

- MSANDA, F.; GASQUEZ, J.; CHAUSSOD, R. & PELTIET, J.P. (1994). Polymorphisme, régime de reproduction de trois populations d'arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels) endémiques du Maroc. Premiers résultats. Actes des deuxièmes journées de l'arbre, pp. 154-158. Marrakech.
- PACINI, E. & JUNIPER, B.E. (1979). The ultrastructure of pollen grain development in the olive (*Olea europaea* L.). Proteins in the pore. *New Phytol.* 83:157-164.
- PRENDERGAST, H.D. & WALKER, C.C. (1992). The argan multipurpose tree of Morocco. *The Kew Mag.* 9:76-85.
- ROWLEY, J.R. (1981). Pollen wall characters with emphasis upon applicability. *Nord. J. Bot.* 1:375-380.
- ROWLEY, J.R. (1990). The fundamental structure of the pollen exine. *Plant Syst. Evol.* 5:13-29.
- ROWLEY, J.R. & SKVARLA, J.J. (1976). Surface coating of germinal apertures of pollen and evolution of apertures. 34th *Annu. Proc. Electron Microsc. Soc. Am.*, pp. 42-43.
- SAUVAGE, CH. & VINDIT, J. (1952). Flore du Maroc analytique, descriptive et illustrée. Spermatophytes, Fascicule 1, Ericales, Primulales, Plombaginales, Ebénales et Contortales. *Trav. Inst. Scient. Chérifien.* 4:83-85.
- SHIVANNA, K.R. & JOHRI, B.M. (1985). *The angiosperm pollen, structure and function.* New Delhi, Wiley Eastern LTD.
- STANLEY, R.G. & LINSKENS, H.F. (1974). *Pollen, biology, biochemistry, management.* Springer, Berlin.
- WODEHOUSE, R.P. (1935). *Pollen Grains, their structure, identification and significance in science and medicine.* McGraw-Hill, New York.
- ZAHIDI, A.; FERRADOUS, A. & BANI-AAMEUR, F. (1996). Morphological diversity of three argan populations (*Argania spinosa* (L.) Skeels). Abstract on Plant Taxonomy, pp. 82. Barcelona.

ANÁLISIS PRELIMINAR DEL PERFIL PROTEICO DEL POLEN DE VARIEDADES DE OLIVO. DIFERENCIAS EN EL CONTENIDO DEL ALERGENO OLE E 1

Jiménez-López, J.C.; 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: Mediante SDS-PAGE han sido analizados los perfiles proteicos de extractos crudos de 19 variedades de polen de olivo, procedentes mayoritariamente de Andalucía. Los resultados obtenidos muestran que existe una gran variabilidad intervarietal en estos perfiles, estableciéndose fundamentalmente la presencia de diferencias cualitativas y cuantitativas en el contenido del alérgeno mayoritario Ole e 1. Así, esta proteína puede tener un papel relevante como marcador molecular para la discriminación de variedades, así como dar idea del potencial más o menos alérgico de las distintas variedades. Los test utilizados tienen una utilidad potencial en la caracterización de variedades con bajo contenido alérgico para su utilización en agricultura o con fines ornamentales.

PALABRAS CLAVE: Olivo, polen, alérgenos, Ole e 1, variedades.

SUMMARY: Protein profiles of crude pollen extracts corresponding to 19 widespread Andalusian olive cultivars were analysed by SDS-PAGE. The results obtained show a high degree of inter-varietal variability in these profiles, in which qualitative and quantitative differences, mainly concerning the amount of the major allergen Ole e 1, have been established. Thus, this protein could play an outstanding role as a molecular marker able to discriminate between cultivars, as well as to assess the allergenic potential of cultivars. The tests used here have a potential utility to characterize low-allergenic varieties for agricultural or ornamental uses.

KEY WORDS: Olive, pollen, allergen, Ole e 1, cultivars.

