

8-10686472

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



FACULTAD DE BIOLOGÍA

Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular

TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS *IN VIVO* DEL METABOLISMO LIPOSINTÉTICO EN
SEMILLAS DE GIRASOL (*Helianthus annuus* L.)**

141

392

3-2-05

Rafael Pleite

DIRECTORES DE TESIS:

Dr. Rafael Garcés Mancheño

Dr. Enrique Martínez Force

TUTOR:

Dr. José María Romero Rodríguez

DOCTORANDO:

D. Rafael Pleite Gutiérrez

SEVILLA, ENERO DE 2005.

TD
73

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

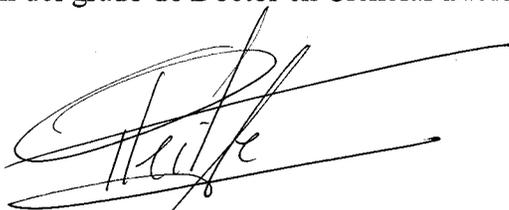
Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular

TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS *IN VIVO* DEL METABOLISMO LIPOSINTÉTICO EN
SEMILLAS DE GIRASOL (*Helianthus annuus* L.)**

**D. Rafael Pleite Gutiérrez
Sevilla, 2005**

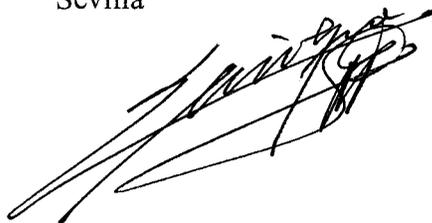
Memoria presentada por el Licenciado D. Rafael Pleite Gutiérrez para la obtención del grado de Doctor en Ciencias Biológicas.



Fdo, Rafael Pleite Gutiérrez
Sevilla, Enero de 2005

Directores:

Dr. Enrique Martínez Force
Científico Titular
Instituto de la Grasa (CSIC)
Sevilla



Fdo. Enrique Martínez Force



Dr. Rafael Garcés Mancheño
Investigador Científico
Instituto de la Grasa (CSIC)
Sevilla

Fdo. Rafael Garcés Mancheño

Tutor:

Dr. José M^a. Romero Rodríguez
Profesor Titular
Facultad Biología
Universidad de Sevilla



Fdo. José M^a. Romero Rodríguez

A Francisco Pleite Muñiz y Margarita Gutiérrez Montes:
padres, consejeros y amigos.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas y organismos que han hecho posible la realización de esta tesis, muy en especial:

Al Dr. **Rafael Garcés Mancheño** por la dirección de esta tesis, así como por haberme transmitido ilusión por todos y cada uno de los resultados obtenidos.

Al Dr. **Enrique Martínez Force** por la dirección de la tesis, así como por haberme ayudado a superar el escalón que separa a un simple técnico de un futuro doctor.

A los doctores **Stephen Rawsthorne** y **Marilyn J. Pike**, por haberme permitido desarrollar parte de mi trabajo y aprendizaje junto a ello.

Al Dr. **José M^a. Romero Rodríguez** por haber accedido amablemente a ser mi tutor.

Al **Ministerio de Educación y Cultura**, por la concesión de la beca dentro del Subprograma de Formación de Profesorado Universitario para el desarrollo de esta tesis durante los primeros cuatro años y al **Consejo Superior de Investigaciones Científicas** por la concesión de la beca predoctoral con cargo al proyecto AGL2002-02617 ALI, hasta su finalización.

También es mi deseo expresar mi agradecimiento a todos los miembros del **Instituto de la Grasa** y en especial a los del **Departamento de Fisiología y Tecnología de Productos Vegetales del** lugar donde se desarrolló gran parte de esta tesis, muy especialmente:

A **José Alberto Domínguez Rubio** y **Pilar Sánchez Gil**, por su espléndida labor realizada durante el cultivo de las plantas utilizadas durante el desarrollo de esta tesis, superando los obstáculos que para ello les han impuesto plagas de insectos, aves, roedores y bípedos.

A **María del Carmen Ruiz Bayona**, por su eficiente ayuda en las labores de análisis en laboratorio.

A todos mis compañeros becarios que he tenido la fortuna de conocer durante estos años, que me han enseñado la diferencia entre la verdadera amistad y el verdadero interés, y muy especialmente a **Manuel Adrián Troncoso Ponce** por estar siempre dispuesto a ayudar sin esperar nada a cambio; a **Joaquín Jesús Salas Liñán** por sus buenos consejos de doctor y por enseñarme que la diversión es compatible con el trabajo y a **Diana Sandra Cabrera Delgado** por su sincera y simpática compañía.

Por último, es mi deseo transmitir mi más sincero agradecimiento a la Dra. **Deborah Paola Rondanini**, por haberme transmitido su ilusión, apoyo y sobre todo amor durante esta tesis.

A todos, de corazón: gracias.

| | |
|---|----|
| I. INTRODUCCIÓN. | 1 |
| 1. GIRASOL. ORIGEN Y DESARROLLO DEL CULTIVO. | 2 |
| 1.1. Origen e importancia del cultivo. | 2 |
| 1.2. Mejora del cultivo de girasol. | 2 |
| 1.3. Características morfológicas y fisiológicas. | 5 |
| <i>1.3.1. Morfología del girasol.</i> | 5 |
| <i>1.3.2. Fisiología del girasol.</i> | 7 |
| 1.4. Acumulación de productos de reserva durante la embriogénesis. | 8 |
| 2. LÍPIDOS. CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA. | 9 |
| 2.1. Ácidos grasos. | 10 |
| 2.2. Lípidos complejos de plantas. | 13 |
| 3. SÍNTESIS DE ACEITE EN SEMILLAS. | 14 |
| 3.1. Fuentes de carbono para el metabolismo de las semillas. | 14 |
| 3.2. Flujos de carbono desde los tejidos fotosintéticos hasta las semillas. | 15 |
| 3.3. Capacidades enzimáticas de los plastidios. | 16 |
| <i>3.3.1. Glucolisis y piruvato deshidrogenada.</i> | 17 |
| <i>3.3.2. Gluconeogénesis.</i> | 20 |
| <i>3.3.3. Ruta oxidativa de las pentosas fosfato.</i> | 20 |
| 3.4. Fuentes de carbono para la síntesis de ácidos grasos y almidón en plastidios. | 21 |
| 3.5. Ruta de síntesis de ácidos grasos. | 23 |
| <i>3.5.1 Síntesis intraplastidial.</i> | 23 |

