



jornadas de investigación y transferencia de tecnología al sector oleícola



Días 20 y 21 de Noviembre de 2002
Colegio Mayor Nuestra Señora de la Asunción
Universidad de Córdoba



BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DEL OLIVO

María Isabel Rodríguez García y Juan de Dios Alché

Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas.
Estación Experimental del Zaidín.

Nuestro trabajo se centra en la biología reproductiva del olivo, utilizando una aproximación celular y molecular, que nos permita conocer los mecanismos que regulan los procesos de desarrollo durante el ciclo reproductivo de esta planta. Los procesos reproductivos en Angiospermas, y especialmente el desarrollo del gametofito masculino, representan una herramienta excelente para el análisis de las bases celulares y moleculares de la diferenciación celular, de la regulación génica, y de muchos de los procesos de la fisiología vegetal / biología celular.

Los sistemas de reproducción sexual de plantas ofrecen además un amplio potencial para el desarrollo de la mejora vegetal y para la producción de las plantas que veremos en las décadas venideras. En una clara correspondencia en ambos sentidos, dicho potencial esta empezando a ser explotado, a medida que va avanzando el conocimiento básico de los mecanismos implicados.

Objetivos

El objetivo final de nuestros estudios es avanzar en el conocimiento de la Biología Reproductiva del olivo y aportar las bases científicas y tecnológicas que nos permitan abordar con éxito la mejora del olivo, lo cual implica la mejora de la calidad y producción del aceite de oliva.

Los objetivos particulares que nos hemos propuesto son:

1°. En el polen:

- ♦ Caracterización de las etapas claves del desarrollo del polen
- ♦ Germinación del polen. Estudios de viabilidad del polen. Optimización de la germinación in vitro. Biología de la germinación. Obtención de protoplastos a partir de polen germinado.
- ♦ Identificación, caracterización y localización de productos génicos y su expresión en el polen. Búsqueda de posibles marcadores moleculares con variabilidad intervarietal.
- ♦ Aproximación de la función biológica de proteínas alergénicas presentes en el polen maduro. Caracterización de la carga alergénica del polen de distintas variedades.

2°. En el fruto:

- ♦ Caracterización de las etapas claves de desarrollo y maduración del fruto.
- ♦ Análisis molecular de la presencia de transcritos de genes y sus productos de expresión en el fruto en los distintos estadios de desarrollo y determinar sus implicaciones en el proceso de fructificación.

3°. Embriogénesis in vitro:

Puesta a punto del cultivo in vitro con objeto de obtener protoplastos, callos, embriones y regenerar la planta completa y estudiar la embriogénesis cigótica y somática del olivo.



Metodología de trabajo empleada

La línea de abordaje utilizada para nuestros estudios es claramente multidisciplinar e incluye tanto técnicas de genómica y proteómica como técnicas de análisis citológico, (ultra) estructural y de localización de la expresión génica *in situ*:

Técnicas bioquímicas:

Análisis del perfil proteico mediante SDS-PAGE.

Inmunoblots utilizando baterías de anticuerpos mono y policlonales (con la asistencia de diversos servicios de obtención de anticuerpos).

Aislamiento, purificación y secuenciación de proteínas (con la asistencia del servicio de Proteómica de la UAM).

Estudio de actividades enzimáticas.

Técnicas de biología molecular:

Amplificación de secuencias mediante (RT)PCR

Aislamiento, clonación y secuenciación de fragmentos amplificados (con la asistencia del servicio de síntesis de oligonucleótidos y secuenciación del IPBLN (CSIC).

Análisis de secuencias con software especializado

Northern y Southern blot no radiactivo.

Técnicas de análisis estructural

Microscopía óptica, de fluorescencia, MET, MEB (con la asistencia de los servicios técnicos de la U. de Granada).

Cito e histoquímica.

Microanálisis de R-X

Inmunocitoquímica

Hibridación *in situ* de ácidos nucleicos

In situ-(RT) PCR

Técnicas de cultivo *in vitro*

Preparación y optimización de medios para germinación y cultivo de células y tejidos

Modificación de las condiciones del medio de cultivo para inducir embriogénesis somática.

Resultados y conclusiones

Líneas de Trabajo en Relación con el Polen

- Se han caracterizado las etapas del desarrollo del polen, comprobando que el polen del olivo comparte características frecuentes con otras Angiospermas. Sin embargo, el olivo presenta particularidades propias, entre las que destacan la presencia de nucleoloides (estructuras citoplásmicas similares al nucleolo) en la microspora joven y relacionados con la repoblación ribosómica de la fase haploide.
- Las observaciones microscópicas también nos ha permitido detectar unas inclusiones nucleares de estructura cristalina y naturaleza proteica presentes en la mayoría de los tejidos, salvo en el polen, se han aislado estos cuerpos proteicos y los estamos caracterizando. No se excluye un posible origen virásico de los mismos.
- Se ha puesto a punto un sistema altamente eficiente de germinación *in vitro* del polen de olivo que nos ha permitido obtener datos básicos sobre la viabilidad de éste en rela-

ción con distintas técnicas de almacenamiento, el comportamiento de las reservas del grano de polen, los fenómenos de división y motilidad nuclear, la ultraestructura del tubo polínico etc. Estos datos son mucho más difíciles de obtener in vivo dado el corto periodo de floración de esta especie. También se han obtenido protoplastos a partir del tubo polínico de granos de polen germinados in vitro, y se ha regenerado su pared celular. Estos resultados abren nuevas posibilidades de utilizar el polen para obtener callos e incluso regenerar plantas