INTRODUCCIÓN

Hasta el momento en España se han caracterizado 262 variedades de olivo en base a esquemas pomológicos bien definidos (BARRANCO & RALLO, 1984; BARRANCO, 1997). Del mismo modo, esta identificación morfológica se está corroborando mediante técnicas básicas en las que se lleva a cabo el análisis de marcadores moleculares con objeto de rela-

cionar, identificar, distinguir y caracterizar diferentes cultivares y genotipos y para obtener información sobre el origen y la dispersión del olivo, así como para evaluar características genéticas deseables e importancia agronómica. Entre las técnicas bioquímicas se usa el análisis isoenzimático en polen (TRUJILLO *et al.*, 1995) y entre las técnicas moleculares utilizadas figuran la detección de marcadores RAPD (random amplified polymorphic DNA) (FABBRI

et al., 1995; BELAJ et al., 2001), RFLP, AFLP y finalmente el aislamiento y análisis de la expresión de genes fundamentalmente implicados en la biosíntesis y modificación de ácidos grasos y triacilglicéridos en el fruto del olivo, y en el almacenamiento de éstos. (HATZOPOULOS et al., 2002).

El olivo es una planta con polinización esencialmente anemófila que produce polen en cantidades sustanciales. Todo ello, unido a su amplia extensión cultivada y a la presencia de numerosas proteínas alergénicas en su polen, hace que éste sea una de las causas fundamentales de alergia respiratoria estacional en los países mediterráneos (LICCARDI et al., 1996). La identificación, purificación y caracterización de los alérgenos presentes en el polen de olivo resulta de gran utilidad para la estandarización de los procedimientos usados en el diagnóstico de afecciones alérgicas (LOWENSTEIN, 1987), el estudio de la respuesta inmunológica (EKRAMODDOULLAH et al., 1986) y para determinar si existe relación entre la estructura molecular de la proteína y su antigenicidad.

Hasta la fecha han sido aislados y caracterizados 9 alérgenos del polen del olivo, denominados Ole e 1 a Ole e 9 (RODRIGUEZ et al., 2001). Entre ellos, el alérgeno mayoritario Ole e 1 (denominado mayoritario por mostrar la mayor prevalencia clínica -alrededor del 70%) ha sido ampliamente estudiado (LAUZURICA et al., 1988a, b), y de él se conocen numerosos detalles estructurales, incluyendo su secuencia, la secuencia de sus componentes glucídicos asociados y la presencia de diferentes formas isoméricas, así como que posee redundante naturaleza ácida y un peso molecular de 17-19 kDa. (BATANERO et al., 1994).

Los estudios sobre la localización de Ole e 1 y su expresión a lo largo del desarrollo

del polen de olivo corroboran su importancia, que se acentúa por el hecho de que Ole e 1 puede representar entre un 15 a un 20% del total de proteína presente en el grano de polen maduro, y es activamente sintetizado durante la germinación *in vitro*, y liberado al medio de cultivo (ALCHÉ et al., 2002).

Una serie de estudios pioneros están revelando la presencia de una relevante variabilidad intervarietal en el polen del olivo (WASEL et al., 1996; CASTRO, 2001; CASTRO et al., 2001). Estas diferencias presuponen que algunos cultivares podrían tener un potencial alergogénico mayor que otros y posibilitan la utilización de variedades de bajo contenido alergénico al menos con fines ornamentales y hace que este alérgeno sea inicialmente un buen candidato como marcador molecular para la detección de variedades en el olivar. Aunque se han obtenido datos muy importantes sobre la función biológica que Ole e 1 desempeña a lo largo del desarrollo y la germinación del grano de polen (RODRIGUEZ et al., 1995; ALCHÉ et al., 2002) aún se desconoce si existe una correlación directa entre los niveles de expresión de esta proteína en el polen de las distintas variedades y parámetros funcionales básicos así como de interés agronómico tales como la viabilidad del polen, su germinabilidad, implicación en el proceso de compatibilidad/incompatibilidad entre variedades, etc.

MATERIAL Y MÉTODOS.

MATERIAL

Para realizar el presente trabajo de investigación se recolectó polen de olivo (*Olea europaea* L.) de las variedades: Hojiblanca, Manzanilla, Verdial de Vélez-Málaga, Verdial de Huevar, Lechín de Granada, Lechín de Má-

laga, Morisca, Gordal, Picudo, Arbequina, Cornicabra, Blanqueta, Picual, Loaime, Lucio y Bella de España. Estas variedades fueron seleccionadas en colecciones y árboles bien caracterizados de Granada, Córdoba y Málaga, y la recolección del polen se realizó entre los meses de abril y junio de 2002. Una vez purificado, el polen fue almacenado a -80 °C hasta su posterior uso.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES DE POLEN DE OLIVO DE DISTINTAS VARIETADES.

