la temperatura, éstos últimos muy variables de un año a otro. Por otro lado, el inicio del desarrollo de la antera no transcurre de manera sincronizada en todo el árbol, siendo más precoz en aquellas ramas que se encuentran orientadas hacia el sur, dado que la cantidad de luz y calor que reciben es mayor. Esta falta de sincronía se manifiesta dentro de una misma inflorescencia e incluso en la propia flor, aunque en este último caso en mucho menor grado (Alché, 1991).

Por estos motivos que se acaban de exponer, los estudios cronológicos descritos al inicio de este apartado no permiten determinar de manera fiable el momento correspondiente a cada una de las diferentes etapas de la formación y desarrollo del grano de polen, y cada año es necesario llevar a cabo el análisis de las muestras recolectadas. Una alternativa, que permite clasificar las inflorescencias en función del estadio de desarrollo del grano de polen, se basa en la medida de caracteres morfométricos de la propia flor, como son la longitud y anchura de la misma. Así, utilizando este criterio junto con otros de tipo morfológico (Ej.: color de la inflorescencia), Swoboda y col. (1995) definieron 5 estadios diferentes en el desarrollo del polen de abedul (*Betula verrucosa*) dentro de la antera, con objeto de llevar a cabo el análisis de expresión del alergeno Bet v 1.

Siguiendo este mismo criterio, en este trabajo se han definido 7 estadios de desarrollo del grano de polen de olivo dentro de la antera, con objeto de poder llevar a cabo análisis de expresión del alergeno Ole e 1, similares a los realizados por estos



autores. Como era de esperar, se observa que existe un incremento de los dos caracteres morfométricos (longitud y anchura de la flor) analizados durante el desarrollo de la antera, estando ambos parámetros correlacionados positivamente. Este hecho se explica por el incremento de tamaño que experimenta el grano de polen durante todos los estadios de su formación y desarrollo (Fernández, 1986), de forma similar a lo observado en *Tradescantia bracteata* (Mephan y Lane, 1970) y *Lillium sp* (Macarenhas, 1975). Estos cambios en el tamaño del grano de polen están correlacionados a su vez con incrementos en el tamaño de la antera (y, por tanto, de la flor). Así, tras liberarse de la tetrada, el área de la célula se duplica durante el periodo de transición del estadio joven al de microspora vacuolada (este incremento tan significativo se puede apreciar en la figura 3.2A, en el capítulo de resultados). A partir de este momento se produce un incremento progresivo del tamaño del grano hasta llegar al estadio de polen medio, momento en el cual dicho aumento se ralentiza (Fernández, 1986). La amplitud de los intervalos de longitud y anchura en cada uno de los estadios, es un reflejo del incremento de tamaño que se produce en cada momento. Dichos intervalos no se solapan, debido a la discontinuidad temporal en la toma de muestras, lo que garantiza una correcta definición de los mismos.

La expresión del gen OLE E 1 está regulada a nivel transcripcional

Existen pruebas de que durante la maduración del grano de polen existe una fase post-transcripcional durante la que tiene lugar un proceso de síntesis proteica muy activo (Mascarenhas, 1992). No obstante, dado que la mayoría de los estudios sobre alérgenos se han centrado en aspectos clínicos y en el desarrollo de métodos de diagnóstico fiables, apenas existen datos publicados hasta la fecha sobre el patrón de expresión espacial y temporal de dichas proteínas. Los escasos estudios sobre síntesis y acumulación de proteínas alérgicas durante el desarrollo del grano de polen se han llevado a cabo siguiendo dos aproximaciones diferentes: a) estudios inmunológicos a partir de anteras en desarrollo y, b) estudios inmunocitoquímicos de granos de polen en desarrollo.

Así, Linskens y col. (1980) determinaron el momento del desarrollo en el que se produce la aparición de proteínas alérgicas en el grano de polen del centeno (*Secale cereale*), mediante ensayos de unión específica de IgE a extractos de anteras en diferentes estadios de desarrollo. Los resultados obtenidos en ese trabajo muestran que la reactividad es máxima en el estadio de polen maduro. En un trabajo anterior, Knox and Heslop-Harrison (1971) mostraron que la actividad alérgica en el grano de polen de *Tagetes patulas* (Familia *Asteraceae*) comienza antes que en el centeno, concretamente durante el periodo de microspora vacuolada. Por otro lado, estudios más recientes en cebada (*Hordeum vulgare*) mediante inmunoblots, muestran que el alérgeno Hor v 9 se acumula durante los estadios finales del desarrollo del grano de polen, acumulándose hasta alcanzar un máximo en el grano de polen maduro (Astwood y Hill, 1996).



Los análisis de Western blot llevados a cabo en el presente trabajo nos han permitido determinar de manera semicuantitativa la abundancia relativa de las tres variantes de la proteína alergénica Ole e 1 al reaccionar con un anticuerpo monoclonal. La presencia de microheterogeneidades tanto en la secuencia aminoacídica como en la secuencia nucleotídica de este alérgeno ha sido referida ampliamente en anteriores trabajos (Villalba y col., 1993, 1994; Lombardero y col., 1994), y explica el alto grado de polimorfismo que presenta esta proteína. Este elevado polimorfismo es también característico de otros alérgenos presentes en pólenes de otras especies vegetales como algunas herbáceas (Johnson y Marsh, 1965), ambrosía (Bond y col., 1991) y abedul (Swoboda y col., 1995), entre otras. Además, en el caso de la proteína Ole e 1, la presencia de isoalérgenos se atribuye igualmente a la existencia de distintos grados de glucosilación (Lauzurica y col., 1988a; Villalba y col., 1990; Batanero y col., 1994b).

Diversos trabajos muestran la presencia masiva de transcritos correspondientes a los alérgenos Lol p 1 y Lol p 5 (Knox y col., 1989; Griffith y col., 1991b), Poa p 9 (Silvanovich y col., 1991) y Bet v 3 (Seiberler y col., 1994) en el grano de polen maduro de estas especies. No obstante, como ocurre en el caso de las proteínas, los datos disponibles sobre la síntesis y acumulación de dichos transcritos durante la ontogenia y el desarrollo del grano de polen son escasos hasta el momento. En un análisis del patrón de expresión espacial y temporal del alérgeno mayoritario del polen de abedul (Bet v 1) durante el desarrollo de la antera, Swoboda y col., (1995) observaron que la expresión de este gen se induce justo antes de la antesis, de forma que los transcritos se acumulan de forma masiva en el grano de polen maduro pero no en estadios previos. Además, dichos transcritos están presentes en hojas y callos, lo que sugiere que, bajo determinadas circunstancias, la proteína Bet v 1 podría sintetizarse en dichos tejidos (Pettenburger y col., 1992). La presencia de transcritos en diferentes tejidos podría deberse a un control de la expresión del gen a nivel translacional o post-translacional. El patrón de expresión descrito para Bet v 1 coincide con el del alérgeno Ory s 1 en el polen de arroz (*Oryza sativa*), cuyos transcritos se acumulan en el estadio de polen maduro (Xu y col., 1995). Finalmente, en otro trabajo en polen de cebada (*Hordeum vulgare*), Astwood y Hill (1996) observaron que los transcritos correspondientes al alérgeno Hor v 9 se sintetizan y acumulan durante la maduración del grano de polen, alcanzando los niveles máximos en el grano de polen maduro. Recientemente, Okada y col. (1999) han observado la presencia de niveles bajos de los transcritos correspondientes a las proteínas alergénicas Bra r 1 y Bra r 2, en el *tapetum* de la antera de *Brassica rapa*.

En el olivo, un estudio reciente muestra que la síntesis de los transcritos correspondientes al alérgeno Ole e 3 sigue un patrón similar al descrito para Bet v 1 (Cismondi, 2000). Así mismo, los estudios realizados por Villalba y col. (1994) mostraron que el gen OLE E 1 se transcribe únicamente en polen maduro. Con objeto de estudiar el patrón de expresión de dicho gen durante el desarrollo de la antera, se



han llevado a cabo análisis de RT-PCR e hibridación *in situ* a microscopía óptica. Los resultados muestran que el patrón de síntesis y acumulación de los transcritos es similar al de la proteína Ole e 1 y difiere con respecto a lo observado en anteriores trabajos. Así, los transcritos comienzan a sintetizarse y acumularse masivamente en el *tapetum* durante el estadio de tetrada y, a partir del momento en que este tejido comienza a degenerar, el nivel de transcritos comienza a incrementarse en el interior de las microsporas, a medida que éstas maduran. No se observó la presencia de transcritos en otros tejidos como hojas y sépalos, lo que corrobora los resultados obtenidos por Villalba y col. (1994). Todos estos datos sugieren que la expresión de este gen está probablemente regulada a nivel transcripcional.

¿Qué ocurre durante la germinación *in vitro*? Los análisis de expresión de la proteína Ole e 1 en el grano de polen de olivo durante el proceso de germinación *in vitro*, muestran la presencia abundante de las tres isoformas del alérgeno durante los distintos intervalos de tiempo estudiados, sin que se aprecien diferencias cuantitativas o cualitativas claras (M'rani-Alaoui, 2000). No obstante, los resultados de los análisis de densitometría muestran un descenso progresivo en los niveles de dichas proteínas durante las 8 horas siguientes al inicio de la germinación, niveles que vuelven a incrementarse en el intervalo 8h-16h. Al contrario de lo observado en el polen germinado, la cantidad de alérgeno no varía significativamente con el tiempo en aquellos granos que no germinan. En el medio de germinación se detectan cantidades mínimas de una única proteína (correspondiente a la variante monoglucosilada) a partir de las 2 horas de incubación (M'rani-Alaoui, 2000), incrementándose progresivamente hasta las 8 horas de cultivo. A partir de este momento, los niveles de este alérgeno disminuyen, siendo indetectables a partir de las 16 horas.

En la mayoría de las plantas estudiadas, ya sean especies con polen bicelular o tricelular, las proteínas necesarias para la germinación están presentes en el grano de polen maduro y sólo se requiere la síntesis *de novo* de dichas proteínas para el crecimiento posterior del tubo polínico (Mascarenhas, 1993), aunque existen algunas excepciones como ocurre en *Lilium*, *Clivia* (Franke y col., 1972) y *Typha* (Hoekstra y Bruinsma, 1979). Los resultados obtenidos en este trabajo con Ole e 1 confirman la hipótesis inicial y sugieren que dicha proteína podría jugar un papel clave en la germinación y el crecimiento del tubo polínico. La síntesis y acumulación del alérgeno durante la última fase del desarrollo del grano de polen y la síntesis *de novo* que tiene lugar durante el crecimiento del tubo sugieren esto último. El descenso que experimentan los niveles de alérgeno a lo largo de la hidratación y germinación podría deberse a que la proteína es metabolizada o bien, a que difunde al exterior. A favor de la primera hipótesis está el hecho de que la cantidad de alérgeno no varía significativamente en los granos que no germinan cuando comparamos con aquellos que sí lo hacen. Como prueba a favor de la segunda está la presencia de la proteína alérgica en el medio de germinación, así como el marcado adicional observado en



las paredes del tubo y en las paredes del tejido transmisor del estigma. En este caso, y puesto que no se ha detectado ningún péptido señal en la secuencia aminoacídica de Ole e 1, se debería asumir que el alérgeno, junto con otros compuestos de la célula, difunde pasivamente una vez que el grano de polen se hidrata, aprovechando que la integridad de la membrana plasmática aún no ha sido restablecida (Simon, 1974). Además, la presencia de Ole e 1 en el medio de germinación está en consonancia con el carácter hidrofílico de esta proteína (Villalba y col., 1993), que le permite difundir con cierta facilidad en medios acuosos. Este hecho podría ser el desencadenante de los procesos alérgicos, al entrar la proteína en contacto con las mucosas de aquellos individuos sensibilizados a dicho polen.

Por otro lado, trabajos pioneros en el uso de inhibidores de la síntesis de ARN (Ej.: actinomicina D) sugieren que la germinación y el crecimiento temprano del tubo polínico no dependen de la síntesis *de novo* de ARN, dado que los ARNm, ribosomas y ARNt necesarios para ello se sintetizan y acumulan durante la maduración del grano de polen, y persisten hasta su posterior uso durante la fase de germinación (Mascarenhas, 1988). Así, los estudios llevados a cabo en *Tradescantia* (Mascarenhas y col., 1974; Mascarenhas y Mermelstein, 1981), maíz (Hanson y col., 1989) y, más recientemente, en tabaco (Weterings y col., 1992), sugieren que no existen diferencias cualitativas entre los transcritos más representativos y abundantes presentes en el grano de polen sin germinar, y aquellos ARN mensajeros sintetizados *de novo* durante la germinación.

Los análisis de expresión del gen OLE E 1 llevados a cabo en este trabajo muestran que los niveles de transcritos en el grano de polen durante la germinación *in vitro* son inicialmente elevados. No obstante, se observa que existe un descenso en dichos niveles, paralelo al descrito para la proteína, durante las 8 horas siguientes al inicio del cultivo. Este hecho sugiere que la hipótesis sobre el control transcripcional de este gen es correcta. Resultados similares han sido observados para el gen NTP-303, que se expresa en el polen de tabaco y cuyos transcritos se acumulan en el ápice del tubo (Weterings y col., 1992, 1995). Por el contrario, los transcritos correspondientes al gen BCP-1 de *Brassica campestris* (Theerakulpisut y col., 1991), y varios ARNm de *Petunia inflata* (Mu y col., 1994a,b), persisten a elevados niveles en el tubo polínico durante su crecimiento, sin que existan cambios cuantitativos significativos. En la mayoría de las especies con polen bicelular, el crecimiento final del tubo y la división de la célula generativa depende de nuevos ARNm sintetizados una vez que el tubo polínico se ha formado (Mascarenhas, 1975). El incremento posterior de los niveles de transcritos correspondientes a Ole e 1 que se observa en el intervalo 8h-16h, sugiere que el crecimiento tardío del tubo polínico podría depender de una síntesis *de novo* de dichos transcritos.



Para explicar el desfase que se observa entre el inicio de la síntesis de los transcritos y la aparición de la proteína hay que considerar la particularidad del ciclo de ARN ribosómico (ARNr) que tiene lugar durante el desarrollo del grano de polen. Así, en algunas especies la población de ribosomas presentes en el citoplasma se ve severamente disminuida a lo largo de la profase meiótica (Mackenzie y col., 1967; Parchman y Lin, 1972; Dickinson y Li, 1988), mientras que, al final de la meiosis, se produce una repoblación en la que podrían estar implicadas unas estructuras denominadas nucleoloides (Dickinson y Heslop-Harrison, 1970; Rodríguez-García y Fernández, 1987). En otros casos, dicha repoblación tiene lugar después de la meiosis, durante el estadio de tetrada (Majewska-Sawka y Rodríguez-García, 1996). No obstante, en el caso del olivo, el número de ribosomas es todavía muy reducido en el estadio de microspora, a pesar de que existe una gran cantidad de nucleoloides en el núcleo de la célula (Alché y col., 1994), y apenas se observa la presencia de retículo endoplasmático rugoso (REr) en el citoplasma. Por tanto, la ausencia o reducción en la maquinaria translacional y la escasa presencia de REr podría ser la causa que explique la ausencia de la proteína Ole e 1 en los estadios de tetrada y microspora, más que la existencia de algún mecanismo de regulación post-transcripcional.

La figura 4.1 resume el patrón de expresión temporal y espacial de la proteína Ole e 1 y sus transcritos:

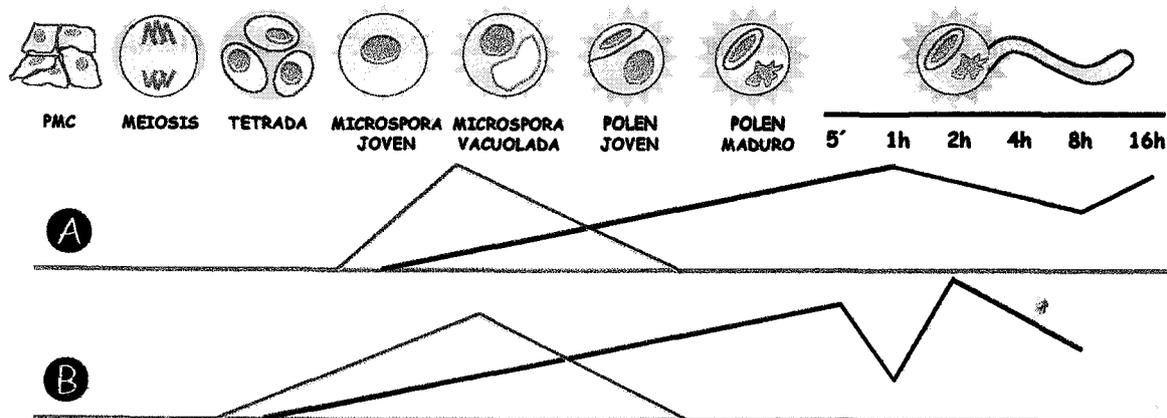


FIGURA 4.1. Patrón de expresión de la proteína Ole e 1 (A) y sus transcritos (B) en el *tapetum* (rojo) durante el desarrollo de la antera, y en el grano de polen (negro) durante su desarrollo dentro de la antera y la germinación *in vitro*. PMC= células madre del polen.

Aunque hemos dibujado el esquema de la expresión del alérgeno Ole e 1 durante el desarrollo, quedan aún algunas cuestiones de interés por resolver, como son: a) determinar qué mecanismos regulan la expresión transcripcional del gen y, b) aclarar el significado biológico que tiene la presencia de la proteína en el *tapetum*.



La síntesis y almacenamiento del alérgeno Ole e 1 tiene lugar en el retículo endoplasmático rugoso, dentro del grano de polen.

La localización celular de las proteínas alérgicas permite conectar los resultados bioquímicos con las características morfológicas de la célula y aporta datos sobre la posible función biológica de dichas moléculas. El avance en este campo ha ido paralelo a la optimización de las técnicas de obtención de anticuerpos y a la mejora en el procesamiento de las muestras para microscopía. Así, los sueros policlonales, desarrollados frente a extractos proteicos muy heterogéneos en su composición, y de uso común hace unos años, han dado paso a una nueva generación de anticuerpos monoclonales, con capacidad de distinguir entre los diferentes epítopos de una misma molécula, lo que ha supuesto un incremento en la especificidad de los resultados obtenidos. Por otro lado, dado que la mayoría de las proteínas alérgicas son moléculas muy hidrosolubles, se han utilizado normalmente técnicas de fijación anhídrida para su inmunolocalización en el grano de polen. No obstante, estas técnicas conducen generalmente a una preservación ultraestructural limitada, lo que lleva en ocasiones a una interpretación errónea de los resultados.

Las ventajas de los métodos de criofijación y criosustitución utilizados en el presente trabajo han sido puestas de manifiesto en estudios inmunocitoquímicos, así como morfológicos, de hibridación *in situ* y microanálisis de rayos X (Roos y Morgan, 1990), e incluyen: a) una mejor preservación de la ultraestructura de las muestras, b) la inmovilización inmediata de las proteínas en su localización original al evitarse la difusión que tiene lugar con el uso de fijadores químicos acuosos convencionales, y c) el mantenimiento de la antigenicidad de estas moléculas.

La presencia de alérgenos en el citoplasma del grano de polen ha sido estudiada mediante inmunocitoquímica a microscopía electrónica en varias especies vegetales entre las que se incluyen el ballico (*Lolium perenne*) (Knox y col., 1980; Howlett y col., 1981; Staff y col., 1990), el fleo (*Phleum pratense*) (Grote y col., 1994), y el abedul (*Betula verrucosa*) (Grote, 1991). En el caso del olivo, el uso de técnicas convencionales de fijación e inclusión en Epon ha permitido la localización precisa del alérgeno Ole e 1 en el interior de las cisternas del retículo endoplasmático rugoso durante los últimos estadios de maduración del grano de polen (Martín-Orozco y col., 1994; Rodríguez-García y col., 1995a,b), lo que prueba que se trata de una proteína termoestable, dado que la inclusión se realizó a 60 °C, sin que existiera una pérdida aparente de la antigenicidad, como demuestra la presencia de un intenso marcado. Por otro lado, la especificidad de la señal y la ausencia de marcado en el núcleo y el resto de orgánulos citoplasmáticos descartan la posibilidad de que exista una difusión masiva por parte de la proteína, como se ha sugerido en trabajos previos (Staff y col., 1990; Grote, 1991). Así mismo, se ha descrito la presencia de proteínas antigénicas en las cisternas del RER en el grano de polen de otras especies de la familia *Oleaceae* como el aligustre, el fresno, la lila y la forsitia, en las que se observa la presencia de



reacción cruzada con varios anticuerpos monoclonales desarrollados frente al alérgeno mayoritario del polen de olivo (Martín-Orozco y col., 1994; Fernández y col., 1996).

