

1313840

7
745

**MOVILIZACIÓN Y DESATURACIÓN DE OLEATO Y SU
INFLUENCIA EN EL METABOLISMO DE LOS
TRIACILGLICÉRIDOS DURANTE LA FORMACIÓN DE LA
SEMILLA DE GIRASOL**



M^a Teresa García Díaz

Universidad de Sevilla, 2000

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Química

Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular

TESIS DOCTORAL

Movilización y desaturación de oleato y su influencia en el metabolismo de los triacilglicéridos durante la formación de la semilla de girasol.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
NEGOCIADO EN TESIS

Queda registrado este Título de Doctor al
folio 82 número 112 del libro
correspondiente. 24 FEB. 2000
Sevilla,

El Jefe del Negociado



DIRECTOR:

Manuel Mancha Perelló.

TUTOR:

José María Vega Piqueres.

DOCTORANDO:

María Teresa García Díaz.

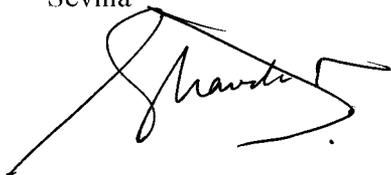
Trabajo presentado por la licenciada María Teresa García Díaz para
optar al grado de Doctora en Química



Fdo. María Teresa García Díaz.

Director:

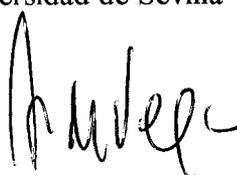
Dr. Manuel Mancha Perelló
Profesor de Investigación
del Instituto de la Grasa (CSIC)
Sevilla



Fdo. Manuel Mancha Perelló

Tutor:

Dr. J. M. Vega Piqueres
Catedrático del Dpto. Bioquímica
Vegetal y Biología Molecular
Universidad de Sevilla



Fdo. J.M. Vega Piqueres

A mi familia

Deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes personas y organismos que me han permitido la realización de esta tesis:

Al doctor Manuel Mancha por haberme ofrecido la oportunidad de realizar este trabajo, por su dirección y orientación en todo momento.

Al doctor José María Vega por su amabilidad al acceder a la tutoría de esta tesis.

Al doctor Enrique Martínez Force por ayudarme siempre que lo he necesitado, por sus consejos y sobre todo por ser un amigo.

Al doctor Rafael Garcés por su ayuda y orientación.

A M^a Carmen Ruíz por su colaboración y amabilidad.

A Alberto Domínguez por haber cuidado de mis girasoles y por ser un “colega”.

Al doctor José Manuel Martínez Rivas por sus consejos y ayuda.

A Sara, Rosario, Valle, Pepa, Mónica y Rafa, por haber sido además de compañeros, amigos, y haber vivido con ellos buenos ratos, dentro y fuera del laboratorio.

A toda la segunda planta, con los que he compartido tan buenos momentos durante estos años. Y en general a todo el Instituto de la Grasa, por el buen trato que siempre me han dispensado.

ÍNDICE GENERAL

	página
Índice General	I
Índice de Figuras	IX
Índice de Tablas	XI
Abreviaturas	XV

INTRODUCCIÓN

I. GIRASOL. CARACTERÍSTICAS DE LA PLANTA Y EL ACEITE.	1
1. Origen del girasol.	1
2. Descripción de la planta.	2
2.1. Sistemática.	2
2.2. Características de la planta.	2
2.3. Crecimiento y desarrollo.	4
2.4. Deposición y acumulación de los lípidos.	5
3. Aplicaciones del girasol.	6
3.1. Aceite de girasol. Composición.	6
3.2. Importancia del cultivo de girasol. Otros usos.	8
4. Mutantes de girasol.	9
4.1. Mutante de girasol alto oleico.	9
4.2. Mutantes de girasol altos saturados.	13
II. LÍPIDOS DE PLANTAS.	15
1. Introducción.	15
2. Clasificación.	16
3. Ácidos grasos.	16
3.1. Ácidos grasos esenciales.	18

3.2. Ácidos grasos pocos frecuentes.	18
3.3. Propiedades físicas y químicas.	19
4. Lípidos complejos.	20
4.1. Glicéridos.	20
4.2. Éteres alquílicos de los acilglicéridos.	23
4.3. Glucosilacilglicéridos.	23
4.4. Fosfoglicéridos.	24
4.5. Esfingolípidos.	27
4.6. Ceras.	27
5. Lípidos simples.	27
5.1. Terpenos.	28
5.2. Esteroides.	28
5.3. Prostaglandinas.	28
III. BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS EN PLANTAS.	29
1. Sustratos para la síntesis de ácidos grasos.	29
2. Estructura y función de la Acetil-CoA Carboxilasa.	31
3. Ruta de síntesis de los ácidos grasos.	32
3.1. Complejo Ácido Graso Sintetasa.	32
3.1.1. Proteína transportadora de acilos (ACP).	33
3.1.2. Reacciones de la FAS.	34
4. Formación del ácido oleico. Esteroil-ACP desaturasa.	36
5. Terminación del ciclo de la sintetasa de los ácidos grasos.	38
6. Biosíntesis extraplastidial de ácidos grasos.	42
6.1. Biosíntesis del ácido linoleico. Características de la oleato desaturasa.	42
6.1.1. Sustrato de la oleato desaturasa.	42
6.1.2. Propiedades y localización celular de la oleato desaturasa.	42
6.1.3. Mecanismo de entrada del ácido oleico en fosfatidilcolina.	45
6.1.3.1. Acil-CoA:lisofosfatidilcolina aciltransferasa.	45
6.1.3.2. Interconversión entre DAG y PC.	46
6.2. Biosíntesis de los ácidos α -linolénico y γ -linolénico.	47
6.3. Formación de ácidos grasos inusuales.	48

6.4. Biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga.	49
IV. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD OLEATO DESATURASA.	50
1. Efecto de la temperatura.	51
V. BIOSÍNTESIS DE GLICEROLÍPIDOS EN PLANTAS.	54
1. Biosíntesis de lípidos neutros en tejidos de reserva.	54
1.1. Rutas eucariótica y procariótica.	54
1.2. Biosíntesis de triacilglicéridos.	56
1.2.1. Formación del ácido lisofosfatídico.	57
1.2.2. Formación del ácido fosfatídico.	58
1.2.3. Formación de diacilglicéridos.	59
1.2.4. Formación de triacilglicéridos.	60
1.2.5. Importancia de la PC en la síntesis de TAG.	60
2. Biosíntesis de fosfolípidos.	61
2.1. Biosíntesis de PC y PE.	61
2.2. Biosíntesis de PI y PG (ruta CDP-DAG).	62
3. Almacenamiento de TAG en semillas en desarrollo. Oleosomas.	63
4. Participación de los TAG en el metabolismo lipídico.	65
VI. EFECTOS DE LA DISPONIBILIDAD DE OXÍGENO.	70
1. Control de la germinación de las semillas por la disponibilidad de O ₂ .	70
1.1. Efectos de las envueltas de las semillas en el requerimiento de oxígeno para la germinación.	71
1.2. Procesos metabólicos relacionados con la privación de oxígeno.	72
2. Efecto de la disponibilidad de oxígeno en la desaturación.	72
2.1. Efecto de la disponibilidad de oxígeno en la desaturación de los lípidos de microorganismos.	72
2.2. Efecto de la disponibilidad de oxígeno en la desaturación de los lípidos de plantas.	73

MATERIALES Y MÉTODOS.

I. MATERIALES.	77
I.1. Material biológico.	77
I.2. Condiciones de cultivo.	77
II. MÉTODOS.	78
II.1. Métodos generales.	78
II.1.1. Extracción de lípidos totales.	78
II.1.2. Metilación de los lípidos.	79
II.1.3. Determinación del contenido en lípidos.	79
II.1.3.1. Determinación del contenido en lípidos usando patrón interno.	79
II.1.3.2. Determinación del contenido en lípidos con Söxhlet.	80
II.2. Métodos cromatográficos de separación de lípidos.	80
II.2.1. Cromatografía en capa fina.	80
II.2.1.1. Detección e identificación de las bandas.	81
II.2.1.2. Separación de los lípidos neutros y polares.	82
II.2.1.3. Separación de los distintos lípidos polares.	82
II.2.1.4. Separación combinada de lípidos neutros y polares.	83
II.2.1.5. Separación de los distintos ácidos grasos.	83
II.2.1.6. Separación de los principales lípidos de la semilla mediante columnas de sílice.	84
II.2.1.7. Separación de los distintos productos de la hidrólisis parcial con lipasa pancreática. Análisis posicional de los ácidos grasos en los triacilglicéridos.	84
II.2.2. Cromatografía gaseosa.	85
II.3. Obtención del extracto crudo y de las fracciones subcelulares.	86
II.3.1. Obtención del extracto crudo.	86
II.3.2. Obtención de oleosomas.	86
II.3.3. Obtención de microsomas.	87
II.4. Incubaciones con sustratos radiactivos.	87
II.4.1 Preparación de sustratos radiactivos.	87
II.4.1.1. Preparación de [1- ¹⁴ C]oleato amónico y [1- ¹⁴ C]linoleato amónico.	87

II.4.1.2. Preparación de [¹⁴ C]-oleil-CoA.	88
II.4.1.3. Preparación de MAG radiactivos.	88
II.4.2. Determinación de la radiactividad en lípidos.	88
II.4.2.1. Contador de centelleo líquido.	88
II.4.2.2. Analizador de radiactividad.	88
II.4.3. Incubaciones de tejido intacto con sustratos radiactivos.	89
II.4.4. Incubaciones de microsomas con sustratos radiactivos.	89
II.4.4.1. Experimentos de incorporación y metabolismo de sustratos radiactivos en microsomas.	89
II.4.4.2. Preparación de microsomas con lípidos radiactivos, después de incubación de la semilla.	90
II.5. Incubaciones de tejido intacto.	91
II.6. Estudio de la disponibilidad de oxígeno en semillas en desarrollo.	91
II.6.1. Analizador de CO ₂ por infrarrojo (LCA-2).	91
II.6.2. Utilización de N ₂ , O ₂ y aire en incubaciones con tejido intacto.	91

OBJETIVOS 93

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. LÍPIDOS DE LA SEMILLA DE GIRASOL DURANTE SU DESARROLLO. COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS Y EFECTO DE LA TEMPERATURA DE CRECIMIENTO. 95

1. Composición de ácidos grasos de los lípidos totales de la semilla de girasol normal y alto oleico durante su desarrollo.	95
2. Composición de ácidos grasos de los principales lípidos de la semilla de girasol normal en desarrollo a distintas temperaturas de crecimiento.	97
3. Composición de ácidos grasos de los lípidos de las fracciones subcelulares, microsomas y oleosomas, de semillas en desarrollo de girasol normal.	100
4. Estudio del contenido de los principales lípidos y ácidos grasos de la semilla de girasol en desarrollo.	101

II. EFECTO DE LA TEMPERATURA Y LA DISPONIBILIDAD DE O₂ EN LA DESATURACIÓN DE OLEATO EN SEMILLAS EN DESARROLLO.	104
1. Incubaciones de semillas en el capítulo.	105
2. Incubaciones de aquenios aislados.	114
3. Incubaciones con semillas peladas.	118
III. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA RESPIRACIÓN Y LA DESATURACIÓN DE OLEATO EN SEMILLAS EN DESARROLLO.	122
1. Medidas del desprendimiento de CO ₂ en semillas en desarrollo.	122
2. Efecto de la temperatura sobre el desprendimiento de CO ₂ por las semillas en desarrollo.	123
IV. ESTUDIO DEL METABOLISMO LIPÍDICO EN ATMÓSFERA DE N₂ EN SEMILLAS EN DESARROLLO.	127
1. Efecto de la atmósfera de N ₂ en el desprendimiento de dióxido de carbono por las semillas.	127
2. Incubación de semillas en desarrollo con [¹⁴ C]18:1 en atmósfera de N ₂ y de aire.	130
2.1. Incorporación de [¹⁴ C]18:1 a los lípidos de semillas en desarrollo.	130
2.2. Incorporación de [¹⁴ C]18:1 a los lípidos totales y la fracción microsómica de semillas en desarrollo incubadas bajo N ₂ .	133
V. INCUBACIONES DE SEMILLAS EN DESARROLLO CON ÁCIDOS GRASOS RADIATIVOS.	134
1. Incubaciones a tiempo corto en atmósfera de aire.	134
1.1. Influencia de la edad de la semilla sobre la incorporación de [¹⁴ C]18:1 a los lípidos de semillas alto oleico, incubadas a alta y baja temperatura.	134
1.2. Incorporación de [¹⁴ C]18:1 y [¹⁴ C]18:2 a los lípidos de semillas alto oleico e influencia de la temperatura en el metabolismo posterior de los	

lípidos.	135
1.3. Incorporación y desaturación de [¹⁴ C]18:1 en los lípidos de semillas de fenotipo normal con distintos niveles de actividad oleato desaturasa.	137
1.4. Incorporación de [¹⁴ C]18:2 a los lípidos de semillas en desarrollo de fenotipo normal e influencia de la temperatura en el metabolismo posterior de los lípidos.	141
2. Incubaciones a tiempo largo en atmósfera de aire.	142
2.1. Incorporación de [¹⁴ C]18:1 a semillas en desarrollo del fenotipo alto oleico.	142
2.2. Incorporación de [¹⁴ C]18:1 a semillas en desarrollo del fenotipo convencional.	142
3. Metabolismo de los lípidos sintetizados incubando previamente las semillas del fenotipo normal, a tiempo largo y en atmósfera de N ₂ , con [¹⁴ C]18:1 y [¹⁴ C]18:2.	145
3.1. Metabolismo de los lípidos marcados con [¹⁴ C]18:1.	145
3.2. Metabolismo de los lípidos marcados con [¹⁴ C]18:2.	150
4. Efecto de la temperatura de incubación sobre la incorporación de [¹⁴ C]18:1 a los lípidos de las semillas, en atmósfera de N ₂ .	151
5. Metabolismo de los lípidos previamente sintetizados por preincubación con [¹⁴ C]18:1, a 40°C bajo N ₂ .	152
VI. INCUBACIONES DE SEMILLAS EN DESARROLLO CON MAG.	155
1. Incubaciones de semillas en desarrollo con [¹⁴ C]MAG.	155
1.1. Incorporación de [¹⁴ C]MAG a los lípidos de la semilla.	155
1.2. Metabolismo de [¹⁴ C]MAG en semillas en desarrollo del fenotipo normal.	156
2. Influencia de los MAG en la incorporación y desaturación de [¹⁴ C]18:1 en semillas en desarrollo.	158
VII. INCUBACIONES DE LOS MICROSOMAS DE LAS SEMILLAS.	160
1. Incorporación in vivo de [¹⁴ C]18:1 y [¹⁴ C]18:2 a los lípidos de la fracción microsómica.	160
2. Metabolismo in vitro de los lípidos microsomales.	162

2.1. Metabolismo de los lípidos microsomales ricos en 1,2-DAG.	162
2.2. Metabolismo de los lípidos microsomales ricos en TAG y PC. Influencia de los MAG.	164
3. Metabolismo de los lípidos microsomales sintetizados a partir de [¹⁴ C]18:1-CoA y G-3-P.	166
DISCUSIÓN	169
CONCLUSIONES	175
BIBLIOGRAFÍA	179

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sección longitudinal de un aquenio.	3
Figura 2. Fases en el desarrollo del girasol.	5
Figura 3. Glicéridos.	20
Figura 4. Glucosilacilglicéridos.	23
Figura 5. Estructura de los principales fosfolípidos.	24
Figura 6. Hidrólisis enzimática catalizada por 4 tipos de fosfolipasas que reaccionan con glicerofosfolípidos (A ₁ , A ₂ , C y D).	26
Figura 7. Biosíntesis de ácidos grasos en plantas.	30
Figura 8. Biosíntesis del ácido oleico mediante la estearil-ACP desaturasa.	36
Figura 9. Esquema general de la biosíntesis de ácidos grasos y de la terminación del ciclo de la ácido graso sintetasa en plantas.	41
Figura 10. Mecanismo de la reacción de desaturación del ácido oleico a linoleico.	43
Figura 11. Intercambio de acilos entre la PC y el conjunto de acil-CoA citoplasmáticos, catalizado por la acil-CoA:lisofosfatidilcolina aciltransferasa.	46
Figura 12. Esquema de las rutas procariótica y eucariótica.	55
Figura 13. Ruta de Kennedy y mecanismo de desaturación de oleato.	57
Figura 14. Biosíntesis de fosfolípidos.	63
Figura 15. Reacción de transacilación catalizada por la diacilglicerol: diacilglicerol transacilasa y que implica la participación de DAG, TAG y MAG.	67
Figura 16. Reacciones que involucran a la fosfatidilcolina y a los lípidos neutros microsomales.	68
Figura 17. Productos de la hidrólisis parcial de los TAG con lipasa pancreática.	85
Figura 18. Variación de la composición de los principales ácidos grasos de los lípidos totales durante el desarrollo de la semilla de girasol convencional y alto oleico.	96
Figura 19. Efecto de la temperatura y la concentración de oxígeno en el porcentaje de linoleato de los LT de la semilla.	121

Figura 20. Efecto de la temperatura en la tasa de desprendimiento de CO ₂ de semillas en desarrollo de girasol convencional incubadas a las temperaturas indicadas con un flujo continuo de aire (125 ml/min) durante 170 min.	124
Figura 21. Efecto del nitrógeno sobre la tasa de desprendimiento de CO ₂ de semillas en desarrollo incubadas a 10°C en atmósfera de aire o nitrógeno alternativamente.	128
Figura 22. Efecto del nitrógeno en la tasa de desprendimiento de CO ₂ de semillas en desarrollo incubadas a 30°C en atmósfera de aire o nitrógeno de forma alternada.	128
Figura 23. Efecto del nitrógeno sobre la tasa de desprendimiento de CO ₂ de semillas en desarrollo de girasol incubadas a 10°C.	129
Figura 24. Evolución del 18:2 en los lípidos totales, triacilglicéridos y lípidos polares de semillas en desarrollo incubadas a 10°C en aire.	147
Figura 25. Incorporación de [¹⁴ C]18:1y [¹⁴ C]18:2 a los LT, TAG y LP de semillas en desarrollo incubadas a 10°C en aire.	149
Figura 26. Metabolismo de los lípidos que habían sido sintetizados por incubación con [¹⁴ C]18:1 a 40°C bajo N ₂ .	153
Figura 27. Cinética de los lípidos microsomales incubados a 20°C con [¹⁴ C]18:2 (gráfica A) y con [¹⁴ C]18:1 (gráfica B).	163
Figura 28. Metabolismo de los lípidos microsomales incubados a 20°C, sin MAG (gráfica A), con MAG (gráfica B).	165
Figura 29. Metabolismo de los lípidos microsomales obtenidos por preincubación con [¹⁴ C]18:1-CoA y G-3-P.	168

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Composición de ácidos grasos del aceite de girasol normal.	7
Tabla 2. Composición de ácidos grasos del aceite de girasol alto oleico, comparada con la del girasol normal.	12
Tabla 3. Composición de ácidos grasos (moles%) de los lípidos totales de los cinco mutantes de girasol y las dos líneas control RHA-274 (fenotipo normal) y HA-OL9 (fenotipo alto oleico).	14
Tabla 4. Ácidos grasos más comunes en los lípidos de reserva.	17
Tabla 5. Líneas puras de girasol usadas en este trabajo.	77
Tabla 6. Composición de ácidos grasos (mol %) de los LT de semillas en desarrollo de girasol normal a distintas temperaturas de crecimiento.	98
Tabla 7. Composición de ácidos grasos (mol %) de los TAG, DAG y LP de semillas en desarrollo de plantas de girasol normal a distintas temperaturas de crecimiento.	99
Tabla 8. Composición de ácidos grasos (mol%) de los LT de semilla y de los principales lípidos de oleosomas y microsomas de girasol convencional en desarrollo cultivado a 24°C ctes.	100
Tabla 9. Contenido en lípidos, expresado como $\text{mg} \cdot (\text{g P.F.})^{-1}$ y $\mu\text{g} / \text{semilla}$, de semillas en desarrollo de girasol convencional, crecidas a 25/15°C.	102
Tabla 10. Composición de ácidos grasos (mol%) y contenido de ácidos grasos en $\mu\text{moles/g P.F.}$ de los LT y de los principales lípidos de semillas en desarrollo de girasol normal, crecidas a 25/15°C.	102
Tabla 11. Modificaciones en el peso y el contenido graso en semillas en desarrollo de girasol convencional, incubadas en el capítulo a 10°C o 30°C durante 24 h.	106
Tabla 12. Cambios en la composición de ácidos grasos (moles %) de los LT de las semillas, incubadas en el capítulo a 10°C o 30°C durante 24 h.	106
Tabla 13. Cambios en el contenido de oleato y linoleato de los lípidos totales y tasa de desaturación de oleato in vivo de las semillas, incubadas en el capítulo a 10°C o 30°C durante 24 h.	107

Tabla 14. Cambios en la composición (moles %) y en el contenido ($\mu\text{moles}\cdot(\text{gPF})^{-1}$) de ácidos grasos de los lípidos totales y tasa de desaturación de oleato in vivo de las semillas.	109
Tabla 15. Variación del contenido de los distintos tipos de lípidos.	110
Tabla 16. Cambios en la composición (moles %) y en el contenido ($\mu\text{moles}\cdot(\text{gPF})^{-1}$) de los ácidos grasos de los TAG y tasa de desaturación de oleato in vivo de las semillas.	111
Tabla 17. Cambios en la composición (moles %) y en el contenido ($\mu\text{moles}\cdot(\text{gPF})^{-1}$) de los ácidos grasos de los LP y tasa de desaturación de oleato in vivo de las semillas.	111
Tabla 18. Cambios en la composición (moles %) y en el contenido ($\mu\text{moles}\cdot(\text{gPF})^{-1}$) de los ácidos grasos de la PC y tasa de desaturación de oleato in vivo de las semillas.	112
Tabla 19. Especies moleculares de TAG los lípidos totales de las semillas.	113
Tabla 20. Efecto de la concentración de oxígeno disuelto sobre la composición de ácidos grasos (mol %) de los LT de las semillas.	115
Tabla 21. Variaciones en el contenido de ácidos grasos en $\mu\text{moles ácido} \cdot (\text{gPF})^{-1}$ de los LT de las semillas.	116
Tabla 22. Efecto de la concentración de oxígeno y la temperatura en la composición de ácidos grasos (mol %) de los LT de las semillas.	117
Tabla 23. Cambios en la composición de ácidos grasos (moles %) de los lípidos totales de las semillas.	118
Tabla 24. Efecto de la temperatura y la concentración de oxígeno en la composición de ácidos grasos de los LT de las semillas.	119
Tabla 25. Medidas de la tasa de desprendimiento de CO_2 a 20°C de los aquenios en desarrollo de fenotipo convencional, y de sus correspondientes cáscaras y semillas peladas.	123
Tabla 26. Efecto de la temperatura de incubación sobre la composición de ácidos grasos (mol%) de los LT de semillas en desarrollo de girasol convencional, incubadas a las temperaturas indicadas con un flujo continuo de aire (125 ml/min) durante 170 min.	125
Tabla 27. Tasa de desaturación de oleato in vivo y tasa de desprendimiento de CO_2 de las semillas.	125

Tabla 28. Incorporación de [¹⁴ C]18:1 a los lípidos totales de las semillas incubadas a 10°C y 30°C durante 2 horas en atmósfera de N ₂ .	130
Tabla 29. Incorporación de [¹⁴ C]18:1 a los principales lípidos de las semillas.	131
Tabla 30. Desaturación del [¹⁴ C]18:1 incorporado a los LT de las semillas.	132
Tabla 31. Incorporación de [¹⁴ C]18:1 en atmósfera de N ₂ a los lípidos totales de la semilla y de la fracción microsómica.	133
Tabla 32. Incorporación de [¹⁴ C]18:1 a los lípidos de las semillas tras dos horas de incubación.	135
Tabla 33. Metabolismo de los principales lípidos de semillas en desarrollo del fenotipo alto oleico preincubadas con [¹⁴ C]18:1.	136
Tabla 34. Metabolismo de los principales lípidos de semillas en desarrollo del fenotipo alto oleico preincubadas con [¹⁴ C]18:2.	137
Tabla 35. Composición de ácidos grasos (mol %) de los LT de la semilla, antes y después de 4 horas de incubación.	138
Tabla 36. Incorporación de [¹⁴ C]18:1 a los principales lípidos de la semilla.	139
Tabla 37. Desaturación de oleato a linoleato de los LT de la semilla.	140
Tabla 38. Incorporación de [¹⁴ C]18:2 a los principales lípidos de la semilla.	141
Tabla 39. Incorporación de [¹⁴ C]18:1 a los principales lípidos de la semilla.	142
Tabla 40. Incorporación de [¹⁴ C]18:1 a los principales lípidos de la semilla.	143
Tabla 41. Desaturación de oleato a linoleato en los lípidos totales de las semillas.	144
Tabla 42. Composición de ácidos grasos de los LT y de los principales lípidos de las semillas.	146
Tabla 43. Metabolismo de los lípidos previamente sintetizados por preincubación de las semillas con [¹⁴ C]18:1.	147
Tabla 44. Metabolismo de los lípidos previamente sintetizados por preincubación de las semillas con [¹⁴ C]18:2.	150
Tabla 45. Incorporación de [¹⁴ C]18:1 a los principales lípidos de la semilla.	152
Tabla 46. Incorporación de [¹⁴ C] a los LT y a los principales lípidos de las semillas.	156
Tabla 47. Incorporación de [¹⁴ C]MAG a los principales lípidos de las semillas.	157
Tabla 48. Porcentaje de incorporación de [¹⁴ C] en forma de [¹⁴ C]18:1 o [¹⁴ C]18:2, a los TAG y LP de las semillas.	159

Tabla 49. Incorporación de [^{14}C]18:1 y [^{14}C]18:2 a los lípidos de la semilla tras su incubación, bajo N_2 , con los sustratos radiactivos.	161
Tabla 50. Incorporación de [^{14}C]18:1 y [^{14}C]18:2 a los lípidos de la fracción microsómica, obtenida de semillas que habían sido incubadas, bajo N_2 , con el sustrato radiactivo.	161
Tabla 51. Incorporación de [^{14}C]18:1 a los lípidos microsomales. Los microsomas se incubaron a 20°C durante 45 min con [^{14}C]18:1-CoA y G-3-P.	167

ABREVIATURAS

2D-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en dos dimensiones
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ACP	Proteína transportadora de acilos
ADP	Adenosina difosfato
AGL	Ácido graso libre
ANOVA	Análisis de las varianzas
AOM	Método del oxígeno activo
ATP	Adenosina trifosfato
BCCP	Proteína transportadora de carboxilo biotina
BHT	Butilhidroxitolueno
BSA	Seroalbúmina bovina
CCF	Cromatografía en capa fina
CDP	Citidina difosfato
cit b ₅ (ox)	Citocromo b ₅ oxidado
cit b ₅ (red)	Citocromo b ₅ reducido
CMS	Esterilidad citoplasmática masculina
CoA	Coenzima A
CTP	Citidina trifosfato
DAG	Diacilglicerol
DAGAT	Diacilglicerol aciltransferasa
DDF	Días después de floración
DGDG	Digalactosildiacilglicérido
DPG	Difosfatidilglicerol
DPM	Desintegraciones por minuto
DS	Desviación estándar
DSQG	Diacilsulfoquinovosilglicerol
E	Ácido esteárico
EDS	Estearil-ACP desaturasa
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
EMS	Etilmetano sulfonato

Fad2	Gen de la Δ -12 desaturasa
FAS	Complejo ácido graso sintetasa
FAS I	Complejo ácido graso sintetasa I
FAS II	Complejo ácido graso sintetasa II
FAS III	Complejo ácido graso sintetasa III
Fat A/ Fat B	Gen de la tioesterasa de los acil-ACP
Fed ox	Ferredoxina oxidada
Fed red	Ferredoxina reducida
G-3-P	Glicerol-3-fosfato
GLC	Cromatografía gas-líquido
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HEPES	N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
KAS I	β -cetoacil-ACP sintetasa I
KAS II	β -cetoacil-ACP sintetasa II
KAS III	β -cetoacil-ACP sintetasa III
L	Ácido linoleico
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LN	Lípidos neutros
LP	Lípidos polares
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPC	Lisofosfatidilcolina
LT	Lípidos totales
MAG	Monoacilglicérido
MGDG	Monogalactosildiacylglicérido
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducida
NADP	Nicotinamida adenina fosfato dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina fosfato dinucleótido reducida
O	Ácido oleico
ODS	Oleato desaturasa
P	Ácido palmítico
PA	Ácido fosfatídico
PC	Fosfatidilcolina

PDH	Piruvato dehidrogenasa plastidial
PE	Fosfatidiletanolamina
P.F.	Peso fresco
PG	Fosfatidilglicerol
PGP	Fosfatidilglicerol-3-fosfato
Pi	Fosfato inorgánico
PI	Fosfatidilinositol
Ppi	Pirofosfato
ppm	Partes por millón
PS	Fosfatidilserina
RE	Retículo endoplasmático
S	Ácidos saturados
SL	Sulfolípidos
TAG	Triacilglicérido
Tris	Tris-Hidroximetil-aminometano



INTRODUCCIÓN

I. GIRASOL. CARACTERÍSTICAS DE LA PLANTA Y EL ACEITE.

1. Origen del girasol.

El girasol (*Helianthus annuus* L.) procede de Norteamérica, de las zonas áridas del Medio-Oeste y del Oeste, zona septentrional del antiguo Méjico y provincia occidental de Canadá (Gadea, 1966). Existen datos arqueológicos que indican el uso del girasol por los indios americanos, entre Arizona y Nuevo Méjico, hacia el 3000 a. C. (Semelczi-Kovacs, 1975). Los indios empleaban los aquenios de algunas especies de girasol como alimento y se le atribuían propiedades medicinales, también se piensa que lo usaban para extraer aceite y tintes para teñir telas y cestas, e incluso para pintarse el cuerpo en ceremonias religiosas.

En el siglo XVI, España introduce el girasol en Europa como planta ornamental, con el nombre de "Flor del Sol Peruana". Con este nombre, y siempre como planta de adorno, se extendió por toda Europa. Posteriormente, se cultivó como planta comestible y comenzó a ser común su consumo (Putt, 1980). La propagación del cultivo de girasol hacia el este de Europa se produjo durante el siglo XVII. En 1716, fue concedida la primera patente europea para usar el aceite de girasol con fines industriales. El girasol llega a Rusia en el siglo XVIII; las primeras referencias de la extracción del aceite se encuentran en la Academia Rusa en el año 1779 (Gundaev, 1971). En el siglo XIX, su cultivo se había difundido por las estepas centrales y meridionales, aprovechándose tanto como alimento directo como para la extracción del aceite. La aparición masiva de varias plagas del girasol, originaron un gran retroceso en su cultivo, hasta que se obtuvieron por selección, a principios de este siglo, variedades resistentes. Luego, en Rusia se lograron variedades cada vez con más alto contenido en aceite, lo que provocó un espectacular avance de este cultivo. En el resto de Europa, su desarrollo tuvo lugar en la primera mitad del siglo XX (Semelczi-Kovacs, 1975).

2. Descripción de la planta.

2.1. Sistemática.

El girasol pertenece a la familia de las Compuestas, subfamilia Tubulifloras, género *Helianthus*, en el que hay numerosas especies anuales y perennes (Gadea, 1966). Algunas especies se cultivan como plantas ornamentales (*H. debilis* Nutt, *H. decapetalus* L.), otras por sus tubérculos comestibles ricos en inulina (*H. tuberosus*) y otras para la extracción de aceite de buena calidad o como planta forrajera (*H. annuus* L.), (Mazzani, 1963).

2.2. Características de la planta.

El girasol es una planta dicotiledónea, anual, erecta, cuyas características morfológicas difieren mucho de unas variedades a otras.

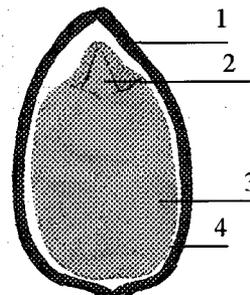
El tallo es de altura variable, entre un mínimo de 0,5 m hasta un máximo de 5 m o más, el grosor varía entre un mínimo de 2-3 cm a un máximo de 7-8 cm. El tallo, ramas, pecíolos, hojas y receptáculo están cubiertos de pelos cortos y rígidos que confieren a la planta una aspereza característica. Las hojas son enteras, de forma aproximadamente ovalada y de borde dentado. La disposición en el tallo es variable incluso en una misma planta. La raíz está formada por un eje principal que se hunde verticalmente en el suelo y un conjunto de raíces secundarias de las que nace una cabellera de raíces terciarias que exploran el suelo en sentido horizontal y vertical. La inflorescencia del girasol es un capítulo con una base medular y el borde provisto de brácteas que terminan en punta aguda. Las dimensiones de los capítulos difieren de una variedad a otra y, dentro de la misma variedad, según las condiciones ambientales. El receptáculo puede ser plano, cóncavo o convexo. El capítulo está formado por un número grande de flores tubuloideas diminutas y un número menor de flores liguloideas grandes que lo rodean. Éstas son de color amarillo y le confieren al capítulo su aspecto llamativo, carecen de anteras y sus pistilos y estilos están atrofiados, por lo que son estériles. Las verdaderas flores, de estructura tubular, son de color marrón y se distribuyen desde el exterior del receptáculo al interior en arcos que convergen hacia el centro. Durante la evolución de la planta las lígulas amarillas estériles son las primeras en aparecer. La floración total del capítulo dura de cinco a diez días, dependiendo del tamaño de éste y de las condiciones ambientales. Un

rasgo característico del girasol es el movimiento de sus capítulos, que se orientan constantemente hacia el sol y siguen su movimiento. Este movimiento heliotrópico termina al completarse la floración (Gadea, 1966).

El fruto (Figura 1) es un aquenio de tamaño y forma variable, oscilando entre 7-25 mm de longitud y 4-13 mm de ancho. Es ligeramente aterciopelado-veloso, con el pericarpio duro y fibroso. El pericarpio está normalmente muy pegado al embrión, exceptuando las aristas del aquenio. La membrana seminal crece con el endospermo, formando una película fina que cubre el embrión de la semilla y asegura la adherencia entre el pericarpio y la semilla. Las variedades de girasol con aquenios grandes, en los que los cotiledones no llenan completamente la cáscara, son las que se utilizan para consumo directo. En cambio, en las variedades oleaginosas se procura que la cáscara sea muy fina. La coloración puede ser blanca, gris, castaña y negra, o bien con manchas y franjas blancas, grises o castañas. El aquenio contiene dos cotiledones, que representan la reserva principal de aceite y aleurona de la semilla. Entre los dos cotiledones carnosos, se encuentra la gémula, en el extremo más agudo. Está compuesta de epidermis, tejido básico y meollo. La gémula contiene, al igual que los cotiledones, aceite y aleurona, pero se tritura más difícilmente que éstos. Tras la germinación, los cotiledones alcanzan una longitud de hasta 4 cm y una anchura de hasta 2 cm y adquieren un color verde claro. La inserción de los cotiledones sobre el eje hipocotílico es pedunculada. El hipocotilo es de color verde pálido en la parte enterrada y verde o rojo morado en la parte expuesta al sol. Su longitud es variable según la profundidad de la siembra (Vrânceanu, 1977). Los aquenios son denominados impropriamente “semillas”, a pesar de lo cual utilizaremos en adelante esta denominación, por ser de uso generalizado.

Figura 1. Sección longitudinal de un aquenio:

1. Pericarpio; 2. Gémula; 3. Cotiledón.;
4. Membrana seminal



2.3. Crecimiento y desarrollo.

El crecimiento de la planta de girasol presenta algunas particularidades, cuyo conocimiento permite dirigir las fases del ciclo vital para obtener una mayor producción de semillas y aceite.

La raíz frecuentemente crece más deprisa que el tallo, y puede alcanzar más longitud que éste. En los suelos más húmedos las raíces profundizan menos y se extienden en sentido horizontal cerca de la superficie. En los suelos menos húmedos crecen más en profundidad, llegando incluso hasta los cuatro metros de la superficie. Por tanto, el crecimiento del sistema radicular depende del nivel de abastecimiento de agua y nutrientes del suelo. El tallo crece lentamente al principio, hasta que la planta tiene 2-3 pares de hojas, luego el ritmo aumenta para alcanzar la máxima altura al finalizar la floración. El crecimiento se puede dirigir controlando diversos factores, como la temperatura, humedad, luz, nutrición, etc. (Vrânceanu, 1977).

La ontogenia del girasol se ha estudiado intensamente, lo que ha permitido establecer las etapas generales de su desarrollo (Alba y Llanos, 1990).

Fases del desarrollo:

- **Germinación de las semillas y emergencia:** comienza en la siembra y dura hasta la aparición de los cotiledones. La duración de esta fase depende de las condiciones de temperatura del suelo, profundidad de la siembra, humedad y disponibilidad de oxígeno, (Figura 2, A).

- **Formación de las primeras hojas:** dura entre 15 y 25 días, desde la emergencia hasta la aparición de 4-5 pares de hojas. En esta fase se produce el enraizamiento de la planta y al final se aprecian los esbozos foliares y florales, (Figura 2, B).

- **Crecimiento activo:** este período comprende desde la anterior fase hasta la aparición del botón floral. Se produce un crecimiento de la planta en altura del tallo y se desarrolla la superficie foliar con un mayor ritmo, alcanzando el máximo en las dos últimas semanas de la floración, (Figura 2, C).

Floración: la floración puede durar de 10 a 12 días. Comienza con la apertura de las primeras flores liguladas, sigue la apertura de las flores verdaderas de los anillos

exteriores del capítulo y continúa la apertura en dirección hacia el centro a razón de 1 a 5 anillos diarios, (Figura 2, D).

- **Maduración:** La duración de esta fase es muy variable, entre 35 y 50 días. Comienza con el final de la floración y llega hasta el estado de madurez fisiológica. En esta fase se forman y desarrollan las semillas, y tiene lugar la acumulación intensa de aceite. La fase termina al finalizar el llenado de las semillas cuyo peso seco ya no aumentará en el futuro, (Figura 2, E).

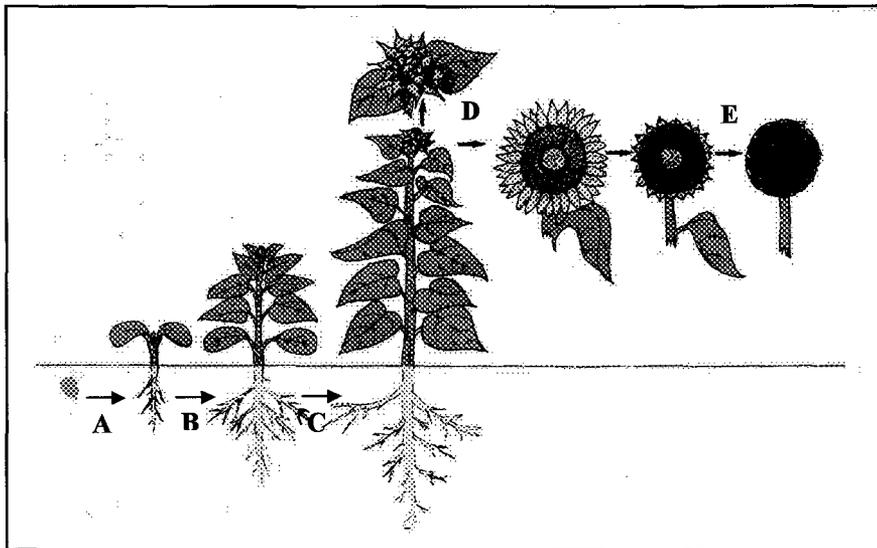


Figura 2. Fases en el desarrollo del girasol. Siembra. A. Germinación de las semillas y emergencia. B. Formación de las primeras hojas. C. Crecimiento activo. D. Floración. E. Maduración.

2.4. Deposición y acumulación de los lípidos.

La acumulación del aceite en semillas y frutos es un proceso bien caracterizado (Canvin, 1963). Como principio general, la deposición de aceite sigue una curva sigmoideal durante el desarrollo de la semilla, que se puede dividir en tres fases desde la floración a la madurez. Durante la primera, después de la floración, (en girasol hasta 12-14 DDF), sólo hay trazas de triacilglicéridos (TAGs) en los tejidos de la semilla. Los principales constituyentes de la fracción lipídica son los lípidos de membrana (fosfolípidos y glucolípidos), de tal modo que la composición de los lípidos en esta fase es similar a la de los tejidos vegetativos de la planta. La segunda fase es una etapa más activa del desarrollo

y corresponde a la propia deposición del aceite, que supone la acumulación gradual de TAGs. La acumulación de TAGs es gradual, aunque se incrementa muy rápidamente en un corto período de tiempo, generalmente hacia la mitad del desarrollo. En girasol esta etapa se extiende desde los 12-14 DDF hasta los 30-35 DDF. En paralelo, el contenido de los ácidos grasos característicos del aceite aumenta considerablemente. Durante este período también se sintetizan los fosfolípidos y glucolípidos, aunque en menor extensión. Al final de la segunda fase, los TAGs son los componentes mayoritarios (90-95%) y los fosfolípidos y glucolípidos suponen menos del 10% de los lípidos totales. Finalmente, la acumulación de lípidos cesa durante la tercera fase y se produce la madurez de la semilla. El peso seco no se incrementa significativamente, y la humedad decrece progresivamente. El girasol alcanza la “madurez fisiológica” aproximadamente a los 35 DDF, cuando el peso seco de las semillas y el contenido en aceite y TAGs es máximo.

3. Aplicaciones del girasol.

El girasol es uno de los cuatro principales cultivos anuales de semillas oleaginosas producidas en el mundo, precedido por la soja, canola y algodón. Si se considera el aceite producido, el girasol ocupa un lugar importante en la producción mundial, ya que supone el 12% del total (Hui, 1996).

3.1. Aceite de girasol. Composición.

El aceite de girasol se caracteriza por tener un nivel elevado de ácidos grasos poliinsaturados y tocoferoles, que son antioxidantes naturales (Morrison et al., 1995).

Los ácidos grasos mayoritarios del aceite de girasol son los ácidos oleico (18:1), linoleico (18:2), esteárico (18:0) y palmítico (16:0) (Tabla 1). Y en proporciones menores al 1% se encuentran los ácidos aráquico (20:0), mirístico (14:0), palmitoleico (16:1), linolénico (18:3), gadoleico (20:1), behénico (22:0), erúxico (22:1), y lignocérico (24:0). Los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados tienen configuración *cis*.

Tabla 1. Composición de ácidos grasos del aceite de girasol normal.

Ácido Graso	%	Ácido Graso	%
<C14	<0.1	C18:3	<0.7
C14:0	<0.5	C20:0	<1
C16:0	3-10	C20:1	<0.5
C16:1	<0.1	C22:0	<1
C18:0	1-10	C22:1	<0.5
C18:1	14-65	>C24	<0.2
C18:2	20-75		

Datos tomados de Davidson et al., 1996.

La composición de ácidos grasos de la semilla depende de factores genéticos y ambientales. Entre éstos últimos destaca la temperatura, que influye en el contenido de los ácidos oleico y linoleico. Las semillas producidas en climas más fríos contienen mayor porcentaje de linoleico que aquellas cultivadas en zonas templadas, las cuales presentan mayores niveles de oleico.

Los triacilglicéridos del aceite de girasol convencional son ricos en los ácidos oleico y linoleico. Las principales especies son LLO (39%), LOO (19%), LLL (14%), LLS (14%), LOS (11%) y cantidades menores de SLS y OOS, (O, oleico; L, linoleico; S, saturados, palmítico y esteárico). El contenido en fosfolípidos de los lípidos totales es del 0,2-3%, siendo el mayoritario la fosfatidilcolina (aprox. 50%), seguido de la fosfatidiletanolamina y el fosfatidilinositol (20-30%), y en menor cantidad el ácido fosfatídico (Chapman, 1980).

El aceite de girasol también contiene hidrocarburos (0,025-0,03%), esteroides (0,542-0,584%) y ceras (0,008-0,044%). El contenido en ceras es menor que en otros aceites vegetales, como el algodón o el maíz. El contenido en ácidos grasos libres es de aproximadamente 0,5%, como otros aceites vegetales. Es rico en tocoferoles naturales, α -tocoferol (608 mg/kg), β -tocoferol (17 mg/kg) y γ -tocoferol (11 mg/kg), (Padley et al., 1994).

3.2. Importancia del cultivo de girasol. Otros usos.

Por su composición en ácidos grasos y su contenido en tocoferoles, el aceite de girasol se considera como un aceite de calidad cuyo uso principal es en alimentación, tanto para uso doméstico como en la industria alimentaria.

En general, no se usa como aceite industrial, ya que resulta caro frente a otros aceites y grasas. Pero se usa para algunas pinturas, barnices y plásticos, por sus buenas propiedades como aceite semi-secante, sin presentar los problemas de amarilleamiento de los aceites con un alto contenido en ácido linolénico. También se usa el aceite de girasol en la elaboración de jabones y detergentes. Su uso en la producción de adhesivos, productos agroquímicos, lubricantes, etc. depende, sobre todo, del precio de los productos derivados del petróleo. Se ha estudiado el uso del aceite de girasol y sus mezclas con gasóleo como combustible para motores diesel. Otra posibilidad es convertir el aceite en sus ésteres metílicos o etílicos de los ácidos grasos. Estos ésteres tienen características mucho más favorables, por ejemplo, menos viscosidad, menor producción de humo, mayor eficiencia térmica sobre el diesel y no presentan diferencias en la combustión (Fick, 1989).

Por otro lado, la semilla de girasol también se consume como aperitivo, existen variedades específicas de girasol que se cultivan para este fin. Suelen ser variedades de semillas más grandes que las que producen aceite, tienen listas blancas y negras en la cáscara y menor peso. La mayor producción se centra en E.E.U.U., aunque España es también un productor importante. Se usan en una amplia variedad de productos alimenticios, como ingredientes o en mezclas de frutos secos.

Otro producto derivado del girasol es la harina, que se usó primero como aporte proteico en piensos para animales. Últimamente hay mayor interés en las proteínas de la harina de girasol como ingredientes de alimentos, en la industria panadera y en la producción de alimentos infantiles. Sin embargo, el uso de nuevas fuentes proteicas suele estar limitado por el bajo valor biológico de dichas proteínas, por la presencia de propiedades organolépticas no deseables y, en muchos casos, por la baja solubilidad que provoca una menor funcionalidad. La calidad de la proteína de la harina de girasol depende del proceso de extracción del aceite. Normalmente, hay un prensado mecánico seguido de extracción con disolventes. Este tipo de procesos da lugar a harinas con altos contenidos en proteínas insolubles. Se ha conseguido mejorar la calidad de estas harinas, para su uso en la industria alimentaria, mediante modificaciones adecuadas, por ejemplo con hidrólisis

enzimáticas. Los hidrolizados de harina de girasol presentan una composición de aminoácidos similar a la harina pero con mejores propiedades funcionales, sobre todo mayor solubilidad. Comparada con la harina de soja, tiene un menor valor energético y menor contenido en lisina, aunque mayor en metionina (Parrado et al., 1993).

4. Mutantes de girasol.

La composición de ácidos grasos de las grasas y aceites determina sus propiedades físicas y químicas y sus posibles aplicaciones. En girasol, el contenido relativo de oleico y linoleico de la semilla está fuertemente influenciado por la temperatura de cultivo, por ello es difícil producir aceites con un grado de insaturación constante. Existe cada vez mayor interés en obtener aceites con una composición de ácidos grasos específica, que además tenga aplicaciones concretas en la industria alimentaria. Por ejemplo, para los procesos de fritura se requieren aceites con bajos niveles de ácidos linoleico y linolénico, mientras que en la producción de margarinas y grasas plásticas se necesitan grasas con mayores niveles de ácidos grasos saturados, con lo que se evitarían los procesos de hidrogenación que dan lugar a la aparición de ácidos grasos trans e isómeros posicionales.

La modificación de la composición de ácidos grasos de los lípidos de reserva de las semillas oleaginosas se puede conseguir por transferencia de nuevos genes de otras especies, o por la inducción de la variabilidad genética mediante mutagénesis, seguida de la identificación y aislamiento de mutantes con alteraciones en la composición de ácidos grasos de los lípidos de la semilla (Mancha et al., 1994).

Se han obtenido, por mutagénesis, varios mutantes de girasol con modificaciones en la composición de ácidos grasos de los lípidos de la semilla (alto contenido en ácido oleico o altos niveles de ácidos grasos saturados), en respuesta a las demandas de la industria alimentaria.

4.1. Mutante de girasol alto oleico.

En 1976, Soldatov publicó la obtención de un mutante de girasol por tratamiento con el agente mutágeno dimetilsulfato (Soldatov, 1976). Las semillas de este mutante se caracterizan por tener un bajo contenido en ácido linoleico y un alto contenido en ácido

oleico. A partir de este mutante se desarrolló una línea de alto oleico, la variedad Pervenet, con un contenido entre 80-90% de este ácido, que se ve poco afectado por las condiciones climáticas (Kharchenko, 1979). Más tarde, Fick desarrolló en E.E.U.U. líneas derivadas de la variedad Pervenet, demostrando su estabilidad en diferentes condiciones ambientales, e incorporó los genes responsables del carácter alto oleico en híbridos, necesarios para la producción comercial (Fick, 1984). El girasol alto oleico se comenzó a comercializar en E.E.U.U. en la década de los ochenta. Fernández-Martínez *et al.* (1987) obtuvieron líneas puras de girasol con altos niveles de ácido oleico (90%), incorporando, por retrocruzamiento, el carácter alto oleico procedente de una línea de origen ruso a dos líneas públicas. A partir de estas líneas se han desarrollado híbridos cuyo cultivo ha alcanzado en España un desarrollo importante.

El control genético de este carácter es bastante complejo, como lo demuestra la existencia de varios modelos propuestos. Fick estudió las generaciones obtenidas al cruzar plantas con altos y bajos niveles de ácido oleico, e indicó la presencia de un solo gen parcialmente dominante que controlaría el carácter alto oleico (Fick, 1984). Urie (1985) indicó la presencia de un solo gen dominante Ol, que daría lugar al carácter alto oleico, aunque en algunos cruces obtuvo dominancia inversa e incluso segregaciones en la F₁. Sin embargo, Miller *et al.* (1987), indicaron que el carácter alto oleico estaría controlado por un gen dominante Ol, y por un segundo gen Ml. Para que se expresara el carácter alto oleico sería necesaria la presencia del gen Ol y el gen recesivo ml en homocigosis. Fernández-Martínez *et al.* (1989) propusieron un modelo en el que el carácter alto oleico estaría controlado por tres genes dominantes y complementarios Ol₁, Ol₂ y Ol₃.

El carácter alto oleico se expresa sólo en la semilla y afecta tanto a los triacilglicéridos como a los lípidos de membrana. Cuando se compara el genotipo normal y el mutante, se observa que la composición de ácidos grasos de los lípidos de las semillas jóvenes (hasta 10 DDF) es similar en ambos. Pero cuando comienza la síntesis activa de TAGs, a partir de los 12 DDF, el contenido de linoleico se reduce drásticamente en los lípidos de las semillas mutantes. Este hecho se puede explicar suponiendo que cuando la velocidad de síntesis de lípidos es baja (en semillas jóvenes) la actividad oleato desaturasa microsomal (ODS microsomal, codificada por el gen FAD2), que existe en el mutante es suficiente para cubrir las demandas de este período, pero cuando aumenta la síntesis lipídica, en el período de desarrollo de la semilla, es insuficiente (Garcés *et al.*, 1989). Durante la etapa de síntesis y acumulación de lípidos de reserva (15-35-DDF) el mutante pierde la capacidad de

desaturar oleato, y la actividad oleato desaturasa microsomal prácticamente desaparece en las semillas mutantes a los 15 DDF, mientras que en el genotipo normal aumenta en este punto (Garcés y Mancha, 1989). La actividad oleato desaturasa se recupera en el inicio de la germinación de la semillas, lo que garantiza la síntesis posterior de ácido linolénico, que es el componente fundamental de los lípidos cloroplásticos y, por tanto, que la germinación tenga lugar de un modo similar a la del girasol normal.

La naturaleza dominante de la mutación alto oleico parece indicar que este carácter no se debe a la pérdida de funcionalidad del enzima, ya que esto implicaría una herencia recesiva (Ohlrogge et al., 1991). Parece más bien que estén alterados genes que regulan la expresión de la actividad oleato desaturasa. Quizás el alelo dominante Ol codifica para un factor que normalmente reprime la ODS microsomal a altas temperaturas en el genotipo normal, pero que en el mutante está siempre activado. Otra posibilidad es que codifique enzimas involucrados en rehacer lípidos por intercambios de acilos (Miller et al., 1987; Stymne y Stobart, 1984 a; Stymne et al., 1983). Por ejemplo, un defecto en las enzimas que controlan el intercambio de acilos entre el conjunto de acil-CoAs y la fosfatidilcolina daría lugar a un fuerte descenso en la desaturación del oleato a linoleato (Stymne et al., 1983).

Recientemente, se han clonado tres genes diferentes de la oleato desaturasa microsomal a partir de semillas de girasol en desarrollo, denominados Fad2-1, Fad2-2 y Fad2-3 (Martínez-Rivas et al., 1998). También se han medido los niveles de transcripción de estos tres genes. En el fenotipo normal, Fad2-1 aumentó su transcripción durante el desarrollo de la semilla, coincidiendo con la biosíntesis de ácidos grasos y la actividad ODS microsomal en semillas de girasol en desarrollo (Garcés et al., 1989; Garcés y Mancha, 1991). En cambio, la expresión de Fad2-2 sólo aumentó ligeramente con el desarrollo de la semilla. En el mutante alto oleico, la expresión de Fad2-1 se redujo drásticamente y sólo se observó una leve expresión en las últimas etapas del desarrollo del embrión. Por el contrario, Fad2-2 solamente se expresó levemente al principio del desarrollo y luego se reprimió. No se detectó Fad2-3 en ninguno de los fenotipos. Estos datos indican una clara correlación entre la mutación alto oleico y un descenso en los niveles de transcripción de los genes Fad2.

Sin embargo, aún no se puede explicar la necesidad de al menos, dos genes dominantes y complementarios para la expresión del carácter alto oleico (Fernández-Martínez et al., 1989), aunque la falta de expresión del gen principal, Fad2-1, podría explicar uno de ellos por la alteración de su regulador.

La composición de ácidos grasos de los lípidos de las semillas del genotipo normal está más fuertemente influenciada por la temperatura de cultivo que la de los lípidos de la semilla mutante alto oleico (Garcés et al., 1989; Fernández-Martínez et al., 1986). Semillas de este genotipo obtenidas a bajas temperaturas (21/14°C) contenían de 3-8 % de linoleato, mientras que las obtenidas a altas temperaturas (34/22°C) sólo presentaban un 0,3-0,5 % de linoleato. Entre el genotipo normal y el alto oleico la única diferencia es la composición de ácidos grasos (Tabla 2), mientras que los otros componentes son similares, ácidos grasos libres, ceras, esteroides, fosfolípidos, tocoferoles, etc. (Purdy, 1986).

Tabla 2. Composición de ácidos grasos del aceite de girasol alto oleico, comparada con la del girasol normal.

	Palmítico (16:0)	Estearico (18:0)	Oleico (18:1)	Linoleico (18:2)
Alto oleico	3,6-4,6	4,1-4,6	84,5-90,5	7,8-0,3
Normal	6,2-5,4	6,9-3,8	37,2-54,8	49,4-35,7

Tomado de Garcés et al., 1989.

La utilización del aceite de girasol alto oleico supone ventajas nutricionales y tecnológicas. Una dieta rica en ácidos grasos monoinsaturados reduce el contenido de lipoproteínas de baja densidad, LDL-colesterol, en el plasma sanguíneo (Grundy, 1986). Por el contrario, el ácido linoleico, que fue considerado como el ácido graso preferible, porque era el más efectivo para disminuir el colesterol plasmático, parece que puede aumentar la oxidación de las lipoproteínas y promover el desarrollo de arterioesclerosis. Además, grandes cantidades de este ácido pueden disminuir la concentración de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y aumentar el riesgo de piedras de colesterol en la vesícula biliar. Además, en estudios sobre el efecto de los ácidos grasos sobre la proliferación celular o sobre el sistema inmune, el ácido oleico resulta uno de los ácidos grasos más benignos (Grundy, 1994).

El aceite de girasol alto oleico presenta una mayor estabilidad frente a la oxidación que el aceite de girasol normal (Purdy, 1986). Se ha estudiado la estabilidad de los aceites de girasol normal y alto oleico frente a la oxidación, encontrando que aceites con un contenido de linoleato del 7 % tenían 60 horas de estabilidad AOM (Active Oxygen

Method), mientras que los extraídos de semillas de alto oleico con sólo 1 % de linoleato, tenían 100 horas (Purdy, 1985). Esta característica lo convierte en un producto de interés para la industria de alimentos. Así, el aceite de girasol con un contenido alto de ácido oleico es menos susceptible a la oxidación que el de composición normal, con un alto contenido en linoleato. Dobarganes *et al.* (1993) demostraron que el aceite de girasol alto oleico es muy recomendable como aceite de fritura, presentando un comportamiento muy similar al de oliva. También es interesante su uso como ingrediente en productos alimenticios infantiles, que necesitan una composición específica de ácidos grasos y un flavor suave (Fick, 1989).

4.2. Mutantes de girasol altos saturados.

En 1988, se inició un programa de mutagénesis en España con el fin de obtener mutantes de girasol con la composición de ácidos grasos modificada. Se utilizaron como agentes mutagénicos rayos-X, azida sódica y etilmetanosulfonato (EMS). Como resultado de este programa se han obtenido cinco mutantes con altos niveles de ácidos saturados en los lípidos de la semilla (Mancha *et al.*, 1994; Osorio *et al.*, 1995; Fernández-Martínez *et al.*, 1997). Tres de estos mutantes tienen altos contenidos en ácido esteárico (CAS-3, CAS-4, CAS-8) y dos en ácido palmítico uno en fondo normal alto linoleico (CAS-5) y otro en fondo alto oleico (CAS-12), (Tabla 3).

En las líneas mutantes CAS-3 y CAS-8 los elevados niveles de ácido esteárico se consiguieron a expensas del ácido oleico, mientras que en CAS-4 fue a expensas del ácido linoleico. Los altos niveles de palmítico y palmitoleico de CAS-5 y CAS-12 se obtuvieron a expensas del ácido oleico.

El control genético de estos mutantes parece complejo; el fenotipo alto palmítico está controlado por tres genes y el alto esteárico por dos genes, todos ellos recesivos (Pérez-Vich, 1998). En todos ellos se ha observado que la mutación depende del genotipo del embrión (Osorio *et al.*, 1995).

Tabla 3. Composición de ácidos grasos (moles%) de los lípidos totales de los cinco mutantes de girasol y las dos líneas control RHA-274 (fenotipo normal) y HA-OL9 (fenotipo alto oleico).

	16:0	16:1	16:2	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	22:0
Líneas control									
RHA-274	6,4 ^a	— ^b	—	4,9	30,8	56,2	—	0,3	1,0
HA-OL9	5,2	—	—	3,7	88,1	1,5	—	0,3	1,1
Líneas Alto palmítico									
CAS-5	30,2	4,3	1,5	4,2	8,0	50,1	0,4	—	1,2
CAS-12	27,8	7,6	—	1,7	56,7	4,4	—	0,3	1,3
Líneas Alto esteárico									
CAS-3	5,4	—	—	26,1	14,2	51,3	—	1,4	1,3
CAS-4	5,9	—	—	11,9	27,8	53,0	—	0,6	0,7
CAS-8	6,3	—	—	11,7	18,1	61,6	—	0,6	1,3

^aSD < 2,5% del valor medio.

