

Título: AN OVERVIEW OF ROS AND RNS METABOLISM IN THE OLIVE REPRODUCTIVE PROCESS

Nombre: Zafra Alvarez, Adoracion

Universidad: Universidad de Granada

Departamento: Fisiología vegetal

Fecha de lectura: 29/07/2015

Mención a doctor europeo: concedido

Programa de doctorado: Biología Fundamental y de Sistemas

Dirección:

> **Director:** JUAN DE DIOS ALCHÉ RAMIREZ

Tribunal:

> **presidente:** JOSE MARIA RAMOS CLAVERO

> **secretario:** MARI CARMEN FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ

> **vocal:** JUAN BAUTISTA BARROSO ALBARRACIN

> **vocal:** SIMON HISCOCK

> **vocal:** JOSÉ ANTONIO HERNANDEZ CORTES

Descriptor:

> BIOQUIMICA

> BIOLOGIA CELULAR

El fichero de tesis ya ha sido incorporado al sistema

> <http://0-hera.ugr.es.adrastea.ugr.es/tesisugr/25500806.pdf>

Localización: [HTTP://0-HERA.UGR.ES.ADRASTEA.UGR.ES/TESISUGR/25500806.PDF](http://0-HERA.UGR.ES.ADRASTEA.UGR.ES/TESISUGR/25500806.PDF)

Resumen: El olivo (*Olea europaea* L.) posee una gran importancia económica y social en el área mediterránea. España como el mayor productor mundial, y especialmente Andalucía, tiene una posición muy significativa en relación con estos aspectos. Las peculiaridades del olivo en relación a los procesos reproductivos hacen de su estudio una importante herramienta para alcanzar una producción satisfactoria. Estamos empezando a conocer que las especies de oxígeno reactivo (ROS) y las especies de nitrógeno reactivo (RNS), además de sus tradicionales funciones implicadas en toxicidad y estrés, tienen mucho que decir en la Biología Reproductiva de las Plantas.

Como una primera aproximación, y con objeto de estudiar las implicaciones generales de las ROS y RNS in la Biología Reproductiva de las Plantas, usamos flores de varias familias de Plantas Superiores con diferentes tipos de estigmas y de sistemas de autoincompatibilidad (así como un representante primigenio de las Angiospermas) en diferentes estadios de desarrollo. Analizamos la presencia de ROS (H₂O₂)/NO en dichos estigmas mediante estereomicroscopía de fluorescencia. A continuación, realizamos una detección detallada e individualizada de H₂O₂, O₂- y NO en los estigmas, anteras y granos de polen de olivo en diferentes estadios

de desarrollo mediante técnicas de estereomicroscopía y microscopía láser confocal de alta definición, usando sondas altamente selectivas.

Con objeto de mejorar nuestro conocimiento sobre las bases moleculares de los cambios observados en el metabolismo ROS y NO durante el desarrollo reproductivo, se diseñó una aproximación molecular consistente en la preparación de bibliotecas sustractivas (SSH), capaces de diseccionar la expresión diferencial de transcritos entre los tejidos reproductivos (polen, pistilo) y vegetativos (hoja) del olivo. Además, se caracterizaron el polimorfismo molecular, los niveles de expresión, las tasas de actividad bioquímica, las características alérgicas y la localización celular de un componente clave del conjunto de enzimas antioxidantes del polen del olivo (el enzima Cu,Zn superóxido dismutasa) (Cu,Zn-SOD). La localización del enzima fue realizada mediante un amplio panel de aproximaciones citológicas e inmunocitoquímicas. El elevado polimorfismo de los transcritos de SOD obtenidos de las bibliotecas SSH, de aproximaciones transcriptómicas, y de su clonación experimental fue evaluado posteriormente mediante métodos bioinformáticos.

