

DISCRIMINACIÓN MOLECULAR EN EL POLEN DE VARIEDADES ESPAÑOLAS Y MARROQUÍES DE OLIVO

Hamman Khalifa, A.M.; Alché Ramírez, J.D.
& Rodríguez García, M.I*.

Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de plantas, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Profesor Albareda 1, 18008, Granada, España.

(Manuscrito recibido el 12 de Diciembre de 2002, aceptado el 13 de Mayo de 2003)

RESUMEN: El desarrollo de métodos rápidos y fiables de discriminación varietal es un objetivo básico para la mejora vegetal del olivo (*Olea europaea* L.). En nuestro estudio se ha utilizado polen maduro de siete variedades españolas de olivo, así como de dos variedades marroquíes, en el que ha sido analizada la expresión de dos marcadores moleculares Ole e 1 y Cu,Zn-Superóxido dismutasa. El estudio de la expresión del alergeno mayoritario Ole e 1 mostró que el nivel de la expresión es reducido en la variedad Arbequina. En este caso de Cu,Zn-SOD, no fueron detectadas diferencias intervarietales significativas. Sin embargo, la presencia descrita de al menos cuatro isoformas del enzima en el polen del olivo de la variedad Picual haría recomendable la utilización de técnicas de análisis enzimático.

PALABRAS CLAVE: Alergenos, Cu,Zn-Superóxido Dismutasa, microheterogeneidad, *Olea europaea* L, Ole e 1, Ole e 5, olivo, variedades.

RESUMÉ: Le développement des méthodes rapides et fiables de la discrimination variétale est un objectif pour l'amélioration végétale de l'olivier (*Olea europaea* L.). Dans notre étude, on a utilisé le pollen mature de sept variétés espagnoles d'olivier et deux d'origine marocain. Ce pollen a été utilisé pour analyser l'expression de deux marqueurs moléculaires: Ole e 1 et Cu,Zn-Superoxyde Dismutase. L'étude de l'expression de l'allergène majoritaire Ole e 1 montre que cette expression est réduite au niveau de la variété Arbequina. Dans le cas de CuZn-SOD, les différences détectées ne sont pas significatives. Cependant, l'existence d'au moins quatre isoformes de cette enzyme au niveau du pollen d'olivier de la variété Picual, rend recommandable l'utilisation des techniques d'analyse enzymatique.

MOTS CLÉS: Allergènes, CuZn-Superoxyde Dismutase, microhétérogénéité, *Olea europaea* L, Ole e 1, Ole e 5, olivier, variétés.

INTRODUCCIÓN

La antigüedad y la extensión del cultivo de olivo en el mundo ha permitido la generación de un germoplasma amplio y muy variado. Solo en España, existen más de 250 variedades cultivadas, de las que se identifican 24 como variedades principales (BARRANCO & RALLO, 1985). Por otro lado, un reducido nu-

mero de cultivares son predominantes por ejemplo: Picual, Hojiblanca, Manzanilla. (BARRANCO & RALLO, 1984). En Marruecos, existen menos variedades autóctonas, siendo la variedad predominante la denominada «Picholine marocaine». Dicha variedad constituye más del 95% de todo el patrimonio oleícola en Marruecos. A partir de Picholine marocaine, se han podido seleccionar seis

clones: Menara, Haouzia, S19, K26, M26 y Dahbia. Además, se conocen otras variedades, aunque con una baja extensión como «Meslala». (PROGRAMME OLIVIER INRA, MARRUECOS, 1999). Aparte de los estudios morfológicos en los que se ha basado hasta ahora dicha discriminación varietal (BARRANCO, 1997), han sido iniciadas diversas aproximaciones a nivel molecular (FABBRI *et al.*, 1995), en algunas de las cuales se ha utilizado polen como material de estudio (TRUJILLO *et al.*, 1995).