^b = < 0,2%.

Tomado de Álvarez-Ortega et al., 1997.

II. LÍPIDOS DE PLANTAS.

1. Introducción.

Los lípidos son constituyentes esenciales de todas las células vegetales. Se definen según sus propiedades físicas, ya que son compuestos de estructura química muy diversa: son insolubles en agua y pueden extraerse de las células y de los tejidos mediante disolventes no polares.

Los lípidos desempeñan importantes funciones biológicas:

- Como componentes estructurales de las membranas. Las membranas actúan como barreras que delimitan tanto las células como sus compartimentos, y también tienen lugar en ellas funciones de gran importancia para la célula, como la captación de luz y las reacciones de transporte de electrones.
- Como material de reserva. Algunas especies de plantas almacenan lípidos de reserva, generalmente en semillas y frutos llamados oleaginosos, en los cuales los lípidos suponen aproximadamente el 40-60% del peso seco.
- Como cubierta protectora sobre la superficie de muchos organismos. Estos lípidos se denominan lípidos cuticulares, en las plantas constituyen una barrera hidrofóbica que impide la pérdida de agua, protege contra el ataque de patógenos y de cualquier otro tipo de estrés ambiental.
- Como componentes de la superficie celular, relacionados con el reconocimiento de las células, la especificidad de especie y la inmunidad de los tejidos. Entre estos lípidos, que tienen actividad biológica, se encuentran precursores de hormonas vegetales y vitaminas.

A veces, los lípidos aparecen combinados con otras clases de biomoléculas, mediante enlaces covalentes o enlaces débiles, por ejemplo los glucolípidos (lípidos y glúcidos) y las lipoproteínas (lípidos y proteínas), (Lehninger, 1993).

2. Clasificación.

Según la presencia o no de ácidos grasos, los lípidos se clasifican en complejos y simples. Los lípidos más abundantes en las células son los derivados de los ácidos grasos.

Dentro de los lípidos complejos se incluyen los glicéridos y fosfoglicéridos, los esfingolípidos y las ceras, que se diferencian entre sí por la estructura del alcohol al que se encuentran unidos los ácidos grasos.

Los lípidos simples no contienen ácidos grasos en su molécula, por ello se denominan también insaponificables, ya que no forman jabones (sales de ácidos grasos) por hidrólisis alcalina. Incluyen terpenos, esteroides, alcoholes grasos, hidrocarburos, etc.

Para una revisión general, ver Gunstone et al., 1994.

3. Ácidos grasos.

Los ácidos grasos son ácidos alifáticos monocarboxílicos, con una cadena hidrocarbonada larga y un grupo carboxilo terminal. Casi sin excepción los ácidos grasos naturales poseen un número par de átomos de carbono (Coultate, 1996). Difieren entre sí por la longitud de cadena, y por el número y posición de los dobles enlaces, aunque también existen algunos ácidos grasos con triples enlaces. Los ácidos grasos se clasifican en:

-Saturados: no presentan ningún doble enlace, y son moléculas lineales.

-Insaturados: tienen dobles enlaces, siendo monoinsaturados con uno solo y poliinsaturados con más de uno. Los dobles enlaces presentan casi siempre configuración cis, y cuando hay más de uno, suelen estar separados por grupos metilenos.

Existen varias nomenclaturas para nombrar los ácidos grasos:

-Sistemática: sigue las reglas adoptadas por la IUPAC, por ejemplo, el ácido oleico es el ácido cis-9-octadecenoico. Se indica la longitud de cadena (18 átomos), el número, posición y configuración de los dobles enlaces (un doble enlace de configuración cis en el carbono 9, contando desde el grupo carboxilo).

-Abreviada: el ácido graso se simboliza por dos números separados por dos puntos, por ejemplo el ácido oleico, es 18:1 Δ^9 c, o bien 18:1 n⁹. El primer número indica la longitud de la cadena, el segundo, tras los dos puntos indica el número de dobles enlaces. También

se indica, a continuación, la posición en la que se encuentra el doble enlace y la configuración cis (c) o trans (t). Se puede contar el número de átomos de carbono a partir del grupo carboxilo (Δ) o a partir del grupo metilo terminal (n ó ω). (Tabla 4).

Tabla 4. Ácidos grasos más comunes en los lípidos de reserva.

Nombre común	Nombre sistemático	Designación taquigráfica
Láurico	Dodecanoico	12:0
Mirístico	Tetradecanoico	14:0
Palmítico	Hexadecanoico	16:0
Palmitoleico	Cis-9-hexadecenoico	16:1 Δ 9c
Estearico	Octadecanoico	18:0
Oleico	Cis-9-octadecenoico	18:1 Δ 9c
Linoleico	Cis, cis-9, 12-octadecadienoico	18:2 Δ 9c, 12c
α -Linolénico	Cis, cis, cis-9, 12, 15-octadecatrienoico	18:3 Δ 9c, 12c, 15c
γ -Linolénico	Cis, cis, cis-6, 9, 12-octadecatrienoico	18:3 Δ 6c, 9c, 12c
Aráquico	Eicosanoico	20:0
Gadoleico	Cis-11-icosenoico	20:1 Δ 11c
Behénico	Docosanoico	22:0
Erúcido	Cis-13-docosenoico	22:1 Δ 13c
Lignocérico	Tetracosanoico	24:0



(Tomado de Pryde, 1979).

Los ácidos grasos son abundantes como componentes fundamentales de los lípidos complejos, pero en estado libre (no esterificados) sólo aparecen en pequeñas cantidades. Se han aislado unos 300 tipos distintos de ácidos grasos en la naturaleza, aunque los más abundantes son los que tienen entre 14 y 22 átomos de carbono (Tabla 4). Los ácidos grasos saturados más abundantes son los ácido láurico, mirístico, palmítico y estearico, y entre los insaturados los más importantes son el ácido oleico, linoleico y linolénico. Estos ácidos constituyen alrededor del 95% del total de ácidos grasos presentes en los aceites comerciales y el 89-97% de los ácidos grasos de hoja, (Harwood, 1979).

3.1. Ácidos grasos esenciales.

Algunos ácidos grasos tienen una función especial en la nutrición humana. Se ha demostrado que al someter ratas inmaduras o recién destetadas a una dieta carente de grasas, aparecen una serie de síntomas en la piel, sistema vascular, órganos reproductores y metabolismo lipídico. Pero estos síntomas desaparecen cuando se les suministra en la dieta ácido linoleico o araquidónico. En cambio, los ácidos grasos saturados y monoinsaturados no son activos en este aspecto. Por ello, se ha concluido que los mamíferos pueden sintetizar ácidos grasos saturados y monoinsaturados a partir de otros precursores, pero son incapaces de sintetizar ácido linoleico y γ -linolénico, por lo que se consideran a éstos como ácidos grasos esenciales y por tanto, deben ser tomados en la dieta. Los mamíferos los obtienen de fuentes vegetales donde son muy abundantes. Se conocen algunas de las funciones específicas que tienen estos ácidos. El ácido linoleico es un precursor necesario, para la biosíntesis del ácido araquidónico, que no se encuentra en las plantas y que actúa como precursor para la biosíntesis de prostaglandinas, (Coultate, 1996, Lehninger, 1993).

3.2. Ácidos grasos poco frecuentes.

Existen ácidos grasos con estructuras poco frecuentes, característicos de determinados grupos o especies vegetales. Presentan dobles enlaces en posiciones no corrientes, triples enlaces, ramificaciones, sustituyentes como grupos hidroxilo, epoxi, anillos de ciclopropeno, etc. Por ejemplo, el ácido ricinoleico (18:1 Δ^9 cis, Δ^{12} OH) es el ácido graso más abundante del aceite de ricino (90%), presenta un doble enlace de configuración cis en el carbono 9 y un grupo hidroxilo en el carbono 12; el ácido petroselinico (18:1 Δ^{12} cis) se encuentra en las semillas de apio, perejil y zanahorias; el ácido erúxico (22:1 Δ^{13} cis), se halla en los aceites de las semillas de las especies del género *Brassica*; los ácidos grasos que tienen en su estructura anillos ciclopropeno se encuentran en bacterias principalmente, aunque también aparecen en el aceite de la semilla de algodón, (Coultate, 1996). En las lamelas del cloroplasto y en ciertas semillas de la familia *Compositae*, aparece un ácido graso insaturado de configuración trans, el ácido trans-3-hexadecenoico (Harwood, 1979).

3.3. Propiedades físicas y químicas.

Los ácidos grasos saturados e insaturados tienen grandes diferencias en sus configuraciones estructurales. En los ácidos saturados, la cadena hidrocarbonada puede tener un número infinito de conformaciones, ya que cada uno de los enlaces sencillos del esqueleto de carbono tiene libertad de rotación. En cambio, los ácidos insaturados presentan uno o más quiebros rígidos en sus cadenas hidrocarbonadas, debido a la incapacidad de rotación de los enlaces dobles. La inserción de un doble enlace de configuración cis tiene un efecto drástico en la conformación de la molécula, ya que introduce un ángulo de 42° en la cadena alifática, mientras que la configuración trans se parece a la forma extendida de las cadenas saturadas. Esto provoca que los insaturados cis posean puntos de fusión más bajos que los saturados con la misma longitud de cadena. En cambio, si es un doble enlace de configuración trans, su introducción tiene poco efecto sobre la conformación de la cadena y sobre la temperatura de fusión. Esto hace que los ácidos grasos trans tengan propiedades físicas parecidas a las de los saturados.

Los ácidos grasos insaturados dan lugar a reacciones de adición a los dobles enlaces. Por ejemplo, la reacción con halógenos (yodo, bromo) puede proporcionar información sobre el número de dobles enlaces de una muestra (Índice de yodo). Los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados se hidrogenan fácilmente en presencia de hidrógeno y de un catalizador adecuado. Esta propiedad se aprovecha en la industria para obtener grasas plásticas para margarinas. En el proceso de fabricación de este producto, se parte de aceites líquidos vegetales o de pescado, después del proceso de hidrogenación se consigue una grasa de consistencia semejante a la mantequilla, en la que se ha reducido el grado de insaturación de los ácidos grasos. Al mismo tiempo que se produce la hidrogenación, tienen lugar reacciones de isomerización cis-trans, y migraciones de dobles enlaces que dan lugar a la aparición de ácidos grasos no naturales.

Otras reacciones interesantes son las reacciones de oxidación de las grasas, que son responsables del enranciamiento y, en el caso de grasas calentadas, a la formación de compuestos polares y polímeros, a expensas de los ácidos insaturados. En las grasas lácteas, el enranciamiento se debe normalmente a la hidrólisis de los triacilglicéridos por microorganismos, que da lugar a la aparición de ácidos grasos de cadena corta, responsables del mal olor. En otras grasas y aceites, el enranciamiento se debe a las reacciones de autooxidación de los ácidos grasos insaturados.

4. Lípidos complejos.

4.1. Glicéridos.

Los glicéridos o grasas neutras, son ésteres de ácidos grasos y del glicerol, e incluyen a los **monoacilglicéridos (MAG)**, **diacilglicéridos (DAG)** y **triacilglicéridos (TAG)**, (Figura3).

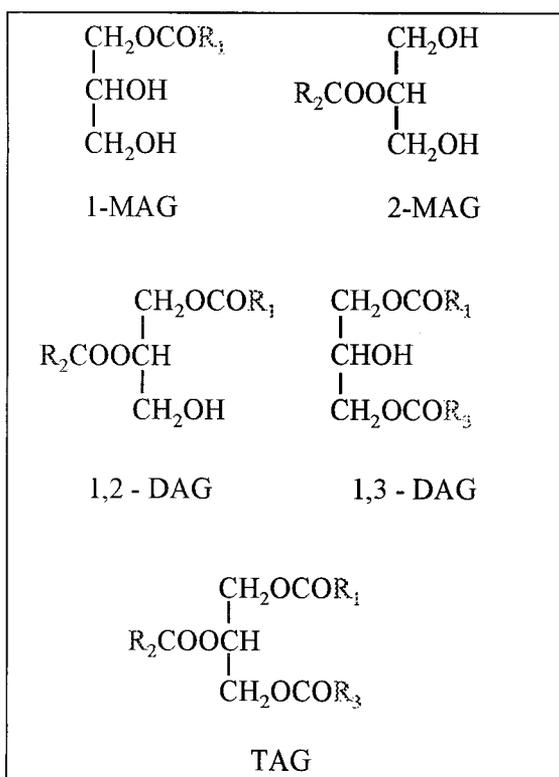


Figura 3. Glicéridos.

Los triacilglicéridos son los principales constituyentes de las grasas naturales y los aceites, mientras que los diacilglicéridos son importantes intermediarios del metabolismo lipídico (Lehninger, 1993).

El glicerol es ópticamente inactivo, pero su átomo de carbono 2 se convierte en asimétrico cuando los sustituyentes en las posiciones sn-1 y sn-3 son diferentes.

En los MAG, hay un solo ácido graso esterificado a la molécula de glicerol, en las posiciones sn-1, sn-2 o sn-3. Existen, por tanto, tres formas isoméricas. Los 1(3)-MAG y 2-MAG, se separan en CCF sobre gel de sílice-ácido bórico. En cambio, los monoglicéridos 1 y 3 no se separan, considerándose como semejantes. A los MAG no se le ha asignado, hasta hace poco, una función metabólica definida en los vegetales (Stobart et al., 1997). Los DAG tienen esterificadas dos posiciones (1,2-DAG, 2,3-DAG, 1,3-DAG). Los 1,2-DAG, de configuración L, se han descrito como importantes intermediarios en el metabolismo lipídico, por ejemplo en la biosíntesis de TAG. Los 2,3-DAG (de

configuración D) aparecen sólo en cantidades traza, y no se pueden separar analíticamente de los anteriores por los métodos cromatográficos habituales (Mancha, 1975), por otro lado no se consideran intermediarios del metabolismo lipídico. Los 1,3-DAG, sólo se encuentran en cantidades traza y se separan perfectamente de los 1,2-DAG, mediante CCF. Generalmente, su presencia se explica como resultado de procesos de hidrólisis de los triacilglicéridos, y no se les han asignado, hasta ahora, funciones bioquímicas.

En los TAG, se encuentran esterificadas las tres posiciones. Cuando tienen un solo tipo de ácido graso, se denominan triacilglicéridos simples, si contienen dos o más ácidos diferentes, se llaman triacilglicéridos mixtos o compuestos. Pueden existir muchas formas isoméricas. Por otro lado, también existen glicéridos con cuatro o más ácidos grasos. Son triacilglicéridos que tienen ácidos grasos con grupos hidroxilos, los cuales se encuentran esterificados con otros ácidos grasos.

La mayoría de las grasas naturales son mezclas complejas de triacilglicéridos simples y compuestos. Los organismos vivos consiguen el perfil adecuado de propiedades físicas de los lípidos de las membranas y los de reserva, mediante una mezcla apropiada de diferentes especies moleculares, y no a base de una sola especie molecular que presente esas características, como ocurre con las proteínas y los carbohidratos (Coultate, 1996). Existe una diferencia general entre las grasas animales y vegetales, éstas últimas son más ricas en ácidos grasos insaturados y los saturados raramente se encuentran en la posición sn-2.

Se han realizado muchos intentos para descubrir las reglas fundamentales que determinan el modo de distribución de los diferentes ácidos grasos en los triacilglicéridos naturales, pero todavía no se pueden formular generalizaciones simples y que lo abarquen todo. Se está aceptando la teoría de distribución “al azar en 1-3- al azar en 2”, que consiste en considerar iguales las posiciones 1 y 3, y que el ácido graso que ocupa una determinada posición, en un triacilglicérido concreto, no guarda ninguna relación con los ácidos grasos situados en las otras posiciones. Es decir, que los ácidos grasos están distribuidos al azar unos respecto a otros, y por tanto, cada posición tiene su propia composición particular de ácidos grasos. En esta teoría se basa la determinación de la distribución posicional de ácidos grasos y de las especies moleculares de triacilglicéridos tras la hidrólisis con lipasa pancreática. Este enzima cataliza específicamente la hidrólisis de los enlaces éster 1 y 3 de los triacilglicéridos, liberando los ácidos grasos de esas posiciones y los 2-monoglicéridos. Sin embargo, existe la posibilidad de determinar la composición de ácidos grasos en las

tres posiciones de la molécula de glicerol mediante análisis estereoespecífico (Christie, 1982). De este modo se ha podido comprobar que las posiciones 1 y 3 no son completamente equivalentes (Gunstone, 1994; Coultate, 1996).

Los glicéridos son solubles en disolventes apolares como éter, cloroformo y benceno, y su densidad es menor que la del agua. Experimentan hidrólisis cuando se hierven con ácidos o bases, o bien por la acción de lipasas. La hidrólisis alcalina, también llamada saponificación, da lugar a una mezcla de jabones y glicerina.

Todos los triacilglicéridos son relativamente insolubles en el agua, y no tienden a formar micelas muy dispersas, en cambio los diacilglicéridos y monoacilglicéridos tienen polaridad apreciable, debido a sus grupos hidroxilos libres, y por ello forman micelas. Los puntos de fusión de los triacilglicéridos puros dependen de la longitud de cadena y del grado de insaturación de los ácidos grasos que los forman. Como las grasas naturales son mezclas, su comportamiento térmico es bastante complejo, así una grasa no tiene un punto de fusión determinado, sino un “intervalo de fusión”. A temperaturas por debajo de este intervalo, todos los glicéridos componentes estarán por debajo de su punto de fusión, por lo que la grasa estará completamente sólida. Dentro del intervalo, los triacilglicéridos de punto de fusión más bajo, los de menor peso molecular o los más insaturados, fundirán y algunos de los restantes triacilglicéridos, aún sólidos, se pueden disolver en esta fracción líquida. A medida que la temperatura aumenta, disminuye la proporción de glicéridos sólidos hasta que, a la temperatura establecida de forma arbitraria como punto de fusión, ya no queda grasa sólida.

Por otro lado, los triacilglicéridos son polimórficos, es decir, pueden presentarse con diferentes organizaciones cristalinas, cada una con su propio punto de fusión característico, su patrón de cristalografía de rayos X y su espectro infrarrojo. Las tres formas principales se llaman, α , β y β' . En las tres formas, los ácidos grasos 1 y 3, se orientan en dirección opuesta a la del ácido graso que ocupa la posición 2. En la forma α , los cristales son frágiles plaquetas de unos 5 μm de tamaño. Las formas β' están formadas por cristales de menor tamaño y en forma de aguja, mientras que las formas β están formadas por cristales de mayor tamaño, unos 100 μm , que se arraciman dando lugar a texturas bastas. Los hábitos de cristalización tienen una gran importancia en la textura de las grasas plásticas y por lo tanto en sus aplicaciones tecnológicas, (Coultate, 1996).

4.2. Éteres alquílicos de los acilglicéridos.

Son un conjunto de compuestos relacionados con los glicerolípidos, menos abundantes pero muy difundidos. Contienen dos ácidos grasos esterificados a dos de los grupos hidroxilos de la glicerina, el otro se encuentra unido mediante un enlace éter a una cadena larga (un resto alquilo o alquenilo). Son difíciles de separar de los triacilglicéridos en los procesos analíticos.

4.3. Glucosilacilglicéridos.

Los glucosildiacylglicéridos o glucolípidos contienen un azúcar unido mediante enlace glucosídico al grupo hidroxilo 3 no esterificado de los diacylglicéridos. Aparecen en plantas superiores, bacterias y en el tejido neural de los vertebrados. Destacan el **monogalactosildiacylglicérido (MGDG)** y el **digalactosildiacylglicérido (DGDG)**, que son abundantes en las membranas cloroplásticas y plastidiales. En estos mismos orgánulos se ha encontrado, en las plantas superiores, un sulfolípidos que contiene una molécula de azúcar, el **diacylsulfoquinovosilglicerol (DSQG)**.

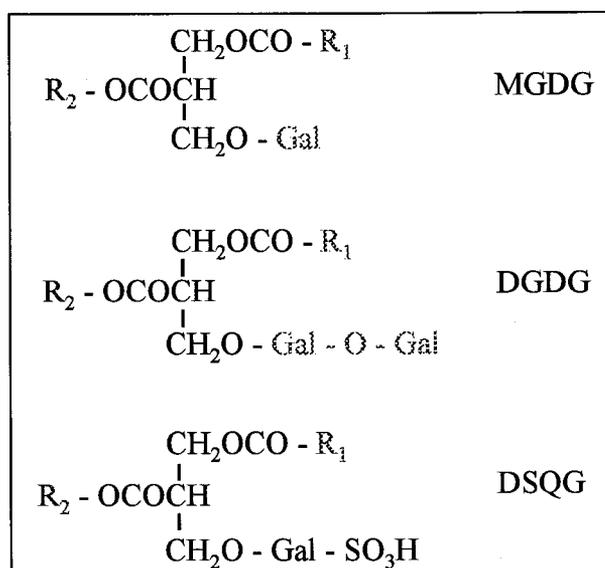


Figura 4. Glucosilacilglicéridos

4.4. Fosfoglicéridos.

Las membranas de todos los sistemas vivos tanto de células como orgánulos (mitocondrias, vacuolas, cloroplastos, retículo endoplasmático, etc.), están constituidas por una estructura, esencialmente idéntica en todas, de proteínas y lípidos (Coulate, 1996). Los fosfoglicéridos o fosfolípidos, tienen carácter anfipático, y son componentes característicos de estas membranas celulares. En otras localizaciones celulares y en grasas y aceites sólo aparecen en pequeñas cantidades. En los fosfoglicéridos, los átomos de carbono 1 y 2 se encuentran esterificados a ácidos grasos, mientras que el grupo hidroxilo en posición 3 se encuentra esterificado por el ácido fosfórico. Además, el ácido fosfórico tiene esterificado un alcohol representado por X, que constituye un grupo de cabeza polar. Los distintos fosfolípidos se diferencian en el tamaño, forma y carga eléctrica de sus grupos de cabeza polares.

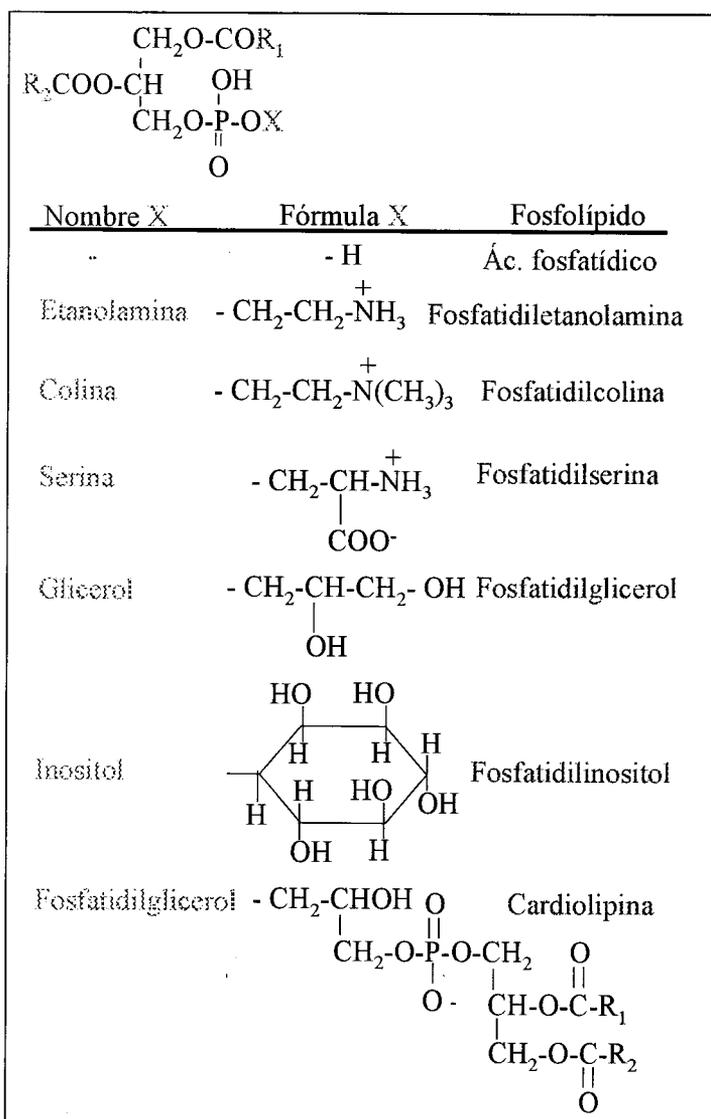


Figura 5. Estructura de los principales fosfolípidos.

R= grupos acilos. X= grupo polar.

El compuesto primario de los fosfoglicéridos es el **ácido fosfatídico (PA)**, que tiene un grupo de cabeza no polar. Se encuentra en pequeñas cantidades en las células, pero es un intermediario importante en la biosíntesis de los fosfolípidos. Los más abundantes, en plantas superiores y animales, son la **fosfatidilcolina (PC)** y la **fosfatidiletanolamina (PE)**, que tienen como grupos de cabeza los aminoalcoholes colina y etanolamina. Estos fosfolípidos son componentes principales de las membranas de células animales. Otros fosfolípidos importantes son, la **fosfatidilserina (PS)**, cuyo grupo polar es el aminoácido L-serina, el **fosfatidilinositol (PI)**, que lleva un grupo inositol, y el **fosfatidilglicerol (PG)**, cuyo grupo de cabeza polar es una molécula de glicerina, este último se encuentra frecuentemente en las membranas cloroplásticas (Hitchcock y Nichols, 1971).

El lípido más complejo es la **cardiolipina** o difosfatidilglicerol, que está constituido por una molécula de fosfatidilglicerol en la que el grupo 3'-hidroxilo de la segunda molécula de glicerina se encuentra esterificado por el grupo fosfato de una molécula de ácido fosfatídico. El esqueleto de cardiolipina contiene tres moléculas de glicerina unidas mediante dos puentes fosfodiéster; los dos grupos hidroxilo de las gliceras externas se hallan esterificados por ácidos grasos. Es abundante en las membranas bacterianas y en la membrana interior de las mitocondrias.

Los fosfoglicéridos son solubles en muchos disolventes no polares que contengan cierta cantidad de agua, y se extraen de las células y tejidos mediante mezclas de cloroformo-metanol o hexano-isopropanol. En agua no forman disoluciones verdaderas (excepto en cantidades muy pequeñas) sino micelas dispersas en el sistema acuoso.

Una hidrólisis alcalina suave de los fosfoglicéridos produce jabones de los ácidos grasos, pero deja inalterado el esqueleto de la molécula, constituido por la glicerina-ácido fosfórico-alcohol. Cuando la hidrólisis se realiza con álcalis concentrados, se liberan los ácidos grasos y el alcohol de cabeza. La eliminación de un ácido graso de un fosfolípido, origina un **lisofosfoglicérido**. Éstos son intermediarios en el metabolismo de los fosfoglicéridos, y sólo aparecen en cantidades traza.

La hidrólisis de los fosfoglicéridos también se puede hacer, en condiciones fisiológicas, con fosfolipasas específicas. Las fosfolipasas, A₁, A₂, C y D, tienen alta regio y estereoselectividad, (Evstigneeva, 1993) (Figura 6).

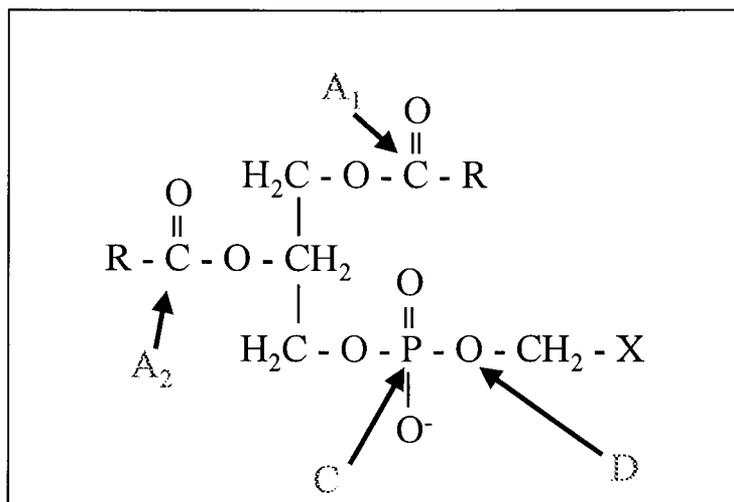


Figura 6. Hidrólisis enzimática catalizada por 4 tipos de fosfolipasas que reaccionan con glicerofosfolípidos (A₁, A₂, C y D).

Fosfolipasa A₁: cataliza la rotura hidrolítica de la molécula de acilo en posición sn-1.

Fosfolipasa A₂: cataliza la liberación del grupo acilo en posición sn-2. Hidroliza fosfolípidos naturales tales como lecitinas (PC), cefalinas (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG) y sus derivados aminoácidos. Es altamente estereoespecífica, hidrolizando sólo los derivados 3-sn-glicerofosfatos de configuración L. Las estructuras de las moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas no parecen tener ningún efecto en la especificidad del enzima, pero afectan a la velocidad de hidrólisis.

Ambas actividades enzimáticas se encuentran en una amplia variedad de células y tejidos, y son probablemente ubiquas (Van den Bosh et al., 1990). La actividad fosfolipasa A₂ es típica de tejidos animales (es muy alta en el veneno de serpientes, abejas, etc.). Recientemente, ha sido descrita en semilla de ricino (Stahl et al., 1995).

Fosfolipasa C: hidroliza el enlace fosfato de la molécula de glicerol, dando lugar a un diacilglicérido y un compuesto fosforilhidroxibase.

Fosfolipasa D: realiza la hidrólisis enzimática del enlace entre el fosfato y la base, produciendo ácido fosfatídico.

Las fosfolipasas se han encontrado en bacterias, células de plantas y animales. Participan en la producción de metabolitos activos fisiológicamente y en procesos tales como transducción de señales en membranas (Pryde, 1985).

4.5. Esfingolípidos.

Son lípidos complejos cuyo esqueleto está constituido por la esfingosina o una base relacionada. Son componentes importantes en las células animales y vegetales. Pero en las grasas de reserva sólo se encuentran en cantidades traza.

Todos los esfingolípidos contienen tres componentes básicos característicos: un ácido graso, una moléculas de esfingosina o de uno de sus derivados y un grupo de cabeza polar.

Los esfingolípidos más abundantes en los tejidos animales superiores son las esfingomielinas, que contienen fosforiletanolamina o fosforilcolina como grupos de cabeza polar. Otros esfingolípidos contienen como grupos de cabeza polar, uno o más restos de azúcar neutros, y se denominan glucoesfingolípidos neutros. Aparecen en el sistema nervioso y en el cerebro, y en menores cantidades en los tejidos no neurales de los animales. Otro grupo son los gangliósidos, que en sus grupos de cabeza polisacáridicos contienen uno o más restos del ácido siálico. Son abundantes en el cerebro y en otros tejidos nerviosos.

4.6. Ceras.

Son ésteres de ácidos grasos de cadena larga con alcoholes grasos monohidroxílicos o con esteroides. Son insolubles en el agua y forman cubiertas protectoras de la piel, pelo y plumas, de las hojas y frutos de las plantas superiores y del exoesqueleto de muchos insectos.

5. Lípidos simples.

Los lípidos simples no contienen ácidos grasos en sus moléculas y por tanto, no forman jabones por hidrólisis alcalina, forman parte de la fracción insaponificable.

Se encuentran en las células y tejidos en menor cantidad que los lípidos complejos, pero algunos de ellos tienen una importante actividad biológica, como las vitaminas, hormonas y otras biomoléculas especializadas.

5.1. Terpenos.

Están constituidos por unidades múltiples del isopreno, un hidrocarburo de cinco átomos de carbono. En los vegetales se han identificado muchos terpenos, algunos responsables de olores y sabores característicos, y componentes principales de los aceites esenciales. Los carotenoides son terpenos superiores, el β -caroteno es un precursor de la vitamina A. Entre los terpenos más importantes se encuentran miembros del grupo de vitaminas liposolubles: las vitaminas A, E y K. Otro grupo de compuestos terpenoides actúan como coenzimas, como la ubiquinona o coenzima Q, que funciona como transportadora de hidrógeno en las mitocondrias y las plastoquinonas que se encuentran en los cloroplastos y actúan en la fotosíntesis.

5.2. Esteroides.

Todos los esteroides derivan del escualeno, un hidrocarburo terpénico lineal que cicla con facilidad. De fuentes naturales se han aislado muchos esteroides diferentes, cada uno con una función característica. Destacan el lanosterol, precursor del colesterol en los tejidos animales y el propio colesterol. Forman parte de una subfamilia de esteroides llamados esterol, que son alcoholes esteroides. Se pueden encontrar en forma de alcoholes libres o esterificados. El colesterol aparece sólo raramente en las plantas superiores, las cuales contienen otros tipos de esterol, llamados fitoesterol, cuyo componente principal es el β -sitosterol. Los esterol de hongos y levaduras se llaman micosterol; en las bacterias no aparecen.

5.3. Prostaglandinas.

Son una familia de derivados de ácidos grasos que tienen actividad biológica como hormonas o reguladores del metabolismo. Todas las prostaglandinas naturales derivan biológicamente de la ciclación de ácidos grasos insaturados de 20 átomos de carbono, como el ácido araquidónico, que procede a su vez del ácido graso esencial ácido linoleico, (Lehninger, 1993).

III. BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS EN PLANTAS.

La biosíntesis de ácidos grasos es una ruta metabólica primaria, se encuentra en todas las células de las plantas y es esencial para su crecimiento. Los inhibidores de la biosíntesis de ácidos grasos son letales para las células, por lo que no se han podido conseguir mutaciones que bloqueen esta ruta (Ohlrogge y Browse, 1995).

La síntesis de novo de los ácidos grasos ocurre en todos los tejidos vegetales, y es muy importante en los de reserva de semillas y algunos frutos y en los tejidos fotosintéticos de hojas. Los orgánulos implicados son los plastidios no verdes y los cloroplastos. En cambio, la biosíntesis de ácidos grasos en animales y hongos, ocurre principalmente en el citosol. La localización plastidial en plantas, implica que deben existir mecanismos de exportación a otros lugares de la célula y de control en la producción y exportación de los ácidos grasos del plastidio. Las siguientes etapas de alargamiento y otras modificaciones ocurren en el retículo endoplasmático. La síntesis de novo de los ácidos grasos tiene lugar mediante la acción combinada de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la ácido graso sintetasa (FAS) (Figura 7).

1. Sustratos para la síntesis de ácidos grasos.

Todos los átomos de carbono de los ácidos grasos derivan del acetil-CoA. En los cloroplastos, la concentración de acetil-CoA es sólo suficiente para cubrir las necesidades de síntesis por unos pocos segundos. Por otro lado, el conjunto de acetil-CoA permanece relativamente constante, incluso cuando las velocidades de síntesis de ácidos grasos son elevadas, por ejemplo, en luz. Por tanto, debe haber un sistema en los plastidios que genere rápidamente acetil-CoA para la producción de ácidos grasos, que podría ocurrir a través de la acción de una piruvato dehidrogenasa plastidial (PDH). Las actividades PDH, aunque son altas en los plastidios no verdes, en los cloroplastos parecen insuficientes para cubrir la síntesis de novo. Por ello, se han sugerido otras rutas alternativas, como la producción de acetil-CoA por una PDH mitocondrial, seguida por el transporte del acetato libre al plastidio donde se activa a acetil-CoA por la acetil-CoA sintetasa, que tiene una actividad de 5 a 15 veces superior que la velocidad de síntesis in vivo de los ácidos grasos. También se han propuesto como precursores del conjunto de acetil-CoA plastidial en semillas oleaginosas, el malato citosólico y la glucosa-3-fosfato (Ohlrogge y Browse, 1995).

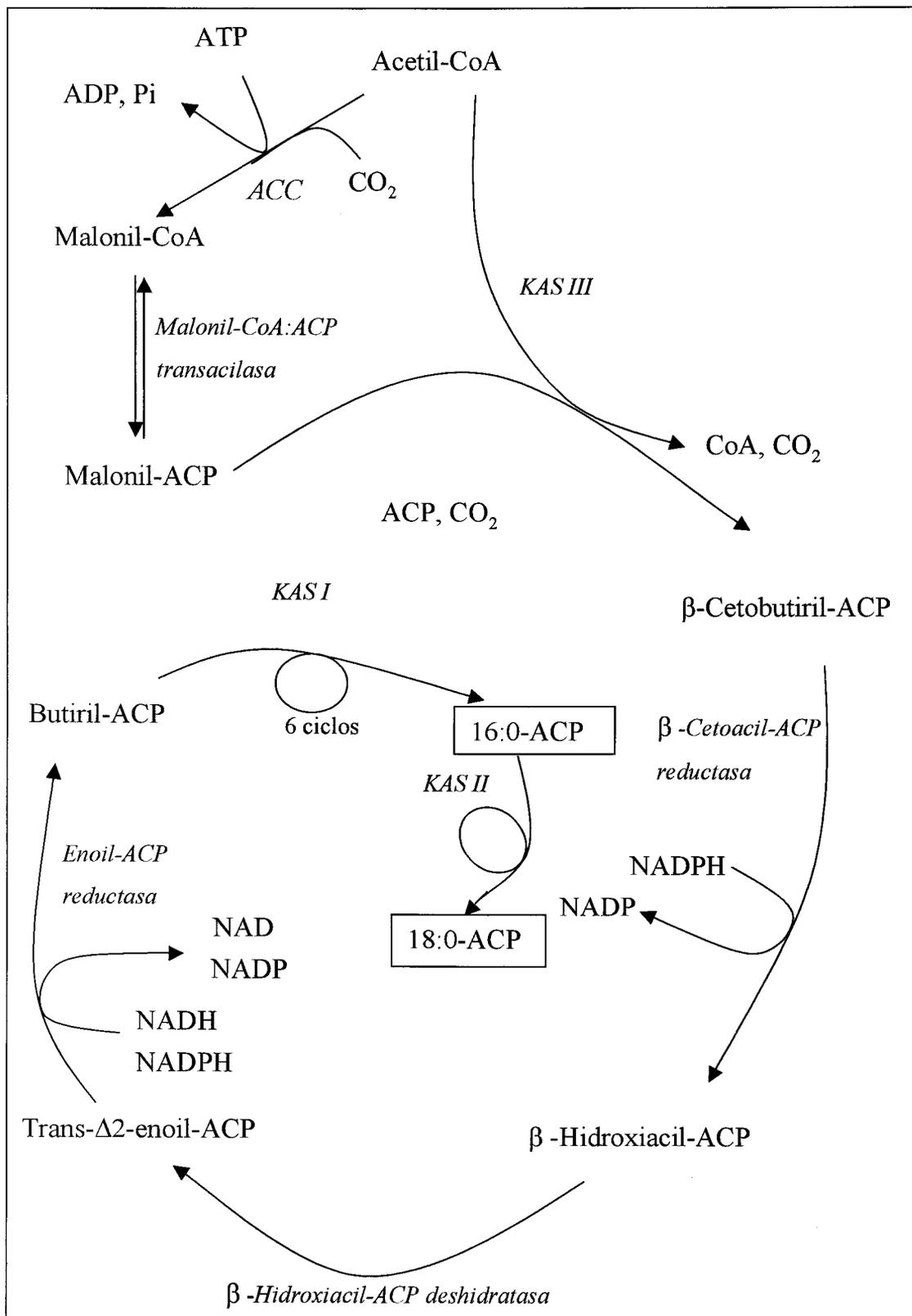
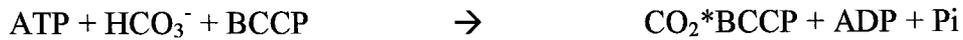


Figura 7. Biosíntesis de ácidos grasos en plantas.

2. Estructura y función de la Acetil-CoA Carboxilasa.

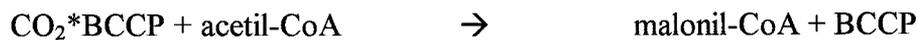
El enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC) cataliza el primer paso de la biosíntesis de ácidos grasos, es decir, la formación de malonil-CoA a partir de acetil-CoA y CO₂.

La reacción de carboxilación ocurre en dos etapas. En la primera, que es dependiente de ATP, el CO₂ (de HCO₃⁻) es transferido por la biotina carboxilasa al nitrógeno de un grupo prostético de la biotina. De esta manera, la biotina de la BCCP es carboxilada.



Biotina carboxilasa

La segunda reacción está catalizada por la carboxiltransferasa; el CO₂ activado es transferido de la biotina al acetil-CoA para formar malonil-CoA.



Carboxiltransferasa

Hay dos tipos de ACCs, un complejo multienzimático y proteínas multifuncionales (Harwood, 1996). En el primer tipo de organización, llamado procariota, la ACC consiste en distintas subunidades separadas que forman un complejo de unos 700 kDa (Ohlrogge y Browse, 1995). El enzima de la *E. coli* consiste en 4 proteínas separadas: una biotina carboxilasa, una biotina transportadora de carboxilos (BCCP), una carboxiltransferasa y una cuarta proteína que podría tener un papel de regulación. El segundo tipo de organización, llamado eucariota, consiste en un polipéptido multifuncional que contiene los 3 componentes principales de la ACC (biotina carboxilasa, BCCP, carboxiltransferasa). Este polipéptido multifuncional es sensible a distintos herbicidas como el ácido ariloxifenoxipropiónico y el ciclohexano-1,3-diona, que no tienen efecto sobre el complejo multienzimático de la ACC.

En plantas se encuentran los dos tipos de organización, dependiendo de la localización subcelular y del tipo de planta. Muchas monocotiledóneas y dicotiledóneas coinciden en la presencia y localización de los dos tipos de ACCs.

En las dicotiledóneas aparecen los dos tipos de ACC. La forma procariota se encuentra en los plastidios, mientras que la forma eucariota está en el citosol. La isoenzima plastidial de las ACCs está involucrada en producir malonil-CoA para la síntesis de novo. Parece

necesario un segundo isoenzima de ACC en el citosol para suministrar malonil-CoA para una serie de rutas metabólicas, que incluyen la elongación de ácidos grasos para la producción de lípidos cuticulares y la biosíntesis de flavonoides. Sin embargo, en monocotiledóneas como las Gramíneas, las isoenzimas plastidial y citosólica son polipéptidos multifuncionales. Esto explicaría la acción, sobre las monocotiledóneas, de herbicidas específicos que inhiben solamente la forma eucariota del enzima. Aunque ambas formas eucariotas (citosólica y plastidial) de la ACC son inhibidas por estos herbicidas, la forma plastidial en las Gramíneas es mucho más sensible que la citosólica. Coincide con el hecho de que la ruta biosintética de ácidos grasos en el plastidio es más importante para el crecimiento que las rutas secundarias que dependen de las ACCs citosólicas.

En animales, hongos, bacterias y plantas, la ACC es un enzima regulador, que controla, al menos en parte, la velocidad de síntesis de los ácidos grasos. En hojas de espinaca se ha descrito la regulación luz/oscuridad de la ACC. Además, en células en suspensión de tabaco, se ha descrito inhibición por producto del malonil-CoA. La ACC no es el único enzima regulador en la biosíntesis de ácidos grasos, por ejemplo los enzimas de condensación, sobre todo, la β -cetoacil-ACP sintasa II (KAS II) también son puntos de control, (Harwood, 1996; Ohlrogge y Browse, 1995).

3. Ruta de síntesis de los ácidos grasos.

Tanto en los organismos procariotas como en los eucariotas, la síntesis de ácidos grasos hasta una longitud de cadena de 16-18 átomos de carbono está catalizada por un complejo multienzimático denominado complejo ácido graso sintetasa (FAS).

3.1. Complejo Ácido Graso Sintetasa.

Mientras que en hongos, animales y algunas bacterias, este complejo no es disociable y está localizado en el citosol, en las plantas y en la mayoría de las bacterias, los enzimas individuales son disociables y se localizan en el estroma del plastidio (Ohlrogge y Browse, 1995).

Existen pues, dos tipos de ácido graso sintetasa. El Tipo I, consiste en un sistema que tiene todos sus componentes en una o dos cadenas polipeptídicas, se encuentra en levaduras ($\alpha 6\beta 6$) y animales ($\alpha 2$). El Tipo II es un sistema en el que los componentes son cadenas polipeptídicas separadas, no asociadas, y se encuentra en células procariotas como *E. coli*. La ácido graso sintetasa de plantas es un complejo multienzimático de Tipo II que, en muchos aspectos, presenta similitudes con la sintetasa de *E. coli*, (Harwood, 1996).

En 1982, 4 laboratorios independientes publicaron la separación de los distintos componentes de la FAS, en aguacate (Caughey y Kekwick, 1982), cebada (Hoj y Svedson, 1983), cultivos en suspensión de perejil (Schulz et al., 1982), cártamo y cloroplastos de espinaca (Shimakata y Stumpf, 1982).

Los ácidos grasos saturados de longitud de cadena hasta 18 átomos de carbono son sintetizados por este complejo enzimático, a partir de acetil-CoA y del malonil-CoA producido por la ACC. La obtención de los ácidos palmítico y esteárico tiene lugar mediante un conjunto de reacciones cíclicas, en las que se va añadiendo cada vez dos átomos de carbono. Los dos primeros átomos de carbono proceden directamente del acetil-CoA y los demás del malonil-CoA tras su conversión en malonil-ACP. La elongación de palmítico a esteárico presenta algunas peculiaridades.

Antes de entrar en la ruta biosintética, el grupo malonil es transferido del CoA a una proteína llamada ACP (proteína transportadora de acilos). Desde este momento, todas las reacciones de la ruta involucran al ACP, hasta que los ácidos grasos producidos son transferidos a glicerolípidos o exportados al citosol.

3.1.1. Proteína transportadora de acilos (ACP).

La ACP es una pequeña proteína (9kDa) ácida y termoestable. Contiene como grupo prostético un resto de fosfopanteteína, por el cual se une la cadena de acilo en crecimiento, formando un enlace tioéster. La ACP es un componente relativamente abundante de la ácido graso sintetasa, ya que es necesario para formar los acil-ACPs (revisión en Slabas y Fawcett, 1992).

La ACP fue la primera proteína del metabolismo lipídico de plantas que se purificó a homogeneidad (Simoni et al., 1967) y la primera que se clonó (Ohlrogge et al., 1991).

La presencia de acil-ACPs en distintos tejidos vegetales fue demostrada experimentalmente por Sánchez y Mancha (1980). En semillas en desarrollo de colza se

midió el contenido de ACP, para determinar si se relaciona con la deposición de lípidos de reserva y para encontrar una etapa en la cual se pudiera purificar ACP de semillas (Slabas y Fawcett, 1992). El resultado fue que la actividad ACP sintetasa aparece justo antes del comienzo de la biosíntesis de los lípidos de reserva. Esto indica la posible regulación de la expresión de la actividad ACP sintetasa de forma temporal, dependiendo del tejido vegetal en que se exprese. La ACP ha sido localizada inmunológicamente en mitocondrias de plantas, lo que indica su participación en otras funciones metabólicas.

Malonil-CoA:ACP transacilasa.



3.1.2. Reacciones de la FAS.

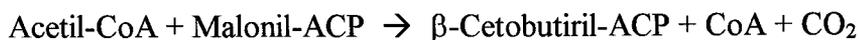
Después de la transferencia del malonato al ACP, el malonil-ACP entra en una serie de reacciones de condensación que dan origen a la formación del ácido graso. Estas reacciones dan lugar a uniones carbono-carbono y a la liberación de CO₂, que hace que el proceso sea irreversible.

Son necesarias al menos 3 enzimas de condensación β -cetoacil-ACP sintetasas para obtener un ácido graso de 18 átomos de carbono. Así, se pueden definir tres tipos de complejos FAS (FAS I, FAS II y FAS III) en función de la β -cetoacil-ACP sintetasa (KAS I, KAS II y KAS III), siendo el resto de los enzimas los mismos. La primera condensación se lleva a cabo entre el acetil-CoA y el malonil-ACP, de tal modo que los dos primeros átomos de carbono proceden del acetil-CoA. La reacción está catalizada por la **β -cetoacil-ACP sintetasa III (KAS III)** (Jaworski et al., 1989). Se forma un producto de 4 átomos de carbono, el β -cetobutilil-ACP (reacción 1).

Después, el grupo carbonilo es reducido por una **β -cetoacil-ACP reductasa**, que usa NADPH como donador de electrones (reacción 2). A continuación, ocurre una reacción de deshidratación por una **β -hidroxiacil-ACP deshidratasa** (reacción 3) que da origen a la formación de un doble enlace trans. Finalmente, el ciclo termina por la acción de la **enoil-ACP reductasa**, que usa NADPH o NADH para reducir el doble enlace y formar así el butiril-ACP (reacción 4). La acción combinada de estas 4 reacciones permite aumentar la cadena grasa en 2 átomos de carbono, mientras se encuentra unida al ACP como tioéster.

El enzima de condensación **β -cetoacil-ACP sintetasa I (KAS I)**, es la responsable de condensaciones sucesivas produciendo acilos de longitud de cadena de hasta 16 átomos de carbono (reacción 5). Por último, la elongación de 16 átomos de carbono (palmitil-ACP) a 18 átomos de carbono (estearil-ACP) es catalizada por la **β -cetoestearil-ACP sintetasa II (KAS II)** (reacción 6).

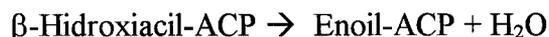
1. *β -Cetoacil-ACP sintasa III (KAS III).*



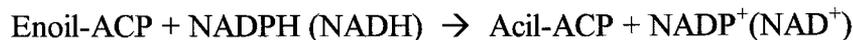
2. *β -Cetoacil-ACP reductasa.*



3. *β -Hidroxiacil-ACP deshidratasa.*



4. *Enoil-ACP reductasa.*

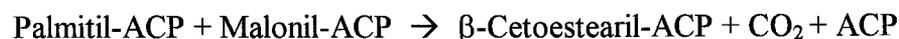


5. *β -Cetoacil-ACP sintasa I (KAS I).*



(Se repiten las reacciones 2 a 4, alargando la cadena hasta 16:0-ACP).

6. *β -Cetoacil-ACP sintasa II (KAS II).*



(Se repiten las reacciones 2 a 4, para dar 18:0-ACP).

Las enzimas de condensación se diferencian en su distinta sensibilidad frente a la temperatura y al antibiótico cerulenina. La cerulenina es un inhibidor muy efectivo de la KAS I, tiene menos efecto sobre la KAS II, y ninguno sobre la KAS III (Jaworski et al., 1989; Slabas y Fawcett, 1992). En un principio se creía que, tanto la primera reacción de condensación como las condensaciones posteriores para formar la cadena de 16 átomos de carbono, estaban catalizadas por la KAS I involucrando al acetil-ACP y al malonil-ACP, para dar lugar al butiril-ACP. Pero en 1987, se descubrió en *E. coli* una nueva enzima de condensación insensible a cerulenina, que usa directamente acetil-CoA y no acetil-ACP (Jackowski y Rock, 1987). Este enzima se denominó KAS III. Presenta mayor actividad que la acetil-CoA:ACP transacilasa, y se considera que es la que cataliza la primera reacción de condensación (Slabas y Fawcett, 1992). La enzima KAS I sería la responsable de las reacciones de condensación del resto del ciclo, hasta 16 átomos de carbono y la KAS II del alargamiento a 18 átomos de carbono

4. Formación del ácido oleico. Estearoil-ACP desaturasa.

El ácido oleico se forma a partir del ácido esteárico, mediante la acción del enzima soluble **estearil-ACP desaturasa** ($\Delta 9$ -desaturasa), que introduce el doble enlace en posición $\Delta 9$, (Figura 8). La estearil-ACP desaturasa es una desaturasa de función mixta, que necesita poder reductor (NADPH) como donador de electrones y ferredoxina como transportador, el O_2 actúa como co-sustrato y se forma H_2O . El sustrato de la reacción es el estearil-ACP y el producto final el oleil-ACP (Shine et al., 1976).

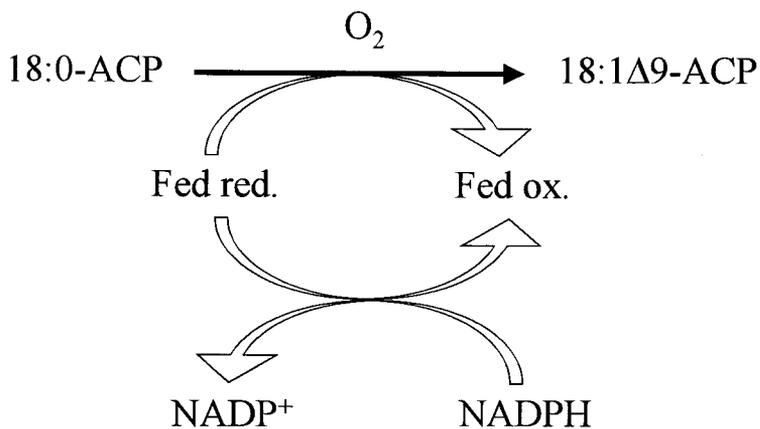


Figura 8. Biosíntesis del ácido oleico mediante la estearil-ACP desaturasa.

La estearil-ACP es la única desaturasa implicada en la desaturación de los lípidos vegetales que es soluble, el resto son proteínas unidas a membranas. Se localiza en el estroma de los plastidios y cloroplastos. En tejidos animales y levaduras su equivalente es un enzima unida a membrana (Gurr, 1974), que actúa sobre el estearil-CoA.

Normalmente, este enzima tiene una alta actividad comparada con la KAS II, por lo que el ácido esteárico rara vez se acumula en plantas. La $\Delta 9$ -desaturasa se purificó por primera vez en cártamo, donde se encontró que es un dímero de 98 kDa de peso molecular (McKeon y Stumpf, 1982). Así mismo, se ha clonado de distintos organismos, como ricino, pepino, cártamo, soja, espinaca y *Thunbergia alata*. Se ha encontrado homología entre las secuencias de aminoácidos de las estearil-ACP desaturasas de plantas superiores, pero no con las estearil-CoA desaturasas de vertebrados y hongos, o con las $\Delta 12$ -desaturasas y $\Delta 9$ -desaturasas de cianobacterias. Esto no es sorprendente, ya que la estearil-ACP desaturasa de plantas es un enzima soluble, que usa un sustrato soluble en agua (un tioéster de ACP) mientras que las enzimas de hongos y animales usan diferentes sustratos y son enzimas unidas a membranas. En el caso de las cianobacterias, son también enzimas unidas a membranas que usan como sustratos lípidos complejos y no tioésteres (revisión en Harwood, 1996).

La clonación del enzima ha permitido, recientemente, la cristalización y determinación de su estructura tridimensional por cristalografía de rayos-X (J. Shanklin, comunicación personal en Ohlrogge y Browse, 1995). El enzima es un homodímero en el cual cada monómero tiene un centro activo independiente que consiste en un cluster con dos átomos de hierro unidos por un grupo oxo. Durante la reacción, el centro sufre importantes modificaciones, con cambios redox de los átomos de hierro (Broadwater et al., 1998) y, un complejo de alta valencia toma un hidrógeno del enlace C-H. Se inhibe por cianuro y quelantes de hierro, pero no por monóxido de carbono (Ohlrogge y Browse, 1995). La dependencia de oxígeno podría ser el principal factor que regulara la síntesis de oleico (Stumpf, 1989). Las condiciones ambientales también afectan la actividad del enzima. El contenido en esteárico de un mutante alto esteárico de soja, fue correlacionado positivamente con el aumento de temperatura.

Existen intereses comerciales en aumentar el contenido de esteárico en los lípidos de reserva, como ya se indicó en el apartado 4. Dentro de un programa de mutagénesis iniciado a finales de la década de los 80 se aislaron mutantes de girasol con la composición de ácidos grasos afectada, algunos con un elevado contenido de ácido esteárico (Osorio et

al., 1995). La caracterización bioquímica llevada a cabo con estos mutantes señalaban a la $\Delta 9$ -desaturasa como uno de los genes implicados en el fenotipo alto esteárico, (Cantisán, 1999, Tesis Doctoral). Estudios preliminares de expresión llevados a cabo por PCR semicuantitativa no mostraron afectados los niveles de expresión de la estearato desaturasa (Martínez-Force, comunicación personal). Todo esto apunta a una mutación estructural del gen en cuestión.

También es interesante conocer si los cambios en los contenidos de esteárico de las membranas pueden afectar a la resistencia a las bajas temperaturas. En mutantes alto esteárico de *Arabidopsis*, se observó que las plantas presentan cambios en la anatomía de las hojas y estatura baja. Cuando se aumentó la temperatura el contenido de esteárico volvió a los niveles normales y el mutante aumentó de altura. Los resultados indican que el fenotipo enano del mutante se debe al incremento de los niveles de esteárico en los tejidos (Harwood, 1996). Sin embargo, los mutantes alto esteárico de girasol, aunque mostraron mayor contenido de este ácido en sus fosfolípidos (Álvarez-Ortega et al., 1997), no presentaron problemas durante su cultivo a distintas temperaturas (Martínez-Force et al., 1998) ni fenotipos aberrantes de germinación (Cantisán, 1999, Tesis Doctoral).

5. Terminación del ciclo de la sintetasa de los ácidos grasos.

La elongación de los ácidos grasos en el plastidio termina cuando el grupo acilo se libera del ACP, que puede ocurrir de dos formas: por acción de una acil-ACP tioesterasa o por la de una aciltransferasa. En los cloroplastos, pueden actuar dos aciltransferasas una que transfiere el ácido graso del ACP al glicerol-3-fosfato y otra que lo hace al monoacilglicerol-3-fosfato. La primera es un enzima soluble que prefiere al oleil-ACP como sustrato y la segunda es un enzima de membrana unida a la envuelta interna del cloroplasto y prefiere como sustrato al palmitil-ACP.

En el caso que actúe una acil-ACP tioesterasa, y quede libre el ácido graso, éste puede salir del plastidio. No se sabe con certeza cómo son transportados los ácidos grasos fuera del plastidio, pero podría ocurrir por difusión simple a través de la membrana. En la Figura 9 se presenta un esquema general de la biosíntesis de ácidos grasos, simplificados para la síntesis de lípidos en tejidos de reserva, es decir, sin incluir la síntesis de lípidos plastidiales.

En la envuelta del plastidio se encuentra una acil-CoA sintetasa que forma un enlace tioéster con el acilo, dando lugar a un acil-CoA, que ya está disponible para las reacciones de transferencia de acilos para formar glicerolípidos en el retículo endoplasmático. Tampoco es conocido cómo se mueven los acil-CoA desde la membrana externa del cloroplasto al retículo endoplasmático. Podrían estar involucradas proteínas que se unieran a los acil-CoA para su transporte (Ohlrogge y Browse, 1995).

Se conoce desde hace tiempo que en el estroma del cloroplasto y en los plastidios no verdes se encuentran tioesterasas que muestran una alta actividad con el oleil-ACP y palmitil-ACP (Shine et al., 1976). La especificidad que presentan estas enzimas para los sustratos, en competencia con el resto de las actividades de la FAS plastidial, determina el perfil de ácidos grasos sintetizados por el complejo ácido graso sintetasa que es transferido al citosol. En función de sus sustratos se pueden distinguir dos tipos de tioesterasas, Fat A y Fat B. Las primeras tienen preferencia por oleil-ACP (y en menor medida por palmitoil-ACP) y las segundas por acilos saturados, distinguiéndose dos tipos: uno con preferencia por acilos de 8-14 átomos de carbono y otro con preferencia por acilos de 16-18 átomos de carbono.

En semillas de soja, colza y en otros tejidos se ha purificado a homogeneidad una única acil-ACP tioesterasa, mientras que en cotiledones de calabaza se han encontrado tres isoenzimas (Harwood, 1996).