- Se ha iniciado la identificación, caracterización y localización de productos génicos y de su expresión durante el desarrollo y germinación del polen. El carácter histórico del cultivo del olivo hace que en la actualidad el germoplasma de éste sea riquísimo, con al menos 150 variedades caracterizadas sólo en la Comunidad Andaluza. La discriminación entre variedades se realiza actualmente en base a parámetros morfológicos (tamaño y forma de las hojas, frutos, flores etc.) ralentizando los programas actuales de mejora. Los marcadores moleculares son de gran utilidad. En nuestro grupo mantenemos un programa/proyecto de investigación ya iniciado para ensayar actividades enzimáticas y productos génicos con múltiples isoformas que presenten diferencias intervarietales en el olivo, y por tanto puedan ser usados como marcadores moleculares. En relación a estas líneas, el grupo ha clonado y secuenciado 25 genes del olivo que se encuentran en la base de datos GenBank.
- El polen del olivo es una importante causa de alergia respiratoria estacional en las regiones mediterráneas. A pesar de que el conocimiento bioquímico y molecular de los alérgenos está progresando, se desconoce en la mayoría de los casos la función biológica de estas proteínas en el ciclo reproductivo. A través de distintas aproximaciones (análisis de expresión, localización in situ, transformación con transcritos de secuencia complementaria durante la germinación in vitro, análisis de actividades enzimáticas) pretendemos dar una respuesta a estos interrogantes. Ello representa un paso previo a cualquier intento de manipulación para la disminución de su potencial alérgico. El carácter alérgico del polen representa un importante tema de salud ambiental. Las aproximaciones biológicas a este tópico, tienen además una aplicación práctica inmediata a través de la mejora de los sistemas actuales de diagnóstico e inmunoterapia de la alergia, actualmente en fase de protección mediante patente. Dicha patente ha de ser desarrollada en un futuro próximo a través de experimentos adecuados en colaboración con los sistemas públicos de salud.

Líneas de Trabajo en Relación con el Desarrollo del Fruto

- El análisis histológico y citológico de las distintas etapas del desarrollo del fruto nos permite definir en que momento del desarrollo se inicia la acumulación de lípidos en el mesocarpio.
- También se están identificando, caracterizando y localizando productos génicos y su expresión durante el desarrollo del fruto. Se trata básicamente de productos génicos que pueden tener implicaciones potenciales en la producción y en la calidad del aceite de oliva, o en el uso de subproductos de la elaboración de éste. En relación a estas líneas, el grupo ha clonado y secuenciado 7 genes del olivo que se encuentran en la base de datos GenBank.



Líneas de Trabajo en Relación con Cultivos Celulares y de Tejidos

- ♦ Se han obtenido embriones a partir de semillas germinadas in vitro y de fragmentos de cotiledón, previa obtención de callos. Son numerosas las aplicaciones de estos cultivos tanto en investigación básica como aplicada.

Innovación y relevancia del trabajo

La importancia económica que el cultivo del olivo tiene, no corre paralela al interés que hasta ahora se le ha prestado a la investigación y muy especialmente a la investigación básica. Es muy escasa la información que hasta ahora se tiene acerca de la fisiología y biología del olivo. Los trabajos realizados por nuestro grupo contribuyen fundamentalmente al conocimiento de la biología reproductiva de esta especie, a través de su aproximación multidisciplinar, pero tienen además importantes implicaciones en vertientes aplicadas como son las siguientes:

- ♦ Aceleración de los programas de mejora, a través de la identificación varietal en estadios juveniles del cultivo y la obtención de plantas (di)haploides mediante androgénesis.
- ♦ Caracterización de virus latentes y certificación de plantas libres de virus de interés para viveristas.
- ♦ Obtención de variedades "poco alergénicas". Mejora en los sistemas de diagnóstico e inmunoterapia de la alergia estacional.
- ♦ Incremento de la productividad a través del control de la vecería y del incremento de la germinabilidad del polen y del cuajado del fruto. Selección de polen y polinizadores con características agronómicas deseables.
- ♦ Métodos alternativos de transformación genética en el olivo a través de métodos biolísticos y de co-cultivo de protoplastos obtenidos de tubos polínicos y de tejidos
- ♦ Incremento de la calidad del aceite y de la productividad a través del control de la expresión de marcadores moleculares implicados en la síntesis de ácidos grasos, síntesis y transporte de azúcares, etc.
- ♦ Caracterización del valor nutricional de subproductos de la elaboración del aceite con uso potencial en alimentación animal.