Por otro lado, la presencia de cisternas dilatadas de retículo endoplasmático en el grano de polen se ha descrito también en pólenes de diferentes especies (Kroh, 1967; Jensen y col., 1974; Cresti y col., 1985, 1988; Pacini y Juniper, 1979a; Cresti y Keijzer, 1985; Ciampolini y col., 1988; Weber, 1988; Tiwari y col., 1990; Van Aelst y Van Went, 1991; Luegmayer, 1993). Se ha propuesto que dicho sistema podría jugar un papel clave como lugar de almacenamiento para proteínas gametofíticas y sus precursores (Knox y Heslop-Harrison, 1970; Jensen y col., 1974; Heslop-Harrison, 1975; Pacini y Juniper, 1979a), así como de aquellos materiales necesarios para el crecimiento del tubo polínico (Cresti y col., 1985).

Los resultados de inmunolocalización obtenidos en el presente trabajo mediante el uso de criotécnicas no sólo corroboran sino que mejoran aquellos obtenidos mediante el uso de técnicas convencionales y documentan de manera convincente por primera vez la implicación de este sistema en el almacenamiento del alérgeno mayoritario del polen de olivo. Además, el RER podría ser el lugar de síntesis del alérgeno Ole e 1, siguiendo el esquema ampliamente extendido de síntesis en los ribosomas adosados al retículo y transporte simultáneo del polipéptido al lumen de la cisterna, tal es el caso de numerosas proteínas presentes en el endospermo de cereales (Khoo y Wolf, 1970; Larkins y Hurkman, 1978; Oparka y Harris, 1982; Krishnan y col., 1986). Existen evidencias claras que apoyan esta hipótesis. Así, durante el desarrollo del grano de polen, el marcado de la proteína alérgica en las cisternas comienza a ser visible en el estadio de polen bicelular medio (Rodríguez-García y col., 1995a), momento en el cuál el retículo endoplasmático rugoso muestra un grado de diferenciación apreciable con relación a sus dimensiones y contenido (Rodríguez-García y Fernández, 1990), lo que sugiere que la síntesis de Ole e 1 tiene lugar en el RER durante las etapas iniciales de la maduración del grano. Los estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio, en los que se describe el proceso de diferenciación del retículo endoplasmático durante las diferentes etapas del desarrollo del grano de polen de olivo (Rodríguez García y Fernández, 1990), nos han sido de gran utilidad para la correcta interpretación de la localización ultraestructural del alérgeno. Este hecho viene a señalar la importancia que tienen los estudios convencionales de microscopía electrónica para llevar a cabo una correcta interpretación de los resultados inmunocitoquímicos. Así, resultados similares obtenidos en experimentos de localización del alérgeno Bet v 1 en el polen de abedul (Grote, 1991) condujeron a una diferente interpretación debido a una mala preservación del material y a la falta de estudios ultraestructurales previos.

Por otro lado, los experimentos de RT-PCR *in situ* muestran que los transcritos correspondientes a la proteína Ole e 1 aparecen frecuentemente asociados a los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso en el citoplasma de la célula vegetativa



del grano de polen maduro. Este hecho constituye, una vez más, evidencia de que la síntesis proteica del alérgeno Ole e 1 podría tener lugar en las cisternas del retículo endoplasmático rugoso.

La utilización de técnicas de hibridación *in situ* basadas en PCR a nivel ultraestructural apenas ha sido documentada hasta el momento (Cohen, 1996; Kareem y col., 1997). Estos métodos de amplificación génica *in situ* combinan las ventajas de ambas técnicas, incrementando de manera notable el número de copias de la secuencia blanco de la amplificación para su posterior detección mediante hibridación (directa) o inmunocitoquímica (indirecta). En el caso de plantas, existen dos únicos precedentes hasta la fecha (Johansen, 1997; Deeken y Kaldenhoff, 1997) y en ambos casos la localización se llevó a cabo mediante microscopía óptica. En el primero, el uso de las técnicas de PCR-IS y RT-PCR-IS permitió la localización del gen de la RUBISCO (ribulosa 1-5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa) y sus transcritos correspondientes en varios tejidos vegetales. Por su parte, Deeken y Kaldenhoff (1997) utilizaron la técnica de RT-PCR-IS para detectar la presencia de transcritos correspondientes a una proteína kinasa receptora, en cotiledones de semillas de *Arabidopsis thaliana*. Los resultados obtenidos en el presente trabajo constituyen, por tanto, la primera contribución al desarrollo de esta técnica a nivel ultraestructural en plantas, al tiempo que suponen una mejora substancial en sensibilidad cuando comparamos con los resultados obtenidos mediante el uso de técnicas convencionales de hibridación *in situ* (Alché y col., 1999).

Una cuestión aún por aclarar es determinar como se dirige la síntesis de dicho alérgeno hacia el interior de las cisternas del RER. Las señales que conducen a una determinada proteína hacia una localización subcelular apropiada se encuentran normalmente codificadas en su propia secuencia aminoacídica. Las características del extremo NH₂ de la proteína Ole e 1 y la presencia del motivo Ala-Xaa-Ala (Villalba y col., 1993), la secuencia más frecuente que precede al lugar de procesamiento del péptido señal (Carne y Scheele, 1985), podría explicar la retención de esta proteína en el retículo.

La proteína alérgica Ole e 1 está presente en la pared del grano de polen y en el tapetum de la antera

La pared celular se ha considerado tradicionalmente como un lugar de la célula donde transcurren multitud de reacciones enzimáticas, así como posible destino final de numerosas proteínas alérgicas (Knox y Heslop-Harrison, 1969, 1970). La procedencia de las mismas se ha atribuido a dos fuentes diferentes: proteínas sintetizadas en el citoplasma, que posteriormente difunden pasivamente al exterior, bajo la influencia de un gradiente de concentración (Simon, 1974) o bien, proteínas sintetizadas en el *tapetum*, que son depositadas después en la cubierta del polen (Knox, 1979).



La presencia de proteínas alergénicas en la pared celular del grano de polen ha sido documentada, mediante técnicas de microscopía electrónica o de fluorescencia, en varias especies vegetales entre las que se incluyen: *Phleum pratense* (Grote y col., 1994), *Parietaria judaica* (Casas y col., 1996), *Lolium perenne* (Knox y col., 1980; Howlett y col., 1981; Staff y col., 1990), *Cryptomeria japonica* (Takahashi y col., 1989; Miki-Hirosige y col., 1994) y *Betula verrucosa* (Grote, 1991, 1992). Se han propuesto diversas hipótesis para tratar de explicar la presencia o ausencia de alérgenos en la pared del grano de polen de varias especies. La inmunolocalización de compuestos alergénicos en la intina, la capa más interna de la pared, podría indicar la presencia de proteínas relacionadas con la activación del grano (Casas y col., 1996). La ausencia de marcado en la misma que se observa en el polen de *Lolium* y *Cryptomeria*, se atribuye a la movilidad de estas proteínas solubles en agua, como consecuencia del grado de hidratación presente en los fijadores acuosos convencionales (Staff y col., 1990; Miki-Hirosige y col., 1994). Por otro lado, la presencia de proteínas alergénicas en la exina, la capa más externa de la pared del polen, podría ser resultado de una secreción desde el lugar de síntesis, durante el desarrollo del grano.

Los estudios iniciales de inmunolocalización del alérgeno Ole e 1 llevados a cabo por Rodríguez-García y col. (1995a,b), y Fernández y col. (1996), fallaron en demostrar la presencia de esta proteína en la pared del grano de polen, debido probablemente a la utilización de fijadores convencionales que podrían haber eliminado la proteína adherida al exterior de la pared celular. Por el contrario, el uso de criotécnicas para el procesamiento de las muestras ha dado como resultado la inmunolocalización del alérgeno Ole e 1 en la ectexina (la capa más externa de la pared del polen). Durante la germinación *in vitro*, la proteína alergénica se localiza en el interior de las cisternas del retículo endoplásmico rugoso, dispersas por todo el citoplasma del tubo polínico (M'rani-Alaoui, 2000). No obstante, en granos de polen germinados *in vivo*, se observa un marcado adicional en las paredes del tubo, así como en las paredes del tejido transmisor del estigma (M'rani-Alaoui, 2000).

Por otro lado, el *tapetum* ha sido considerado durante mucho tiempo como lugar de origen del material proteico adherido a la exina, así como de proteínas responsables del fenómeno de alergia respiratoria al polen inhalado (Knox y col., 1970; Knox y Heslop-Harrison, 1971; Pacini, 1994). No obstante, la presencia de componentes alergénicos en dicho tejido no ha sido abordada hasta el momento debido a las dificultades técnicas en su procesado para los estudios de inmunolocalización. En el presente trabajo, la utilización de criotécnicas combinada con la microscopía de campo oscuro ha permitido detectar la presencia de una gran cantidad de la proteína alergénica Ole e 1 en las células del *tapetum*. Dado que el marcado en dicho tejido inicialmente es significativamente mayor que el observado en las microsporas en desarrollo, podemos asumir que la aparición temprana de esta proteína durante el



desarrollo de la antera tiene lugar aquí. Queda claro, por tanto, que este tejido esporofítico está implicado directamente en la síntesis y acumulación de Ole e 1. La mayor parte de las proteínas que van ser secretadas son sintetizadas en las membranas del REr y transportadas a la superficie celular a través de vesículas que se forman en el aparato de Golgi (Jones and Robinson, 1989). La ausencia de marcado en dicho orgánulo así como en la intina (la capa más interna de la pared del polen) sugiere que el alérgeno Ole e 1 no se secreta activamente, aunque al ser una proteína hidrosoluble podría difundir de forma pasiva en un medio acuoso. Por tanto, cabe la posibilidad de que la mayor parte del alérgeno que se localiza en la pared provenga del *tapetum*, una vez que este tejido degenera y sus componentes son liberados al lóculo de la antera.

La localización subcelular y ultraestructural del alérgeno en dicho tejido no fue posible dado que el mantenimiento de la estructura, aunque sustancialmente mejorado, fue todavía muy pobre. Para que ello sea posible, será necesario optimizar los métodos de criofijación e inclusión a baja temperatura para este tejido, así como las técnicas de visualización.

Aproximación a la función biológica del alérgeno mayoritario del polen de olivo

Las proteínas alérgicas del polen ejercen funciones biológicas en muchos casos hasta ahora desconocidas. Únicamente las profilinas, caracterizadas como panalérgenos en el grano de polen (Martínez y col., 1995; Valenta y col., 1992), parecen tener asignado un papel claro en el control de la polimerización de la actina en las células eucariotas (Theriot y Mitchinson, 1993). Sin embargo, gracias al avance que la biología molecular ha experimentado durante la última década, están empezando a obtenerse evidencias que sugieren que los alérgenos desempeñan un papel importante en sucesos clave del desarrollo del grano de polen (Hanson y col., 1989; Twell y col., 1989; McCormick, 1991; Mascarenhas, 1992; McCormick, 1993). Así, el conocimiento de la secuencia de estas proteínas y sus genes correspondientes permite buscar similitudes en las bases de datos con otras secuencias conocidas, y obtener pruebas indirectas de la posible función biológica que desempeñan estas moléculas en el polen. Al mismo tiempo, se ha podido aislar y silenciar algunos de estos genes durante el desarrollo del polen con objeto de diseccionar su función.

Uno de los casos mejor estudiados es el del alérgeno mayoritario del polen de abedul (Bet v 1), que muestra una elevada homología con una familia de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Breiteneder y col., 1989), identificadas en varias especies de plantas. Dichos genes forman parte de la respuesta de resistencia por parte de la planta frente al ataque de microbios patógenos. La infección, percibida a través de una cascada de señales, induce la expresión de las diferentes proteínas PR (Ej.: quitinasas), que presentan actividad antimicrobiana (Briggs, 1995). Existen estudios que muestran que el conjunto de genes BET V 1 es activado en un cultivo de células



de abedul en presencia de patógenos microbianos (Swoboda y col., 1994) y que la proteína Bet v 1 presenta actividad ribonucleasa (Bufe y col., 1996). Estos resultados sugieren que el alérgeno Bet v 1 podría estar implicado en la protección de los tejidos reproductivos femeninos frente al ataque de patógenos, durante el crecimiento del tubo polínico. Alternativamente, el alérgeno podría ser requerido para el crecimiento del tubo polínico a través del estigma, proceso que muestra analogía con las interacciones entre patógeno y hospedador (Dickinson, 1994) y en el que podrían intervenir proteínas con actividad ribonucleasa (Murfett y col., 1994).

En esta misma línea, los trabajos de Bufo y col. (1995) muestran que el alérgeno Phl p 5, que presenta actividad ribonucleasa, difunde desde el grano de polen al añadir ácido salicílico, una hormona señal en la resistencia de plantas (van de Rhee y col., 1990; Gaffney y col., 1993), al medio. Más recientemente, Karamloo y col. (1999) observaron que el alérgeno minoritario del polen de abedul Bet v 5 muestra una homología del 60-80 % con una familia de proteínas (isoflavona reductasas) también implicadas en reacciones de defensa de la planta.

Aunque no podemos descartar que la función de alguna de las proteínas alérgicas sea meramente estructural, los datos obtenidos hasta el momento muestran que la mayoría de estas moléculas presentan algún tipo de actividad biológica. Dentro de este grupo cabe destacar los dos alérgenos mayoritarios de *Cryptomeria japonica* (Cry j 1 y Cry j 2), que se localizan en la pared del grano de polen (Miki-Hirosige y col. 1994), y que muestran actividad pectato liasa y polimetilgalacturonasa, respectivamente (Taniguchi y col., 1995; Ohtsuki y col., 1995). Puesto que ambas enzimas están implicadas en la síntesis y degradación de polisacáridos de la pared celular, los autores han postulado que estos alérgenos podrían estar implicados en el crecimiento de la pared del tubo polínico. Algunos alérgenos presentan en su secuencia un centro activo similar al del enzima pectato liasa, aunque no está demostrado que presenten dicha actividad, tal es el caso de las proteínas Cup a 1 (Aceituno y col. 2000), Jun a 1 y Cha o 1 (Midoro-Horiuti y col., 1999). Recientemente, Suck y col. (2000) observaron que el alérgeno Phl p 13 muestra una cierta homología con enzimas poligalacturonasas de varias especies.

Existe un grupo de alérgenos del polen cuya característica común es la presencia de una gran cantidad de residuos de cisteína (Cys) en su secuencia aminoacídica, tal es el caso de Amb a 5 en el polen de *Ambrosia artemisiifolia* (Mole y col., 1975) y Hev b 1 en el polen de *Hevea brasiliensis* (Templeton y col., 1994), o largas regiones ricas en Cys, como es el caso de las proteínas Amb a 1 y Amb a 2 (Griffith y col., 1991a) y algunos alérgenos incluidos en el denominado grupo 1, presentes en el polen de algunas gramíneas (ver revisión, Knox y Suphioglu, 1996). Aparentemente, todas estas proteínas carecen de capacidad catalítica pero tienden a unirse a otras moléculas tales como carbohidratos, proteínas y lípidos. Se asume que los residuos de cisteína podrían formar enlaces disulfuro dando lugar a motivos



estructurales de tipo toxina-aglutinina, presente en algunas toxinas y lectinas (Drenth y col., 1980), haciendo de estas moléculas candidatos ideales para llevar a cabo papeles de reconocimiento y especificidad. Así por ejemplo, el alergeno Lol p 1, presente en el polen de *Lolium perenne*, contiene una zona rica en cisteínas en el extremo N-terminal de la secuencia aminoacídica, una zona o dominio de unión a azúcares en el extremo carboxilo, y un péptido señal hidrofóbico, similar al del enzima α -amilasa, que sugiere que la proteína es secretada (Griffith y col., 1991b). Todas estas características estructurales indican que Lol p 1 podría desempeñar un papel en las interacciones celulares que tienen durante la entrada del tubo polínico en el estigma y su posterior crecimiento intercelular a través del estilo.

Finalmente, otro grupo interesante, para el que recientemente se ha propuesto el nombre genérico de *polcalcinas* (Ledesma y col., 1998b), incluye a todos aquellos alérgenos presentes en el grano de polen que contienen uno o varios motivos de unión a calcio en su secuencia aminoacídica (ver tabla 1.4 en Introducción). Tanto el calcio como las proteínas unidas a éste (Ej.: calmodulina) parecen estar implicadas en la regulación de la expresión de genes relacionados con muchos fenómenos celulares que tienen lugar en el grano de polen (Franklin-Tong, 1999). Dichas proteínas son generalmente citosólicas o aparecen asociadas a sistemas de membrana, modulando la dinámica de la concentración de calcio citosólico (Sanders y col., 1999). También cabe la posibilidad de que dichas proteínas desempeñen un papel como mensajeros secundarios en la transferencia de señales en respuesta a estímulos externos, modulando la activación de enzimas implicadas en funciones tales como mitosis (Wick y col., 1985), inducción de la disociación de microtúbulos (Schliwa y col., 1981) y crecimiento del tubo polínico (Haußer y col., 1984).

Por otro lado, los estudios de inmunocitoquímica aportan datos sobre la localización subcelular de los alérgenos en el grano de polen y el lugar de síntesis y almacenamiento, que podrían ayudar a entender su función biológica. Así por ejemplo, la presencia dichas proteínas en la pared celular y el material extracelular asociado a la misma, como ocurre por ejemplo con los alérgenos Lol p 1 (Staff y col., 1990), Bet v 1 (Grote, 1991, 1992), Cry j 1 (Miki-Hirosige, 1994), Phl p 1 y Phl p 3 (Grote y col., 1994), Hor v 9 (Astwood y Hill, 1996) y varias proteínas alérgénicas de *Parietaria judaica* (Casas y col., 1996), permitiría el contacto directo entre los sistemas de reconocimiento del grano de polen y la superficie del estigma durante la hidratación, y la germinación posterior del tubo polínico (Howlett y col., 1973). Por otro lado, la proteína Lol p 5b, que se sintetiza en forma de precursor, es transportada a los amiloplastos en el grano de polen maduro y se acumula en los gránulos de almidón. Estos datos sugieren que su papel biológico podría estar relacionado con la movilización del almidón durante la germinación y crecimiento del tubo polínico (Singh y col., 1991).



Llegados a este punto, consideremos la siguiente cuestión: ¿qué sabemos acerca de la función biológica de Ole e 1 en el grano de polen del olivo?. Al comparar la secuencia aminoacídica de este alérgeno con otras secuencias conocidas presentes en las bases de datos, encontramos una homología del 35-40 % con los polipéptidos codificados por los genes *LAT52*, *Zmc13* y *OSPSG*, presentes en el polen de tomate, maíz y arroz, respectivamente (Villalba y col., 1993). Las proteínas codificadas por estos genes tienen un peso molecular similar al alérgeno Ole e 1 y presentan un lugar potencial de N-glucosilación. Todas muestran en su secuencia una región de 7 aminoácidos que se repite, probablemente implicada en la función biológica, y 6 residuos de cisteína en posiciones idénticas, con implicaciones obvias en la estructura terciaria final de la proteína. A partir de los experimentos de represión antisense llevados a cabo por Muschiatti y col. (1994) para el producto del gen *LAT52*, estos autores observaron que la reducción en la expresión de dicho gen está correlacionada con un funcionamiento anormal del grano de polen durante la germinación. Estos resultados sugieren que dicha proteína podría jugar un papel importante en la hidratación del grano y/o germinación del tubo polínico (McCormick, 1993). Por tanto, en virtud de la homología que esta proteína muestra con el alérgeno Ole e 1, cabría esperar una función similar para éste último.