En la mayoría de las semillas oleaginosas, los lípidos de reserva presentan un alto contenido en ácidos grasos insaturados como oleico y linoleico. Pero existen especies con altos contenidos en otros ácidos. Por ejemplo, la manteca de cacao presenta elevados niveles de ácido esteárico y ácido palmítico (Padley et al., 1994). Es de esperar, por tanto, la presencia de una acil-ACP tioesterasa con alta selectividad para estearil-ACP y palmitoil-ACP. Sin embargo, en experimentos realizados en el plastidio de vainas de cacao en desarrollo, se observó que la tioesterasa tenía, como en otros casos, preferencia por oleil-ACP, pero mostraba cuatro veces más actividad con estearil-ACP que con palmitil-ACP, en contraste con otras tioesterasas plastidiales. Esta actividad tioesterasa podría explicar, en parte, el alto contenido en esteárico de la manteca de cacao. Además, hay que tener en cuenta otros factores, como la baja actividad estearil-ACP Δ^9 -desaturasa en cacao (Harwood, 1996).

Algunas especies vegetales, como *Cuphea*, acumulan ácidos grasos de cadena media y corta de C₈-C₁₄. Los ácidos grasos de cadena media tienen interés comercial, como

lubricantes, detergentes y en la industria alimentaria. Uno de los ácidos con mayor interés es el ácido láurico (12:0), sobre todo, para la industria oleoquímica. Se encuentra en los aceites de coco y palmiste (45%) y en la semilla de laurel. Se han propuesto distintos mecanismos para explicar la presencia de estos ácidos, como la acción de tioesterasas específicas y acil-transferasas específicas para ácidos grasos de cadena media. En las semillas de Cuphea se ha encontrado además de la tioesterasa que tiene preferencia por oleil-ACP, una segunda tioesterasa específica para acilos de cadena media. Por lo tanto, en plantas que acumulan este tipo de ácidos grasos, la terminación “prematura” de la síntesis de novo ocurre, principalmente, por la presencia de tioesterasas especiales (Harwood, 1996). En girasol, se ha descrito la presencia de ambos tipos de tioesterasas (Fat A y Fat B), tanto por las determinaciones de actividad enzimática como por los cDNAs obtenidos en semillas en formación (Martínez-Force et al., enviado).

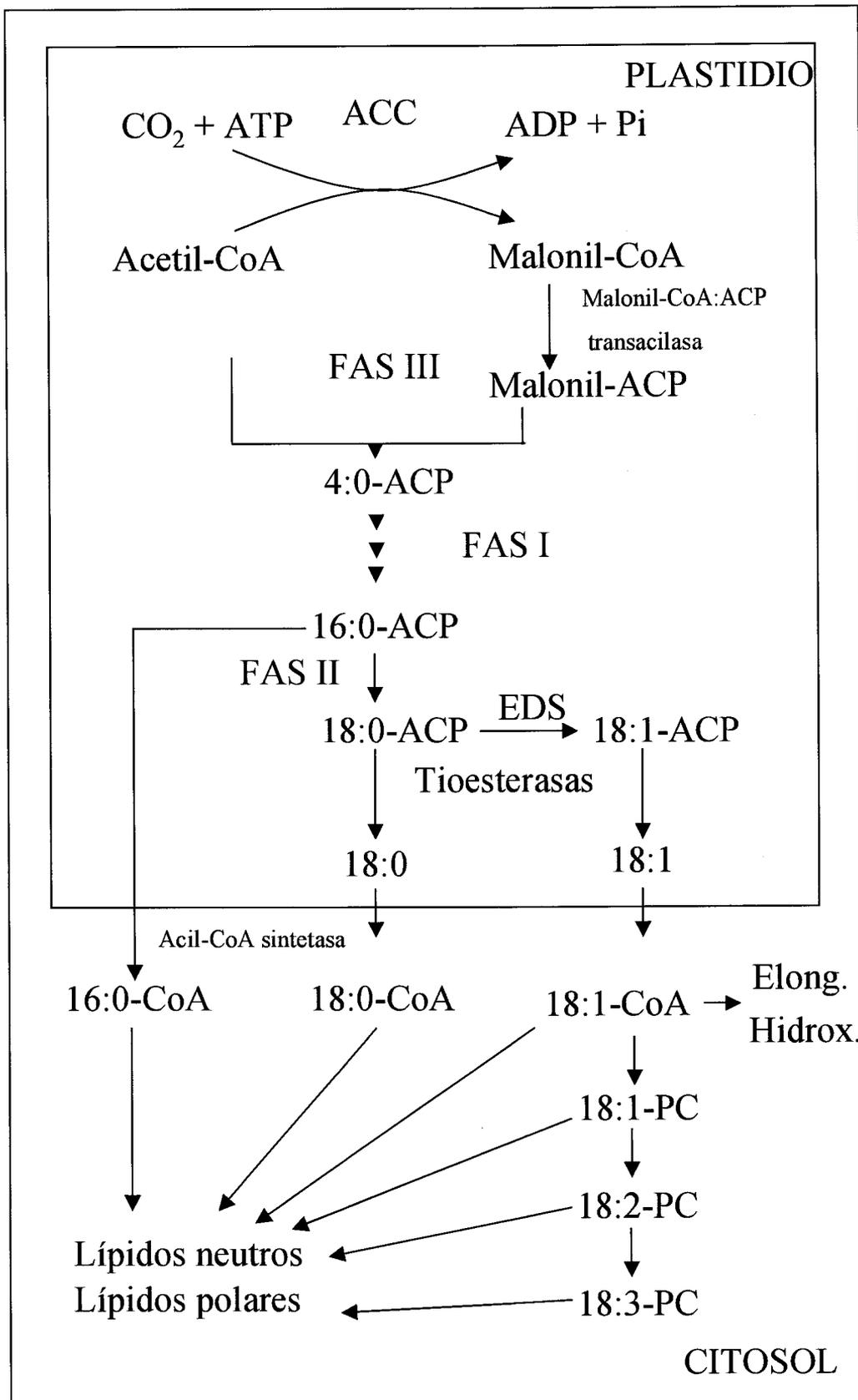


Figura 9. Esquema general de la biosíntesis de ácidos grasos y de la terminación del ciclo de la ácido graso sintetasa en plantas.

6. Biosíntesis extraplastidial de ácidos grasos.

La biosíntesis de los ácidos palmítico, esteárico y oleico ocurre en los plastidios mientras que la de los ácidos poliinsaturados linoleico, linolénico y los de cadena larga ($>C_{18}$) tiene lugar en el citoplasma, concretamente en el retículo endoplasmático, mediante enzimas unidos a membrana (Figura 9).

6.1. Biosíntesis del ácido linoleico. Características de la oleato desaturasa.

El linoleato es sintetizado a partir del oleato por acción de una $\Delta 12$ -desaturasa microsomal (ODS microsomal o FAD2). Este enzima se encuentra en todas las plantas y algas y en tres de las cuatro clases de cianobacterias. Por otro lado, a excepción de protozoos y algunos insectos, ningún animal lo puede sintetizar, por lo que se considera como ácido graso esencial, que debe ser aportado en la dieta (Harwood, 1996).

6.1.1. Sustrato de la oleato desaturasa.

Gurr y colaboradores (1969) indicaron que era el oleato esterificado a la PC el que se desaturaba para dar linoleato en *Chlorella vulgaris*. Pero los primeros ensayos in vitro en semillas de cártamo sugirieron como sustrato al oleil-CoA (Vijay y Stumpf, 1971, 1972). Más tarde, la desaturasa de cártamo fue reinvestigada y se demostró que el verdadero sustrato era el oleil-PC, en posición sn-2, aunque también se ha observado en posición sn-1 (Stymne y Appelqvist, 1978; Slack et al., 1979; Stobart y Stymne, 1985 a).

6.1.2. Propiedades y localización celular de la oleato desaturasa.

La oleato desaturasa, como la estearato desaturasa, pertenece al grupo de las desaturasas de función mixta. Necesita oxígeno molecular como co-sustrato y requiere NADH o un reductor equivalente como donador de electrones y citocromo b_5 como transportador, (Vijay y Stumpf, 1972; Stymne y Appelqvist, 1978), de acuerdo con la reacción siguiente:

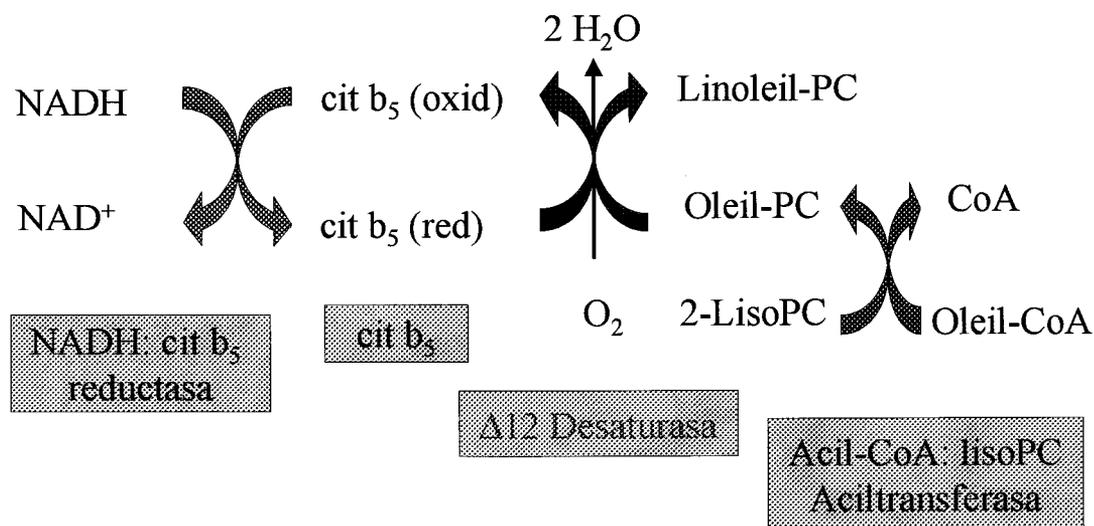


Figura 10. Mecanismo de la reacción de desaturación del ácido oleico a linoleico.

La cadena transportadora de electrones se ha estudiado en cártamo y está formada por citocromo b₅ y citocromo b₅ reductasa (Smith et al., 1990). Los primeros experimentos realizados también en cártamo, descartaron la participación de citocromo P-450 ya que no existía inhibición por CO, (Vijay y Stumpf, 1972). Los enzimas que desaturan oleato y linoleato tienen muchas de las propiedades de otras desaturases eucarióticas de ácidos grasos, como el requerimiento de O₂ y NADH o NADHP y la inhibición por cianuro pero no por CO (Vijay y Stumpf, 1972; Stymne, 1980). Su centro activo también contiene dos átomos de hierro, pero su estructura y funcionamiento son diferentes a los de las desaturases solubles (Broadwater et al., 1998).

Se ha observado una asociación funcional y quizás física entre la oleato desaturasa microsomal y la 1-acil-lisofosfatidilcolina aciltransferasa en hojas de guisante y semillas de cártamo, que explicaría la rapidez de la acilación de la lisofosfatidilcolina con oleil-CoA para dar 2-oleil-PC, (Murphy et al., 1984). Sperling y colaboradores estudiaron, en el girasol alto oleico, la composición y desaturación de los ácidos grasos de diferentes lípidos y tejidos. Los resultados indicaron que la 1-acil-lisofosfatidilcolina aciltransferasa y los componentes de la cadena transportadora de electrones no estaban afectados en el mutante alto oleico (Sperling et al., 1990).

Por otro lado, la actividad oleato desaturasa microsomal in vitro de semillas de girasol en desarrollo se estimuló con LPC y sorbitol, y requirió Mg⁺² (Garcés y Mancha, 1991). La correlación de las actividades colina fosfotransferasa y 1-acil-lisofosfatidilcolina

aciltransferasa con la ODS es menos estrecha que la que presenta el citocromo b_5 , y sugiere que la concentración de cualquier otra actividad enzimática limita las medidas de ODS durante el desarrollo de la semilla (Gray y Kekwick, 1996).

Se han realizado estudios de fenotipos normales y mutantes de girasol con la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en dos dimensiones (2D-PAGE). En el mutante alto oleico de girasol aparecen dos nuevos polipéptidos de 32 y 49 kDa, y cuatro polipéptidos de 32 kDa y dos de 33 kDa se desplazaron hacia puntos isoeléctricos menores, respecto al fenotipo normal. Entre las semillas del fenotipo normal cuya ODS fue inducida a baja temperatura y las no inducidas se encontraron diferencias cuantitativas. Algunos de estos polipéptidos podrían estar relacionados con la actividad ODS o con su regulación por temperatura (Sarmiento et al., 1994).

El lugar de desaturación del oleato parece ser el retículo endoplasmático, que contiene todos los enzimas involucrados en la biosíntesis de los triacilglicéridos y lípidos polares (Slack et al., 1976; Stymne, 1980). En semillas de girasol en desarrollo la actividad oleato desaturasa se localizó en la fracción microsomal, aunque los oleosomas retuvieron alguna actividad que se perdió después de sucesivos lavados (Garcés y Mancha, 1991). Resultados similares obtuvieron Gray y Kekwick, (1996), que encontraron que la actividad específica era máxima en los microsomas, indicando que la ODS se localiza en las membranas microsomales.

Por otro lado, existe una $\Delta 12$ -desaturasa en el cloroplasto capaz de convertir oleato en linoleato en los cuatro principales lípidos del tilacoide. En este caso el sustrato de la reacción es 18:1-MGDG. Este enzima utiliza O_2 y NADPH como poder reductor y la cadena transportadora de electrones está formada por ferredoxina. Esta desaturasa se ha purificado en cloroplastos de espinaca y se ha medido su actividad "in vitro". En las plantas que contienen ácido hexadecatrienoico (16:3) en sus lípidos cloroplásticos, es posible que la formación del ácido linoleico ocurra tanto en el citoplasma como en los cloroplastos. Sin embargo, en plantas que contienen principalmente 18:3 en las membranas cloroplásticas, como el girasol, la biosíntesis de linoleico parece ocurrir sólo en el citoplasma, debiendo ser transportado al interior del cloroplasto para su posterior desaturación a linoléico (Harwood, 1996).

6.1.3. Mecanismo de entrada del ácido oleico en fosfatidilcolina.

Es necesario conocer cómo entra el oleato en PC y cómo se libera el producto de la desaturación, el linoleato.

6.1.3.1. Acil-CoA:lisofosfatidilcolina aciltransferasa.

Los primeros datos indicaban que en semillas oleaginosas el oleato en forma de oleil-CoA entraba en posición sn-2 de la PC gracias a la acción de una acil-CoA:lisofosfatidilcolina aciltransferasa (Stymne y Appelqvist, 1978). Pero la importancia de la desaturación del oleato en semillas oleaginosas indicaba que debe existir un mecanismo que regenere el aceptor del acilo, es decir, la lisofosfatidilcolina. En plantas se ha encontrado una actividad enzimática, fosfolipasa A₂ que libera los ácidos grasos en posición sn-2 de los fosfolípidos, pero sólo para ácidos poco usuales, no para el oleico (Stahl et al., 1995).

En microsomas de semillas de soja en desarrollo se observó que la cantidad de oleil-CoA transferido a PC era mucho mayor que lo que cabría esperar teniendo en cuenta la cantidad de lisofosfatidilcolina preexistente (Stymne y Glad, 1981). Esto sugirió la existencia de un intercambio de acilos entre la PC microsomal y el conjunto de acil-CoAs citoplasmático. Este intercambio de acilos fue confirmado posteriormente en cártamo, girasol y lino (Stymne et al., 1983; Stymne y Stobart, 1984 a; Stymne y Stobart, 1985 a). El mecanismo por el cual se produce el intercambio de acilos se investigó en membranas microsomales de semillas de cártamo en desarrollo, comprobándose que está catalizado por una acil-CoA:lisofosfatidilcolina aciltransferasa, que actúa de forma reversible, (Stymne y Stobart, 1984 b).

La primera etapa de la reacción consiste en la transesterificación de los ácidos grasos de la posición sn-2 de PC (lo llamaremos X) a CoA, por la acción inversa de una aciltransferasa. La segunda etapa consiste en reacilación de la LPC gracias al conjunto de acil-CoAs preexistente (los llamaremos Y), por la acción directa del mismo enzima. La combinación de las dos reacciones da lugar al intercambio de acilos entre la PC y el conjunto de acil-CoAs citoplasmáticos, al mismo tiempo que se regenera la LPC (Figura 11).

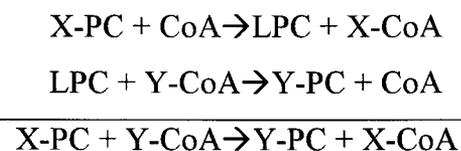


Figura 11. Intercambio de acilos entre la PC y el conjunto de acil-CoA citoplasmáticos, catalizado por la acil-CoA:lisofosfatidilcolina aciltransferasa.

La PC parece ser el único fosfolípido que participa en este intercambio de acilos. La reacción implica la rotura y posterior formación de un enlace tioéster de alta energía. El oleato y el linoleato presentaron la misma velocidad de acilación a PC, mientras que el linolenato se intercambió a la mitad de velocidad. Los ácidos grasos saturados, palmítico y esteárico fueron así totalmente excluidos del intercambio cuando estaban presentes en una mezcla de acilos junto a los ácidos grasos insaturados. En mezclas sin acilos insaturados, los ácidos grasos saturados se intercambiaron, pero a una velocidad mucho menor que la de los insaturados (Stymne y Stobart, 1984 b). Las reacciones directa e inversa parecen tener la misma selectividad para los acilos, en las semillas oleaginosas estudiadas aunque, en experimentos realizados en tejidos animales, las selectividades de ambas reacciones fueron diferentes (Stymne y Stobart, 1985 b). La desaturación de oleato en la PC requiere que el linoleato formado se utilice para la síntesis de otros lípidos, para lo que se requiere la participación, no sólo de la acil-CoA:lisofosfatidilcolina aciltransferasa, para facilitar el intercambio en la PC, sino también de otros enzimas que puedan retirar el 18:2 de manera preferente, como veremos más adelante.

6.1.3.2. Interconversión entre DAG y PC.

Otra posibilidad para la entrada de oleico en fosfatidilcolina, es la interconversión entre PC y DAGs con oleato en posición sn-2, catalizada por una diacilglicerol colinafosfotransferasa. Experimentos realizados in vivo con semillas oleaginosas en desarrollo, indicaron que el esqueleto de glicerol de la PC aparecía en los TAGs, y este movimiento era casi tan rápido como el flujo de ácidos grasos entre los dos lípidos (Slack

et al., 1978; Slack et al., 1985). Por otro lado, la composición de ácidos grasos de DAG y PC es muy similar. Esto sugirió la existencia de un equilibrio entre DAG y PC (Slack y Roughan, 1978). Esta reacción podría intercambiar DAGs ricos en oleico con PC, donde tendría lugar la desaturación de este ácido; luego, los ácidos poliinsaturados obtenidos servirían para acilar los TAG, vía DAG (Roughan y Slack, 1982). La participación de una colina fosfotransferasa en este intercambio se ha sugerido en cotiledones de lino, girasol y cártamo (Slack et al., 1983; Stymne y Stobart, 1984 a; Stobart y Stymne, 1985 a; Stymne y Stobart, 1985 a). En 1985, Slack y colaboradores demostraron que la colina fosfotransferasa en microsomas de semillas de cártamo en desarrollo, puede actuar de forma reversible. También se ha demostrado en el mismo sistema, el movimiento simultáneo del esqueleto de DAG a PC, y del de PC a DAG, durante la síntesis activa de TAG, a través de la ruta glicerol-P (Stobart y Stymne, 1985 b).

Hasta el momento es difícil conocer la contribución relativa de estas dos formas de entrada del oleato en PC, la transferencia reversible entre DAG y PC, y el intercambio de acilos de la PC y el conjunto de acil-CoAs citoplasmático. La importancia de estos dos tipos de intercambio difiere de unas especies de plantas a otras. En ciertas plantas, como colza alto erúcico, debe existir alguna selectividad en la transferencia de DAG a PC y/o diferentes conjuntos de DAGs, ya que hay una alta concentración de ácido erúcico en las posiciones sn-1,3 de los TAG, y está totalmente ausente en PC (Sosulski et al., 1981).



6.2. Biosíntesis de los ácidos α -linolénico y γ -linolénico.

El ácido α -linolénico (18:3 Δ 9c, 12c, 15c) es el ácido graso más abundante en la naturaleza, por ser el componente de los tilacoides de los cloroplastos. Sin embargo, es poco abundante en las semillas oleaginosas, aunque se acumula en semillas de lino (60%), nuez negra (62%), nuez inglesa (55%) y semillas de pino (44%), (Padley et al., 1994). También se encuentra en las semillas de soja y colza, constituyendo aprox. el 10% de su aceite.

Los primeros trabajos demostraron que el ácido α -linolénico se forma por la acción de una Δ 15-desaturasa a partir del ácido linoleico. También se demostró la participación de glicerolípidos como sustratos de la Δ 15-desaturasa. En los tejidos verdes, el ácido α -linolénico se sintetiza en los cloroplastos a partir de 18:2-MGDG y, en los tejidos de

reserva, el lugar de síntesis parece ser el retículo endoplasmático y el sustrato la sn-2-linoleil-PC (Roughan y Slack, 1982).

El ácido γ -linolénico (18:3 Δ 6c, 9c, 12c) es un ácido importante sobre todo por sus propiedades nutricionales y terapéuticas. Se encuentra en los lípidos de reserva de algunos cultivos de interés económico como *Oenothera biennis* y *Borago officinalis* (Harwood, 1996). Su biosíntesis ocurre por la desaturación del ácido linoleico en posición Δ 6, mediante una Δ 6-desaturasa microsomal, (Stymne y Stobart, 1986 a). Este enzima utiliza como sustrato sn-2-linoleil-PC y requiere NADH. El ácido γ -linolénico obtenido se incorpora en TAG, preferentemente en posición sn-2 y sn-3, (Harwood, 1996).

6.3 Formación de ácidos grasos inusuales.

Las plantas contienen un gran número de distintas estructuras de ácidos grasos. Algunos de estos ácidos inusuales se encuentran en los lípidos de reserva de semillas oleaginosas y cada vez existe un mayor interés industrial por estos ácidos de estructura diferente (Harwood, 1996).

Por ejemplo, los epoxiácidos como el ácido vernólico (18:1-12-epoxi), se usan para plastificar, y los hidroxiaácidos como el ácido ricinoleico (18:1-12-OH), se usan para cubrir superficies o como lubricante. El ácido vernólico es muy abundante en semillas de *Euphorbia lagascae* (58%). Se sintetiza a partir del ácido linoleico por epoxidación del doble enlace en posición Δ 12. La reacción ocurre en las posiciones sn-1 y sn-2 de la PC microsomal y requiere citocromo b₅.

El ácido ricinoleico es el ácido más abundante de las semillas de ricino (90%). Los primeros trabajos realizados en microsomas de semillas de ricino en desarrollo, indicaron que el sustrato de la reacción era oleato y se requiere NAD(P)H. Más tarde, los datos cinéticos obtenidos indicaron que el oleato se encuentra esterificado a la PC antes de la hidroxilación. Por lo que la formación del ácido ricinoleico ocurre en posición sn-2 de la PC, por hidroxilación en posición Δ 12 del ácido oleico, de acuerdo con un mecanismo similar al de desaturación que usa O₂ como co-sustrato y poder reductor en forma de NADH. El enzima Δ 12-hidroxilasa de ricino requiere citocromo b₅ como transportador de electrones y se encuentra en el retículo endoplasmático (Harwood, 1996).

Un ácido graso similar, el ácido isoricinoleico (ácido 9-hidroxi-cis-12-octadecenoico) se ha encontrado como principal componente de las semillas de *Wrightia tinctoria* y

Wrightia coccinea. Algunos experimentos con radiactividad han sugerido la formación de este ácido por una ruta anaerobia (Harwood, 1996).

Los enzimas responsables de estas reacciones de modificación están relacionados estructuralmente con la $\Delta 12$ -desaturasa microsomal (Stymne et al., 1998).

6.4. Biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga.

Los ácidos grasos de cadena larga son los de 20 átomos de carbono o más. En las plantas estos ácidos son constituyentes de los lípidos protectores de superficies, ceras, cutina y suberina (Harwood, 1996). Están involucrados en la biosíntesis de otros compuestos como hidrocarburos, aldehídos y alcoholes. También pueden acumularse en los lípidos de reserva de algunas semillas (Padley et al., 1994).

Los sistemas de elongación son enzimas unidos a membranas que utilizan acil-CoAs como sus sustratos iniciales, a los que se añaden dos átomos de carbono mediante la adición de malonil-CoA (Stumpf, 1989). Estudios realizados con sustratos radiactivos en tejidos in vivo y en ensayos microsomales in vitro, han demostrado que los sistemas de elongación de distintas plantas tienen diferente especificidad para sus sustratos, además también se distinguen enzimas específicos para tejidos concretos. Por ejemplo, en patata se han encontrado elongasas específicas para ácidos de C_{20} , C_{22} y C_{24} átomos de carbono. La elongasa de semillas en desarrollo de *Lunaria annua* acepta como sustratos acil-CoAs desde C_{14} a C_{24} , pero con una marcada preferencia por sustratos saturados o monoinsaturados de C_{18} a C_{20} . Semillas de *Limnanthus alba* pueden usar también como sustratos ácidos saturados (palmítico, esteárico) o monoinsaturados (oleico, eicosenoico), y contienen ácidos de C_{20} y C_{22} con un doble enlace inusual, $\Delta 5$. En homogeneizados de semillas de colza, se han encontrado elongasas con una alta especificidad según la longitud o el grado de insaturación de la cadena de acilo. Las elongasas de muchas plantas se concentran en la fracción microsomal aunque, actualmente, no es posible generalizar sobre la localización subcelular de las elongasas, sólo decir que son sistemas unidos a membrana y extraplastidiales (revisión en Harwood, 1996).

IV. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD OLEATO DESATURASA.

El estudio de los enzimas implicados en la desaturación de los ácidos grasos es complicado debido a la dificultad de la purificación, ya que al estar unidos a membrana suelen perder actividad cuando se solubilizan.

La regulación de la ODS microsomal es compleja. Parece existir una regulación específica de cada tejido, de modo que la proporción de linoleato es distinta en tejidos verdes y de reserva. Además existe una regulación temporal, ya que el grado de desaturación de los lípidos de las semillas varía durante su desarrollo. Estudios realizados con semillas de girasol en desarrollo de distintas edades indican que la actividad es baja en los primeros días de formación, aumenta mucho a partir de los 12-14 DDF, alcanzando el máximo a los 20 DDF, y disminuye a medida que las semillas maduran (Garcés y Mancha, 1989; Gray y Kekwick, 1996).

Los estudios cinéticos indican que nunca ocurre la conversión total de oleato a linoleato en preparaciones microsomales. La velocidad de desaturación depende de la concentración de oleato en PC, y disminuye rápidamente cuando las cantidades de éste se aproximan a las que se encuentran en la PC endógena en semillas oleaginosas (Stymne et al., 1983; Stymne y Stobart, 1986 a). Esto puede ser debido a la afinidad de la ODS por su sustrato o en la inhibición por el producto (linoleato). Gray y Kekwick, (1996) observaron, en semillas de girasol en desarrollo, correlación entre la actividad ODS y su componente, el citocromo b₅, indicando que éste podría gobernar la velocidad de desaturación del oleato.

La actividad oleato desaturasa está además regulada por factores ambientales. Se ha encontrado estimulación de la ODS por luz, en distintos sistemas, hojas de avena, hojas de colza, cultivos celulares de *Arabidopsis*, cotiledones verdes de pepino y cotiledones inmaduros de cártamo (Ohnishi y Yamada, 1983; Trémolières et al., 1978; Brockman et al., 1990; Murphy y Stumpf, 1979, 1980; Griffiths et al., 1986). Se han descrito pequeñas fluctuaciones día/noche en los niveles de oleico y linoleico en hojas de espinaca (revisión en Miquel y Browse, 1995). Pero este efecto parece producirse sólo en tejidos verdes, así en girasol la luz estimuló la biosíntesis de linoleico en hojas pero no en semillas (Tchang et al., 1981).

La actividad ODS también está afectada por el estrés hídrico y salino. En hojas de algodón se ha observado una disminución en la biosíntesis de linoleato en plantas

sometidas a estrés hídrico (Pham Thi et al., 1985, 1987). Experimentos realizados en hojas de olivo indicaron que un aumento del calcio en el suelo provocó una disminución del porcentaje de linoleato (Marzouk et al., 1987). Pero el factor ambiental que más afecta a la actividad ODS es la temperatura. Por ello, le dedicaremos el siguiente apartado.

Efecto de la temperatura.

Se han obtenido y estudiado una serie de mutantes de *Arabidopsis* con niveles reducidos de linoleico y α -linolénico en los lípidos de las semillas (Browse y Somerville, 1991; Somerville y Browse, 1991). El mutante *fad2* de *Arabidopsis* es deficiente en la actividad ODS, es decir, en la desaturasa de oleato del retículo endoplasmático (Miquel y Browse, 1992). Cuando el mutante crece a 22°C, no hay diferencias con el fenotipo normal, pero cuando el crecimiento es a bajas temperaturas (6°C), se observa necrosis de la roseta después de varios días. Es decir, la deficiencia en ácidos grasos poliinsaturados provoca sensibilidad a las bajas temperaturas (Miquel et al., 1993). Estos ácidos son, por tanto, esenciales para mantener el funcionamiento normal de las células y su viabilidad a temperaturas bajas.

Normalmente, el aumento de la insaturación es inversamente proporcional a la temperatura. Ésta es una respuesta universal que ocurre en animales, plantas y algunos microorganismos. Se considera como un fenómeno de adaptación que permite mantener las funciones fisiológicas de las células a bajas temperaturas, ya que la fluidez de las membranas puede cambiar dependiendo de la insaturación de los ácidos grasos de los lípidos de membrana. Sin embargo, no está claro que se trate de una causa o un efecto.

El mecanismo por el cual la temperatura regula la actividad ODS en plantas es desconocido aunque se han propuesto distintas hipótesis. Una de ellas es que la fluidez de las membranas puede afectar directamente la actividad de las enzimas desaturasas (Brenner, 1984). Esta hipótesis se ha ensayado en semillas de cártamo, pero no existen datos que indiquen que la actividad oleato desaturasa se regule por un cambio en la fluidez de las membranas microsomales (Stymne y Stobart, 1986 b). En 1969, Harris y James, sugirieron que la mayor solubilidad del oxígeno en agua a bajas temperaturas puede incrementar la actividad desaturasa, ya que actúa como co-sustrato (Harris y James, 1969 a). Sin embargo, la solubilidad del O₂ en agua cambia poco entre 10 y 30°C (Wilhelm et

al., 1977), por lo que más bien parece que lo que influye es la disponibilidad de O₂, que es lo que se ha demostrado en microorganismos. (en el apartado VI se discutirá con más detalle esta hipótesis).

Distintas desaturasas pueden ser estimuladas al disminuir la temperatura, y este aumento de actividad parece deberse a la inducción de la síntesis de nuevo enzima. (Wada y Murata, 1990). En 1993, Jones y colaboradores observaron un aumento de la expresión de los genes de las desaturasas durante la adaptación al frío de protozoos. Se ha demostrado que el nivel de ARNm de la Δ 12-desaturasa de *Synechocystis* sp. PCC 6803, aumenta cuando decrece la temperatura ambiente. Esto indica una regulación a nivel de la expresión génica, aunque también puede haber regulación a nivel de ARNm (Los et al., 1993).

En girasol, la composición de ácidos grasos de las semillas del fenotipo normal y del alto oleico depende de la temperatura de crecimiento, aunque el girasol normal es más sensible a la temperatura que el mutante (Garcés et al., 1989).

Se ha demostrado que la actividad oleato desaturasa se incrementa a bajas temperaturas, (Garcés y Mancha, 1989) debido a la síntesis de nuevo enzima (Garcés et al., 1992). La estimulación de la actividad fue mayor en plantas crecidas a altas temperaturas (30/20°C), cuya actividad inicial era muy baja.

Por otro lado, la actividad ODS, medida en microsomas aislados de semillas de plantas crecidas a bajas temperaturas depende de la temperatura de incubación, mostrando un máximo a 20°C. En cambio, en semillas de plantas crecidas a altas temperaturas, la actividad desaturasa microsomal fue mucho más baja y casi insensible a la temperatura de incubación. Estos resultados indican que la actividad inducida por bajas temperaturas es dependiente de la temperatura, mientras que la actividad presente en plantas cultivadas a altas temperaturas, considerada "actividad basal", es independiente de la temperatura de incubación. Esta actividad desaturasa basal sería la responsable de la síntesis de linoleato a altas temperaturas, de acuerdo con el modelo propuesto en semillas por Garcés et al., (1992), y en hojas por Williams et al., (1992 a). El sistema enzimático en semillas de girasol podría corresponder al descrito en semillas en desarrollo de soja, donde se han identificado dos Δ 12-desaturasas microsomales (Heppard et al., 1996). En hojas hay evidencias que indican que el aumento de la actividad desaturasa a bajas temperaturas está controlado por la activación del gen a bajas temperaturas (síntesis de nuevo enzima) y no

por modificación de la actividad del enzima, debido por ejemplo a la concentración de oxígeno o la fluidez de la membrana (Williams et al., 1992 b)

Por otra parte, se ha observado que cuando se produce la inducción por frío de la ODS microsomal se incrementa el contenido de linoleato en PC y TAG. Así mismo, se ha observado que el oleato de los TAGs de reserva puede servir como sustrato de la desaturasa, probablemente a través de un intercambio con fosfatidilcolina, (Garcés et al., 1994); lo que sugiere que el oleato procedente de los lípidos polares y el producido por la síntesis de novo no son suficientes para las necesidades de desaturación a bajas temperaturas, teniendo en cuenta que, en estas condiciones, la síntesis de novo de ácidos grasos se encuentra reducida (Browse y Slack, 1983), a la vez que se estimula la actividad ODS microsomal (Garcés et al., 1992).

En condiciones en las que la síntesis de novo de ácidos grasos no es apreciable, se observó que la actividad ODS microsomal de semillas de girasol en desarrollo se reprimió a altas temperaturas, aunque se recuperó rápidamente cuando se transfirió de nuevo a bajas temperaturas. Estos resultados sugieren que, en semillas de girasol, el mecanismo para la rápida adaptación a los cambios de temperatura implica la síntesis o activación de la ODS a bajas temperaturas y la inhibición reversible de este enzima a altas temperaturas, así como los intercambios de oleato y linoleato entre TAG y PC (Sarmiento et al., 1998).

V. BIOSÍNTESIS DE GLICEROLÍPIDOS EN PLANTAS.

Las plantas utilizan como reserva de energía carbono reducido, derivado de la fotosíntesis. Las principales formas de reserva son carbohidratos, proteínas y lípidos. Entre ellos, los lípidos son la forma más eficiente de almacenar energía, ya que los átomos de carbono de los ácidos grasos están más reducidos y, por tanto, la oxidación de los lípidos produce el doble de energía que la oxidación de carbohidratos y proteínas (Leningher, 1993). Por esta razón, muchas especies de plantas almacenan lípidos, para que sirvan como aporte energético durante la germinación. Además, los lípidos pueden almacenarse en gran cantidad en un mínimo volumen de tejido, los azúcares, en cambio, debido a su hidratación, no pueden almacenarse de forma tan concentrada.

En los lípidos de reserva de las plantas, los ácidos grasos se encuentran generalmente, en forma de triacilglicéridos, si bien hay excepciones como las semillas de jожoba (*Simmondsia chinensis* L.), en las que los ácidos grasos están esterificados a alcoholes de cadena larga, formando ceras (Yermanos, 1975). Los triacilglicéridos, se encuentran en todos los órganos de las plantas, pero se acumulan preferentemente en las semillas y frutos, así se localizan en los cotiledones (ej. cártamo, girasol, soja, colza, lino), en el mesocarpio de los frutos (ej. aceituna, palma, aguacate) y en el endospermo de las semillas (ej. coco, ricino).

1. Biosíntesis de lípidos neutros en tejidos de reserva.

Los lípidos neutros, como se dijo en el apartado 4 del bloque II, están formados por los triacilglicéridos, diacilglicéridos y monoacilglicéridos, los TAG son los mayoritarios, suponiendo el 90-95 % de los lípidos de las semillas oleaginosas.

1.1. Rutas eucariótica y procariótica.

Las plantas superiores poseen dos rutas distintas para la síntesis de glicerolípidos: la eucariótica y la procariótica. La ruta eucariótica (o ruta de Kennedy) tiene lugar en el retículo endoplasmático y la procariótica en la membrana interna del cloroplasto. Debido a las especificidades de las aciltransferasas del plastidio por ciertos sustratos acil-ACP

(Frentzen, 1993) el ácido fosfatídico formado por la ruta procariótica tiene 16:0 en posición sn-2 y, en la mayoría de los casos, 18:1 en posición sn-1. Este PA se usa para la síntesis de PG o se convierte en DAG por una PA-fosfatasa localizada en la membrana interna del cloroplasto. Estos DAGs pueden actuar como precursores de la síntesis de los principales lípidos de membrana plastidiales, MGDG, DGDG y SL (Joyard et al., 1993).

En contraste con los isoenzimas del cloroplasto, las aciltransferasas del RE usan sustratos en forma de acil-CoAs para la síntesis de PA. En este caso, la especificidad de las enzimas aciltransferasas hace que el PA contenga ácidos grasos C₁₈-insaturados en posición sn-2, mientras que los saturados (16:0 y 18:0) ocupan la posición sn-1. Este PA es el sustrato para la síntesis de fosfolípidos tales como PE, PC y PI. Además, el esqueleto de la PC puede atravesar a la membrana cloroplástica, donde entra en el conjunto de DAGs aportando 18:2 para la síntesis del 18:3 que requieren los lípidos cloroplásticos.

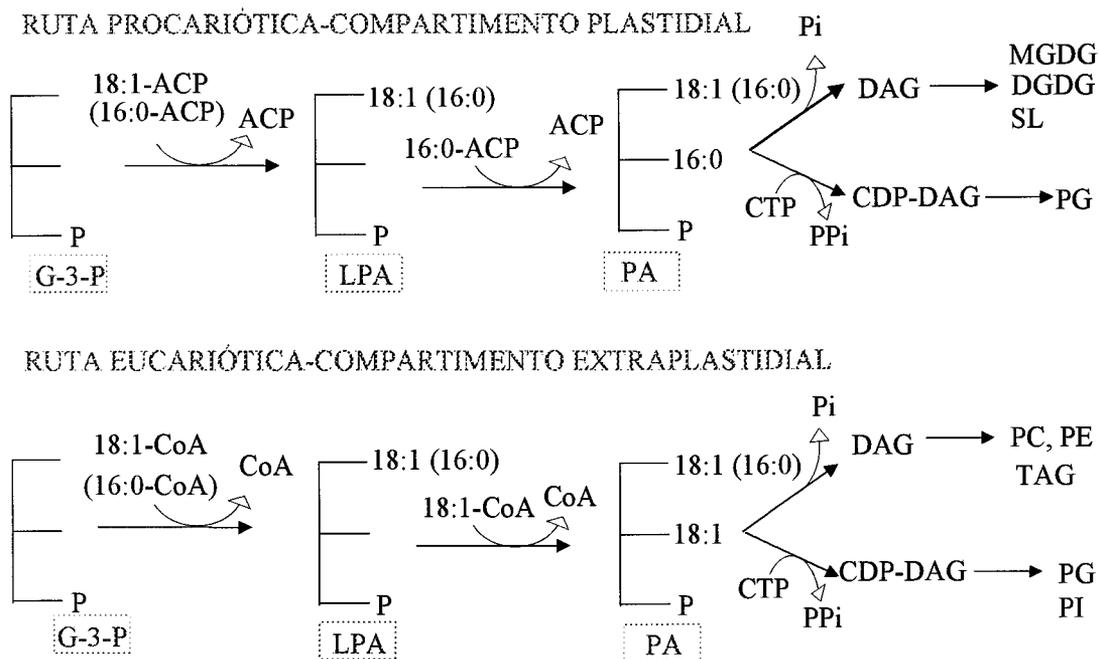


Figura 12. Esquema de las rutas procariótica y eucariótica.

En muchas especies de plantas superiores el PG es el único producto de la ruta procariótica, y el resto de lípidos cloroplásticos son sintetizados por la ruta eucariótica. En otras especies, como *Arabidopsis* y espinacas, ambas rutas contribuyen por igual a la síntesis de MGDG, DGDG y SL (Browse y Sommerville, 1991). Los lípidos de hojas de estas plantas tienen como característica el poseer cantidades sustanciales del ácido

hexadecatrienóico (16:3), que se encuentra sólo en MGDG y DGDG producidos por la ruta procariótica. A estas plantas se les llama plantas 16:3 para distinguirlas de otras angiospermas (plantas 18:3) cuyos galactolípidos contienen sobre todo linoleato (18:3).

En plantas inferiores y muchas algas verdes, el cloroplasto es casi autónomo respecto a la síntesis de los lípidos de membrana y la ruta eucariótica contribuye muy poco en la síntesis de MGDG, DGDG y SL (Ohlrogge y Browse, 1995).

En distintos mutantes de *Arabidopsis* se han encontrado evidencias del intercambio de lípidos, reversible en cierta extensión, entre el RE y el cloroplasto (Miquel y Browse, 1992). La cuestión no resuelta, es cómo se mueven las moléculas de lípidos, hidrofóbicas, del RE al cloroplasto. Hasta ahora, se había considerado que unas proteínas solubles, que se han caracterizado mediante ensayos in vitro, como proteínas transportadoras de lípidos, eran las encargadas del transporte intracelular de éstos. Sin embargo, datos bioquímicos e inmunohistoquímicos indican que estas proteínas son extracelulares y por tanto, no pueden realizar esta función (revisión en Ohlrogge y Browse, 1995).

1.2. Biosíntesis de triacilglicéridos.

Los TAG representan el producto final de la ruta de Kennedy o del glicerol-3-fosfato, esquematizada en el apartado anterior. Se describió por primera vez en animales y más tarde, se encontró en plantas superiores (Barron y Stumpf, 1962). Por su importancia la describiremos en detalle, junto con las conexiones con otras reacciones importantes en la síntesis de lípidos de reserva de la semilla. El producto de partida es el glicerol-3-fosfato, y la ruta se alimenta con los acilos que son exportados del plastidio (16:0, 18:0, 18:1), además de los ácidos grasos poliinsaturados que se sintetizan fuera del plastidio (18:2, 18:3, etc.). Todos ellos forman el conjunto de acil-CoAs citoplasmáticos. En la Figura 13, se presenta esta ruta, junto con la de la $\Delta 12$ -desaturasa (oleato desaturasa).

Las etapas de esta ruta son:

- Reacción I: Formación del ácido lisofosfatídico.
- Reacción II: Formación del ácido fosfatídico.
- Reacción III: Formación de diacilglicéridos.
- Reacción IV: Formación de la PC a partir de DAG.
- Reacción V: Desaturación de oleato a linoleato.

-Reacción VI: Transferencia del linoleato recién formado al conjunto de acil-CoAs citoplasmáticos.

-Reacción VII: Formación de triacilglicéridos.

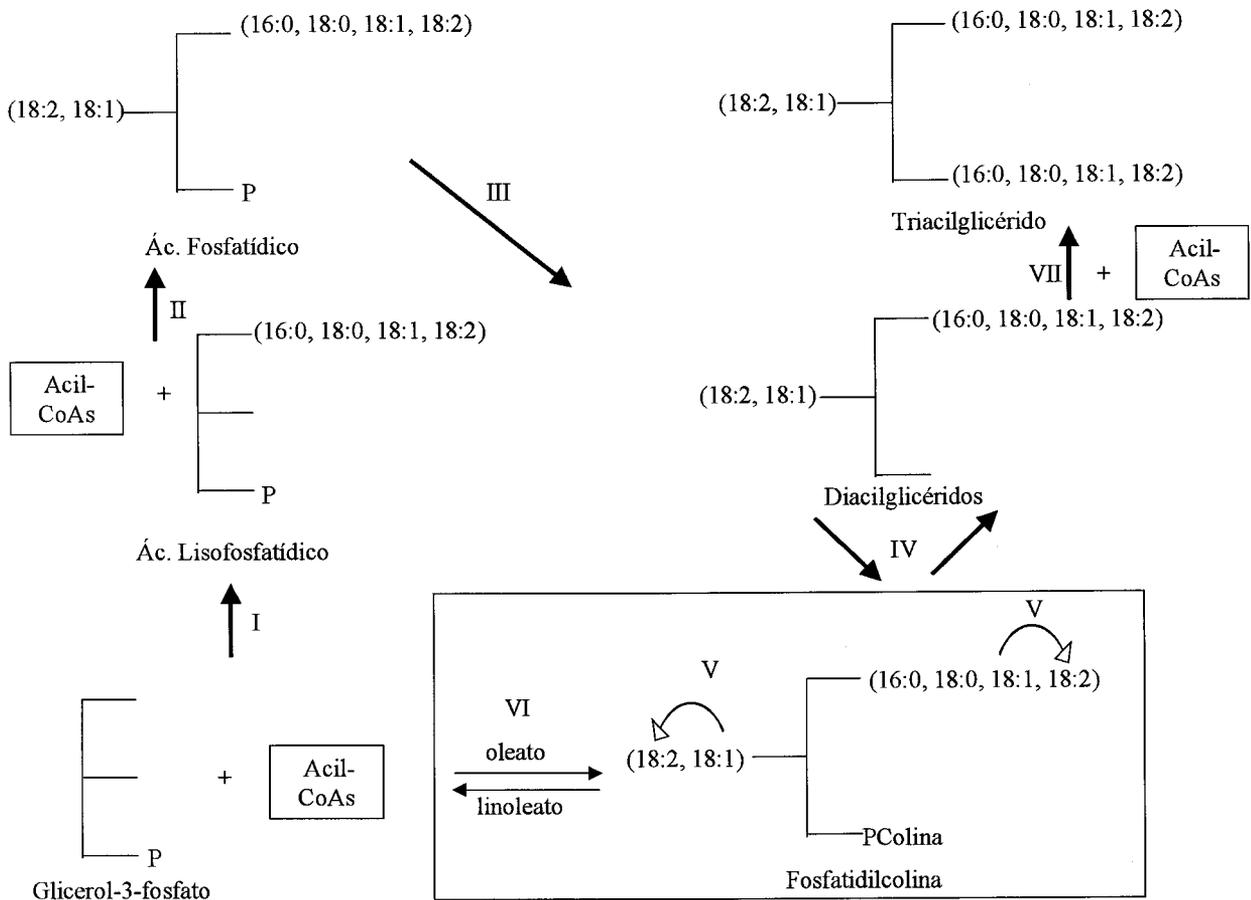
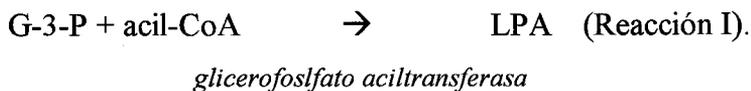


Figura 13. Ruta de Kennedy y mecanismo de desaturación de oleato.

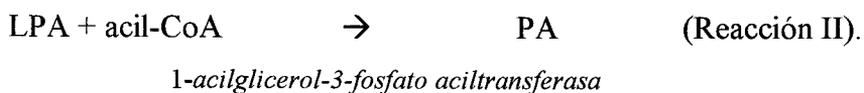
1.2.1. Formación del ácido lisofosfatídico.



La formación del ácido lisofosfatídico (LPA) está catalizada por una glicerolfosfato aciltransferasa que acila la posición sn-1 del glicerol-3-fosfato (Yamashita et al., 1972; Tamai y Lands, 1974). Este enzima presenta preferencia por el ácido palmítico (Ichihara,

1984; Griffiths et al., 1985). Respecto al orden de preferencia del resto de acilos, hay discrepancias dependiendo de cómo se han realizado los experimentos. Ichihara, (1984) encontró en microsomas de cártamo la siguiente secuencia de selectividad: palmitato>oleato=linoleato>estearato. En cambio, Griffiths y colaboradores (1985), observaron, también en microsomas de cártamo, que el linoleato se acilaba a la mitad de velocidad que el oleato y un poco más lentamente que el estearato, es decir, oleato>estearato>linoleato. La glicerolfosfato aciltransferasa se ha estudiado en ricino (Vick y Beevers, 1977) y requiere para su funcionamiento cationes divalentes, si bien este requerimiento no parece necesario en los enzimas de cártamo (Ichihara, 1984; Griffiths et al., 1985; Stobart y Stymne, 1985 b). Es un enzima extraplastidial y se supone que se encuentra asociado al retículo endoplasmático (Vick y Beevers, 1977; Ichihara, 1984; Griffiths et al., 1985). En las hojas de espinaca este enzima se ha encontrado en la fracción microsomal del RE, presentando la misma selectividad que los tejidos de reserva (Frentzen et al, 1984).

1.2.2. Formación del ácido fosfatídico.



En la segunda reacción, el ácido lisofosfatídico es acilado en posición sn-2, dando lugar al ácido fosfatídico. Esta reacción está catalizada por una 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa. Este enzima tiene una fuerte selectividad por linoleato frente a oleato y excluye totalmente a los saturados (Griffiths et al., 1985).

Las reacciones I y II se han descrito en distintos sistemas como microsomas de cártamo (Stobart et al., 1983; Stymne et al., 1983; Ichihara, 1984), girasol (Stymne y Stobart, 1984 a) y lino (Stymne y Stobart, 1985 a), así como en extractos crudos de tejidos de reserva (Barron y Stumpf, 1962; Vick y Beevers, 1977). Las selectividades de las posiciones sn-1 y sn-2 del G-3-P, explican que la distribución de los ácidos grasos saturados e insaturados en los triacilglicéridos no es al azar.

1.2.3. Formación de diacilglicéridos.

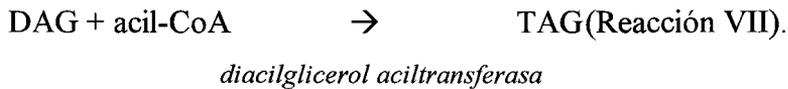


Esta reacción está catalizada por una fosfatidato fosfatasa, que libera el fosfato inorgánico del ácido fosfatídico, rindiendo diacilglicéridos. Esta actividad enzimática se ha encontrado en extractos crudos de tejidos vegetales que sintetizan triacilglicéridos (Barron y Stumpf, 1962; Stymne et al., 1983; Ichihara, 1984) y en las fracciones soluble y unida a membrana de homogeneizados de semillas maduras de cártamo, donde el enzima requiere para su actividad Mg^{+2} y es inhibida por EDTA (Ichihara et al., 1989, 1990). Las actividades relativas y combinadas de estas dos formas cambian durante la maduración de la semilla. En el período de máxima acumulación de TAG en la célula, la mayor actividad fosfatidato fosfatasa se encontró unida a membrana. Al comienzo y final del desarrollo de la semilla, cuando la síntesis de TAG fue insignificante, la mayor actividad fue soluble. Las sales potásicas de los ácidos palmítico, esteárico y oleico (productos del plastidio) provocaron la translocación del enzima citosólico a las membranas microsomales, mientras que los ácidos láurico y linoleico, que no son productos del plastidio, no provocaron ningún efecto. Los resultados sugieren que en semillas oleaginosas maduras la velocidad de síntesis plastidial de los ácidos grasos puede regular la translocación específica de la fosfatidato fosfatasa entre el citosol y el retículo endoplasmático, cuando tiene lugar la síntesis de TAG controlando la velocidad de síntesis de los TAG en la célula.

La fosfatidato fosfatasa de semillas oleaginosas y del mesocarpio del aguacate es extraplastidial y está unida a membrana, mientras que el de hojas de espinaca se localiza en la membrana interna del cloroplasto (Barron y Sumpf, 1962; Stymne et al., 1983; Ichihara, 1984; Block et al., 1983).

La fosfatidato fosfatasa microsomal de semillas maduras de cártamo mostró preferencia (selectividad y especificidad) por especies de fosfatidatos con dos ácidos grasos insaturados (Ichihara, 1991). En cambio, la enzima de los cloroplastos de espinaca no mostró preferencia por ninguna especie molecular de fosfatidato, de forma que la composición de ácidos grasos de estos glicerolípidos no están afectados por este paso de defosforilación (Block et al., 1983). En plantas esta reacción parece ser el paso limitante de la ruta de los triacilglicéridos (Stymne y Stobart, 1987).

1.2.4. Formación de triacilglicéridos.



La acilación del DAG para formar TAG está catalizada por una diacilglicerol aciltransferasa. Esta actividad se ha encontrado en la fracción microsomal de distintos tejidos vegetales (Barron y Stumpf, 1962; Stymne et al., 1983).

Los estudios realizados indican que tiene una selectividad parecida a la del primer enzima de la ruta, es decir, preferencia por los saturados, sin embargo, Ichihara y Noda (1982) encontraron en cotiledones de cártamo que esta acilación no presentaba preferencia por ninguna especie de DAG o acil-CoA. Pero hay que tener en cuenta que la actividad enzimática investigada por Ichihara y Noda (1982) fue de casi un orden de magnitud menor que la encontrada en microsomas de cártamo por Stobart y Stymne (1985 a). Esta reacción es la única reacción propia de la síntesis de TAG.

1.2.5. Importancia de la fosfatidilcolina en la síntesis de triacilglicéridos.

En muchas semillas oleaginosas como soja, cártamo, lino y girasol, los ácidos grasos más abundantes son los de C₁₈ mono y poliinsaturados. Los TAG de estas semillas son ricos en estos ácidos. La PC se sintetiza a partir de DAG mediante una CDP-colina:diacilglicerol colinafosfotransferasa (Reacción IV). Interviene en la formación de especies de DAG con ácidos grasos insaturados y en acil-CoAs de C₁₈ poliinsaturados que luego servirán para la síntesis de TAG.

Como se ha dicho antes, existe una interconversión reversible entre DAG y PC que ocurre de forma muy rápida, catalizada por la acción de la colinafosfotransferasa (Slack et al., 1983; Slack et al., 1985). Por otro lado, también existe un intercambio entre los acilos que constituyen el conjunto de acil-CoAs citoplasmáticos y la posición sn-2 de la PC, catalizado por una acil-CoA:lisofosfatidilcolina aciltransferasa (Stymne y Stobart, 1984 b). Este intercambio tiene preferencia por los acilos insaturados, en especial por el oleato y el linoleato que se intercambian a la misma velocidad. De este modo, el conjunto de acil-CoAs citoplasmáticos se enriquece con ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran disponibles para las distintas reacciones de acilación de la ruta de Kennedy.

En especies que acumulan ácidos grasos saturados o monoinsaturados como el aguacate (*Persea americana*) y el cacao (*Theobroma cacao* L.) no se han detectado ni la interconversión DAG-PC ni el intercambio con el conjunto de acil-CoAs citoplasmáticos, (Stobart y Stymne, 1985 a; Griffiths y Harwood, 1991).

2. Biosíntesis de fosfolípidos.

El ácido fosfatídico es el precursor común de todos los glicerolípidos. Como se ha indicado, la hidrólisis del PA da lugar a DAG, a través de la acción de una fosfatasa asociada al RE. Esta ruta es común a la biosíntesis de TAG y fosfolípidos. En las plantas, los principales fosfolípidos son PC, PE, PI y PG, y se obtienen a partir de DAG, a través de diversas reacciones, (revisión en Longmuir, 1993).

2.1. Biosíntesis de PC y PE .

En la denominada ruta CDP-base, la colina y la etanolamina son fosforiladas para dar lugar a colina fosfato y etanolamina fosfato, respectivamente. Estas reacciones están catalizadas por los enzimas colina kinasa y etanolamina kinasa. Ambas enzimas son citosólicas y requieren ATP y Mg^{+2} .

La colina fosfato y etanolamina fosfato reaccionan con citidinatrifosfato (CTP) para formar CDP-colina y CDP-etanolamina. Los enzimas que catalizan estas reacciones son la colina-fosfato citidiltransferasa y etanolamina-fosfato citidiltransferasa. La colina-fosfato citidiltransferasa se puede encontrar en dos formas, una soluble, en el citosol y otra agregada, asociada al RE. La forma soluble se considera inactiva, mientras que la asociada a membranas microsomales es la forma activa. En cambio, la etanolamina-fosfato citidiltransferasa es sólo citosólica. Estas reacciones parecen ser el paso limitante de la síntesis de PC y PE. De hecho, la cantidad de CDP-colina y CDP-etanolamina es siempre mucho menor que la de colina-fosfato y etanolamina-fosfato, como ocurre típicamente en los procesos que son etapa limitante. Se ha estudiado con interés la colina-fosfato citidiltransferasa por su probable papel como enzima regulatorio. Se ha demostrado que la forma citosólica, poco activa, aumenta su actividad cuando se asocia a membrana. Los factores que provocan esta asociación son la defosforilación del enzima y la asociación con

ácidos grasos. La etapa final de la biosíntesis de PC y PE, por la ruta CDP-Base, consiste en la reacción de CDP-colina y CDP-etanolamina con DAG. Estas reacciones están catalizadas por los enzimas colina fosfotransferasa y etanolamina fosfotransferasa. Ambas son dependientes de magnesio y se encuentran asociadas al RE. Inicialmente, se sugirió que estas dos actividades se localizan en la misma proteína, pero parece que se trata de dos proteínas diferentes.

Una ruta alternativa para la síntesis de PC consiste en la metilación sucesiva de la PE con S-adenosil-L-metionina para formar primero monometilfosfatidiletanolamina, luego dimetilfosfoetanolamina y finalmente fosfatidilcolina. Esta ruta tiene importancia en tejidos animales, sobre todo en el hígado, pero no parece importante en plantas.

2.2. Biosíntesis de PI y PG (ruta CDP-DAG).

El PA reacciona con CTP originando CDP-DAG mediante la acción de la fosfatidato:CTP citidiltransferasa. Este enzima requiere cationes divalentes para su actividad y se encuentra asociado a membranas en *E. coli*; en levaduras y células animales se encuentra en microsomas y mitocondrias. Esta ruta es esencialmente la misma en procariontas, levaduras, animales y plantas.

El fosfatidilinositol se forma por condensación de CDP-DAG con mioinositol, catalizado por el enzima fosfatidilinositol sintetasa. Este enzima se localiza en las membranas microsomales del RE.

La biosíntesis de fosfatidilglicerol a partir de CDP-DAG tiene lugar en dos pasos. Primero reacciona el CDP-DAG con glicerol-3-P para formar fosfatidilglicerol-3-fosfato (PGP), luego se hidroliza este producto, obteniéndose fosfatidilglicerol. Estos enzimas se localizan en las membranas mitocondriales. La PC se puede formar, también, por el ya mencionado mecanismo de interconversión con los DAG, por la actividad reversible de la colina fosfotransferasa (revisión en Longmuir, 1993).