Se utilizó 1 gr. de polen de cada variedad, al que se añadieron 10 ml de tampón de extracción (Tris-ClH, pH 8.0) y PMSF 100 mM (fluoruro de fenil-metil sulfonilo). Esta etapa de extracción se dejó en agitación a 4 °C durante 8 horas.

El sobrenadante se centrifugó dos veces a 12.000 x durante 10 min y posteriormente se filtró y almacenó en alícuotas a -20 °C hasta su posterior uso.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES. (BRADFORD)

Se preparó una curva patrón con la proteína estándar (BSA) a partir de una solución de 1 µg/µl para posteriormente añadir colorante Bradford. Simultáneamente se prepararon las muestras a cuantificar del extracto proteico de cada variedad. Transcurridos 5 minutos de la adición del colorante Bradford, se midió la DO₅₉₅, tanto de las muestras como de la curva patrón.

ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

La separación electroforética de los extractos crudos se realizó en geles separados al 12% y geles concentradores al 4%, siguiendo el sistema descrito por SHAGER &

VON JAGOW (1987) en un sistema Miniprotean II (Bio-Rad). Los geles resultantes fueron teñidos con azul de Coomassie o transferidos a membranas.

WESTERN BLOTS

Una vez separadas las proteínas mediante SDS-PAGE, los geles fueron transferidos a membranas de PVDF utilizando un sistema Mini-Trans-blot (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante, durante toda la noche a 4 °C y utilizando una corriente de 30 V.

Una vez transferida, la membrana se bloqueó en una solución de bloqueo (1xTSB con Tween 20 al 0.1% + Leche en polvo al 0,3%) durante 2-5 h.

La incubación con el anticuerpo primario específico (monoclonal anti-Ole e 1) se realizó a temperatura ambiente en una dilución 1:1.000 en tampón de bloqueo durante 3 h a 4 °C. Posteriormente y tras lavar la membrana con TBS se incubó el anticuerpo secundario (anticuerpo policlonal anti-Ig G de ratón desarrollado en cabra y conjugado con fosfatasa alcalina) en una dilución 1: 4.000 en TBST durante 1 h.

Tras lavar tres veces durante 10 min. cada vez con 1xTBST a T° ambiente, la membrana se equilibró con tampón de activación de fosfatasa alcalina (cloruro sódico 100 mM, cloruro de magnesio 5 mM y Tris-HCl 100 mM, pH = 9,5) durante 2-5 min., a T° ambiente, se pasó a la incubación de la membrana con el sustrato (NBT/BCIP) hasta que apareció la señal.

CUANTIFICACIÓN DENSITOMÉTRICA DE LAS BANDAS.

Con objeto de cuantificar las cantidades relativas del alérgeno mayoritario Ole e 1, los

geles y los blots fueron sometidos a un análisis densitométrico utilizando el software Quantity-one (Bio-Rad).

RESULTADOS

Los geles de los extractos crudos de polen analizados permiten detectar un patrón de bandas semejantes en las 19 variedades analizadas (Fig. 1), y a su vez se aprecian importantes diferencias cuantitativas, entre las que destaca la intensidad distintiva de las bandas que aparecen entre 17 y 19 kDa en las variedades estudiadas. Estas bandas corresponden a dos isoformas del alérgeno Ole e 1 con diferente grado de glucosilación.

Estas isoformas del alérgeno Ole e 1 son cuantitativamente más elevadas en las variedades designadas como Lechín, Verdial de Huevar, Manzanilla, Picudo, Blanqueta, Lucio. Los resultados de densitometría mostraron que este grupo de polipéptidos, entre los que presumiblemente se encuentra Ole e 1, representa un porcentaje

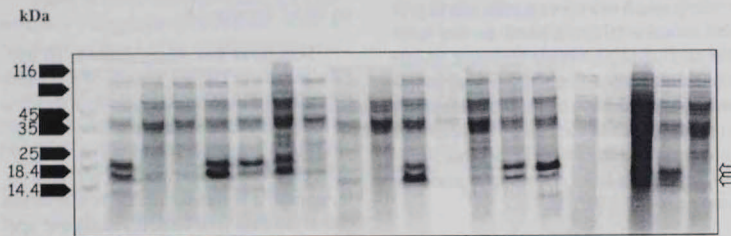


FIGURA 1. Gel SDS-PAGE teñido con Azul Coomassie mostrando extractos crudos del polen (45 mg proteína total por muestra) de las variedades 1 y 2, Lechín; 3, Verdial de Vélez-Málaga; 4, Verdial de Huevar; 5 y 6, Manzanilla; 7, Hojiblanca; 8, Morisca; 9, Gordal Sevillana; 10, Picudo; 11 y 16, Arbequina; 12, Cornicabra; 13, Blanqueta; 14 y 17, Picual; 15, Loaime; 18, Lucio; 19, Bella de España. La posición e las bandas correspondientes al alérgeno mayoritario (17-19 kDa) aparecen marcadas con flechas huecas.