Los datos obtenidos a partir de los análisis de expresión llevados a cabo en el presente trabajo confirman esta teoría, a saber: 1) la síntesis y acumulación de la proteína se produce durante las etapas finales de la maduración del grano, alcanzando los niveles máximos justo antes de la antesis, 2) la proteína, aunque presenta niveles cuantitativos muy diferentes, está presente en el polen de todas las variedades de olivo analizadas, y 3) existe una síntesis *de novo* tanto de transcritos como de proteína durante la germinación *in vitro* y posterior crecimiento del tubo polínico. Por tanto, parece claro que el alérgeno Ole e 1 podría estar implicado en el proceso de germinación y posterior crecimiento del tubo polínico. La siguiente cuestión, pues, es determinar de qué manera está implicada en dichos procesos.

Las plantas con un "estigma seco" (Heslop-Harrison y Shivanna, 1977), presentan una papila estigmática cubierta por una cutícula continua, que representa una de las principales barreras para la entrada del tubo polínico (Heslop-Harrison, 1975; Heslop-Harrison y col. 1975). Se ha postulado que una cutinasa presente en el grano de polen y secretada por el ápice del tubo polínico degradaría la cutícula del estigma, facilitando así la entrada del mismo en su camino hacia el ovario. Recientemente, ha sido purificada y clonada una proteína con actividad cutinasa en la cubierta del grano de polen de *Brassica napus* (Hiscock y col., 1994). Esta proteína muestra una cierta homología en el extremo NH₂-terminal de su secuencia aminoacídica con el alérgeno Ole e 1 (Dr. S. Hiscock, Department of Plant Sciences, University of Oxford. Comunicación personal; ver figura 4.2). En el caso del olivo, no hay estudios hasta el momento que demuestren la presencia de una cutícula que recubra el estigma, pero no



podemos descartar su existencia. A partir de estos datos, se consideró la posibilidad de que Ole e 1 fuera la proteína homóloga al enzima aislado en *Brassica*.



FIGURA 4.2. Homología parcial en el extremo NH₂-terminal de la proteína Ole e 1 con una cutinasa del polen de *Brassica napus*. Sustituciones conservativas (*).

Los ensayos de actividad butirato esterasa *in vitro* a partir de extractos crudos de polen maduro de olivo llevados a cabo en el presente trabajo mostraron la existencia de un elevado nivel de dicha actividad enzimática en el grano, mientras que no se observó actividad en extractos correspondientes a la fracción proteica purificada. La causa podría ser la utilización de PMSF, un potente inhibidor de enzimas proteasas, en la preparación de dichos extractos dado que, aparentemente, también es un agente inhibidor de dicha actividad. Por otro lado, los ensayos de actividad acetato y butirato esterasa en geles de poliacrilamida mostraron que existen al menos dos polipéptidos capaces de catalizar la hidrólisis de enlaces éster. El peso de una de estas bandas coincide con el de la proteína Ole e 1, aunque la intensidad de la banda es menor de lo esperado, dado que el alérgeno representa aproximadamente un 20 % de la cantidad total de proteínas presentes en el grano de polen. Análisis posteriores mostraron la presencia de otras proteínas en el extracto que fueron purificadas junto con Ole e 1. Por otro lado, los estudios de inmunolocalización llevados a cabo en este trabajo muestran que dicha proteína no está presente en la intina, considerada como el lugar de almacenamiento de las enzimas proteolíticas e hidrolíticas necesarias para la salida del tubo polínico y el posterior crecimiento del mismo dentro del estigma (Knox, 1984). Por tanto, aunque no podemos descartar totalmente la posibilidad de que Ole e 1 tenga actividad esterasa, esta hipótesis parece muy improbable. Para aclarar este punto, será necesario expresar la proteína *in vitro* y repetir los ensayos de actividad.

Podemos especular sobre otras posibles funciones atribuibles a la proteína alérgica Ole e 1 durante la germinación y el crecimiento del tubo polínico (ver tabla 4.1). Cabe señalar que ninguna de las hipótesis que a continuación se presentan es excluyente, por lo que cabría la posibilidad de que la proteína desempeñara una doble función en el polen. La primera hipótesis está relacionada con la creación del gradiente osmótico necesario para la germinación. La hidratación del grano de polen se produce debido a diferencias en el potencial hídrico entre el estigma (o el medio, en un sistema *in vitro*) y el grano (Heslop-Harrison y Shivanna, 1977). El alto contenido en la



proteína (20 % del total) en el grano de polen maduro podría determinar el gradiente osmótico necesario para la hidratación. Por otro lado, la síntesis de esta proteína durante el crecimiento del tubo polínico contribuiría a mantener dicho gradiente. En contra de esta hipótesis está el hecho de que los niveles de alérgeno varían muy significativamente entre los distintos cultivares analizados. No obstante, hasta el momento, no existen estudios detallados que muestren si existen diferencias en la capacidad de hidratación del polen de olivo dependiendo de la variedad considerada.

TABLA 4.1. Algunas posibles funciones de la proteína Ole e 1 durante la germinación del grano de polen y/o el crecimiento del tubo polínico.

POSIBLE FUNCIÓN BIOLÓGICA			
	GRADIENTE OSMÓTICO	RECONOCIMIENTO POLEN-ESTIGMA	RECAMBIO PROTEICO
A FAVOR	Niveles elevados de la proteína antes de la hidratación y durante la germinación	La proteína está presente en la exina La proteína difunde pasivamente durante la germinación	Niveles elevados de la proteína en el grano de polen maduro
EN CONTRA	Niveles distintos de la proteína entre variedades	Presencia de la proteína en el RER	Hay síntesis de novo de la proteína durante la germinación

Una segunda hipótesis apunta a los procesos de reconocimiento entre el polen y el estigma. A favor de esta posibilidad está la presencia del alérgeno en la exina y en el material adherido a la misma, y el hecho de que la proteína difunde pasivamente al medio durante la germinación *in vitro*. Bajo este punto de vista, no obstante, resulta difícil explicar que función tendría la gran cantidad de proteína que se almacena en el interior de las cisternas del retículo endoplasmático rugoso.

Finalmente, cabe la posibilidad de que la proteína acumulada en el grano de polen maduro sea utilizada como recambio para la síntesis de otras proteínas necesarias durante el crecimiento del tubo polínico. En contra de esta hipótesis está la síntesis *de novo* de la proteína que tiene lugar durante el crecimiento del tubo (M'rani-Alaoui, 2000), que sugiere que la proteína desempeña un papel activo durante dicho proceso. Aún cuando cualquiera de las hipótesis propuestas sea cierta, queda aún por aclarar el significado biológico del doble origen, gametofítico y esporofítico, de la proteína.



Los análisis de represión antisense permitirían llevar a cabo una aproximación alternativa con objeto de determinar la posible función biológica de este alérgeno en el grano de polen. Recientemente, nuestro grupo ha iniciado dicho abordaje, a través de la transformación mediante técnicas biolísticas, con objeto de determinar inicialmente si el promotor LAT52 del polen de tomate es activo en el polen del olivo. Los resultados muestran la presencia de una intensa actividad GUS en el interior del grano, aunque será necesario ajustar los parámetros de la transformación para incrementar la eficiencia del sistema, con objeto de obtener resultados fiables.

La proteína Ole e 1 muestra reacción cruzada con el alérgeno mayoritario de *Plantago lanceolata*, Pla l 1

La existencia de reacción cruzada entre antígenos presentes en el polen de olivo y otras especies de la familia *Oleaceae*, como *Ligustrum* (aligustre) y *Phillyrea*, fue descrita por primera vez por Bousquet y col. (1985), al que siguieron los estudios de Kernermann y col. (1992) y Baldo y col. (1992). El uso de anticuerpos ha permitido identificar aquellos antígenos implicados directamente en estos fenómenos de reacción cruzada y mapear los determinantes antigénicos presentes en dichas moléculas. Así, por ejemplo, mediante el uso de técnicas de cromatografía de afinidad, Obispo y col. (1993) aislaron y caracterizaron el alérgeno mayoritario del polen de *Fraxinus excelsior* (Fra e 1), *Ligustrum vulgare* (Lig v 1) y *Syringa vulgaris* (Syr v 1). En todos los casos, la proteína muestra un peso molecular de 20 kDa y su secuencia aminoacídica parcial en el extremo NH₂-terminal es idéntica al alérgeno Ole e 1. El elevado grado de polimorfismo que presenta la proteína Syr v 1 (Batanero y col., 1994a) podría explicar las diferencias observadas en el patrón de reconocimiento y reactividad que presentan los anticuerpos monoclonales anti-Ole e 1 cuando son ensayados frente a extractos de polen de otras especies de la familia *Oleaceae* (Martín-Orozco y col., 1994) o en estudios de inmunolocalización (Rodríguez-García y col., 1995b; Fernández y col., 1996). No obstante, no podemos descartar la existencia de reacción cruzada entre otras proteínas alérgicas minoritarias presentes en el grano de polen. Así, en un estudio más reciente, se han identificado hasta 6 proteínas diferentes como responsables de la reacción cruzada entre el olivo, fresno, aligustre y lila (Pajarón y col., 1997). Dos de estas proteínas se corresponden con distintas isoformas del alérgeno Ole e 1, y una tercera con la proteína alérgica Ole e 2 (profilina). Esta última es responsable de la reacción cruzada entre el polen de muchas especies y determinados alimentos (van Ree y col., 1992), aunque este fenómeno no se ha observado en el olivo. De modo similar a la propuesta de van Ree y col. (1995a) para la familia *Poaceae*, Pajarón y col. (1997) concluyen que el uso de extractos de polen de olivo podría ser suficiente para el diagnóstico de hipersensibilidad a la familia *Oleaceae*.

La reactividad cruzada es consecuencia del hecho de que la relación entre un antígeno y su anticuerpo nunca es exclusiva (Trifilieff y col., 1991), y se ha asociado a



la presencia de epitopos comunes en los alérgenos mayoritarios de las distintas especies (Calkhoven y col., 1987; Aalberse, 1992; Taniani y col., 1993). Es por ello que, generalmente, se asume que este tipo de relaciones únicamente ocurre entre especies próximas desde el punto de vista taxonómico (Panzani y col. 1986; Eriksson y col. 1987; Rohac y col., 1991). No obstante, en aquellos individuos sensibilizados al polen de olivo, se detecta frecuentemente la existencia de reacción cruzada frente a otras especies no relacionadas filogenéticamente. Este es el caso de los cereales y otras gramíneas (González y col., 1987; Baldo y col., 1992; Ariano y col., 1993; Carreira y col., 1994; Miyahara y col., 1997), responsables de la mayor parte de los casos de alergia respiratoria en el mundo (Avjioglu y col., 1994). Este hecho sugiere que la sensibilización de algunos pacientes al polen de olivo podría estar inducida por el polen de gramíneas, y viceversa. Así mismo, existen estudios recientes que demuestran la existencia de reacción cruzada del polen de olivo con especies de otros grupos taxonómicos divergentes, tal es el caso de las familias *Cupresaceae* (Pham y Baldo, 1995; González y col., 2000), *Pinaceae* (González y col., 2000), *Betulaceae* (Pham y Baldo, 1995; González y col., 2000), y *Euphorbiaceae* (Vallverdú y col., 1997).

El alérgeno mayoritario del polen de *Plantago lanceolata*, denominado Pla 1 1, muestra un grado de homología del 38.7 % en la secuencia aminoacídica con la proteína Ole e 1, que se incrementa hasta el 68.2 % al considerar los cambios conservativos (Dr. F. Polo, Abelló, S.A., Madrid, comunicación personal). Este hecho sugiere que ambas proteínas podrían tener una función biológica y propiedades alérgicas similares. Los estudios llevados a cabo en el presente trabajo aportan pruebas de la existencia de reacción cruzada entre el alérgeno principal del olivo, Ole e 1, y la proteína alérgica mayoritaria de *Plantago lanceolata* (familia *Plantaginaceae*), denominada Pla 1 1. Así, los análisis de Western blot llevados a cabo en el presente trabajo muestran que el anticuerpo monoclonal 2A10, desarrollado frente a Pla 1 1, es capaz de reconocer dos proteínas de 18 y 20 kDa en extractos crudos de polen de olivo, que corresponden a las variantes sin glucosilar y monoglucosilada de la proteína alérgica Ole e 1, respectivamente. Aparecen también dos bandas polipeptídicas adicionales de 50-55 kDa que, de acuerdo a los resultados obtenidos por Vela y col. (1982) y Wheeler y col. (1990), podrían constituir una estructura multimérica o algún tipo de agregado de dicha proteína. Estos resultados contradicen los estudios mediante ELISA llevados a cabo por Calabozo y col. (2001) en los que dicho anticuerpo fue incapaz de reaccionar con la proteína Ole e 1. Para explicar dichas discrepancias cabe señalar que nuestros resultados muestran que dicha reacción sólo ocurre en variedades de alto contenido en la proteína Ole e 1 (datos no mostrados), mientras que estos autores parten de mezclas de polen comerciales de origen y composición indeterminados. Por otro lado, los ensayos en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) llevados a cabo en nuestro laboratorio podrían hacer accesibles epitopos que no lo son en condiciones nativas. Finalmente, los resultados de



inmunolocalización corroboran la existencia de dicha reactividad cruzada, aunque alejan la posibilidad de una función biológica común de ambas proteínas.

La existencia de reacción cruzada entre especies no relacionadas filogenéticamente sugiere que la sensibilización de un individuo a un determinado polen no implica necesariamente que dicho individuo haya estado expuesto directamente a dicha fuente. Así, en un estudio llevado a cabo sobre 103 individuos atópicos del estado de Michigan (USA), Kernermann y col. (1992) encontraron 19 casos de sensibilización frente a extractos de polen de olivo, a pesar del hecho de que esta especie no es cultivada ni utilizada con fines ornamentales en esta zona.

Antigenicidad de la proteína Ole e 1 en varios cultivares de olivo: implicaciones clínicas, agronómicas y medioambientales

Desde los trabajos pioneros de Vela y col. (1982) y Blanca y col. (1983), diversos estudios han aportado pruebas claras de la existencia de una enorme variabilidad en el contenido antigénico del grano de polen de olivo (Barber y col., 1990; Waisel y col., 1996). El amplio y variado germoplasma de esta especie (262 variedades en España, Barranco, 1997), resultado de un cultivo extensivo durante varios siglos, es con toda probabilidad la causa directa de dicha variabilidad. El análisis discriminatorio del contenido alergénico entre cultivares podría ser de gran interés para: a) la estandarización de extractos proteicos para uso clínico o en la preparación de vacunas efectivas, b) la discriminación de cultivares que son utilizados con fines ornamentales, c) el estudio de la naturaleza y la función biológica de estas proteínas dentro del grano, y d) el análisis de las variaciones en las características agronómicas de los diferentes cultivares y su relación con la mayor o menor capacidad alergénica de los mismos. No obstante, hasta el momento son muy pocos los trabajos en los que se tiene en cuenta la distribución geográfica y composición varietal del material utilizado, generalmente mezclas comerciales de polen con un contenido masivo de antígenos (Waisel y Geller-Bernstein, 1996).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que existen diferencias cuantitativas significativas en el polen de diez variedades de olivo (Arbequina, Frantoio, Gordal sevillana, Hojiblanca, Lechín de Granada, Loaime, Lucio, Manzanilla de Sevilla, Picual y Picudo) respecto a los niveles relativos del alérgeno mayoritario Ole e 1. Estas diferencias se reflejan a nivel bioquímico (patrón electroforético y análisis de Western blot) y a nivel celular (estudios de inmunolocalización), y los valores relativos de la proteína oscilan entre el 17.9 % en la variedad Gordal sevillana (la de contenido más bajo) y el 100 % del cultivar de referencia (Lechín de Granada). Así mismo, los análisis de expresión de los transcritos correspondientes a Ole e 1 en las diez variedades estudiadas muestran una fuerte correlación con los niveles de proteína, datos que apoyan la idea de que el mecanismo de control génico de este gen es transcripcional.



En un estudio en el que se analizaron un total de 17 variedades de olivo autóctonas y foráneas, Waisel y col. (1996) observaron la existencia de diferencias en el contenido proteico del polen respecto a un grupo de proteínas de 18-20 kDa. Este grupo de proteínas estaba presente en el extracto comercial y en 7 de los cultivares analizados, y ausente en el resto. A diferencia de los resultados obtenidos por estos autores, la proteína Ole e 1 está presente en las diez variedades aquí analizadas, aunque probablemente los niveles de sensibilidad de las técnicas empleadas no son comparables.

Aunque el elevado grado de polimorfismo descrito para esta proteína (ver revisión de Alché y Rodríguez-García, 1997) podría explicar también la existencia de diferencias cualitativas entre variedades (dado que cualquier diferencia mínima en la proteína pueden conducir a un cambio dramático en su capacidad alergénica), la buena correlación existente entre los datos de densitometría de geles e inmunoblots indica que el anticuerpo monoclonal utilizado es probablemente incapaz de detectar tales diferencias entre las variedades aquí estudiadas.

A partir de estas diferencias cuantitativas en los niveles del alérgeno, podemos presuponer que esta proteína podría ser un buen candidato inicial como marcador molecular para la detección de variedades en el olivar, aunque para confirmar este punto será necesario ampliar este tipo de estudios al resto de cultivares. Por tanto, el análisis de diferencias entre cultivares, a partir de clones de ADN previamente caracterizados podría suponer una alternativa rápida y eficaz para la caracterización de variedades en el olivar. Otra cuestión de interés aún por aclarar es determinar las posibles causas de estas discrepancias en el contenido de Ole e 1 en el grano de polen. Para poder contestar a esta pregunta, será necesario llevar a cabo estudios que nos permita correlacionar esta variabilidad intervarietal con posibles diferencias morfológicas y funcionales en el grano de polen, tales como la capacidad de hidratación y de germinación *in vitro*, las características ultraestructurales, etc.

¿Qué proteínas son responsables de la capacidad alergogénica del polen de olivo?. Aunque el grupo de proteínas de 18-20 kDa es considerado por muchos autores como el alérgeno mayoritario del polen de olivo, existen pruebas que sugieren que otras proteínas podrían estar implicadas en su alergenicidad. Algunos sueros de individuos alérgicos no reaccionan frente a este alérgeno pero sí lo hacen, en cambio, frente a otras proteínas presentes igualmente en los extractos (Wheeler y col., 1990; Waisel y col., 1996). Así, en ensayos sobre extractos de polen de distintas variedades de California, Boluda y col. (1998), observaron que un 80 % de los sueros de pacientes alérgicos muestra reactividad frente a la proteína alergénica Ole e 4, mientras que sólo un 40 % lo hace frente a Ole e 1. Este último dato es significativo si lo comparamos con trabajos previos en los que se observa una frecuencia mayor del 80 % (Wheeler y col., 1990; Lauzurica y col., 1988a). Por otro lado, Martínez y col. (1999) encontraron un 83 % de sueros reactivos frente a una proteína de 36 kDa y sólo un 59 % frente a



Ole e 1. Los ensayos llevados a cabo en este trabajo a partir de sueros de individuos alérgicos muestran la presencia de patrones de reactividad individualizados en los que aparecen hasta 9 proteínas diferentes, comprendidas en un rango de peso molecular entre de 7.6 y 78 kDa. El patrón de bandas varía en cada paciente en función del cultivar, y entre individuos para cada una de las variedades analizadas. En 7 de los 14 sueros ensayados (50 %) se detectó la presencia de dos polipéptidos de 18 y 20 kDa, correspondientes al alérgeno mayoritario.

TABLA 4.2. Diversidad en los patrones de unión de IgE frente a extractos de polen de olivo en inmunoblots.