Para este estudio, se recogió polen maduro de siete variedades principales españolas: Manzanilla, Lucio, Picual, Loaime, Hojiblanca, Bella de España y Arbequina, así como

dos de origen marroquí: Picholine marocaine y uno de sus clones más representados en el sur de Marruecos:»Menara». Para el polen de estas variedades, ha sido establecido un análisis de la expresión y de las secuencias cDNAs del alergeno mayoritario del olivo «Ole e 1» así como un análisis de la expresión de Cu,Zn-Superóxido Dismutasa «Cu,Zn-SOD». Dichos marcadores moleculares fueron seleccionados en base a la existencia de referencias en la bibliografía sobre posible polimorfismo en su secuencia (caso de Ole e 1) (VILLALBA *et al.*, 1994), o la presencia de isoenzimas (caso de Cu,Zn-Superóxido Dismutasa) (ALCHÉ *et al.*, 1998). El objetivo de este estudio ha sido la identificación de un buen marcador molecular que pueda servir para la discriminación intervarietal en el cultivo de olivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL DE ESTUDIO

En este estudio se utilizó polen dehisciente de árboles bien caracterizados en el CIFA “Alameda del Obispo” (Córdoba), correspondien-

tes a seis variedades españolas de olivo (Manzanilla, Lucio, Picual, Loaime, Hojiblanca y Arbequina), así como de dos variedades de origen marroquí (Picholine marocaine y Menara), localizados en Tánger y la Estación Experimental de Aïn Taoujdat (región de Meknès), respectivamente .

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS

Los granos de polen (0.5 gr) fueron agitados en 5ml de tampón Tris- HCl 10 mM pH 8.0 a 4°C durante 8h. La solución resultante fue centrifugada a 12000g durante 20 min y el sobrenadante filtrado a través de una membrana de 0,22mm. Después se hizo una cuantificación de las proteínas a 595 nm según el método de BRADFORD (1976).

SDS-PAGE E INMUNOBLOTS

El análisis de los polipéptidos presentes en los extractos crudos fue realizado mediante Tricina-SDS-PAGE en geles de acrilamida al 12% según métodos estándar (SCHÄGER & VON JAGOW, 1987). Los geles se transfirieron a una membrana PVDF utilizando un equipo «Mini Trans-Blot» (Bio-Rad Laboratories) mediante voltaje constante (100 V) durante 1 h a 4° C con agitación continua y usando como tampón de transferencia una solución 25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 20 % metanol, (pH 8.4).

Para la inmunodetección de Ole e 1, la membrana fue probada con un anticuerpo monoclonal anti-Ole e 1 desarrollado en ratón (1:500) y posteriormente un anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón) conjugado con fosfatasa alcalina y diluído 1:5000 en TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 57 mM NaCl, 0.1% Tween-20). La detección se realizó con el sustrato Nitro blue tetrazolium-5-bromo-4-chloro-inodolyl phosphate (NBT-BCIP).

AMPLIFICACIÓN MEDIANTE RT-PCR

La extracción del RNA total a partir del polen maduro de cada variedad de estudio así como la síntesis de los cDNAs y la PCR de Ole e 1 han sido detalladas en (ALCHÉ *et al.*, 1999). Los oligos utilizados para la amplificación de CuZn-SOD han sido diseñados en base a la secuencia que existe en la base de datos (GenBank AF191342). Se utilizaron 5'-CCTGGACTTCA TGCTTCCAT-3' como sense y 5'-TCTTCCGCCAGCGTTTCCAGTG-3' como antisense. La PCR de los cDNAs que corresponden a Cu,Zn-SOD se realizó con 35 ciclos de 94°C (1min), 60°C (1min) y 72°C (1min).

En el caso de Ole e 1, se cortaron las bandas generadas en cada variedad, y se extrajo el DNA amplificado mediante un kit específico (Prep-A-Gene de Bio-Rad), que fue posteriormente clonado usando un sistema pGEM-T Easy (Promega). Un mínimo de tres clones por cada variedad fueron secuenciados en el Servicio de Secuenciación y Síntesis de Oligonucleótidos del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra" (CSIC, Granada) en búsqueda de microheterogeneidades en la secuencia del alérgeno. Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante programas de análisis adecuado, obteniéndose los alineamientos correspondientes (Software Clustal_X 1.81), y un análisis de clústers (Software TreeView 1.6.5), que ha permitido establecer las relaciones correspondientes entre las variedades estudiadas.

RESULTADOS

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL ALERGENO MAYORITARIO OLE E 1

El análisis mediante SDS-PAGE de los extractos crudos obtenidos en polen de diferentes variedades de olivo dió como resul-

tado una serie de bandas (Fig. 1), con un patrón muy similar en todas las variedades analizadas. Es posible sin embargo apreciar alguna diferencia cuantitativa clara en un grupo de polipéptidos con un peso molecular en un rango comprendido entre 17 y 20 kDa que corresponden al alérgeno mayoritario Ole e 1 en sus tres formas de glucosilación descritas previamente (ver introducción). Así, las proteínas de este grupo son relativamente abundantes en los extractos correspondientes a las variedades españolas con excepción de Arbequina, que presenta niveles reducidos de estas formas proteicas. Los extractos de variedades marroquíes (Picholine marocaine y Menara) muestran niveles similares a los de las variedades Loaime, Picual, Lucio y Manzanilla de Sevilla.