elevado respecto del total de proteínas del grano de polen en estas variedades, llegando hasta un 11% en el cultivar Picual de Granada.

En los estudios de inmunoblotting el anticuerpo reconoció dos tipos de bandas proteicas cuyos pesos moleculares están en un rango entre 17 y 19 kDa, que se corresponden a dos variantes del alérgeno mayoritario con diferente grado de glucosilación (Fig. 2). Aunque todas las variedades examinadas mostraron la presencia de bandas reactivas, las cantidades relativas presentes en cada una de ellas varían de forma significativa (Fig. 3) y es posible establecer dos categorías fundamentales: los cultivares Lechín, Verdial de Huevar, Manzanilla, Picudo, Blanqueta, Picual, Lucio, que muestran elevados niveles del alérgeno Ole e 1 en sus dos variantes, y las variedades Lechín, Verdial de Vélez-Málaga, Hojiblanca, Morisca, Gordal Sevillana, Cornicabra, Bella de España, que muestran niveles reducidos de dicha proteína. En las restantes variedades analizadas (Arbequina y Loaime) las bandas fueron prácticamente indetectables.

DISCUSIÓN

Las diferencias cuantitativas en las proteínas observadas entre los distintos cultivares hacen presuponer que Ole e 1 podría ser un buen candidato como marcador molecular para la distinción de variedades. Los resultados obtenidos en este estudio son coherentes en cuanto a las diferencias que se observan en la presencia de proteínas alérgicas en el polen de olivo (ver revisión de WASEL *et al.* 1996). Por otro lado, la gran capacidad alérgica del polen de olivo ha provocado en algunas zonas la consideración de normas reguladoras de la plantación y venta de olivos (O'ROURKE & BUCHMANN, 1987). Dada la enorme expansión que el cultivo tiene en nuestra región, sería conveniente compaginar este desarrollo con el derecho a la salud de aquellos pacientes sensibles a su polen. La existencia de diferencias entre variedades en la cantidad y composición de los alérgenos podría ser en el futuro un criterio que permitiera a las autoridades evaluar la autorización de plantaciones próximas a los casos urbanos. Especialmente para aquellos olivos que, con carácter ornamental, se plantan en nuestras plazas y parques, sería conveniente seleccionar variedades afectadas de androesterilidad o, en su defecto, con una baja capacidad alérgica, como las caracterizadas en este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dr. Carmen del Río (CIFA "Alameda del Obispo", Córdoba) su colaboración en la localización y recolección del material. Este trabajo ha sido financiado por los proyectos CA099-003 (INIA) y BMC2000-1484 (ambos del MCYT). J.C. Jiménez-López agradece a la Fundación Farmacéutica Avenzoar y al CSIC (MCYT) la concesión de sendas becas para la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- ALCHÉ, J.D.; CASTRO, A.J. & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M.I. (2002). Localization of transcripts corresponding to the major allergen from olive pollen (Ole e 1) by electron microscopic non-radioactive in situ RT-PCR. *Micron* 33:33-37.
- ALCHÉ, J.D.; M'RANI, M.; CASTRO, A.J. & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M.I. (2002). Olive (*Olea europaea* L.) pollen major allergen (Ole e 1) is *de novo* synthesised and secreted to the medium during *in vitro* pollen germination. Abstract XVIIth. International Congress on Sexual Plant Reproduction. Lublin, Poland.
- 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.

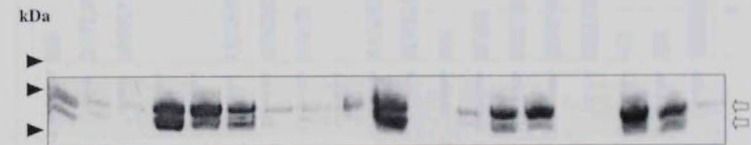


FIGURA 2. Inmunodetección del alérgeno Ole e 1 en membrana, mediante un anticuerpo monoclonal anti-Ole e 1, a partir de extractos crudos del polen de olivo de las distintas variedades descritas en la figura 1.