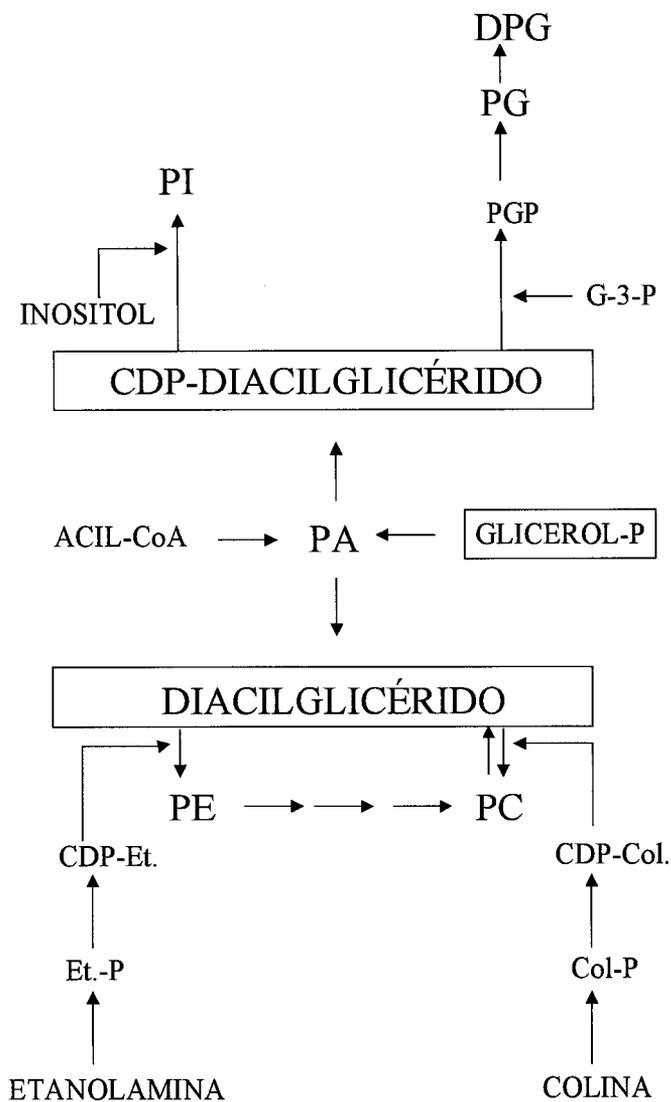


Figura 14. Biosíntesis de fosfolípidos

3. Almacenamiento de triacilglicéridos en semillas en desarrollo. Oleosomas.

Los triacilglicéridos se acumulan preferentemente en semillas y frutos, aunque se pueden encontrar en todos los tejidos de las plantas.

En las células de las plantas, y particularmente en las semillas, los TAGs se acumulan como pequeñas gotas subcelulares llamadas oleosomas (Frey-Wyssling et al., 1963; Bergfeld et al., 1978) aparecen en forma de esferas con un diámetro de 0,2 a 2,5 μm . El diámetro depende de la especie y también puede estar afectado por factores nutricionales y ambientales. Dentro de la misma semilla el diámetro de los oleosomas varía de un tejido a

otro. La estructura y síntesis de los oleosomas en semillas maduras se ha estudiado intensamente y todavía está sujeto a controversia.

Estudios con microscopía electrónica han demostrado que en las semillas oleaginosas, los oleosomas están rodeados por lo que parece ser una “media unidad” de membrana en lugar de la típica bicapa (Bergfeld et al., 1978; Slack et al., 1980; Wanner et al., 1981). El análisis de los oleosomas indica que su composición es muy variable. En la mayoría de las semillas oleaginosas contienen un 90-95% de TAG, 1-4% de DAG, 1-4% de fosfolípidos y 1-4% de proteínas (Tzen et al., 1993). Sin embargo, en semillas de soja en desarrollo el contenido de proteínas y fosfolípidos es muy superior (García et al., 1988). Por ello, un oleosoma puede describirse como una matriz de TAG rodeada de una monocapa de fosfolípidos, con la parte hidrofóbica interaccionando con los TAGs y la cabeza hidrofílica hacia el citosol. La monocapa de fosfolípidos engloba a unas proteínas específicas de los oleosomas denominadas oleosinas (Huang, 1992). Los fosfolípidos y oleosinas cargan negativamente la superficie de los oleosomas a pH 7,0, lo que impide que éstos se agreguen (Slack et al., 1980).

Como ya se ha dicho, la formación de los oleosomas es una cuestión sujeta a controversia, incluso se ha debatido la participación del retículo endoplasmático en la síntesis de los TAG. Los ácidos grasos, sintetizados en el plastidio y modificados en el citosol, son los que posteriormente formaran los TAGs. Todos los enzimas involucrados en la síntesis de TAG se encuentran en la fracción microsomal de las semillas oleaginosas, probablemente en el RE (Stymne y Stobart, 1987). La última enzima de la biosíntesis de TAG, la diacilglicerol aciltransferasa se localiza en el retículo endoplasmático rugoso, lo que sugiere que éste podría ser el lugar de síntesis de los TAG (Cao y Huang, 1986). Esta localización estaría de acuerdo con la hipótesis que indica que los oleosomas surgen del retículo endoplasmático por vesiculación (Frey-Wyssling et al., 1963; Wanner et al., 1981). Los TAGs, altamente hidrofóbicos, podrían acumularse entre las dos hojas de la membrana del retículo endoplasmático hasta formar una gota de aceite rodeada por una monocapa de fosfolípidos pero todavía unida al RE. Luego, la vesícula llena de aceite se separaría del RE. Otra hipótesis alternativa, es que los TAGs son sintetizados como gotas simples de aceite en un área granular del citoplasma y se rodean de fosfolípidos y oleosinas en una etapa posterior del desarrollo (Huang, 1992). Si los oleosomas nacientes contienen o no oleosinas en esta etapa es una cuestión muy controvertida.

En semillas de soja se estudiaron los cambios en la composición química de los oleosomas durante el desarrollo de la semilla (García et al., 1988). Las proteínas y fosfolípidos disminuyeron y los lípidos neutros aumentaron afectando a la densidad de los orgánulos, que pasó de 1,08 a 0,98 g/cm³. En este trabajo se sugiere que en semillas de soja el primer lugar de síntesis de los TAGs son las membranas microsomales. La rápida acumulación de los TAGs recién sintetizados en los oleosomas in vivo, de acuerdo con los resultados de un sistema in vitro (Stobart et al., 1986) y la presencia de actividad enzimática de síntesis lipídica en los oleosomas (Stobart y Stymne, 1985 a; Ichiara y Noda, 1981; Bergfeld et al., 1978), indican la existencia de una estructura integrada donde los TAG son sintetizados y acumulados. Esto podría responder al modelo propuesto por Wanner et al. (1981) en la que los plastidios y el RE están involucrados en la síntesis de TAG y producción de oleosomas.

Los oleosomas sólo se han asociado a la protección de la integridad de las gotas de grasa en semillas que sufren desecación previa a la germinación, por lo que no se encuentran en tejidos de reserva de frutos como el mesocarpio de aceituna o de aguacate.

4. Participación de los TAG en el metabolismo lipídico.

Los TAGs, como productos finales de la ruta de Kennedy, se han considerado tradicionalmente como compuestos metabólicamente inertes cuya función era únicamente la de servir de material de reserva durante la germinación. Este concepto está cambiando gracias a distintos trabajos en los que se involucra a los TAGs en el metabolismo activo de los lípidos. Algunos de estos trabajos son los que se comentan a continuación.

Kohn y colaboradores (1994), estudiaron la biosíntesis de dos ácidos acetilénicos, en el hongo *Ceratodon purpureus* (Hedw.), el ácido 9,12-octadecadien-6-inoico (18:2 A) y el ácido 9,12,15-octadecatrien-6-inoico (18:3 A), que son los principales componentes de sus TAGs. La principal ruta de biosíntesis del 18:3 A fue la desaturación del 18:2 A, que se encuentra exclusivamente en TAG. Por otra parte, Garcés y colaboradores (1994) sugirieron que el oleato de TAG se utilizó para sintetizar linoleato en respuesta a las bajas temperaturas, en semillas de girasol en desarrollo. Khozin et al. (1997), demostraron la participación de los grupos acilos de los TAG en la síntesis de los lípidos cloroplásticos en el alga roja *Porphyridum cruentum*.

Los resultados de estos trabajos se pueden explicar según dos hipótesis, la desaturación directa de los grupos acilo en los TAGs o el intercambio de acilos entre TAG y PC donde se produciría la desaturación y el retorno de los acilos modificados a los TAGs. Teniendo en cuenta que la PC se considera como el principal sustrato para la desaturación en los carbonos 12 y 15 de los ácidos grasos, parece más probable la segunda hipótesis.

Mancha y Stymne, (1997) demostraron que los microsomas de ricino catalizan el remodelado de especies de TAGs, de forma que el ricinoleato es reemplazado por acilos no hidroxilados provenientes de los lípidos polares, principalmente PC. En microsomas preincubados con sustratos radiactivos ($[^{14}\text{C}]$ G3P y $[^{14}\text{C}]$ ricinoleil-CoA), los TAGs radiactivos con 2 ó 3 grupos ricinoleato se convirtieron en especies de TAGs que contenían uno o ninguno. Aparentemente, este remodelado de TAG tuvo lugar sin gasto energético en forma de ATP o enlaces ricos en energía como acil-CoA y sólo estuvieron implicados los TAGs asociados a las membranas microsomales de los tejidos del endospermo. Los autores postulan la existencia de dos conjuntos distintos de especies de TAGs, en oleosomas y en microsomas. Las principales especies radiactivas de TAGs en los oleosomas fueron los 3HO-TAG (54,5%), mientras que en los microsomas sólo suponían el 13% (Mancha y Stymne, 1997). También en semillas de girasol en desarrollo se ha postulado la existencia de dos conjuntos diferentes de TAGs (Garcés et al., 1994; Mancha et al., 1995).

Experimentos previos con microsomas de cártamo habían demostrado que los TAGs se formaban a partir de DAG en ausencia de acil-CoA y, por tanto, no había acilación directa a través de la diacilglicerol aciltransferasa (Stobart y Stymne, 1985 a), si bien no se pudo dar ninguna explicación a este hecho. Posteriormente se demostró que microsomas de cotiledones inmaduros de cártamo catalizaban la interconversión de los lípidos neutros, MAG, DAG y TAG con ácidos grasos del conjunto de acil-CoA citoplasmático, bajo condiciones en las que no había acilación directa del esqueleto de glicerol. Las membranas se incubaron con lípidos neutros marcados en el esqueleto de glicerol o en los acilos. Los $[^{14}\text{C}]$ DAG produjeron TAG, MAG y PC y los $[^{14}\text{C}]$ TAG originaron DAG, pero en menor extensión. Los $[^{14}\text{C}]$ MAG fueron rápidamente convertidos en TAG y DAG. La formación de TAG a partir de DAG ocurrió en ausencia de acil-CoA y por tanto sin la intervención de la diacilglicerol aciltransferasa, y los MAG no fueron esterificados por la acilación directa de acil-CoA. Los autores proponen que estas reacciones están catalizadas por una

diacilglicerol: diacilglicerol transacilasa que da lugar a TAG y MAG, siendo la reacción reversible (Stobart et al., 1997). Una reacción de transacilación similar se ha descrito en microsomas del intestino de rata, que está involucrada en la síntesis neta de MAG y TAG (Lehner y Kuksis, 1993).



diacilglicerol : diacilglicerol transacilasa

Figura 15. Reacción de transacilación catalizada por la diacilglicerol: diacilglicerol transacilasa y que implica la participación de DAG, TAG y MAG.

La formación de DAG a partir de los TAG preexistentes permitiría el enriquecimiento de los TAG en ácidos poliinsaturados, ya que los DAG se intercambian con la PC, que es el sustrato de la desaturasa. Por otro lado, se produciría un aumento del oleato disponible el cual, una vez desaturado, podría incorporarse al conjunto de acil-CoA y utilizarse para la síntesis de TAG y otros lípidos.

Los MAG están implicados en la síntesis de grasas en algunos tejidos animales (Yang y Kuksis, 1991), pero no hay información sobre su participación en la biosíntesis de TAG en plantas. En el mencionado trabajo de Stobart et al., (1997) se estudió el metabolismo de los MAG marcados en el glicerol o en el acilo en preparaciones microsomales de cártamo. La radiactividad apareció, después de la incubación, en TAG, DAG, PC y LPC, y también como ácidos grasos libres, cuando el sustrato estaba marcado en el acilo. Con el fin de aclarar estos datos se incubaron microsomas de cártamo con TAG radiactivos con y sin MAG no radiactivos. Se encontró radiactividad en PC y DAG. La adición de MAG aumentó la incorporación de radiactividad en DAG, y esta incorporación dependió de la concentración de MAG. En PC también aumentó la radiactividad, posiblemente a través de la interconversión con DAG. Sin embargo, la concentración 1mM de MAG parece ser inhibidora de esta interconversión PC-DAG, ya que la radiactividad en PC descendió en un 60% comparada con las incubaciones con 0,5 mM de MAG. Los resultados sugieren que la fosfocolina podría transferirse de la PC a los MAG para dar la LPC que es rápidamente acilada con acil-CoA en los microsomas (Stymne y Stobart, 1984 b; Sperling y Heinz, 1993). Podría concluirse que los enzimas microsomales presentes pueden catalizar la

síntesis neta de TAG sin actividad diacilglicerol aciltransferasas y sin acumulación de MAG.

Esta hipótesis se resumen la siguiente figura.

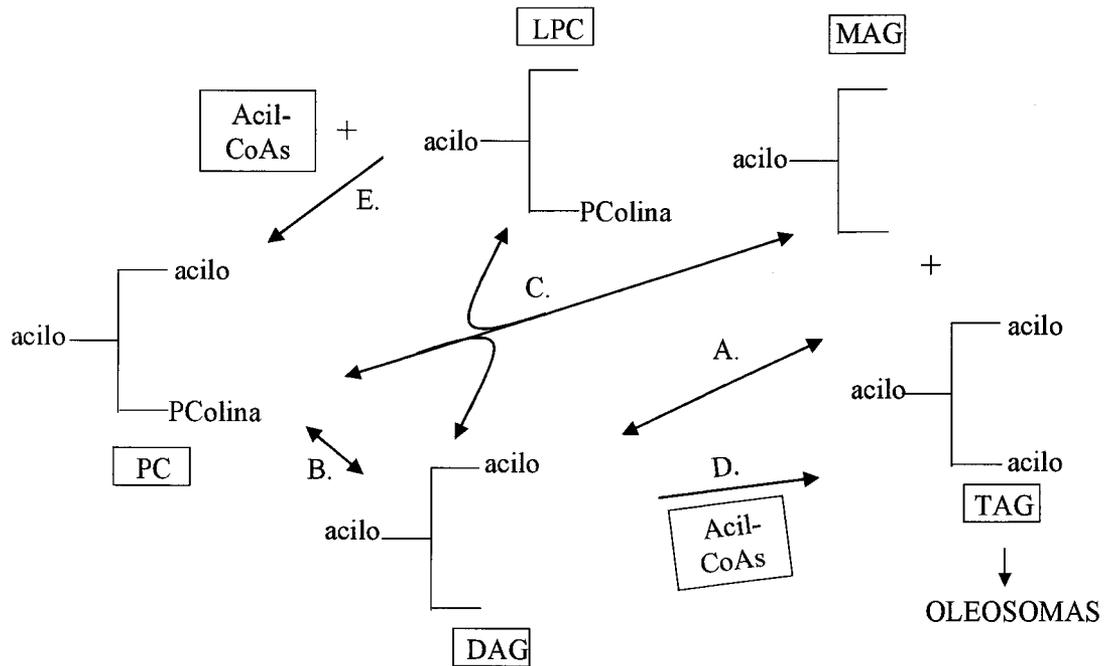


Figura 16. Reacciones que involucran a la fosfatidilcolina y a los lípidos neutros microsomales.

Se requiere:

- Reacción A: transacilación reversible entre dos moléculas de diacilglicerol que da lugar a un monoacilglicerol y un triacilglicerol.
- Reacción B: interconversión entre el diacilglicerol y la fosfatidilcolina (catalizada por la colina fosfotransferasa).
- Reacción C: transferencia de fosfocolina de la fosfatidilcolina a un monoglicérido para producir un diacilglicérido y una molécula de lisofosfatidilcolina (catalizada por la colina fosfotransferasa).
- Reacción D: el diacilglicérido puede ser acilado por un acil-CoA para producir un triacilglicérido (catalizada por la diacilglicerol aciltransferasa).
- Reacción E: la lisofosfatidilcolina es acilada por un acil-CoA para obtener una fosfatidilcolina (catalizada por una lisofosfatidilcolina aciltransferasa).

Las reacciones A y B, permiten la entrada de grupos acilos del triacilglicérido a la fosfatidilcolina para su desaturación y así enriquecer el conjunto de acil-CoAs citoplasmáticos y el conjunto de DAGs con ácidos grasos insaturados.

En conclusión, estos resultados demuestran la existencia de movimientos de acilos y esqueletos de glicerol entre los lípidos, en preparaciones microsomales de semillas de cártamo en desarrollo. Aún no está establecida la relevancia fisiológica de estas reacciones, pero ofrecen posibles explicaciones bioquímicas para los nuevos datos obtenidos *in vivo* sobre el metabolismo de TAG en tejidos de planta oleaginosas (Garcés et al., 1994; Khon et al., 1994; Khozin et al., 1997). De estos trabajos se deduce que los TAGs, al menos en algunas plantas oleaginosas, participan activamente en el metabolismo lipídico durante el período de deposición de lípidos y no sólo son la reserva de energía durante la germinación.

VI. EFECTOS DE LA DISPONIBILIDAD DE OXÍGENO.

El desarrollo y la germinación de las semillas son estados fisiológicos distintos. El metabolismo del desarrollo de la semilla es anabólico, y se caracteriza por la masiva síntesis y deposición de reservas en los tejidos de almacenaje. La germinación es un proceso catabólico, en el cual se movilizan las reservas almacenadas (Lehninger, 1993).

Los efectos del oxígeno en la germinación de las semillas son complejos y no siempre bien conocidos, pero se conoce bastante menos de su influencia en el desarrollo de las semillas.

1. Control de la germinación de las semillas por la disponibilidad de oxígeno.

En el suelo, las semillas están expuestas a varios factores, incluyendo temperatura, hongos, atmósfera del suelo (disponibilidad de oxígeno) y luz, los cuales pueden actuar independientemente o en común para regular la germinación y posteriormente el crecimiento de las semillas.

Las semillas no pueden germinar en condiciones ambientales no favorables, tales como temperaturas demasiado altas o bajas, o una concentración de oxígeno demasiado baja. Normalmente, las semillas permanecen viables en un estado inactivo y germinan cuando las condiciones ambientales mejoran. Por otro lado, muchas semillas no pueden germinar, incluso en condiciones aparentemente favorables, durante un largo período denominado dormancia. La imposibilidad de germinar puede deberse al propio embrión o a la acción inhibitoria de la cubierta, debido a que ésta sea completamente impermeable al agua o porque prive al embrión del oxígeno (Corbineau y Côme, 1995).

Solamente, se conocen en la literatura 6 especies de plantas que germinan bajo anoxia: 4 especies de *Echinochloa*, *Oryza sativa* y *Erythrina caffra*. Distintas especies acuáticas germinan mejor bajo concentraciones de oxígeno reducidas que en aire. Sin embargo, en la mayoría de las especies las semillas no germinan cuando se les priva de oxígeno, la restricción de este gas también evita el crecimiento y desarrollo de las semillas.

La germinación de semillas oleaginosas (girasol, soja, lino) se inhibe completamente cuando la concentración de oxígeno se aproxima al 2%. En cambio, semillas que

almacenan almidón (arroz, maíz, trigo), pueden germinar en atmósferas con menos del 1% de oxígeno (Al-Ani et al., 1982, 1985).

1.1. Efectos de las envueltas de las semillas en el requerimiento de oxígeno para la germinación.

Las envueltas de las semillas son responsables de la limitación de la difusión del oxígeno hacia el embrión, que además depende de la estructura, el grosor y las propiedades bioquímicas de los tejidos de las envueltas. Esta limitación también depende mucho de la temperatura.

Quitar las envueltas de las semillas permite la germinación de numerosas semillas en hipoxia (Bewley y Black, 1982; Côme, 1982), ya que los embriones aislados requieren menos oxígeno que las semillas intactas. En la mayoría de los casos, los embriones aislados germinan bien en atmósferas con 1% a 3% de oxígeno. Sin embargo, tanto en los embriones como en las semillas intactas, el requerimiento de oxígeno aumenta cuando las temperaturas suben ya que el consumo de este gas por la respiración aumenta y su solubilidad en las fases acuosas decrece (Côme, 1982; Corbineau y Côme, 1995).

Dependiendo de su estructura, las envueltas de las semillas son más o menos permeables a los gases cuando están secas (Corbineau y Côme, 1995). Sin embargo, las cáscaras sumergidas en agua llegan a ser una barrera para la difusión del oxígeno, ya que constituyen una capa continua húmeda alrededor del embrión. El oxígeno tiene que pasar disolviéndose en el agua que rodea la envuelta; el aumento de la temperatura disminuye la solubilidad del oxígeno y por tanto su disponibilidad para el embrión. Además, las cáscaras de muchas semillas contienen grandes cantidades de compuestos fenólicos, cuya oxidación reduce el oxígeno disponible para el embrión (Côme 1982; Corbineau y Côme, 1995). En tales semillas el efecto inhibitorio de las cáscaras aumenta con la temperatura, ya que el oxígeno es menos soluble y la oxidación de los compuestos fenólicos más intensa. Este fenómeno juega un papel importante en la regulación de la germinación por temperatura. La respiración de los microorganismos que crecen en la superficie de muchas semillas también puede estar involucrada en la limitación de la difusión del oxígeno al embrión por competencia con el CO₂ emitido (Heydecker y Chetram, 1971) y la propia respiración de la cáscara, que consume oxígeno.

1.2. Procesos metabólicos relacionados con la privación de oxígeno.

La privación de oxígeno normalmente provoca un descenso en la carga energética e induce la producción de etanol por fermentación. En el caso de semillas oleaginosas en germinación, este descenso parece estar relacionado directamente con la actividad respiratoria. En cambio en semillas que almacenan almidón, la velocidad de respiración ejerce poco control en la germinación porque la incapacidad de germinar a bajas presiones de oxígeno no está asociado con un descenso de la carga energética (Al-Ani et al., 1985).

2. Efecto de la disponibilidad de oxígeno en la desaturación.

2.1. Efecto de la disponibilidad de oxígeno en la desaturación de los lípidos de microorganismos.

La composición de ácidos grasos de los microorganismos varía según las especies, la edad del cultivo, la composición del medio y la temperatura de crecimiento. En *Torulopsis utilis*, se favoreció la síntesis de enzimas desaturasas en anaerobiosis (Meyer y Bloch, 1963), pero no en todos los microorganismos se ha observado lo mismo. En *Candida utilis*, tanto la temperatura de crecimiento como la concentración de oxígeno disuelto influyeron mucho en la síntesis de ácidos grasos, en el grado de insaturación y en la proporción de ácidos grasos de cadena corta, (Brown y Rose, 1969). Se observó una disminución de la síntesis de insaturados en cultivos con tensiones de oxígeno bajas. Este efecto se explica por la necesidad del oxígeno como cosustrato en las reacciones de desaturación.

En cultivos de células de *Acer pseudoplatanus* L. se observó que la temperatura de cultivo no tuvo prácticamente ningún efecto en la composición de ácidos grasos (Rebeille et al., 1980). Pero, de acuerdo con la hipótesis de Harris y James (1969, a, b) y Stumpf y James (1963), se observó que la concentración de oxígeno en disolución tiene un papel fundamental en la composición de ácidos grasos poliinsaturados de estas células. Las condiciones de aireación durante el crecimiento del cultivo celular afectó a la composición de ácidos grasos de los lípidos totales de *Acer pseudoplatanus* L. Con concentraciones de oxígeno bajas (por debajo de 60 μM) el porcentaje de oleato aumentó fuertemente, mientras que el de linoleato disminuyó. La aireación del medio de cultivo indujo una rápida transformación de oleato a linoleato (con concentraciones de oxígeno de 250 μM).

Estos resultados arrojan dudas sobre la importancia de la temperatura en el grado de insaturación de los ácidos grasos de las células de *Acer pseudoplatanus* L., pero confirman que la formación de ácidos grasos insaturados por células de plantas está controlada por la disponibilidad del oxígeno en disolución. En 1996, Avery y colaboradores, estudiaron en *Acanthamoeba castellanii*, la influencia del oxígeno disuelto en la actividad $\Delta 12$ -desaturasa. Los resultados obtenidos demostraron que la disponibilidad de oxígeno puede regular la síntesis de novo del enzima y también puede afectar directamente a la actividad del enzima preexistente. Además, esto ocurre independientemente de los cambios de temperatura, (Avery et al., 1996). Estos resultados se han confirmado posteriormente en el trabajo de Thomas et al., (1998), donde se demuestra que la actividad enzimática puede ser regulada por el O₂, independientemente de la temperatura.

Es importante destacar que entre las reacciones que provocan modificaciones en los ácidos grasos, no todas requieren oxígeno como cosustrato. Por una parte, pueden existir desaturasas que no están limitadas por oxígeno, incluso a niveles bajos de éste, y por otra parte, la célula puede ser capaz de sintetizar enzima cuando lo necesita para mantener la relación insaturados/saturados necesarios para mantener la fluidez de la membrana. El nivel de ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos de las membranas de *Tetrahymena* no está regulado por el nivel de oxígeno en el medio. A este respecto *Tetrahymena* difiere de levaduras (Brown y Rose, 1969) y plantas superiores (Harris y James, 1969 a, b).

2.2.Efecto de la disponibilidad de oxígeno en la desaturación de los lípidos de plantas.

La síntesis de ácidos grasos poliinsaturados involucra una serie de reacciones de deshidrogenación de la cadena grasa saturada. Estas deshidrogenaciones requieren oxígeno y piridín nucleótidos reducidos.

Algunas plantas aumentan la síntesis de ácidos grasos insaturados al disminuir la temperatura pero este efecto no es general, sino que está limitado a algunas especies. Canvin (1965) demostró que este efecto ocurre en las semillas de colza, girasol y lino, pero no en ricino o cártamo.

Harris y James, (1969, a) estudiaron el efecto del oxígeno en la desaturación de los lípidos de distintos sistemas vivos, tejido del bulbo de narciso, tejido de hojas de ricino y células del alga verde *Chlorella vulgaris*. Los resultados indicaron que en tejidos no fotosintéticos (tejido del bulbo), con una actividad desaturasa fijada, el oxígeno fue el

principal factor limitante en la desaturación de los ácidos grasos. El efecto del descenso de las temperaturas provocó un aumento en la concentración de oxígeno en la disolución, y como consecuencia aumentó la desaturación. El efecto del oxígeno como factor limitante no se observó en los tejidos fotosintéticos en presencia de luz, ya que se produce oxígeno en exceso y sólo se puede observar este efecto en oscuridad. En el tejido del bulbo, la velocidad de formación de ácidos grasos insaturados aumentó al bajar las temperaturas. En este mismo sistema, el oxígeno fue un factor limitante en la síntesis de ácidos grasos insaturados por debajo de los 10°C, el aumento de la concentración de oxígeno no provocó un aumento significativo de la desaturación, indicando que, a esas temperaturas, el oxígeno disponible en la disolución es ya saturante. En cambio, a 20°C y a 30°C, el aumento de la concentración de oxígeno en la disolución provocó un aumento de la desaturación. En el tejido del bulbo cabe esperar entre los 25-35°C, competencia por el oxígeno entre la respiración y la desaturación de ácidos grasos (Harris y James, 1969, a). En otros tejidos no fotosintéticos, como semillas, se pueden esperar resultados similares.

En cártamo, los cambios en la composición de ácidos grasos en respuesta a la temperatura son menores que en otros cultivos oleaginosos. Los ensayos de desaturación del oleato *in vitro*, y también en cotiledones aireados, indicaron que los cambios en la composición de ácidos grasos se debieron a un efecto de la temperatura y no de la concentración de oxígeno, la cual se considera saturante entre 13°-37°C (Browse y Slack, 1983). El aumento de temperatura provocó un aumento en la proporción de oleato y un descenso en la de linoleato en el aceite de semillas de cártamo en desarrollo. La variación en la concentración de oxígeno disuelto en un intervalo de 330-210 μM a temperaturas entre 13°-37°C, no afectó a la velocidad de desaturación en microsomas y cotiledones intactos. Estos resultados sugieren que la distinta respuesta a la temperatura de la síntesis de ácidos grasos y la desaturación de oleato son suficientes para explicar la influencia de la temperatura en la composición de ácidos grasos de cártamo. Los ensayos *in vitro* de la oleato desaturasa estuvieron saturados de oxígeno, pero no se puede determinar con estos resultados si el consumo de oxígeno por la semilla en desarrollo y la difusión a través de la cáscara son suficientes para que la concentración de oxígeno en el sitio de la desaturasa esté por debajo de lo que requiere para que su actividad sea máxima. Es importante tener en cuenta la actividad respiratoria del tejido a cada temperatura y su posible competencia con otras reacciones metabólicas que consumen oxígeno como, por ejemplo, la desaturación de ácidos grasos.

En girasol y ricino, la cantidad de ácidos grasos insaturados sintetizados aumentó con el descenso de la temperatura y con el incremento de la concentración de oxígeno. Estos experimentos mostraron que la concentración de oxígeno controló la velocidad de formación de ácidos grasos insaturados en estas semillas en desarrollo (Harris y James, 1969 b) y la magnitud del efecto dependió del tipo de semilla.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. MATERIALES.

I.1. Material biológico.

En este trabajo se ha utilizado el girasol (*Helianthus annuus* L.) como material biológico, en concreto se ha trabajado con 4 líneas puras, donadas por el Dr. J.M^a. Fernández Martínez (Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Córdoba), de dos fenotipos distintos para la composición de ácidos grasos (Tabla 5).

Tabla 5. Líneas puras de girasol usadas en este trabajo.

LINEA	FENOTIPO (Composición de Ác. Grasos)
RHA-274	Normal
HA-OL9	Alto Oleico
CAS-6	Normal
CAS-9	Alto Oleico

La línea RHA-274 es una línea pública. La línea HA-OL9 fue obtenida por Fernández-Martínez et al. (1987), mediante cruces de una línea normal con el mutante alto oleico "Pervenets" (Soldatov, 1976). Las líneas CAS-6 y CAS-9 son isogénicas; la línea CAS-9 se obtuvo cruzando CAS-6 con material alto oleico y seleccionando para este carácter. La línea RHA-274 se usa como parental masculino de híbridos, actuando como restauradora de la fertilidad. Las otras tres líneas son mantenedoras de la esterilidad citoplasmática masculina (CMS) y se emplean para propagar la línea que actúa como hembra sin polen. Estas líneas son fértiles y autocompatibles.

I.2. Condiciones de cultivo.

Las semillas de girasol se sembraron en placas de petri con vermiculita expandida y se mantuvieron húmedas y en oscuridad a 25°C durante 2-3 días hasta que germinaron. A continuación se trasplantaron a macetas pequeñas con turba durante 2-3 semanas. Finalmente, fueron trasplantadas a macetas mayores, con una mezcla de turba y vermiculita al 50%.

El crecimiento se realizó en cámaras de cultivo con fotoperíodo controlado de 16 h. día / 8 h. noche. Las plantas crecieron a 25/15°C ó 20/10°C (día/noche) o a una temperatura constante a partir de los 8 DDF. La iluminación se hizo con tubos fluorescentes que

producen una densidad de flujo de fotones de $300 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. El riego se realizó de forma automática con una frecuencia de tres riegos diarios de 2-3 minutos de duración. El abonado se hizo con un abono líquido completo, Bayfolan S (Bayer), tres veces por semana. La temperatura de crecimiento varió según el experimento.

En este trabajo se han usado inflorescencias (capítulos) completas o seccionadas, y semillas en desarrollo. La edad de las semillas se expresa como días después de la floración (DDF). Se ha considerado el primer día después de la floración aquel en el que se han abierto los 2-3 primeros círculos de túbulos florales. Se ha usado el término semilla pelada para designar los aquenios desprovistos de la membrana seminal y la cáscara.

II. MÉTODOS.

II.1. Métodos generales.

II.1.1. Extracción de lípidos totales.

La extracción de los lípidos totales se realizó según el método de Hara y Radin (1978), con modificaciones. Se añade a la muestra una mezcla de hexano: isopropanol (3:2, v/v), en una proporción aproximada de 2 ml por 100 mg de tejido. Las muestras de tejidos intactos se trituran en un mortero o en un tubo de vidrio con la ayuda de una varilla de vidrio y un poco de arena de mar lavada, con el disolvente. En el caso de la extracción de lípidos totales de fracciones subcelulares, es suficiente con agitar la mezcla por sonicación, colocándola durante 10 minutos en un baño ultrasónico. A continuación, se añade a la muestra la mitad del volumen inicial de una disolución de sulfato amónico al 6,7%, se agita y se centrifuga a 2000 rpm durante 10 minutos. Se consigue así la separación de dos fases. En la superior se encuentran los lípidos totales, en una mezcla de hexano-isopropanol, en la inferior se quedan las sustancias hidrofílicas, en una mezcla isopropanol-agua y en el fondo quedan los restos del tejido triturado. La capa superior se pasa a otro tubo y la capa inferior se reextrae con una mezcla de hexano: isopropanol (7:2, v/v), se vuelve a agitar y centrifugar en las mismas condiciones. Se obtiene así, una nueva fase lipídica que se mezcla con la que se extrajo en primer lugar.

Los lípidos totales extraídos se disolvieron en un pequeño volumen de hexano: isopropanol (3:2, v/v) y se guardaron en atmósfera de nitrógeno a -20°C , de esta forma se pueden conservar durante semanas.

Todos los disolventes usados para la extracción, separación y análisis de los lípidos llevan butilhidroxitolueno (BHT) al 0.01% como antioxidante para evitar la oxidación de los lípidos.

II.1.2. Metilación de los lípidos.

Para analizar la composición de ácidos grasos de los lípidos, se obtuvieron los correspondientes ésteres metílicos, mediante un proceso de transesterificación. La metilación de los ácidos grasos de mezclas de lípidos o lípidos aislados se realizó añadiendo 3 ml de una mezcla de metanol: tolueno: ácido sulfúrico (88: 10: 2, v/v), y calentando en un tubo herméticamente cerrado, a 80°C durante 1 hora (Garcés y Mancha, 1993). Los ésteres metílicos formados se extrajeron con 1 ml de heptano, para facilitar la separación de fases se añadió 1 ml de agua y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos. Para la obtención de los ésteres metílicos directamente de la semilla se usó el método de extracción y metilación rápida en un solo paso, utilizando como reactivo una mezcla que contenía metanol: heptano : tolueno: dimetoxi-propano : ácido sulfúrico (39: 48 : 10: 2 : 1, en vol.), (Garcés y Mancha, 1993).

II.1.3. Determinación del contenido en lípidos.

II.1.3.1. Determinación del contenido en lípidos usando patrón interno.

Este método permite determinar el contenido lipídico en muestras pequeñas aprovechando las operaciones de extracción, metilación y análisis de ácidos grasos por GLC. Para ello se utilizó ácido heptadecanoico (17:0), como patrón interno ya que no se encuentra presente en ninguna grasa natural.

Se prepararon disoluciones de este ácido, con concentraciones conocidas y exactas. Se preparó una disolución 166 mM de 17:0 en hexano: isopropanol (3:2, v/v) que se adicionó a las muestras antes de la extracción de los lípidos totales, para que sufriera los mismos procesos que los restantes lípidos de la muestra. A las muestras de semillas, previamente pesadas, se añadió un volumen adecuado, de forma que el ácido heptadecanoico representara aproximadamente el 20% del total de ácidos grasos de la muestra. Luego, se extrajeron y metilaron los lípidos totales, por el procedimiento ya descrito, y se analizaron por cromatografía de gases. El ácido heptadecanoico presentó un tiempo de retención intermedio entre el ácido palmítico (16:0) y el ácido esteárico (18:0). A partir del porcentaje de ácido heptadecanoico, se puede calcular la riqueza grasa y la cantidad neta de un determinado ácido graso presente en la muestra. Disoluciones más diluidas se adicionaron a los distintos lípidos neutros y polares (TAG, DAG, LP totales, PC, PE, PI), una vez que éstos se separaron mediante cromatografía en placa fina, antes de ser metilados. Para los TAG se preparó una disolución 148 mM de 17:0 y para el resto de los lípidos una disolución 7,4 mM, ambas en tolueno. Luego, se analizaron mediante



cromatografía gaseosa y, a partir del porcentaje de ácido heptadecanoico, se calculó el contenido de los distintos lípidos en la muestra.

II.1.3.2. Determinación del contenido en lípidos con Söxhlet.

La determinación del contenido lipídico de algunas muestras se realizó por gravimetría tras la extracción con éter etílico en aparato Söxhlet. Este es el método de referencia para la determinación del contenido graso en muestras sólidas. En primer lugar las semillas peladas se pesaron en balanza de precisión y se trituraron en un mortero con sulfato sódico anhidro en exceso y la pasta que se obtuvo se puso en un cartucho de papel de filtro. El cartucho se colocó en el cuerpo superior y el disolvente en el matraz inferior, pesado previamente. Éste se calienta y los vapores ascienden por un tubo lateral y condensan en el refrigerante, cayendo sobre el sólido.

El disolvente impregna el sólido que se encuentra dentro del cartucho, a medida que el depósito superior se va llenando. Cuando el líquido alcanza la parte alta del tubo lateral, el depósito superior se vacía completamente por efecto “sifón” (Villarrosa, 1975). Después de 4 horas de extracción, se evaporó el disolvente y se pesó de nuevo el matraz. De esta forma, se puede calcular la riqueza grasa de las semillas.

II.2. Métodos cromatográficos de separación de lípidos.

II.2.1. Cromatografía en capa fina.

La cromatografía en capa fina (CCF), es una técnica muy utilizada para la separación e identificación de mezclas complejas de lípidos en sus distintos componentes (revisión en Fried, 1991). Se basa en la distinta adsorción de los lípidos al soporte sólido y en la distinta solubilidad en la fase líquida móvil. Permite obtener buenos resultados de forma relativamente simple y con un equipo mínimo. Los análisis son rápidos, se pueden analizar varias muestras simultáneamente y usar patrones al mismo tiempo. Además, es posible visualizar los productos separados por distintos métodos de revelado, y los cromatogramas obtenidos se pueden registrar y guardar. También se pueden recuperar los productos para futuros análisis. Por ello, se usa esta técnica con fines preparativos o analíticos. El procedimiento consiste en aplicar una mezcla de lípidos a un adsorbente que se encuentra soportado sobre una placa de vidrio. Luego, se coloca la placa en una cubeta que contiene el disolvente, éste sube por capilaridad y permite separar los distintos componentes de la mezcla por migración diferencial (Henderson y Tocher, 1992).

Se han utilizado placas de gel de sílice con un tamaño de partícula entre 10-15 μm . Antes de usar las placas se activaron a 110°C, durante 1 hora. Se han usado placas preparadas en el laboratorio y compradas a casas comerciales. Las placas preparadas fueron de 20 x 20 cm y 0,25 mm de espesor. Para hacer las placas se preparó una papilla con una parte de gel de sílice (Kieselgel-60, Merck) y dos de agua, que se extendió sobre placas de vidrio de forma uniforme. Luego, se secaron al aire y se activaron en una estufa a 110°C durante 1 hora. Las placas compradas fueron de 10 x 20 cm o 20 x 20 cm y 0,25 mm de espesor, con un tamaño de poro de 60 Å, de Merck, Whatman y Macherey-Nagel, y también se activaron antes de usarlas. Para usos específicos se han empleado placas de sílice impregnadas de nitrato de plata o sulfato amónico. La preparación de estas placas consistió en impregnar las placas comerciales de 20 x 20 con una disolución del producto correspondiente y posterior activación:

- 10 ml de disolución de nitrato de plata al 0,1% en acetonitrilo. Estas placas se utilizaron para separar los lípidos según el grado de insaturación, ya que los iones de plata forman complejos con los dobles enlaces de los ácidos grasos, (Christie, 1982).
- 12 ml de disolución de sulfato amónico al 2% en agua: acetona (1:1, v/v). Las placas impregnadas con sulfato amónico se utilizaron para la separación de lípidos polares (Khan y Williams, 1977).

La movilidad de los lípidos en la cromatografía en capa fina se ve afectado por diversos factores externos, como la temperatura ambiente, las variaciones de temperatura, la humedad, etc. Por esta razón se usaron patrones externos que se colocan al lado de las muestras. Para los lípidos neutros se utilizaron como patrones los productos de la hidrólisis de aceite de oliva o girasol con lipasa pancreática de cerdo (ver apartado II.2.1.7). En el caso de los lípidos polares se usaron patrones de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol, adquiridos de SIGMA.

II.2.1.1. Detección e identificación de las bandas.

Después del desarrollo, las placas se trataron con distintos métodos para revelar la posición de los lípidos.

Método destructivo:

Pulverizando la placa con un oxidante fuerte, como es el ácido sulfúrico al 50% en agua, y luego calentándola en una placa calefactora. Los lípidos desarrollan colores característicos y finalmente color negro por carbonización.

Métodos no destructivos:

- A) Pulverizando la placa con 2,7-diclorofluorosceína al 0,2% en etanol y revelando bajo luz U.V. para observar las bandas fluorescentes.
- B) Revelando con vapor de yodo. Para ello se coloca la placa en una cubeta cerrada que contiene yodo en el fondo. Parte de la placa se cubre con otra de cristal, de forma que se deje fuera una parte de ésta o bien los patrones externos para que se tiñan y, de esta forma, identificar las bandas.
- C) Con un detector lineal de radiactividad, cuando las muestras contienen productos radiactivos (ver apartado II.4.2.2.).

II.2.1.2. Separación de los lípidos neutros y polares.

Para separar los lípidos neutros y polares, se puso una alícuota de los lípidos totales en una placa, preparativa o analítica, de gel de sílice activada. La placa se desarrolló con una mezcla de hexano: éter dietílico: ácido fórmico (75:25:1, v/v/v), (revisión Christie, 1982). Con este desarrollo los lípidos polares no se mueven del origen, mientras que los lípidos neutros suben tanto más cuanto más apolares sean. Así se separan, contando desde el origen, lípidos polares, monoacilglicéridos, diacilglicéridos, ácidos grasos libres y triacilglicéridos. Se usaron como patrones la mezcla de productos obtenidos de la lipólisis (ver apartado II.2.1.7.) de una muestra de aceite de girasol. Cuando la cromatografía se hizo con fines preparativos las bandas se rasparon de la placa con una espátula. En algunos casos los lípidos se metilaron directamente sin eliminar la sílice. Cuando interesaba recuperarlos, se eluyeron los lípidos de la sílice mediante una pequeña columna. Para eluir los triacilglicéridos se añadió éter etílico y, para los lípidos polares, una mezcla de cloroformo: metanol (2:1, v/v). Luego se evaporó el disolvente bajo N₂ y los lípidos se disolvieron en un pequeño volumen de hexano: isopropanol (3:2, v/v). El revelado de las placas se hizo con uno de los métodos no destructivos descritos anteriormente (apartado II.2.1.1.).

II.2.1.3. Separación de los distintos lípidos polares.

Para la separación de los lípidos polares en sus distintos componentes se parte, bien de una alícuota de lípidos totales o de los de lípidos polares totales que se habían obtenido previamente por CCF preparativa.

Se han usado dos tipos de desarrollo para los lípidos polares:

- A). Cloroformo: metanol: ácido acético: agua (85:15:10:3,5 v/v/v/v), (Mancha, 1974). Para este desarrollo, se usan placas de gel de sílice sin ningún tratamiento especial. Se separan, contando desde el origen, fosfatidilinositol, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina.

B). Acetona: benceno: agua (90:30:10, v/v/v), (Khan y Williams, 1977).

Para este desarrollo, se utilizan placas de gel de sílice impregnadas con sulfato amónico. Se separan desde el origen, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina. Este desarrollo es muy adecuado para separar PC.

Para la identificación de las bandas de lípidos polares se utilizaron patrones de esos mismos lípidos adquiridos a SIGMA. El revelado se hizo por los métodos citados anteriormente.

II.2.1.4. Separación combinada de lípidos neutros y polares.

En algunos casos, se realizó una separación combinada de lípidos neutros y polares, en una sola cromatografía en placa fina (Mancha, 1975). Los lípidos totales, disueltos en un pequeño volumen de hexano: isopropanol (3:2,v/v), se pusieron en una placa y se hicieron dos desarrollos. En primer lugar, se desarrolló la placa con una mezcla de hexano: éter dietílico: ácido fórmico (75:25:1, v/v/v). Así se logra que los lípidos más apolares se separen de los polares, que quedan en el origen. Se desarrolla la placa hasta prácticamente el borde de la misma, de forma que los diacilglicéridos queden en la mitad superior de la placa. A continuación, se saca la placa de la cubeta de desarrollo y se deja secar. Se hace un revelado no destructivo con vapores de yodo, para localizar las bandas de los lípidos neutros (triacilglicéridos, diacilglicéridos y ácidos grasos libres). Si la placa tiene fines preparativos, una vez identificados se pueden raspar de la placa para su análisis, o bien se dejan en la misma y se raspan al final de la cromatografía. Luego, se hace el segundo desarrollo, con cloroformo: metanol : ácido acético: agua (85:15:10:3.5, v/v/v/v). Se desarrolla la placa hasta la mitad, justo antes de llegar a la posición de los diacilglicéridos. Se hace el revelado de las bandas con vapores de yodo para localizar e identificar las bandas correspondientes a los principales lípidos polares.

II.2.1.5. Separación de los distintos ácidos grasos.

Para la separación de los ácidos grasos, por su grado de insaturación, se utilizaron placas de gel de sílice impregnadas con nitrato de plata (Christie, 1982). Como ya se ha dicho, los iones de plata forman complejos, de distinta estabilidad, con los dobles enlaces de los ácidos grasos, lo que permite separar los lípidos según su grado de insaturación. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se colocan en las placas y se desarrollan con una mezcla de hexano: éter dietílico (85:15, v/v). Con este desarrollo se consigue la separación de los ácidos grasos en el siguiente orden, contando desde el origen, trienos, dienos, monoenos y saturados. Esta técnica se ha usado con fines analíticos, para la separación de

los ácidos oleico y linoleico, marcados radiactivamente. La cuantificación se hizo con el detector lineal de radiactividad y con el contador de centelleo líquido.

II.2.1.6. Separación de los principales lípidos de la semilla mediante columnas de sílice.

Esta técnica es una cromatografía de adsorción, con una fase estacionaria sólida que contiene ácido silícico al que se añade un 20% de celita para facilitar la filtración. La fase móvil la forman los distintos disolventes utilizados. Primero se activa la mezcla de ácido silícico y celita a 110°C durante 1 hora. Se pesan 0,5 g. de la mezcla y con ayuda de 3 ml de hexano: éter etílico (9:1, v/v), se coloca en una pequeña columna y se deja decantar. Los lípidos totales disueltos en 2 ml de hexano: éter etílico (9:1, v/v), se pasan por la columna. Se hace un primer lavado con 8-10 ml de hexano: éter etílico (9:1, v/v), con lo cual se eluyen los triacilglicéridos, que se recogen en un tubo de ensayo. Después, se hace un segundo lavado con 8 ml de hexano: éter etílico (2:1, v/v) para eluir los diacilglicéridos, que se recogen en otro tubo. Finalmente, se lava la columna con 8 ml de cloroformo: metanol (1:2, v/v), y se obtienen los lípidos polares. Se evapora el disolvente y los productos obtenidos se disuelven en un pequeño volumen de hexano: isopropanol (3:2,v/v). Posteriormente, se puede analizar la composición de ácidos grasos de cada fracción. Los lípidos polares se pueden separar, en su caso, mediante cromatografía en capa fina.

II.2.1.7. Separación de los distintos productos de la hidrólisis parcial con lipasa pancreática. Análisis posicional de los ácidos grasos en los triacilglicéridos.

Para el análisis posicional de los ácidos grasos de los triacilglicéridos se hizo una hidrólisis parcial con lipasa pancreática, según el método de Luddy et al. (1964) modificado por Mancha (1975). Se hidrolizan específicamente los acilos de las posiciones sn-1 y sn-3. El procedimiento consiste en añadir a unos 10 mg de triacilglicéridos, 1 mg de lipasa pancreática de cerdo, 1ml de tampón Tris-HCl (tris-hidroximetil-aminometano) 1 M pH 8, 0,1 ml de una disolución de cloruro cálcico al 22% y 0,25 ml de una disolución de deoxicolato sódico al 0,1%. La mezcla se agita fuertemente durante 2 minutos, se añaden 0,5 ml de ácido clorhídrico 6 N, para romper los jabones formados, y 1 ml de éter dietílico para extraer los productos. Los productos de la hidrólisis son los ácidos grasos libres procedentes de las posiciones sn-(1+3), los 2-monoacilglicéridos, los 1,2 y 2,3-diacilglicéridos que no han sido totalmente hidrolizados y los triacilglicéridos no hidrolizados (Figura 17). Estos productos se separan mediante cromatografía en capa fina, usando placas de gel de sílice desarrolladas con hexano: éter dietílico: ácido fórmico

(75:25:1, v/v/v). Así, se separan los productos antes mencionados en el siguiente orden, contando desde el origen, MAG, DAG, AGL y TAG. Se rasparon los 2-monoacilglicéridos, cuyos ácidos grasos representan las posiciones sn-2 de los TAG, y los ácidos grasos libres, que representan las posiciones sn-(1+3). Posteriormente, estos productos se metilan y se analizan los ésteres metílicos resultantes mediante cromatografía gaseosa. Cuando los productos estaban marcados con radiactividad, el revelado se hizo con el detector lineal de radiactividad y con el contador de centelleo líquido.

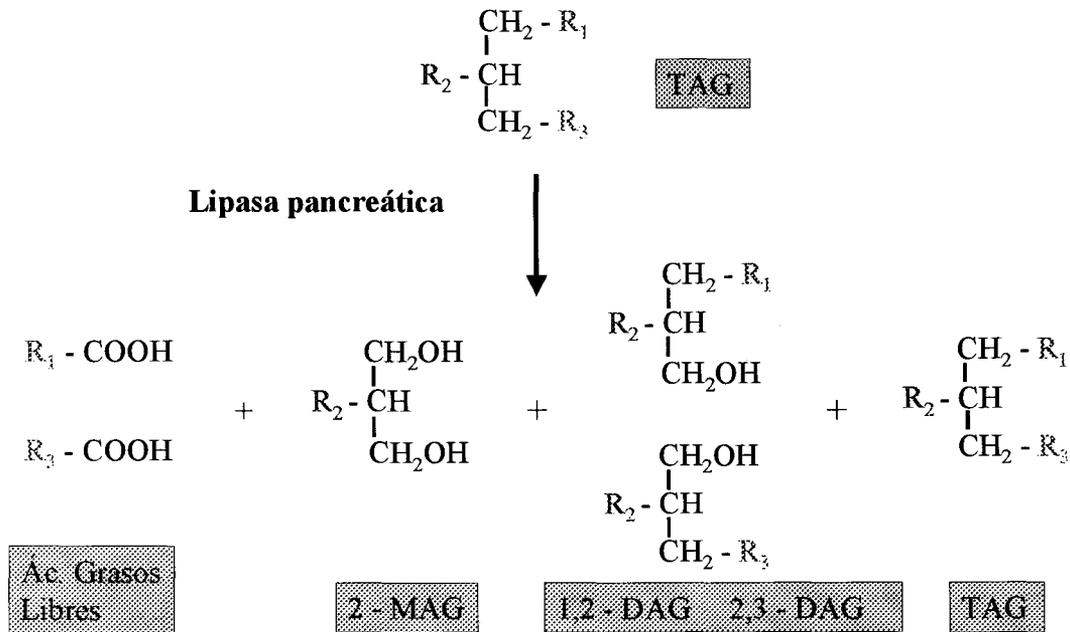


Figura 17. Productos de la hidrólisis parcial de los TAG con lipasa pancreática.

II.2.2. Cromatografía gaseosa .

La cromatografía gaseosa es una cromatografía de partición, en la que los compuestos a separar deben ser volatilizados y arrastrados por una corriente de gas inerte (fase móvil) a través de una columna que contiene la fase estacionaria líquida unida a un soporte sólido (Christie, 1982). Las sustancias se separan según su coeficiente de partición, que depende de su volatilidad y solubilidad en la fase líquida. Se utiliza la cromatografía gaseosa para el análisis de una gran cantidad de sustancias que se volatilizan sin descomponerse. Una de las aplicaciones más importantes de esta técnica es la determinación de la composición de ácidos grasos de los lípidos. Para este análisis es necesario transformar los ácidos grasos en sus ésteres metílicos, ya que estos últimos se volatilizan a temperaturas más bajas y no se descomponen durante el proceso cromatográfico. Para ello se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 A (Palo Alto, CA), con una columna capilar de sílice fundida

(Supelco SP2380, de 30m de longitud, 0,32mm de diámetro interno, y 0,20 μm de grosor de fase) y un detector de ionización de llama. El gas portador fue hidrógeno, con un flujo de 1,34 ml/min. La temperatura del inyector y del detector fue de 220°C, la del horno de 170°C y la razón inyectado/rechazado de 1/50. Los ácidos grasos se identificaron con patrones

También se ha utilizado para el análisis de especies de triacilglicéridos. Las especies de triacilglicéridos se separaron y cuantificaron usando un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 (PALO Alto, CA), con una columna capilar de sílice recubierta de metil 65% fenil silicona (Quadrex Aluminum-clad, de 15 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,1 μm de grosor de fase) y un detector de ionización de llama. La temperatura del detector y del inyector fue de 400°C, mientras que la temperatura en el horno fue un gradiente de 340°C a 355°C con una rampa de 1°C/min y una razón inyectado/rechazado de 1/100. El gas portador fue hidrógeno, con un flujo de 3,6 ml/min. Las especies moleculares de triacilglicéridos fueron identificadas y cuantificadas de acuerdo con Carelli y Cert (1993).

II.3. Obtención del extracto crudo y de las fracciones subcelulares.

II.3.1. Obtención del extracto crudo.

Las muestras (semillas peladas) se trituraron en un mortero pre-enfriado y mantenido a 4°C en un recipiente con hielo, con tampón N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES) 50 mM pH 7,2, sorbitol 0,6 M, ascorbato sódico 40 mM, ácido etilendiamino tetracético (EDTA) 1 mM y sulfato magnésico 1 mM. Los extractos obtenidos se pueden almacenar a -80°C durante semanas. Todos los tampones se prepararon con agua desionizada tipo milli-Q.

II.3.2. Obtención de oleosomas.

Para obtener los oleosomas, el extracto crudo se centrifugó en una centrífuga Sorvall, a 10.000 g, durante 5 minutos a 4°C. Los oleosomas aparecen formando una capa flotante, también aparece un precipitado y el sobrenadante que contiene los microsomas. Los oleosomas se recogen con una espátula, se pasan a un tubo eppendorf y se resuspenden en tampón HEPES pH 7,2, se agitan y se sonicán durante unos minutos. Después esta suspensión se centrifuga a 13793 g, durante 2 minutos. Vuelve a aparecer la capa flotante y un precipitado pequeño. Se eliminan el precipitado y el sobrenadante; se resuspenden de nuevo los oleosomas en tampón y se repite el proceso al menos 3 veces. Después de los

lavados, los oleosomas obtenidos se resuspenden en 0,4 ml de tampón HEPES pH 7,2, se guardan en atmósfera de N₂ a -80°C, para su análisis posterior. En su caso, los lípidos totales se pueden extraer con 1ml de cloroformo: metanol : acético (50:50:1, v/v/v) y recuperando la capa inferior de cloroformo. Los lípidos extraídos se disuelven en un pequeño volumen de cloroformo y son posteriormente analizados.

II.3.3. Obtención de microsomas.

El sobrenadante obtenido después de centrifugar el extracto crudo a 10.000 g durante 5 minutos, y que contiene los microsomas, se centrifuga a 100.000 g durante 1 hora a 4°C, en una ultracentrífuga BECKMAN. Se obtiene un precipitado que son los microsomas. Éstos se resuspenden en tampón HEPES pH 7,2. Se guardan a -80°C, en atmósfera de N₂, o bien se extraen los lípidos con la mezcla cloroformo: metanol : acético (50:50:1, v/v/v). La concentración de proteína de las muestras se determinó según las instrucciones de medida de un preparado comercial de Biorad (Protein Assay) usando como patrón concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina. La concentración final de las muestras se ajustó a 0,5 mg/40µl.

II.4. Incubaciones con sustratos radiactivos.

II.4.1. Preparación de sustratos radiactivos.

II.4.1.1. Preparación de [1-¹⁴C]oleato amónico y [1-¹⁴C]linoleato amónico.

Los ácidos grasos son insolubles en agua, por lo cual, en los experimentos en los que hay que incorporar ácidos grasos radiactivos a los lípidos de las semillas, estos ácidos han de estar en forma soluble, por ejemplo en forma de sales amónicas. Para ello, se toma la cantidad adecuada de solución de ácido [1-¹⁴C]oleico o de [1-¹⁴C]linoleico en etanol (3,7 MBq/ml, 2,1 GBq/mmol, New England Nuclear) y se les añade la cantidad estequiométricamente suficiente de hidróxido amónico 7 N para que la reacción tenga lugar (la reacción ocurre mol a mol). La mezcla se agita y se evapora bajo nitrógeno. La sal amónica formada se disuelve en la cantidad de tampón fosfato pH 7,2 adecuada para obtener la concentración final deseada. Esta concentración se comprueba midiendo la radiactividad en el contador de centelleo líquido.

II.4.1.2. Preparación de [¹⁴C]-oleil-CoA.

En los ensayos “in vitro” con microsomas se usó como sustrato radiactivo [¹⁴C]-oleil-CoA. Este producto es suministrado comercialmente disuelto en acetato sódico 0,01 N: etanol (1:1), (0,74 MBq/ml, 2,2 GBq/mmol, New England Nuclear). Se prepara una disolución en tampón fosfato pH 7,2 que contenga aproximadamente 10.000 DPM/μl. La concentración final se mide en el contador de centelleo líquido.

II.4.1.3. Preparación de MAG radiactivos.

Para obtener los MAG radiactivos se mezclaron 100 mg de aceite de oliva refinado con un volumen adecuado de glicerol tri[1-¹⁴C]oleato (3,70 MBq/ml, 2,26 GBq/mmol, Amersham International plc). A continuación se hizo la lipólisis de los triacilglicéridos. Los productos de la hidrólisis se separaron mediante una cromatografía en capa fina con hexano: éter dietílico: fórmico (75:25:1, v/v/v) como se ha descrito en anteriormente. Los MAG se rasparon de la placa y se pusieron en una pequeña columna de la que se eluyeron con cloroformo: metanol (2:1). El disolvente se evaporó bajo N₂ y los MAG se dispersaron en tampón fosfato pH 7,2 y 100 μl de etanol. Para facilitar la dispersión se sonicaron durante 10 min. La radiactividad obtenida se midió en el contador de centelleo líquido.

II.4.2. Determinación de la radiactividad en lípidos.

II.4.2.1. Contador de centelleo líquido.

Para la medida de radiactividad presente en las muestras de extractos lipídicos se usó un contador de centelleo líquido RackBeta II 1215 (LKB, Sweden) calibrado para calcular las desintegraciones por minuto (DPM) de ¹⁴C. Para realizar la calibración se utilizó un patrón de tripalmitato de glicerol con una radiactividad de 96600 DPM ± 0,2%. Las muestras se colocaron en viales de polietileno de 5 ml de capacidad y se les añadió 3 ml de líquido centelleador suministrado por National diagnostics (Hessle, England). Se midió durante la radiactividad durante 240 segundos.

II.4.2.2. Analizador de radiactividad.

Los lípidos y ácidos grasos marcados radiactivamente y separados por cromatografía en capa fina, se detectaron y cuantificaron mediante un analizador de radiactividad, InstanImager de Packard, que cuantifica la radiactividad distribuida en superficies planas. Tiene como detector un conjunto de microcanales muy eficientes en la detección de

radiactividad y requiere el suministro constante de una mezcla gaseosa de isobutano al 1%, CO₂ al 2,5% en argón. El aparato tiene una sensibilidad de 100 DPM (¹⁴C) en 20 minutos y una resolución de 1-2 mm para el ¹⁴C.