La detección del alérgeno Ole e 1 en inmunoblots se ilustra en la Figura 2. El anticuerpo monoclonal específico frente a esta proteína reconoció hasta tres bandas proteicas con pesos moleculares situados

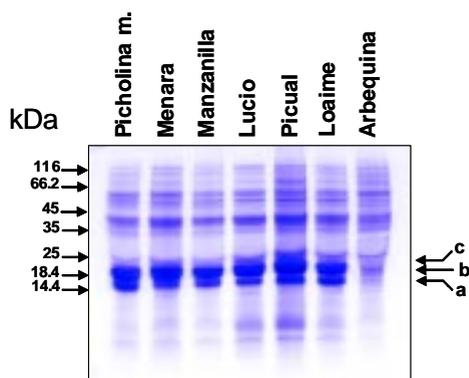


FIGURA 1. Tricine-SDS-PAGE 12% teñido con azul coomasie de los extractos crudos de polen de las variedades españolas y marroquíes de estudio. En cada calle han sido cargadas 30mg de proteínas totales.

en un rango entre 17 y 20 kDa (flechas a,b,c), que como ha sido mencionado anteriormente, corresponden a tres variantes del alergeno mayoritario con diferente grado de glucosilación. Todas las variedades examinadas muestran la presencia de bandas reactivas al anticuerpo. Sin embargo, la intensidad de la señal se correlaciona estrechamente con la intensidad de las bandas

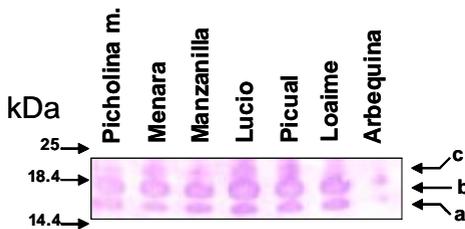


FIGURA 2. Inmunoblot correspondiente al gel de la figura 1, tratado con un anticuerpo monoclonal frente al alergeno mayoritario de olivo (Ole e 1).

descritas en los geles teñidos con Coomassie (Fig. 1), es decir: menor intensidad relativa en el extracto de la variedad Arbequina, y cantidades relativas similares para el resto de las variedades.

Los niveles de transcritos correspondientes al alergeno mayoritario del olivo Ole e 1 fueron analizados mediante RT-PCR en polen de las variedades estudiadas (Fig. 3A). El gel muestra que dichos niveles son similares en seis variedades (Picholine marocaine, Menara, Lucio, Picual, Loaime y Hojiblanca), mientras en Arbequina no se detectó la señal porque el número de ciclos de amplificación fue mínimo. La figura 3B presenta un control realizado con objeto de ratificar que la cantidad de mRNA de partida para cada una de las muestras es idéntica, puesto que se observa que la intensidad de las bandas resultantes de la amplificación de ubiquitina

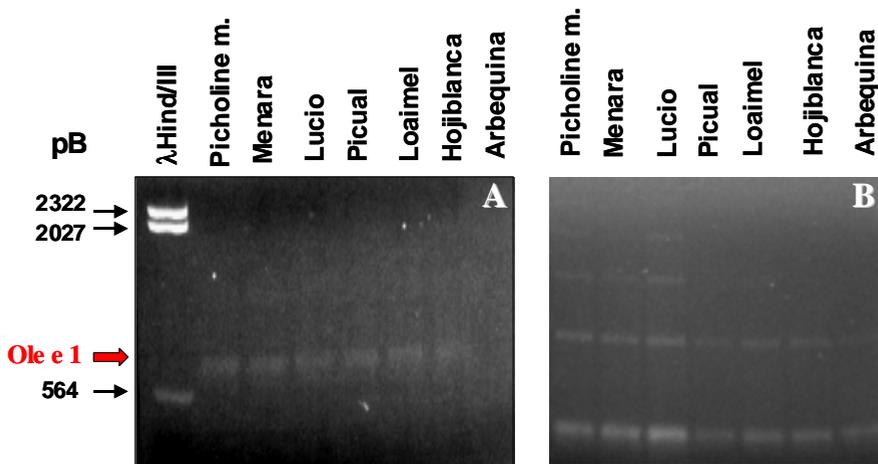


FIGURA 3. Análisis en gel de agarosa 1.5% en TAE de los productos amplificados mediante RT-PCR correspondientes a los transcritos de Ole e 1 en polen de las variedades españolas y marroquíes de estudio. (B): Análisis en gel de agarosa 1.5% en TBE de los productos amplificados mediante RT-PCR correspondientes a los transcritos de ubiquitina desde la forma monómerica hasta la forma pentámerica en polen de las variedades estudiadas.

de la forma monómerica hasta la forma pentámerica es similar en todas las muestras.