PROTEÍNAS ALERGÉNICAS CON CAPACIDAD DE UNIÓN A IgE (kDa)										REFERENCIA
8-17 Ole e 2, 3, 5, 6, 7	18-20 Ole e 1	32 Ole e 4	38-39	40-42	44	47	50-60	64-66	>68	
								+		Vela y col. (1982)
	+	+								Blanca y col. (1983)
	+			+			+			Lahoz y col. (1985)
	+	+								Rubio y col. (1987)
+	+			+			+			Lauzurica y col. (1988a,b)
	+	+	+				+			Barber y col. (1990)
	+			+			+	+		Wheeler y col. (1990, 1992)
	+	+		+						Villalba y col. (1990)
	+	+								Spinozzi y col. (1991)
+	+		+	+	+		+	+		Baldo y col. (1992)
	+									Lombardero y col. (1992)
	+							+		Obispo y col. (1993)
+	+		+							Rodríguez y col. (1995)
+	+	+	+			+	+	+	+	Lahoz y col. (1995)
	+						+			Martín-Orozco y col. (1994)
+	+	+				+	+	+	+	Waisel y col. (1996)
+	+	+	+			+	+	+	+	Tesis



Las discrepancias que se observan si comparamos estos resultados con los obtenidos en otros trabajos publicados hasta la fecha (Tabla 4.2) podrían deberse a los diferentes métodos de extracción empleados, y a la utilización de polen procedente de muy diversas fuentes, que en la mayor parte de los casos se corresponde a una mezcla de origen y composición indeterminadas. Cabe señalar que, en aquellos casos en los que pacientes mostraron reactividad frente al alérgeno mayoritario Ole e 1, no se observó señal alguna en las variedades Arbequina, Frantoio y Gordal, todas ellas con un contenido bajo en dicha proteína. Este dato contrasta con los resultados obtenidos con el anticuerpo monoclonal, en los que sí aparece la proteína, y muestra que los resultados obtenidos mediante la utilización de sueros de pacientes alérgicos permiten conocer únicamente aquellos alérgenos frente a los que el individuo está sensibilizado, pero no la composición antigénica real del grano de polen.

Por otro lado, la reactividad media a la prueba SPT (calculada como el área de reacción cutánea, en mm^2) en pacientes sensibilizados al polen de olivo varía significativamente en función de la procedencia del extracto (variedad) y depende de la cantidad de proteína (% Ole e 1) presente en el grano. El análisis detallado de cada paciente muestra que, en algunos casos, los individuos presentan reactividad exacerbada frente a extractos de determinadas variedades con independencia de los niveles cuantitativos del alérgeno mayoritario. Así mismo, cabe señalar que un 10 % de los pacientes sometidos a inmunoterapia prolongada con vacunas comerciales no mostraron reactividad alguna frente al extracto de origen comercial, utilizado como control e incluido en el kit de diagnóstico, aunque dicha reactividad se mantuvo frente a extractos de algunas de las variedades analizadas. Estos resultados indican la existencia de diferencias cualitativas, además de cuantitativas, en la composición antigénica de las diferentes variedades de olivo y sugieren la idea de que algunos cultivares de olivo podrían tener un potencial alergogénico mayor que otros. Tales diferencias implicarían que la sensibilización al polen de esta especie podría no ser una característica general sino que dependería de la procedencia del polen.

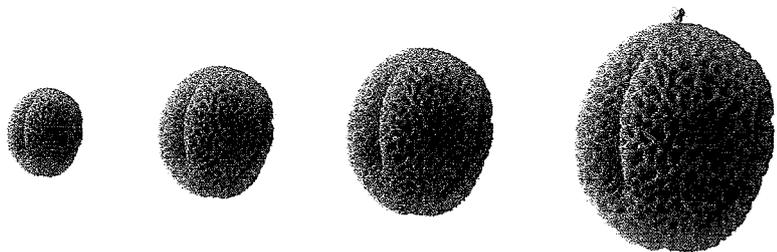
En un estudio sobre la incidencia de la alergia al olivo en Israel, Geller-Berstein y col. (1996) observaron que existe una correlación entre el número de individuos alérgicos al polen de esta especie y la densidad del cultivo. En esta línea, los resultados obtenidos por Florido y col. (1998) muestran que los pacientes monosensibilizados al polen de olivo necesitan niveles excepcionalmente altos de dicho polen para que aparezcan los síntomas alérgicos. Todos estos resultados sugieren que la exposición a niveles elevados de polen tiene un efecto negativo sobre la salud, por lo que una reducción en dichos niveles sería recomendable. Por tanto, existiría la posibilidad de utilizar cultivares de bajo contenido alergénico (Ej.: Arbequina, Frantoio y Gordal) con fines ornamentales (Ej.: en jardines y parques públicos), con objeto de disminuir el porcentaje de individuos sensibilizados de la población sin que exista detrimento en la productividad y/o orientación agronómica del cultivo.



Finalmente, cabe resaltar que, tal y como muestran los resultados obtenidos en este trabajo, el uso de mezclas comerciales de polen de olivo, cuyo origen y composición es muy variado, conduce en algunos casos a errores de diagnóstico y éxitos limitados en los tratamientos de inmunoterapia. Estos efectos negativos podrían ser corregidos con la estandarización de los extractos utilizados con fines de diagnóstico, y un tratamiento personalizado en el que se tendría en cuenta las variaciones intraespecíficas en el contenido alergénico. Para ello, los individuos sintomáticos deberían ser sometidos a un diagnóstico inicial mediante pruebas SPTs a partir de un extracto o mezcla de polen de aquellas variedades dominantes y aquellas otras consideradas secundarias en la región de origen del paciente. Tras esta primera aproximación, y en caso de que el resultado fuera positivo, se debería proceder a un diagnóstico discriminatorio mediante extractos de polen individualizados de cada uno de los cultivares. En todos los casos, se llevarían a cabo controles positivos (Ej.: histamina) y negativos (Ej.: tampón salino).

Una vez establecido el diagnóstico, se debería llevar a cabo una personalización de la composición de la vacuna correspondiente, en aquellos casos en los que, bajo prescripción médica, sea aconsejable iniciar la inmunoterapia (Ej.: imposibilidad de aislamiento físico frente al agente causante de la alergia, persistencia de los síntomas alérgicos después del tratamiento medicamentoso, prevención de la aparición o exacerbación del asma, etc.). La vacuna debería contener en cada caso el número adecuado de unidades de potencia inmunológica, repartidas de manera proporcional en función de la mayor o menor reactividad de cada extracto individualizado. El protocolo de inmunoterapia seguiría las recomendaciones ya establecidas para los extractos comerciales, con los que ya se posee una experiencia clínica amplia. Este tipo de tratamientos modelo podría extenderse a las diversas formas de inmunoterapia que actualmente están en desarrollo (Ej.: administración sublingual).

Conclusiones



① El alergen Ole e 1 presenta un patrón de expresión gametofítico y esporofítico dado que, tanto los transcritos como la proteína se detectan en las microsporas en desarrollo (gametofito) y en las células del *tapetum* (esporofito).

② La síntesis y almacenamiento de la proteína alergénica Ole e 1 dentro del grano de polen, tiene lugar en el retículo endoplasmático rugoso siguiendo el esquema ampliamente extendido de síntesis en los ribosomas adosados a las cisternas y transporte simultáneo del péptido al lumen de éstas. La proteína alergénica Ole e 1 presente en la exina (la capa más externa de la pared del grano de polen) tiene su origen con toda probabilidad en el *tapetum*.

③ La expresión del/los gen/genes OLE E 1 durante el desarrollo del grano de polen dentro de la antera y la germinación *in vitro* está regulada a nivel transcripcional. La síntesis de transcritos comienza en el *tapetum* durante el estadio de tetrada y, a partir del momento en que dicho tejido comienza a degenerar, se observa que los transcritos se acumulan en el interior del polen, a medida que éste madura. La síntesis proteica muestra un patrón similar aunque se inicia, con un ligero desfase, en el estadio de microspora.

④ Existen diferencias significativas en el contenido de la proteína Ole e 1 en el polen de 10 variedades de olivo analizadas, cuyos niveles muestran una fuerte correlación con los de transcritos. Estas diferencias presuponen que algunos cultivares podrían tener un potencial alergogénico mayor que otros. Este hecho posibilita la utilización de variedades de bajo contenido alergénico con fines ornamentales y hace que este alergen sea inicialmente un buen candidato como marcador molecular para la detección de variedades en el olivar.

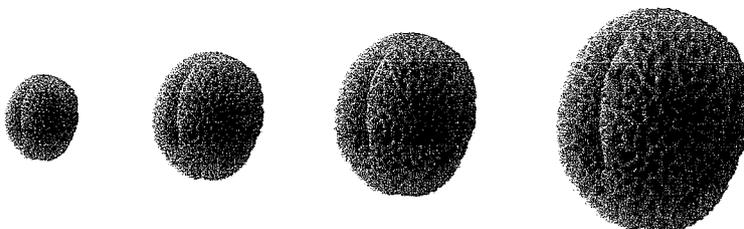
⑤ La utilización de sueros de pacientes alérgicos como herramienta de estudio permite conocer aquellos antígenos frente a los que un determinado individuo está sensibilizado, pero no la composición antigénica real del grano de polen. El patrón de reacción varía en cada individuo en función del cultivar, y entre individuos para cada una de las variedades analizadas. Estos resultados confirman que, además del alergen Ole e 1, son numerosas las proteínas antigénicas implicadas en los fenómenos de alergia.

⑥ El uso de mezclas comerciales de polen de olivo puede conducir a errores de diagnóstico y éxitos limitados en la inmunoterapia. Este hecho podría ser corregido a través de un diagnóstico más preciso, en el que se tenga en cuenta las variaciones intervarietales en el contenido antigénico del polen, y mediante el diseño de vacunas individualizadas.

⑦ La proteína Ole e 1 muestra reacción cruzada con el alergeno mayoritario del polen de *Plantago lanceolata*, denominado Pla l 1, lo que confirma que ambas proteínas comparten determinantes antigénicos en su estructura.

⑧ Al menos tres hechos demuestran que el alergeno Ole e 1 debe desempeñar un papel clave durante la germinación del grano de polen: 1) la síntesis y acumulación de la proteína se produce durante las etapas finales de la maduración del grano de polen, alcanzando los niveles máximos justo antes de la antesis, 2) la proteína, aunque presenta niveles cuantitativos muy diferentes, está presente en el polen de todas las variedades de olivo analizadas, y 3) tiene lugar una síntesis *de novo* tanto de transcritos como de proteína durante el proceso de germinación *in vitro*.

Anexos



ANEXO 1.

Estadística descriptiva [número de observaciones (N), media y error estándar (Er. Es.)] de los caracteres morfométricos analizados en la flor de olivo durante el desarrollo del grano de polen en la antera.

ANEXO 1.

DÍA	CARACTERES MORFOMÉTRICOS					
	Longitud (cm)			Anchura (cm)		
	N	Media	Er. Es	N	Media	Er. Es.
14AB	9	0.1478	0.0120	9	0.1011	0.0079
15AB	10	0.1536	0.0184	10	0.1076	0.0117
16AB	9	0.1617	0.0143	9	0.1056	0.0091
17AB	10	0.1600	0.0113	10	0.1056	0.0092
20AB	10	0.1730	0.0247	10	0.1090	0.0138
21AB	9	0.1800	0.0122	9	0.1106	0.0104
22AB	10	0.1876	0.0163	10	0.1120	0.0106
23AB	10	0.1950	0.0127	10	0.1146	0.0114
24AB	10	0.2020	0.0148	10	0.1320	0.0148
27AB	9	0.2144	0.0101	9	0.1422	0.0107
28AB	10	0.2296	0.0170	10	0.1576	0.0117
29AB	10	0.2356	0.0179	10	0.1546	0.0140
30AB	10	0.2386	0.0214	10	0.1600	0.0089
4MA	10	0.2480	0.0194	10	0.1700	0.0127
5MA	10	0.2520	0.0214	10	0.1740	0.0158
6MA	10	0.2536	0.0171	10	0.1706	0.0140
7MA	9	0.2767	0.0146	9	0.1894	0.0072
8MA	10	0.2880	0.0140	10	0.2030	0.0063
11MA	10	0.3000	0.0127	10	0.2090	0.0118
12MA	10	0.2990	0.0180	10	0.1996	0.0126
13MA	10	0.3246	0.0250	10	0.2240	0.0118
14MA	9	0.3289	0.0134	9	0.2222	0.0090
15MA	10	0.3360	0.0230	10	0.2370	0.0138
18MA	10	0.3460	0.0186	10	0.2450	0.0074

ANEXO 2.

Área de reacción (en mm²) de 25 pacientes alérgicos sometidos a pruebas SPT frente a extractos de polen maduro de olivo de 10 variedades diferentes.

ANEXO 2.

PACIENTE	ÁREA DE REACCIÓN (mm ²)				
	PICUAL	LOAIME	LUCIO	FRANTOIO	GORDAL
1	17.03	3.84	34.06	10.44	1.64
2	0.00	0.00	0.00	3.30	10.99
3	0.00	4.94	0.00	0.00	0.00
4	14.83	4.94	8.24	6.59	6.04
5	12.09	36.81	9.34	21.98	29.67
6	8.79	6.59	0.00	2.20	4.94
7	24.17	19.77	3.29	8.24	13.18
8	15.38	24.17	28.02	10.98	8.79
9	7.03	10.44	7.69	10.44	6.59
10	16.48	14.84	13.74	19.23	12.09
11	6.60	8.79	0.00	7.70	1.10
12	2.20	0.00	0.00	1.54	0.00
13	5.49	4.39	13.18	4.94	4.94
14	9.89	17.58	8.24	21.43	15.39
15	0.54	1.35	1.08	22.7	10.81
16	3.25	4.33	0.00	0.27	4.06

PACIENTE	ÁREA DE REACCIÓN (mm ²)				
	PICUAL	LOAIME	LUCIO	FRANTOIO	GORDAL
17	7.84	15.40	7.57	11.89	10.81
18	11.35	28.11	2.97	5.95	4.60
19	30.27	7.57	6.76	10.54	5.68
20	28.65	53.25	29.46	4.60	15.38
21	54.05	14.86	55.41	11.89	47.30
22	4.59	1.89	1.08	9.19	12.70
23	13.78	28.38	52.16	40.81	20.81
24	14.86	24.32	20.81	22.97	22.70
25	10.00	33.78	10.00	6.21	2.97
26	35.68	18.92	47.57	19.46	5.68
27	0.00	0.00	0.00	15.95	0.00
28	15.14	7.84	0.00	10.0	0.00
29	11.43	39.19	39.19	12.70	20.54

ANEXO 2.

PACIENTE	ÁREA DE REACCIÓN (mm ²)				
	MANZANILLA	ARBEQUINA	HOJIBLANCA	PICUDO	LECHÍN
1	24.17	2.19	0.00	0.00	12.08
2	12.64	0.00	6.05	0.00	12.09
3	0.00	0.00	2.19	0.00	4.39
4	0.00	6.59	18.68	0.00	20.33
5	25.82	20.88	18.68	10.44	23.08
6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	15.38	5.49	0.54	-	12.63
8	10.98	14.83	8.23	2.74	6.04
9	10.99	0.00	0.00	-	3.30
10	4.84	3.30	15.93	7.69	10.44
11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
12	3.85	0.00	0.55	0.00	3.30
13	4.39	4.39	6.59	10.44	19.23
14	28.02	16.48	15.38	15.38	23.62
15	3.25	5.68	31.89	9.73	21.89
16	0.00	0.00	2.17	0.00	6.76

PACIENTE	ÁREA DE REACCIÓN (mm ²)				
	MANZANILLA	ARBEQUINA	HOJIBLANCA	PICUDO	LECHÍN
17	5.13	5.13	6.84	0.81	24.05
18	4.06	0.00	5.68	4.60	12.16
19	3.79	18.11	29.46	11.89	16.21
20	30.54	17.84	37.57	16.22	14.06
21	63.78	15.68	40.00	19.73	42.43
22	27.03	7.84	6.76	0.00	12.16
23	86.22	6.76	45.68	21.62	12.97
24	13.78	15.14	25.68	10.54	19.73
25	11.08	5.41	3.78	21.89	40.81
26	44.59	20.54	43.24	24.32	29.73
27	13.51	2.16	12.43	12.70	18.11
28	0.00	1.08	5.41	15.68	0.00
29	32.16	3.51	27.30	34.32	9.19

ANEXO 3.

Listado de abreviaturas

SECRETARÍA DE ECONOMÍA
ESTADO DE GUAYMAS
SECRETARÍA DE ECONOMÍA
ESTADO DE GUAYMAS

ANEXO 3.

A ₂₆₀	Absorbancia a 260 nm
A ₂₈₀	Absorbancia a 280 nm
A ₄₀₅	Absorbancia a 405 nm
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
APES	3-Aminopropyltriethoxy-silane
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNt	ARN de transferencia
AU	Allergy unit
BAU	Bioequivalent allergy unit
BCI	5-Bromo-4-chloro-3-indole
BCIP	5-bromo-4-chloro-indolyl phosphate
BSA	Bovine serum albumin
BU	Biological unit
CDP-Star	Disodium-2-chloro-5-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}] decan}-4-yl)-1-phenylphosphate
DAPI	4',6-Diamidine-2-phenylindole
DD-PCR	Differential display-polymerase chain reaction
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
Dig-11-dUTP	Digoxigenin-11-2'-deoxy-uridine-5'-triphosphate
dNTP's	Deoxyribonucleoside triphosphates
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediamine-N, N, N', N' -tetracetic acid
EGTA	Ethyleneglycol-N, N, N', N' -tetracetic acid
FPLC	Fast protein liquid chromatography
GITC	Guanidine isothiocyanate
GUS	Glucuronidase
HEP	Histamine equivalent prick

ha	Hectárea
HIS	Hibridación <i>in situ</i>
IEF	Isoelectrofocusing
IUIS	International union of immunological societies
MET	Microscopía electrónica de transmisión
M-MLV-RT	Moloney-murine leukemia virus-reverse transcriptase
MO	Microscopía óptica
MOPS	Morpholinopropane sulphonic acid
NBT	Nitro blue tetrazolium
Oligo (dT)	Oligodeoxytimidine
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pI	Punto isoeléctrico
PMSF	Phenylmethyl-sulfonyl fluoride
PNB	p-Nitrophenyl butirate
p/v	Peso/volumen
PVP	Polyvinyl pyrrolidone
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RACE	Rapid amplification of cDNA ends.
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
RAST	Radio allergosorbent test
REr	Retículo endoplasmático rugoso
RNasa	Ribonucleasa
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
RT-PCR-IS	Reverse transcription-polymerase chain reaction- <i>in situ</i>
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium docecyl sulfate - polyacrilamide gel electrophoresis
SPT	Skin prick test
SQ	Standarized quality
SSC	Standard saline citrate
t	Tonelada métrica
TAE	Tris - acetic acid-EDTA

TBE	Tris -buffered EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline-Tween 20
TCA	Trichloroacetic acid
TE	Tris EDTA
TEA	Triethanolamine
TEMED	N, N, N, N' -Tetra-methyl-ethylenediamine
UV	Luz ultravioleta
v/v	Volumen/volumen

Bibliografía





- AALBERSE, R. B. (1992). Clinically significant cross-reactivities among allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 99: 261-264.
- ACEITUNO, E.; DEL POZO, V.; MÍNGUEZ, A.; ARRIETA, I.; CORTEGANO, I.; CÁRDABA, B.; GALLARDO, S.; ROJO, M.; PALOMINO, P. & LAHOZ, C. (2000). Molecular cloning of major allergen from *Cupressus arizonica* pollen, cup a 1. *Clin. Exp. Allergy*, 30 (12): 1750-1758.
- ALCHE, J. D. (1991). Estudio a nivel celular de la microsporogénesis en el olivo (*Olea europaea*): ultraestructura, citoquímica, inmunocitoquímica e hibridación *in situ*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- ALCHE, J. D.; CASTRO, A. J.; OLMEDILLA, A.; FERNÁNDEZ, M. C.; RODRÍGUEZ, R.; VILLALBA, M. & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I. (1999). The major olive pollen allergen (*Ole e 1*) shows both gametophytic and sporophytic expression during anther development, and its synthesis and storage takes place in the RER. *J. Cell Sci.*, 112: 2501-2509.
- ALCHE, J. D.; CASTRO, A. J. & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I. (2001). Localization of transcripts corresponding to the major allergen from olive pollen (*Ole e 1*) by electron microscopic non-radioactive *in situ* RT-PCR. *Micron* (en prensa).
- ALCHE, J. D.; FERNÁNDEZ, M. C. & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I. (1994). Cytochemical features common to nucleoli and cytoplasmic nucleoloids of *Olea europaea* meiocytes: detection of rRNA by *in situ* hybridization. *J. Cell Sci.*, 107: 621-629.
- ALCHE, J. D. & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I. (1997). El polen como vector responsable de alergias. *Polen*, 8: 5-23.
- ALTAMURA, M. M.; PASCUA, G. & MAZZOLANI, G. (1982a). Development of the female gametophyte in *Olea europaea* L. *Annali di Botanica*, XL: 111-117.
- ALTAMURA, M. M.; PASCUA, G. & MAZZOLANI, G. (1982b). Embryogenesis in *Olea europaea* L. *Annali di Botanica*, XL: 141-152.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, S. F.; MILLER, W.; MYERS, E. W. & LIPMAN, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410.
- AMICI, G. B. (1824). Observations microscopiques sur diverses espèces de plantes. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol.*, 2: 41-70, 211-248.
- AMICI, G. B. (1830). Note sur le mode d'action du pollen sur le stigmate. Extrait d'une lettre d'Amici à Mirbel. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol.*, 21: 329-332.