II.4.3. Incubaciones de tejido intacto con sustratos radiactivos.

Un determinado peso o número de semillas se incubaron con solución acuosa de [¹⁴C]-oleato amónico o [¹⁴C]-linoleato amónico, usando tampón fosfato pH 7,2. Se pusieron en baños termostatzados, con agitación constante, y en algunos casos con flujos de gases (aire, O₂ o N₂). El tiempo y la temperatura de incubación variaron según el experimento, pero en todos los casos fue suficiente para permitir la incorporación del sustrato radiactivo a los lípidos del tejido.

Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró la solución radiactiva y se lavó el tejido varias veces con tampón fosfato pH 7,2. Luego, se trituró y se analizaron los lípidos, o bien se prosiguió la incubación sin sustrato radiactivo, poniendo sólo tampón fosfato pH 7,2 (experimentos de pulso y captura).

La incorporación de radiactividad al extracto lipídico total se midió mediante el contador de centelleo. También, se midió la cantidad de sustrato radiactivo en los distintos tipos de lípidos (TAG, DAG, LP), separados mediante CCF en placas analíticas, que se cuantificaron directamente usando el analizador de radiactividad. Los ácidos oleico y linoleico se separaron en forma de ésteres metílicos por CCF, en placas analíticas de nitrato de plata, y los porcentajes de radiactividad de las distintas bandas se cuantificaron directamente usando el analizador de radiactividad (InstanImager).

II.4.4. Incubaciones de microsomas con sustratos radiactivos.

El marcaje de los lípidos microsomales con ¹⁴C se realizó por dos procedimientos diferentes: incubación de microsomas con [¹⁴C]18:1-CoA e incubación previa de las semillas con [1-¹⁴C]18:1 o [1-¹⁴C]18:2 y posterior obtención de los microsomas.

II.4.4.1. Experimentos de incorporación y metabolismo de sustratos radiactivos en microsomas.

Se obtuvieron microsomas de semillas de girasol en desarrollo. Los microsomas se incubaron con [¹⁴C]-oleil-CoA y G-3-P, y se hicieron experimentos de incorporación y de pulso y captura. La temperatura y el tiempo variaron según el experimento.

Para los ensayos se usó la siguiente mezcla de reacción:

Por ensayo: microsomas (0.5mg de proteína), 1.87 nmoles de (¹⁴C)-oleil-CoA (200.000 DPM), 5.6 nmoles de glicerol-3-fosfato, 1 mg de BSA, 0.75 μmoles de cloruro de magnesio (5 mM) y tampón fosfato pH 7.2, en un volumen de reacción de 150 μl.

II.4.4.2.Preparación de microsomas con lípidos radiactivos, después de incubación de la semilla.

Se incubaron semillas peladas con [1-¹⁴C]-oleato amónico o [1-¹⁴C]-linoleato amónico a 10°C o 40°C durante 18 horas, en atmósfera de N₂. Luego se obtuvieron microsomas, cuyos lípidos están marcados radiactivamente. Estos microsomas se utilizaron para estudiar el metabolismo de sus lípidos endógenos con o sin adición de sustratos no radiactivos. La temperatura y el tiempo variaron según el experimento.

Condiciones de reacción.

Las condiciones de los distintos ensayos variaron según el experimento, las incubaciones se hicieron a distintas temperaturas y tiempos. En los experimentos de pulso y captura, después de la primera incubación, los microsomas se precipitaron con 250 μl de tampón fosfato pH 7,2 y cloruro de magnesio 50mM o bien con la ultracentrífuga BECKMAN (100.000g, 30 minutos, 4°C), para eliminar el exceso de sustrato radiactivo y se añadió tampón fosfato pH 7,2 y 0,75 μmoles de cloruro de magnesio, para continuar la incubación. Finalmente, se procedió a la extracción de los lípidos totales de los microsomas, añadiendo a las muestras 250 μl de tampón fosfato pH 7,2 y 1 ml de cloroformo: metanol : ácido acético (50:50:1 por volumen). Después las muestras se agitaron fuertemente y se sonicaron en un baño sonicador, durante 10 minutos. Se separaron las fases centrifugando en la centrífuga eppendorf, durante unos segundos a 13.000 rpm. Se recuperó la fase inferior, que contiene los lípidos y se pasó a otro tubo.

Análisis de los productos de la reacción.

En primer lugar, se midió la incorporación de radiactividad al extracto lipídico total, en el contador de centelleo líquido. Luego, los lípidos neutros y polares se separaron mediante cromatografía en capa fina y las placas se analizaron en el analizador de radiactividad. En algunos experimentos, los lípidos se metilaron y posteriormente se separaron los ácidos oleico y linoleico mediante placas de plata, que se analizaron en el analizador de radiactividad.

II.5. Incubaciones de tejido intacto.

Las incubaciones del tejido intacto se realizaron con semillas en tres situaciones fisiológicas distintas: a) en trozos de capítulo, manteniéndose las semillas insertadas en el tejido esponjoso, b) aquenios aislados, es decir, semillas dentro de la cáscara y c) semillas peladas, libres de la cáscara y de la membrana seminal.

Los trozos de capítulo se pusieron en vasos de precipitado con un poco de agua, para evitar la desecación. Las semillas con cáscara, se pusieron en tubos con agua que las cubriera y un burbujeo constante de gases (aire, N₂ o O₂) o bien con un flujo de aire. Las semillas peladas se pusieron en viales con la cantidad mínima de agua, para evitar la desecación, y se suministró un flujo constante de gases (aire, N₂ o O₂) o bien se pusieron en tubos con agua que las cubriera y burbujeo de esos mismos gases en el agua. Los tubos, vasos de precipitado o viales se pusieron en baños termostatzados con agitación constante. El tiempo y la temperatura variaron según el experimento. Después de las incubaciones, se extrajeron los lípidos totales de las semillas y se analizó la composición de ácidos grasos de los lípidos totales mediante cromatografía de gases. También se separaron los distintos lípidos de las semillas por cromatografía en capa fina.

II.6. Estudio de la disponibilidad de oxígeno en semillas en desarrollo.

II.6.1. Analizador de CO₂ por infrarrojo (LCA-2).

Para medir la tasa respiratoria de las semillas se usó un analizador de gases (LCA-2), que mide el desprendimiento de CO₂ (ppm) en continuo. Este aparato utiliza un detector de infrarrojos. En estos experimentos las semillas peladas se pusieron, con un poco de agua para evitar la desecación, en viales con entrada y salida permanente de gases. Se hicieron experimentos haciendo pasar aire y N₂. Posteriormente se extrajeron los lípidos totales de las semillas y se analizaron mediante cromatografía gaseosa. La temperatura y el tiempo variaron según el experimento.

II.6.2. Utilización de N₂, O₂ y aire en incubaciones con tejido intacto.

En algunos experimentos se hicieron incubaciones de tejidos intactos en las que se suministraron a las muestras flujos de gases (aire, N₂, O₂). El N₂ se utilizó para evitar la desaturación del ácido oleico endógeno de las semillas y del [1-¹⁴C]-oleico durante su incorporación y metabolismo en las incubaciones de tejidos intactos con [1-¹⁴C]-oleato amónico. El aire se utilizó para facilitar la desaturación del ácido oleico en experimentos

con semillas peladas y con cáscara (aquenios). El O₂ se utilizó también para provocar la desaturación del ácido oleico al aumentar la disponibilidad de oxígeno, en incubaciones con semillas peladas y aquenios. En algunos casos los gases se burbujearon en el medio acuoso donde se encontraban las semillas, y en otros las semillas peladas se pusieron, con un poco de agua para evitar la desecación, en viales con entrada y salida permanente de gases.



OBJETIVOS

OBJETIVOS

El presente trabajo es continuación de los que se han venido realizando en el Instituto de la Grasa desde 1989, relacionados con el control de la desaturación del ácido oleico en la semilla de girasol. En su inicio se contaba con el material vegetal adecuado y abundante información, obtenida de estudios anteriores. En especial, se pueden destacar como precedentes:

- a) Los primeros resultados sobre la caracterización bioquímica de la oleato desaturasa en la semilla de girasol convencional y en la del mutante alto oleico, en el cual esta actividad está fuertemente inhibida.
- b) La inducción de la oleato desaturasa a baja temperatura y su inhibición reversible a alta temperatura y
- c) La utilización del oleato almacenado en los triacilglicéridos como sustrato para la desaturación.

Como objeto de explicar estas observaciones se habían desarrollado algunas hipótesis sobre los mecanismos de control por temperatura del proceso de desaturación de oleato. Se admitía que, a baja temperatura, la activación de la oleato desaturasa microsomal preexistente y la síntesis de nuevo enzima permitían la desaturación del oleato que se sintetizando y, en caso de mayor demanda, se utilizaba el que está almacenado en los triacilglicéridos de reserva. Se suponía que, a alta temperatura, se inactivaba el enzima, impidiéndose la desaturación. Sin embargo, los resultados más recientes indicaban que, bajo determinadas condiciones, se podía impedir la desaturación de oleato manteniendo la actividad enzimática y que esta se reducía gradualmente al disminuir la disponibilidad de oxígeno. Por otro lado, nuestros primeros resultados resultaron contradictorios, observándose que el efecto de la temperatura sobre la desaturación de oleato *in vivo* dependía de las condiciones experimentales en las que se incubaban las semillas. Por otro lado, la interesante observación de que el oleato de los triacilglicéridos podía ser desaturado requería un estudio más profundo con objeto de determinar las condiciones en que se produce, su función fisiológica y los mecanismos de intercambio de oleato y linoleato entre lípidos.

En consecuencia nos propusimos abordar los siguientes aspectos, que son los objetivos concretos de este trabajo:

- 1- Reexaminar el efecto de la temperatura sobre la desaturación en la semilla, prestando especial atención a las condiciones experimentales de los ensayos *in vivo*.
- 2- Estudiar la influencia de la temperatura en relación con la síntesis *de novo* de oleato y la utilización del oleato preexistentes en los triacilglicéridos.
- 3- Estudiar la influencia de la temperatura en relación con la disponibilidad de oxígeno por parte de la semilla y la posible competencia entre respiración y desaturación.
- 4- Estudiar el metabolismo de los lípidos de la semilla bajo nitrógeno. Con ello se pretende disponer de metodología para estudiar el metabolismo de los lípidos, y los movimientos de oleato y linoleato entre lípidos, a baja temperatura sin que se produzcan reacciones de desaturación.
- 5- Estudiar la influencia del proceso de desaturación en los movimientos de oleato y linoleato entre lípidos.
- 6- Realizar ensayos *in vitro* encaminados a explicar algunos de los resultados obtenidos *in vivo*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. LÍPIDOS DE LA SEMILLA DE GIRASOL DURANTE SU DESARROLLO. COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS Y EFECTO DE LA TEMPERATURA DE CRECIMIENTO.

En este apartado mostraremos la composición de ácidos grasos de los lípidos totales y de los principales lípidos (TAG, DAG y LP) de la semilla de girasol normal y alto oleico durante su desarrollo, así como de las fracciones subcelulares (microsomas y oleosomas). También se estudiará el efecto de la temperatura de crecimiento sobre la composición de ácidos grasos y, por último, el contenido graso de las semillas en desarrollo. De esta manera conoceremos las características del material de trabajo con el que posteriormente se realizarán los diferentes estudios.

1. Composición de ácidos grasos de los lípidos totales de semillas de girasol normal y alto oleico durante su desarrollo.

El período de formación de las semillas es una fase de duración variable que depende del genotipo de las semillas y de las condiciones ambientales (temperatura, luz, humedad). Durante este período se produce la acumulación del aceite, que sigue una curva sigmoide, con tres fases (Harris et al., 1978). En la primera, los principales lípidos de la semilla son los lípidos de membrana (fosfolípidos y glucolípidos), y sólo hay trazas de TAGs, en girasol esta fase llega hasta los 12-14 DDF. En la segunda fase, se produce la deposición del aceite propiamente dicha, que en girasol dura hasta los 30-35 DDF. Esta es la etapa más activa y en ella se produce la acumulación masiva de TAGs, que se convierten en los componentes mayoritarios >90%, frente a los fosfolípidos y glucolípidos que también se sintetizan en esta etapa, (Robertson et al., 1978). En la última fase termina la acumulación de lípidos, las semillas pierden agua y se alcanza la madurez fisiológica.

Hemos trabajado con semillas en la segunda etapa del desarrollo. Antes de esa edad, la composición de ácidos grasos es similar en los dos genotipos estudiados (normal y alto oleico), puesto que la expresión del carácter alto oleico se inicia, aproximadamente, a los 12 DDF. Por el contrario, en semillas de la segunda etapa se expresa plenamente el carácter alto linoleico (normal) o alto oleico, por lo que la composición es muy diferente (Garcés et al., 1989; Garcés y Mancha, 1989). La evolución de los % de los principales

ácidos grasos en semillas en desarrollo de ambos genotipos, cultivadas a 20/10°C, puede verse en la Figura 18.

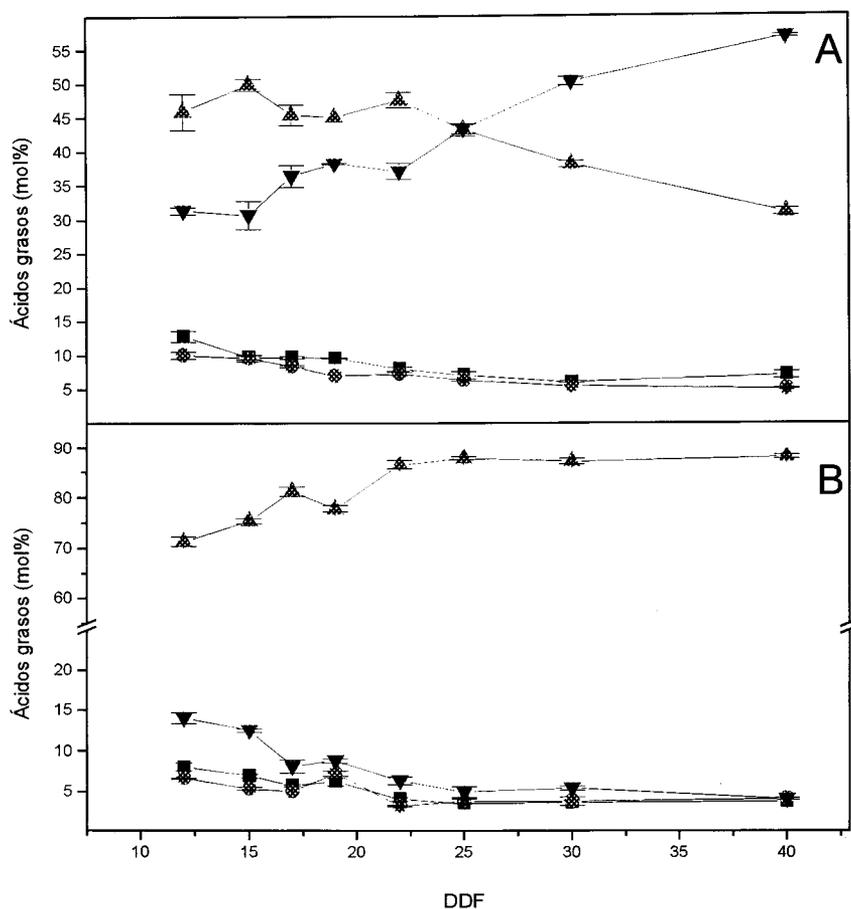


Figura 18. Variación de la composición de los principales ácidos grasos (16:0, ■; 18:0, ●; 18:1, ▲; 18:2, ▼) de los lípidos totales durante el desarrollo de la semilla de girasol convencional (A) y alto oleico (B). Las barras de error reflejan las desviaciones estándar de los 3 experimentos realizados.

En ambos genotipos, los ácidos grasos saturados se encuentran en menor proporción que los insaturados y disminuyen durante el desarrollo de la semilla hasta alcanzar valores en torno al 5-10%. En el girasol normal, los ácidos insaturados oleico y linoleico son los que sufren mayores variaciones durante este período. Al comienzo de esta fase, a los 12 DDF, el ácido graso mayoritario fue el ácido oleico con un 46%, frente a un 31% de ácido linoleico. El ácido oleico mantuvo este valor con oscilaciones hasta los 22 DDF y a partir de este momento comenzó a disminuir, hasta alcanzar un valor de 31% a los 40 DDF. El ácido linoleico se mantuvo al comienzo del período en un 31% y luego empezó a aumentar

progresivamente hasta los 40 DDF, alcanzando un 56,8%. Estos resultados coinciden con los obtenidos anteriormente en semillas de girasol en formación por Garcés et al., 1989. El período de disminución del % de oleico y de aumento del % de linoleico coincide con el de máxima actividad oleato desaturasa.

En el genotipo alto oleico, los ácidos saturados, palmítico y esteárico, presentaron un comportamiento y unos valores similares a los del genotipo normal. Durante todo el período de desarrollo de la semilla el ácido graso mayoritario fue el oleico. A los 12 DDF tenía un porcentaje del 71%, que aumentó progresivamente, alcanzando un 86% a los 22 DDF. A partir de este momento, aunque siguió aumentando, lo hizo con más suavidad, hasta llegar a un 88% a los 40 DDF. El ácido linoleico presentó al comienzo del período un valor del 14%, y fue disminuyendo durante todo el período, hasta alcanzar un 4% a los 40 DDF. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Garcés et al., 1989.

2. Composición de ácidos grasos de los principales lípidos de semillas en desarrollo de girasol normal a distintas temperaturas de crecimiento.

Como se ha indicado anteriormente, la temperatura es uno de los factores que más influye en el contenido de los ácidos oleico y linoleico durante el desarrollo de la semilla, de manera que las semillas producidas en climas fríos tienen un mayor contenido en linoleico que las obtenidas en zonas más cálidas (Lajara et al., 1990). Aunque la composición de ácidos grasos de semillas del genotipo normal depende mucho más de la temperatura de crecimiento que la del mutante alto oleico (Garcés et al., 1989).

En la Tabla 6 se muestra la composición de ácidos grasos de los lípidos totales de semillas en desarrollo del genotipo normal a distintas temperaturas de crecimiento. Se han utilizado condiciones de temperatura variable día/noche, parecidas a las condiciones reales de las plantas en la naturaleza, y de temperatura constante, ya que en experimentos posteriores se utilizarán plantas sometidas a estas condiciones. Las muestras se tomaron cuando las plantas tenían entre 15 y 18 DDF. Las plantas sometidas a condiciones de temperatura constante día/noche, estuvieron hasta los 8 DDF (antes de la síntesis activa de lípidos) en cámaras de cultivo con temperatura variable, 20/10°C ó 25/15°C, y después se pasaron a cámaras de temperatura constante durante una semana. De esta forma, el

crecimiento de la planta es adecuado y el efecto de la temperatura se produce sobre las semillas en desarrollo.

Tabla 6. Composición de ácidos grasos (mol %) de los LT de semillas en desarrollo (15-18 DDF) de girasol normal a distintas temperaturas de crecimiento. Los resultados son media \pm D.S. (3 plantas).

Temperatura	16:0	18:0	18:1	18:2
20/10°C	9,7 \pm 1,2	10,0 \pm 1,7	38,4 \pm 3,0	41,9 \pm 1,9
25/15°C	8,6 \pm 1,0	8,0 \pm 0,3	47,3 \pm 3,1	36,1 \pm 3,8
20°C cte.	7,1 \pm 0,2	7,8 \pm 0,9	67,5 \pm 0,8	17,5 \pm 1,4
24°C cte.	6,6 \pm 0,1	6,5 \pm 0,1	80,1 \pm 0,3	6,9 \pm 0,3

Las plantas crecidas a temperaturas bajas contenían menos ácido oleico y más ácido linoleico que las crecidas a temperaturas más altas. Los ácidos grasos saturados, palmítico y esteárico, mantuvieron prácticamente los mismos porcentajes, aunque disminuyeron levemente sus valores a medida que aumentó la temperatura de crecimiento. Cuando las plantas crecen a temperatura variable día/noche, la temperatura que más afecta al contenido de los ácidos oleico y linoleico es la más baja. Así, las plantas crecidas a 20/10°C y 25/15°C presentaron un 41,9% y un 36,1% de linoleico respectivamente, frente a un 17,5% que tuvieron cuando crecieron a 20°C constantes. En los dos primeros casos, las plantas están más afectadas por las temperaturas nocturnas, (10°C y 15°C), que por las temperaturas diurnas (20°C y 25°C) más elevadas. En las plantas crecidas a 24°C constantes el contenido de ácido linoleico sufrió un fuerte descenso llegando al 6,9%, mientras que el ácido oleico alcanzó valores muy altos, del 80%, comparables con los del mutante alto oleico. Estos resultados se explican porque en las plantas crecidas a bajas temperaturas la actividad oleato desaturasa microsomal es mayor que en plantas crecidas a altas temperaturas (Garcés et al., 1992). En el caso de las plantas crecidas a 24°C constantes, las medidas de actividad ODS microsomal fueron también menores que la de semillas crecidas a temperaturas bajas (20/10°C) (Sarmiento et al., 1998). Además, a temperaturas bajas se produce la inducción de la síntesis de nuevo enzima (Garcés et al., 1992).

También se ha estudiado la composición de ácidos grasos de los principales lípidos de la semilla en función de la temperatura de crecimiento, TAG, DAG, y lípidos polares (LP)

Este estudio nos permite observar el efecto de la temperatura de crecimiento sobre la composición de ácidos grasos de los TAG, DAG y lípidos polares (LP).

Tabla 7. Composición de ácidos grasos (mol %) de los TAG, DAG y LP de semillas en desarrollo (16-20 DDF) de plantas de girasol normal a distintas temperaturas de crecimiento. Los resultados son media \pm D.S. (3 plantas).

Temperatura	Tipo de Lípido	16:0	18:0	18:1	18:2
20/10°C	TAG	9,0 \pm 0,2	12,3 \pm 0,8	37,3 \pm 0,6	41,3 \pm 0,3
	1,2-DAG	13,9 \pm 0,8	10,8 \pm 1,3	32,4 \pm 1,3	42,9 \pm 2,2
	LP	15,5 \pm 0,1	10,3 \pm 0,9	30,1 \pm 1,8	44,2 \pm 2,2
25/15°C	TAG	10,0 \pm 0,1	6,9 \pm 0,2	43,8 \pm 0,1	37,0 \pm 1,0
	1,2-DAG	7,0 \pm 0,1	4,8 \pm 0,5	51,7 \pm 1,5	36,0 \pm 1,0
	LP	13,3 \pm 0,4	8,3 \pm 0,3	37,6 \pm 5,1	40,8 \pm 5,8
20°C cte.	TAG	7,0 \pm 0,2	8,8 \pm 1,5	71,1 \pm 1,4	13,0 \pm 1,8
	1,2-DAG	17,6 \pm 3,0	9,2 \pm 1,1	55,6 \pm 3,6	17,6 \pm 0,5
	LP	8,8 \pm 2,4	5,2 \pm 2,4	63,1 \pm 3,7	22,9 \pm 1,0
24°C cte.	TAG	6,9 \pm 0,1	8,6 \pm 1,5	78,0 \pm 1,9	6,5 \pm 0,2
	1,2-DAG	7,5 \pm 0,5	5,6 \pm 0,9	78,5 \pm 1,5	8,4 \pm 0,1
	LP	11,4 \pm 1,1	12,3 \pm 0,8	63,8 \pm 1,5	12,5 \pm 0,3

En la Tabla 7 se observa que la proporción de ácido linoleico de los diferentes lípidos fue mayor en las plantas crecidas a bajas temperaturas, como ocurría en los lípidos totales. En todos los casos la composición de ácidos grasos de los triacilglicéridos refleja la de los lípidos totales ya que suponen el 90-95% de éstos. También se observa que a todas las temperaturas, los lípidos polares contienen más ácido linoleico que los triacilglicéridos. Los diacilglicéridos presentan una composición de ácidos grasos parecida a la de los otros lípidos, indicando que son intermediarios en el metabolismo lipídico.

3. Composición de ácidos grasos de los lípidos de las fracciones subcelulares, microsomas y oleosomas, de semillas en desarrollo de girasol normal.

En algunos experimentos se ha trabajado con las fracciones subcelulares de la semilla de girasol, por ello parece conveniente mostrar la composición de ácidos grasos de microsomas y oleosomas.

Los microsomas constituyen el conjunto de membranas del retículo endoplasmático que se obtienen después de centrifugar a 100.000 g, el homogeneizado obtenido de las semillas (apartado II.3.3. de Materiales y Métodos). En estas membranas se producen las modificaciones extraplastidiales de los ácidos grasos y su incorporación a los diferentes lípidos. Se han utilizado para hacer estudios “in vitro” con y sin sustratos radiactivos, con el fin de estudiar situaciones metabólicas que no podemos controlar en los experimentos “in vivo”.

Los oleosomas son los orgánulos de reserva lipídica en las plantas. Y contienen 90-95% de TAG, 1-4% de DAG, 1-4% de fosfolípidos y 1-4% de proteínas (Tzen et al., 1993).

Tabla 8. Composición de ácidos grasos (mol%) de los LT de la semilla y de los principales lípidos de oleosomas y microsomas de girasol convencional en desarrollo (15 DDF) cultivado a 24°C ctes. Los resultados son media \pm D.S. (3 plantas).

Fracción subcelular	Tipo de Lípido	16:0	18:0	18:1	18:2
Homogeneizado	LT semilla	5,6 \pm 0,3	6,2 \pm 0,4	77,5 \pm 0,6	10,6 \pm 0,6
	TAG	8,3 \pm 1,1	6,8 \pm 1,2	76,6 \pm 1,6	8,2 \pm 0,5
Oleosomas	DAG	5,2 \pm 0,7	4,2 \pm 0,3	68,5 \pm 2,5	22,1 \pm 2,4
	PC	7,4 \pm 0,2	5,0 \pm 0,2	60,3 \pm 2,6	27,3 \pm 2,5
	TAG	15,5 \pm 0,2	6,0 \pm 0,4	70,6 \pm 3,5	7,9 \pm 0,3
Microsomas	DAG	15,1 \pm 0,2	8,5 \pm 0,3	55,8 \pm 0,6	20,6 \pm 0,8
	PC	15,1 \pm 0,8	4,9 \pm 0,4	56,1 \pm 1,6	23,9 \pm 0,3

En la Tabla 8 se muestra la composición de ácidos grasos de los LT y de las fracciones subcelulares de semillas de girasol normal en desarrollo cultivado a 24°C ctes. Se ha elegido este ejemplo porque a esta temperatura se consigue que el contenido de ácido

linoleico se reduzca a valores bajos, del mismo nivel que en el mutante alto oleico. De esta manera se pueden apreciar mejor las diferencias en los niveles de ácido linoleico en los distintos lípidos.

En la composición de ácidos grasos de los lípidos totales se puede observar el efecto de la alta temperatura de crecimiento; así, el porcentaje de ácido linoleico fue del 10%, un valor muy bajo para un girasol normal. Los triacilglicéridos de oleosomas y microsomas presentaron unos valores de ácido linoleico también bajos, del 8%. Es decir, no se observó acumulación de linoleato en los triacilglicéridos. En cambio, los lípidos polares y los diacilglicéridos, tuvieron un mayor contenido en ácido linoleico (más del 20%). El elevado porcentaje de linoleico en la PC está de acuerdo con el importante papel que se asigna a este lípido, siendo universalmente aceptado que la síntesis de linoleato ocurre a nivel de fosfatidilcolina. Los diacilglicéridos reflejaron la composición de ácidos grasos de la PC, de acuerdo con el intercambio reversible y rápido entre ellos (Slack et al., 1985). En los lípidos de microsomas se observó un mayor contenido de ácido palmítico, que llegó al 15%. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Sarmiento et al., 1998.

4. Estudio del contenido de los principales lípidos y ácidos grasos de la semilla de girasol en desarrollo.

En algunos experimentos se hará referencia, al contenido relativo (%) de los diferentes lípidos y ácidos grasos y además a sus valores absolutos. A continuación se expone un ejemplo de desglose del contenido neto de los lípidos y ácidos grasos de semillas de girasol normal en desarrollo.

Para el experimento se tomaron lotes de 34 semillas obtenidas de una planta cultivada a 25/15°C. El peso medio de una semilla fue de $33,0 \pm 0,2$ mg. El contenido graso, determinado por extracción en Soxhlet con éter etílico, fue de $6,2 \pm 0,2$ % sobre peso fresco. El contenido relativo de TAG, DAG y LP (separados por CCF preparativa en placa de gel de sílice y cuantificados por GLC de sus ésteres metílicos tras la adición de una cantidad conocida de 17:0 como patrón interno) fue de 91,5%, 3,6% y 5,0% respectivamente, referido a lípidos totales.

En la Tabla 9, se muestra el contenido en lípidos de las semillas, expresado como $\text{mg lípido} \cdot (\text{g P.F.})^{-1}$, y $\mu\text{g lípido/semilla}$. La riqueza grasa (6,2%) no tuvo un valor elevado,

indicando que las semillas estaban en desarrollo y todavía no habían alcanzado la madurez. Los TAG fueron la fracción lipídica más importante con $1871,1 \text{ mg} \cdot (\text{g P.F.})^{-1}$, más del 90% de los lípidos totales. Los diacilglicéridos y lípidos polares fueron una parte minoritaria, aunque también importante de los lípidos de la semilla.

Tabla 9. Contenido en lípidos, expresado como $\text{mg} \cdot (\text{g P.F.})^{-1}$ y $\mu\text{g} / \text{semilla}$, de semillas en desarrollo (19 DDF) de girasol convencional, crecidas a 25/15°C. Los resultados son media \pm D.S. de 2 plantas.

	LT	TAG	DAG	LP
mg / g. P.F.	$62,0 \pm 2,0$	$56,7 \pm 0,5$	$2,2 \pm 0,4$	$3,1 \pm 0,1$
$\mu\text{g} / \text{semilla}$	$2046 \pm 0,4$	$1871,1 \pm 15,3$	$73,7 \pm 12,3$	$101,3 \pm 3,1$

Tabla 10. Composición de ácidos grasos (mol%) y contenido de ácidos grasos en $\mu\text{moles/g P.F.}$ de los LT y de los principales lípidos de semillas en desarrollo (19 DDF) de girasol normal, crecidas a 25/15°C. Los resultados son media \pm D.S. de 2 plantas.

	mol%			
Tipo de lípido	16:0	18:0	18:1	18:2
LT	$8,1 \pm 0,3$	$13,9 \pm 0,1$	$39,6 \pm 0,3$	$38,5 \pm 0,7$
TAG	$7,6 \pm 0,6$	$13,5 \pm 0,8$	$42,1 \pm 0,8$	$36,8 \pm 2,3$
DAG	$10,3 \pm 0,4$	$17,3 \pm 1,1$	$39,2 \pm 0,8$	$33,1 \pm 1,1$
LP	$14,9 \pm 1,0$	$11,9 \pm 0,7$	$25,6 \pm 0,3$	$47,3 \pm 2,2$
	$\mu\text{moles} \cdot (\text{g P.F.})^{-1}$			
Tipo de lípido	16:0	18:0	18:1	18:2
LT	$24,3 \pm 0,8$	$31,7 \pm 0,9$	$89,2 \pm 2,5$	$89,9 \pm 1,8$
TAG	$22,3 \pm 0,2$	$31,9 \pm 2,0$	$84,0 \pm 1,1$	$76,9 \pm 1,0$
DAG	$1,4 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,1$
LP	$2,1 \pm 0,0$	$1,5 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,2$	$4,6 \pm 0,0$

En la Tabla 10 se muestra la composición de ácidos grasos (%) y el contenido de ácidos grasos, expresado en $\mu\text{moles} \cdot (\text{g P.F.})^{-1}$ de los distintos lípidos. Los ácidos grasos mayoritarios fueron los ácidos oleico y linoleico, en todos los lípidos. En los LT, TAG y DAG, tanto si se expresan como mol% o como $\mu\text{moles} \cdot (\text{g P.F.})^{-1}$, el contenido de ácido oleico fue mayor que el de ácido linoleico, mientras que en LP ocurre lo contrario. El contenido de ácidos grasos saturados fue mayor en los diacilglicéridos y en los lípidos polares que en triacilglicéridos y lípidos totales.

II. EFECTO DE LA TEMPERATURA Y LA DISPONIBILIDAD DE O₂ EN LA DESATURACIÓN DE OLEATO EN SEMILLAS EN DESARROLLO.

Como hemos visto en el capítulo anterior, los contenidos relativos de oleato y linoleato dependen de la temperatura de crecimiento. Estudios anteriores habían demostrado que las semillas en desarrollo se adaptan rápidamente a los cambios de temperatura, modificando la actividad oleato desaturasa, de manera que los porcentajes de los ácidos oleico y linoleico pueden cambiar al incubar las semillas a alta y baja temperatura por períodos de tiempo cortos (2-4 horas). Además de la inducción de la síntesis de nuevo enzima a baja temperatura (Garcés et al., 1992), se observó la inhibición de la actividad ODS a alta temperatura y su recuperación cuando las semillas se ponen de nuevo a baja temperatura. Cuando la propia planta o el capítulo se transfirieron a 10°C, el contenido de linoleato aumentó en todos los lípidos de la semilla, pero cuando se incubaron a 30°C no hubo desaturación (Sarmiento et al., 1998). La interpretación de estos resultados fue que las semillas de girasol modifican el nivel de insaturación de sus lípidos mediante una compleja regulación de la actividad ODS, que implica:

- a) Síntesis de nuevo enzima a baja temperatura.
- b) Represión de la enzima preexistente a alta temperatura y su reactivación al retornar a baja temperatura.

Estos experimentos se realizaron con semillas en desarrollo cultivadas a alta temperatura para reducir la actividad ODS preexistente, y se incubaron por períodos de tiempo cortos para minimizar la síntesis de nuevo enzima. Los resultados indicaron que a baja temperatura aumentaban tanto la actividad ODS microsomal (medida en microsomas aislados tras la incubación) como el contenido de linoleato, mientras que a alta temperatura se producía una inhibición parcial de la ODS microsomal y no se observaba síntesis de linoleato (Sarmiento et al., 1998). Es decir, que la desaturación de oleato se inhibía a alta temperatura si bien la actividad del enzima, medida in vitro, sólo se reducía parcialmente, lo que resulta difícil de explicar. Por otra parte, las semillas usaron oleato preexistente como sustrato para la desaturación, consiguiendo así una rápida adaptación a las temperaturas bajas (Garcés et al., 1994).

La situación real de la planta durante el período activo de síntesis de lípidos debe ser mucho más compleja. Así, el contenido de oleato y linoleato dependería, tanto de la velocidad de síntesis de novo de oleato como de la actividad ODS, que a su vez depende de la temperatura de crecimiento (Browse y Slack, 1983). Sin embargo, los mecanismos por los cuales la temperatura regula el nivel de linoleato no son totalmente conocidos. La pregunta es si la activación o represión de la actividad ODS se debe al efecto de la temperatura sobre el enzima o a un efecto indirecto. Estudios previos indican que la disponibilidad de oxígeno puede regular, no sólo la desaturación de oleato in vivo, sino también la actividad ODS microsomal (García-Díaz et al., 1998). Estos resultados, que están de acuerdo con los obtenidos en condiciones en las que es fácil determinar la disponibilidad de oxígeno, al trabajar con un microorganismo en suspensión (Avery et al., 1996), junto a las contradicciones observadas en estudios anteriores, nos han llevado a reconsiderar los mecanismos mediante los cuales la temperatura regula la desaturación del ácido oleico en la semilla de girasol.

En este apartado hemos estudiado el efecto de la temperatura y de diferentes condiciones de disponibilidad de O₂ en la desaturación del oleato, en el capítulo intacto, en los aquenios (semillas provistas de la cáscara) y en semillas peladas.

1. Incubaciones de semillas en el capítulo.

Se han hecho experimentos con semillas alojadas en el aquenio, que a su vez se inserta en el capítulo. Con ello se pretende estudiar cómo afecta la temperatura a la desaturación de oleato en condiciones similares a las de la planta, es decir, cuando se está produciendo la síntesis activa de lípidos de reserva y, por tanto, un suministro continuo de oleato. En estas condiciones el oxígeno puede llegar a la semilla tanto por el floema como a través de la cáscara.

Los capítulos se dividieron en tres partes. Una se tomó como referencia, para determinar el estado fisiológico de la semilla y poder comparar con las muestras incubadas. Los otros dos trozos se incubaron en baños termostatzados a 10°C o 30°C, durante 24 horas. Las semillas de cada uno de los trozos de capítulo se dividieron en dos lotes y se realizó la extracción de los lípidos totales de las semillas. Además, se obtuvieron los lípidos neutros y polares totales, mediante cromatografía en capa fina y se cuantificaron los

distintos lípidos mediante patrón interno, a la vez que se determinó su composición de ácidos grasos. Los datos que se obtuvieron sobre la riqueza grasa de las semillas se sometieron a un análisis estadístico, ANOVA (Análisis de las varianzas), para determinar con un nivel de confianza del 5%, si eran o no significativamente diferentes.

A) En este primer experimento se trabajó con girasol convencional crecido en cámara a 25/15°C, y las semillas se recogieron con 19 DDF. La extracción y cuantificación de los lípidos totales se realizó en aparato Söxhlet durante 4 horas, utilizando éter etílico como disolvente. En este método de extracción prima la exactitud, si bien no garantiza que los lípidos minoritarios se obtengan intactos. Por ello los resultados se limitan a las diferencias en los ácidos grasos de los lípidos totales (Tablas 11, 12, 13).

Tabla 11. Modificaciones en el peso y el contenido grasa en semillas en desarrollo de girasol convencional, incubadas en el capítulo a 10°C o 30°C durante 24 h.

Tratamiento	Peso medio de una semilla (mg/semilla)	Riqueza grasa (%)	µg lípido/semilla	mg lípido · (gPF) ⁻¹
---	23,8	5,8	1380	58,0
10°C, 24 h.	32,8	6,5	2132	65,0
30°C, 24 h.	32,0	9,3	2976	93,0

Tabla 12. Cambios en la composición de ácidos grasos (moles %) de los LT de las semillas, incubadas en el capítulo a 10°C o 30°C durante 24 h.

Tratamiento	16:0	18:0	18:1	18:2
---	9,4 ± 0,3	12,6 ± 0,4	37,4 ± 1,1	40,5 ± 0,8
10°C, 24 h.	8,3 ± 0,1	10,5 ± 0,1	22,5 ± 0,6	58,7 ± 0,2
30°C, 24 h.	8,4 ± 0,2	11,8 ± 0,1	42,6 ± 0,3	37,1 ± 0,3

Tabla 13. Cambios en el contenido de oleato y linoleato de los lípidos totales y tasa de desaturación de oleato in vivo de las semillas, incubadas en el capítulo a 10°C o 30°C durante 24 h.

Tratamiento	$\mu\text{moles/semilla}$		$\mu\text{moles} \cdot (\text{gPF})^{-1}$		$\Delta\mu\text{moles} \cdot (\text{gPF})^{-1}$		$\Delta\mu\text{moles} \cdot (\text{gPF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
	18:1	18:2	18:1	18:2	18:1	18:2	18:2
---	1,8	2,0	76,9	83,9	-	-	-
10°C, 24 h	1,7	4,5	51,9	136,3	-25,0	52,4	2,2
30°C, 24 h	4,5	3,9	140,5	123,2	63,6	39,3	1,6

Después de la incubación a las dos temperaturas se observó un aumento en el peso de las semillas, de 4,8 mg a 10°C y de 6,8 mg a 30°C. La riqueza grasa de las muestras sin tratamiento y de las incubadas a 10°C y 30°C, fueron 5,8%, 6,5% y 9,3%, respectivamente. En los dos casos hubo un aumento importante del contenido graso por semilla, indicando que se produjo síntesis de novo, y que ésta aumentó con la temperatura (Tabla 11). En semillas de cártamo en desarrollo se habían obtenido resultados similares, (Browse y Slack, 1983).

En la composición de ácidos grasos de los lípidos totales se observó que los ácidos saturados de las muestras incubadas, prácticamente no variaron respecto al control (Tabla 12). A 10°C se observó que el porcentaje de ácido linoleico aumentó en un 18,2%. Los resultados obtenidos después de la incubación a 30°C fueron sorprendentes, ya que en los lípidos totales, el porcentaje de ácido linoleico disminuyó respecto al control. Este resultado sólo puede explicarse teniendo en cuenta que se ha producido un aumento importante del contenido de oleato debido a la síntesis de novo de ácidos grasos.

A partir de los datos anteriores se calculó el contenido de los ácidos oleico y linoleico en los lípidos totales de las semillas. Sólo se muestran los datos de estos dos ácidos, ya que los ácidos saturados no variaron (Tabla 13).

La incubación a 10°C provocó un aumento en el contenido de linoleato que pasó de 2,0 a 4,5 $\mu\text{moles/semilla}$, mientras que el contenido de oleato permaneció constante (1,7-1,8 $\mu\text{moles/semilla}$). Expresados los resultados en $\mu\text{moles/g PF}$ se observó un aumento de linoleato y una disminución de oleato. Es decir, se ha producido un proceso de desaturación importante, de manera que ha aumentado el contenido de linoleato. Sin

embargo, la disminución de oleato indica que se utilizó parte del oleato preexistente para suplir las necesidades del proceso de desaturación. La incubación a 10°C provocó una tasa de desaturación de $2,2 \mu\text{moles } 18:2 \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

El tratamiento a 30°C provocó un aumento de oleato ya que se sintetizaron 2,7 $\mu\text{moles/semilla}$ y, sorprendentemente, también aumentó el contenido de linoleato en 1,9 $\mu\text{moles/semilla}$, que es un valor próximo al obtenido tras la incubación a 10°C. Expresado en $\mu\text{moles/g PF}$ se observó también el aumento de los dos ácidos, lo que indica que también a alta temperatura se produjo síntesis de linoleato, es decir, desaturación de oleato a linoleato. El incremento positivo de oleato a 30°C, indica que a esta temperatura se sintetizó suficiente oleato de novo para suplir las necesidades de desaturación de la semilla. Se obtuvo una tasa de desaturación de $1,6 \mu\text{moles} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Estos resultados parecen contradecir resultados anteriores en los que se proponía que la alta temperatura provocaba represión de la actividad ODS (Sarmiento et al., 1998). Conviene indicar que, en este trabajo, se utilizaron tiempos cortos (1-2 horas) y los datos se daban en mol% de oleico y linoleico. Esta estrategia permite observar cambios rápidos bajo condiciones en las que la síntesis de lípidos es despreciable y permite estudiar el efecto de la baja temperatura sobre la desaturación del oleato, pero no es adecuada para estudiar el efecto de la temperatura alta, donde predomina la síntesis de oleato frente a su desaturación.

B) En este experimento se efectuó la extracción con hexano-isopropanol y la cuantificación del contenido lipídico se realizó por el método del patrón interno. Estas condiciones garantizan la integridad de los lípidos, si bien la exactitud de la cuantificación del contenido lipídico es menor que con el Soxhlet. El interés de estos datos está en que ponen de manifiesto importantes cambios en el contenido y composición de ácidos grasos de los distintos tipos de lípidos. En este experimento se utilizaron trozos de capítulo, como se indicó en el experimento anterior, que se mantuvieron a 10°C y 30°C durante 18 horas. El contenido lipídico de las semillas no tratadas (control) fue del 4% y no se modificó después del tratamiento a 10°C. Por el contrario, aumentó hasta el 6% tras el tratamiento a 30°C. Por lo tanto, en estas semillas no se observa síntesis de novo a baja temperatura pero si a alta temperatura, lo que puede explicarse, en relación con el experimento anterior, por la menor actividad biosintética de estas semillas, que se traduce en un menor contenido graso, y a la reducción del tiempo de incubación.

Como en el experimento anterior, el %18:2 aumenta en las semillas mantenidas a 10°C y disminuye en las mantenidas a 30°C (Tabla 14). La ausencia de síntesis de novo en el tratamiento a baja temperatura, permite observar que el aumento del contenido neto de 18:2 en los lípidos totales se corresponde con la disminución del 18:1 (22,9 y 21,6 $\mu\text{moles} \cdot (\text{g P.F.})^{-1}$ respectivamente), indicando que prácticamente todo el oleato desaturado procede de los lípidos preexistentes. En las semillas de 30°C se aprecia un incremento en el contenido de todos los ácidos, siendo elevado el de 18:1 (49,7 $\mu\text{moles} \cdot (\text{g P.F.})^{-1}$) y mucho menor el de 18:2 (10 $\mu\text{moles} \cdot (\text{g P.F.})^{-1}$), indicando que la desaturación tiene lugar también a alta temperatura, aunque a una tasa más reducida.

Tabla 14. Cambios en la composición (moles %) y en el contenido ($\mu\text{moles}(\text{gPF})^{-1}$) de ácidos grasos de los lípidos totales y tasa de desaturación de oleato in vivo de las semillas. Los resultados son media \pm D.S. de 3 experimentos.

mol%				
LT	16:0	18:0	18:1	18:2
CONTROL	9,6 \pm 0,3	11,6 \pm 0,5	38,1 \pm 0,3	40,7 \pm 0,8
10°C	10,2 \pm 1,0	10,8 \pm 0,9	24,2 \pm 0,3	54,8 \pm 3,1
30°C	9,9 \pm 0,9	9,8 \pm 1,2	48,2 \pm 0,9	32,1 \pm 3,2

LT	$\mu\text{g lípido}(\text{gPF})^{-1}$	$\mu\text{moles}(\text{gPF})^{-1}$		$\mu\text{moles}(\text{gPF})^{-1}\text{h}^{-1}$		
		18:1	18:2	Δ18:1	Δ18:2	Δ18:2
CONTROL	40	54,3	57,1	--	--	--
10°C	40	32,7	80	-21,6	22,9	1,3
30°C	60	104,0	67,1	49,7	10	0,6

Los cambios en el contenido de los diferentes lípidos (Tabla 15) ponen de manifiesto que, en las semillas mantenidas a 10°C, disminuye el contenido de TAG y aumentan los de DAG y LP, especialmente de PC, lo que es más evidente en términos de %.

Por el contrario, en las mantenidas a 30°C aumentan todos los lípidos, con excepción del % de TAG, que permanece constante. La ausencia de síntesis de novo a baja temperatura, en semillas que tienen una alta capacidad de desaturar oleato, permite realizar interesantes observaciones. La disminución del contenido en TAG y el aumento del de PC

apoya la hipótesis de que el oleato de los TAG se transfiere a la PC para ser desaturado. Normalmente no se aprecia disminución del contenido de TAG ya que el linoleato sintetizado se incorpora rápidamente a los TAG, por lo que su contenido suele permanecer constante. Los cambios en los ácidos grasos de los TAG (Tabla 16) reproducen prácticamente los de los lípidos totales. La disminución del contenido neto de 18:1 en los TAG de las semillas mantenidas a 10°C excede al aumento de 18:2, lo que se compensa con el mayor incremento de este ácido en los LP (Tabla 17) y especialmente en la PC (Tabla 18).

Tabla 15. Variación del contenido de los distintos tipos de lípidos. Los resultados son media \pm D.S. de 3 experimentos.

	% Lípidos			% Lípidos polares			
	TAG	1,2-DAG	LP	PC	PI	PE	Otros LP
CONTROL	85,3	3,8	10,9	4,8	0,9	1,6	3,6
10°C	80,3	5,8	13,9	8,3	1,3	2,3	2,0
30°C	84,6	4,2	11,2	5,7	1,1	1,5	2,9
	$\mu\text{moles lípido}(\text{gPF})^{-1}$			$\mu\text{moles LP}(\text{gPF})^{-1}$			
	TAG	1,2-DAG	LP	PC	PI	PE	Otros LP
CONTROL	40,3	2,6	7,8	3,4	0,7	1,1	2,5
10°C	37,9	4,1	9,9	5,9	0,9	1,6	1,4
30°C	60	4,4	11,8	6,0	1,2	1,6	3,0

Tabla 16. Cambios en la composición (moles %) y en el contenido ($\mu\text{moles}(\text{gPF})^{-1}$) de los ácidos grasos de los TAG y tasa de desaturación de oleato in vivo de las semillas. Los resultados son media \pm D.S. de 3 experimentos.

TAG	mol%			
	16:0	18:0	18:1	18:2
CONTROL	9,0 \pm 0,2	12,3 \pm 0,8	37,3 \pm 0,6	41,2 \pm 0,3
10°C	8,6 \pm 0,5	10,7 \pm 0,2	24,4 \pm 0,3	56,3 \pm 0,8
30°C	8,6 \pm 0,1	11,7 \pm 0,5	49,0 \pm 2,6	30,7 \pm 3,2

TAG	$\mu\text{moles}(\text{gPF})^{-1}$		$\mu\text{moles}(\text{gPF})^{-1}$		$\Delta\mu\text{moles}(\text{gPF})^{-1}\text{h}^{-1}$
	18:1	18:2	Δ 18:1	Δ 18:2	18:2
CONTROL	45,7	48,6	--	--	--
10°C	25,5	65,5	-20,2	16,9	0,9
30°C	87,2	53,7	41,5	5,1	0,3

Tabla 17. Cambios en la composición (moles %) y en el contenido ($\mu\text{moles}(\text{gPF})^{-1}$) de los ácidos grasos de los LP y tasa de desaturación de oleato in vivo de las semillas. Los resultados son media \pm D.S. de 3 experimentos.

LP	mol%			
	16:0	18:0	18:1	18:2
CONTROL	15,5 \pm 0,1	10,3 \pm 0,9	30,1 \pm 1,8	44,2 \pm 2,2
10°C	16,4 \pm 0,9	9,1 \pm 1,2	13,2 \pm 0,7	61,3 \pm 0,1
30°C	14,4 \pm 0,2	7,8 \pm 0,3	38,3 \pm 0,6	39,5 \pm 0,6

LP	$\mu\text{moles}(\text{gPF})^{-1}$		$\mu\text{moles}(\text{gPF})^{-1}$		$\Delta\mu\text{moles}(\text{gPF})^{-1}\text{h}^{-1}$
	18:1	18:2	Δ 18:1	Δ 18:2	18:2
CONTROL	5,7	5,7	--	--	--
10°C	3,6	10,9	-2,1	5,2	0,3
30°C	10,1	10,1	4,4	4,4	0,2

Tabla 18. Cambios en la composición (moles %) y en el contenido ($\mu\text{moles}(\text{gPF})^{-1}$) de los ácidos grasos de la PC y tasa de desaturación de oleato in vivo de las semillas. Los resultados son media \pm D.S. de 3 experimentos.

PC	mol%			
	16:0	18:0	18:1	18:2
CONTROL	11,0 \pm 0,9	10,8 \pm 0,4	37,8 \pm 1,7	40,4 \pm 1,3
10°C	11,9 \pm 0,5	8,4 \pm 0,6	15,3 \pm 0,7	64,4 \pm 1,9
30°C	10,7 \pm 0,8	8,0 \pm 0,7	46,6 \pm 2,5	34,7 \pm 0,7

PC	$\mu\text{moles}(\text{gPF})^{-1}$		$\mu\text{moles}(\text{gPF})^{-1}$		$\Delta\mu\text{moles}(\text{gPF})^{-1}\text{h}^{-1}$
	18:1	18:2	Δ 18:1	Δ 18:2	18:2
CONTROL	2,6	2,9	--	--	--
10°C	1,4	5,7	-1,2	2,8	0,2
30°C	6,7	3,4	4,1	0,5	0,03

En la Tabla 19 se muestra la composición de especies moleculares de TAG de las muestras sin tratamiento y de las incubadas a 10°C y 30°C.

Se observa que, en las muestras sin tratamiento, las especies más abundantes son las que contienen ácido oleico y linoleico, principalmente OLL y OOL. Cuando las muestras se incubaron a 10°C, hubo un aumento en las especies ricas en ácido linoleico (LLL, ELL y OLL), mientras que disminuyeron las que contenían oleico (OOL, OOO, EOO y EOL). En las muestras incubadas a 30°C, en cambio, aumentaron las especies ricas en ácido oleico (OOO y OOL), y disminuyeron las que contenían ácido linoleico (ELL y LLL).

Tabla 19. Especies moleculares de TAG los lípidos totales de las semillas. Los resultados se expresan en % y son media \pm D.S. de 3 experimentos.

Trat.	POP	PLP	POE	POO	PLE	POL	PLL	EOE	EOO	ELE	OOO	EOL	OOL	ELL	OLL	LLL
Control	0,9	1,0	2,2	4,3	2,7	8,6	5,3	1,6	5,9	1,8	6,0	12,6	15,2	8,1	16,3	7,5
	$\pm 0,1$	$\pm 0,2$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,3$	$\pm 0,2$	$\pm 0,3$	$\pm 0,3$	$\pm 0,3$	$\pm 0,3$	$\pm 0,1$				
10°C	0,4	1,3	0,7	1,7	3,2	7,0	9,7	0,6	1,9	1,6	2,6	7,8	9,1	14,2	21,8	16,4
	$\pm 0,1$	$\pm 0,0$	$\pm 0,4$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,0$	$\pm 0,1$	$\pm 0,3$	$\pm 0,3$	$\pm 0,3$	$\pm 0,5$	$\pm 0,5$				
30°C	1,0	0,7	2,4	6,4	1,8	8,8	3,1	1,3	8,7	0,5	10,9	11,9	20,1	4,5	13,6	4,2
	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,3$	$\pm 0,3$	$\pm 0,1$	$\pm 0,4$	$\pm 0,4$	$\pm 0,3$	$\pm 1,5$	$\pm 0,4$	$\pm 0,9$	$\pm 0,8$	$\pm 0,8$	$\pm 0,0$	$\pm 1,6$	$\pm 0,7$

P, palmítico; O, oleico; L, linoleico; E, estearico.

2. Incubaciones de aquenios aislados.

Las manipulaciones que podemos realizar con las semillas en el capítulo no permiten obtener más información sobre la desaturación de oleato, por ello, se realizaron experimentos con los aquenios y las semillas peladas, donde se pueden controlar otros factores, como la disponibilidad de oxígeno.

Efecto de la temperatura y la disponibilidad de oxígeno en la desaturación de semillas incubadas en el aquenio:

En primer lugar, se hicieron experimentos para comprobar si las semillas podían desaturar oleato si estaban fuera del capítulo pero permanecían dentro del aquenio, protegidas por la cáscara. Como ya se ha dicho, la desaturación del oleato es una reacción aerobia, y requiere oxígeno molecular como cosustrato. Cuando las semillas están en el capítulo el O₂ les llega a través del floema, aunque no se puede excluir, que les pueda llegar también a través de la cáscara. Se han planteado dos tipos de experimentos que reproducen las dos situaciones fisiológicas extremas en cuanto a la posible disponibilidad de O₂ para la semilla: incubar los aquenios sumergidos en agua (A) o incubados en el aire (B). En la primera, la disponibilidad está limitada por la solubilidad del O₂ en el agua, que es pequeña (del orden de 0,2-2 mM) y depende de la temperatura y de la concentración de O₂ en la mezcla gaseosa que se emplee como atmósfera o se burbujee en el medio acuoso que contiene los aquenios. En la segunda, la disponibilidad viene determinada por la concentración de O₂ en el aire, que es del orden del 21%.

A) En el caso de aquenios separados del capítulo e incubados en agua, el O₂ disponible se encuentra disuelto en el medio y puede difundirse al interior donde se encuentra la semilla. Uno de los problemas que podríamos encontrarnos es que la cáscara impidiera el proceso de desaturación, ya que es un impedimento físico para la entrada de este gas porque forma una barrera húmeda alrededor de la semilla. El posible efecto inhibitorio de la cáscara aumentaría con la temperatura, ya que disminuye la solubilidad del oxígeno. La concentración de oxígeno disuelto en el agua a las distintas temperaturas se ha calculado a partir de las correspondientes fracciones molares (Wilhelm et al., 1997).

A1) El objetivo de este primer experimento fue determinar la concentración de oxígeno disuelto en el medio de incubación que permite la desaturación del oleato en semillas con cáscara. Para ello, se incubaron aquenios de fenotipo normal en desarrollo a 10°C durante 18 horas, con burbujeo de mezclas de oxígeno y nitrógeno en distintas proporciones, oxígeno puro (100%), al 50% y al 21% (aire) y nitrógeno puro. Luego se realizó la extracción de los lípidos totales y se determinó la composición de ácidos grasos.

En la Tabla 20 se muestra la composición de ácidos grasos de los LT y la concentración de oxígeno disuelto (μM) en cada caso. Se observó que sólo cuando las muestras se burbujearon con oxígeno puro, correspondiente a una concentración 1706 μM , hubo desaturación y el porcentaje de ácido linoleico pasó del 32,3% al 47,9%. En el resto de los casos las semillas no desaturaron, de forma que la composición de ácidos grasos no varió significativamente respecto al control. Por tanto, ni el oxígeno al 21% ni al 50% fueron suficientes para provocar la desaturación. Las muestras incubadas con burbujeo de nitrógeno puro suponen un control negativo. En las condiciones del experimento la riqueza grasa, determinada por GLC tras añadir una cantidad conocida de 17:0 como patrón interno, se mantuvo constante, con un valor del 8,0%.

Tabla 20. Efecto de la concentración de oxígeno disuelto sobre la composición de ácidos grasos (mol %) de los LT de las semillas. Los resultados son media \pm D.S. de 2 experimentos.

Tratamiento	O ₂ disuelto (μM)	16:0	18:0	18:1	18:2
---	---	9,6 \pm 0,4	7,7 \pm 0,5	50,3 \pm 0,4	32,3 \pm 0,5
O₂	1706	9,2 \pm 0,2	6,9 \pm 0,3	35,9 \pm 0,9	47,9 \pm 0,9
50%O₂-N₂	853	8,8 \pm 0,3	7,5 \pm 1,0	50,6 \pm 0,6	33,1 \pm 0,5
AIRE	353	9,0 \pm 1,1	7,6 \pm 0,3	51,7 \pm 0,7	31,5 \pm 0,6
N₂	0	8,7 \pm 0,2	7,7 \pm 0,9	51,9 \pm 1,4	31,6 \pm 0,3

En la Tabla 21 se muestran los contenidos de los ácidos grasos de lípidos totales, expresados en $\mu\text{moles ácido} \cdot (\text{g PF})^{-1}$. En los ácidos grasos saturados, palmítico y esteárico no se observaron diferencias significativas con el control en ninguna de las incubaciones.

Tabla 21. Variaciones en el contenido de ácidos grasos en $\mu\text{moles ácido} \cdot (\text{g PF})^{-1}$ de los LT de las semillas. Se muestran por separado los valores obtenidos para la semillas control, el tratamiento con O_2 (desaturación) y el resto (no desaturación). Los resultados son media \pm D.S. de 2 o 6 experimentos respectivamente.