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA CU,ZN-SUPERÓXIDO DISMUTASA

El análisis mediante SDS-PAGE (Fig. 1) de los extractos crudos obtenidos en polen de las variedades de estudio no permitió determinar con precisión la banda que corresponde a la Cu,Zn-SOD, con un peso molecular estimado de 16 kDa. No se dispone de un anticuerpo adecuado anti CuZn-SOD de plantas, por lo que no se realizaron experimentos de inmunoblot que pudieran corroborar dicha expresión.

La figura 4 ilustra el análisis de los niveles de transcritos de Cu,Zn-SOD mediante RT-PCR usando el mismo control de ubiquitina (Fig. 3B). El gel muestra que dichos niveles son similares en el polen de todas las variedades de estudio.

ANÁLISIS DE LAS MICROHETEROGENEIDADES EN EL ALERGENO MAYORITARIO OLE E 1

Las secuencias obtenidas para los distintos clones del alérgeno Ole e 1 han sido remitidos a la base de datos GenBank, en donde serán próximamente accesibles. Los análisis establecidos mediante el uso de programas específicos (Clustal X, Treeview), permiten detectar un nivel elevado de microheterogeneidad en las secuencias de Ole e 1 obtenidas mediante RT-PCR, principalmente en la región 5' codificante. Dichas microheterogeneidades consisten en cambios de bases y deleciones que no afectan en muchos casos a la secuencia aminoacídica. Por otra parte, se puede mencionar que el nivel de variabilidad intravarietal es significativamente menor que la variabilidad que existe entre variedades (Fig. 5).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos, indican que la expresión del alérgeno mayoritario de olivo Ole e 1 y de la Cu,Zn-Superóxido Dismutasa está en general bastante conservada en las variedades utilizadas en este estudio, por lo que resulta muy difícil la discriminación entre variedades de España y de Marruecos en base únicamente a estos parámetros. Por el contrario, el análisis de las secuencias obtenidas mediante RT-PCR de Ole e 1 ofrece más datos sobre el nivel del polimorfismo que existe y también sobre el nivel de microheterogeneidad inter e intravarietal. En estudios anteriores (VILLALBA *et al*, 1994) dicho polimorfismo nunca ha sido atribuido a la composición varietal del polen de partida, puesto que en dichos estudios se utilizó polen comercial con composición varietal indefinida. El procedimiento utilizado en este trabajo confirma que las microheterogeneidades detectadas en las secuencias de Ole e 1 están relacionadas directamente con el origen varietal del polen. Además, posibilita la utilización del alérgeno Ole e 1 como un buen marcador molecular para la discriminación entre las variedades del olivo. Los cultivares con bajo contenido alérgico o con alergenidad

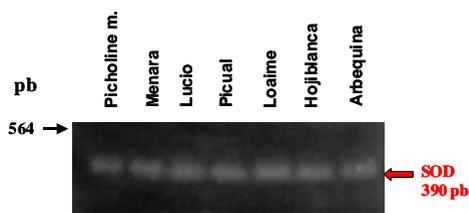


FIGURA 4. Análisis en gel de agarosa 1.5% en TBE de los productos amplificados mediante RT-PCR correspondientes a los transcritos de Cu,Zn-SOD en polen de las variedades españolas y marroquíes de estudio.

diferencial pueden tener diferentes aplicaciones entre ellas la elaboración de vacunas alérgicas, el uso ornamental y su cultivo en zonas densamente pobladas sin que puede provocar ningún tipo de riesgo al nivel sanitario. Al contrario, la Cu,Zn-SOD no se puede considerar inicialmente como un buen marcador molecular, excepto si se logra confirmar mediante un análisis enzimático adecuado que existen diferencias a nivel de las formas isoenzimáticas detectables en polen de cada variedad de olivo estudiada.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra. Carmen del Rio (CIFA "Alameda del Obispo", Córdoba) y a la Prof. Fatiha Chibi (FSTT, Tánger) su colaboración en la obtención del material de estudio, y al Dr. Carlos Lahoz (Fundación

Jiménez Díaz, Madrid) la cesión del anticuerpo anti-Ole e 1. Este trabajo ha sido realizado gracias a la concesión de una beca predoctoral de la Agencia Española de Cooperación Internacional, y ha sido financiado por los proyectos CA099-003 (INIA) and BMC2000-1484 (ambos del MCYT).