- **ARIANO, R.; PANZANI, R. C.; FALAGIANI, P.; CHIAPPELLA, M. & AUGERI, G.** (1993). Respiratory allergy to the pollen of *M. annua* (Euphorbiaceae). *Ann. Allergy*, 70: 249-254.
- **ASTURIAS, J. A.; ARILLA, M. C.; GÓMEZ-BAYÓN, N.; AGUIRRE, M.; MARTÍNEZ, A.; PALACIOS, R. & MARTÍNEZ, J.** (1998). Cloning and immunological characterization of the allergen Hel a 2 (profilin) from sunflower pollen. *Mol. Immunol.*, 35 (8): 469-478.
- **ASTURIAS, J. A.; ARILLA, M. C.; GÓMEZ-BAYÓN, N.; MARTÍNEZ, A. & PALACIOS, R.** (1997). Cloning and expression of the panallergen profilin and the major allergen (*Ole e* 1) from olive tree pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 100: 365-372.
- **ASTWOOD, J. D. & HILL, R.D.** (1996). Cloning and expression pattern of Hor v 9, the group 9 pollen isoallergen from barley. *Gene*, 182 (1-2): 53-62.
- **AVJIOGLU, A.; CREANEY, J.; SMITH, P.; TAYLOR, P.E.; SINGH, M. B. & KNOX, R. B.** (1993). Cloning and characterization of the major allergen of *Sorghum halepense*, a subtropical grass. In: Molecular biology and immunology of allergens (eds. Kraft, D. & Sehon, A.), pp. 161-164. CRC Press. Boca Ratón, USA.
- **AVJIOGLU, A.; HOUGH, T.; SINGH, M. B. & KNOX, R. B.** (1994). Pollen allergens. In: Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants. Williams, E. G.; Clarke, A. E. & Knox, R. B. (eds.), pp. 336-359. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- **BALDO, B. A.; PANZANI, R. C.; BASS, D. & ZERBONI, R.** (1992). Olive (*Olea europaea*) and privet (*Ligustrum vulgare*) pollen allergens. Identification and cross-reactivity with grass pollen proteins. *Mol. Immunol.*, 29: 1209-1218.
- **BARBER, D.; CARPIZO, J.; GARCÍA RUMBAO, M. C.; POLO, F. & JUAN, F.** (1990). Allergenic variability in *Olea* pollen. *Annu. Allergy*, 64: 43-46.
- **BARRANCO, D.** (1997). Variedades y Patrones. En: El cultivo del olivo. Barranco, D.; Fernández-Escobar, D. y Rallo, L. (eds.), pp. 61-79. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid/ Junta de Andalucía.
- **BARRANCO, D. & RALLO, L.** (1984). Las variedades de olivo cultivadas en Andalucía. Consejería de Agricultura (Junta de Andalucía) y Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Madrid).
- **BARRANCO, D. & RALLO, L.** (1985). Las variedades de olivo cultivadas en España. *Olivae*, 9: 16-22.
- **BATANERO, E.; LEDESMA, A.; VILLALBA, M. & RODRÍGUEZ, R.** (1997). Purification, amino acid sequence and immunological characterization of Ole e 6, a cysteine-enriched allergen from olive tree pollen. *FEBS Letters*, 410 (2-3): 293-296.



- **BATANERO, E.; VILLALBA, M.; LEDESMA, A.; PUENTE, X. S. & RODRÍGUEZ, R.** (1996). Ole e 3, an olive-tree allergen, belongs to a widespread family of pollen proteins. *Eur. J. Biochem.*, 241 (3): 772-778.
- **BATANERO, E.; VILLALBA, M.; LÓPEZ-OTÍN, C. & RODRÍGUEZ, R.** (1994a). Isolation and characterization of an olive allergen-like protein from lilac pollen. *Eur. J. Biochem.*, 221: 187-193.
- **BATANERO, E.; VILLALBA, M. & RODRÍGUEZ, R.** (1994b). Glycosylation site of the major allergen from olive tree pollen. Allergenic implications of the carbohydrate moiety. *Mol. Immunol.*, 31: 31-37.
- **BAUER, C. P.** (1993). Untersuchung zur Asthmaprvention durch die spezifische immuntherapie bei kindern. *Allergologie*, 11: 468.
- **BEERS, M. H. & BERKOW, R.** The Merck manual of diagnosis and therapy. 17th Edition. Internet Edition: www.merck.com/pubs/mmanual.
- **BLANCA, M.; BOULTON, P.; BROSTOFF, J. & GONZÁLEZ-REGUERA, I.** (1983). Studies of the allergens of *Olea europaea* pollen. *Clin. Allergy*, 13 (5): 473-478.
- **BOGANI, P.; CAVALIERI, D.; PETRUCCELLI, R.; POLSINELLI, L. & ROSELLI, G.** (1994). Identification of olive tree cultivars by using random amplified polymorphic DNA. *Acta Hort.*, 356: 98-101.
- **BOLUDA, L.; ALONSO, C. & FERNÁNDEZ-CALDAS, E.** (1998). Purification, characterization, and partial sequencing of two new allergens of *Olea europaea*. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 101: 210-216.
- **BOND, J. F.; GARMAN, R. D.; KEATING, K. M.; BRINER, T. J.; RAFNAR, T.; KAPPLER, D. G. & ROGERS, B. L.** (1991). Multiple *Amb a I* allergens demonstrate specific reactivity with IgE and T cells from ragweed-allergic patients. *J. Immunol.*, 146: 3380-3385.
- **BOTTARI, V. & SPINA, P.** (1953). Le varietà di olivo coltivate in Sicilia. *Annali della Sperimentazione Agraria*, VII: 937-978; 1141-1174; 1421-1444.
- **BOUSQUET, J.; GUERIN, B.; HEWITT, B.; LIM, S. & MICHEL, F. B.** (1985) Allergy in the Mediterranean area III: Cross-reactivity among Oleaceae pollens. *Clin. Allergy.*, 15: 439-448.
- **BRADFORD, M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.



- **BRADLEY, M. V. & GRIGGS, W. H.** (1963). Morphological evidence of incompatibility in *Olea europaea* L. *Phytomorphology*, 13: 141-156.
- **BREITENBACH, M.; SWOBODA, I.; SCHEINER, O.; HEBERLE-BORS, E. & KRAFT, D.** (1992). Tree pollen allergens: functional and environmental aspects. In: Proceedings of the International Workshop-Symposium on Molecular Biology and Immunology of Allergens. CRC Press. Vienna, Austria.
- **BREITENEDER, H.; FERREIRA, F.; HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K.; EBNER, C.; BREITENBACH, M.; RUMPOLD, H. ET AL.** (1993). Four recombinant isoforms of Cor a I, the major allergen of hazel pollen, show different IgE-binding properties. *Eur. J. Biochem.*, 212 (2): 355-362.
- **BREITENEDER, H.; FERREIRA, F.; REIKER-STORFER, A.; DUCHÊNE, M.; VALENTA, R.; HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K. ET AL.** (1992). Complementary DNA cloning and expression in *Escherichia coli* of *Aln g I*, the major allergen in pollen of alder (*Alnus glutinosa*). *J. Allergy Clin. Immunol.*, 90: 909-917.
- **BREITENEDER, H.; HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K.; O'RIORDAIN, G.; SUSANI, M.; AHORN, H.; EBNER, C.; KRAFT, D. & SCHEINER, O.** (1995). Molecular characterization of *Api g 1*, the major allergen of celery (*Apium graveolens*), and its immunological and structural relationships to a group of 17-kDa tree pollen allergens. *Eur. J. Biochem.*, 233: 484-489.
- **BREITENEDER, H.; PETTENBURGER, K.; BITO, A.; VALENTA, R.; KRAFT, D.; RUMPOLD, H.; SCHEINER, O. & BREITENBACH, M.** (1989). The gene coding for the major birch pollen allergen *Bet v I*, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *EMBO J.*, 8 (7): 1935-1938.
- **BRIGGS, S. P.** (1995). Grand unification theory in sight. *Curr. Biol.*, 5: 128-131.
- **BROSTOFF, J. & HALL, T.** (1991). Hipersensibilidad: tipo I. En: Inmunología (2ª edición). Roitt, I. M.; Brostoff, D. K. y Male, D. K. (eds.). Salvat Editores S. A. Barcelona, España.
- **BUFE, A.; BECKER, W. M.; SCHRAMM, G.; PETERSEN, A.; MAMAT, U. & SCHLAAK, M.** (1994). Major allergen *Phl p Va* (timothy grass) bears at least two different IgE-reactive epitopes. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 94 (2): 173-181.
- **BUFE, A.; SCHRAMM, G.; KEOWN, M. B.; SCHLAAK, M.; & BECKER, W. M.** (1995). Major allergen *Phl p Vb* in timothy grass is a novel pollen RNase. *FEBS Letters*, 363: 6-12.



- BUFE, A.; SPANGFORT, M. D.; KAHLERT, H.; SCHLAAK, M.; & BECKER, W. M. (1996). The major birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity. *Planta*, 199: 413-415.
- BYRNE, D. H. & LITTLETON, T. G. (1989). Characterization of isozyme variability in apricots. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 114: 674-678.
- CALABOZO, B.; DÍAZ-PERALES, A.; SALCEDO, G.; BARBER, D. & POLO, F. (2001). Structural and antigenic similarity between Pla 1 1 and Ole e 1, the major allergens of English plantain and olive pollens. Abstracts of the 57th Annual Meeting of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, New Orleans, USA. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 107 (2): 331-339.
- CALKHOVEN, P. G.; AALBERS, M.; KOSHTE, V. L.; POS, O.; OEI, H. D. & AALBERSE, R. C. (1987). Cross-reactivity among birch pollen, vegetables and fruits as detected by IgE antibodies is due to at least three distinct cross-reactive structures. *Allergy*, 42: 382-390.
- CAMERARIUS, R. J. (1664). De sexu plantarum epistola. Tübingen.
- CÁRDABA, B.; DE PABLO, R.; VILCHES, C.; MARTÍN, E.; GELLER-BERNSTEIN, C.; DE ANDRÉS, B.; ZAHARAN, Y.; DEL POZO, V.; GALLARDO, S.; DE ARRUDA CHAVES, E.; WAISEL, Y.; PALOMINO, P.; KREISLER, M. & LAHOZ, C. (1996). Allergy to olive pollen: T-cell response from olive allergic patients is restricted by DR7-DQ2 antigens. *Clin. Exp. Allergy*, 26: 316-322.
- CÁRDABA, B.; VILCHES, C.; MARTÍN, E. ET AL. (1993). DR7 and DQ2 are positively associated with the immunoglobuline-E response to the main antigen of olive pollen (*Ole e 1*) in allergenic patients. *Human Immunol.*, 38: 293-299.
- CARNE, T. & SCHEELE, G. (1985). Cell biology of the secretory process. Cantin, M. (ed.), pp. 73. S. Karger A. G. Basel.
- CARREIRA, J.; OBISPO, T. & LOMBARDEIRO, M. (1994). Alergenos de *Olea europaea* y otras especies relacionadas. *Rev. Esp. Allergol. Immunol. Clin.*, 9: 46-50
- CARUSO, T.; MARTELLI, G.; SABINA, M. R.; GRECO, I.; MARRA, F. P.; SOTTILE, F. & BARONE, E. (2000). Sicilian olive germplasm characterization by randomly amplified polymorphic DNA analysis and biometric traits. 3th International Symposium on Olive Growing. Bari, Italy.
- CASAS, C.; MÁRQUEZ, J.; SUÁREZ-CERVERA, M. & SEOANE-CAMBA, J. A. (1996). Immunocytochemical localization of allergenic proteins in *Parietaria judaica* L. (Urticaceae) pollen grains. *Eur. J. Cell Biol.*, 70: 179-188.



- CEREZO, M.; SOCIAS, R.; COMPANY, I. & ARÚS, P. (1989). Identification of almond cultivars by pollen isoenzymes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 114: 164-169.
- CIAMPOLINI, F.; MOSCATELLI, A. & CRESTI, M. (1988). Ultrastructural features of *Aloe ciliaris* pollen. 1. Mature grain and its activation in vitro. *Sex. Plant Reprod.*, 1: 88-96.
- CISMONTI, I. A. (2000). Análisis celular y molecular de la expresión del alérgeno *Ole e 3* en el grano de polen del olivo (*Olea europaea* L.). Tesis de maestría. Universidad Internacional de Andalucía.
- COHEN, N. S. (1996). Intracellular localization of the mRNAs of argininosuccinate synthetase and argininosuccinate lyase around liver mitochondria, visualized by high-resolution *in situ* reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Cellular Biochem.*, 61: 81-96.
- COI (CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL) (1995). Series estadísticas del aceite de oliva y de la aceituna de mesa.
- CORBI, A. L.; PELÁEZ, A.; ERRIGO, E. & CARREIRA, J. (1985). Cross-reactivity between *Parietaria judaica* and *Parietaria officinalis*. *Ann. Allergy*, 54: 142-146.
- COSTA, M. A.; COLOMBO, P.; IZZO, V.; KENNEDY, H.; VENTURELLA, S.; COCCHIARA, R. ET AL. (1994). cDNA cloning, expression and primary structure of *Par j I*, a major allergen of *Parietaria judaica* pollen. *FEBS letters*, 341 (2-3): 182-186.
- CRESTI, M.; CIAMPOLINI, F.; MULCAHY, D. L. M. & MULCAHY, G. (1985). Ultrastructure of *Nicotiana alata* pollen, its germination and early tube formation. *Am. J. Bot.*, 72: 719-727.
- CRESTI, M. & KEIJZER, C. J. (1985). The structure of the endoplasmic reticulum in pollen grains and pollen tubes after osmium tetroxide-potassium ferricyanide staining. *J. Submicrosc. Cytol.*, 17: 615-620.
- CRESTI, M.; MILANESI, C.; TIEZZI, A.; CIAMPOLINI, F. & MOSCATELLI, A. (1988). Ultrastructure of *Linaria vulgaris* pollen grain. *Acta Bot. Neerl.*, 37:379-386.
- CUEVAS, G. J. (1992). Incompatibilidad polen-pistilo, procesos gaméticos y fructificación en cultivares de olivo (*Olea europaea* L.). Tesis doctoral. Universidad de Córdoba.
- CUEVAS, J.; RAPOPORT, H. F. & RALLO, L. (1995). Relationships among reproductive processes and fruited abscission in "Arbequina" olive. *Adv. Hortic. Sci.*, 2: 92-96.
- CVITANOVIC, S.; MARUSIC, M.; JURISIC, M. ET AL. (1993). Hypersensitivity to *Parietaria officinalis* pollen in newcomers to the area with the plant. *Allergy*, 48: 592-597.



- **D'AMATO, G. & SPIEKMA, F. T. M.** (1992). European allergenic pollen types. *Aerobiol.*, 8: 447-450.
- **DÉCHAMPS, C. & DEVILLER, P.** (1990). Ragweed, a potential plague in Europe. *Allergy Clin. Immunol. News*, 2: 78-83.
- **DEEKEN, R. & KALDENHOFF, R.** (1997). Light-repressible receptor protein kinase: a novel photo-regulated gene from *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 202: 479-486.
- **DEGANI, C. & EL BATSRI, R.** (1990). Enzyme polymorphism in mango. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 115: 844-847.
- **DERKSEN, J.; RUTTEN, T.; VAN AMSTEL, T.; DE WIN, A.; DORIS, F. & STEER, M.** (1995). Regulation of pollen tube growth. *Acta Bot. Neerl.*, 44: 93-102.
- **DICKINSON, H. G.** (1976a). The deposition of acetolysis-resistant polymers during the formation of pollen. *Pollen Spores*, 18: 321-334.
- **DICKINSON, H. G.** (1976b). Common factors in exine deposition. In: The evolutionary significance of the exine. Ferguson, I. K. & Muller, J. (eds.), pp. 67-90. Academic press. London, UK.
- **DICKINSON, H. G.** (1994). Simply a social disease?. *Nature*, 367: 517-518.
- **DICKINSON, H. G. & HESLOP-HARRISON, J.** (1970). The ribosome cycle, nucleoli, and cytoplasmic nucleoloids in the meiocytes of *Lilium*. *Protoplasma*, 69: 187-200.
- **DICKINSON, H. G. & LI, F. L.** (1988). Organelle behaviour during higher plant gametogenesis. In: Division and segregation of organelles. Boffey, S. A. & Lloyd, D. (ed.), pp. 131-148. Cambridge University Press. UK.
- **DO AMARAL FRANCO, J. & DA ROCHA AFONSO, M. L.** (1972). *Olea* L. En: Flora europea, vol. 3. Tulin, T. G.; Heywood, V. H.; Burges, N. A.; Moore, D. M.; Valentine, D. H.; Walters, S. M. & Webb, D. A. (eds.), pp. 55. Cambridge University Press, UK.
- **DOLECEK, C.; VRTALA, S.; LAFFER, S.; STEINBERGER, P.; KRAFT, D.; SCHEINER, O. & VALENTA, R.** (1993). Molecular characterization of *Phl p* II, a major timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen. *FEBS letters*, 335 (3): 299-304.
- **DOUGHTY, J.; HEDDERSON F.; MCCUBBIN, A. & DICKINSON, H. G.** (1993). Interaction between a coat-borne peptide of *Brassica* pollen grain and stigma S (self-incompatibility)-locus-specific glycolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 467-471.



- DREBORG, S.; BASOMBA, A. & EINARSSON, R. (1986). Sensitivity to *Parietaria officinalis* and *Parietaria judaica* pollen allergens in a Spanish population. *Allergol. Immunopathol.*, 14: 499-508.
- DRENTH, J.; LOW, B. W.; RICHARDSON, J. S.; WRIGHT, C. S. (1980). The toxin-agglutinin fold. A new group of small proteins structures organised around a four-disulfide core. *J. Biol. Chem.*, 255: 2652-2655.
- EKRAMODDOULLAH, A. K. M.; KISIL, F. T. & SEHON, A. H. (1986). Partial characterization of an antigenic site of high molecular weight basic antigen, a ryegrass pollen allergen, using a monoclonal antibody. *Mol. Immunol.*, 23: 111-117.
- ELLEMAN, C. J.; FRANKLIN-TONG, V. & DICKINSON, H. G. (1992). Pollination in species with dry stigmas: the nature of the early stigmatic response and pathway taken by pollen tubes. *New Phytol.*, 121: 413-424.
- ENGEL, E.; RICHTER, K.; OBERMEYER, G.; BRIZA, P.; KUNGL, A. J.; SIMON, B.; AUER, M.; EBNER, C.; RHEINBERGER, H. J.; BREITENBACH, M. & FERREIRA, F. (1997). Immunological and biological properties of Bet v 4, a novel birch pollen allergen with two EF-hand calcium-binding domains. *J. Biol. Chem.*, 45: 28630-28637.
- ERIKSON, N. E.; WIHL, J. A.; ARRENDAL, H. & STRANDHEDE, S. O. (1987). Tree pollen allergy III. Cross-reactions based on results from skin prick tests and the RAST in hay fever patients. A multicentre study. *Allergy*, 42: 205-214.
- ESLAVA GALÁN, J. (2000). Las rutas del olivar: Masaru en el olivar. Diputación provincial de Jaén, Asociación española de municipios del olivo (AEMO) y Consejería de Educación y Ciencia (Junta de Andalucía). Soproargra S.A., Jaen, España.
- FABBRI, A.; HORMAZA, J. I. & POLITO, V. S. (1995). Random Amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 120: 538-542.
- FERNÁNDEZ, M. F. (1986). Estudio ultraestructural, citoquímico y morfométrico del grano de polen del olivo (*Olea europaea* L.) durante su formación. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
- FERNÁNDEZ, M. C.; OLMEDILLA, A.; ALCHÉ, J. D.; PALOMINO, P.; LAHOZ, C. & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I. (1996). Immunogold probes for light and electron microscopic localization of *Ole e* I in several Oleaceae pollens. *J. Histochem. Cytochem.*, 44: 151-158.
- FERNÁNDEZ, M. C. & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I. (1988). Pollen wall development in *Olea europaea* L. *New Phytol.*, 108: 91-99.