| | |
|---|----|
| 3.5.2. <i>Modificaciones extraplastidiales.</i> | 26 |
| a) <u>Biosíntesis de ácido linoléico</u> | 26 |
| b) <u>Elongaciones extraplastidiales.</u> | 27 |
| c) <u>Biosíntesis de glicerolípidos y de fosfolípidos.</u> | 28 |
| 4. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS. | 29 |
| 4.1. Regulación intraplastidial. | 30 |
| 4.2. Regulación extraplastidial. | 31 |
| 4.3. Regulación luz/oscuridad. | 33 |
| 5. EL ACEITE DE GIRASOL. | 34 |
| 5.1. Características generales. | 34 |
| 5.2. Usos industriales del aceite de girasol | 36 |
| 5.3. Alternativas a la hidrogenación. | 38 |
| 5.4. Herencia del carácter alto esteárico y alto oleico. | 40 |
| 5.5. Control genético del carácter alto esteárico y alto oleico. | 41 |
| II. MATERIALES Y MÉTODO. | 45 |
| 1. MATERIAL VEGETAL, CONDICIONES DE CULTIVO Y CRUCES. | 46 |
| 1.1. Material vegetal. | 46 |
| 1.2. Condiciones de cultivo. | 46 |
| 1.3. Cruces. | 47 |
| 2. METODOLOGÍA GENERAL PARA EL ANÁLISIS DE LÍPIDOS. | 48 |

| | |
|--|----|
| 2.1. Extracción de lípidos totales. | 48 |
| 2.2. Separación de lípidos. | 48 |
| 2.2.1. <i>Separación de lípidos neutros.</i> | 48 |
| 2.2.2. <i>Separación de los distintos fosfolípidos.</i> | 50 |
| 2.3. Formación de ésteres metílicos de los ácidos grasos. | 51 |
| 2.4. Separación y cuantificación de los ésteres metílicos. | 52 |
| 2.4.1. <i>Cromatografía gaseosa.</i> | 52 |
| 2.4.2. <i>Cromatografía en capa fina.</i> | 52 |
| 3. INCUBACIONES DE SEMILLAS EN DESARROLLO CON [¹⁴C]ACETATO. | 53 |
| 3.1. Condiciones de incubación. | 53 |
| 3.2. Utilización de inhibidores. | 53 |
| 4. PREPARACIÓN Y PROPIEDADES DE LOS PLASTIDIOS. | 54 |
| 4.1. Consideraciones previas. | 54 |
| 4.2. Aislamiento de plastidios. | 54 |
| 4.3. Verificación de la pureza durante la extracción. | 55 |
| 4.3.1. <i>Marcadores.</i> | 56 |
| 4.3.2. <i>Verificación de la integridad. Latencia.</i> | 57 |
| 5. INCORPORACIÓN DE ¹⁴C DESDE SUBSTRATOS MARCADOS AL INTERIOR DE LOS PLASTIDIOS. | 57 |
| 5.1. Mezcla de reacción. | 58 |
| 5.2. Incorporación de ¹⁴C dentro de los ácidos grasos. | 58 |

| | |
|--|----|
| 5.3. Incorporación simultánea de ^{14}C en almidón y liberación de $^{14}\text{CO}_2$. | 59 |
| 6. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS Y PRODUCTOS DE RESERVA. | 60 |
| 6.1. Preparación de extracto total de semillas. | 60 |
| 6.2. Determinación del contenido de metabolitos en embriones enteros. | 60 |
| 6.2.1. Extracción de metabolitos. | 60 |
| 6.2.2. Determinación enzimática de metabolitos. | 61 |
| 6.3. Determinación del contenido de almidón en semillas. | 62 |
| 6.4. Determinación del contenido de aceite en semillas. | 63 |
| 6.4.1. Medidas directas. | 63 |
| 6.4.2. Medidas indirectas. | 63 |
| 6.5. Determinación de proteínas. | 63 |
| 6.6. Contador líquido de centelleo. | 64 |
| 7. BIOLOGIA MOLECULAR. | 64 |
| 7.1. Extracción de mRNA de semillas. | 64 |
| 7.2. Síntesis de la primera cadena de cDNA. | 64 |
| 7.3. Estimación de la concentración de ácidos nucleicos. | 64 |
| 7.4. Electroforesis de DNA. | 65 |
| 7.5. Amplificación del DNA mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) | 65 |
| 7.5.1. Diseño de cebadores. | 65 |
| 7.5.2. Condiciones de amplificación | 67 |

| | |
|---|----|
| 7.5.3. Amplificación rápida de los extremos del cDNA (RACE). | 68 |
| 7.6. Clonación de productos de PCR. | 68 |
| 7.6.1. Ligación | 68 |
| 7.6.2. Obtención de células competentes | 69 |
| 7.6.3. Transformación de <i>E. coli</i> | 70 |
| 7.6.4. Extracción de DNA plasmídico. | 70 |
| 7.6.5. Secuenciación y análisis de secuencias | 71 |
| III. OBJETIVOS. | 72 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. | 73 |
| BLOQUE I: INCUBACIONES DE EMBRIONES DE GIRASOL EN DESARROLLO CON [2- ¹⁴ C]ACETATO. | 74 |
| 1. PUESTA A PUNTO DEL ENSAYO. | 75 |
| 1.1. Estado fisiológico de las semillas. | 76 |
| 1.2. Efecto del pH sobre la incorporación de [2- ¹⁴ C]acetato. | 78 |
| 1.3. Efecto de la concentración de [2- ¹⁴ C]acetato. | 79 |
| 1.4. Efecto de la temperatura y tiempo de incubación. | 80 |
| 1.5. Efecto de la edad de la semilla. | 83 |
| 1.6. Incubaciones con semillas de distintos genotipos. | 85 |
| 2. ENSAYO CON METIL VIOLÓGENO. | 87 |
| 2.1. Efecto del metil viológeno sobre la síntesis de lípidos. | 88 |
| 2.2. Efecto del metil viológeno sobre la síntesis | 91 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| | <i>de novo</i> de ácidos grasos. | |
| 3. | ENSAYO CON CERULENINA. | 94 |
| 3.1. | Incubaciones de semillas con [2- ¹⁴ C]acetato y cerulenina. | 95 |
| 3.2. | Medidas de la actividad KAS II sobre 16:0-ACP y 18:0-ACP. | 96 |
| 4. | OSCILACIONES RÍTMICAS DEL METABOLISMO LIPÍDICO. | 99 |
| 4.1. | Incorporación de [2- ¹⁴ C]acetato a lípidos durante los ciclos luz/oscuridad. | 99 |
| 4.2. | Síntesis <i>de novo</i> de ácidos grasos durante los ciclos luz/oscuridad. | 102 |
| 4.3. | Oscilación rítmica de la actividad estearil-ACP desaturasa. | 104 |
| | BLOQUE II: OBTENCIÓN DE LÍNEAS DE GIRASOL HSHO: SELECCIÓN DE NUEVAS LÍNEAS ALTO OLEICO. | 106 |
| 1. | INCUBACIÓN DE SEMILLAS DE LÍNEAS ALTO-OLEICO CON [2-¹⁴C]ACETATO. | 107 |
| 1.1. | Caracterización inicial de las líneas alto-oleico. | 107 |
| 1.2. | Incubaciones de semillas de girasol alto-oleico con [2- ¹⁴ C]acetato. | 109 |
| 1.3. | Incubaciones de semillas de girasol alto-oleico con [2- ¹⁴ C]acetato y metil viológeno. | 111 |
| 2. | CRUCES ALTO-OLEICO X CAS-3. | 114 |
| 2.1. | Análisis de la primera generación F ₁ . | 114 |
| 2.2. | Análisis de la segunda generación F ₂ . | 117 |
| 2.3. | Análisis de la tercera generación F ₃ . | 121 |