BIBLIOGRAFÍA

- ALCHÉ, J.D.; CORPAS, F.J.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, M.I. & DEL RÍO L.A. (1998). Identification and immunolocalization of superoxide dismutase isoenzymes of olive pollen. *Physiol. Plant.* 104:772-776.
- ALCHÉ, J.D.; CASTRO, A.J.; OLMEDILLA, A.; FERNÁNDEZ, M.C.; RODRÍGUEZ, R.; VILLALBA, M. & RODRIGUEZ-GARCIA, M.I. (1999). The major olive pollen allergen (Ole e 1) shows both gametophytic and sporophytic expression during anther deve-

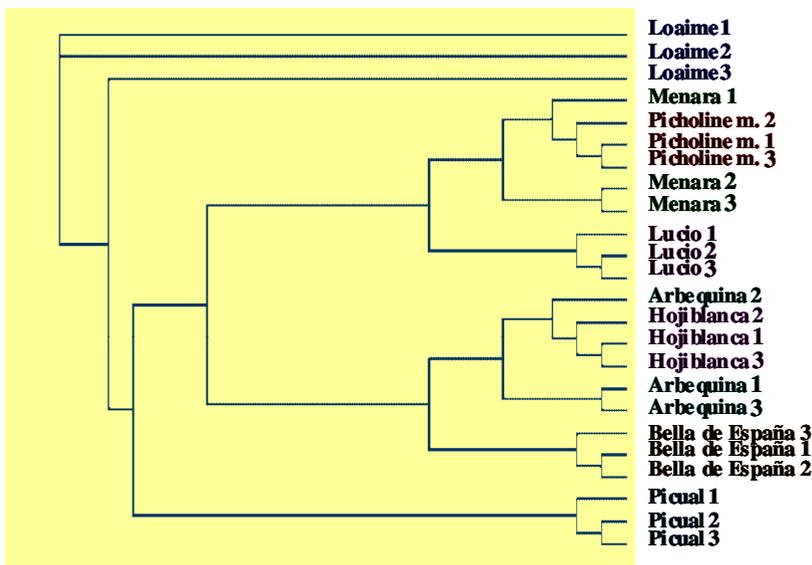


FIGURA 5. Dendrograma obtenido tras el análisis con el software Treeview de las secuencias amplificadas mediante RT-PCR de Ole e 1 en el polen de las variedades estudiadas una vez alineadas con el programa Clustal X.

- lopment, and its synthesis and storage takes place in the RER. **J. Cell Sci.** 112:2501-2509.
- 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.
- BARRANCO, D. (1997). Variedades y Patrones. In: D. BARRANCO, D. FERNÁNDEZ ESCOBAR & L. RALLO (eds). **El cultivo del olivo**, pp. 61-79. Junta de Andalucía/Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- 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.
- FABBRI A.; HORMAZA, J.I & POLITO, V.S. (1995). Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. **J. Am. Soc. Hort. Sci.** 120:538-542.
- SHAGER, 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.
- TRUJILLO, I.; RALLO, L & ARUS, P. (1995). Identifying olive cultivars by isozyme analysis. **J. Am. Soc. Hort. Sci.** 120:318-324.
- VILLALBA, M.; LOPEZ-OTIN, C.; MARTIN-OROZCO, E.; MONSALVE, R.I.; PALOMINO, P.; LAHOZ, C & RODRÍGUEZ, R. (1990). Isolation of three allergenic fractions of the major allergen from *Olea europaea* pollen and N-terminal amino acid sequence. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 172:523-528.
- VILLALBA, M.; BATANERO, E.; MONSALVE, R.I.; GONZÁLEZ DE LA PENA, M.A.; LAHOZ, C. & RODRÍGUEZ, R. (1994). Cloning and expression of Ole e I, the major allergen from olive tree pollen. Polymorphism analysis and tissue specificity. **J. Biol. Chem.** 269:15.217-15.222.