Un gran número de interesantes y nuevas conclusiones fueron obtenidas tras realizar el presente estudio multidisciplinario: las ROS fueron detectadas en los estigmas de las diferentes especies de plantas inspeccionadas, pero no aparecieron de forma significativa en el estilo o en el ovario. La acumulación de ROS se presentó en forma de patrones múltiples y variados, teniendo en cuenta su presencia en la flor sin abrir, en aquellas fases consideradas ¿receptivas¿ a la interacción con el polen, o en los estadios de post-fertilización. A este respecto, no se encontraron relaciones filogenéticas claras, o asociaciones con el tipo de estigma (seco o húmedo), o con el sistema de autoincompatibilidad. La acumulación de ROS en Angiospermas primitivas del género Magnolia podría indicar una función preferencial de estos químicos en defensa, que podría haber evolucionado posteriormente hacia funciones de más especializadas como las de señalización. En los tejidos reproductivos del olivo, las ROS y el NO son producidos según perfiles específicos de estadio y de tejido. Hemos asignado funciones potenciales a esos productos, dependiendo del estadio. Así, en los estadios tempranos de floración podrían estar implicados en funciones de defensa, en los estadios donde existe una intensa interacción entre polen y pistilo, pueden determinar la presencia de una fase receptiva en el estigma, y finalmente, las ROS tienen una función bien conocida en senescencia, que serían igualmente aplicables a este fenómeno en el estigma. El estudio confirma la disminución de la presencia de ROS en el estigma del olivo cuando se produce activamente NO en los granos de polen y tubos polínicos durante la fase receptiva, una observación que ha sido anteriormente descrita en otras especies vegetales.

La construcción de seis bibliotecas sustractivas SSH entre cada dos (each two of) de las bibliotecas de polen, pistilo y hoja, permitió la identificación de transcritos con papeles fundamentales en los respectivos tejidos reproductivos. Las funciones de muchos de los transcritos obtenidos están íntimamente relacionadas, y muchas de ellas son de importancia capital en defensa, interacción polen-estigma y señalización. Algunos de estos transcritos están directamente implicados en el metabolismo ROS, e incluyen los de superóxido dismutasas. Muchas de estas secuencias de SODs fueron extraídas de las bibliotecas SSH y de aproximaciones transcriptómicas adicionales, realizadas mediante procedimientos de secuenciación de última generación. Tras la clonación por medios experimentales y su confirmación, las secuencias fueron usadas para posterior escrutinio mediante métodos bioinformáticos, con objeto de identificar relaciones potenciales, grado de conservación, y la presencia de varias formas únicas, que incluyen una variante deletada de la Cu,Zn-SOD. Además, se generaron modelos 3-D de las formas alternativas fundamentales, así como predicciones bioinformáticas sobre la antigenicidad/alérgenicidad de estas moléculas. Los ensayos bioquímicos de actividad SOD, llevados a cabo sobre extractos de polen, no mostraron ningún tipo de correlación con la viabilidad polínica. Se detectaron nuevas formas de Cu,Zn-SODs (incluyendo formas cloroplastídicas no descritas

previamente en este material), así como isoformas de Mn, Fe y Cu,Zn-SODs expresadas diferencialmente en extractos de polen obtenido de diferentes cultivares. También fueron identificadas proteínas con reacción cruzada frente a un anticuerpo anti Cu,Zn-SOD de polen de olivo en los extractos de polen de diversas especies alergénicas, lo que indica una relevancia potencial de esta molécula como panalérgeno. Finalmente, ambas formas relevantes de Cu,Zn-SOD (completa y delecionada) fueron expresadas como proteínas recombinantes, y fueron sometidas a análisis de actividad SOD. El enzima delecionado recombinante mostró una actividad SOD ligeramente diferencial a la de la forma completa del enzima. Esta diferencia podría contribuir a regular de forma muy fina el equilibrio ROS. Varios anticuerpos frente al enzima Cu,Zn-SOD fueron obtenidos, y usados para inmunolocalización. Estos estudios, particularmente los realizados a nivel ultraestructural, confirmaron la localización del enzima, previamente indicada en el citosol y en la exina y las aperturas del grano de polen del olivo. Además, el enzima fue detectado en amiloplastos presentes en los granos de polen jóvenes, y en plástidos poco diferenciados existentes en el grano de polen maduro. El enzima Cu,Zn-SOD fue detectado también en peroxisomas presentes en el citoplasma de la célula vegetativa, que fueron también positivos a catalasa, utilizada como marcador peroxisomal.

La relevancia fisiológica de estas observaciones es ampliamente discutida y contrastada con la literatura disponible sobre el tema.