| | |
|--|-----|
| BLOQUE III: FUENTES DE CARBONO PARA EL METABOLISMO PLASTIDIAL DE EMBRIONES DE GIRASOL EN DESARROLLO. | 128 |
| 1. PREPARACIÓN Y PROPIEDADES DE LOS PLASTIDIOS. | 129 |
| 1.1. Fosfofructoquinasa dependiente de pirofosfato (FFK-PPI). | 130 |
| 1.2. Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa NADPH dependiente (NADPH-GAPdH). | 130 |
| 1.3. Actividad enolasa. | 132 |
| 2. FUENTES DE CARBONO PARA LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS EN PLASTIDIOS. | 133 |
| 2.1. Análisis previos. | 135 |
| 2.2. Síntesis de ácidos grasos dependiente de tiempo y concentración. | 135 |
| 2.3. Síntesis de ácidos grasos durante el desarrollo. | 138 |
| 2.4. Contenido de metabolitos en la semilla. | 139 |
| 3. SÍNTESIS DE ALMIDÓN EN PLASTIDIOS. | 142 |
| 3.1. Análisis previos. | 143 |
| 3.2. Incorporación de radioactividad dependiente de tiempo y concentración. | 144 |
| 3.3. Utilización de la Glc6P durante el desarrollo. | 147 |
| 4. INTERACCIONES ENTRE LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS Y LA OPPP DURANTE EL METABOLISMO DE PLASTIDIOS. | 149 |
| 4.1. Efecto de la Glc6P sobre la síntesis de ácidos grasos. | 150 |

| | |
|---|-----|
| 4.2. Efecto del piruvato y malato sobre el flujo de Glc6P hacia la síntesis de almidón y la OPPP. | 152 |
| 5. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL mRNA DEL GEN DEL TRASPORTADOR DE Glc6P EN SEMILLAS EN DESARROLLO DE GIRASOL. | 156 |
| 5.1. Amplificación de un fragmento de Hagpt a partir de semillas de 15 DDF de la línea control RHA-274. | 156 |
| 5.2. Obtención de la secuencia completa del cDNA correspondiente a <i>Hagpt</i> . | 157 |
| V. CONCLUSIONES. | 161 |
| VI. BIBLIOGRAFÍA. | 165 |

Índice de figuras.

- Figura 1.** Inflorescencia.
- Figura 2.** Sección longitudinal de un aquenio.
- Figura 3.** Estructura de los ácidos grasos.
- Figura 4** Estructura de acilglicéridos.
- Figura 5.** Esquema del metabolismo del carbono en embriones en desarrollo durante la acumulación de aceite.
- Figura 6.** Esquema general de la biosíntesis de ácidos grasos en semillas oleaginosas.
- Figura 7.** Formación de triglicéridos a través de la ruta del glicerol-3-P o ruta de Kennedy, y su relación con la PC.
- Figura 8.** Distribución de los distintos lípidos en una placa desarrollada con hexano/éter dietílico/fórmico (75:25:1 v/v/v).
- Figura 9.** Alineamiento parcial de secuencias aminoacídicas de transportadores de glucosa-6-fosfato mediante el programa Clustal X v1.8.
- Figura I.1.** Incorporación de [2-¹⁴C]acetato a la fracción de lípidos totales en semillas de la línea RHA-274 de 15 DDF.
- Figura I.2.** Distribución de radioactividad a los distintos componentes de la fracción lipídica con la concentración de [2-¹⁴C]acetato en el medio de incubación.
- Figura I.3.** Distribución de radioactividad en los distintos componentes de la fracción lipídica durante el tiempo de incubación.
- Figura I.4.** Acumulación de aceite en semillas de girasol durante el desarrollo. Incorporación de radioactividad en lípidos.
- Figura I.5.** Efecto del metil viológeno sobre la incorporación de [2-¹⁴C]acetato dentro de la fracción de lípidos. Distribución dentro de las diferentes clases de lípidos.
- Figura I.6.** Efecto del metil viológeno sobre la distribución de radioactividad en los ácidos grasos de la fracción de TAG.
- Figura I.7.** Análisis de la actividad FASII *in vitro* en semillas de girasol en

desarrollo de 15 DDF.

- Figura I.8.** Incorporación de [2-¹⁴C]acetato a lípidos de semillas de girasol de 16 DDF en desarrollo durante los ciclos luz/oscuridad.
- Figura I.9.** Síntesis *de novo* de ácidos grasos durante los ciclos luz/oscuridad.
- Figura I.10.** Oscilación rítmica de la actividad estearil-ACP desaturasa (SAD) en semillas de girasol.
- Figura II.1.** Esquema seguido para estudiar el carácter alto esteárico en distintas líneas de girasol alto-oleico.
- Figura II.2.** Representación del porcentaje de ácido esteárico (18:0) frente a ácido palmítico (16:0) marcados radiactivamente procedentes de la fracción de TAG de semillas de 15 DDF incubadas con [¹⁴C]acetato.
- Figura II.3.** Esquema del efecto del metil viológeno (MV) sobre la síntesis intraplasmática de ácidos grasos, en presencia de [¹⁴C]acetato.
- Figura II.4.** Índice de saturación expresado como % [¹⁴C](18:0 + AGML*) / % [¹⁴C]insaturados en función de la concentración del inhibidor metil viológeno (MV).
- Figura II.5.** Representación de ácido esteárico (18:0) frente a ácido oleico (18:1) en semillas de cosecha F₁ y sus correspondientes líneas parentales: parental alto-oleico donador de polen (AOP) y parental alto-esteárico receptor de polen (CAS-3).
- Figura II.6.** Representación del ácido esteárico (18:0) frente al ácido oleico (18:1) en semillas de plantas F₂ crecidas a partir de las semillas F₁ procedentes del cruce entre CAS-3 y los distintos parentales alto-oleico.
- Figura II.7.** Representación de ácido esteárico (18:0) frente a ácido oleico (18:1) en semillas maduras F₃ de plantas crecidas a partir de semillas F₂ de los cruces CAS-3 x Línea D.
- Figura II.8.** Representación de ácido esteárico (18:0) frente a ácido oleico (18:1) en semillas F₃ de plantas crecidas a partir de semillas F₂ de los cruces CAS-3 x Línea E.
- Figura II.9.** Representación de ácido esteárico (18:0) frente a ácido oleico (18:1) en semillas F₃ de plantas crecidas a partir de semillas F₂ de los cruces CAS-3 x Línea E (continuación).