Tratamiento	$\mu\text{moles} \cdot (\text{g P.F.})^{-1}$					
	16:0	18:0	18:1	18:2	$\Delta 18:1$	$\Delta 18:2$
---	$30,2 \pm 1,1$	$21,7 \pm 1,5$	$142,7 \pm 1,1$	$92,2 \pm 1,5$	--	--
O_2	$28,8 \pm 0,5$	$19,3 \pm 0,5$	$101,8 \pm 1,2$	$136,8 \pm 2,0$	-40,9	44,6
50% O_2 , Aire, N_2	$27,7 \pm 0,4$	$21,4 \pm 0,2$	$145,8 \pm 1,7$	$91,6 \pm 2,1$	3,1	-0,6

En las muestras que no desaturaron, el contenido de los ácidos grasos insaturados, oleico y linoleico, sólo sufrió pequeñas variaciones no significativas. En las muestras incubadas en agua saturada de oxígeno, los ácidos oleico y linoleico sufrieron variaciones importantes. El contenido de linoleato aumentó, casi exclusivamente a costa del oleato, obteniéndose un incremento del $44,6 \mu\text{moles} \cdot (\text{g P.F.})^{-1}$. Esto indica que el oleato utilizado para la desaturación procedió, prácticamente en su totalidad, del oleato preexistente en los lípidos de reserva. Se ha comprobado que la desaturación de oleato es posible en las semillas con cáscara a 10°C , aunque fue necesario suministrar oxígeno puro a las semillas. En estas condiciones, en las que se produce una intensa desaturación de oleato, sin que éste se sintetice de novo, se pone de manifiesto la utilización del oleato de lípidos preexistentes, con mayor claridad que en experimentos anteriores. Esto viene a confirmar observaciones anteriores (Garcés et al., 1994).

A2) El objetivo del siguiente experimento fue comprobar si la desaturación en semillas con cáscara es también posible a alta temperatura. Para ello se incubaron aquenios de fenotipo normal en desarrollo a 10°C y 30°C durante 18 horas con burbujeo de oxígeno puro, aire y N_2 . Se extrajeron los lípidos totales se cuantificaron y se obtuvo la composición de ácidos grasos, como se indica en el apartado anterior. El contenido graso permaneció constante en todos los experimentos.

En la Tabla 22 se muestra la composición de ácidos grasos de los lípidos totales y la concentración de oxígeno disuelto en cada muestra. Las muestras incubadas con burbujeo de oxígeno puro a 10°C, fueron las únicas en las que se observó claramente la desaturación de oleato. En las incubaciones a 30°C con oxígeno se aprecian indicios de desaturación, si bien la diferencia con el control no es estadísticamente significativa ($p= 0,05\%$). En el resto de las muestras no se observó variación respecto al control.

Tabla 22. Efecto de la concentración de oxígeno y la temperatura en la composición de ácidos grasos (mol %) de los LT de las semillas. Los resultados son media \pm D.S. de 3 experimentos.

Temperatura	Atmósfera	O ₂ disuelto (μ M)	16:0	18:0	18:1	18:2
---	---	---	7,9 \pm 0,2	8,2 \pm 0,5	44,9 \pm 0,7	38,9 \pm 1,2
10°C	O ₂	1706	7,6 \pm 0,1	7,8 \pm 0,2	30,4 \pm 0,5	54,3 \pm 0,4
	Aire	353	7,7 \pm 0,3	9,4 \pm 0,6	44,8 \pm 1,2	38,1 \pm 1,6
	N ₂	0	8,9 \pm 0,9	9,8 \pm 0,6	44,6 \pm 1,4	36,7 \pm 0,2
30°C	O ₂	1182	8,5 \pm 0,2	8,9 \pm 0,4	40,5 \pm 1,0	42,0 \pm 1,1
	Aire	244	7,8 \pm 0,0	8,4 \pm 0,1	44,9 \pm 0,8	38,9 \pm 0,7
	N ₂	0	7,8 \pm 0,1	7,8 \pm 0,2	45,4 \pm 0,5	39,0 \pm 0,6

Los resultados de estos experimentos indican que la cáscara puede suponer una barrera para que la semilla disponga de suficiente oxígeno cuando se separa del capítulo. Esto sugiere que podría limitar la disponibilidad de oxígeno bajo determinadas condiciones fisiológicas.

B) Con objeto de incrementar la disponibilidad de oxígeno, se incubaron aquenios aislados en atmósfera de aire. Se colocaron en viales con entrada y salida de gases, a 10, 20 o 30°C y se pasó un flujo de aire de 300-400 ml \cdot min⁻¹.

En la Tabla 23 se muestran los cambios en la composición de ácidos grasos de las semillas incubadas, con relación a las no incubadas (control). Como en los experimentos anteriores, los ácidos saturados no cambian, pero los % de 18:1 y 18:2 sufren cambios que

dependen de la temperatura. El % de 18:2 aumenta, a costa del de 18:1, a medida que la temperatura desciende. Así, el incremento es máximo en las semillas incubadas a 10°C (14,9%), menor en las incubadas a 20°C (9,7%) y nulo en las incubadas a 30°C (diferencia no significativa con el control).

Tabla 23. Cambios en la composición de ácidos grasos (moles %) de los lípidos totales de las semillas. Los resultados son media \pm D.S. de 3 experimentos.

Tratamiento	16:0	18:0	18:1	18:2
---	7,6 \pm 0,4	13,7 \pm 0,5	47,0 \pm 0,4	31,6 \pm 0,4
10°C	8,4 \pm 0,0	13,5 \pm 0,0	31,6 \pm 0,1	46,5 \pm 0,1
20°C	7,6 \pm 0,0	13,4 \pm 0,0	37,7 \pm 1,2	41,3 \pm 1,3
30°C	7,4 \pm 0,3	14,5 \pm 1,2	48,1 \pm 0,2	30,1 \pm 0,7

De los resultados de los experimentos de incubación de aquenios se deduce que, cuando la disponibilidad de O₂ en la atmósfera exterior de la cáscara es máxima (aire, 21%), la temperatura alta (30°C) impide la desaturación de oleato, en contra de lo que ocurre en el aquenio en el capítulo. La diferencia podría deberse a la aportación de O₂ vía floema. Sin embargo, a niveles bajos de O₂ su disponibilidad puede ser limitante incluso a baja temperatura. Los resultados sugieren que la cáscara puede constituir una barrera que, en función de la concentración de O₂ en el medio exterior y, muy especialmente, de la temperatura, puede impedir la desaturación de oleato en condiciones fisiológicas.

3. Incubaciones con semillas peladas.

La semilla pelada, es decir el aquenio desprovisto de la cáscara y la membrana seminal, representa el modelo in vivo donde la disponibilidad del O₂ externo puede regularse más fácilmente. Al no existir el impedimento de la cáscara para la entrada de oxígeno se incrementa la disponibilidad de este gas. Como en el caso del aquenio completo se han realizado experimentos con semillas sumergidas en agua (A) e incubadas en el aire (B).

A) Se incubaron semillas de fenotipo normal en desarrollo sumergidas en agua durante 8 horas con burbujeo de aire o de oxígeno puro a 10°C o 30°C. Se determinó la riqueza grasa por GLC con patrón interno. En estas condiciones no se espera que la síntesis de novo de ácidos grasos sea apreciable. De hecho, incubaciones de semilla pelada a 10°C durante 24 h no incrementaron el contenido grasa (Garcés et al., 1994).

La riqueza grasa se mantuvo constante con un valor de 6,8% y no aumentó después de las incubaciones, confirmando que en semillas peladas no se aprecia síntesis de novo en estas condiciones.

A continuación se muestra la composición de ácidos grasos y la concentración de oxígeno disuelto de las distintas incubaciones (Tabla 24).

Tabla 24. Efecto de la temperatura y la concentración de oxígeno en la composición de ácidos grasos de los LT de las semillas. Los resultados son media \pm D.S. de 3 experimentos.

Temperatura	Trat.	O ₂ disuelto (μ M)	16:0	18:0	18:1	18:2
---	---	---	8,7 \pm 0,1	10,4 \pm 0,1	40,1 \pm 0,4	40,8 \pm 0,5
10°C	O ₂	1706	8,4 \pm 0,2	10,4 \pm 0,4	34,2 \pm 0,1	47,0 \pm 0,8
	Aire	353	9,1 \pm 0,3	10,4 \pm 0,2	33,7 \pm 0,5	46,8 \pm 0,0
30°C	O ₂	1182	8,7 \pm 0,2	10,5 \pm 0,4	32,7 \pm 0,0	48,1 \pm 0,6
	Aire	244	9,0 \pm 0,0	10,0 \pm 0,3	33,6 \pm 0,5	47,4 \pm 0,2

Todos los tratamientos provocaron aumentos similares del porcentaje de linoleato que, al no existir síntesis de novo, nos indica el incremento real de este ácido. El linoleato aumentó, aproximadamente, en un 6,5% en todos los casos.

De los resultados de este experimento se deduce que el O₂ disuelto en el agua que está en contacto con la semilla es suficiente para que se produzca la desaturación del oleato. Incluso la concentración que permite el burbujeo con aire a 30°C (244 μ M) es suficiente. Es interesante observar que no hay diferencias entre las dos temperaturas, al menos en el tiempo de este ensayo (8 horas).

B) Con objeto de estudiar el efecto de concentraciones superiores de O_2 y obtener más información sobre el efecto de la temperatura sobre la actividad oleato desaturasa, en condiciones de máxima disponibilidad de O_2 in vivo, se ha estudiado la cinética de desaturación de oleato a 10 y 30°C en semillas peladas incubadas en corriente de aire.

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 19. Se observa claramente que en tiempos cortos la desaturación es más activa a 30°C, pero decae con el tiempo. A 10°C, por el contrario, la tasa de desaturación es menor a tiempos cortos pero permanece constante. Al cabo de 8 horas se alcanza el mismo valor de % de 18:2 a ambas temperaturas, lo que coincide con el resultado del experimento anterior, en el que el tiempo fue también de 8 horas.

Resulta interesante destacar que el incremento del % de 18:2 es similar en ambos experimentos, a pesar de la diferencia de concentración de O_2 (< 0,005% en el A y 21% en el B). Esto indica que el O_2 es saturante en condiciones fisiológicas y que la cáscara puede ser una barrera que impide la difusión del O_2 bajo determinadas condiciones que siempre coinciden con temperaturas altas.

En cuanto al efecto directo de la temperatura sobre la oleato desaturasa parece responder al clásico modelo de incremento de actividad al aumentar la temperatura y posterior inactivación por destrucción del enzima o falta de los cofactores necesarios. En este caso hay que considerar, además, la estimulación de la síntesis de nuevo enzima a baja temperatura.

Parece también que los cambios de actividad ODS observados en semillas en el capítulo sometidas alternativamente a temperatura alta y baja durante períodos de 1-2 horas (Sarmiento et al., 1998) no pueden explicarse por un mecanismo de activación del enzima a baja temperatura e inactivación reversible a alta temperatura.

En condiciones fisiológicas de la semilla en la planta, el efecto de la temperatura alta parece estar más bien relacionado con la reducción de la disponibilidad de O_2 por debajo del límite necesario para la desaturación. Los experimentos posteriores tratarán de demostrar esta hipótesis.

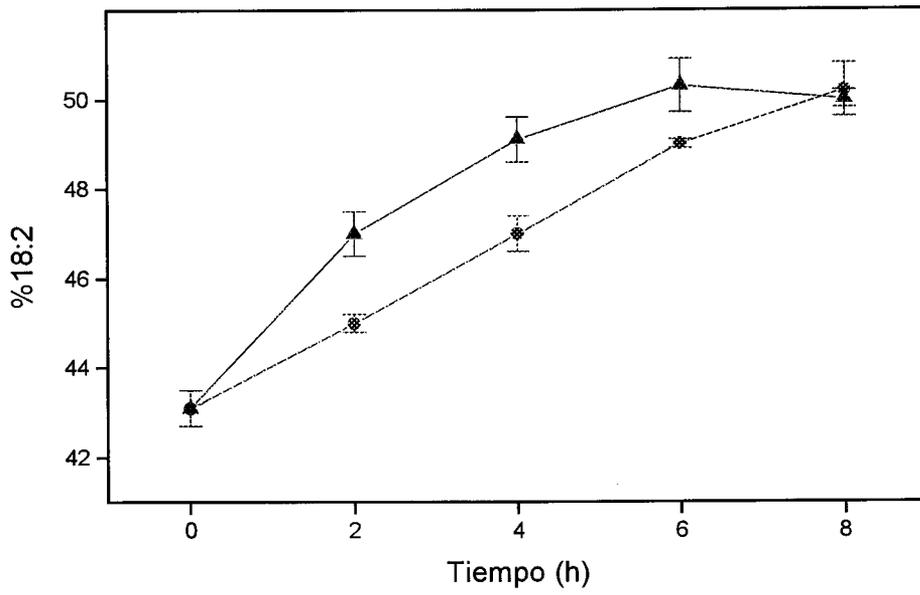


Figura 19. Cinética de desaturación de oleato en los lípidos endógenos de semillas peladas incubadas a 10°C (●) y 30°C (▲) en corriente de aire.

III. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA RESPIRACIÓN Y LA DESATURACIÓN DE OLEATO EN SEMILLAS EN DESARROLLO.

El oxígeno parece ser el principal factor que puede ser limitante en la desaturación de los ácidos grasos en tejidos no fotosintéticos. No ocurre lo mismo en tejidos fotosintéticos en luz, donde el oxígeno se produce en exceso. En los no fotosintéticos se establece una competencia por el O₂ entre la respiración y otras reacciones que requieren oxígeno, como la desaturación de ácidos grasos (Harris y James, 1969 a). En las semillas, el requerimiento de oxígeno aumenta cuando la temperatura sube ya que el consumo de este gas por la respiración aumenta y su solubilidad en las fases acuosas decrece (Côme 1982; Corbineau y Côme, 1995). Por otro lado, la respiración de los microorganismos que crecen en la superficie de muchas semillas también puede estar involucrada en la limitación de la difusión del oxígeno al embrión por competencia con el CO₂ emitido y la propia respiración de la cáscara, que consume oxígeno (Heydecker y Chetram, 1971).

Con objeto de estudiar la posible competencia entre la respiración y la desaturación por la disponibilidad de oxígeno, se determinó el desprendimiento de CO₂ y el efecto de la temperatura sobre el mismo.

1. Medidas del desprendimiento de CO₂ en semillas en desarrollo.

Para medir el desprendimiento de CO₂ de las semillas se utilizó un analizador con detector de IR. Las semillas se colocaron en viales de 20 ml de capacidad con entrada y salida de gases, y se suministró aire con un flujo de 125 ml/min. El CO₂ desprendido se expresó en $\mu\text{moles totales} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

En primer lugar, se midió el desprendimiento de CO₂ en aquenios intactos de fenotipo normal, de una planta cultivada a 25/15°C, así como de las correspondientes semillas peladas y cáscaras (Tabla 25). El material se incubó a 20°C durante 30 min. y se midió el CO₂ desprendido.

La tasa respiratoria de la cáscara es aproximadamente el doble que la de la semilla y, por tanto, compite con el embrión y los cotiledones (semilla) por el oxígeno exógeno. Por otra parte, el consumo de O₂ por los aquenios coincide con la suma del de la propia semilla y del de la cáscara. Estos resultados indican que el oxígeno puede acceder a la semilla a

través de la cáscara, al menos para mantener la tasa respiratoria. Los resultados de este experimento explican los datos obtenidos anteriormente en incubaciones con aquenios y semillas peladas, según los cuales la desaturación de oleato sólo tenía lugar en los aquenios (semillas con cáscara) cuando se suministraba oxígeno puro, mientras que para las semillas peladas fue suficiente con el oxígeno del aire, o incluso del que puede disolverse en el agua que la rodea. En éstas últimas no existía el impedimento físico de la cáscara, a través de la cual llega el oxígeno a los tejidos de la semilla y, además, no había consumo de este gas por la respiración de las cáscaras. Los resultados sugieren que la desaturación podría verse afectada por una insuficiente disponibilidad de O₂ en determinadas condiciones.

Tabla 25. Medidas de la tasa de desprendimiento de CO₂ a 20°C de los aquenios en desarrollo de fenotipo convencional, y de sus correspondientes cáscaras y semillas peladas.

Tiempo (min)	$\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{h}^{-1}$		
	Aquenios	Cáscaras	Semillas peladas
0	23,4	15,6	8,1
5	22,5	15,6	7,2
10	22,8	15,6	7,2
30	22,8	15,6	7,2

2. Efecto de la temperatura sobre el desprendimiento de CO₂ por las semillas en desarrollo.

Los resultados obtenidos en las incubaciones con capítulos, aquenios y semillas peladas, se podrían explicar si la tasa respiratoria de las semillas fuera diferente a distintas temperaturas. Debido a que la respiración aumenta con la temperatura, cabe esperar que a temperatura alta exista competencia por el oxígeno entre la respiración y la desaturación de ácidos grasos. Por ello se estudió el desprendimiento de CO₂ en las semillas a diferentes temperaturas.

Se midió el desprendimiento CO₂ de semillas peladas de fenotipo normal incubadas a 10°C, 20°C y 30°C durante 170 min. (Figura 20). Como era de esperar, la tasa respiratoria

de las semillas aumenta al aumentar la temperatura, de modo que a 30°C es la más alta y a 10°C la más baja. La tasa respiratoria a 10°C se mantiene constante. Sin embargo, cuando la temperatura aumenta su valor inicial decae con el tiempo, probablemente debido al agotamiento de los azúcares. Estos resultados sugieren que, a alta temperatura, el consumo de oxígeno para la respiración podría limitar otras funciones metabólicas como, por ejemplo, la desaturación de oleato.

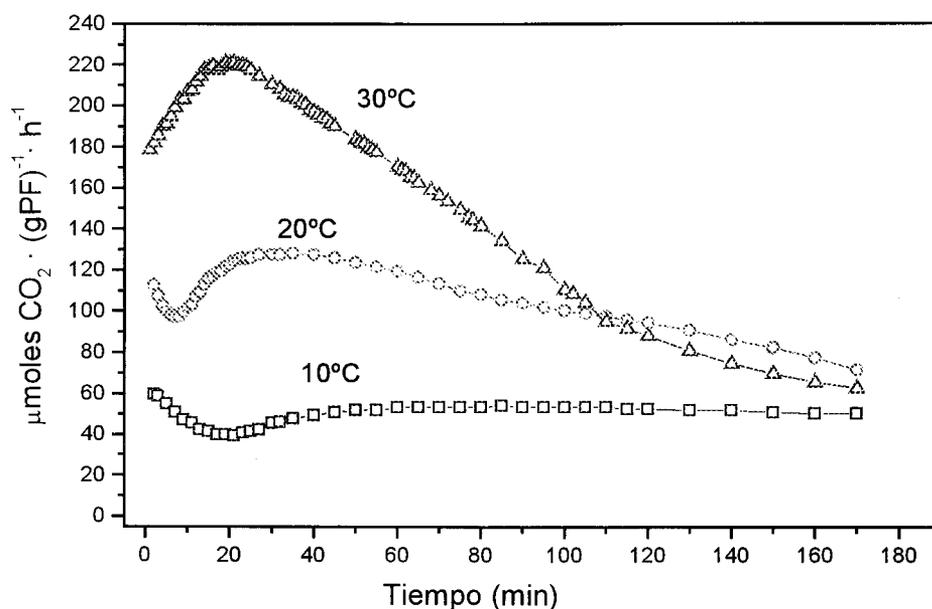


Figura 20. Efecto de la temperatura en la tasa de desprendimiento de CO₂ de semillas en desarrollo de girasol convencional incubadas a las temperaturas indicadas con un flujo continuo de aire (125 ml/min) durante 170 min.

A continuación se extrajeron los lípidos totales que suponen un 6,8% y se obtuvo la composición de ácidos grasos. En la Tabla 26 se observa que el % de 18:1 disminuye y el de 18:2 aumenta al aumentar la temperatura, confirmando los resultados obtenidos en el capítulo anterior (Figura 19). A partir de los datos de contenido graso, composición de ácidos grasos y desprendimiento de CO₂ se calculó la tasa de desaturación de oleato y la tasa respiratoria. (Tabla 27).

Tabla 26. Efecto de la temperatura de incubación sobre la composición de ácidos grasos (mol%) de los LT de semillas en desarrollo de girasol convencional, incubadas a las temperaturas indicadas con un flujo continuo de aire (125 ml/min) durante 170 min. Los resultados son media \pm D.S. de 2 experimentos.

Tratamiento	16:0	18:0	18:1	18:2
---	9,2 \pm 0,9	9,4 \pm 0,3	47,2 \pm 1,0	34,2 \pm 0,4
10°C	8,3 \pm 0,5	7,9 \pm 0,8	46,3 \pm 1,1	37,4 \pm 0,3
20°C	8,3 \pm 0,0	8,0 \pm 0,1	40,2 \pm 0,2	43,5 \pm 0,1
30°C	8,5 \pm 0,2	7,6 \pm 0,1	39,4 \pm 0,3	44,6 \pm 0,2

Tabla 27. Tasa de desaturación de oleato in vivo y tasa de desprendimiento de CO₂ de las semillas. Los resultados son media \pm D.S. de 2 experimentos.

Tratamiento	$\Delta\mu\text{moles } 18:2 \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	$\mu\text{moles CO}_2 \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	
		Máxima	Media
--- (a)	---		
10°C (b)	3,4	59,6	49,7
20°C (c)	8,5	128,2	109,5
30°C (d)	10,2	221,0	174,0

Tanto el porcentaje de linoleato, como la tasa de desaturación de oleato y la tasa respiratoria aumentaron con la temperatura. A 10°C el linoleato aumentó en un 3,2%, a 20°C en un 9,3% y a 30°C se produjo el mayor aumento, un 10,4%. La tasa de desaturación presentó un valor de 3,4 $\mu\text{mol } 18:2 \cdot (\text{g P.F.})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ a 10°C, valor parecido a los obtenidos en las incubaciones con capítulos y aquenios. A 20°C la tasa de desaturación fue de 8,5 $\mu\text{mol } 18:2 \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ y a 30°C de 10,2 $\mu\text{mol } 18:2 \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. En la Tabla 27 se muestran los valores medios y máximos de los $\mu\text{moles CO}_2 \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ desprendidos a las distintas temperaturas. Se observó que el desprendimiento de CO₂ aumentó con la temperatura, pasando de 49,7 $\mu\text{moles CO}_2 \cdot (\text{g P.F.})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ a 10°C a 174 $\mu\text{moles CO}_2 \cdot (\text{g P.F.})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ a

30°C. Puesto que para la desaturación de un mol de oleato se necesita un mol de O₂, el incremento neto de linoleato equivale al consumo de O₂ para la desaturación.

De estos resultados se deduce que, si el suministro de oxígeno es suficiente, el consumo de este gas por la respiración es 15-20 veces superior al que corresponde a la desaturación de oleato. En estas condiciones, la disponibilidad de oxígeno para la semilla pelada en contacto con el aire no parece ser limitante para el funcionamiento de la desaturasa y, en tiempos de incubación cortos, su actividad aumentó con la temperatura.

IV. ESTUDIO DEL METABOLISMO LIPÍDICO EN ATMÓSFERA DE N₂ EN SEMILLAS EN DESARROLLO.

Se conoce bastante sobre el efecto del oxígeno y de su privación en la germinación de las semillas, pero poco sobre su influencia en el desarrollo de las mismas. La mayoría de las semillas no germinan cuando se les priva de oxígeno, afectando también su crecimiento y desarrollo. La privación de oxígeno normalmente provoca un descenso en la carga energética, la formación de etanol por fermentación y la inhibición de la producción de etileno en numerosos tejidos de plantas.

1. Efecto de la atmósfera de N₂ en el desprendimiento de dióxido de carbono por las semillas.

El objetivo de los siguientes experimentos fue comprobar si las semillas sometidas a atmósfera de N₂ durante cierto tiempo podían recuperar su actividad metabólica al ponerlas de nuevo en atmósfera de aire. Las semillas se colocaron en viales con un flujo continuo (125ml/min.) de N₂ o aire, y se midió el desprendimiento de CO₂ como se indica en el capítulo anterior. Se incubaron a 10°C o 30°C alternando las atmósferas de aire y N₂.

En la incubación a 10°C (Figura 21) se pasó una corriente de aire y se midió el desprendimiento de CO₂ que se mantuvo constante, aproximadamente 45 $\mu\text{moles CO}_2 \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. A los 60 min., se pasó una corriente de N₂, que provocó una disminución importante del desprendimiento de CO₂ que se estabilizó aproximadamente en valores de 5,3 $\mu\text{moles CO}_2 \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Luego se volvió a pasar aire y aumentó inmediatamente el desprendimiento de CO₂, llegando a valores de 39,9 $\mu\text{moles CO}_2 \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Cuando de nuevo se pasó una corriente de N₂ volvió a descender la emisión de CO₂, y se volvió a recuperar al poner una corriente de aire, alcanzando valores similares a los del comienzo.

En el experimento con semillas incubadas a 30°C (Figura 22) se pasó también, de forma alternativa, aire y N₂. Se observó que en aire, el desprendimiento de CO₂ inicial fue más alto que en la incubación a 10°C, con valores de 98,3 $\mu\text{moles CO}_2 \cdot (\text{g P.F.})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ de media, aunque no se mantuvo constante sino que disminuyó con el tiempo. Cuando las semillas se pusieron en atmósfera de N₂, el desprendimiento de CO₂ disminuyó

rápidamente y se estabilizó en $30 \mu\text{moles CO}_2 \cdot (\text{g P.F.})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Estos cambios aire/N₂ se hicieron varias veces. El resultado fue que cuando las semillas se volvieron a poner en aire, no llegaron nunca a los niveles iniciales.

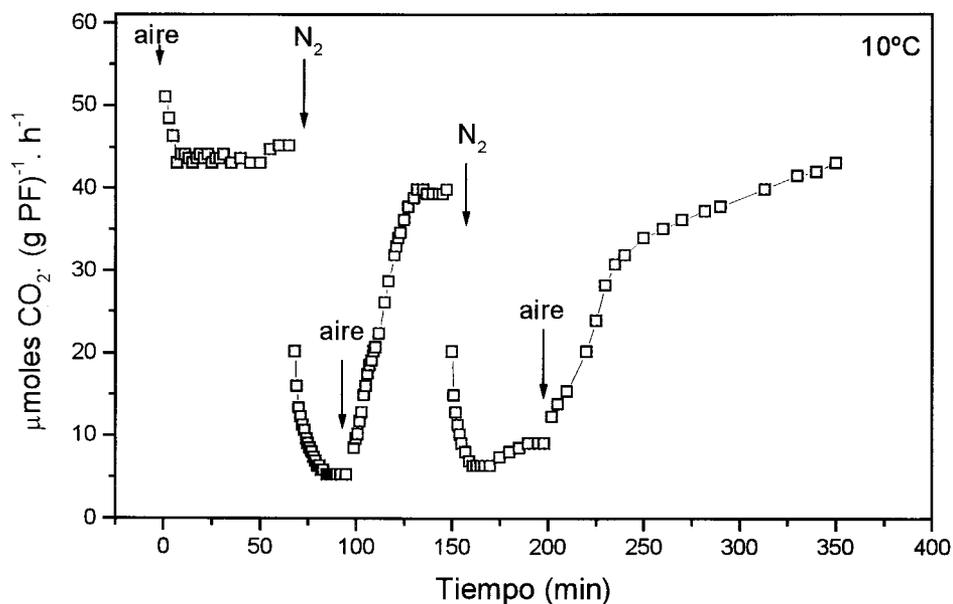


Figura 21. Efecto del nitrógeno sobre la tasa de desprendimiento de CO₂ de semillas en desarrollo (18DDF) incubadas a 10°C en atmósfera de aire o nitrógeno alternativamente.

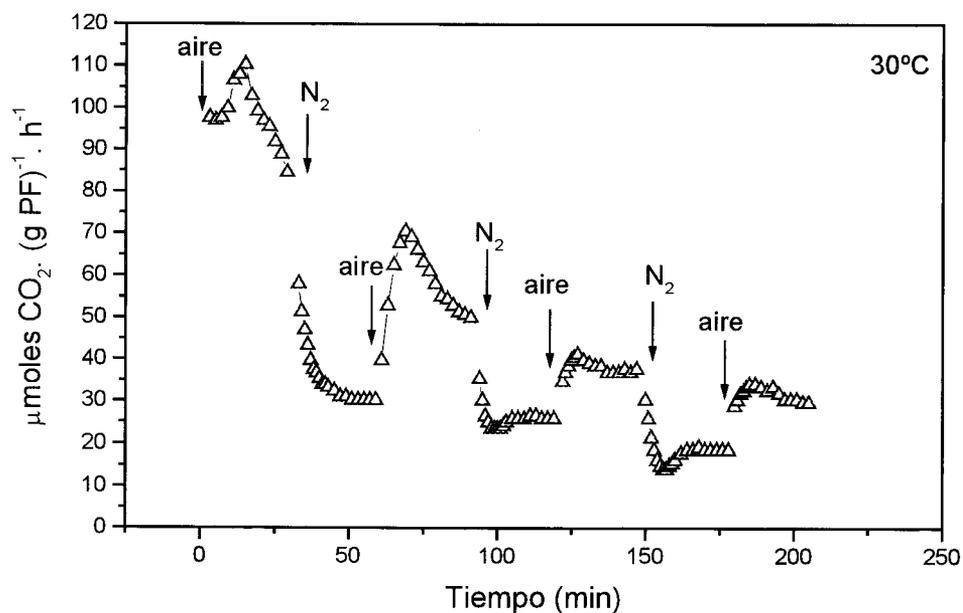


Figura 22. Efecto del nitrógeno en la tasa de desprendimiento de CO₂ de semillas en desarrollo (18DDF) incubadas a 30°C en atmósfera de aire o nitrógeno de forma alternada.

Por último, se estudió el comportamiento de las semillas bajo N_2 en tiempos más largos a $10^\circ C$ (Figura 23).

Las semillas se pusieron en viales y se pasó una corriente de aire durante 30 minutos, para determinar el valor de referencia de desprendimiento de CO_2 , fue de, aproximadamente, $35 \mu\text{moles } CO_2 \cdot (\text{g P.F.})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. A continuación se pusieron en atmósfera de N_2 durante 177 minutos. Inmediatamente disminuyó la emisión de CO_2 , alcanzando valores muy bajos, similares los del experimento anterior de las Figuras 21 y 22 prácticamente constantes en torno a $6 \mu\text{moles } CO_2 \cdot (\text{g P.F.})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Cuando se puso de nuevo la corriente de aire, la emisión de dióxido de carbono aumentó más lentamente, recuperando los valores iniciales de aproximadamente $35 \mu\text{moles } CO_2 \cdot (\text{g P.F.})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

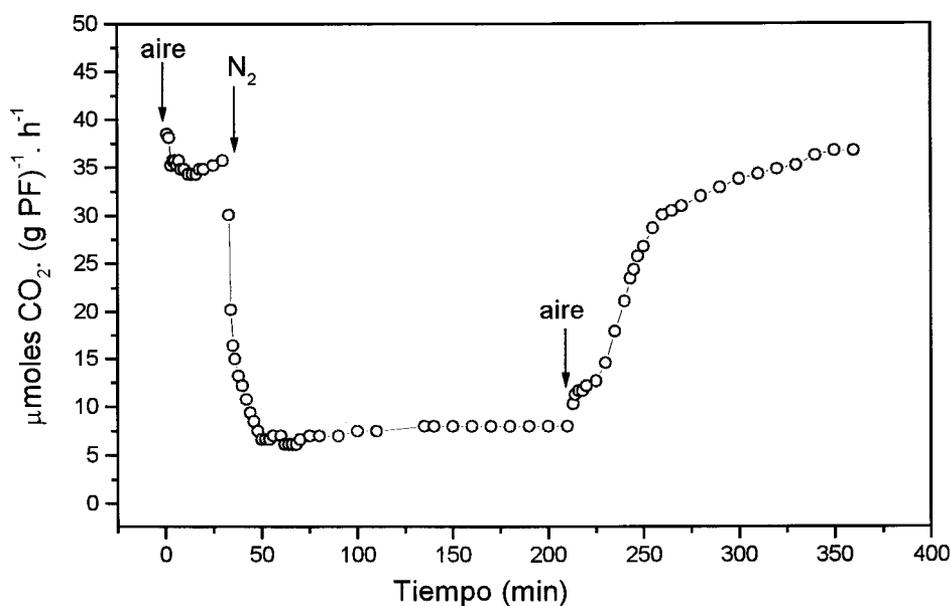


Figura 23. Efecto del nitrógeno sobre la tasa de desprendimiento de CO_2 de semillas en desarrollo de girasol incubadas a $10^\circ C$.



De los resultados de estos experimentos se deduce que las semillas recuperaron su tasa respiratoria después de haber estado bajo atmósfera de nitrógeno. El mantenimiento de la producción de CO_2 a $10^\circ C$ y su disminución con el tiempo a $30^\circ C$ están de acuerdo con los resultados anteriores (Figura 20) en los que se estudió el desprendimiento de CO_2 a diferentes temperaturas.

2. Incubación de semillas en desarrollo con [^{14}C]18:1 en atmósfera de N_2 y de aire.

Una vez comprobada la capacidad de las semillas en desarrollo de recuperar su actividad metabólica después de un período de anaerobiosis, nos interesa comparar el metabolismo lipídico de semillas en desarrollo en atmósfera de aire y N_2 . En este apartado se incluyen ensayos para comprobar si la incorporación a los lípidos de la semilla se modifica durante la incubación con ácidos grasos radiactivos en atmósfera de N_2 .

2.1. Incorporación de [^{14}C]18:1 a los lípidos de semillas en desarrollo.

Se estudió la incorporación de [^{14}C]18:1 a los lípidos de semillas en desarrollo del fenotipo normal. Las incubaciones se hicieron en atmósfera de aire o N_2 durante 2 horas, a temperatura alta y baja. La incorporación de [^{14}C]18:1 a los LT fue mayor en las semillas incubadas bajo N_2 , a las dos temperaturas.

Tabla 28. Incorporación de [^{14}C]18:1 a los lípidos totales de las semillas incubadas a 10°C y 30°C durante 2 horas en atmósfera de N_2 . Los resultados son media \pm D.S. de 2 experimentos.

Incorporación [^{14}C]	10°C , Aire	10°C , N_2	30°C , Aire	30°C , N_2
(pmoles)	$1841,0 \pm 38,0$	$2180,5 \pm 49,1$	$1360,6 \pm 24,4$	$2424,3 \pm 78,8$
(%)	$33,5 \pm 0,6$	$39,6 \pm 0,9$	$25 \pm 2,3$	$44,1 \pm 1,5$

Se extrajeron los lípidos totales y se separaron los principales lípidos mediante CCF, y se cuantificaron con patrón interno. Los lípidos de las semillas contenían un 94% de TAG, 1,3% de DAG y 4,6% de LP. También se cuantificaron los lípidos radiactivos, mediante CCF y un analizador de radiactividad. En la siguiente tabla se muestra la incorporación de [^{14}C]18:1 a los principales lípidos de la semilla.

La mayor incorporación fue en todos los casos a TAG y después a PC. En las incubaciones a alta temperatura se observó mayor acumulación de 1,2-DAG que a baja temperatura (un 4-5% de diferencia). Los contenidos de PA y PE fueron prácticamente los mismos en todos los casos. La incorporación a TAG fue mayor en atmósfera de aire que en

atmósfera de nitrógeno. Esto se debe, como se verá más adelante, al proceso de desaturación que tiene lugar en atmósfera de aire, indicando que el [^{14}C]18:2 sintetizado se almacenó principalmente en TAG. Aunque las diferencias son pequeñas, se observa mayor incorporación a PC a 10°C bajo N_2 y mayor incorporación a 1,2-DAG a 30°C, tanto en aire como bajo N_2 , sugiriendo que el paso de PC a DAG y a TAG está ralentizado.

Tabla 29. Incorporación de [^{14}C]18:1 a los principales lípidos de las semillas. Los resultados son media \pm D.S. de 2 experimentos.

T ^a	Atmósfera	% Incorporación [^{14}C]					
		TAG	AGL	1,2-DAG	PC	PE	PA
10°C	Aire	58,5	6,8	8,0	18,0	5,4	3,4
		$\pm 2,3$	$\pm 1,1$	$\pm 0,4$	$\pm 0,6$	$\pm 0,4$	$\pm 0,2$
	N_2	54,8	6,2	8,1	21,8	6,8	2,3
		$\pm 0,0$	$\pm 1,0$	$\pm 0,8$	$\pm 0,8$	$\pm 1,3$	$\pm 0,3$
30°C	Aire	50,1	5,9	12,4	21,3	6,0	4,4
		$\pm 2,2$	$\pm 0,2$	$\pm 1,3$	$\pm 3,9$	$\pm 0,2$	$\pm 0,4$
	N_2	43,6	7,0	13,8	23,7	6,9	5,1
		$\pm 4,2$	$\pm 0,2$	$\pm 0,4$	$\pm 1,8$	$\pm 0,8$	$\pm 1,1$

Además, se obtuvo la composición de ácidos grasos de los lípidos totales no radiactivos y la desaturación de [^{14}C]18:1 a [^{14}C]18:2, mediante CCF sobre sílice- NO_3Ag (apartado II.2.1.5. de Materiales y Métodos).

El contenido de oleato y linoleato de los LT no radiactivos fue de 41 y 43%, respectivamente y no cambió significativamente durante el experimento, es decir no se apreció síntesis de linoleato tras dos horas de incubación. En cambio en los radiactivos se observó desaturación de oleato a linoleato. Por tanto, la desaturación tuvo lugar en el oleato recién incorporado y no se aprecia en el que ya se encontraba en la semilla. El

porcentaje de linoleato sintetizado en atmósfera de aire fue el mismo a las dos temperaturas.

Las muestras incubadas en atmósfera de nitrógeno nos sirvieron como control negativo. Se observó que aparecía radiactividad unida a [^{14}C]18:2, que se puede explicar bien por la presencia de O_2 residual en la semilla o por el tiempo necesario para eliminar el O_2 .

Tabla 30. Desaturación del [^{14}C]18:1 incorporado a los LT de las semillas. Los resultados son media \pm D.S. de 2 experimentos y se expresan en pmoles de [^{14}C]18:1 o [^{14}C]18:2 (los % de incorporación se dan entre paréntesis).

T ^a	Atmósfera	pmoles de [^{14}C] incorporado	
		[^{14}C]18:1	[^{14}C]18:2
10°C	Aire	1634,8 \pm 11,0 (88,8%)	206,2 \pm 11,0 (11,2%)
	N ₂	1536,9 \pm 6,4 (96%)	64,0 \pm 6,4 (4%)
30°C	Aire	1899,2 \pm 10,9 (87,1%)	281,3 \pm 10,9 (12,9%)
	N ₂	2356,4 \pm 0,2 (97,2%)	67,9 \pm 0,2 (2,8%)

Cuando se incuban semillas de girasol alto oleico, la incorporación de [^{14}C]18:1 a los lípidos es similar a la obtenida con semilla convencional y no se afecta por el hecho de que se incuba en el aire o bajo N₂. La única diferencia consiste en que en éstas no se produce desaturación de oleato.

2.2. Incorporación de [¹⁴C]18:1 a los lípidos totales y la fracción microsómica de semillas en desarrollo incubadas bajo N₂.

Se ha estudiado la incorporación de [¹⁴C]18:1 a los lípidos totales y a la fracción microsómica de semillas en desarrollo del fenotipo convencional, en incubaciones a tiempo largo, bajo N₂.

Las semillas se incubaron con [¹⁴C]18:1 durante 24 horas a 10°C, en atmósfera de nitrógeno. Después las semillas se trituraron en un mortero con tampón HEPES-Sorbitol pH 7,2 y se obtuvo el homogeneizado, que representa los lípidos totales de la semilla. Parte del homogeneizado se procesó para obtener los correspondientes microsomas (apartado II.3. de Materiales y Métodos).

En la siguiente tabla se muestra la incorporación de [¹⁴C]18:1 a los principales lípidos del homogeneizado y de la fracción microsómica.

Tabla 31. Incorporación de [¹⁴C]18:1 en atmósfera de N₂ a los lípidos totales de la semilla y de la fracción microsómica. Los resultados son media ± D.S. de 2 experimentos.

Fracción	% Incorporación [¹⁴ C]			
	TAG	1,2-DAG	PC	PE
Homogeneizado	86,8 ± 1,4	6,0 ± 0,3	6 ± 0,2	1,2 ± 0,1
Microsomas	49,4 ± 0,4	11,6 ± 0,6	38,6 ± 1,0	0,4 ± 0,1

La incorporación al homogeneizado y a los microsomas fue muy diferente. En el homogeneizado la mayor incorporación fue a TAG con un 86,8%, también aparecieron marcados los 1,2-DAG y la PC con un 6%, y la PE con un 1,2 %. En microsomas los lípidos más marcados fueron también los TAG pero con un porcentaje menor que en el homogeneizado. Además la PC también tuvo una incorporación importante, un 38,6%. También los 1,2-DAG tuvieron mayor incorporación que en el homogeneizado.

Estos resultados indican que la ausencia de O₂ no altera el metabolismo general de los lípidos de la semilla, salvo las reacciones de desaturación que necesitan O₂ y poder reductor. El metabolismo anaerobio de la semilla produce ATP para activar los ácidos grasos a acil-CoA. También debe producir suficiente poder reductor, en forma de NADH y NADPH.

V. INCUBACIONES DE SEMILLAS EN DESARROLLO CON ÁCIDOS GRASOS RADIATIVOS.

Estos ensayos permiten estudiar el metabolismo lipídico extraplastidial, en especial el destino del oleato y del linoleato y sus movimientos entre los diferentes lípidos. En estos experimentos, que se realizan con semillas sumergidas en agua que contiene el sustrato radiactivo, la concentración de oxígeno está limitada por la solubilidad del gas en agua a la temperatura del ensayo, por el grado de aireación y por el tiempo de incubación. Por esta razón la desaturación de oleato a temperatura alta puede estar infravalorada, de acuerdo con los resultados del capítulo II.

1. Incubaciones a tiempo corto en atmósfera de aire.

En este apartado se ha estudiado la incorporación y desaturación de [^{14}C]18:1 y la incorporación de [^{14}C]18:2 en semillas en desarrollo de fenotipo convencional y alto oleico. Las incubaciones se hicieron en atmósfera de aire a tiempos cortos.

En primer lugar, se han realizado experimentos utilizando semillas de girasol alto oleico, en las que la desaturación de oleato es prácticamente nula. Así se puede estudiar la incorporación y el movimiento de este ácido sin tener en cuenta su posible conversión a linoleato.

1.1. Influencia de la edad de la semilla sobre la incorporación de [^{14}C]18:1 a los lípidos de semillas alto oleico, incubadas a alta y baja temperatura.

En este experimento, semillas en desarrollo del fenotipo alto oleico a dos edades distintas, 17 DDF y 23 DDF, se incubaron con [^{14}C]18:1, a alta y baja temperatura, durante 2 horas en atmósfera de aire. En estas semillas, en las que no se produce desaturación de oleato, se puede estudiar la influencia de la edad de la semilla y de la temperatura de incubación sobre la incorporación de un ácido graso, en este caso 18:1. De este modo se elimina el efecto de la competencia entre 18:1 y 18:2 por incorporarse, específicamente, a determinados lípidos.

No hubo diferencias en la incorporación del sustrato a los LT, que fue similar a las dos edades y a las dos temperaturas. La distribución de radiactividad entre los principales lípidos de la semilla indicó que en semillas de 17 DDF hubo mayor incorporación a TAG que en las de 23 DDF (un 10% de diferencia). Dentro de la misma edad hubo mayor incorporación a TAG a temperatura baja en los dos casos, con una diferencia de un 7%. Además, se observó en las muestras incubadas a 30°C una mayor acumulación de 1,2-DAG (sobre todo en semillas de 23 DDF).

Tabla 32. Incorporación de [^{14}C]18:1 a los lípidos de las semillas tras dos horas de incubación. Los resultados son media \pm D.S. de 2 experimentos.

EDAD	Trat.	Incorporación				
		[^{14}C] nmoles	%Incorporación [^{14}C]			
		LT	TAG	1,2-DAG	PC	PE
17 DDF	10°C, 2 h	1,2 \pm 0,1	67,4 \pm 2,1	10,8 \pm 0,8	16,4 \pm 1,3	5,4 \pm 0,0
	30°C, 2h	1,2 \pm 0,0	60,4 \pm 1,4	13,6 \pm 0,6	18,3 \pm 0,4	7,7 \pm 1,7
23 DDF	10°C, 2h	1,5 \pm 0,1	57,5 \pm 0,8	13,3 \pm 0,1	19,2 \pm 1,9	10,0 \pm 1,0
	30°C, 2h	1,5 \pm 0,1	50,5 \pm 0,8	20,7 \pm 1,5	18,9 \pm 0,4	9,9 \pm 0,3

1.2. Incorporación de [^{14}C]18:1 y [^{14}C]18:2 a los lípidos de semillas alto oleico e influencia de la temperatura en el metabolismo posterior de los lípidos.

A continuación se estudió la incorporación de [^{14}C]18:1 y [^{14}C]18:2 a los lípidos de semillas en desarrollo del fenotipo alto oleico y el efecto de la temperatura sobre la redistribución de radiactividad entre los principales lípidos de la semilla.

Las semillas se preincubaron durante 15 min. a 25°C, con aireación. Se lavaron y se tomaron muestras, luego se continuó la incubación durante 4 horas a 10°C y 30°C.

Después de la preincubación con [^{14}C]18:1 (Tabla 33), la mayor parte de la radiactividad se incorporó a PC (un 36%), seguido de TAG (26%). La rápida y preferente incorporación de 18:1 a PC está de acuerdo con el papel que se asigna a este lípido como sustrato de la desaturación de oleato. En estas semillas, sin embargo, no tiene lugar esta

desaturación, por lo que se puede observar el destino del 18:1 incorporado inicialmente a la PC. El metabolismo posterior durante la incubación, provocó el aumento de radiactividad en los TAG a costa, fundamentalmente, de la PC. Se observó que a temperatura baja hubo mayor incorporación a TAG que a temperatura alta, donde la disminución de PC fue menor. Además, a temperatura alta se observó acumulación de 1,2-DAG.

Tabla 33. Metabolismo de los principales lípidos de semillas en desarrollo del fenotipo alto oleico preincubadas con [^{14}C]18:1. Los resultados son media \pm D.S. de 2 experimentos.

Tratamiento	% Incorporación [^{14}C]					
	TAG	AGL	1,2-DAG	PC	PE	PI
---	26,3 \pm 5,6	16,7 \pm 2,3	8,4 \pm 0,6	36,2 \pm 2,1	8,2 \pm 0,3	4,2 \pm 0,7
10°C, 4 h.	44,8 \pm 1,4	16,4 \pm 1,4	6,1 \pm 0,8	20,9 \pm 2,7	7,9 \pm 0,3	3,9 \pm 0,7
30°C, 4 h.	36,6 \pm 1,7	14,1 \pm 0,3	11,2 \pm 0,6	24,3 \pm 0,7	9,0 \pm 0,2	4,8 \pm 0,2

En la preincubación con [^{14}C]18:2 (Tabla 34) la mayor parte de la radiactividad se incorporó a TAG (un 34%), seguido de PC (27%), al contrario que en la incubación con [^{14}C]18:1. Este experimento pone de manifiesto la importancia del mecanismo de síntesis de TAG a expensas de ácidos grasos que proceden de la PC. Además aparecieron marcados los 1,3-DAG, que en las incubaciones con [^{14}C]18:1 no habían aparecido. Las incubaciones a 10°C y 30°C, provocaron un aumento de la incorporación a TAG, más acusada a alta temperatura. Este aumento ocurrió a expensas de los LP, fundamentalmente de PC. Además a alta temperatura se observó, de nuevo, acumulación de 1,2-DAG.

Tabla 34. Metabolismo de los principales lípidos de semillas en desarrollo del fenotipo alto oleico preincubadas con [^{14}C]18:2. Los resultados son media \pm D.S. de 2 experimentos.

Trat.	% Incorporación [^{14}C]						
	TAG	AGL	1,3-DAG	1,2-DAG	PC	PE	PI
---	33,9	8,3	8,6	10,3	26,9	9,7	2,3
	$\pm 3,8$	$\pm 1,9$	$\pm 0,7$	$\pm 1,3$	$\pm 4,4$	$\pm 1,1$	$\pm 0,1$
10°C, 4 h	44,5	8,0	10,1	9,1	15,4	10,0	3,0
	$\pm 5,8$	$\pm 0,6$	$\pm 1,5$	$\pm 0,6$	$\pm 3,2$	$\pm 2,0$	$\pm 0,3$
30°C, 4 h	47,1	10,2	10,8	16,1	9,0	5,1	1,7
	$\pm 4,0$	$\pm 1,9$	$\pm 1,2$	$\pm 0,8$	$\pm 1,4$	$\pm 1,8$	$\pm 0,2$

1.3. Incorporación y desaturación de [^{14}C]18:1 en los lípidos de semillas de fenotipo normal con distintos niveles de actividad oleato desaturasa.

Se utilizaron semillas en desarrollo de fenotipo normal, con distintos niveles de actividad oleato desaturasa que se consiguieron cultivando las plantas en las siguientes condiciones.

- (a) Semillas cultivadas a (20/10°C) --- Actividad oleato desaturasa alta.
- (b) Semillas cultivadas 24°C cte. --- Actividad oleato desaturasa baja.

Las condiciones de incubación fueron las siguientes: en primer lugar, las semillas se mantuvieron a 10°C o 30°C, durante 10 min en atmósfera de aire. Se añadió el sustrato radiactivo y continuó la incubación durante 4 horas en las mismas temperaturas y con aireación.

Tabla 35. Composición de ácidos grasos (mol %) de los LT de la semilla, antes y después de 4 horas de incubación. Los resultados son media \pm D.S. de 3 experimentos.

Semillas	T ^a	16:0	18:0	18:1	18:2
(a)	---	9,8 \pm 0,5	9,1 \pm 0,4	41,6 \pm 0,5	39,6 \pm 1,3
	10°C	9,1 \pm 0,1	8,1 \pm 0,2	38,7 \pm 0,6	44,2 \pm 0,4
	30°C	9,5 \pm 0,1	7,9 \pm 0,0	39,6 \pm 0,1	42,9 \pm 0,1
(b)	---	5,7 \pm 0,3	6,8 \pm 0,2	78,1 \pm 1,2	9,4 \pm 0,5
	10°C	5,1 \pm 0,1	6,0 \pm 0,1	78,2 \pm 0,4	10,8 \pm 0,4
	30°C	5,2 \pm 0,2	6,0 \pm 0,2	77,9 \pm 0,3	10,9 \pm 0,2

Las semillas de los dos tratamientos difieren en el contenido relativo de oleico y linoleico, así como en su capacidad para desaturar oleato. Esto se muestra en la Tabla 35, donde se incluye la composición de ácidos grasos no radiactivos y los cambios en el % de 18:1 y 18:2 como consecuencia de los tratamientos. En las semillas de plantas cultivadas a (20/10°C) los lípidos totales contenían un porcentaje inicial de linoleato del 39,6%, mientras que las cultivadas a 24°C cte. tenían sólo un 9,4% de este ácido.

En las semillas del tratamiento (a), después de las incubaciones a 10°C y 30°C, se observó un aumento de ácido linoleico de un 4% aproximadamente. En las del tratamiento (b), después de las incubaciones a alta y baja temperatura sólo aumentó el porcentaje de este ácido en un 1,5%. Este bajo porcentaje de desaturación se debió a que las semillas, después de estar a 24°C cte. tienen la actividad ODS reprimida, sólo actúa la ODS basal (Garcés et al., 1992).

En la tabla 36 se muestran los % de incorporación de [¹⁴C]18:1 a los diferentes lípidos en función de la temperatura de incubación. En todos los casos la mayor incorporación se produjo a TAG, y después a PC, con importantes diferencias según los tratamientos. Las incubaciones a 30°C, como en experimentos anteriores, provocaron una menor incorporación a TAG y mayor a DAG que las correspondientes a 10°C.

Tabla 36. Incorporación de [^{14}C]18:1 a los principales lípidos de la semilla. Los resultados son media \pm D.S. de 3 experimentos.

		% INCORPORACIÓN [^{14}C]			
Semillas	T ^a	TAG	1,2-DAG	PC	PE
(a)	10°C	69,4 \pm 3,9	10,6 \pm 1,3	20,0 \pm 2,9	0,0 \pm 0,0
	30°C	47,0 \pm 1,7	12,3 \pm 0,8	23,1 \pm 1,0	17,6 \pm 2,0
(b)	10°C	65,4 \pm 3,2	12,3 \pm 1,2	22,2 \pm 2,3	0,0 \pm 0,0
	30°C	44,0 \pm 4,6	16,3 \pm 2,0	22,3 \pm 1,8	17,5 \pm 1,7

En las semillas del tipo (a), se produjo a 10°C la mayor incorporación a TAG con un 69,4%. A 30°C, el porcentaje de incorporación a TAG fue menor (47%), y mayor en 1,2-DAG y PC. Además, a alta temperatura se observó una importante incorporación a PE, mientras que a baja temperatura no se detectó este lípido.

En las semillas del tipo (b), a baja temperatura hubo una incorporación a TAG importante, del orden del 65%, marcándose también los 1,2-DAG y la PC. A alta temperatura de nuevo se acumularon los 1,2-DAG y disminuyeron los TAG. La PC permaneció igual y, también se observó una incorporación importante a PE, del orden del 17%.

A continuación se muestra la desaturación a [^{14}C]18:2 del [^{14}C]18:1 incorporado en los lípidos totales (Tabla 37). En el caso (a), la incubación a baja temperatura provocó la desaturación del 25% del oleato incorporado, mientras que a 30°C sólo desaturó el 17%. En el caso (b) a baja temperatura se sintetizó un 16,7% de linoleato y a alta temperatura un 21,2% de [^{14}C]18:2.

Tabla 37. Desaturación de oleato a linoleato de los LT de la semilla. Los resultados son media \pm D.S. de 3 experimentos.

Semillas	T ^a	Incorporación [¹⁴ C]			
		%		pmoles	
		[¹⁴ C]18:1	[¹⁴ C]18:2	[¹⁴ C]18:1	[¹⁴ C]18:2
(a)	10°C	75,0 \pm 1,6	25,0 \pm 1,6	887,6 \pm 57,9	301,5 \pm 7,9
	30°C	83,0 \pm 1,5	17,0 \pm 1,5	967,9 \pm 51,1	199,0 \pm 27,2
(b)	10°C	83,3 \pm 0,4	16,7 \pm 0,4	682 \pm 54,5	136,6 \pm 11,5
	30°C	78,8 \pm 2,5	21,2 \pm 2,5	746,9 \pm 24,8	203,2 \pm 35,3

Como conclusión se puede decir que la incorporación a LT varió según el tipo de semillas, aunque entre las semillas del mismo tipo no hubo diferencias importantes entre las incubadas a baja y a alta temperatura.

La incorporación a TAG fue mayor a baja temperatura en los dos casos. La incorporación a DAG fue mayor a alta temperatura, y se observó también una incorporación importante a PE que no se detectó a 10°C.

En todos los casos, se observó desaturación del [¹⁴C]18:1. La intensidad del proceso dependió del tipo de semilla y de la temperatura. Así, en semillas con alta actividad oleato desaturasa la síntesis de [¹⁴C]18:2 fue mayor a baja que a alta temperatura, mientras que ocurrió lo contrario en semillas de baja actividad oleato desaturasa. Esto puede explicarse por la diferente susceptibilidad a la temperatura alta de la ODS inducible a baja temperatura, mayoritaria en las semillas (a) y la ODS basal, mayoritaria en las semillas (b), (Garcés et al., 1992).

1.4. Incorporación de [¹⁴C]18:2 a los lípidos de semillas en desarrollo de fenotipo normal e influencia de la temperatura en el metabolismo posterior de los lípidos.

Las semillas en desarrollo se preincubaron con [¹⁴C]18:2 a 25°C durante 15 min., con aireación. Se retiró el sustrato radiactivo, se lavaron las semillas y se tomó el control. Luego, continuó la incubación a 10°C y 30°C durante 4 horas, con aireación.

La incorporación de [¹⁴C]18:2 a los lípidos totales de la semilla fue de 1,0 nmoles (20%). En este experimento el sustrato incorporado no sufre desaturación, por tanto la radiactividad que se detecta corresponde sólo a [¹⁴C]18:2. Después de la preincubación (control) la mayor parte de la radiactividad se incorporó en TAG (49,4%), el segundo lípido más marcado fue la PC (22,5%). La incubación posterior, tanto a alta como a baja temperatura provocó un aumento de la radiactividad en TAG, a costa de la PC. El mayor aumento se produjo a alta temperatura, donde los TAG aumentaron en un 13,7%. Hay que destacar que el [¹⁴C]18:2 se incorporó a los 1,3-DAG, que no se detectan en las incubaciones con [¹⁴C]18:1. Comparando este experimento con uno similar realizado con material alto oleico (Tablas 33 y 34), observamos que en los dos casos el movimiento de acilos fue de PC a TAG. Hay que tener en cuenta que en ninguno de los casos hubo desaturación.

Tabla 38. Incorporación de [¹⁴C]18:2 a los principales lípidos de la semilla. Los resultados son media \pm D.S. de 2 experimentos.

Tratamiento	% Incorporación [¹⁴ C]					
	TAG	AGL	1,3-DAG	1,2-DAG	PC	PE
CONTROL	49,4 \pm 0,5	5,5 \pm 0,9	4,5 \pm 0,5	11,6 \pm 1,5	22,5 \pm 1,0	6,6 \pm 0,3
10°C, 4 h.	53,9 \pm 1,5	4,2 \pm 0,1	4,9 \pm 0,3	11,2 \pm 0,2	18,0 \pm 1,3	7,9 \pm 0,7
30°C, 4 h.	63,1 \pm 2,9	3,9 \pm 0,1	5,9 \pm 0,5	9,0 \pm 0,6	12,1 \pm 1,5	6,0 \pm 1,4

2. Incubaciones a tiempo largo en atmósfera de aire.

En este apartado se ha estudiado la incorporación de [^{14}C]18:1 y [^{14}C]18:2, y la desaturación del primero, en semillas en desarrollo de fenotipo convencional y alto oleico. Las incubaciones se hicieron bajo atmósfera de aire o nitrógeno, a tiempo largo.

2.1. Incorporación de [^{14}C]18:1 a semillas en desarrollo del fenotipo alto oleico.

En este experimento se incubaron semillas en desarrollo del fenotipo alto oleico con [^{14}C]18:1; las incubaciones se hicieron en atmósfera de aire, a temperatura baja y alta (10°C y 30°C) durante 24 horas.

La incorporación del sustrato radiactivo a los lípidos totales fue similar a ambas temperaturas, incorporándose, aproximadamente, 2 nmoles de [^{14}C]18:1. Respecto a los principales lípidos de la semilla, la mayor incorporación fue a TAG en los dos casos, aunque a baja temperatura se incorporó un 10% más. Sólo un 3-5% de AGL no se incorporaron. A alta temperatura hubo menor incorporación a LP (3% menos) y mucho mayor a los 1,2-DAG (12% más) que a baja temperatura. Se confirma la acumulación de 1,2-DAG a alta temperatura, más intensa en este caso por la duración de la incubación.

Tabla 39. Incorporación de [^{14}C]18:1 a los principales lípidos de la semilla. Los resultados son media \pm D.S. de 2 experimentos.

Tratamiento	% Incorporación [^{14}C]			
	TAG	AGL	1,2-DAG	LP
10°C, 24 h.	76,8 \pm 1,2	3,5 \pm 0,1	8,7 \pm 0,1	11,1 \pm 0,9
30°C, 24 h.	66,6 \pm 3,4	5,2 \pm 1,9	21,0 \pm 2,3	7,3 \pm 0,8

2.2. Incorporación de [^{14}C]18:1 a semillas en desarrollo del fenotipo convencional.

En los siguientes experimentos se estudió la incorporación y desaturación de [^{14}C]18:1 en semillas en desarrollo de fenotipo normal. Se utilizaron dos tipos de semillas:

A) Semillas de una planta crecida a 20/10°C.

B) Semillas de una planta similar a la anterior, cuyo capítulo se mantuvo a 10°C durante 24 horas. Con este tratamiento se induce la síntesis de la oleato desaturasa. Se tomaron muestras antes y después de este tratamiento.