- **FERNÁNDEZ, M. C. & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I.** (1989). Developmental changes in the aperture during pollen grain ontogeny in *Olea europaea* L. *New Phytol.*, 11: 717-723.
- **FERNÁNDEZ, M. C. & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I.** (1990). Passage of lanthanum through the pollen wall of *Olea europaea* during pollen development. *Plant Cell Rep.*, 8: 667-761.
- **FERNÁNDEZ, M. C. & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I.** (1994). Ultrastructural and morphometric studies of cytoplasmic changes during *Olea europaea* pollen grain maturation. En: Trabajos de Palinología Básica y Aplicada. Mateu, I. (ed.), pp. 67-75. Universidad de Valencia.
- **FERNÁNDEZ, M. C. & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I.** (1995). Pollen grain apertures in *Olea europaea* L. (Oleaceae). *Rev. Palaeobot. Palyno.*, 85: 99-109.
- **FERREIRA, F.; EBNER, C.; KRAMER, B.; CASARI, G.; BRIZA, P.; KUNGL, A. J.; GRIMM, R.; JAHN-SCHMID, B.; BREITENEDER, H.; KRAFT, D.; BREITENBACH, M.; RHEINBERGER, H. J. & SCHEINER, O.** (1998). Modulation of IgE reactivity of allergens by site-directed mutagenesis: potential use of hypoallergenic variants for immunotherapy. *FASEB J.*, 12 (2): 231-242
- **FLORIDO, J. F.; GONZÁLEZ-DELGADO, P.; SÁENZ DE SAN PEDRO, B.; QUIRALTE, J., ARIAS DE SAAVEDRA, J. M.; PERALTA, V. & RUÍZ VALENZUELA, L.** (1999). High levels of *Olea europaea* pollen and relation with clinical findings. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 119: 133-137.
- **FRANKE, W. W.; HERTH, W.; VAN DERWOUDE, W. J. & MORRE, D. J.** (1972). Tubular filamentous structures in pollen tubes: Possible involvement as guide elements in protoplasmic streaming and vectorial migration of secretory vesicles. *Planta*, 105: 317-341.
- **FRANKLIN-TONG, V. E.** (1999). Signalling and the modulation of pollen tube growth. *Plant Cell*, 11: 727-738.
- **FRANKLIN-TONG, V. E.; DROBAK, B. K.; ALLAN, A. C.; WATKINS, P. A. C. & TREWAVAS, A. J.** (1996). Growth of pollen tubes of *Papaver rhoeas* is regulated by slow-moving calcium wave propagated by inositol 1,4,5-triphosphate. *Plant Cell*, 8: 1305-1321.
- **GAFFNEY, T.; FRIEDICH, L.; VERNOOIJ, B.; NEGROTTO, D.; NYE, G.; UKNES, S.; WARD, E.; KESSMANN, H. & RYALS, J.** (1993). *Science*, 261: 754-756.
- **GELLER-BERNSTEIN, C.; ARAD, G.; KEYNAN, N.; LAHOZ, C.; CÁRDABA, B. & WAISEL, Y.** (1996). Hypersensitivity to pollen of *Olea europaea* in Israel. *Allergy*, 51: 356-359.



- **GIIOULEKAS, D.; CHATZIGEORGIU, G.; LIKOGIANNIS, S.; PAPAOKOSTA, D.; MPALAFOUTIS, C. & SPIEKSM, F. TH. M.** (1991). *Olea europaea* 3-year pollen record in the area of Thessaloniki, Greece and its sensitizing significance. *Aerobiology*, 7: 57-61.
- **GONZÁLEZ, E. M.; VILLALBA, M. & RODRÍGUEZ, R.** (2000). Allergenic cross-reactivity of olive pollen. *Allergy*, 55 (7): 658-663.
- **GONZÁLEZ, R. M.; CORTES, C. & CARREIRA, J.** (1987). Un alérgeno minoritario del polen de *Olea europaea* compartido por cuatro especies comunes de gramíneas. *Rev. Esp. Allergol. Immunol. Clin.*, 2: 18-22.
- **GHOSH, B.; PERRY, M. P. & MARSH, D. G.** (1991). Cloning of the cDNA encoding the *Amb t V* allergen from giant ragweed (*Ambrosia trifida*) pollen. *Gene*, 101: 231-238.
- **GHOSH, B.; PERRY, M. P.; RAFNAR, T. & MARSH, D. G.** (1993). Cloning and expression of immunologically active recombinant *Amb a V* allergen of short ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) pollen. *J. Immunol.*, 150: 5391-5399.
- **GHOSH, B.; RAFNAR, T.; PERRY, M. P.; BASSOLINO-KLIMAS, D.; METZLER, W. J.; KLAPPER, D. G. & MARSH, D. G.** (1994). Immunologic and molecular characterization of *Amb p V* allergens from *Ambrosia psilostachya* (Western ragweed) pollen. *J. Immunol.*, 152: 2882-2889.
- **GRIFFITH, I. J.; POLLOCK, J.; KLAPPER, D. G.; ROGERS, B. L. & NAULT, A. K.** (1991a). Sequence polymorphism of *Amb a I* and *Amb a II*, the major allergens in *Ambrosia artemisiifolia* (short ragweed). *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 96: 296-304.
- **GRIFFITH, I.J.; SMITH, P. M.; POLLOCK, J.; THEERAKULPISUT, P.; AVJIOGLU, A.; DAVIES, S.; HOUGH, T.; SINGH, M. B.; SIMPSON, R. J.; WARD, L. D. & KNOX, R. B.** (1991b). Cloning and sequencing of *Lol p I*, the major allergenic protein of rye-grass pollen. *FEBS Lett.*, 279: 210-215.
- **GROTE, M.** (1988). Binding of antibodies against birch pollen antigens/allergens to various parts of apples as studied by immunogold electron microscopy. *Immunobiology*, 17: 290-300.
- **GROTE, M.** (1991). Immunogold electron microscopy of soluble proteins: localization of *Bet v I* major allergen in ultra-thin sections of birch pollen after anhydrous fixation techniques. *J. Histochem. Cytochem.*, 39: 1395-1401.
- **GROTE, M.** (1992). Ultrastructural morphology and allergen detection in birch pollen after aqueous, anhydrous-liquid, and vapour fixation techniques. *J. Microsc. Res. Tech.*, 21: 242-248.



- GROTE, M.; DOLECEK, C. H.; VAN REE, R & VALENTA, R. (1994). Immunogold electron microscopic localization of timothy grass (*Phleum pratense*) pollen major allergens *Phl p* I and *Phl p* V after anhydrous fixation in acrolein vapour. *J. Histochem. Cytochem.*, 42 (3): 427-431.
- GUIGNARD, L. (1899). Sur les anthérozoïdes et la double copulation sexuelle chez le végétaux angiospermes. *Rev. Gén. Bot.*, 11: 129-135.
- HANSON, D. D.; HAMILTON, D. A.; TRAVIS, J. L.; BASHE, B. M. & MASCARENHAS, J. P. (1989). Characterization of a pollen-specific cDNA clone from *Zea mays* and its expression. *Plant Cell*, 1: 173-179.
- HARVEY, P. H.; LEVINGS, C. S. & WERNSMAN, E. A. (1972). The role of extrachromosomal inheritance in plant breeding. *Adv. Agron.*, 24: 124.
- HAÜPER, I.; HERTH, W. & REISS, H. (1984). *Planta*, 162: 33-39.
- HERNÁNDEZ DE ROJAS, M. D.; BASOMBA, A.; SUBIZA, E. (1991). Allergenic pollen and pollinosis in Spain. In: Allergenic pollen and pollinosis in Europe. D'Amato, G.; Frits, T.; Spielsma, M. & Bonini, S. (eds.), pp. 189-192. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK.
- HESLOP-HARRISON, J. (1968). Tapetal origin of pollen coat substances in *Lilium*. *New Phytol.*, 67: 779-786.
- HESLOP-HARRISON, J. (1972). Sexuality in Angiosperms. In: Plant physiology. Steward, F.C. (ed.), pp. 133-289. Academic press. New York, USA.
- HESLOP-HARRISON, J. (1975). The physiology of pollen grain surface. *Proc. Soc. B.*, 190: 275-299.
- HESLOP-HARRISON, J. & HESLOP-HARRISON, Y. (1992). Intracellular motility, the actin cytoskeleton and germinability in the pollen of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Sex. Plant Reprod.*, 5: 247-255.
- HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y. & BARBER, J. (1975). The stigma surface in incompatibility responses. *Proc. Roy. Soc. London Ser. B*, 188: 287-297.
- HESLOP-HARRISON, J. & MACKENZIE, A. (1967). Autoradiography of soluble [¹⁴C]thymidine derivatives during meiosis and microsporogenesis in *Lilium* anthers. *J. Cell Sci.*, 2: 387-400.
- HESLOP-HARRISON, Y. & SHIVANNA, K. R. (1977). The receptive surface of the Angiosperm stigma. *Ann. Bot.*, 41: 1233-1258.



- **HEYWOOD, H. U.** (1978). Flowering plants of the world. Oxford University Press, London, UK.
- **HISCOCK, S. J.; DEWEY, F. M.; COLEMAN, J. O. D. & DICKINSON, H. G.** (1994). Identification and localization of an active cutinase in the pollen of *Brassica napus* L. *Planta*, 193: 377-384.
- **HISCOCK, S. J.; DOUGHTY J. & DICKINSON, H. G.** (1995). Synthesis and phosphorylation of pollen grain proteins during pollen-estigma interaction in self-compatible *Brassica napus* L. and self-incompatible *Brassica Olearacea* L. *Sex. Plant Reprod.*, 8: 345-353.
- **HOEKSTRA, F. A. & BRUINSMA, J.** (1979). Protein synthesis of binucleate and trinucleate pollen and its relationship to tube emergence and growth. *Planta*, 146: 559-566.
- **HOFMEISTER, W.** (1849). Die entstehung des embryo der phanerogamen. Leipzig.
- **HORNER, H. T. JR.** (1977). A comparative light and electron-microscopic study of microsporogenesis in male-fertile and cytoplasmic male-fertile sunflower (*Helianthus annuus*). *Ann. J. Bot.*, 64: 745-759.
- **HORNER, H. T. JR. & LERSTEN, N. R.** (1971). Microsporogenesis in *Citrus limon* (Rutaceae). *Am. J. Bot.*, 58: 72-79.
- **HOWLETT, B. J.; KNOX, R. B. & HESLOP-HARRISON, J.** (1973). Pollen-wall proteins: release of the allergen Antigen E from intine and exine sites in pollen grains of ragweed and *Cosmos*. *J. Cell Sci.*, 13: 603-619.
- **HOWLETT, B. J.; VITHANAGE, H. L. M. V. & KNOX, R. B.** (1981). Immunofluorescent localization of two water-soluble glycoproteins including the major allergen from the pollen of ryegrass, *Lolium perenne*. *Histochem. J.*, 13: 461-480.
- **HUECAS, S.; VILLALBA, M.; GONZÁLEZ, E.; MARTÍNEZ-RUIZ, A. & RODRÍGUEZ, R.** (1999). Production and detailed characterization of biologically active olive pollen allergen Ole e 1 secreted by the yeast *Pichia pastoris*. *Eur. J. Biochem.*, 261: 539-545.
- **HUYNH, K. L.** (1976). Arrangement of some monosulcate, disulcate, trisulcate, dicolpate and tricolpate pollen types in the tetrads, and some aspects of evolution in the angiosperms. In: The evolutionary significance of the exine. Ferguson, I. K. & Muller, J. (eds.), pp-101-124. Academic Press. London, UK.
- **IPSEN, H. & HANSEN, O. C.** (1990). Structural similarities among major allergens of tree pollens. In: Epitopes of atopic allergens. Schon, A. H.; Kraft, D. & Kunkel, G. (eds.), pp. 3. UCB Institute of Allergy. Brussels, Belgium.



- IPSEN, H. & HANSEN, O. C. (1991). The NH₂-terminal amino acid sequence of the immunochemically partial identical major allergens of alder (*Alnus glutinosa*) *Aln g I*, birch (*Betula verrucosa*) *Bet v I*, hornbeam (*Carpinus betulus*) *Car b I*, and oak (*Quercus alba*) *Que a I* pollens. *Mol. Immunol.*, 28: 1279-1288.
- JACOBSEN, L.; DREBORG, S.; MÖLLER, C.; VALOVIRTA, E.; WAHN, U.; NIGGEMANN, B.; KOLLER, D.; URBANEK, R.; HALKEN, S.; HØST, A. & LØWENSTEIN, H. (1996). Immunotherapy as preventive allergy treatment (PAT). Abstract 198. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 97: 232.
- JAROLIM, E.; TEJKL, M.; ROHAC, M.; SCHLERKA, G.; SCHEINER, O.; KRAFT, D. ET AL. (1989). Monoclonal antibodies against birch pollen allergens: Characterization by immunoblotting and use for a single-step affinity purification of the major allergen *Bet v I*. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 90: 54-60.
- JENSEN, W. A.; ASHTON, M & HECKARD, R. (1974). Ultrastructural studies of the pollen of subtribe Castilleiinae, family Scrophulariaceae. *Bot. Gaz.*, 135: 210-218.
- JOHANSEN, B. (1997). *In situ* PCR on plant material with sub-cellular resolution. *Ann. Bot.*, 80: 697-700.
- JOHNSON, P. & MARSH, D. G. (1965). "Isoallergens" from rye grass pollen. *Nature*, 206: 935-937.
- JONES, P. (1995). Gel electrophoresis: nucleic acids. Essential Techniques Series (Series ed. Rickwook, D.). John Wiley & Sons + Bios Scientific Publishers Ltd., UK.
- JONES, R. L. & ROBINSON, D. G. (1989). *New Phytol.*, 111: 567-597.
- KARAMLOO, F.; SCHMITZ, N.; SCHEURER, S.; FOETISCH, K.; HOFFMANN, A.; HAUSTEIN, D. & VIETHS, S. (1999). Molecular cloning and characterization of a birch pollen minor allergen, *Bet v 5*, belonging to a family of isoflavone reductase-related proteins. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 104 (5): 991-999.
- KAREEM, B. N.; KARLSEN, F.; HOLM, R.; HENNIG, E. M.; SUO, Z.; EMILSEN, E.; HELLESYLT, E. & NESLAND, J. M. (1997). A novel grid polymerase chain reaction (G-PCR) approach at ultrastructural level to detect target DNA in cell cultures and tissues. *J. Pathol.*, 183: 486-493.
- KERHOAS, C.; GAY, G. & DUMAS, C. (1987). A multidisciplinary approach to the study of plasma membrane of *Zea mays* pollen during controlled dehydration. *Planta*, 171: 1-10.



- **KERNERMANN, S. M.; McCULLOUGH, J.; GREEN, J. & OWNBY, D. R.** (1992). Evidence of cross-reactivity between olive, ash, privet and Russian olive tree pollen allergens. *Ann. Allergy*, 69: 493-496.
- **KHOO, V. & WOLF, M. J.** (1970). Origin and development of protein granules in maize endosperm. *Am. J. Bot.*, 57: 1042-1050.
- **KING, J. R. & HESSE, C. O.** (1938). Pollen longevity studies with deciduous fruits. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 36: 310-313.
- **KNOX, R. B.** (1979). In: Pollen and allergy, pp. 56-57. University Park Press. Baltimore, USA.
- **KNOX, R. B.** (1984). The pollen grain. In: Embriology of Angiosperms. Johri, B. M. (ed.), pp. 197-271. Springer-Verlag. Germany.
- **KNOX, R. B. & HESLOP-HARRISON, J.** (1969). Cytochemical localization of enzymes in the wall of the pollen grain. *Nature*, 223: 92-94.
- **KNOX, R. B. & HESLOP-HARRISON, J.** (1970). Pollen wall proteins: localization and enzymatic activity. *J. Cell Sci.*, 6: 1-11.
- **KNOX, R. B. & HESLOP-HARRISON, J.** (1971). Pollen-wall proteins: localization of antigenic and allergenic proteins in pollen grain walls of *Ambrosia* spp. (ragweeds). *Cytobios*, 4: 49-54.
- **KNOX, R. B.; SINGH, M. B.; HOUGH, T. & THEERAKULPISUT, P.** (1989). *Adv. Biosc.*, 75: 161-171.
- **KNOX, R. B. & SUPHIOGLU, C.** (1996). Pollen allergens: development and function. *Sex. Plant Reprod.*, 9: 318-323.
- **KNOX, R. B.; VITHANAGE, H. I. M. & HOWLETT, B. J.** (1980). Botanical immunocytochemistry: a review with special reference to pollen antigens and allergens. *Histochem. J.*, 12: 247-272.
- **KÖLREUTER, J. C.** (1760). Vorläufige nachricht von einigen das geschlecht der pflanzen betreffenden Versuchen und Beobachtungen.
- **KOMIYAMA, M.; SONE, T.; SHIMIZU, K.; MORIKUBO, K. & KINO, K.** (1994). CDNA cloning and expression of *Cry j II*, the second major allergen of Japanese cedar pollen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 201 (2): 1021-1028.