- Figura III.1.** Incorporación de radioactividad en la fracción de ácidos grasos de plastidios, dependiente de tiempo de incubación.
- Figura III.2.** Incorporación de radioactividad a la fracción de ácidos grasos dependiente de concentración de sustrato.
- Figura III.3.** Incorporación de [^{14}C]sustratos dentro de la fracción de ácidos grasos por plastidios aislados de semillas de girasol en desarrollo.
- Figura III.4.** Incorporación de radioactividad en la fracción insoluble en metanol/KCl, dependiente de tiempo de incubación.
- Figura III.5.** Incorporación de radioactividad en la fracción insoluble en metanol/KCl, dependiente de concentración de sustrato.
- Figura III.6.** Tasa de utilización de Glc6P para la síntesis de almidón y flujo a través de la OPPP en plastidios aislados de semillas de 17 y 24 DDF.
- Figura III.7.** Incorporación de radioactividad a la fracción de ácidos grasos a partir de [^{14}C]malato o [^{14}C]piruvato, en presencia o en ausencia de 1 mM de Glc6P.
- Figura III.8.** Modelo de flujo de carbono en plastidios aislados de embriones de girasol en desarrollo.
- Figura III.9.** Alineamiento del fragmento de PCR *Hagpt*.

Índice de tablas.

- Tabla 1.** Principales ácidos grasos del girasol, tanto de semilla como de tejidos fotosintéticos, su nomenclatura y temperatura de fusión (Tf).
- Tabla 2.** Principales fosfolípidos, naturaleza de sus sustituyentes, carga eléctrica y la abundancia y función de cada uno de ellos.
- Tabla 3.** Composición de ácidos grasos del aceite de semilla de las líneas control (RHA-274), control alto-oleico (HAOL-9) y mutantes (CAS-5, CAS-12, CAS-3, CAS-4 y CAS-8).
- Tabla 4.** Cebadores diseñados para la amplificación por PCR.
- Tabla I.1.** Distribución de radioactividad en la fracción de ácidos grasos de semillas frescas y congeladas.
- Tabla I.2.** Variación en la incorporación de radioactividad dentro de los ácidos grasos de la fracción de TAG, a lo largo del tiempo de incubación.
- Tabla I.3.** Composición de ácidos grasos en el aceite de semillas procedentes de líneas de girasol control RHA-274, alto oleico HAOL-9, alto esteárico CAS-3 y alto palmítico CAS-5.
- Tabla I.4.** Radioactividad incorporada en los ácidos grasos de la fracción de TAG en semillas de 15 y 20 DDF.
- Tabla I.5.** Incorporación de radioactividad dentro de la fracción de TAG y ácidos grasos en presencia de cerulenina.
- Tabla II.1.** Composición de ácidos grasos en el aceite de semillas de distintas líneas de girasol alto-oleico, empleadas en este estudio.
- Tabla II.2.** Variación del porcentaje de ácidos grasos ^{14}C -marcados de la fracción

de TAG en semillas de 15 DDF de distintas plantas alto oleico incubadas a distintas concentraciones de metil viológeno.

- Tabla II.3.** Composición de ácidos grasos de semillas de plantas alto-oleico donadoras de polen (AOP), procedentes de distintas líneas alto-oleico (A, C, D, E y F), de plantas mutantes CAS-3 receptoras de polen y de sus respectivos híbridos F₁.
- Tabla II.4.** Distribución de frecuencia y análisis de Chi-Cuadrado para el contenido de 18:0 y 18:1 en semillas de plantas F₂, así como el índice de % [¹⁴C](18:0 + AGML*) / % [¹⁴C]insaturados a 10 mM de MV, procedentes del cruce de CAS-3 con distintas líneas alto-oleico.
- Tabla II.5.** Herencia teórica del contenido en ácido esteárico (18:0) y en ácido oleico (18:1).
- Tabla II.6.** Análisis del contenido en 18:0 y 18:1 en semillas de las distintas poblaciones F₃ procedentes del cruce entre distintas líneas alto-oleico y el mutante alto esteárico CAS-3.
- Tabla III.1.** Recuperación del marcador plastidial, y confirmación de inexistencia de contaminación por componentes citosólicos durante el proceso de aislamiento de plastidios.
- Tabla III.2.** Contenido de metabolitos en semillas de girasol.
- Tabla III.3.** Partición de [U-¹⁴C]Glc6P dentro de la ruta de síntesis de almidón y de la OPPP.

I. Introducción.

1. EL GIRASOL. ORIGEN Y DESARROLLO DEL CULTIVO.

1.1. Origen e importancia del cultivo.

Se cree que el girasol (*Helianthus annuus* L.) tiene su origen en el suroeste de Norte América y que fue domesticado originariamente en el área centro-oeste del actual EEUU hacia el año 5000 a.d.C. El cultivo se introdujo en Europa en el siglo XVI inicialmente como una planta ornamental y más tarde se desarrolló para alimento y usos medicinales, siendo en Rusia a lo largo del siglo XIX donde comenzó a ser usado como cultivo oleaginoso (Fick, 1989).

Debido a sus elevados contenidos en aceite y proteínas, las semillas oleaginosas constituyen uno de los principales cultivos de la agricultura mundial. El cultivo de girasol, con más de 9 millones de Tm de aceite producido anualmente, ocupa el cuarto lugar a nivel mundial detrás de la soja, palma y colza. En Europa, debido a razones climatológicas y socioeconómicas ocupa el segundo lugar por detrás del cultivo de colza, situándose la producción del pasado año 2003 en 4,8 millones de Tm. España, con una producción media anual de 480.000 Tm de aceite en los últimos 10 años, se encuentra entre los principales productores mundiales de aceite de girasol, siendo sólo superada por Francia, Argentina y por los países miembros de la extinta URSS: Ucrania y la Federación Rusa. (FAOSTAT 2003).

1.2. Mejora del cultivo de girasol.

En el cultivo de girasol se ha perseguido desde sus inicios la obtención de nuevas variedades con una serie de características deseables tales como una mayor producción de semillas y aceite, una mayor resistencia a enfermedades y parásitos, tales como el jopo (*Orobanche cumana*), la roya (*Puccinia helianthi*), o el mildiu (*Plasmopara helianthi*), y una mayor resistencia a condiciones de cultivo adversas, como la sequía o la elevada salinidad de

los suelos; todas ellas encaminadas a incrementar el rendimiento. Para conseguir estos objetivos se han estado utilizando diversas estrategias.

La estrategia clásica utilizada desde los orígenes ha sido la mejora del cultivo aprovechando la gran variabilidad genética natural que posee el girasol y que es una de las razones que hacen del girasol un cultivo ampliamente adaptado y con un gran potencial. Gracias a esta cualidad, desde los inicios de la mejora clásica en Rusia a finales del siglo XIX, se consiguió reducir hasta uno el número de capítulos por planta, incrementar el tamaño de las semillas (Vrânceanu, 1977) y pasar de variedades con un contenido de aceite del 30% (1912-1926) a variedades con un rendimiento de aceite del 45-50% a principios de los años 60. Estas mejoras confirieron a esta planta, ornamental en sus inicios, la consideración e importancia de cultivo oleaginoso (Röbbelen *et al.*, 1989).