Las semillas se incubaron a 10°C o 30°C durante 24 horas con aireación. La incorporación a LT fue del mismo orden en todos los casos

Tabla.40. Incorporación de [¹⁴C]18:1 a los principales lípidos de la semilla. Los resultados son media ± D.S. de 3 experimentos.

Trat.	T ^a	Incorporación			
		pmoles [¹⁴ C] (%)	% Incorporación [¹⁴ C]		
		LT	TAG	1,2-DAG	PC
A	10°C	736,3 ± 30,5 (37%)	84,0 ± 2,6	6,1 ± 0,4	10,1 ± 0,9
	30°C	749,5 ± 58,1 (38%)	77,0 ± 5,4	7,9 ± 0,8	15,2 ± 3,1
B	10°C	812,1 ± 33,6 (31%)	84,0 ± 1,1	13,2 ± 0,9	2,8 ± 0,3
	30°C	591,8 ± 30,0 (23%)	73,4 ± 2,9	23,1 ± 2,7	3,5 ± 0,4

En los dos casos los lípidos mayoritarios fueron los TAG, aunque en las incubaciones a 30°C siempre hubo una incorporación menor que en las correspondientes incubaciones a 10°C particularmente en las semillas del tipo (B) (Tabla 40).

En las semillas (A), después de la incubación a 10°C se incorporó hasta un 84% de oleato en TAG y un 10% en PC. A 30°C se incorporó menos a TAG, un 77% y más a PC, un 15%. La incorporación a DAG fue prácticamente la misma en las dos incubaciones, aunque un poco mayor a 30°C.

Después del tratamiento B, la radiactividad se incorporó fundamentalmente a TAG, 84% y 73% a baja y alta temperatura, respectivamente. Mientras que la incorporación a PC

fue mucho menor, aproximadamente un 3%. También se observó que la incubación a alta temperatura provocó acumulación de 1,2-DAG, un 10% más que a baja temperatura.

En la Tabla 41 se presentan los datos de desaturación de oleato, tanto de los LT no radiactivos como de los lípidos radiactivos recientemente sintetizados. De la composición de los lípidos de la semilla (no radiactivos) sólo se dan los % de 18:1 y 18:2, porque los saturados no mostraron ninguna variación.

Tabla 41. Desaturación de oleato a linoleato en los lípidos totales de las semillas. Los resultados son media \pm D.S. de 3 experimentos.

		Incorporación [^{14}C]					
		Mol%		%		pmoles	
		18:1	18:2	[^{14}C]18:1	[^{14}C]18:2	[^{14}C]18:1	[^{14}C]18:2
A	---	34,3	43,7				
		$\pm 0,3$	$\pm 0,1$				
	10°C	25,3	54,3				
		$\pm 2,6$	$\pm 2,9$	50,3 \pm 6,5	49,7 \pm 6,5	370,3 \pm 15,3	365,9 \pm 15,2
	30°C	29,8	47,0				
		$\pm 1,0$	$\pm 2,1$	67,1 \pm 6,2	32,9 \pm 6,2	502,9 \pm 39,0	246,6 \pm 19,1
B	---	45,9	46,6				
		$\pm 0,2$	$\pm 0,1$				
	*	30,2	62,7				
		$\pm 0,1$	$\pm 0,3$				
	10°C	25,4	67,3				
		$\pm 0,4$	$\pm 0,3$	30,9 \pm 1,4	69,1 \pm 1,4	250,9 \pm 10,4	561,1 \pm 23,2
30°C	28,6	64,3					
	$\pm 0,2$	$\pm 0,4$	32,8 \pm 1,1	67,2 \pm 1,1	194,1 \pm 9,8	397,7 \pm 20,2	

* incubación del capítulo a 10°C, 24 horas.

En las semillas (A), el tratamiento provocó la desaturación de oleato a linoleato a las dos temperaturas, tanto en los lípidos endógenos (no radiactivos) como en los radiactivos. El tiempo de incubación largo (24 h) favorece la desaturación de oleato a baja temperatura. El mayor incremento inicial de linoleato a 30°C se compensa con el aumento constante a

10°C (Figura 19), que se prolonga hasta, la menos, 24 h (Figura 24). En los lípidos marcados con radiactividad también se refleja la desaturación, también mayor a 10°C que a 30°C. A baja temperatura las semillas desaturaron el 50% del [^{14}C]18:1 y a alta temperatura el 33%.

El tratamiento de las semillas (B) comenzó con la incubación del capítulo a 10°C durante 24 horas, que provocó un aumento del linoleato del 16%. Después las semillas se incubaron otras 24 horas a 10°C y 30°C en presencia de [^{14}C]18:1. La desaturación a linoleato continuó a las dos temperaturas, a 10°C el linoleato aumentó en un 4,6% y a 30°C en un 1,5%. En los lípidos marcados la desaturación fue la misma a 10°C y 30°C, del 32% aproximadamente. En este tratamiento se alcanza el nivel máximo de 18:2 que puede tener una semilla de girasol de esta edad (Sarmiento et al., 1998). Esto indica que la actividad oleato desaturasa debe tener algún tipo de regulación que impida que se desature todo el oleato disponible. El hecho que se alcance el mismo nivel de 18:2 tanto en los lípidos endógenos de la semilla como en los recientemente sintetizados (radiactivos) apoya esta hipótesis.

3. Metabolismo de los lípidos sintetizados incubando previamente las semillas del fenotipo normal, a tiempo largo y en atmósfera de N_2 , con [^{14}C]18:1 y [^{14}C]18:2.

Como hemos visto en el bloque IV, la incubación de las semillas bajo N_2 permite la incorporación de ácidos grasos marcados a los lípidos, evitando su desaturación. La incubación a tiempo largo permite una buena incorporación a TAG. La incubación posterior de las semillas en atmósfera de aire permite estudiar el proceso de desaturación y sus efectos sobre el metabolismo general de los lípidos.

3.1. Metabolismo de los lípidos marcados con [^{14}C]18:1.

Se incubaron semillas en desarrollo del fenotipo normal con [^{14}C]18:1, en atmósfera de N_2 , a 10°C, durante 18 horas. Con este tratamiento se pretendía incorporar el [^{14}C]18:1 a los lípidos de la semilla, con preferencia a TAG, evitando su desaturación a [^{14}C]18:2. A continuación las semillas se lavaron para retirar el sustrato que no se había incorporado y se continuó la incubación a la misma temperatura pero en atmósfera de aire, tomando

muestras a diferentes tiempos. Con ello se pretende estudiar el metabolismo de los lípidos de la semilla en relación con el paso de 18:1 desde los TAG a la PC y del 18:2 desde la PC a los TAG.

En la Tabla 42 se muestra la variación de la composición de ácidos grasos de los lípidos de la semilla (ácidos grasos no radiactivos que forman los lípidos preexistentes). Se incluyen sólo los datos de las semillas control y después de 24 horas de incubación en el aire, observándose una fuerte desaturación de oleato, que se refleja en todos los lípidos. Con objeto de observar esto con más detalle, en la Figura 24 se muestra la evolución del % de 18:2 en los distintos lípidos. Cuando las semillas se pusieron en atmósfera de aire, comenzó el proceso de desaturación, que se apreció en primer lugar en los LP. Después de 1,5 h. de incubación, ya se había producido un aumento del 10% de linoleato en los LP, que se reflejaba en los LT con un 2%. Después de 24 horas, se observó un aumento de linoleato del 16% en los lípidos totales. Este aumento se observó, así mismo, en el resto de los lípidos, siendo los LP los que tenían un mayor contenido de este ácido, con un 55%.

Tabla 42. Composición de ácidos grasos de los LT y de los principales lípidos de las semillas. Los resultados son media \pm D.S. de 3 experimentos.

Tratamiento	Lípido	16:0	18:0	18:1	18:2
---	LT	8,9 \pm 0,1	11,1 \pm 0,2	45,2 \pm 0,1	34,7 \pm 0,3
	TAG	8,7 \pm 0,1	10,5 \pm 0,5	48,9 \pm 0,4	31,9 \pm 0,2
	1,2-DAG	16,1 \pm 0,2	18,7 \pm 0,6	39,6 \pm 0,2	25,6 \pm 0,5
	LP	13,5 \pm 0,5	13,4 \pm 0,4	38,6 \pm 0,2	34,4 \pm 0,3
24 horas	LT	8,4 \pm 0,2	9,7 \pm 0,0	31,1 \pm 0,2	50,8 \pm 0,0
	TAG	9,1 \pm 0,7	11,2 \pm 1,0	35,1 \pm 2,2	44,6 \pm 4,0
	1,2-DAG	16,2 \pm 3,5	13,4 \pm 0,1	31,4 \pm 2,9	39,0 \pm 7,3
	LP	12,9 \pm 1,5	13,7 \pm 4,3	18,1 \pm 0,1	55,3 \pm 2,9

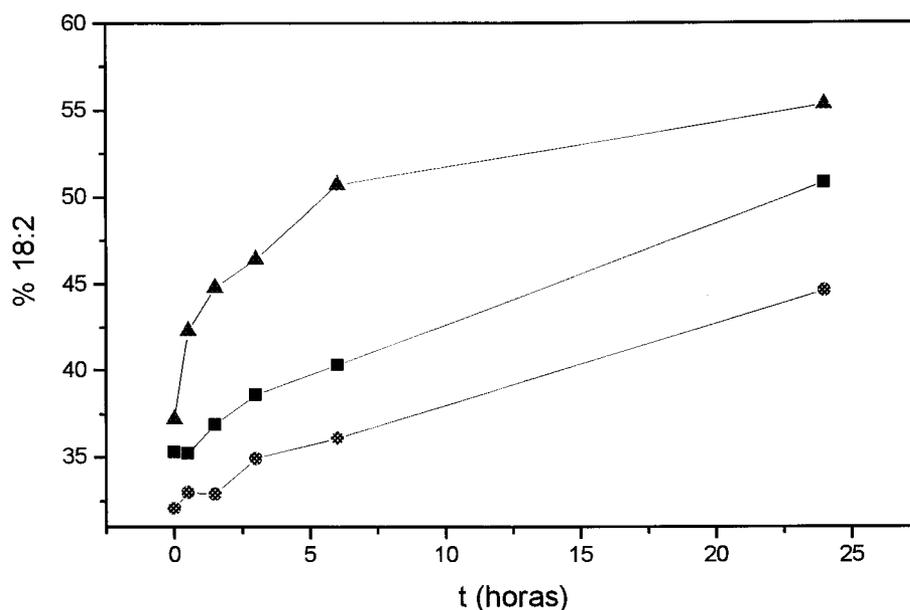


Figura 24. Evolución del 18:2 en los lípidos totales (■), triacilglicéridos (●) y lípidos polares (▲) de semillas en desarrollo incubadas a 10°C en aire. D.S. < 10%

Tabla 43. Metabolismo de los lípidos previamente sintetizados por preincubación de las semillas con [^{14}C]18:1. Los resultados son media \pm D.S. de 3 experimentos.

Trat.	% Incorporación [^{14}C]						LT	
	TAG	AGL	1,2-DAG	PC	Otros LP	LT		
						[^{14}C]18:1	[^{14}C]18:2	
Lavado	71,2	9,0	8,4	5,7	5,7	100	0,0	
30 min	69,5	9,4	10,7	4,4	6,1	100	0,0	
1h.30min	72,1	8,3	10,5	3,6	5,6	91,6	8,4	
3 horas	66,4	11,4	8,6	4,8	8,8	87,6	12,4	
6 horas	63,7	10,2	7,7	9,2	9,3	80,9	19,2	
24 horas	65,5	11,1	10,9	5,4	7,2	63,8	36,3	

D.S.<10% de la media.

Por su parte, la incorporación de [^{14}C]18:1 a los lípidos totales fue del orden de 2 nmoles, (40% de incorporación). Tras la preincubación con [^{14}C]18:1 en atmósfera de N_2 , el sustrato radiactivo se incorporó preferentemente en los TAG (71,2%), seguidos de los 1,2-DAG (8,4%) y la PC (5,7%), quedando un 9% como ácidos grasos libres (Tabla 43). La incubación posterior en atmósfera de aire provocó pequeños cambios en la incorporación a los distintos lípidos, particularmente un descenso en los TAG, que comenzó a apreciarse a partir de las 3 horas de incubación.

En los lípidos radiactivos, que son representativos de los ácidos grasos y lípidos recientemente sintetizados, también se apreció el proceso de desaturación. En el punto de partida, después del lavado, toda la radiactividad en los LT corresponde a [^{14}C]18:1. Durante la incubación en atmósfera de aire se observa el aumento de [^{14}C]18:2 y la correspondiente disminución de [^{14}C]18:1. En la Figura 25 se muestran los cambios de los dos ácidos radiactivos tanto en los LT como en los TAG y LP. Al final de la incubación se había sintetizado un 36,3% de [^{14}C]18:2 en los lípidos totales. y un 15,6% y un 3%, en los TAG y LP, respectivamente.

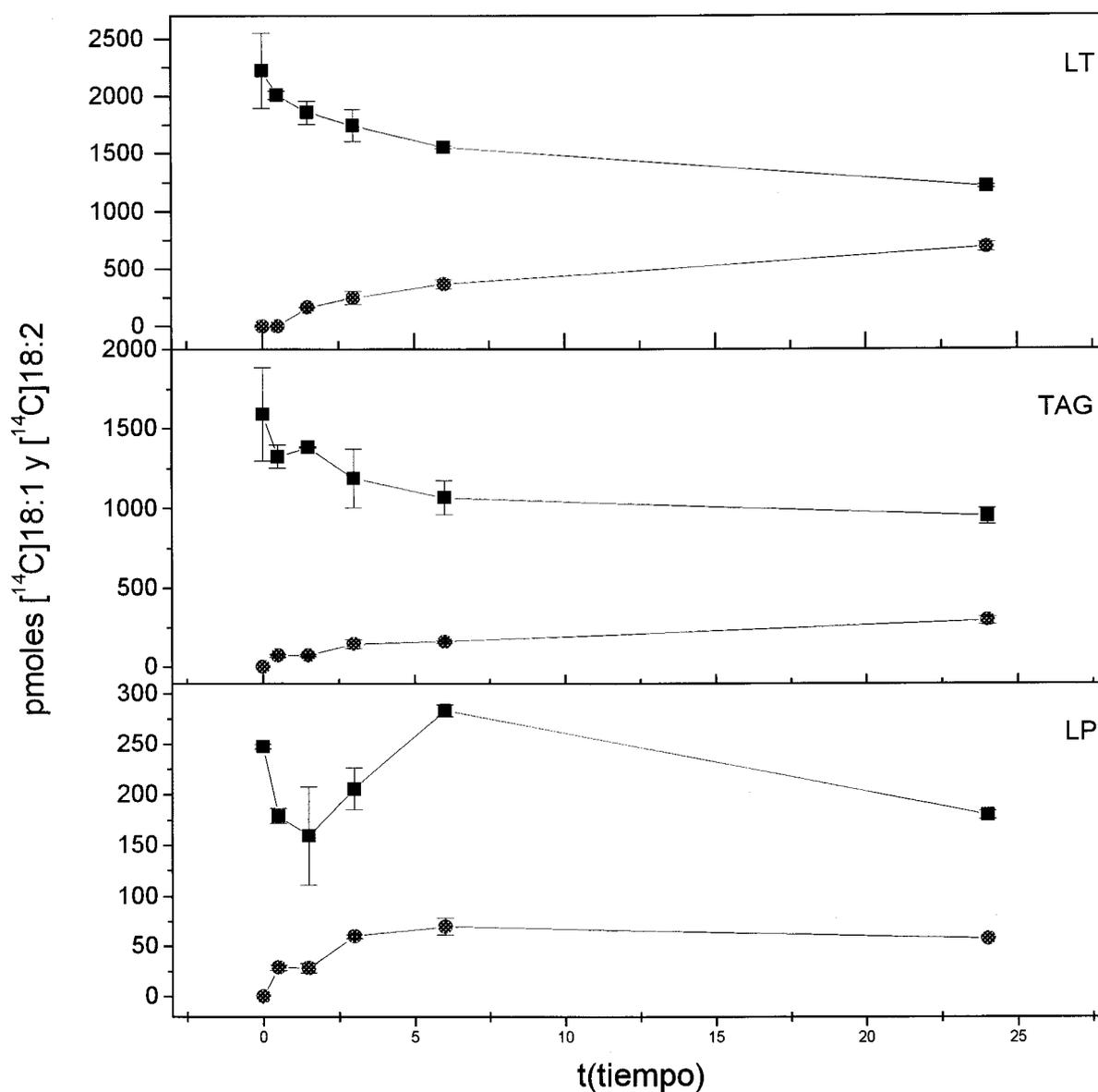


Figura 25. Incorporación de $[^{14}\text{C}]18:1$ (■) y $[^{14}\text{C}]18:2$ (●) a los LT, TAG y LP de semillas en desarrollo incubadas a 10°C en aire.

De los resultados de la Figura 25 se deduce que el $[^{14}\text{C}] 18:1$ que se desatura a $[^{14}\text{C}] 18:2$ procede principalmente de los TAG, en los que se había acumulado el 71,2% del $[^{14}\text{C}] 18:1$ durante la preincubación. La disminución de oleato en los TAG es superior al aumento de linoleato, lo que justifica la disminución de la radiactividad total en TAG (Tabla 43). En los LP se aprecian oscilaciones en el contenido de $[^{14}\text{C}] 18:1$ que puedan explicarse por el paso de este ácido de los TAG a la PC y su vuelta a los TAG una vez desaturado. Es interesante destacar también que el $[^{14}\text{C}] 18:2$ aumenta constantemente en

los TAG mientras que en los LP aumenta al principio y después se estabiliza. Este comportamiento está de acuerdo con la desaturación en PC y también indica que el linoleato que se transfiere a los TAG no se moviliza constituyendo el verdadero producto final de la síntesis de ácidos grasos de reserva de la semilla.

3.2. Metabolismo de los lípidos marcados con [^{14}C]18:2.

A continuación se hizo un experimento similar al anterior, pero incubando las semillas con [^{14}C]18:2. Se incubaron semillas en desarrollo del fenotipo normal a 10°C durante 18 horas, en atmósfera de N_2 . Luego, las semillas se lavaron, para retirar el sustrato que no se había incorporado, y se continuó la incubación a la misma temperatura en atmósfera de aire.

La incorporación del sustrato radiactivo a los lípidos totales fue del orden de 1,5 nmoles de [^{14}C]18:2 y se mantuvo constante durante el experimento.

Tabla 44. Metabolismo de los lípidos previamente sintetizados por preincubación de las semillas con [^{14}C]18:2. Se incubaron a 10°C durante 18 horas bajo N_2 . Los resultados son media \pm D.S. de 2 experimentos.

% INCORPORACIÓN [^{14}C]						
Trat.	TAG	AGL	1,3-DAG	1,2-DAG	PC	Otros LP
Lavado	71,8	6,2	4,7	6,9	6,1	4,4
1h.30min	71,7	3,9	5,3	7,3	7,2	4,8
3 horas	72,5	3,9	5,5	7,9	5,6	4,7
9 horas	76,9	2,9	5,4	9,1	3,2	2,6
24 horas	78,2	2,8	4,2	7,5	3,9	3,4

D.S.<10% de la media.

La incorporación de [^{14}C]18:2, en la muestra de partida, después del lavado, fue mayoritariamente a TAG (71,8%), el resto de los lípidos tuvieron una incorporación bastante menor, del orden del 6-2% (Tabla 44). Hay que destacar la presencia de 1,3-DAG, que son lípidos que no se detectan en incubaciones con [^{14}C]18:1. Durante la incubación, se observó un aumento de radiactividad en los TAG. En este experimento, en el que el único ácido graso radiactivo es el [^{14}C]18:2, el resultado más destacable es que, a diferencia de lo que ocurre en el caso del 18:1, no se aprecia la transferencia de 18:2 de los TAG a otros lípidos. Se excluye, pues, la posibilidad de que el 18:2 de los TAG se utilice como alternativa a la desaturación del 18:1 a baja temperatura.

4. Efecto de la temperatura de incubación sobre la incorporación de [^{14}C]18:1 a los lípidos de las semillas, en atmósfera de N_2 .

En este apartado se estudió cómo afecta la temperatura (entre 10°C y 40°C) a la incorporación de [^{14}C]18:1 a los principales lípidos de la semilla de girasol normal. Para evitar el efecto de la desaturación a linoleato, las incubaciones se realizaron en atmósfera de N_2 .

El experimento consistió en incubar semillas en desarrollo del fenotipo normal con [^{14}C]18:1 a 10°C, 20°C, 30°C y 40°C durante 2 horas, en atmósfera de nitrógeno.

La incorporación del sustrato radiactivo a lípidos totales fue similar entre 10 y 30°C (7-7,5%) pero se redujo a 4,3% a 40°C (Tabla 45).

La incorporación a los diferentes lípidos dependió de la temperatura de incubación. A mayor temperatura, hubo menor incorporación a TAG y mayor a 1,2-DAG, que pasó del 10,7% a 10°C al 50% a 40°C. La incorporación a PC fue similar a todas las temperaturas, 23% a 10-30°C y 18% a 40°C. El resto de los lípidos variaron poco, y tuvieron menores incorporaciones.

Estos resultados demuestran que la incorporación a los lípidos se ve afectada fuertemente por la temperatura. A temperatura alta el paso de DAG a TAG se hace más lento, acumulándose los DAG. Esto se puede utilizar como herramienta para estudiar el paso de DAG a TAG, tal como se muestra en el experimento siguiente.

Tabla 45. Incorporación de [^{14}C]18:1 a los principales lípidos de la semilla. Los resultados son media \pm D.S. de 2 experimentos.

T ^a	Incorporación					
	nmoles [^{14}C]18:1 (%)	% INCORPORACIÓN [^{14}C]				
	LT	TAG	1,2-DAG	PC	PE	Otros LP
10°C	1,8 \pm 0,0 (7,1%)	51,4 \pm 2,1	10,7 \pm 1,0	23,2 \pm 3,2	4,9 \pm 1,0	9,9 \pm 0,5
20°C	1,8 \pm 0,1 (7,0%)	51,9 \pm 2,2	13,2 \pm 0,3	23,8 \pm 0,6	4,8 \pm 0,2	6,4 \pm 1,3
30°C	1,9 \pm 0,2 (7,5%)	42,7 \pm 0,0	20,7 \pm 1,5	22,4 \pm 1,7	5,2 \pm 0,6	9,0 \pm 0,2
40°C	1,1 \pm 0,2 (4,3%)	17,0 \pm 0,4	50,2 \pm 0,9	18,4 \pm 0,8	5,8 \pm 0,4	8,6 \pm 0,1

5. Metabolismo de los lípidos previamente sintetizados por preincubación con [^{14}C]18:1, a 40°C bajo N₂.

Se incubaron semillas en desarrollo del fenotipo normal con [^{14}C]18:1 a 40°C durante 2 horas, en atmósfera de nitrógeno. Las semillas se lavaron para eliminar el sustrato que no se había incorporado. La incorporación a los LT fue del orden de 2 nmoles y la mayor parte del sustrato se incorporó a 1,2-DAG (44,4%). Después, se continuó la incubación a 10°C, también bajo nitrógeno

Cuando las semillas se pusieron a baja temperatura (10°C) hubo una redistribución de la radiactividad (Figura 26). Aumentó progresivamente el contenido de [^{14}C]18:1 en TAG,

que pasó del 17% inicial al 69,5%, después de 48 horas de incubación. Este incremento se produjo a expensas de los 1,2-DAG y la PC.

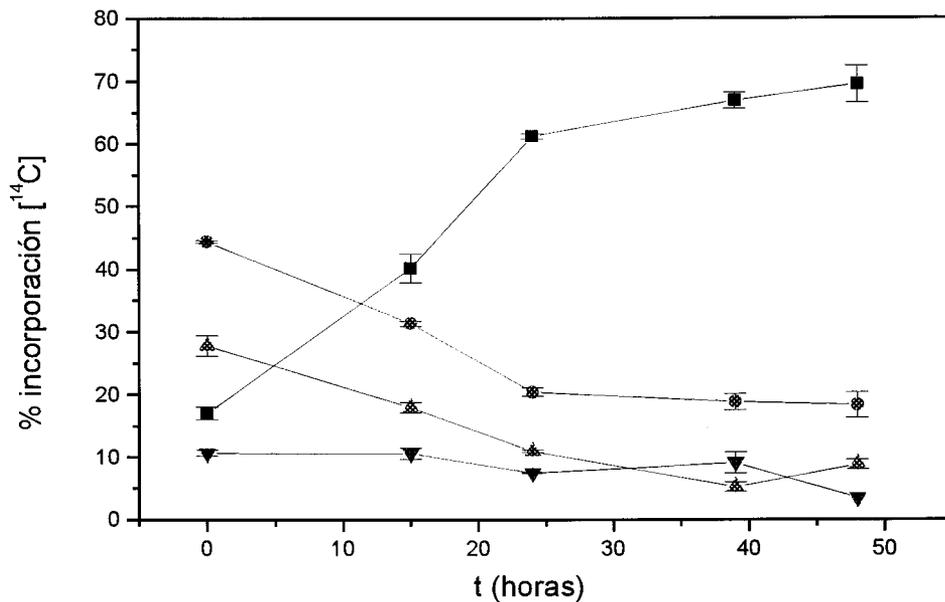


Figura 26. Metabolismo de los lípidos que habían sido sintetizados por incubación con $[^{14}\text{C}]18:1$ a 40°C bajo N_2 . (■ Triacilglicéridos; ● Diacilglicéridos; ▲ Fosfatidilcolina; ▼ Otros lípidos polares). Las barras de error reflejan las desviaciones estándar de la media de los 3 experimentos realizados.

Los resultados de este experimento ponen de manifiesto un flujo muy intenso de oleato desde los DAG y PC a los TAG. Estos cambios se producen en atmósfera de N_2 , confirmando la capacidad de la semilla de mantener un metabolismo activo de los lípidos en anaerobiosis. Las condiciones del experimento excluyen la participación del linoleato. Resulta interesante destacar que, a baja temperatura (10°C) pero sin que se produzca desaturación, el oleato tiende a acumularse en los TAG. También resulta interesante destacar que no se produce acumulación de oleato en la PC.

Analizando en su conjunto los resultados de experimentos en los que se puede observar el metabolismo de los lípidos a baja temperatura, con o sin desaturación de oleato (Tablas 43 y 45, Figuras 25 y 26), se puede concluir que este tiende a acumularse en los

TAG pero puede ir a PC para ser desaturado. Por el contrario, el linoleato solo realiza el cambio de PC a TAG, donde queda almacenada hasta la germinación.

Los resultados de los experimentos in vivo con semillas de girasol en desarrollo sugieren la existencia de mecanismos de interconversión entre TAG y PC, con la probable intervención de los DAG. Estos mecanismos deben involucrar no sólo a los ácidos grasos (transferencia de acilos entre lípidos) sino también, y probablemente de forma importante, a la parte glicéridica de la molécula, es decir interconversión lípido-lípido. Por un lado, hay algunos mecanismos bien consolidados que incluyen la interconversión entre PC y DAG (Slack et al., 1983; Slack et al., 1995) y la conversión de DAG en TAG por acilación en la posición sn-3, que requiere acil-CoA, y que constituye el paso final de la ruta de Kennedy. Sin embargo, la conversión de TAG conteniendo 18:1 en PC es un mecanismo que no ha sido demostrado. Teniendo en cuenta la rápida interconversión entre PC y DAG, sería suficiente, para explicarlo, la existencia de un mecanismo que permita la conversión de TAG en DAG. La única evidencia que se ha aportado la constituye la demostración, en microsomas de cártamo, de un mecanismo de transacilación que, al menos in vitro, permite la reacción reversible (Stobart et al., 1997).



Con objeto de tratar de aclarar este punto, se han realizado experimentos in vivo con monoacilglicéridos (MAG). Así mismo, se han realizado experimentos in vitro con microsomas aislados de girasol.

VI. INCUBACIONES DE SEMILLAS EN DESARROLLO CON MAG.

1. Incubaciones de semillas en desarrollo con [¹⁴C]MAG.

En este apartado se ha estudiado el efecto de los monoacilglicéridos (MAG) sobre el metabolismo lipídico *in vivo*. Se conoce poco sobre la participación de los MAG en el metabolismo lipídico en los tejidos vegetales, aunque en animales se ha demostrado que están involucrados en la síntesis de lípidos (Yang y Kuksis, 1991). En microsomas de cártamo se ha demostrado la interconversión entre DAG y TAG mediante mecanismos de transacilación con la participación de MAG y sin la participación directa de acilos (Stobart et al., 1997). También en microsomas de tejidos animales se ha descrito la síntesis de MAG y TAG, a través de reacciones de transacilación (Lehner y Kuksis, 1993).

1.1. Incorporación de [¹⁴C]MAG a los lípidos de la semilla.

En primer lugar se estudió si los [¹⁴C]MAG se pueden incorporar a los lípidos de las semillas en desarrollo. Para obtener los [¹⁴C]MAG se utilizó como sustrato radiactivo glicerol tri[1-¹⁴C]oleato. Este triacilglicérido radiactivo se mezcló con aceite de oliva refinado, y se hizo la hidrólisis parcial de la mezcla con lipasa pancreática, los [¹⁴C]MAG se separaron mediante CCF (apartado II.2.1.7. de Materiales y Métodos). Semillas en desarrollo de fenotipo normal se incubaron a 10°C y en atmósfera de N₂ con una suspensión de [¹⁴C]MAG en tampón fosfato pH 7,2.

Se determinó la incorporación de los MAG radiactivos a los LT y a los principales lípidos de la semilla. La incorporación a los LT aumentó con el tiempo de incubación, pasando del 20% en 1 hora de incubación al 81% en 15 horas (Tabla 46).

Después de una hora de incubación quedaron sin metabolizar el 60% de los MAG y se detectaron AGL (23%), 1,3-DAG (8,6%) y 1,2- DAG (8,2%), pero no LP ni TAG. Después de 3 horas de incubación, quedaba un 40% de MAG sin metabolizar, aumentaron los AGL y los DAGs, y no se detectaron LP ni TAG. Finalmente, tras 15 horas de incubación se había metabolizado la mayor parte de los MAG y se observa la formación de una importante cantidad de TAG y LP.

Tabla 46. Incorporación de [^{14}C] a los LT y a los principales lípidos de las semillas. Los resultados se expresan como % de incorporación y son media \pm D.S. de 2 experimentos.

Trat.	Incorporación [^{14}C] (%)		Incorporación [^{14}C] (pmoles)			
1 hora	19,8 \pm 2,4		75,0 \pm 8,8			
3 horas	27,3 \pm 2,4		103,6 \pm 8,9			
15 horas	80,9 \pm 4,5		307,5 \pm 17,0			
	TAG	AGL	1,3-DAG	1,2-DAG	MAG	LP
1 hora	0,0 \pm 0,0	22,9 \pm 4,0	8,6 \pm 2,9	8,2 \pm 2,0	60,4 \pm 8,8	0,0 \pm 0,0
3 horas	0,0 \pm 0,0	34,7 \pm 0,2	12,7 \pm 1,7	12,2 \pm 1,2	40,5 \pm 2,9	0,0 \pm 0,0
15 horas	40,7 \pm 1,4	17,4 \pm 1,9	6,2 \pm 0,2	16,5 \pm 0,1	2,8 \pm 0,4	16,5 \pm 0,1

Estos resultados indican que los MAG han sufrido un intenso metabolismo que inicialmente, conduce a la formación de AGL, 1,3-DAG y 1,2-DAG. La ausencia de LP y TAG sugiere que los MAG no han penetrado en las células de la semilla y que, probablemente, las reacciones han tenido lugar en su superficie. Conviene indicar aquí que los DAG tendrían aún más dificultad para penetrar en la célula y, por tanto, para convertirse en TAG o PC. La aparición posterior (después de 15 horas) de LP y TAG, se explica a partir de los AGL que, como es sabido, atraviesan la membrana celular. No se puede afirmar, pues, que los TAG procedan directamente del metabolismo de los MAG, pero resulta interesante la formación de 1,2-DAG y 1,3-DAG, inicialmente en proporciones idénticas, lo que indica un metabolismo complejo que, probablemente, implica la participación de otros lípidos.

1.2. Metabolismo de [^{14}C]MAG en semillas en desarrollo del fenotipo normal.

A continuación se hizo un experimento en el que se incubaron semillas en desarrollo de fenotipo normal con [^{14}C]MAG a 10°C, en atmósfera de N_2 durante 1 hora. Luego, se lavaron las semillas con tampón fosfato pH 7,2. La incorporación de [^{14}C] a los LT de las semillas fue de 70,6 pmoles. Después se continuó la incubación en las mismas condiciones.

Tabla 47. Incorporación de [^{14}C]MAG a los principales lípidos de las semillas. Los resultados se expresan en % de incorporación y son media \pm D.S. de 2 experimentos.

Tratamiento	TAG	AGL	1,3-DAG	1,2-DAG	MAG	LP
Lavado	11,0 \pm 0,1	16,0 \pm 2,1	9,8 \pm 0,3	28,5 \pm 0,1	16,8 \pm 1,8	18,0 \pm 0,8
1 hora	22,9 \pm 4,0	15,6 \pm 1,8	8,3 \pm 0,4	26,8 \pm 2,6	10,4 \pm 0,8	16,2 \pm 2,2
3 horas	33,8 \pm 8,6	13,3 \pm 1,3	8,1 \pm 1,9	20,4 \pm 1,6	5,7 \pm 2,4	19,0 \pm 4,0
8 horas	50,5 \pm 5,8	14,9 \pm 0,0	6,8 \pm 0,6	13,8 \pm 2,1	3,4 \pm 1,7	10,7 \pm 1,5
24 horas	63,2 \pm 0,8	0,0 \pm 0,0	10,9 \pm 0,4	13,4 \pm 0,5	0,0 \pm 0,0	12,7 \pm 0,2

En este experimento el metabolismo de los MAG fue más rápido que en el anterior. Después de la preincubación y el lavado, se observó que la mayor parte de los MAG se habían metabolizado, quedando sólo un 16,8% sin utilizar. Los lípidos más marcados fueron los 1,2-DAG (28,5%). Después de 1 hora de incubación ya aparecen LP y TAG. Se observó que la incorporación de radiactividad a TAG aumentó con el tiempo de incubación, a la vez que disminuyeron los demás lípidos. Después de 24 horas de incubación, los MAG y los AGL se habían consumido completamente. Los resultados de este experimento confirman los del anterior en cuando a la formación de 1,2- y 1,3- DAG a expensas de los MAG. Además, el hecho de que los 1,2-DAG sean los más abundantes (tras la preincubación y después de 1 hora de incubación), superando a los LP, en contraste con lo que ocurre en incubaciones a tiempo corto con [^{14}C]18:1, (ver **Tabla 29**), indica un metabolismo complejo de los MAG que da lugar a la formación de ambos tipos de DAG. El hecho que los 1,2-DAG se encuentren en mayor cantidad que los 1,3-DAG, es coherente con el hecho que los primeros participan en la formación de TAG a través de la ruta de Kennedy, mientras que los 1,3-DAG no tienen aún un papel asignado en el metabolismo lipídico.

2. Influencia de los MAG en la incorporación y desaturación de [¹⁴C]18:1 en semillas en desarrollo.

En este experimento se estudió la incorporación y posterior desaturación de [¹⁴C]18:1 en semillas en desarrollo que se incubaron con MAG no radiactivos. Los MAG fríos se obtuvieron de un aceite de oliva refinado mediante lipólisis y se cuantificaron con patrón interno.

Se incubaron semillas en desarrollo de fenotipo normal con [¹⁴C]18:1, a 10°C en atmósfera de N₂, durante 18 horas. Después se lavaron con tampón fosfato pH 7,2, para retirar el sustrato radiactivo que no se había incorporado. Las semillas se dividieron en lotes. En unas muestras se añadieron 10,9 μmoles de MAG fríos y en otras no se añadió ningún sustrato. A continuación, todas las muestras se incubaron a 10°C, en atmósfera de aire, y se tomaron puntos a distintos tiempos. La incorporación del sustrato radiactivo a los lípidos totales fue del orden de 1 nmol, equivalente a un 35% del [¹⁴C]18:1 suministrado.

Tras la preincubación con [¹⁴C]18:1 y posterior lavado, se observó que la mayor parte de la radiactividad se encontraba en los TAG (68%) y en PC (14%), el resto de los lípidos tenían entre 4,5-2,1% de incorporación. Durante la incubación posterior, tanto en presencia como en ausencia de MAG, aumentó la incorporación a TAG hasta un 83-85%, mientras que los lípidos polares disminuyeron, sobre todo la PC.

En la composición de ácidos grasos de los lípidos totales no radiactivos se observó que durante la cinética aumentó el porcentaje de ácido linoleico que pasó del 39,5% al 52%, indicando una fuerte actividad desaturasa, no observándose diferencias entre las muestras incubadas con y sin MAG. Por el contrario, la desaturación de [¹⁴C]18:1 a [¹⁴C]18:2 se vio afectada por la presencia de MAG, observándose una menor desaturación en las muestras incubadas con MAG (Tabla 48). El porcentaje de linoleato aumentó con el tiempo de incubación, tanto en los TAG como en los LP. La mayor diferencia se observó en los TAG radiactivos que llegaron a tener un 30,5% de todo el [¹⁴C]18:2 incorporado a los lípidos en la incubación con MAG, frente a un 37,8% en la incubación sin MAG. Los resultados indican que los MAG tienen un efecto inhibitorio sobre la desaturación de oleato. Estos resultados obligan a replantear si los MAG pueden o no penetrar en las células de la semilla. Los resultados de este experimento indican que han debido penetrar, en contra de lo que sugieren los precedentes. La explicación puede estar en la diferente concentración de los MAG en el medio de incubación. En los experimentos anteriores se añadieron MAG

radiactivos con una concentración de 76 nM, mientras que en éste se añadieron MAG con una concentración 1,2 mM. No resulta sorprendente que una pequeñísima pero continua penetración de MAG en la célula durante una incubación de 24 h produzca efectos detectables. En los ensayos *in vitro* (Stobart et al., 1997) la concentración de MAG estaba entre 0,1 y 0,5 mM, siendo inhibitoria por encima de este último valor.

Tabla 48. Contenido de [^{14}C]18:1 y [^{14}C]18:2 en los TAG y LP de las semillas. Los resultados se expresan como porcentajes de cada ácido en el total de los lípidos, y son media \pm D.S. de 2 experimentos

Trat.	Tiempo	TAG		LP	
		[^{14}C]18:1	[^{14}C]18:2	[^{14}C]18:1	[^{14}C]18:2
	Lavado	68,3 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	21,5 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
con MAG	2 h	64,8 \pm 0,5	4,2 \pm 0,4	14,0 \pm 0,1	5,0 \pm 0,1
	5 h	72,0 \pm 0,5	10,7 \pm 0,5	4,6 \pm 0,3	2,9 \pm 0,3
	9 h	67,0 \pm 0,3	15,6 \pm 0,3	4,4 \pm 0,9	3,5 \pm 0,0
	24 h	52,3 \pm 0,2	30,5 \pm 0,2	2,7 \pm 0,1	4,2 \pm 0,0
sin MAG	2 h	67,4 \pm 0,2	6,7 \pm 0,2	10,4 \pm 0,2	5,9 \pm 0,1
	5 h	68,8 \pm 0,6	12,6 \pm 0,6	4,8 \pm 0,3	3,5 \pm 0,3
	9 h	65,1 \pm 0,9	19,1 \pm 0,9	3,7 \pm 0,2	4,4 \pm 0,2
	24 h	47,0 \pm 0,1	37,8 \pm 0,1	2,5 \pm 0,1	4,9 \pm 0,0



VII. INCUBACIONES DE LOS MICROSOMAS DE LAS SEMILLAS.

En este apartado se ha estudiado el comportamiento de los lípidos microsomales, marcados con [^{14}C]18:1 y [^{14}C]18:2 en incubaciones a distintas temperaturas. De esta forma se complementa el trabajo realizado *in vivo* con experimentos *in vitro*. Se han realizado dos tipos de experimentos. En el primero, la incorporación a los lípidos microsomales se ha realizado *in vivo*, incubando las semillas con el sustrato radiactivo y aislando después la fracción microsomal. En el segundo tipo la incorporación se ha realizado *in vitro*, incubando los microsomas con [^{14}C]18:1-CoA y G-3-P.

1. Incorporación *in vivo* de [^{14}C]18:1 y [^{14}C]18:2 a los lípidos de la fracción microsómica.

En este experimento se han elegido dos temperaturas extremas, 10°C y 40°C, para estudiar la incorporación de [^{14}C]18:1 y [^{14}C]18:2 a los lípidos microsomales. Con ello los resultados se pueden comparar con los de los experimentos *in vivo* de la **Tabla 45** y **Figura 26**.

Semillas del fenotipo normal se incubaron con el correspondiente sustrato a 10°C o 40°C en atmósfera de nitrógeno. Después de la incubación se trituraron en un mortero con tampón Hepes-Sorbitol pH 7,2 y se obtuvo el homogeneizado, del que se obtuvieron los correspondientes microsomas (apartado II.3. de Materiales y Métodos), que se resuspendieron en tampón fosfato pH 7,2.

Como referencia, en la Tabla 49 se puede ver la incorporación a los lípidos de la semilla, que confirman resultados anteriores (**Tablas 43 y 45**).

Tabla 49. Incorporación de [^{14}C]18:1 y [^{14}C]18:2 a los lípidos de la semilla tras su incubación, bajo N_2 , con los sustratos radiactivos. Los resultados son media \pm D.S. de 2 experimentos.

Trat.	Sustrato	TAG	AGL	1,2-DAG	1,3-DAG	LP
24 h, 10°C	[^{14}C]18:1	83,4	-	4,7	-	12,0
		$\pm 1,2$		$\pm 0,8$		$\pm 0,8$
18 h, 40°C	[^{14}C]18:1	28,7	8,4	34,9	-	28,0
		$\pm 2,7$	$\pm 1,7$	$\pm 0,5$		$\pm 4,4$
18 h, 40°C	[^{14}C]18:2	43,7	5,6	30,6	3,7	16,7
		$\pm 2,8$	$\pm 1,8$	$\pm 0,8$	$\pm 0,1$	$\pm 0,5$

En la Tabla 50 se muestra la incorporación de [^{14}C]18:1 y [^{14}C]18:2 a los principales lípidos de la fracción microsómica.

Tabla 50. Incorporación de [^{14}C]18:1 y [^{14}C]18:2 a los lípidos de la fracción microsómica, obtenida de semillas que habían sido incubadas, bajo N_2 , con el sustrato radiactivo. Los resultados son media \pm D.S. de 2 experimentos.

Trat.	Sustrato	TAG	AGL	1,2-DAG	1,3-DAG	PC	Otros LP
24 h, 10°C	[^{14}C]18:1	32,2	6,5	11,2	-	32,2	18,1
		$\pm 1,7$	$\pm 2,0$	$\pm 1,3$		$\pm 1,9$	$\pm 0,6$
18 h, 40°C	[^{14}C]18:1	12,5	6,6	30,9	-	24,1	25,8
		$\pm 1,8$	$\pm 0,4$	$\pm 2,7$		$\pm 4,0$	$\pm 5,0$
18 h, 40°C	[^{14}C]18:2	18,9	8,0	21,4	3,4	12,5	36,0
		$\pm 1,4$	$\pm 3,3$	$\pm 1,3$	$\pm 1,0$	$\pm 1,7$	$\pm 2,8$

La incorporación a los lípidos de la semilla y de los microsomas fue muy diferente. A 10°C, la incorporación en los lípidos de la semilla fue casi en su totalidad a TAG y también aparecieron marcados los 1,2-DAG y los lípidos polares (constituidos principalmente por PC). En microsomas, por el contrario, la incorporación preferente fue a lípidos polares,

especialmente a PC (32%), aunque la incorporación a TAG fue también importante (similar a la de PC).

A 40°C, la incorporación a los lípidos de la semilla fue menor en TAG y mayor en 1,2-DAG Y LP, especialmente en la incubación con [^{14}C]18:1. En el caso de los microsomas la incorporación fue diferente. El [^{14}C]18:1 se incorporó principalmente a 1,2-DAG, seguido de la PC y otros LP (25% en cada uno), mientras que la incorporación a TAG fue menor (12,5%).

La mayor incorporación de [^{14}C]18:2 fue a LP, con una incorporación menor a PC (12,5%), seguido de 1,2-DAG (21,4%) y TAG (19%). También aparecieron los 1,3-DAG con un 3,4%.

Estos resultados indican que la composición de los lípidos microsomales se puede modificar, incubando previamente la semilla, bajo N_2 , con el ácido graso a la temperatura adecuada.

2. Metabolismo *in vitro* de los lípidos microsomales.

Se ha estudiado el metabolismo de los lípidos de microsomas aislados de semillas que habían sido incubadas previamente con [^{14}C]18:1 o [^{14}C]18:2.

Para ello, semillas en desarrollo de fenotipo normal se incubaron con el correspondiente sustrato en atmósfera de nitrógeno a 10°C o 40°C, con objeto de modificar la composición de los lípidos microsomales radiactivos, en particular, TAG, 1,2-DAG y PC. Después se trituraron en un mortero con tampón Hepes-Sorbitol pH 7,2 y se obtuvo el homogeneizado que se procesó para obtener los correspondientes microsomas (apartado II.3. de Materiales y Métodos) que se resuspendieron en tampón fosfato 7,2.

2.1. Metabolismo de los lípidos microsomales ricos en 1,2-DAG.

Para conseguir que los lípidos microsomales fueran pobres en TAG y PC y ricos en 1,2-DAG, las semillas se incubaron con [^{14}C]18:1 o [^{14}C]18:2 durante 18 horas a 40°C, en atmósfera de nitrógeno. Se obtuvieron los microsomas y se resuspendieron en tampón fosfato pH 7,2, con Cl_2Mg 30 mM y se incubaron a 20°C sólo en tampón, tomando

alícuotas a distintos tiempos. En la Figura 27 se muestra la composición inicial y los cambios en los lípidos radiactivos de la fracción microsómica.

De acuerdo con lo esperado, en ambos casos los 1,2-DAG fueron los lípidos más abundantes, mientras que la PC presenta niveles bajos. La única diferencia está en el contenido de TAG que, siendo bajo como corresponde a la incubación a 40°C, presenta un valor algo más alto en la incubación con [^{14}C]18:2 y especialmente bajo en la incubación con [^{14}C]18:1.

Durante el metabolismo posterior de los lípidos microsomales a 20°C se produjo, en ambos casos, un incremento de los DAG y una disminución de la PC. Es interesante destacar que, a pesar del elevado contenido en DAG, éste aumenta a costa de la PC. Se observan diferencias en el metabolismo de los lípidos de los microsomas marcados con [^{14}C]18:1 y con [^{14}C]18:2, especialmente a lo que se refiere a los TAG. En los primeros, se aprecia una síntesis de TAG en las primeras 3 horas, seguida de su degradación durante las 6 horas siguientes.

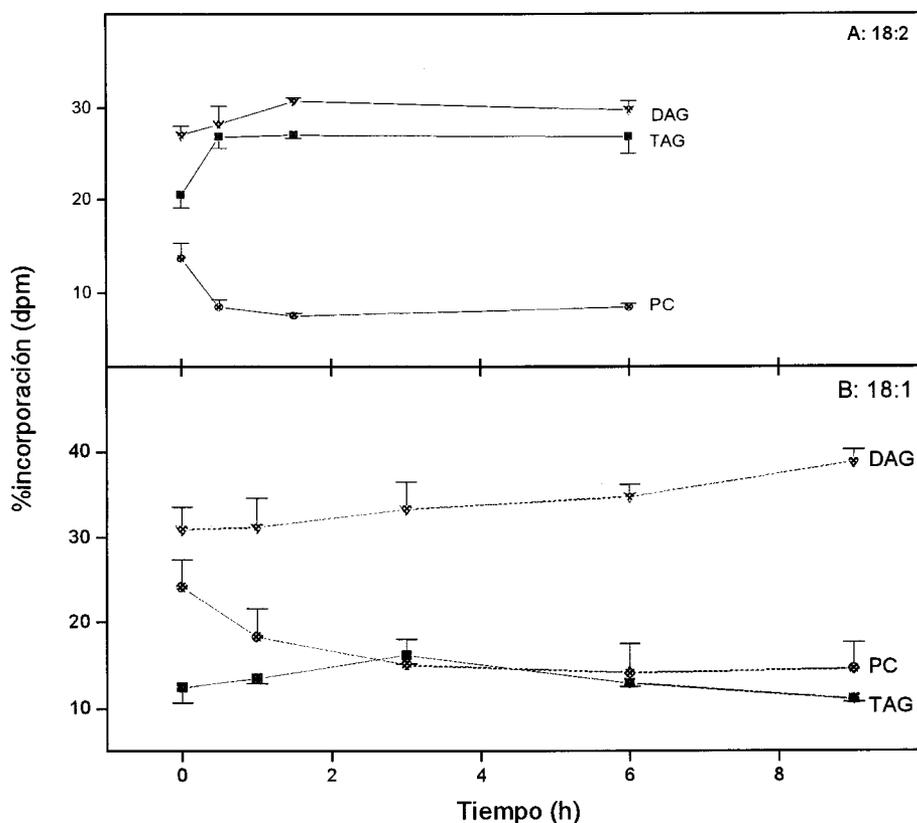


Figura 27. Cinética de los lípidos microsomales incubados a 20°C con [^{14}C]18:2 (gráfica A) y con [^{14}C]18:1 (gráfica B). Los microsomas se obtuvieron de semillas incubadas previamente con [^{14}C]18:1 a 40°C. TAG (■); DAG (▽); PC (●). D.S. <10%.

Este resultado confirma los obtenidos *in vivo* con la semilla intacta, indicando que el oleato puede, tanto incorporarse a los TAG, como salir de ellos, de acuerdo con el siguiente esquema:



En los microsomas marcados con [¹⁴C]18:2, por el contrario, sólo se aprecia un aumento de DAG y TAG a costa de la PC. Estos resultados también confirman los obtenidos *in vivo* e indican que el linoleato sólo puede incorporarse a los TAG, donde queda almacenado.



2.2. Metabolismo de los lípidos microsomales ricos en TAG y PC. Influencia de los MAG.

Con objeto de conseguir una mayor incorporación a TAG y PC, las semillas se incubaron con [¹⁴C]18:1 durante 24 horas a 10°C, en atmósfera de nitrógeno. Una vez obtenidos los microsomas, se resuspendieron en tampón fosfato 7,2, y Cl₂Mg 30 mM y se dividieron en dos lotes. Uno de ellos se incubó sólo con el tampón y al otro se le añadió, además, 10,9 μmoles de MAG obtenidos como se indica en el apartado 1.1. del bloque VI. Ambos lotes se incubaron a 20°C, tomando puntos a distintos tiempos.

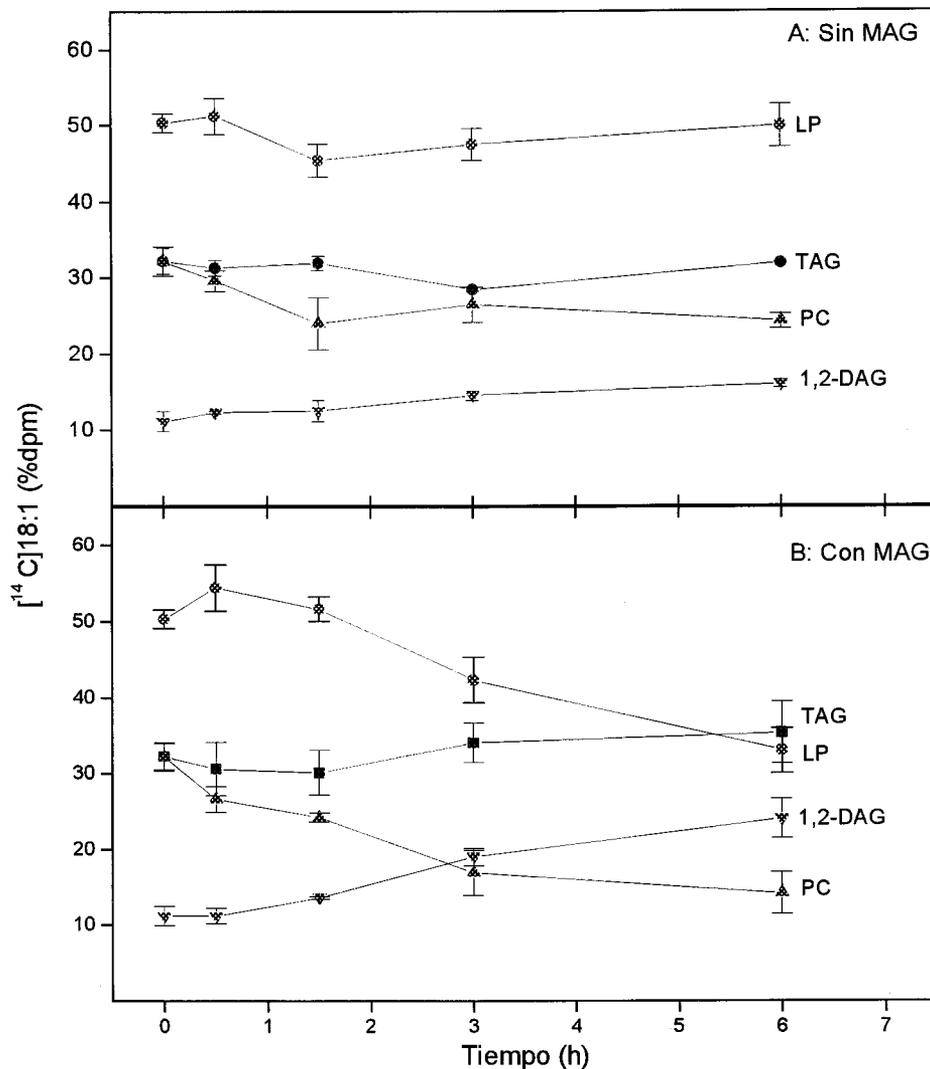


Figura 28. Metabolismo de los lípidos microsomales incubados a 20°C, sin MAG (gráfica A), y con MAG (gráfica B). Los microsomas se obtuvieron a partir de semillas en desarrollo de fenotipo normal, incubadas previamente con [^{14}C]18:1 a 10°C. TAG (■); DAG (▽); PC (◻); LP (●). D.S. <10%.

Los microsomas obtenidos presentaron una incorporación similar a TAG y PC (32%) y baja a DAG (11%).

En los microsomas incubados sin MAG sólo se observó un pequeño aumento de los 1,2-DAG y una disminución de la PC, junto con pequeñas oscilaciones de los TAG. Estos resultados coinciden con los del experimento anterior (microsomas marcados con [^{14}C]18:1). Por el contrario, en los microsomas incubados en presencia de MAG se produjeron cambios importantes. Se observó una disminución de LP, especialmente PC, y un aumento de 1,2-DAG y TAG. Estos resultados sugieren que los MAG estimulan el paso de oleato de la PC a los TAG, mediante un mecanismo no descrito. La transferencia de

oleato de PC a TAG reduce la cantidad de oleato disponible para la ODS, lo que explicaría los resultados en los que la presencia de MAG reduce la desaturación (Tabla 48).

3. Metabolismo de los lípidos microsomales sintetizados a partir de [^{14}C]18:1-CoA y G-3-P.

La incubación de microsomas con [^{14}C]18:1 y G-3-P origina la formación de los distintos lípidos sintetizados a partir del ácido fosfatídico (PA), que es el producto inicial de la ruta de Kennedy. Para ello, se obtuvieron microsomas de semillas en desarrollo de fenotipo convencional que se resuspendieron en tampón fosfato pH 7,2.

El ensayo de incubación llevaba: 40 μl microsomas (0,5 mg proteína), 1,87 nmoles de [^{14}C]18:1-CoA, 5,6 nmoles de G-3-P, 1 mg de BSA y Cl_2Mg 5 mM.

Los microsomas junto al resto de componentes del ensayo, se incubaron a 20°C durante 45 min. En una alícuota de la suspensión de microsomas se extrajeron los lípidos y se determinó la incorporación del sustrato radiactivo y su distribución entre los distintos tipos de lípidos separados por CCF sobre gel de sílice.

En la Tabla 51 puede verse la composición de los lípidos radiactivos formados a partir del [^{14}C]18:1 y el G-3-P. En las condiciones de la incubación, prácticamente todo el PA formado se ha metabolizado, quedando sólo un 3,3% como tal. La mayor parte se ha convertido en PC (34%) con niveles bajos de TAG (14%) y 1,2-DAG (7%). Es interesante destacar la presencia de otros lípidos que habitualmente no se detectan, tales como 1,3-DAG (4%), MAG (6%) y LPC (3%). Los 1,3-DAG sólo se habían detectado en incubaciones con [^{14}C]18:2, lo que sugiere que cuando el ácido radiactivo es 18:1 el metabolismo de los 1,3-DAG es muy rápido, lo que impide que se detecte su presencia en incubaciones sin G-3-P. La presencia de MAG es aún más interesante, especialmente si aparecen junto a los 1,3-DAG y 1,2-DAG. Esto confirma los resultados obtenidos *in vivo* en los que MAG radiactivos dan lugar a formación de ambos tipos de DAG.

Tabla 51. Incorporación de [^{14}C]18:1 a los lípidos microsomales. Los microsomas se incubaron a 20°C durante 45 min con [^{14}C]18:1-CoA y G-3-P. Los resultados son media \pm D.S. de 2 experimentos.

TAG	AGL	1,3-DAG	1,2-DAG	Otros LN	MAG	PC	PA	LPC	Otros LP
14,3	7,0	4,1	7,1	6,3	5,9	33,9	3,3	2,7	15,6
$\pm 1,3$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,5$	$\pm 1,7$	$\pm 1,7$	$\pm 0,8$	0,2	0,0	$\pm 0,1$

Al resto de las muestras se añadió Cl_2Mg 1M para precipitar los microsomas, los cuales se lavaron con tampón fosfato pH 7,2 y se recuperaron por centrifugación. Luego, se volvió a añadir tampón fosfato pH 7,2 y Cl_2Mg 5 mM, y continuó la incubación a 20°C, tomando alícuotas a distintos tiempos.

En el metabolismo posterior a 20°C (Figura 29), tras un período de reajuste de 15 min, durante el cual se agotó el G-3-P, como indica el leve aumento de PA, se observó un aumento sostenido de TAG y de 1,3-DAG a costa de la PC. El nivel de 1,2-DAG permaneció constante, lo que está de acuerdo con su carácter de intermediario entre la PC y los TAG. Lo mismo ocurre con los MAG y la LPC, sugiriendo que actúan también como intermediarios en el mismo proceso.