- KRISHNAN, B. H.; FRANCESCHI, V. R., & OKITA, T. W. (1986). Immunocytochemical studies on the role of the Golgi complex in protein-body formation in rice seeds. *Planta*, 169: 471-480.
- KROH, M. (1967). Fine structure of petunia pollen germinated *in vivo*. *Rev. Paleobot. Palynol.*, 3: 197-203.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- LAHOZ, C.; CÁRDABA, B.; PALOMINO, P.; DE ANDRÉS, B.; DEL POZO, V. & DE ARRUDA-CHAVES, E. (1995). Olive tree pollen: the main cause of allergy in Mediterranean countries. Proceedings of the XVI European Congress of Allergology and Clinical Immunology (Bologna, Italy), pp. 661-664.
- LAHOZ, C.; LAUZURICA, P.; TRICAS, L.; DÍAZ, R.; MASURI, N.; GALOCHA, B.; FLOREZ, R.; MAESTRE, Y.; GURBINDO, C. & GARCÍA, R. (1985). A glycoprotein as the major antigen in *Olea europaea*. *Ann. Allergy*, 55: 289-294.
- LARKINS, B. A. & HURKMAN, W. J. (1978). Synthesis and deposition of protein bodies of maize endosperm. *Plant Physiol.*, 62: 256-263.
- LARSEN, J. N.; STROMAN, P. & IPSEN, H. (1992). PCR based cloning and sequencing of isogenes encoding the tree pollen major allergen *Car b I* from *Carpinus betulus*, hornbeam. *Mol. Immunol.*, 29 (6): 703-711.
- LASER, K. D. & LERSTEN, N. R. (1972). Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. *Bot. Rev.*, 38: 425-454.
- LAUZURICA, P.; GURBINDO, C.; MARURI, N.; GALOCHA, B.; DÍAZ, R.; GONZÁLEZ, J.; GARCÍA, R. & LAHOZ, C. (1988a). Olive (*Olea europaea*) pollen allergens. I. Immunochemical characterization by immunoblotting, CRIE and immunodetection by a monoclonal antibody. *Mol. Immunol.*, 25: 329-335.
- LAUZURICA, P.; MARURI, N.; GALOCHA, B.; GONZÁLEZ, J.; DÍAZ, R.; PALOMINO, P.; HERNÁNDEZ, R.; GARCÍA, R. & LAHOZ, C. (1988b). Olive (*Olea europaea*) pollen allergens. II. Isolation and characterization of two major antigens. *Mol. Immunol.*, 25: 337-344.
- LEDESMA, A.; RODRÍGUEZ, R. & VILLALBA, M. (1998a). Olive pollen profilin. Molecular and immunological properties. *Allergy*, 53 (5): 520-526.
- LEDESMA, A.; VILLALBA, M.; BATANERO, E. & RODRÍGUEZ, R. (1998b). Molecular cloning and expression of active Ole e 3, a major allergen from olive-tree pollen and



- member of a novel family of Ca²⁺-binding proteins (polcalcins) involved in allergy. *Eur. J. Biochem.*, 258 (2): 454-459.
- LEDESMA, A.; VILLALBA, M. & RODRÍGUEZ, R. (2000). Cloning, expression and characterization of a novel four EF-hand Ca²⁺-binding protein from olive pollen with allergenic activity. *FEBS Letters*, 466 (1): 192-196.
 - LEITÃO, F. (1988). Contributo para o conhecimento de 20 cultivares de *Olea europaea* L., quer sobre o aspecto de caracterização, quer da produtividade, determinante do seu valor economico. Dissertação. Instituto Nacional de Investigação Agrario. Estação Agronómica Nacional. Oeiras, Portugal.
 - LEITCH, A. R.; SCHWARZACHER, T.; JACKSON, D. & LEITCH, I. J. (1994). *In situ* hybridization: a practical guide. Royal Microscopical Society Microscopy Handbooks, 27. Bios Scientific Publishers. Oxford, UK.
 - LEUNG, R. C.; CARLIN, J. B.; BURDON, J. G. & CZARNY, D. (1994). Asthma, allergy and atopy in Asian immigrants in Melbourne. *Med. J. Austr.*, 161: 418-425.
 - LICCARDI, G.; D'AMATO, M. & D'AMATO, G. (1996). Oleaceae pollinosis: a review. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 111: 210-217.
 - LINSKENS, H. F.; VAN DER WERKEN, P. & JORDE, W. (1980). The formation of allergens during the development of rye pollen (*Secale cereale*). *Allergol. Immunopath.*, 8: 35-41.
 - LOMBARDEO, M.; BARBAS, J. A.; MOSCOSO DEL PRADO, J. & CARREIRA, J. (1994). cDNA sequence analysis of the main olive allergen, *Ole e I*. *Clin. Ex. Allergy*, 24: 765-770.
 - LOMBARDEO, M.; QUIRCE, S.; DUFFORT, O.; BARBER, D.; CARPIZO, J.; CHAMORRO, M. J.; LEZAUN, A. & CARREIRA, J. (1992). Monoclonal antibodies against *Olea europaea* major allergen: Allergenic activity of affinity-purified allergen and depleted extract and development of a radioimmunoassay for the quantitation of the allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 89: 884-894.
 - LOUSSERT, R. & BROUSSE, G. (1980). El olivo. Ed. Mundi Prensa. Madrid, España.
 - LÖWENSTEIN, H. (1987). Detection systems: the different principles for standarization of allergens. In: V International Paul-Ehrlich Seminar. Kurth, R. (ed.), pp. 113-116. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart, Germany.
 - LUEGMAYR, E. (1993). The generative cell and its close association with the endoplasmic reticulum of the vegetative cell in pollen of *Cyrtandra pendula* (Gesneriaceae). *Protoplasma*, 177: 73-81.



- MACKENZIE, A.; HESLOP-HARRISON, J. & DICKINSON, H. G. (1967). Elimination of ribosomes during meiotic prophase. *Nature*, 215: 997-999.
- MAHESHWARI, P. (1950). An introduction to the embryology of Angiosperms. McGraw-Hill. London. New York.
- MAJEWSKA-SAWKA, A. & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I. (1996). rRNA distribution during microspore development in anthers of *Beta vulgaris* L.: quantitative in situ hybridization analysis. *J. Cell Sci.*, 109: 859-866.
- MAJEWSKA-SAWKA, A.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I.; NAKASHIMA, H. & JASSEN, B. (1993). Ultrastructural expresión of cytoplasmic male sterility in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Sex. Plant Reprod.*, 6: 22-32.
- MAPA (MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACION) (1990). Anuarios de estadística agraria.
- MAPA (MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACION) (1993). Anuarios de estadística agraria.
- MARCH, L. & RÍOS, A. (1989). El libro del aceite y la aceituna. Alianza Ed. S.A. Madrid, España.
- MARTÍN-OROZCO, E.; CÁRDABA, B.; DEL POZO, V.; DE ANDRÉS, B.; VILLALBA, M.; GALLARDO, S.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I.; FERNÁNDEZ, M. C.; ALCHÉ, J. D.; RODRÍGUEZ, R.; PALOMINO, P. & LAHOZ, C. (1994). *Ole e I*: epitope mapping, cross-reactivity with other Oleaceae pollens and ultrastructural localization. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 104: 160-170.
- MARTÍNEZ, A.; ASTURIAS, J. A.; PALACIOS, R.; SANZ, M. L.; SÁNCHEZ, G.; OEHLING, A. & MARTÍNEZ, J. (1999). Identification of a 36-kDa olive-pollen allergen by *in vitro* and *in vivo* studies. *Allergy*, 54: 584-592.
- MARTÍNEZ, A.; MARTÍNEZ, A. & PALACIOS, R. (1995). The panallergenic character of profilin. *Allergy Clin. Immunol. News*, 7 (3): 85-94.
- MASCARENHAS, J. P. (1975). The biochemistry of angiosperm pollen development. *Bot. Rev.*, 41: 259-314.
- MASCARENHAS, J. P. (1988). Anther and pollen expressed genes. In: Temporal and apatial regulation of plant genes. Verma, D. P. S. & Goldberg R. B. (eds.), pp. 97-115. Springer-Verlag, New York (USA).



- MASCARENHAS, J. P. (1989). The male gametophyte of flowering plants. *Plant Cell*, 1: 657-664.
- MASCARENHAS, J. P. (1990). Gene activity during pollen development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 41: 317-338.
- MASCARENHAS, J. P. (1992). Pollen gene expression: Molecular evidence. *Int. Rev. Cytol.*, 140: 3-18.
- MASCARENHAS, J. P. (1993). Molecular mechanisms of pollen tube growth and differentiation. *Plant Cell*, 5: 1303-1314.
- MASCARENHAS, J. P. & MERMELSTEIN, J. (1981). Messenger RNAs: Their utilization and degradation during pollen germination and tube growth. *Acta Soc. Bot. Polon.*, 50: 13-20.
- MASCARENHAS, J. P.; TERENNA, B.; MASCARENHAS, A. F. & RUECKERT, L. (1974). Protein synthesis during germination and pollen tube growth in *Tradescantia*. In: Fertilization in Higher Plants. Linskens, H. F. (ed.), pp. 137-143. North Holland. Amsterdam, The Netherlands.
- MATTHIESEN, F.; IPSEN, H. & LÖWENSTEIN, H. (1991). Pollen allergens. In: Allergenic pollen and pollinosis in Europe. D'Amato, G.; Frits, T.; Spiekma, M. & Bonini, S. (eds.), pp. 36-44. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK.
- MCCORMICK, S. (1991). Molecular analysis of male gametogenesis in plants. *Trends Genet.*, 7: 298-303.
- MCCORMICK, S. (1993). Male gametophyte development. *Plant Cell*, 5: 1265-1275.
- MEPHAM, R. H. & LANE, G. R. (1969). Formation and development of the tapetal periplasmodium in *Tradescantia bracteata*. *Protoplasma*, 68: 175-192.
- MEPHAM, R. H. & LANE, G. R. (1970). Observations on the fine structure and developing microspores of *Tradescantia bracteata*. *Protoplasma*, 70: 1-20.
- MIDORO-HORIUTI, T.; GOLDBLUM, R. M.; KUROSKY, A.; WOOD, T. G.; SCHEIN, C. H. & BROOKS, E. G. (1999). Molecular cloning of the mountain cedar (*Juniperus ashei*) pollen major allergen, *Jun a 1*. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 104: 613-617.
- MIKI-HIROSIGE, H.; NAKAMURA, S.; YASUEDA, H.; SHIDA, T. & TAKAHASHI, Y. (1994). Immunocytochemical localization of the allergenic proteins in the pollen of *Cryptomeria japonica*. *Sex. Plant Reprod.*, 7: 95-100.



- MITTERMAN, I.; SWOBODA, I.; PIERSON, E.; ELLER, N.; KRAFT, D.; VALENTA, R. & HEBERLE-BORS, E. (1995). Molecular cloning and characterization of profilin from tobacco (*Nicotiana tabacum*). Increased profilin expression during pollen maturation. *Plant Mol. Biol.*, 27 (1): 137-146.
- MIYAHARA, S.; NAKADA, M.; NISHIZAKI, K.; KAWARAI, Y.; NISHIOKA, K. & HINO, H. (1997). Cross-reactivity to olive tree pollen and orchard grass pollen in patients with pollinosis. *Acta Med. Okayama*, 51 (3): 167-171.
- MOLE, L. E.; GOODFRIEND, L.; LAPKOFF, C. B.; KEHOE, J. M. & CAPRA, J. D. (1975). The amino acid sequence of ragweed pollen allergen Ra5. *Biochemistry*, 14: 1216-1220.
- MORETTINI, A. (1972). L'olivicultura. Ramo Editoriale degli Agricoltori. Roma, Italy.
- MORI, T.; YOKOYAMA, M.; KOMIYAMA, M.; OKANO, M. & KINO, K. (1999). Purification, identification, and cDNA cloning of Cha o 2, the second major allergen of Japanese cypress pollen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 263 (1): 166-171.
- M'RANI-ALAOU, M. (2000). Estudio a nivel celular de la germinación del polen, emisión y elongación del tubo polínico en el olivo (*Olea europaea* L.). Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- MU, J. H.; LEE, H. S. & KAO, T. H. (1994). Characterization of a pollen-expressed receptor-like kinase gene of *Petunia inflata*. *Plant Mol. Biol.*, 25: 539-544.
- MU, J. H.; STAINS, J. P. & KAO, T. H. (1994). Characterization of a pollen-expressed gene encoding a putative pectin esterase of *Petunia inflata* and the activity of its encoded kinase. *Plant cell*, 6: 709-721.
- MURFETT, J.; ATHERTON, T. L.; MOU, B.; GASSER, C. S. & MCCLURE, B. A. (1994). *Nature*, 376: 563-566.
- MUSCHIETTI, J.; DIRCKS, L.; VANCANNEY, G. & MCCORMICK, S. (1994). LAT52 protein is essential for tomato pollen development: pollen expressing antisense LAT52 RNA hydrates and germinates abnormally and cannot achieve fertilization. *Plant J.*, 6: 321-338.
- NAWASCHIN, S. G. (1898). Resultate einer revision der befruchtungsvorgänge bei *Lilium martagon* und *Fritillaria tenella*. *Bull. Acad. Imp. Sci. St. Petersburg*, 9: 377-382.
- NEGRINI, A. C. (1989). Pollinosis in Italy. Proceedings Symposium: Pollinosis in the Mediterranean area, pp. 39-42. Naples, Italy.



- **OBISPO, T.M.; MELERO, J. A.; CARPIZO, J.A.; CARREIRA, J. & LOMBARDELO, M.** (1993). The main allergen of *Olea europaea* (Ole e I) is also present in other species of the Oleaceae family. *Clin. Exp. Allergy*, 23: 311-316.
- **OHTSUKI, T.; TANIGUCHI, Y.; M.; KHONO, K.; FUKUDA, S.; USUI, M. & KURIMOTO, M.** (1995). Cry j 2, a major allergen of Japanese red cedar pollen, shows polymethylgalacturonase activity. *Allergy*, 50: 483-488.
- **OLMEDILLA, A.; ALCHÉ, J. D. & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I.** (1997). Nucleolar evolution and coiled bodies during meiotic prophase in *Olea europaea*: differential localization of nucleic acids. *Eur. J. Cell Biol.*, 74: 181-189.
- **OKADA, T.; SWOBODA, I.; BHALLA, P. L.; TORIYAMA, K. & SINGH, M. B.** (1998). Engineering of hypoallergenic mutants of the *Brassica* pollen allergen, Bra r 1, for immunotherapy. *FEBS Letters*, 434: 255-260.
- **OKADA, T.; ZHANG, Z.; RUSSELL, S. D.; TORIYAMA, K.** (1999). Localization of the Ca²⁺-binding protein, Bra r 1, in anthers and pollen tubes. *Plant Cell Physiol.*, 40 (12): 1243-1252.
- **OPARKA, N., & HARRIS, N.** (1982). Rice protein-body formation: all types are initiated by dilation of the endoplasmic reticulum. *Planta*, 154: 184-188.
- **OUAZZANI, N.; LUMARET, R.; VILLEMUR, P. N. & DIGIUSTO, F.** (1993). Leaf allozyme variation in cultivated and wild olive tress (*Olea europaea* L.). *J. Hered.*, 84: 34-42.
- **PACINI, E.** (1990). Role of pollen in plant physiology and reproduction. In: Pollinosis. Falagiani, P. (ed.), pp. 3-18. CRC Press. Boca Ratón, Florida, USA.
- **PACINI, E.** (1994). Cell biology of anther and pollen development. In: Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants. Williams, E. G.; Clarke, A. E. and R. B. Knox (eds.), pp. 289-308. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.
- **PACINI, E. & JUNIPER, B. E.** (1979a). The ultrastructure of pollen grain development in the olive (*Olea europaea* L.). 1. Proteins in the pore. *New Phytol.*, 83: 157-164.
- **PACINI, E. & JUNIPER, B. E.** (1979b). The ultrastructural of pollen grain development in the olive (*Olea europaea* L.). 2. Secretion by the tapetal cells. *New Phytol.*, 83: 165-174.
- **PAJARÓN, M. J.; VILA, L.; PRIETO, I.; RESANO, A.; SANZ, M. L. & OEHLING, A. K.** (1997). Cross-reactivity of *Olea europaea* with other Oleaceae species in allergic rhinitis and bronchial asthma. *Allergy*, 52: 829-835.



- PANZANI, R.; YASUEDA, H.; SHIMIZU, T. & SHIDA, T. (1986). Cross-reactivity between the pollen of *Cupressus sempervirens* (Common cypress) and of *Cryptomeria japonica* (Japanese cedar). *Ann. Allergy*, 57: 26-30.
- PARCHMAN, L. G. & LIN, K. CH. (1972). Nucleolar RNA synthesis during meiosis of lily microsporocytes. *Nat. New Biol.*, 239: 235-237.
- PARFITT, D. E. & ARULSEKAR, S. (1989). Inheritance and isozyme diversity for GPI and PGM among grape cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 114: 486-491.
- PASCUAL, L.; PERFECTTI, F.; GUTIERREZ, M. & VARGAS, A. M. (1993). Characterizing isozymes of Spanish cherimoya cultivars. *Hort. Science*, 38: 845-847.
- PÉREZ, M.; ISHIOKA, G. Y.; WALKER, L. E. & CHESNUT, R. W. (1990). cDNA cloning and immunological characterization of the rye grass allergen *Lol p I*. *J. Biol. Chem.*, 265 (27): 16210-16215.
- PERRI, E.; SIRIANNI, R.; GODINO, G. & TARTARINI, S. (2000). Characterization of Italian olive (*Olea europaea* L.) cultivars by statistical and molecular methods. 3th International Symposium on Olive Growing. Bari, Italy.
- PETERSEN, A.; BUFE, A.; SCHRAMM, G.; SCHLAAK, M. & BECKER, W. (1995). Characterization of the allergen group VI in timothy grass pollen (Phl p 6). II. cDNA cloning of Phl p 6 and structural comparison to grass group V. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 108 (1): 55-59.
- PETTENBURGER, K.; TEJKL, M.; VALENTA, R.; HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K. SWOBODA, I.; HEBERLE-BORS, E.; BREITENBACH, M.; RUMPOLD, H.; KRAFT, D. & SCHEINER, O. (1992). Distribution of allergens and allergen-coding mRNAs in various tissues of white birch. *Mol. Immunol.*, 29 (11): 1401-1406.
- PHAM, N. H. & BALDO, B. A. (1995). Allergenic relationship between taxonomically diverse pollens. *Clin. Exp. Allergy*, 25: 599-606.
- P. M. PHARMA- Revista profesional de marketing farmacéutico (Junio, 1996). Un nuevo informe identifica el movimiento hacia un mayor uso de los tratamientos preventivos inhalados que minimizan el riesgo de los ataques de asma.
- PONTIKIS, C. A.; LOUKAS, M. & KOUSOUNIS, G. (1980). The use of biochemical markers to distinguish olive cultivars. *J. Hort. Sci.*, 55 (4): 333-343.
- RAFNAR, R.; GRIFFITH, I. J.; KUO, M.; BOND, J. F.; ROGERS, B. L. & KLAPPER, D. G. (1991). Cloning of *Amb a I* (Antigen E), the major allergen family of short ragweed pollen. *J. Biol. Chem.*, 266: 1229-1236.



- **RAPOPORT, H. F. & RALLO, L.** (1991). Post-anthesis flower and fruit abscission in the olive cultivar "Manzanillo". *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 116: 720-723.
- **REYNOLD, E. S.** (1963). The use of lead citrate at high a pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17: 208-212.
- **RIHS, H. P.; CHEN, Z.; RUEFF, F.; PETERSEN, A.; ROZYNEK, P.; HEIMANN, H. & BAUR, X.** (1999). IgE binding of recombinant allergen soybean profilin (rGly m 3) is mediated by conformational epitopes. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 104 (6): 1293-1301.
- **RIHS, H. P.; ROZYNEK, P.; MAYTAUBE, K.; WELTICKE, B. & BAUR, X.** (1994). Polymerase chain reaction based cDNA cloning of wheat profilin. A potential plant allergen. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 105 (2): 190-194.
- **RISUEÑO, M. C.; GIMÉNEZ-MARTIN, G.; LÓPEZ-SÁEZ, J. F. & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I.** (1969). Origin and development of sporopollenin bodies. *Protoplasma*, 67: 361-374.
- **RIVERA, F. G.** (1941). Pleomorfismo y esterilidad ovárica del olivo. *Anales de la E. de P. A. y de E. A.*, 1 (Fasc. I y II): 75-94.
- **RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I. & FERNÁNDEZ, M. C.** (1987). Cytoplasmic nucleoloids during microsporogenesis in *Olea europaea* L. *Biol. Cell.*, 60: 155-160.
- **RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I. & FERNÁNDEZ, M. C.** (1990). Ultrastructural evidence of endoplasmic reticulum changes during the maturation of the olive pollen grain (*Olea europaea* L.). *Plant Syst. Evol.*, 171: 221-231.
- **RODRÍGUEZ-GARCÍA M. I.; FERNÁNDEZ M. C. & ALCHE J. D.** (1995a). Immunocytochemical localization of allergenic protein (*Ole e 1*) in the endoplasmic reticulum of the developing pollen grain of olive (*Olea europaea* L.). *Planta*, 196: 558-563.
- **RODRÍGUEZ-GARCÍA M. I.; FERNÁNDEZ M. C.; ALCHE J. D. & OLMEDILLA A.** (1995b). Endoplasmic reticulum as storage site for allergenic proteins in pollen grains of several Oleaceae. *Protoplasma*, 187: 111-116.
- **RODRÍGUEZ-GARCÍA M. I. & MAJEWSKA-SAWKA, A.** (1992). Is the special callose wall of microsporocytes an impermeable barrier?. *J. Exp. Bot.*, 257: 1659-1663.
- **RODRÍGUEZ, R.; VILLALBA, M.; BATANERO, E.; MONSALVE, R. I.; LÓPEZ-OTÍN, C.; LAHOZ, C. & GONZÁLEZ DE LA PEÑA, M. A.** (1995). Allergens from olive tree and related species. Proceedings of the XVI European Congress of Allergology and Clinical Immunology (Bologna, Italy), pp. 671-677.