Posteriormente, se desarrolló la mejora mediante la obtención de híbridos, aprovechando el fenómeno de la heterosis o vigor del híbrido de primera generación. La mejora mediante la heterosis dio sus primeros frutos en Canadá a mediados del siglo pasado, pero debido a que sobre el parental hembra sucedía tanto autopolinización como polinización cruzada, los porcentajes de hibridación eran menores del 50% (Röbbelen *et al.*, 1989). Este problema se solucionó a principios de los años 70 obteniéndose híbridos mediante la introducción en la línea parental hembra del carácter *androsterilidad citoplásmica* (CMS). Este carácter es un sistema que se transfiere de una generación a otra por vía materna, está relacionado con la producción de una proteína mitocondrial alterada y las plantas que lo poseen son incapaces de producir polen (Köhler *et al.*, 1991). La línea macho utilizada para obtener híbridos, además de producir polen, debe tener los genes restauradores de la fertilidad, para que los híbridos de primera generación obtenidos puedan producir polen de manera normal y por tanto semillas.

Sin embargo, dado que tanto la variabilidad genética natural del girasol como la conseguida mediante la hibridación son en ocasiones insuficientes para conseguir líneas con unas características determinadas, es necesario recurrir a otras técnicas, como la mutagénesis o la ingeniería genética, con el fin de obtener variedades con una serie de caracteres deseables demandados por la industria y por tanto con un elevado interés económico. Para mutagenizar semillas oleaginosas se pueden emplear dos tipos de procedimientos:

- Mutagénesis química; que consiste en sumergir las semillas en soluciones de mutágenos químicos que o bien reaccionan directamente con el DNA, caso de los agentes alquilantes como el etilmetanosulfonato (EMS), o bien indirectamente por medio de la formación de un metabolito a partir de ellos que sí tiene propiedades mutagénicas, caso de la azida sódica que es efectiva solo en algunas especies vegetales (McCourt y Somerville, 1987).
- Mutagénesis física; que consiste en someter a las semillas a radiaciones ionizantes como rayos-X o rayos- γ para así producir roturas en la doble cadena de DNA, algunas de las cuales serán reparadas por los propios mecanismos celulares de reparación que introducirán modificaciones.

Fruto de la mutagénesis de plantas oleaginosas ha sido la obtención de mutantes con modificaciones en la composición de ácidos grasos de su aceite. Utilizando EMS en soja (*Glycine max*), se han obtenido mutantes con un menor contenido en ácido linolénico (18:3), reduciéndolo de un 7% a un 3% (Wilcox y Cavins, 1985). También se han obtenido mutantes con alto contenido en ácido esteárico (18:0) en el aceite y buenas propiedades agronómicas. Así se ha obtenido con azida sódica un mutante con un mayor contenido en 18:0, incrementándolo de un 5% a un 30% (Graef *et al.*, 1985). En colza (*Brassica sp.*), utilizando

el agente EMS, se han obtenido mutantes alto oleico con hasta un 87% de ácido oleico (18:1) en su aceite (Auld *et al.*, 1992; Rücker y Röbbelen, 1995).

En girasol (*Helianthus annuus* L.) son varios los mutantes obtenidos con modificaciones en los lípidos de semilla. El primer mutante de girasol se obtuvo en Rusia utilizando como agente mutagénico el dimetilsulfato, que originó la primera variedad alto oleico (76%) (Soldatov, 1976). Posteriormente, se han obtenido varias líneas mutantes con niveles superiores de ácidos grasos saturados palmítico o esteárico (Osorio *et al.*, 1995), así como mutantes con alto contenido de ácido palmítico en fondo alto oleico (Fernández-Martínez *et al.*, 1997), obtenidos tanto por mutagénesis química como por mutagénesis física. Este apartado será ampliado más adelante al hablar del aceite de girasol.

1.3. Características morfológicas y fisiológicas.

1.3.1. Morfología del girasol.

El girasol cultivado es una planta dicotiledónea, anual y diploide ($2n=34$), que dentro de la familia Compositae pertenece a la especie *Helianthus annuus* L. La planta es de porte erecto, con altura variable entre 60-220 cm, sistema radicular bien desarrollado, tallo cilíndrico con amplia superficie foliar coronado por una única inflorescencia o capítulo apical. La inflorescencia tiene un diámetro de entre 15-30 cm dependiente de la variedad y de las condiciones de cultivo (Figura 1). Dentro de la inflorescencia, adosadas al receptáculo discoidal se encuentran las flores, que pueden ser liguladas y tubulares:

- Las flores liguladas (Fig. 1.Be) se sitúan en el borde del capítulo y se disponen radialmente en 1-2 filas. Tienen forma alargada y son de un color amarillo intenso. Tienen estilos y estigmas vestigiales pero no tienen anteras, por lo que son estériles.

- Las flores tubulares (Fig. 1.Ba-d) son las flores propiamente dichas y son hermafroditas. Se disponen en arcos espirales que parten desde el centro y están separadas entre ellas por la pálea. El cáliz se compone de dos sépalos muy reducidos que se caen con facilidad. La corola tiene forma de tubo con cinco dientes y es de color amarillo. Tiene cinco estambres con los filamentos libres y las anteras unidas entre sí por una cutícula. El pistilo tiene dos carpelos y el ovario es ínfero con un solo óvulo. El estilo está oculto en el interior del tubo y el estigma está bifurcado.

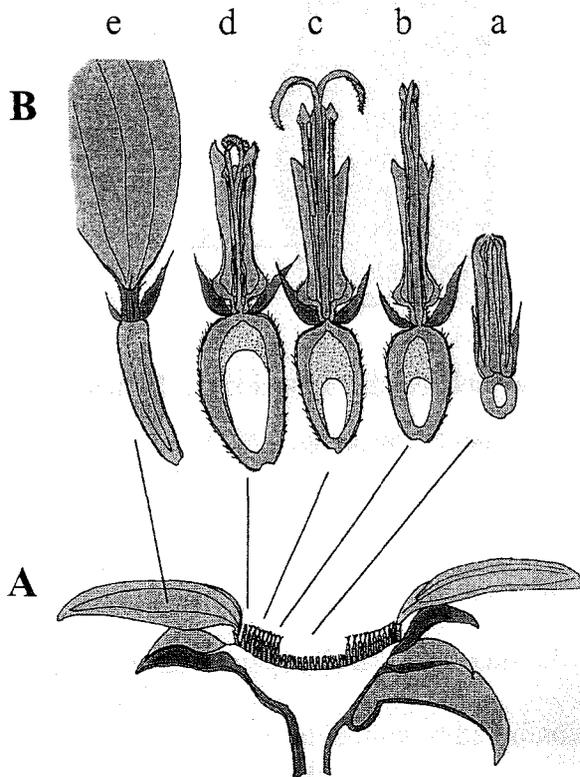


Figura 1. Inflorescencia. A. Sección longitudinal de un capítulo de girasol; B. Flores liguladas (e) y tubulosas en diferentes estadios de desarrollo: antes de abrirse (a); comienza a abrirse (emergencia de estambres) (b); abierta (c) y después de fecundada (d) (Alba y Llanos, 1990).

El fruto es un aquenio de 7-17 mm de largo compuesto por el pericarpio o cáscara, que es la envuelta externa dura y fibrosa, normalmente muy próxima al embrión excepto por las aristas (Figura 2). El embrión está rodeado por una fina cutícula denominada membrana seminal que sirve de unión entre embrión y pericarpio. Los cotiledones son la principal reserva de aceite de la semilla, y entre ambos se sitúa la gémula, que está formada por células alargadas que durante la germinación darán lugar a la radícula (Vrânceanu, 1977).