- 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).
- BATANERO, E.; VILLALBA, M. & RODRÍGUEZ, R. (1994). Glycosylation site of the major allergen from olive tree pollen. Allergenic implications of the carbohydrate moiety. *Mol. Immunol.* 31:31-37.
- BELAJ, A.; TRUJILLO, I.; DE LA ROSA, R. & RALLO, L. (2001). Polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 126:64-71.
- CASTRO, A.J. (2001). Aproximación a la función biológica del alergeno mayoritario del polen del olivo (*Ole e 1*). Implicaciones clínicas y ambientales. Tesis doctoral. Univ. Granada.
- CASTRO, A.J.; ALCHÉ J.D.; CUEVAS J. & RODRÍGUEZ M.I. (2001). Implicaciones del olivo en el medio ambiente: proteínas

alergénicas del polen de olivo como herramienta de selección de variedades del olivo con fines ornamentales. Actas del IX Simposio Científico-Técnico EXPOLIVA'99, pp. 253-259. Jaén.

- 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.
- 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.
- HATZOPOULOS, P.; BANILAS, G.; GIANNOULIA, K.; GAZIS, F.; NIKOLOUDAKIS, N.; MILIONI, D. & HARALAMPIDIS, K. (2002). Molecular markers and molecular biology of the olive tree. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104:574-586.
- 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.* 25:329-35.

- 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.
- LICCARDI, G.; D'AMATO, M.; D'AMATO, G. (1996). Oleaceae pollinosis: a review. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 111:210-217.
- LÖWENSTEIN, H. (1987). Detection systems: the different principles for standardization of allergens. In: R. KURTH (ed.). *V International Paul-Ehrlich Seminar*, pp. 113-116. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- O'ROURKE, M.K. & BUCHMANN, S.L. (1989). Pollen yield of two cvs of *Olea europaea* (Manzanillo and Swan Hill). *Proc. 3th Int. Conf. on Aerobiology*, Basilea, Switzerland.

RODRIGUEZ R, VILLALBA M, MONSALVE R.I., BATANERO E. (2001). The spectrum of olive pollen allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 125:185-195.

- RODRIGUEZ-GARCIA M.I.; FERNANDEZ M.C. & ALCHÉ J.D. (1995). Immunocytochemical localization of allergenic protein (*Ole e 1*) in the Endoplasmic Reticulum of the developing pollen grain of olive (*Olea europaea* L.). *Plant.* 196:558-563.
- SHÄGER H. & VON JAGOW G. (1987). Tricinesodium-duodecyl-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. & ARÚS, P. (1995). Identifying olive cultivars by isozyme analysis. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 120:318-324.
- WASEL, Y.; GELLER-BERNSTEIN, C.; KEYNAN, N. & ARAD, G. (1996). Antigenicity of the pollen proteins of various cultivars of *Olea europaea*. *Allergy* 51:819-825.

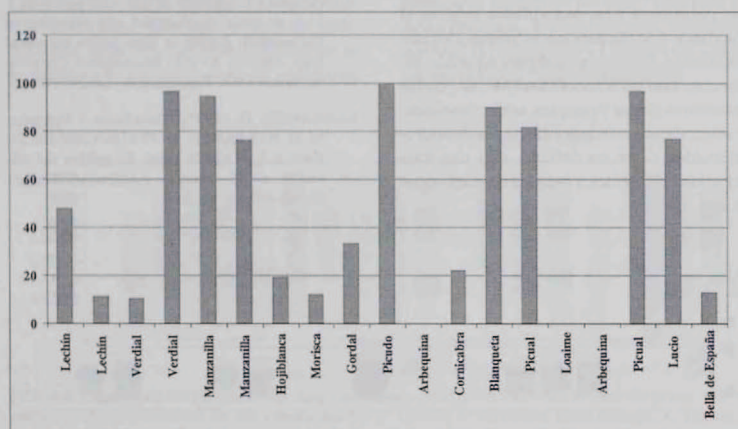


FIGURA 3. Representación gráfica de las cantidades relativas del alergeno presentes en cada variedad, tomando como referencia el cultivar Picudo, que presentó la mayor densidad óptica (100%).