- ROGERS, B. L.; MORGENSTERN, J. P.; GRIFFITH, I. J.; YU, X. B.; COUNSELL, C. M.; BRAUER, A. W. *ET AL.* (1991). Complete sequence of the allergen *Amb a II*. Recombinant expression and reactivity with T cells from ragweed allergenic patients. *J. Immunol.*, 147: 2547-2552.
- ROHAC, M.; BIRKNER, T.; REIMITZER, Y.; BOHLE, B.; STEINER, R.; BREITENBACH, M.; KRAFT, D.; SCHEINER, O.; GABL, F. & RUMPOLD, H. (1991). The immunological relationship of epitopes on major tree pollen allergens. *Mol. Immunol.*, 28: 897-906.
- ROOS, N. & MORGAN, A. J. (1990). Cryopreparation of thin biological specimens for electron microscopy: methods and applications. Oxford University Press-Royal Microscopical Society. UK.
- RUBIO, N.; BRIEVA, A. & ALCÁZAR, B. (1987). Purification of allergens by high-performance liquid chromatography. IV. Purification of the allergen of olive pollen (*Olea europaea*). *J. Chromatogr.*, 403: 312-318.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York, USA.
- SANDERS, D.; BROWNLEE, C. & HARPER, J. F. (1999). Communicating with calcium. *Plant Cell*, 11: 691-706.
- SCHÄGGER, H. & VON JAGOW, G. (1987). Tricine-sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, 166: 368-379.
- SCHEINER, O. (1992). Recombinant allergens: biological, immunological and practical aspects. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 98: 93-96.
- SCHEURER, S.; WANGORSCH, A.; HAUSTEIN, D. & VIETHS, S. (2000). Cloning of the minor allergen Api g 4 profilin from celery (*Apium graveolens*) and its cross-reactivity with birch pollen profilin Bet v 2. *Clin. Exp. Allergy*, 30 (7): 962-971.
- SCHLEIDEN, M. J. (1837). Einige blicke auf die entwicklungsgeschichte des vegetabilischen organismus bei den phanerogamen. *Arch. Bwl. Naturgeschichte* III, 1: 289-320.
- SCHLEIDEN, M. J. (1845). Über Amici's letzten beitrage zur lehre von der befruchtung der pflanzen. *Flora*: 593-600.
- SCHLIWA, M.; EUTENEUER, V.; BULINSKI, J. C. & IZANT, J. G. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78: 1037-1041.



- SEIBERLER, S.; SCHEINER, O.; KRAFT, D.; LONSDALE, D. & VALENTA, R. (1994). Characterization of a birch pollen allergen, *Bet v* III, representing a novel class of Ca^{2+} -binding proteins: specific expression in mature pollen and dependence of patients IgE binding on protein-bound Ca^{2+} . *EMBO J.*, 13 (15): 3481-3486.
- SHIVANNA, K. R.; LINSKENS, H. F. & CRESTI, M. (1991). Responses of tobacco pollen to high humidity and heat stress: viability and germinability *in vitro* and *in vivo*. *Sex. Plant Reprod.*, 4: 104-109.
- SIDOLI, A.; TAMBORINI, E.; GIUNTINI, I.; LEVI, S.; VOLONTE, G.; PAINI, C.; DE LALLA, C.; SICCARDI, A. G.; BARALLE, F. E.; GALLIANI, S. *ET AL.* (1993). Cloning, expression, and immunological characterization of recombinant *Lolium perenne* *Lol p* II. *J. Biol. Chem.*, 268 (29): 21819-21825.
- SILVANOVICH, A.; ASTWOOD, J.; ZHANG, L.; OLSEN, E.; KISIL, F.; SEHON, A.; MOHAPATRA, S. & HILL, R. (1991). Nucleotide sequence analysis of three cDNAs coding for *Poa p* IX isoallergens of Kentucky bluegrass pollen. *J. Biol. Chem.*, 266 (2): 1204-1210.
- SIMON, E. W. (1974). Phospholipids and plant membrane permeability. *New Phytol.*, 73: 377-420.
- SINGH, M. B.; HOUGH, T.; THEERAKULPISUT, P.; AVJIOGLU, A.; DAVIES, S.; SMITH, P. M.; TAYLOR, P.; SIMPSON, R. J.; WARD, L. D.; MCCLUSKY, J.; PUY, R. & KNOX, R. B. (1991). Isolation of a cDNA encoding a newly identified major allergenic protein of rye grass pollen: intracellular targeting to the amyloplast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 1384-1388.
- SONE, T.; KOMIYAMA, M.; SHIMIZU, K.; KUSAKABE, T.; MORIKUBO, K. & KINO, K. (1994). Cloning and sequencing of cDNA coding for *Cry j* I, a major allergen of Japanese cedar pollen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994 (2): 619-625.
- SPINOZZI, F.; CIMIGNOLI, E.; BROCCURRI, L. *ET AL.* (1991). The immune response to Mediterranean pollen allergens. BSACI, abstract 52. London, UK.
- STAFF, I. A.; TAYLOR, P. E.; SMITH P.; SINGH, M. B. & KNOX, R. B. (1990). Cellular localization of water-soluble allergenic proteins in rye grass (*Lolium perenne*) pollen using monoclonal and specific IgE antibodies with immunogold probes. *Histochem. J.*, 22: 276-290.
- STRASBURGER, E. (1879). Die Angiospermen und die Gymnospermen. Jena.
- STRASBURGER, E. (1884). Neue untersuchungen über den befruchtungsvorgang bei den phanerogamen. Jena



- SWOBODA, I.; DANG, T. C. H.; HEBERLE-BORS, E. & VICENTE, O. (1995). Expression of *Bet v* I, the major birch pollen allergen, during anther development. *Protoplasma*, 187: 103-110.
- SWOBODA, I.; SCHEINER, O.; KRAFT, D.; BREITENBACH, M.; HEBERLE-BORS, E. & VICENTE, O. (1994). A birch gene family encoding pollen allergens and pathogenesis-related proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1219: 457-464.
- SUBIZA MARTÍN, E.; SUBIZA GARRIDO-LESTACHE, J.; JEREZ LUNA, M. (1986). Árboles, hierbas y plantas de interés alergológico en España. En: Tratado de alergología e inmunología clínica, pp. 257-343. Luzán 5 S. A. Ediciones. Madrid, España.
- SUBIZA MARTÍN, E.; SUBIZA GARRIDO-LESTACHE, J.; JEREZ LUNA, M. (1989). Aerobiología de las gramíneas en los climas de España. *Res. Esp. Alergol. Inmunol. Clin.*, 4: 45-50.
- SUCK, R.; PETERSEN, A.; HAGEN, S.; CROMWELL, O.; BECKER, W. M. & FIEBIG, H. (2000). Complementary DNA cloning and expression of a newly recognized high molecular mass allergen Phl p 13 from timothy grass pollen (*Phleum pratense*). *Clin. Exp. Allergy*, 30 (3): 324-332.
- SUPHIOGLU, C.; FERREIRA, F. & KNOX, R. B. (1997). Molecular cloning and immunological characterization of *Cyn d* 7, a novel calcium-binding allergen from Bermuda grass pollen. *FEBS letters*, 402: 167-172.
- SUZUKI, M.; KOMIYAMA, N.; ITOH, M.; SONE, T.; KINO, K.; TAKAGI, Y. & OHTA, N. (1996). Purification, characterization and molecular cloning of *Cha o* I, a major allergen of *Chamaecyparis obtusa* (Japanese cypress) pollen. *Mol. Immunol.*, 33: 451-460.
- TANIANI, M.; KAYANO, T.; TAKAKURA, R.; YAMAMOTO, S.; USUI, M.; ANDO, S.; KURIMOTO, M.; PANZANI, R. & MATUHASI, T. (1993). Epitopes on *Cry j* I and *Cry j* II for the human IgE antibodies cross-reactive between *Cupressus sempervirens* and *Cryptomeria japonica* pollen. *Mol. Immunol.*, 30: 183-189.
- TANIGUCHI, Y.; ONA, O.; SAWATANI, M.; NANBA, M.; KHONO, K.; USUI, M.; KURIMOTO, M. & MATUHASI, T. (1995). *Cry j* 1, a major allergen of Japanese red cedar pollen has pectate lyase activity. *Allergy*, 50: 90-93.
- TAKAHASHI, Y.; MIZOGUCHI, J. & KATAGIRI, S. (1989). Development and distribution of the major pollen allergen (*Cry j* I) in male flower buds of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*). *Jpn. J. Allergol.*, 38 (12): 1354-1358.
- TEJERA, M. L.; VILLALBA, M.; BATANERO, E. & RODRÍGUEZ, R. (1999). Identification, isolation, and characterization of *Ole e* 7, a new allergen of olive tree pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 104 (4): 797-802.



- TEMPLETON, M. D.; RIKKERINK, E. H. A. & BEEVER, R. E. (1994). Small, cysteine-rich proteins and recognition in fungal-plant interactions. *Mol. Plant Microbe Interactions*, 7: 320-325.
- THEERAKULPISUT, P.; XU, H.; SINGH, M. B.; PETTITT, J. M. & KNOX, R. B. (1991). Isolation and developmental expression of Bcp1, an anther-specific cDNA clone in *Brassica campestris*. *Plant Cell*, 3: 1073-1084.
- THERIOT, J. A. & MITCHISON, T. J. (1993). The three faces of profilin. *Cell*, 75: 835-838.
- THOMMEN, A. A. (1931). Hay fever. In: Asthma and hay fever. Coca, A. F.; Walzer, M. & Thommen, A. A. (eds.). Thomas. Springfield, USA.
- TIWARI, S. C.; POLITO, V.S. & WEBSTER, B. D. (1990). In dry pear (*Pyrus communis* L.) pollen, membranes assume a tightly packed multilamellate aspect that disappears rapidly upon hydration. *Protoplasma*, 153: 157-168.
- TRIFILIEFF, E.; DUBS, M. C. & VAN REGENMORTEL, M. H. V. (1991). Antigenic cross-reactivity potential of synthetic peptides immobilized on polyethylene rods. *Mol. Immunol.*, 28: 889-896.
- TRUJILLO, I.; RALLO, L. & ARÚS, P. (1995). Identifying olive cultivars by isozyme analysis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 120: 318-324.
- TURCICH, M. P.; HAMILTON, D. A. & MASCARENHAS, J. P. (1993). Isolation and characterization of pollen-specific maize genes with sequence homology to ragweed allergens and pectate lyases. *Plant Mol. Biol.*, 5: 1061-1065.
- TWELL, D. (1994). The diversity and regulation of gene expression in the pathway of male gametophyte development. In: Molecular and cellular aspects of plant reproduction. Scott R. J. & Stead A. D. (eds.), pp. 83-135. Cambridge University Press. UK.
- TWELL, D.; WING, R.; YAMAGUCHI, J. & MCCORMICK, S. (1989). Isolation and expression of an anther-specific gene from tomato. *Mol. Gen. Genet.*, 217: 240-245.
- URIU, K. (1959). Periods of pistil abortion in the development of the olive flower. *Proc. Am. Hort. Soc.*, 73: 194-202.
- VALDEYRON, G. & CROSSA-RAYNAUD, P. (1950). Les fruits de Tunisie. *Annales de Service Botanique et Agronomique de Tunisie*, 23.
- VALENTA, R.; BALL, T.; VRTALA, S.; DUCHÊNE, M.; KRAFT, D. & SCHEINER, O. (1994). cDNA cloning and expression of timothy grass (*Phleum pratense*) pollen profilin



- in *Escherichia coli*. Comparison with birch pollen profilin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 199 (1): 106-118.
- VALENTA, R.; DUCHÊNE, M.; EBNER, C.; VALENT, P.; FILLABER, C.; DEVILLER, P. ET AL. (1992). Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *J. Exp. Med.*, 175: 377-385.
 - VALENTA, R.; DUCHÊNE, M.; PETTENBURGER, K.; FILLABER, C.; VALENT, P.; BETTELHEIM, P.; BREITENBACH, M.; RUMPOLD, H.; KRAFT, D. & SCHEINER, O. (1991). Identification of profilin as a novel allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science*, 253: 557-560.
 - VALENTA, R.; FERREIRA, F.; GROTE, M.; SWOBODA, I.; VRTALA, S.; DUCHÊNE, M.; DEVILLER, P.; MEAGHER, R. B.; MCKINNEY, E.; HEBERLE-BORS, E.; KRAFT, D. & SCHEINER, O. (1993). Identification of profilin as an actin-binding protein in higher plants. *J. Biol. Chem.*, 268: 22777-22781.
 - VALLVERDÚ, A.; GARCÍA-ORTEGA, P.; MARTÍNEZ, J.; MARTÍNEZ, A.; ESTEBAN, M. I.; DE MOLINA, M.; FERNÁNDEZ-TÁVORA, L.; FERNÁNDEZ, J.; BARTOLOMÉ, B. & PALACIOS, R. (1997). *Mercurialis annua*: Characterization of main allergens and cross-reactivity with other species. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 112: 356-364.
 - VALOVIRTA, E. (1997). Capacity of specific immunotherapy in prevention of allergic asthma in children: the preventive allergy treatment study (PAT). *J. Invet. Allergol. Clin. Immunol.*, 7: 369-370.
 - VAN AELST, A. C. & VAN WENT, J. L. (1991). The ultrastructure of mature *Papaver dubium* L. pollen grains. *Acta Bot. Neerl.*, 40: 319-328.
 - VAN DE RHEE, M. D.; VAN KAN, J. A. L.; GONZÁLEZ-JEAN, M. T. & BOL, J. F. (1990). *Plant Cell*, 2: 357-366.
 - VANEK-KREBITZ, M.; HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K.; LAIMER DA CAMERA MACHADO, M.; SUSANI, M.; EBNER, C.; KRAFT, D. & SCHEINER, O. (1995). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 214: 538-551.
 - VAN REE, R.; BREWCZYNSKI, P. Z.; TAN, K. Y. ET AL. (1995a). Grass pollen immunotherapy induces highly cross-reactive IgG antibodies to group V allergen from different grass species. *Allergy*, 50: 281-283.
 - VAN REE, R.; HOFFMAN, D. R.; VANDIJK, W.; BRODARD, V.; MAHIEU, K.; KOELEMAN, C. A. M.; GRANDE, M.; VAN LEEUWEN, W. A. & AALBERSE, R. C. (1995b). *Lol p XI*, a new major grass allergen, is a member of a family of soybean trypsin inhibitor-related proteins. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 95 (5): 970-978.



- VAN REE, R.; VOITENKO, V.; VAN LEEUWEN, W. A. & AALBERSE, R. C. (1992). Profilin is a cross-reactive allergen in pollen and vegetable foods. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 98: 97-104.
- VARGIU, G.; MULAS, M.; NIEDDU, G. & VARGIU, A. (1989). A preliminary study of the morphological and biomedical characteristics of olive pollen in the Sassari area with their aerobiological and allergological effects. Proceedings Symposium: Pollinosis in the Mediterranean area, pp. 225. Naples, Italy.
- VELA, C.; PLATAS, C.; GURBINDO, C.; TRICAS, L.; SUBIZA, E.; GARCÍA, R. & LAHOZ, C. (1982). Fractionation and biological characterization of *Olea europaea* pollen extract. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 68 (4): 289-294.
- VILLALBA, M.; BATANERO, E.; LÓPEZ-OTÍN, C.; SÁNCHEZ, L. M.; MONSALVE, R. I.; GONZÁLEZ DE LA PEÑA, M. A.; LAHOZ, C. & RODRÍGUEZ, R. (1993). The amino acid sequence of *Ole e* I, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen. *Eur. J. Biochem.*, 216: 863-869.
- VILLALBA, M.; BATANERO, E.; MONSALVE, R. I.; GONZÁLEZ DE LA PEÑA, M. A.; LAHOZ, C. & RODRÍGUEZ, R. (1994). Cloning and expression of *Ole e* I, the major allergen from olive tree pollen. *J. Biol. Chem.*, 269: 15217-15222.
- VILLALBA, M.; LÓPEZ-OTÍN, C.; MARTÍN-OROZCO, E.; MONSALVE, R. I.; PALOMINO, P.; LAHOZ, C. & RODRÍGUEZ, R. (1990). Isolation of three allergenic fractions of the major allergen from *Olea* pollen and N-terminal amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 172: 523-528.
- VRTALA, S.; SPERR, W. R.; REIMITZER, Y.; VAN REE, R.; LAFFER, S.; MÜLLER, W. D.; VALENT, P.; LECHNER, K.; RUMPOLD, H.; KRAFT, D.; SCHEINER, O. & VALENTA, R. (1993). cDNA cloning of a major allergen from timothy grass (*Phleum pratense*) pollen; characterization of the recombinant *Phl p* V allergen. *J. Immunol.*, 151: 4773-4781.
- WAISEL, Y. & GELLER-BERNSTEIN, C. (1996). Reliability of olive pollen extracts for skin prick tests. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 98: 715-716.
- WAISEL, Y.; GELLER-BERNSTEIN, C.; KEYNAN, N. & ARAD, G. (1996). Antigenicity of the pollen proteins of various cultivars of *Olea europaea*. *Allergy*, 51: 819-825.
- WALSH, D. J.; MATTHEWS, J. A.; DENMEADE, R. & WALKER, M. R. (1989). Cloning of cDNA coding for an allergen of Cocksfoot grass (*Dactylis glomerata*) pollen. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 90: 78-83.
- WATTS, F. Z. & MOORE, A. L. (1989). Nucleotide sequence of a full length cDNA clone encoding a polyubiquitin gene from *Pisum sativum*. *Nucleic Acids Res.*, 17: 100-110.



- WEBER, M. (1988). Metabolism of p-particles (polysaccharide particles) in mature pollen grains of *Eryngium campestre* L. (Apiaceae). *Protoplasma*, 146: 65-71.
- WEEDEN, N. F. & LAMB, R. C. (1985). Identification of apple cultivars by isozyme phenotypes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 110: 509-515.
- WETERINGS, K.; REIJNEN, W.; VAN AARSSSEN, R.; KORTSTEE, A.; SPIJKERS, J.; VAN HERPEN, M.; SCHRAUWEN, J. & WULLEMS, G. (1992). Characterization of a pollen-specific DNA clone from *Nicotiana tabacum* expressed during microgametogenesis and germination. *Plant Mol. Biol.*, 18: 1101-1111.
- WETERINGS, K.; REIJNEN, W.; WIJN, G.; VAN DE HEUVEL, K.; APPELDOORN, N.; DE KORT, G.; VAN HERPEN, M.; SCHRAUWEN, J. & WULLEMS, G. (1995). Molecular characterization of the pollen-specific genomic clone NTPg303 and *in situ* localization of expression. *Sex. Plant Reprod.*, 8: 11-17.
- WHEELER, A. W. (1992). Hypersensitivity to the allergens of the pollen from the olive tree (*Olea europaea*). *Clin. Exp. Allergy.*, 22: 1052-1057.
- WHEELER, A. W.; HICKMAN, B. E. & FOX, B. (1990). Heterogeneity of a major allergen from olive (*Olea europaea*) pollen. *Mol. Immunol.*, 27: 631-636.
- WICK, S. M.; MUTO, S. & DUNIEC, J. (1985). *Protoplasma*, 126: 198-206.
- WIESMAN, Z.; LAVEE, S.; AVIDAN, N. & QUEBEDEAUX, B. (2000). Molecular characterization of common olive varieties in Israel and the west bank. 3th International Symposium on Olive Growing. Bari, Italy.
- WILLING, R. P.; BASHE, D. & MASCARENHAS, J. P. (1988). An analysis of the quantity and diversity of messenger RNAs from pollen and shoots of *Zea mays*. *Theor. Appl. Genet.*, 75: 751-753.
- WILLING, R. P. & MASCARENHAS, J. P. (1984). Analysis of the complexity and diversity of mRNAs from pollen and shoots of *Tradescantia*. *Plant Physiol.*, 75: 865-868.
- XIA, X. & MAHON, J. (1998). Pea polyubiquitin genes: (I) structure and genomic organization. *Gene*, 215 (2): 445-452.
- XU, H.; THEERAKULPISUT, P.; GOULDING, N.; SUPHIOGLU, C.; SINGH, M. B. & BHALLA, P. (1995). Cloning, expression and immunological characterisation of Ory s 1, the major allergen of rice pollen. *Gene*, 164: 255-259.



- YOKOYAMA, M.; MIYAHARA, M.; SHIMIZU, K.; KINO, K. & TSUNOO, H. (2000). Purification, identification, and cDNA cloning of Jun a 2, the second major allergen of mountain cedar pollen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 275 (1): 195-202.
- ZOHARY, D. & SPIEGEL ROY, P. (1975). Beginning of fruit growing in the Old World. *Science*, 187: 319-327.



Biblioteca Universitaria de Granada



01066197