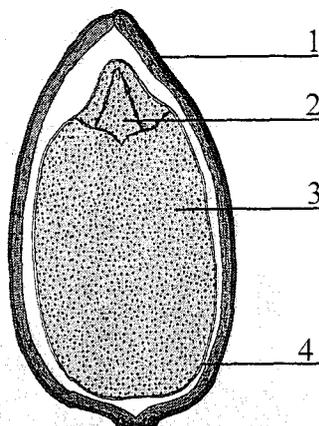


Figura 2. Sección longitudinal de un aquenio: 1. Pericarpio; 2. Gémula; 3. Cotiledón; 4. Membrana seminal (Vrânceanu, 1977).

1.3.2. Fisiología del girasol.

La longitud del ciclo de vida del girasol depende principalmente de dos factores: la variedad o cultivar, y las condiciones ambientales, como la temperatura, fotoperiodo y humedad, presentes durante el desarrollo. En términos generales varía entre 120-150 días para las variedades cultivadas actualmente en España. La floración del capítulo comienza a las 10-12 semanas después de la germinación y suele durar en torno a 10-12 días. Comienza con la apertura de las primeras flores liguladas y sigue con la de las flores verdaderas desde los anillos externos hacia los centrales, a razón de 2-5 anillos diarios. Durante la floración, el 73-

85% del carbono acumulado en las semillas deriva de los carbohidratos asimilados por fotosíntesis (Hall *et al.*, 1999). Las hojas mayores de la parte superior de la planta tienen la mayor capacidad fotosintética, exportando el 80% de la materia seca incorporada dentro de las semillas (McWilliam *et al.*, 1974). Después de la fecundación de las flores se inicia el llenado de las semillas. En ese periodo hay un escaso aumento de la materia seca de la planta, produciéndose una redistribución de las sustancias asimiladas por la planta en beneficio de las semillas y a expensas de los tallos y hojas. En este estado es cuando ocurre la síntesis y acumulación de materia grasa, y suele durar de 35 a 50 días. Una vez finalizado el llenado, la semilla alcanza la madurez fisiológica y comienza a perder agua. Una vez perdida el agua, se considera el momento óptimo para su recolección (Vrânceanu, 1977; Alba y Llanos, 1990).

1.4. Acumulación de productos de reserva durante la embriogénesis.

Se ha estudiado en detalle la acumulación de productos de reserva durante la embriogénesis de semillas oleaginosas, y se ha comprobado que esta no ocurre de forma gradual y constante durante la formación de la semilla, sino que hay una etapa específica de acumulación y que dicha temporalidad está determinada por la presencia de ciertas actividades enzimáticas implicadas en la ruta de biosíntesis.

En semillas de colza (*Brassica napus* L.), se ha observado que la acumulación de productos de reserva durante los primeros 20 días después de floración (DDF) es escasa o nula, y que el embrión crece por división celular. Entre los 20 y 50 DDF sucede la máxima tasa de acumulación de aceite en semilla, y además, hay una acumulación temporal de almidón en la semilla que incrementa hasta los 33 DDF, para luego degradarse y casi no detectarse al final del desarrollo de la semilla periodo en el que la división celular cesa y

comienza la expansión de las células. Después de este periodo, entre los 55 y los 85 DDF se sintetizan las proteínas de reserva (da Silva *et al.*, 1997; Norton y Harris, 1975). En semillas de soja, el aceite y la proteína son los principales productos que se almacenan durante el desarrollo del embrión. El almidón también se acumula durante la etapa inicial del desarrollo, pero a diferencia de lo que ocurre en colza, la degradación del mismo es más tardía y sí se detecta en semilla madura (Wilson *et al.*, 1978).

En semillas de girasol se ha estudiado la acumulación de productos de reserva durante el desarrollo existiendo una clara temporalidad en el depósito tanto de aceite como de proteína, pero no existiendo acumulación parcial ni final de almidón (Connor y Hall, 1997). Aunque existen ciertas diferencias en cuanto a la duración de la etapa de llenado de la semilla entre los distintos autores, probablemente causadas por el uso de distintos cultivares y distintas condiciones de cultivo, se puede afirmar que la acumulación de aceite en semilla se empieza a detectar a partir de los 12 DDF, y se alcanza la tasa más elevada entre los 16 DDF y los 24 DDF, momento en el que el contenido de aceite en semilla pasa aproximadamente del 16% al 30% del peso seco de semilla. A partir de dicha edad y hasta los 35 DDF el incremento, más o menos pronunciado, siempre es muy inferior. La acumulación de proteínas de reserva es temporalmente paralela a la acumulación del aceite, aunque durante todo el llenado de la semilla el porcentaje de estas se mantienen siempre por debajo del porcentaje de aceite, alcanzándose en semillas próximas a madurez (30 DDF) un porcentaje de proteínas de más del 25% del peso total de la semilla (Martínez-Force *et al.*, 2000).

2. LÍPIDOS. CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA.

Los lípidos constituyen un grupo químicamente diverso cuya característica común y definitoria es su insolubilidad en agua, y tienen un amplio abanico de funciones biológicas.

En semillas oleaginosas las grasas y los aceites, lípidos formados por triacilglicéridos, son la principal forma de almacenamiento energético junto con las proteínas. Otros lípidos como fosfolípidos y esteroides constituyen la mitad de la masa de las membranas vegetales, teniendo funciones estructurales. Otros, aun estando en cantidades relativamente pequeñas, juegan un papel crucial como cofactores enzimáticos, transportadores electrónicos, agentes emulsionantes, hormonas y mensajeros intracelulares.

2.1. Ácidos grasos.

Los ácidos grasos son lípidos sencillos y posiblemente los más abundantes. Son ácidos orgánicos formados por una cadena hidrocarbonada, usualmente con un número par de átomos de carbono y un grupo carboxilo terminal. La longitud de la cadena varía entre 2 y 80 átomos de carbono, pero los más habituales son los ácidos grasos de 12 a 22 átomos de carbono. Existen varias formas de nombrarlos; así, todos tienen un nombre sistemático y uno abreviado, e incluso algunos un nombre común. El nombre sistemático sigue las reglas de la IUPAC, mientras que el abreviado consiste en dos números separados por dos puntos, donde el primero indica el número de átomos de carbono y el segundo el número de dobles enlaces presentes en la cadena hidrocarbonada. En esta nomenclatura también se puede indicar la posición en la que se encuentran los dobles enlaces mediante el uso de letras griegas que indican su posición respecto al extremo carboxílico o al extremo opuesto (Δ si se cuenta desde el grupo carboxilo, y n u ω si se cuenta desde el grupo metilo terminal), y la configuración *cis* (*c*) o *trans* (*t*) del doble enlace. Por ejemplo, el ácido oleico es el *cis*-9-octadecenoico según la nomenclatura sistemática y el 18:1 Δ 9*c* según la abreviada. No todos los ácidos grasos que se conocen en la naturaleza, que son cientos, tienen la misma importancia (Naudet, 1996). Según su importancia se clasifican en ácidos grasos mayoritarios que, aun siendo muy pocos,

constituyen al menos el 95 % del total (ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico); ácidos grasos minoritarios que son los constituyentes secundarios (ácido palmitoleico, araquídico o behénico); y ácidos grasos inusuales que sólo se encuentran en algunas especies vegetales como es el caso del ricinoleico o del erúxico. En la Tabla 1 se indican los principales ácidos grasos del girasol, así como su nomenclatura y punto de fusión.