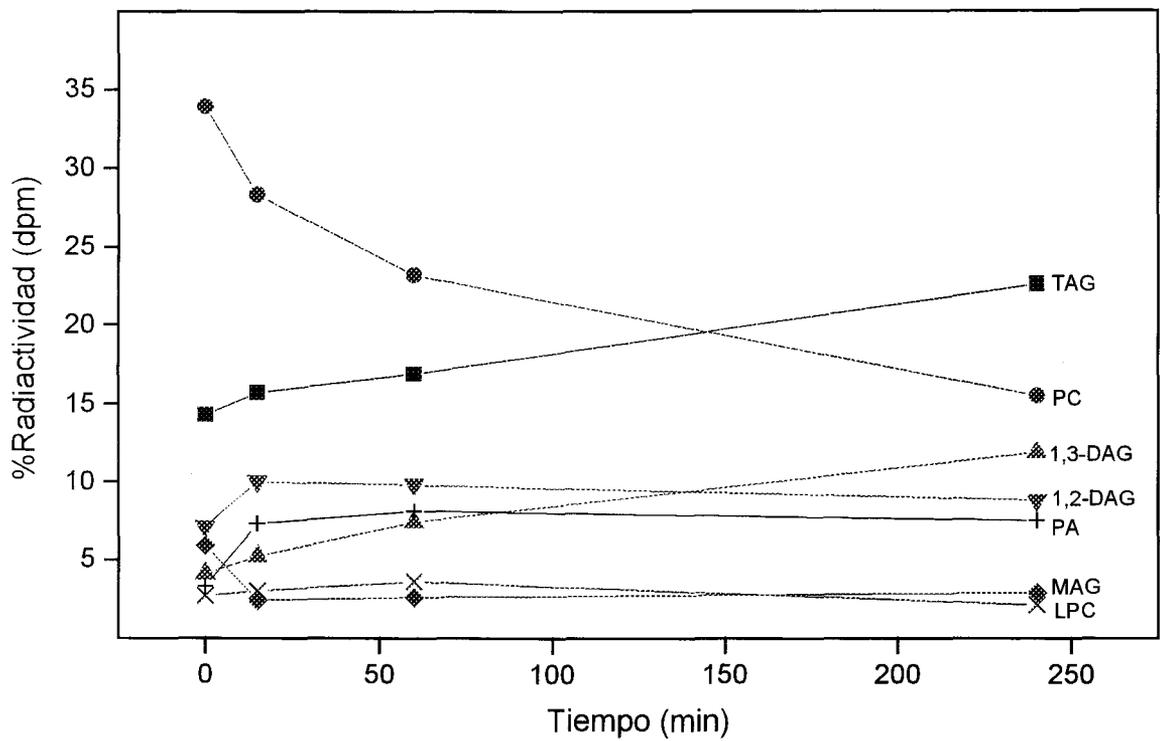


Figura 29. Metabolismo de los lípidos microsomales obtenidos por preincubación con [^{14}C]18:1-CoA y G-3-P. Los microsomas se incubaron a 20°C durante 45 min. TAG (■); 1,2-DAG (▽); PC (●); 1,3-DAG (◻); PA (+); MAG (∩); LPC (x). D.S. <10%.

DISCUSIÓN

I. Durante el desarrollo de la semilla, el ácido linoleico aumenta a costa del ácido oleico hasta convertirse en el ácido graso mayoritario en la semilla del girasol normal. En el mutante alto oleico, por el contrario, el ácido oleico fue el mayoritario durante todo el período. El aumento del ácido linoleico corresponde al aumento de la actividad oleato desaturasa. La temperatura de crecimiento afecta, sobre todo, a los ácidos insaturados oleico y linoleico. Las semillas de plantas crecidas a temperaturas más bajas presentaron un mayor contenido en ácido linoleico debido por una parte a la mayor actividad oleato desaturasa y por otra a la inducción de la síntesis de nueva enzima. Las de plantas crecidas a alta temperatura (24°C cte.) fueron las que presentaban un menor contenido en ácido linoleico y este efecto se reflejó en las fracciones subcelulares, oleosomas y microsomas.

El análisis cuantitativo de los lípidos de la semilla confirmó que los mayoritarios son los TAG (> 90%), seguidos de los DAG y LP, entre los que destaca la PC. Los ácidos oleico y linoleico son los principales constituyentes de todos los lípidos.

II. En condiciones fisiológicas similares a las usuales en la planta, es decir incubando trozos de capítulo que contienen los aquenios, la desaturación de oleato puede tener lugar, en los lípidos de la semilla, tanto a alta como a baja temperatura. Esto parece contradecir resultados de un trabajo anterior, en el que se proponía que la alta temperatura provocaba represión de la actividad ODS (Sarmiento et al., 1998). Conviene indicar que en este trabajo las incubaciones se realizaron en tiempos cortos (1-2 horas) y los datos se daban en mol% de oleico y linoleico. Esta estrategia permite observar cambios rápidos bajo condiciones en las que la síntesis de lípidos es despreciable; resulta adecuada para estudiar el efecto de la baja temperatura sobre la desaturación de oleato, pero no para estudiar el efecto de la temperatura alta, donde predomina la síntesis de oleato frente a su desaturación.

A alta temperatura hay un suministro constante de oleato que se utiliza para sintetizar linoleato. En cambio, a temperatura baja, la síntesis de oleato es menor y en algún caso inapreciable, en estas condiciones el oleato utilizado para la desaturación proviene del que se encuentra almacenado en los TAG. De esta forma, se puede observar la disminución del

contenido de TAG, que normalmente no se aprecia al recibir el flujo del linoleato recién sintetizado. Estos cambios también se pueden apreciar en las especies de TAG.

Comparando los resultados obtenidos en las incubaciones con trozos de capítulo, aquenios aislados y semillas sin la cáscara, se pueden obtener interesantes conclusiones sobre la importancia de la disponibilidad de oxígeno en el proceso de desaturación *in vivo*. Los resultados obtenidos usando aquenios aislados indican que el oxígeno puede llegar a la semilla a través de la cáscara, a diferencia de lo que ocurre en las semillas en el capítulo, en las que el oxígeno puede llegar también a través del floema. En las incubaciones con aquenios, sólo se observó desaturación a baja temperatura, mientras que en las semillas peladas (que es el sistema *in vivo* en el que mejor se puede modificar la disponibilidad de oxígeno), la desaturación ocurre tanto a baja como a alta temperatura. Incluso se observó mayor desaturación a temperatura alta (30°C) que a temperatura baja (10°C), en tiempos de incubación cortos. A tiempos más largos, la inducción de la síntesis de nuevo enzima a temperatura baja permite que el contenido de linoleico aumente con el tiempo. A temperatura alta, por el contrario, la síntesis de linoleico, que inicialmente era más intensa, se ralentiza y después cesa por completo.

III. Los resultados confirman la competencia entre la respiración y otros procesos dependientes de oxígeno, como la desaturación. Se observa que la cáscara respira intensamente, consumiendo oxígeno y desprendiendo CO₂, lo que la convierte en una barrera para que el oxígeno acceda a los tejidos de la semilla. A baja temperatura el desprendimiento de CO₂ se mantiene constante y a alta temperatura disminuye con el tiempo. El hecho de que el desprendimiento de CO₂ aumente con la temperatura indica que el proceso de respiración es más intenso a alta que a baja temperatura. Como consecuencia, hay menos oxígeno disponible para la desaturación y mayor impedimento para la entrada de este gas, ya que al mismo tiempo se está produciendo la emisión de CO₂.

IV. Las semillas recuperan su tasa respiratoria después de permanecer en atmósfera de N₂. El metabolismo lipídico extraplastidial no se ve afectado por la incubación de las semillas en atmósfera de N₂, con la excepción de la desaturación de oleato. En las incubaciones con material alto oleico en atmósfera de N₂, no se observan diferencias con las incubaciones en aire. En el caso del material normal, la única diferencia es la desaturación de oleato en aire. Esto permite el uso de la atmósfera de N₂ en posteriores experimentos, en los que se

puede estudiar el metabolismo de los lípidos sin la posible interferencia de la desaturación de oleato a linoleato.

V. El oleato y el linoleato radiactivos se incorporaran a los lípidos de la semilla, principalmente a los TAG. El metabolismo posterior de los lípidos radiactivos provoca el movimiento de oleato y linoleato desde la PC a los TAG. El linoleato se incorpora a TAG más eficientemente que el oleato. Este movimiento tiene lugar tanto a baja como a alta temperatura y la velocidad del proceso depende de la temperatura y del sustrato incorporado. Por otra parte, a alta temperatura se produce una acumulación de 1,2-DAG y la correspondiente disminución de TAG, que podría explicarse por la ralentización del último paso de la ruta de Kennedy, pero también por la alteración de rutas alternativas para la síntesis de TAG, como veremos más adelante. En las incubaciones con linoleato se observa la formación de 1,3-DAG, lo que nos indica que este lípido participa en el proceso metabólico de incorporación y posterior movimiento de este ácido, lo que no ocurre en el caso del oleato.

En las semillas de girasol alto oleico, la radiactividad detectada corresponde siempre al sustrato que se ha incorporado [^{14}C]18:1 o [^{14}C]18:2, pero en las semillas de fenotipo normal hay que tener en cuenta la desaturación de oleato a linoleato. La desaturación, como ya se ha visto en apartados anteriores, tiene lugar a cualquier temperatura, confirmando que la temperatura alta no impide la desaturación.

Como se ha dicho, en las semillas del mutante alto oleico no se espera desaturación de oleato, pero sí en el material normal. El proceso de desaturación más intenso se produjo cuando se puso el capítulo a 10°C durante 24 horas, en comparación con las semillas peladas. En el capítulo las semillas sufren menos estrés que cuando se separan y se les priva de la cáscara. Además, en el capítulo se produce síntesis *de novo* (como se comprobó en el apartado II) y, por tanto, hay abundante sustrato para la desaturación. En las semillas peladas no se aprecia síntesis *de novo* y, por tanto, el oleato que es desaturado es el que forma parte de los lípidos, en especial de los TAG. Existe un problema adicional si las semillas se incuban sumergidas en un medio acuoso, lo que es práctica habitual en incubaciones con sustratos radiactivos. En este caso el oxígeno disponible es el que está disuelto en el agua, donde la solubilidad es pequeña y depende de la temperatura. Conviene destacar aquí la importancia del diseño experimental, que afecta fuertemente a los resultados. En el capítulo, en el que las semillas están en sus condiciones fisiológicas

habituales, el proceso de desaturación tiene lugar a cualquier temperatura, aunque fue más intensa a temperatura baja. Una vez que los aquenios se separaron y se incubaron en un medio acuoso, la desaturación solo se produjo a baja temperatura y cuando la concentración de oxígeno en el medio era máxima, correspondiente al burbujeo de O₂ puro (1,7mM). Sin embargo, cuando se incubaron en corriente de aire se observó una intensa desaturación a baja temperatura, pero no a alta temperatura. Cuando las semillas sin la cáscara se incubaron en corriente de aire, o en agua con intenso burbujeo de aire (concentración de oxígeno 353-244 μM), la desaturación se produjo a cualquier temperatura, aunque en tiempos cortos la desaturación fue más intensa a temperatura alta.

Las incubaciones se han realizado en atmósfera de N₂, para evitar la desaturación de [¹⁴C]18:1 durante la incorporación del sustrato, o en atmósfera de aire, para facilitar la desaturación. Con esta estrategia se ha podido estudiar como se afecta el metabolismo de los lípidos de la semilla como consecuencia de la desaturación del oleato. En el caso de incubaciones con [¹⁴C]18:2, el metabolismo lipídico no se ve afectado por la presencia o ausencia de oxígeno. Una importante diferencia entre los dos ácidos grasos se aprecia durante el metabolismo posterior: mientras que el [¹⁴C]18:2 continua almacenándose en TAG, el [¹⁴C]18:1 se mueve desde los TAG hacia los otros lípidos. De esta manera, el oleato está disponible como sustrato para el proceso de desaturación. La conclusión es que el [¹⁴C]18:2 sólo se mueve hacia TAG, mientras que el [¹⁴C]18:1 es capaz de volver a los LP, particularmente a la PC. Este proceso solo se ha observado en condiciones en las que se produce la desaturación de oleato.

VI. En las semillas incubadas con [¹⁴C]MAG, la radiactividad se observa inicialmente en AGL, 1,2-DAG y 1,3-DAG. La incorporación es prácticamente idéntica en ambos tipos de DAG y no se aprecia en otros lípidos como TAG o LP. De estos resultados no se deduce que los MAG penetren en las células de la semilla, donde los DAG formados se convertirían en LP y TAG, pero indican que los MAG generan un metabolismo complejo. Su conversión en 1,2-DAG los incorpora a las rutas metabólicas de los lípidos de la semilla. Por otro lado, su conversión en 1,3-DAG los relaciona con el paso de linoleato de la PC a los TAG, a través de un mecanismo desconocido. La presencia posterior de LP y TAG se explica por el metabolismo de AGL, que penetran libremente en la célula. Los experimentos realizados con [¹⁴C]18:1 a tiempo largo y en presencia de MAG no radiactivos en una concentración elevada (1.2 mM frente a 76nM en las incubaciones con

MAG radiactivos), indicaron que los MAG debieron penetrar, ya que aunque no afectaron a la distribución de los lípidos microsomales, sí afectaron a la desaturación de oleato. La desaturación fue menor en las semillas incubadas con MAG que en las incubadas sin MAG, y también fue menor su incorporación a TAG. Estos resultados sugieren que los MAG y los 1,3-DAG actúan como intermediarios en el intercambio de oleato y linoleato entre la PC y los TAG.

VII. La composición de los lípidos microsomales se ve afectada por la temperatura de incubación y también depende del sustrato radiactivo utilizado. En los lípidos microsomales de semillas incubadas a 40 °C con [¹⁴C]18:1 y [¹⁴C]18:2, se produjo una importante acumulación de 1,2-DAG y una escasa incorporación a TAG. El metabolismo posterior de estos lípidos incrementa aun más el contenido de 1,2-DAG a costa de la PC, mientras que la formación de TAG depende del sustrato empleado. En los microsomas marcados con [¹⁴C]18:1 los TAG presentan niveles bajos, aumentando primero y disminuyendo después. En los marcados con [¹⁴C]18:2, por el contrario, los TAG presentan inicialmente un nivel más alto y aumentan durante la incubación hasta alcanzar un nivel constante. Conviene destacar que el contenido de TAG en las membranas microsomales nunca alcanza valores superiores al 30-35%, muy alejados de los que se obtienen para los lípidos totales de la semilla. Los resultados *in vitro* confirman los obtenidos *in vivo*, en cuanto que el oleato puede incorporarse a los TAG y también salir de ellos, mientras que el linoleato se almacena irreversiblemente en los TAG.

Microsomas ricos en TAG, obtenidos de semillas incubadas a 10°C con [¹⁴C]18:1, se incubaron también con y sin MAG, sin que se pueda producir desaturación. La presencia de MAG estimuló el paso de oleato desde la PC a los TAG. Por su parte, la incubación de microsomas con [¹⁴C]18:1-CoA y G-3-P provocó la aparición de todos los productos de la ruta de Kennedy: PA, 1,2-DAG y TAG. Se observó la presencia de cantidades importantes de PC y otros LP, pero también de MAG, LPC y 1,3-DAG, cuando este último sólo se habían detectado en las incubaciones con [¹⁴C]18:2. Todos estos permanecieron presentes, durante el metabolismo posterior, mientras se produjo un incremento constante del contenido de TAG a costa de la PC. Estos resultados confirman la implicación de los 1,3-DAG en el metabolismo de los MAG y la participación de ambos en la transferencia de acilos entre la PC y los TAG.

CONCLUSIONES

El trabajo realizado en esta tesis ha consistido en el estudio del efecto de la temperatura y la disponibilidad de oxígeno sobre la desaturación de oleato en la semilla de girasol, el estudio del metabolismo lipídico bajo nitrógeno y los movimientos de oleato y linoleato entre lípidos como consecuencia del proceso de desaturación.

Como resumen del trabajo se pueden sacar las siguientes conclusiones:

1. La temperatura de crecimiento afecta a la composición de ácidos grasos de los lípidos de la semilla de girasol, reflejándose, tanto en los orgánulos de reserva (oleosomas) como en las membranas microsomales donde tienen lugar las reacciones extraplastidiales.
2. En concordancia con lo universalmente aceptado, la desaturación de oleato a linoleato se ve favorecida por las temperaturas bajas cuando la semilla de girasol se encuentra bajo condiciones fisiológicas en la planta. Nuestros resultados indican, sin embargo, que la desaturación de oleato tiene lugar tanto a baja como a alta temperatura, dependiendo más de la disponibilidad de oxígeno en los tejidos de la semilla que de la temperatura en sí misma.
3. La respiración compite con otros procesos metabólicos dependientes de oxígeno, como la desaturación de ácidos grasos. Las altas temperaturas provocan el aumento de la respiración y la disminución de la solubilidad de oxígeno en agua y, por tanto, de su disponibilidad como cosustrato para la desaturación.
4. Se demuestra la importancia de la vía de penetración del oxígeno en las semillas a través de la cáscara. Esta constituye una barrera, a veces insalvable, para la entrada de este gas y afecta a la desaturación.
5. En las semillas alojadas en el capítulo, la síntesis de novo de oleato aumenta con la temperatura. A temperatura alta el aporte de oleato supera la capacidad de desaturación, disminuyendo el porcentaje de ácido linoleico.
6. En las incubaciones con aquenios aislados, sólo se observa desaturación de oleato a baja temperatura. Por el contrario, cuando se elimina la cáscara, a alta temperatura se estimula la desaturación hasta que se produce la inactivación del enzima. La síntesis de nuevo enzima hace que la desaturación sea mayor a temperatura baja.

7. Las semillas recuperan su tasa respiratoria después de estar sometidas a una atmósfera de N₂. El metabolismo lipídico extraplastidial no se ve afectado por la ausencia de oxígeno, con la excepción de la desaturación de oleato.
8. Las incubaciones a baja temperatura provocan una acumulación de triacilglicéridos, que se favorece por la presencia de linoleato. Las incubaciones a alta temperatura provocan una acumulación de 1,2-diacilglicéridos y la correspondiente disminución de triacilglicéridos, que podría explicarse por la ralentización del último paso de la ruta de Kennedy, pero también por la alteración de rutas alternativas para la síntesis de triacilglicéridos.
9. El oleato y linoleato radiactivos se incorporan a los principales lípidos de la semilla. El metabolismo posterior provoca el movimiento de estos ácidos desde los lípidos polares, en particular fosfatidilcolina a los triacilglicéridos, tanto a alta como a baja temperatura. El linoleato sólo se mueve hacia los triacilglicéridos, mientras que el oleato es capaz de moverse en ambas direcciones.
10. En las incubaciones de microsomas con oleato radiactivo en presencia de glicerol-3-fosfato se forman lípidos no habituales que podrían actuar como intermediarios en la interconversión entre los triacilglicéridos y la fosfatidilcolina. Estos son los 1,3-diacilglicéridos, los monoacilglicéridos y la lisofosfatidilcolina.
11. Experimentos *in vivo* indican que los 1,3-diacilglicéridos aparecen al incubar semillas con linoleato, pero no con oleato, y también cuando las semillas se incuban con monoglicéridos. Por otra parte, la presencia de monoacilglicéridos provoca una menor desaturación de oleato y estimula el paso de oleato desde la PC a los TAG.
12. Estos resultados indican que los mecanismos alternativos a la ruta de Kennedy para la síntesis de triacilglicéridos tienen gran importancia en la semilla de girasol. Estos mecanismos suponen la incorporación inicial de los ácidos grasos a la fosfatidilcolina y su transferencia a los triacilglicéridos vía diacilglicéridos.
13. Los resultados sugieren que en estos mecanismos podrían participar reacciones de transacilación, como la que permite la interconversión entre triacilglicéridos y diacilglicéridos con implicación de los monoacilglicéridos. En estas reacciones podrían también participar los 1,3-diacilglicéridos, lo que explicaría el intercambio de ácidos grasos entre las distintas posiciones de la molécula de glicerol.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

-
- Al-Ani, A., Bruzau, F., Raymond, P., Saint-Ges, V., Lellanc, J.M. y Pradet, A. (1985)**, Germination, respiration, and adenylate energy change of seeds at various oxygen partial pressures. *Plant Physiology* 79, 885-890.
- Al-Ani, A., Leblanc, J.M., Raymond, P. y Pradet, A. (1982)** en "Effet de la pression partielle d'oxygène sur la vitesse de germination des semences à réserves lipidiques et amylacées: rôle du métabolisme fermentaire". *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris*, 295, Série III: 271-274.
- Alba, A. y Llanos, M. (1990)**. Crecimiento y ecología. En "El cultivo del girasol". Colección agroguías mundi-prensa. pp. 41-56.
- Álvarez-Ortega, R., Cantisán, S., Martínez-Force, E. y Garcés, R. (1997)**, Characterization of polar and nonpolar seed lipid classes from highly saturated fatty acids sunflower mutants. *Lipids* 32, 833-837.
- Avery, S.V., Rutter, A.J., Harwood, J.L. y Lloyd, D. (1996)**, Oxygen-dependent low-temperature $\Delta 12$ (n6)-desaturase induction and alteration of fatty acid composition in *Acanthamoeba castellanii*. *Microbiology* 142, 2213-2221.
- Barron, E.J. y Stumpf, P.K. (1962)**, Fat metabolism in higher plants: XIX. The biosynthesis of triglycerides by avocado-mesocarp enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 60, 329-337.
- Bergfeld, R., Hong, Y.N., Kuhn, Y. y Schopfer, P. (1978)**, Formation of olesomes (storage lipid bodies) during embryogenesis and their breakdown during development in cotyledons of *Sinapsis alba* L.. *Planta* 143, 297-307.
- Bewley, J.B. y Black, M. (1982)** *Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination*. Springer-Verlang, Berlin.
- Block, M.A., Dorne, J.A., Joyard, J. y Douce, R. (1983)**, The phosphatidic acid phosphatase of the chloroplast envelope is located on the inner envelope membrane. *FEBS Lett.* 164, 111-115.
- Brenner, R.R. (1984)** Effect of unsaturated acids on membrane structure and enzyme kinetics. *Prog. Lipid Res.* 23, 69-96.

- Broadwater, J.A., Haas, J.A. y Fox, B.G. (1998)**, The fundamental, versatile role of diiron enzymes in lipid metabolism. *Fett/ Lipid* 100, 103-113.
- Brockman, J.A., Norman, H.A. y Hildebrand, D.F. (1990)**, Effect of temperature, light and a chemical modulator on linolenate biosynthesis in mutant and wild type *Arabidopsis* calli. *Phytochemistry*, 29, 1447-1453.
- Brown, C.M. y Rose, A.H. (1969)**, Fatty-acid composition of *Candida utilis* as affected by growth temperature and dissolved-oxygen tension. *J. Bacteriol.* 99, 371-378.
- Browse, J. y Slack, C.R. (1983)**, The effects of temperature and oxygen on the rates of fatty acid synthesis and oleate desaturation in safflower (*Carthamus tinctorius*) seed. *Biochim. Biophys. Acta* 753, 145-152.
- Browse, J. y Somerville, C.R. (1991)**, Glycerolipids synthesis: Biochemistry and Regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 42, 467-506.
- Cantisán, S. (1999)** en Caracterización de un mutante de girasol (*Helianthus annuus* L.) con alto contenido de ácido esteárico en su aceite. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.
- Canvin, D.T. (1963)**, Formation of oil in the seed of *Ricinus communis* L. *Can. J. Biochem. Physiol.* 41, 1879-1885.
- Canvin, D.T. (1965)**, The effect of temperature on the oil content and fatty acid composition of the oils from several oil seed crops. *Can. J. Bot.* 43, 63-69.
- Cao, Y.Z. y Huang, A.H.C. (1986)**, Diacylglycerol acyltransferase in maturing oil seeds of maize and other species. *Plant Physiol.* 82, 813-820.
- Carelli, A.A. y Cert, A. (1993)**, Comparative study of the determination of triacylglycerol in vegetable oils using chromatographic techniques. *Journal Chromatography* 630, 213-222.
- Caughey, I. y Kekwick, R.G.O., (1982)**, The characteristics of some components of the fatty acid synthetase system in the plastids from the mesocarp of avocado (*Persea americana*). *Eur. J. Biochem.* 123, 553-561.
- Côme, D. (1982)** en "Croissance et développement. Physiologie Végétale II". P. Mazliak, (ed.). Hermann, Paris. pp. 129-226
- Corbineau F. y Côme D. (1995)** Control of Seed Germination and Dormancy by the Gaseous Environment. En "Seed development and germination". J. Kigel y G. Galili, (eds.). Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 397-424.

- Coultate, T.P. (1996)** Lípidos. En "Food: The Chemistry of its Components". T.P. Coultate (ed.). 3ª Edition, The Royal Society of Chemistry. pp. 54-93.
- Chapman, G.W. Jr. (1980)**, A conversion factor to determine phospholipid content in soybean and sunflower crude oils. J. Am. Oil Chem. Soc., 59, 299-302.
- Christie, W.W. (1982)**, en "Lipids Analysis", W.W. Christie (ed.), Pergamon Int., Oxford 2ª edition, pp.1.
- Davidson, H.F., Campbell, E.J., Richard, J.B., y Pritchard, R.A. (1996)** Sunflower Oil. En "Bailey's Industrial Oil and Fat Products". Y.H. Hui (ed). A Wiley-Interscience. Publication New York. Vol. 2, pp. 603-689.
- Dobarganes, M.C., Márquez-Ruiz, G. y Pérez-Camino, M.C. (1993)**, Thermal stability and frying performance of genetically modified sunflower seed (*Helianthus annuus* L.) oils. J. Agric. Food Chem., 41, 678-681.
- Evstigneeva, R. (1993)** Chemical Stability. En "Phospholipids Handbook". G. Cevc, (ed.). Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 323-333.
- Fernández-Martínez, J.M., Jiménez-Ramírez, A., Domínguez-Giménez, J. y Alcántara, A. (1986)**, Influencia de la temperatura en el contenido de ácido oleico y linoleico del aceite de tres genotipos de girasol. Grasas y Aceites, 37, 326-331.
- Fernández-Martínez, J.M., Domínguez-Giménez, J. y Jiménez-Ramírez, A. (1987)** , Obtención de dos líneas puras con altos niveles de ácido oleico. Comunicaciones Agrarias, nº 4, Junta de Andalucía, Sevilla.
- Fernández-Martínez, J.M., Jiménez, A., Domínguez, J., García, J.M., Garcés, R. y Mancha, M. (1989)**, Genetic analysis of the high oleic acid content in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). Euphytica, 41, 39-51.
- Fernández-Martínez, J.M., Mancha, M., Osorio, J. y Garcés, R. (1997)**, Sunflower mutant containing high levels of palmítico acid in high oleic background. Euphytica 97, 113-116.
- Fick, G.N. (1989)** Sunflower. En "Oil Crops of the world". G. Röbbelen, R.K. Downey y A. Ashri (eds.). Mcgraw-Hill. New York. pp. 301-318.
- Fick, G.N., (1984)** Inheritance of high oleic acid in the seed oil of sunflower en Proc. 6th Sunflower Forum, Bismarck, ND. 1 Feb. National Sunflower Association, Bismarck, ND. pp. 9.

- Fried, B. (1991)** Handbook of Thin-Layer Chromatography. En "Chromatographic Science Series" J. Sherma, y B.Fried (eds). Marcel Dekker, New York. 55: 593-600.
- Frentzen, M. (1993)** Acyltransferases and triacylglycerols. En "Lipid Metabolism in Plants". T.S. Moore, Jr. (ed.). Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 195-231.
- Frentzen, M., Hares, W. y Schiburr, A. (1984)** Properties of the microsomal glycerol 3-P and monoacylglycerol 3-P acyltransferase from leaves. En "Structure, Function and Metabolism of Plant Lipids". P.A. Siegenthaler y W. Eichenberger, (eds.). Elsevier, Amsterdam. pp. 105-110.
- Frey-Wyssling, A., Grieshaber, E. y Mühlethales, K. (1963)**, Origin of spherosomes in plant cells. J. Ultrastruct. Res. 8, 506-516.
- Gadea L., M. (1966)** El girasol. En "El Girasol. Planta Industrial y Forrajera". M. Gadea Loubriel, (ed.). Ministerio de Agricultura. pp. 33-52.
- Garcés, R. y Mancha, M. (1989)**, Oleate desaturation in seeds of two genotypes of sunflower. Phytochemistry 28, 2593-2595.
- Garcés, R. y Mancha, M. (1991)**, In vitro oleate desaturasa in developing sunflower seeds. Phytochemistry 30, 2127-2130.
- Garcés R. y Mancha, M. (1993)**, One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. Analytical Biochemistry 211,139-143.
- Garcés, R., García, J.M. y Mancha, M. (1989)**, Lipid characterization in seeds of a high oleic acid sunflower mutant. Phytochemistry 28, 2597-2600.
- Garcés, R., Sarmiento, C. y Mancha, M. (1992)**, Temperature regulation of oleate desaturasa in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. Planta 186, 461-465.
- Garcés, R., Sarmiento, C. y Mancha, M. (1994)**, Oleate from triacylglycerols is desaturated in cold-induced developing sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed. Planta 193, 473-477.
- García, J.M., Quintero, L.C. y Mancha, M. (1988)**, Oil bodies and lipid synthesis in developing soybean seeds. Phytochemistry, 27, 3083-3087.
- García-Díaz, M.T., Sarmiento, C. y Mancha, M. (1998)** The in vivo oleate desaturation in sunflower seeds depends on the availability of oxygen. En "Advances in Plant Lipid Research". J. Sánchez, E. Cerdá-Olmedo y E. Martínez-Force, (eds.) Universidad de Sevilla, Sevilla. pp. 140-142.

- Gray, D.A. y Kekwick, R.G.O. (1996)**, Oleate desaturase activity in sunflower (*Helianthus annuus*) seeds and its relation to associated constituents during seed development. *Plant Science* 115, 39-47.
- Griffiths, G. y Harwood, J.L. (1991)**, The regulation of triacylglycerol biosynthesis I cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Planta* 184, 279-284.
- Griffiths, G., Stobart, A.K. y Stymne, S. (1985)**, The acylation of sn-glycerol 3-phosphate and the metabolism of phosphatidate in microsomal preparations from the developing cotyledons of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed. *Biochem. J.* 230, 379-388.
- Griffiths, G., Stymne, S., Beckett, A. y Stobart, K. (1986)**, Lipids metabolism in immature cotyledons of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) exposed to light. *Plant Biol.* 2, 147-156.
- Grundy, S.M. (1986)**, Comparison of monounsaturated fatty acids and carbohydrates for lowering plasma cholesterol. *N. Engl. J. Med.* 314, 745-748.
- Grundy, S.M. (1994)**, Influence of stearic acid on cholesterol metabolism relative to other long-chain fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.* 60, 986S-990S.
- Gundaev, A. I. (1971)** Basic principles of sunflower selections. En "Genetic principles of plant selection". Nauka, Moscow. pp. 417-465.
- Gunstone, F.D., Harwood, J.L. y Padley, F.B. (1994)**. En "The Lipid Handbook". F.D. Gunstone, J.L. Harwood y F.B. Padley (eds.) 2ª edition. Chapman & Hall. London.
- Gurr, M.I. (1974)** The biosynthesis of unsaturated fatty acids. En "Biochemistry of Lipids". T.W. Goodwin (ed.). Butterworths, London. Vol. 4, pp.181-235.
- Gurr, M.I., Robinson, M.P. y James, A.T. (1969)**, The mechanism of formation of polyunsaturated fatty acids by photosynthetic tissue. *Eur. J. Biochem.* 9, 70-78.
- Hara, A. y Radin, N.S. (1978)**, Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal. Biochem.* 90, 420-426.
- Harris, P. y James, A.T. (1969 a)**, The effect of low temperature on fatty acid biosynthesis in plants. *Biochem. J.* 112, 325-330.
- Harris, P. y James, A.T. (1969 b)**, Effect of low temperature on fatty acid biosynthesis in seed. *Biochim. Biophys. Acta* 187, 13-18.
- Harris, H.C., McWilliam, J.R. y Mason, W.K. (1978)**, Influence of temperature on oil content and composition of sunflower seed. *Aust. J. Agric. Res.* 29, 1203-1212.

- Harwood, J.L. (1979)** The synthesis of acyl lipids in plant tissues. En Prog. Lipid Res. Pergamon Press Ltd. Vol. 18, pp. 55-86
- Harwood, J.L. (1996)**, Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. Biochimica et Biophysica Acta 1301, 7-56.
- Henderson, R.J. y Tocher, D.R. (1992)** Thin-layer chromatography. En "Lipid Analysis a Practical Approach". R.J. Hamilton y S. Hamilton, (eds.). IRL Press. Oxford. pp. 65-111.
- Heppard, E.P., Kinney, A.J., Stecca, K.L. y Miao, G-H. (1996)**, Developmental and growth temperature regulation of two different microsomal omega-6 desaturase genes in soybeans. Plant Physiol. 110, 311-319.
- Heydecker, W., y Chetram, R. S. (1971)** Water relations of beetroot seed germination. I. Microbial factors, with special reference to laboratory germination. Annals of Botany 35, 17-29.
- Hitchcock, C. y Nichols, B.W. (1971)** Plant Acil Lipids. En "Plant Lipid Biochemistry: the biochemistry of fatty acids and acyl lipids with particular reference to higher plants and algae". C. Hitchcock, y B.W. Nichols (eds.). Academic Press. London. pp. 43-58.
- Hoj, P.B. y Svedson, I. (1983)**, Barley acyl carrier protein: its amino acid sequence and assay using purified malonyl CoA:ACP transacylase. Carlsberg Res. Commun 48, 285-305.
- Huang, A.H.C. (1992)**, Oil bodies and oleosins in seeds. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43, 177-200.
- Hui, Y.H., (1996)**, Sunflower oil. En "Bailey's industrial oil and fat products". Y.H. Hui, (ed.). A Wiley-Interscience Publication, New York. Vol. 2, pp 603-689.
- Ichihara, K. (1984)**, *sn*-Glycerol-3-phosphate acyltransferase in a particulate fraction from maturing safflower seeds. Arch. Biochem. Biophys. 232, 685-698.
- Ichihara, K. (1991)**, The action of phosphatidate phosphatase on the fatty acid composition of safflower triacylglycerol and spinach glycerolipids. Planta 183, 353-358.
- Ichihara, K. y Noda, M. (1981)**, Triacylglycerol synthesis by subcellular fractions of maturing safflower seeds. Phytochemistry 20, 1245-1249.
- Ichihara, K. y Noda, M. (1982)**, Some properties of diacylglycerol acyltransferase in a particulate fraction from maturing safflower seeds. Phytochemistry 21, 1895-1901.

- Ichihara, K., Naoki, M. y Fujii, S. (1990)**, Intracellular translocation of phosphatidate phosphatase in maturing safflower seeds: a possible mechanism of feedforward control of triacylglycerol synthesis by fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1043, 227-234.
- Ichihara, K., Norikura, S. y Fujii, S. (1989)**, Microsomal phosphatidate phosphatase in maturing safflower seeds. *Plant Physiol.* 90, 413-419.
- Jackowski, S. y Rock, C.O. (1987)**, Acetoacetyl-acyl carrier protein synthase, a potential regulator of fatty acid biosynthesis in bacteria. *J. Biol. Chem.* 262, 7927-7931.
- Jaworski, J.G., Clough, R.C. y Barnum, S.R. (1989)**, A cerulenin insensitive short chain 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase in *Spinacia oleracea* leaves. *Plant Physiol.* 90, 41-44.
- Jones, A.L., Lloyd, D. y Harwood, J.L. (1993)**, Rapid induction of microsomal $\Delta 12(\omega 6)$ -desaturase activity in chilled *Acanthamoeba castellanii*. *Biochem. J.* 296, 183-188.
- Joyard, J., Block, M.A., Malherbe, A., Marachal, E. y Douce, R. (1993)** Origin and synthesis of galactolipid and sulfolipid headgroups. En "Lipid Metabolism in Plants". T.S. Moore, Jr. (ed). Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 231-258.
- Khan, M.V. y Williams, J.P. (1977)**, Improved thin-layer chromatographic method for the separation of major phospholipids and glycolipids from plant lipid extracts and phosphatidylglycerol and bis(monoacylglyceryl) phosphate from animal lipid extracts. *Journal Chromatography* 140, 179-185.
- Kharchenko, L.N., (1979)**, On genotypic and phenotypic mechanisms of fatty acid biosynthesis regulation in sunflower seed. *Fizealoga Rastanii* 26, 1226.-1232.
- Khon, G., Hartmann, E., Stymne, S. y Beutelmann, P. (1994)**, Biosynthesis of acetylenic fatty acids in the moss *Ceratodon purpureus* (Hedw.) brid. *J. Plant Physiol.* 144, 265-271.
- Khozin, I., Zheng Yu, H., Adlerstein, D., Bigogno, C. y Cohen, Z. (1997)** Triacylglycerols Participate in the Eukaryotic Pathway of PUFAs Biosynthesis in the Red Microalga *Porphyidium cruentum*. En "Physiology, biochemistry and molecular biology of plant lipids". J.P. Williams, M.U. Khan y N.W, Lem, (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp.90-92.



- Lajara, J.R., Díaz, U. y Díaz Q.,R. (1990)**, Definite influence of location and climatic conditions on the fatty acid composition of sunflower seed oil. *JAOCS* 67, 10: 618-623.
- Lehner, R. y Kuksis, A (1993)**, Triacylglycerols synthesis by an *sn*-1,2(2,3)-diacylglycerol transacylase from rat intestinal microsomas. *J. Biol. Chem.* 268, 8781-8786.
- Lehninger, A.L. (1993)** Lípidos, lipoproteínas y membranas. Biosíntesis de los lípidos. En "Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular". Ediciones Omega, S.A. pp. 285-314, y 671-703.
- Longmuir, K.J. (1993)** Phospholipid Biosynthesis. En "Phospholipids Handbook". G. Ceve, (ed.). Marcel Dekker. Inc. New York. pp.65-95.
- Los, D.A., Horvath, I., Vigh, L. y Murata, N. (1993)**, The temperature-dependent expression of the desaturase gene *desA* in *Synechocystis* PCC6803. *FEBS Lett.* 318, 57-60.
- Luddy, F.E., Barford, A., Herb, S., Magidman, P. y Riemenschneider, R.W. (1964)**, Pancreatic lipase hydrolysis of triglycerides by a semimicro technique. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 41, 693-696.
- Mancha, M. (1974)**, Fosfolípidos y glicolípidos de la pulpa de aceitunas maduras. *Grasas y Aceites* 25, 159-164.
- Mancha, M. (1975)**, Estudio de los diglicéridos naturales de la pulpa de aceituna. *Grasas y Aceites* 26, 347-352.
- Mancha, M. y Stymne, S. (1997)**, Remodelling of triacylglycerols in microsomal preparations from developing castor bean (*Ricinus communis* L.). *Planta* 203, 51-57.
- Mancha, M., Osorio, J., Garcés, R., Ruso, J., Muñoz, J. y Fernández-Martínez, J.M. (1994)**, New sunflower mutants with altered seed fatty acid composition. *Lipid Res.* 33, 147-154.
- Mancha, M., Sarmiento, C. y Garcés, R. (1995)** Acyl turnover in triacylglycerols. Its role in the regulation by temperature of the 18:1/18:2 ratio in sunflower seeds. En "Plant lipid metabolism". J.C. Kader y P. Mazliak, (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp.378-380.

- Martínez-Force, E., Álvarez-Ortega, R., Cantisán, S. y Garcés, R. (1998)**, Fatty acid composition in developing high saturated sunflower (*Helianthus annuus*) seeds: maturation changes and temperature effect. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3577-3582.
- Martínez-Force, E, Cantisán, S. y Garcés, R. (1999)**, Enzymatic characterization of high stearic acid sunflower (*Helianthus annuus* L.) mutants. Enviado.
- Martínez-Rivas, J.M., Sperling, P., Lühs, Wilfried y Heinz, E. (1998)** Isolation of three different microsomal oleate desaturase cDNA clones from sunflower: Expression studies in normal type and high oleic mutant. En "Advances in Plant Lipid Research". J. Sánchez, E. Cerdá-Olmedo y E. Martínez-Force, (eds.) Universidad de Sevilla, Sevilla. pp. 137-139.
- Marzouk, B., Zarrouk, M., Cherif, A. y Mazliak, P. (1987)** Calcium Chloride Effect on Glycerolipids Metabolism in olive tree leaf. En "The Metabolism, Structure & Function of Plant Lipids". P.K. Stumpf, J.B. Mudd y W.D. Nes, (eds.). Plenum Press, New York. pp. 317-319.
- Mazzani, B. (1963)** Compuestas oleaginosas. Girasol. En "Plantas oleaginosas". Colección Agrícola Salvat. pp. 101-120.
- McKeon, T.M. y Stumpf, P.K. (1982)**, Purification and characterization of the stearyl-acyl carrier protein desaturasa and the acyl-acyl carrier protein thioesterase from maturing seeds of safflower. *J. Biol. Chem.* 257, 12141-12147.
- Meyer, F. y Bloch, K. (1963)**, Effect of temperature on the enzymatic synthesis of unsaturated fatty acids in *Torulopsis utilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 77, 671-673.
- Miller, J.F., Zimmerman, D.C. y Vick, B.A. (1987)**, Genetic control of high oleic acid content in sunflower oil. *Crop Science*, 27, 923-926.
- Miquel, M. y Browse, J. (1992)**, Arabidopsis mutants deficient in polyunsaturated fatty acid synthesis, Biochemical and genetic characterization of a plant oleoyl-phosphatidylcholine desaturasa. *J. Biol. Chem.* 267, 1502-1509.
- Miquel, M. y Browse, J.A. (1995)**. Lipid Biosynthesis. En "Seed Development and Germination". J. Kigel y G. Galili (eds.). ACADEMIC PRESS. pp. 169-193.
- Miquel, M., James, D., Dooner, H. y Browse, J. (1993)**, Arabidopsis requires polyunsaturated lipids for low-temperature survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6208-6212.

- Morrison, W.H., Hamilton, R.J. y Kalu, C. (1995)** Sunflowerseed oil. En "Developments in Oils and Fats". R.J. Hamilton (ed). Blackie Academic & Professional. Chapman & Hall. London. pp. 132-152.
- Murphy, D.J. y Stumpf, P.K. (1979)**, Light-dependent induction of polyunsaturated fatty acid biosynthesis in greening cucumber cotyledons. *Plant Physiol.* 63, 328-335.
- Murphy, D.J. y Stumpf, P.K. (1980)**, Polyunsaturated fatty acid biosynthesis in cotyledons from germinating and developing *Cucumis sativus* L. seedlings. *Plant Physiol.* 66, 660-665.
- Murphy, D.J., Mukherjee, K.D. y Woodrow, I.E. (1984)**, Functional association of a monoacylglycerolphosphocholine acyltransferase and the oleoylglycerolphosphocholine desaturase in microsomes from developing leaves. *Eur. J. Biochem.* 159, 373-379.
- Ohlrogge J.B. y Browse J. (1995)** Lipid Biosynthesis. En "The plant cell". American Society of Plant Physiologists. Vol. 7, pp. 957-970.
- Ohlrogge, J.B., Browse, J. y Somerville, C.R. (1991)**, The genetics of plant lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1082, 1-26.
- Ohnishi, J. y Yamada, M. (1983)**, Glycerolipid synthesis in *Avena* leaves during greening of etiolated seedlings IV. Effect of light on fatty acid desaturation. *Plant & Cell Physiol.* 24 (8), 1553-1557.
- Osorio, J., Fernández-Martínez, J.M., Mancha, M. y Garcés, R. (1995)**, Mutant sunflowers with high concentration of saturated fatty acids in the oil. *Crop Sci.* 35, 739-742.
- Padley, F.B., Gunstone, F.D. y Harwood, J.L. (1994)** Occurrence and characteristics of oils and fats. En "The Lipid Handbook". F.D. Gunstone, J.L. Harwood y F.B. Padley (eds.) 2ª edition. Chapman & Hall. London. pp. 47-224.
- Parrado, J., Millán, F., Hernández-Pinzón, I., Bautista, J. y Machado, A. (1993)**, Characterization of enzymatic sunflower protein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1821-1825.
- Pérez-Vich, B. (1998)** en Control Genético de la síntesis de ácidos grasos saturados en semillas de girasol (*Helianthus annuus* L.), Tesis doctoral, Universidad de Sevilla.
- Pham Thi, A., Borrel-Flood, C., Vieira da Silva, J., Justin, A.M. y Mazliak, P. (1985)**, Effects of water stress on lipid metabolism in cotton leaves. *Phytochemistry*, 24, 723-727.

- Pham Thi, A., Borrel-Flood, C., Vieira da Silva, J., Justin, A.M. y Mazliak, P. (1987)**, Effects of drought on (1-¹⁴C)-linoleic acid desaturation in cotton leaves. *Physiol. Plantarum*, 69, 147-150.
- Pryde, E.H. (1979)** Natural Fatty Acids and their Sources. En "Fatty Acids". E.H. Pryde (ed.) American Oil Chemists' Society. pp. 1-28.
- Pryde, E.H. (1985)** Chemical Reactions of Phosphatides. En "Lecitins". B.F. Szuhaj y G.R. List, (eds.). American Oil Chemists' Society. pp. 213-246.
- Purdy, R.H. (1985)**, Oxidative stability of high oleic sunflower and safflower oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 62, 523-525.
- Purdy, R.H. (1986)**, High oleic sunflower: physical and chemical characteristics. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 63, 1062-1066.
- Putt, E.D. (1980)** History and Present World Status. En "Sunflower Science and Technology". J.F. Carter (ed.). Number 19 in the series Agronomy. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Inc., Publishers Madison, Wisconsin, U.S.A. pp. 1-11.
- Rebeille, F., Bigny, R. y Douce, R. (1980)**, Role de l'oxygene et de la temperature sur la composition en acides gras des cellules isolees d'erable (*Acer pseudoplatanus* L.). *Biochim. Biophys. Acta* 620, 1-9.
- Robertson, J.A., Chapman, Jr. G.W. y Wilson, Jr. R.L. (1978)**, Relation of days after flowering to chemical composition and physiological maturity of sunflower seed. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 55, 266-269.
- Roughan, P.G. y Slack, C.R. (1982)**, Cellular organization of glycerolipid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33, 97-132.
- Sánchez, J. y Mancha, M. (1980)**, Separation and analysis of acylthioesters from higher plants. *Phytochemistry* 19, 817-820.
- Sarmiento, C., Garcés, R. y Mancha, M. (1998)**, Oleate desaturation and acyl turnover in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed lipids during rapid temperature adaptation. *Planta* 205, 595-600.
- Sarmiento, C., Mancha, M. y Garcés, R. (1994)**, Microsomal polypeptides in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Comparison between normal type before and after cold-induction, and a high oleic acid mutant. *Physiol Plant.* 91, 97-103.
- Schulz, R., Ebel, J. y Hahlbrock, K. (1982)**, Partial purification of β -ketoacyl acyl carrier protein synthetase from a higher plant. *FEBS Lett* 140, 207-209.

- Semelcz-Kovacs, A. (1975)**, Acclimatization and dissemination of the sunflower in Europe. *Acta Ethnogr. Acad. Sci. Hung.* 24, 47-88.
- Shimakata, T. y Stumpf, P.K. (1982)**, The prokaryotic nature of the fatty acid synthetase of developing *Carthamus tinctorius* L. (safflower) seed. *Arch. Biochem. Biophys.* 217, 144-154.
- Shine, W.E., Mancha, M. y Stumpf, P.K. (1976)**, Fat metabolism in higher plants. The function of acyl thioesterases in the metabolism of acyl-Coenzymes A and acyl-acyl carrier proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 172, 110-116
- Simoni, R.D., Criddle, R.S. y Stumpf, P.K. (1967)**, Fat metabolism in higher plants. Purification and properties of plant and bacterial acyl carrier protein. *J. Biol. Chem.* 242, 573-581.
- Slabas, A.R. y Fawcett, T. (1992)**, The biochemistry and molecular biology of plant lipid biosynthesis. *Plant Mol. Biol.* 19, 169-191. Kluwer Academic Publishers.
- Slack, C.R. y Roughan, P.G. (1978)**, Rapid temperature-induced changes in the fatty acid composition of certain lipids in developing linseed and soya-bean cotyledons. *Biochem. J.* 170, 437-439.
- Slack, C.R., Bertaud, W.S., Shaw, B.D., Holland, R., Browse, J. y Wright, H. (1980)**, Some studies on the composition and surface properties of oil bodies from the seed cotyledons of safflower (*Carthamus tinctorius*) and linseed (*Linum usitatissimum*). *Biochem. J.* 190, 551-556.
- Slack, C.R., Campbell, L.C., Browse, J.A. y Roughan, P.G. (1983)**, Some evidence for the reversibility of the cholinephosphotransferase-catalyzed reaction in developing linseed cotyledons in-vivo. *Biochem. J.* 263, 217-228.
- Slack, C.R., Roughan, P.G. y Balasingham, N. (1978)**, Labeling of glycerolipids in the cotyledons of developing oilseeds by (1-¹⁴C)acetate and (2-³H)glycerol. *Biochem. J.* 179, 421-433.
- Slack, C.R., Roughan, P.G. y Browse, J. (1979)**, Evidence for an oleoyl phosphatidylcholine desaturase in microsomal preparations from cotyledons of safflower (*Carthamus tinctorius*) seed. *Biochem. J.* 179, 649-656.
- Slack, C.R., Roughan, P.G. y Terpstra, J. (1976)** Some properties of a microsomal oleate desaturase from leaves. *Biochem. J.* 155, 71-80.

- Slack, C.R., Roughan, P.G., Browse, J.A. y Gardiner, S.E. (1985), Some properties of cholinephosphotransferase from developing safflower cotyledons. *Biochim. Biophys. Acta* 833, 438-448.
- Smith, M.A., Cross, A.R., Jones, O.T.G., Griffiths, W.T., Stymne, S. y Stobart, A.K. (1990), Electron-transport components of the 1-acyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine Δ^{12} -desaturase (Δ^{12} -desaturase) in microsomal preparations from developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cotyledons. *Biochem. J.* 272, 23-29.
- Soldatov, K.I. (1976), Chemical mutagenesis in sunflower breeding, en Proc. 7th International Sunflower Conference, Krasnodar, 1, International Sunflower Association, Vlaardingen, Holanda. pp. 352-357.
- Somerville, C. y Browse, J. (1991), Plants lipids: metabolism, mutants and membranes. *Science* 252, 80-87.
- Sosulski, F., Zadernowski, R. y Babuchowski, K. (1981), Composition of polar lipids in rapeseed. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58, 561-564.
- Sperling, P. y Heinz, E. (1993), Isomeric *sn*-1-octadecenyl and *sn*-2-octadecenyl analogues of lysophosphatidylcholine as substrates for acylation and desaturation by plant microsomal membranes. *Eur. J. Biochem.* 213, 965-971.
- Sperling, P., Hammer, U., Wolfgang, F. y Heinz, E. (1990), High oleic sunflower: studies on composition and desaturation of acyl groups in defferent lipids and organs. *Z. Naturforsch.* 45c, 166-172.
- Stahl, V., Banas, A. y Stymne, S. (1995) Plant microsomal phospholipid acyl hydrolases have selectivities for uncommon fatty acids. *Plant Physiology* 107, 953-962.
- Stobart, A.K. y Stymne, S. (1985 a), The regulation of the fatty acid composition of the triacylglycerol in microsomal preparations from avocado mesocarp and the developing cotyledons of safflower. *Planta* 163, 119-125.
- Stobart, A.K. y Stymne, S. (1985 b). The interconversion of diacylglycerol and phosphatidylcholine during triacylglycerol production in microsomal preparations of developing cotyledons of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Biochem. J.* 232, 217-221.
- Stobart, A.K., Stymne, S. y Glad, G. (1983), The synthesis of linoleato and phosphatidic acid and its relationship to oil production in the microsomas of developing seeds of

- safflower (*Carthamus tinctorius* L. var. Gila). *Biochim. Biophys. Acta* 754, 292-297.
- Stobart, A.K., Stymne, S. y Hoglund, S. (1986)**, Safflower microsomes catalyse oil accumulation in vitro: a model system. *Planta* 169, 33-37.
- Stobart, K., Mancha, M., Lenman, M., Dahlqvist, A. y Stymne, S. (1997)**, Triacylglycerols are synthesised and utilized by transacylation reactions in microsomal preparations of developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Planta* 203, 58-66.
- Stumpf, P.K. (1989)** Biosynthesis of Fatty Acids in Higher Plants. En "Oil Crops of the World". G. Röbbelen, R.K. Downey y A. Ashri, (eds.). McGraw-Hill, New York. pp. 38-62.
- Stumpf, P.K. y James, A.T. (1963)**, The biosynthesis of long chain fatty acids by lettuce chloroplast preparations. *Biochim. Biophys. Acta* 70, 20-32.
- Stymne, S. (1980)** en "The Biosynthesis of Linoleic and Linolenic Acids and Plants". Ph. D. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Stymne, S. y Appelqvist, L.A. (1978)**, The biosynthesis of linoleato from oleoyl-CoA via oleoyl-phosphatidylcholine in microsomas of developing safflower seeds. *Eur. J. Biochem.* 90, 223-229.
- Stymne, S. y Glad, G. (1981)**, Acyl exchange between oleoyl-CoA and phosphatidylcholine in microsomas of developing soya bean cotyledons and its role in fatty acid desaturation. *Lipids* 16, 298-305.
- Stymne, S. y Stobart, A.K. (1984 a)**, The biosynthesis of triacylglycerols in microsomal preparations of developing cotyledons of sunflower. *Biochem. J.* 220, 481-488.
- Stymne, S. y Stobart, A.K. (1984 b)**, Evidence for the reversibility of the acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase in microsomal preparations from developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cotyledons and rat liver. *Biochem. J.* 223, 305-314.
- Stymne, S. y Stobart, A.K. (1985 a)**, Oil synthesis in-vitro in microsomal membranes from developing cotyledons of *Linum usitatissimum* L. *Planta* 164, 101-104.
- Stymne, S. y Stobart, A.K. (1985 b)**, Involvement of acyl exchange between acyl-CoA and phosphatidylcholine in the remodelling of phosphatidylcholine in microsomal preparations of rat lung. *Biochim. Biophys. Acta* 837, 239-250.

- Stymne, S. y Stobart, A.K. (1986 a)**, Biosynthesis of γ -linolenic acid in cotyledons and microsomal preparations of the developing seeds of common borage (*Borago officinalis*). *Biochem. J.* 240, 385-393.
- Stymne, S. y Stobart, A.K. (1986 b)**, The effect of temperature on the activity of 2-oleoyl-*sn*-phosphatidylcholine desaturase in modified microsomal membranes from the cotyledons of maturing safflower seed. *Physiol. Veg.* 24, 45-51.
- Stymne, S. y Stobart, A.K. (1987)** Triacylglycerol biosynthesis. En "The Biochemistry of Plants". P.K. Stumpf y E.E.Conn, (eds.). Academic Press, New York. Vol.9, pp. 175-214.
- Stymne, S., Bafor, M., Banas, A., Dahqvist, A., Gummeson, P.O., Lee, M., Lenman, M., Stahl, U. y Wiberg, E. (1998)** Metabolism of unusual fatty acids in transgenic and non-transgenic oil seeds. En "Advances in Plant Lipid Research". J. Sánchez, E. Cerdá-Olmedo y E. Martínez-Force, (eds.) Universidad de Sevilla, Sevilla. pp. 204-210.
- Stymne, S., Stobart, A.K. y Glad, G. (1983)**, The role of acyl-CoA pool in the synthesis of polyunsaturated 18-carbon fatty acids and triacylglycerol production in the microsomas of developing safflower seeds. *Biochim. Biophys. Acta* 752, 198-208.
- Tamai, Y. y Lands, W.E. (1974)**, Positional specificity of *sn*-glycerol 3-phosphate acylation during phosphatidate formation by rat liver microsomas. *J. Biochem. (Tokio)* 76, 847-860.
- Tchang, F., Robert, D. y Mazliak, P. (1981)**, Utilisation des réserves lipidiques, formation des peroxydes et des chloroplastes dans les cotylédons de semences de tournesol (*Helianthus annuus* L) germant à la lumière. *Physiol. Vég.*, 19, 9-22.
- Thomas, K., Rutter, A., Suller, M., Harwood, J. y Lloyd, D. (1998)**, Oxygen induces fatty acid (n6)-desaturation independently of temperature in *Acanthamoeba castellanii*. *FEBS Letters* 425, 171-174.
- Trémolières, H., Trémolières, A. y Mazliak, P. (1978)**, Effects of light and temperature on fatty acid desaturation during the maturation of rapeseed. *Phytochemistry* 17, 685-687.
- Tzen, J.T.C., Cao, Y.Z., Laurent, P., Ratnayake, C. y Huang, A.H.C. (1993)**, Lipids, proteins, and structure of seed oil bodies from diverse species. *Plant Physiol.* 101, 267-276.

- Urie, A.L. (1985), Inheritance of high oleic acid in sunflower. *Crop. Sci.* 25, 986-989.
- Van den Bosch, H., Aarsman, A.J., Van Schaik, R.H.N., Schalkwijk, C.B., Neijs, F.W. y Stukk, A. (1990), Structural and enzymological properties of cellular phospholipases A2. *Biochem. Soc. Trans.* 18, 781-786.
- Vick, B. y Beevers, H. (1977), Phosphatidic acid synthesis in castor bean endosperm. *Plant Physiol.* 59, 459-463.
- Vijay, I.K. y Stumpf, P.K. (1971), Fat metabolism in higher plants. Nature of the substrate and the product of oleyl coenzyme A desaturase from *Carthamus tinctorius*. *J. Biol. Chem.* 246, 2910-2917.
- Vijay, I.K. y Stumpf, P.K. (1972), Fat metabolism in higher plants. Properties of oleyl coenzyme A desaturase of *Carthamus tinctorius*. *J. Biol. Chem.* 247, 360-366.
- Vilarrosa, J. (1975) Separación de mezclas. Purificación. En "Introducción al análisis orgánico". EUNIBAR. Editorial Universitaria de Barcelona. pp. 53-78.
- Vrânceanu, V. (1977) Fisiología y Bioquímica. En "El Girasol". V Vrânceanu (ed.). Ediciones Mundi-Prensa. pp. 73-97.
- Wada, H. y Murata, N. (1990), Temperature-induced changes in the fatty acid composition of the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803. *Plant Physiol.* 92, 1062-1069.
- Wanner, G., Formanek, H. y Theimer, R.R. (1981), The ontology of lipid bodies (spherosomes) in plant cells. *Planta* 151, 109-123.
- Wilhelm, E., Battino, R. y Wilcock, R.J. (1997), Low-pressure solubility of gases in liquid water. *Chem. Rev.* Vol. 77, nº 2. pp. 219-262.
- Williams, J.P., Khan, M.U. y Wong, D. (1992 b), Low temperature-induced fatty acid desaturation in *Brassica napus*: thermal deactivation and reactivation of the process. *Biochim. Biophys. Acta* 1128, 275-279.
- Williams, J.P., Williams, K. y Khan, M.U. (1992 a), Low temperature-induced fatty acid desaturation in *Brassica napus*: thermal lability of the process. *Biochim. Biophys. Acta* 1125, 62-67.
- Yamashita, S., Hosaka, K. y Numa, S. (1972), Resolution and reconstitution of the phosphatidate-synthesizing system of rat-liver microsomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 3490-3492.

- Yang, L.Y. y Kuksis A. (1991)**, Apparent convergence (at 2-monoacylglycerol level) of phosphatidic acid and 2-monoacylglycerol pathways of synthesis of chylomicron triacylglycerols. *J. Lipid Res.* 32, 1173-1186.
- Yermanos, D.M. (1975)**, Composition of jojoba seed during development. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 52, 115-117.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Resolución de Excmo. C. de U. de Sevilla por los señ. Graduados en el día 20 de la sesión para otorgar la tesis doctoral de D. M^{ra} Teresa García Díaz

por su Movilización y destacada labor, su influencia en el metabolismo de los triacilglicéridos durante la formación de la semilla de germen accede otorgando la tesis doctoral Sobresaliente "cum laude" por una vez.

Sevilla, 27 de junio 2000

El Vocal,

[Signature]
Presidente

El Vocal,

[Signature]
El Secretario.

El Vocal,

[Signature]
El Doctorado,

[Signature]

[Signature]

[Signature]



* 5 0 1 3 1 3 8 4 0 *

FQU I T/745