Tabla 1. Principales ácidos grasos del girasol, tanto de semilla como de tejidos fotosintéticos), su nomenclatura y temperatura de fusión (Tf) (Gurr y Harwood, 1991).

| Común | Sistemático | Abreviado | Tf (°C) |
|----------------------|-------------------------------|--------------------------|---------|
| Palmítico | Hexadecanoico | 16:0 | 60 |
| Esteárico | Octadecanoico | 18:0 | 69 |
| Araquídico | Eicosanoico | 20:0 | 75 |
| Behénico | Docosanoico | 22:0 | 80 |
| Oleico | <i>cis</i> -9-octadecenoico | 18:1 Δ 9c | 16 |
| - | <i>trans</i> -3-hexadecenoico | 16:1 Δ 3t | 53 |
| Linoleico | 9,12-octadecadienoico | 18:2 Δ 9c,12c | -5 |
| α -Linolénico | 9,12,15-octadecatrienoico | 18:3 Δ 9c,12c,15c | -11 |

Según el número de dobles enlaces los ácidos grasos se clasifican en:

-Saturados: no tienen ningún doble enlace y son cadenas lineales. Su fórmula general es $C_nH_{2n}O_2$ y se clasifican en cortos, medios, largos y muy largos según la longitud de su cadena.

-Insaturados: son aquellos que contienen dobles enlaces y pueden ser mono o poliinsaturados, dependiendo de si tienen uno o más de ellos. Los dobles enlaces están normalmente en configuración *cis* y aparecen en un número limitado de posiciones en la cadena, siendo las más usuales las Δ 9, Δ 12 y Δ 15.

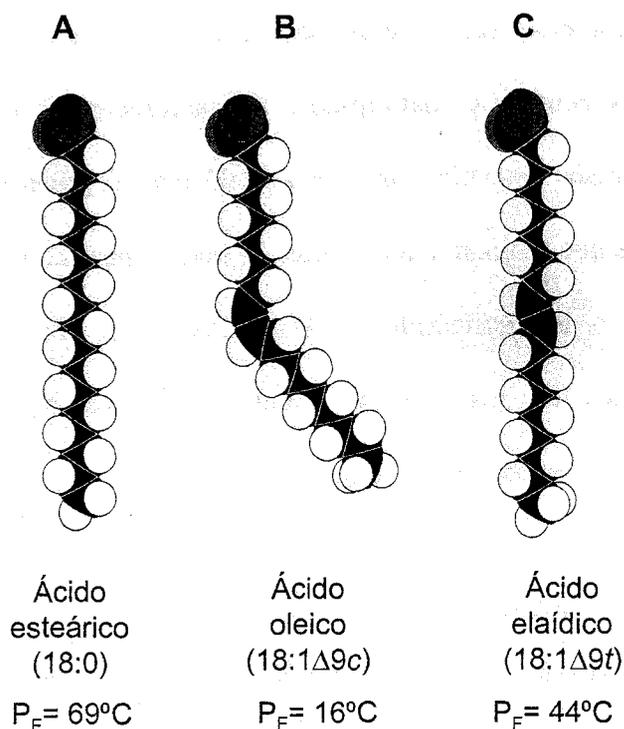


Figura 3. Estructura de los ácidos grasos: A) esteárico (18:0), B) oleico (18:1Δ9c) y C) elaídico (18:1Δ9t).

Los dobles enlaces con isomería *cis* (Figura 3.B), introducen “codos” en las cadenas hidrocarbonadas afectando con ello todas sus propiedades físicas, como por ejemplo el punto de fusión. No sucede lo mismo con los dobles enlaces en configuración *trans* (Figura 3.C), que no introducen más que un pequeño ángulo en la cadena lo que supone un cambio menor en las propiedades físico-químicas del compuesto y su comportamiento es más parecido al de los ácidos grasos saturados (Figura 3.A). El ángulo que introduce el doble enlace *cis* en la molécula del ácido oleico, hace que su punto de fusión baje desde 69 °C del ácido esteárico hasta 16 °C. En cambio, el doble enlace *trans* no distorsiona tanto la molécula por lo que el punto de fusión sólo baja a 44 °C.

2.2. Lípidos complejos de plantas.

Los lípidos complejos son ésteres del glicerol o glicerolípidos y se agrupan normalmente en lípidos neutros y fosfolípidos. Los acilgliceroles (lípidos neutros) están formados por ácidos grasos esterificados a una molécula de glicerol, y dependiendo del número de ácidos grasos que se unan a la molécula se denominan monoacilglicéridos (MAG), diacilglicéridos (DAG) o triacilglicéridos (TAG). Los TAG son los más abundantes y principales constituyentes de los aceites, mientras que los MAG y DAG son los intermediarios metabólicos de los TAG (Figura 4).

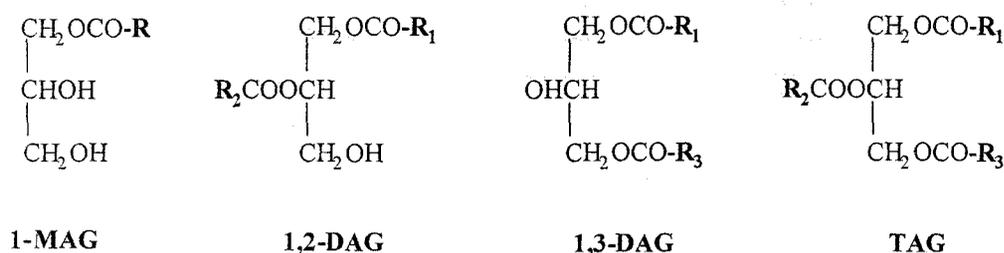


Figura 4. Estructura de acilglicéridos. MAG: monoacilglicérido, DAG: diacilglicérido, TAG: triacilglicérido. (R_n) molécula de ácido graso.

Los fosfoglicéridos o fosfolípidos son lípidos polares formados por una molécula de glicerol con dos ácidos grasos esterificados en las posiciones *sn-1* y *sn-2* y un grupo fosfato en la posición *sn-3* del glicerol. Según cual sea el sustituyente del grupo fosfato así se clasifican los distintos fosfolípidos. En la Tabla 2 se recogen los principales fosfolípidos, junto con su sustituyente, carga eléctrica y abundancia de cada uno de ellos.

Las principales funciones de los lípidos son:

-*Reserva de energía*: en los oleosomas, gotas de aceite citoplásmicas, se

acumulan los lípidos neutros para que las semillas puedan obtener energía con su degradación.

-*Estructurales*: los lípidos polares o fosfolípidos son los constituyentes fundamentales de las membranas celulares.

-*Metabólicas*: hormonas, esteroides que regulan mensajes entre tejidos, prostanoídes que son potentes efectores biológicos, fosfoinosítoles en la señalización celular, etc.

Tabla 2. Principales fosfolípidos, naturaleza de sus sustituyentes, carga eléctrica y la abundancia y función de cada uno de ellos.

| Sustituyente | Fosfolípido | Carga | Abundancia/Función |
|--------------|-----------------------|-------|--|
| H | Ácido fosfatídico | -1 | Intermediario metabólico Trazas |
| Etanolamina | Fosfatidiletanolamina | 0 | Intermediario metabólico Cantidades apreciables |
| Colina | Fosfatidilcolina | 0 | Grandes cantidades |
| Serina | Fosfatidilserina | -1 | Minoritario |
| Glicerol | Fosfatidilglicerol | -1 | Abundante en tejidos fotosintéticos |
| Inositol | Fosfatidilinositol | -1 | Minoritario |

3. SÍNTESIS DE ACEITE EN SEMILLAS.

3.1. Fuentes de carbono para el metabolismo de las semillas.

Las fuentes de carbono necesarias para el metabolismo de las semillas son suministradas por la fotosíntesis que se realiza en las hojas y en las inflorescencias de las plantas. La contribución relativa de estos tejidos depende tanto de la especie como del estado de desarrollo de la semilla. La contribución fotosintética de las inflorescencias varía entre el

10 y el 75% en cereales (Crookston *et al.*, 1974) y entre el 0 y el 20% en leguminosas (Flinn *et al.*, 1977). En embriones de guisante (*Pisum sativum* L.), la contribución relativa varía durante el desarrollo, de tal forma que la fotosíntesis realizada en las inflorescencias suministra más fotosintatos a las semillas en los estados intermedios de desarrollo que en los estados iniciales o finales (Flinn *et al.*, 1977). En colza (*Brassica napus* L.), las semillas en desarrollo se encuentran dentro de una cápsula o silicua de color verde, y se cree que la asimilación fotosintética de carbono que se produce por la silicua es suficiente para soportar la mayor parte de demanda de carbono requeridas por la semilla durante el desarrollo. (Allen *et al.*, 1971; Pechan y Morgan, 1985; Keiller y Morgan, 1988).

3.2. Flujos de carbono desde los tejidos fotosintéticos a las semillas.

En la mayoría de las plantas, el principal soluto transportado entre los tejidos fotosintéticos y las semillas es la sacarosa (ap Rees, 1988), aunque en algunas ocasiones otros carbohidratos simples e incluso aminoácidos pueden ejercer de medio de transporte del carbono (Rijven y Gifford, 1983; Schussler *et al.*, 1984). El carbono asimilado por fotosíntesis en los tejidos fuente puede ser convertido en almidón, permanecer en el cloroplasto y estar disponible para su re-movilización durante la noche, o puede exportarse al citosol en forma de triosas fosfato. Una vez en el citosol, las triosas fosfato se convierten en sacarosa que se transporta por el floema de la planta hasta los tejidos sumidero. La cantidad de sacarosa destinada a las semillas depende de múltiples factores entre los que se encuentran la tasa neta de fotosíntesis, la capacidad para sintetizar sacarosa y la capacidad de descargar sacarosa en el floema. La descarga de sacarosa desde el floema a las semillas requiere que en primer lugar la sacarosa pase simplásticamente desde los elementos de criba o tamizado del

floema a las células de la cubierta de la semilla a través del plasmodesmata (Patrick y Offler, 1995; Stitt, 1996) y de ahí al espacio apoplástico que rodea al embrión (Wang *et al.*, 1995).

Alkio y Grimm (2002), estudiaron en girasol el transporte de fotoasimilados desde las hojas hasta el capítulo durante el llenado de la semillas, después de aplicaciones foliares de pulsos de $^{13/14}\text{CO}_2$. Determinaron que 2/3 del total de las hojas, aquellas situadas en la parte superior del tallo, exportaban fotoasimilados al capítulo, y que lo hacían de forma sectorial, es decir, cada hoja suministraba fotoasimilados a un sector en forma de cuña que correspondía a 2/8-3/8 de la superficie total del capítulo. Demostraron que durante el llenado de las semillas, la máxima importación de fotoasimilados sucedía en los arcos intermedios del capítulo mientras que la mínima ocurría en los arcos centrales del capítulo y establecieron que la sacarosa era el único azúcar transportado a través del floema. Por otro lado, Goffner *et al.*, (1988) suministrando $^{14}\text{CO}_2$ a hojas de plantas de girasol en desarrollo, estudiaron la radioactividad translocada a los fotoasimilados de la semilla y encontraron que a las 8 horas después del suministro de $^{14}\text{CO}_2$ la mayor parte de la radioactividad aparecía en forma de azúcares solubles. Pasadas 48 h el 60% de los fotoasimilados se habían metabolizado, siendo los compuestos lipídicos el principal destino de la radioactividad, aunque también se detectaba radiactividad en la fracción proteica y en la fracción de carbohidratos insolubles.

3.3. Capacidades enzimáticas de los plastidios.

Una vez dentro del embrión, el principal destino de la sacarosa es el suministro del carbono necesario para la biosíntesis de productos de reserva, como proteínas, almidón y aceite, así como para la producción de ATP y poder reductor necesarios para llevar a cabo estos procesos (ap Rees, 1995). Inicialmente, la sacarosa una vez dentro del citosol puede convertirse tanto en uridina difosfato-glucosa (UDP-glucosa) o adenosina difosfato-glucosa

(ADP-glucosa) y fructosa por la acción de la sacarosa sintetasa, o puede convertirse en glucosa y fructosa por la acción de la invertasa (ap Rees, 1995). La UDP-glucosa se convierte en glucosa-1-fosfato (Glc-1-P) y uridina trifosfato (UTP) por la acción de la UDP-glucosa pirofosforilasa (Stitt y Steup, 1985). En algunas especies vegetales como el maíz o la cebada, la Glc-1-P puede convertirse en ADP-glucosa por la isoforma citosólica de la ADP-glucosa pirofosforilasa (Thorbjornsen *et al.*, 1996; Denyer *et al.*, 1996). Las hexosas, hexosas fosfato o ADP-glucosa producidas en el citosol pueden ser importadas directamente al plastidio o servir de sustrato para la ruta glucolítica en el citosol y ser transformadas en intermediarios glucolíticos como piruvato, malato o acetato. Uno o más de estos metabolitos pueden ser importados al interior del plastidio donde serán utilizados como suministradores de carbono para la síntesis de almidón y/o ácidos grasos (Figura 5).

Desde nuestros conocimientos actuales, la glucolisis, gluconeogénesis y la ruta oxidativa de las pentosas fosfato (OPPP) pueden estar implicadas en el suministro de fuentes de carbono, ATP y poder reductor necesarios para la síntesis de almidón y ácidos grasos. Además, varias enzimas como la Acetyl-CoA sintetasa (ACC), el complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDH) y la enzima málica pueden suministrar también acetyl-CoA y cofactores para la síntesis de ácidos grasos (Figura 5).

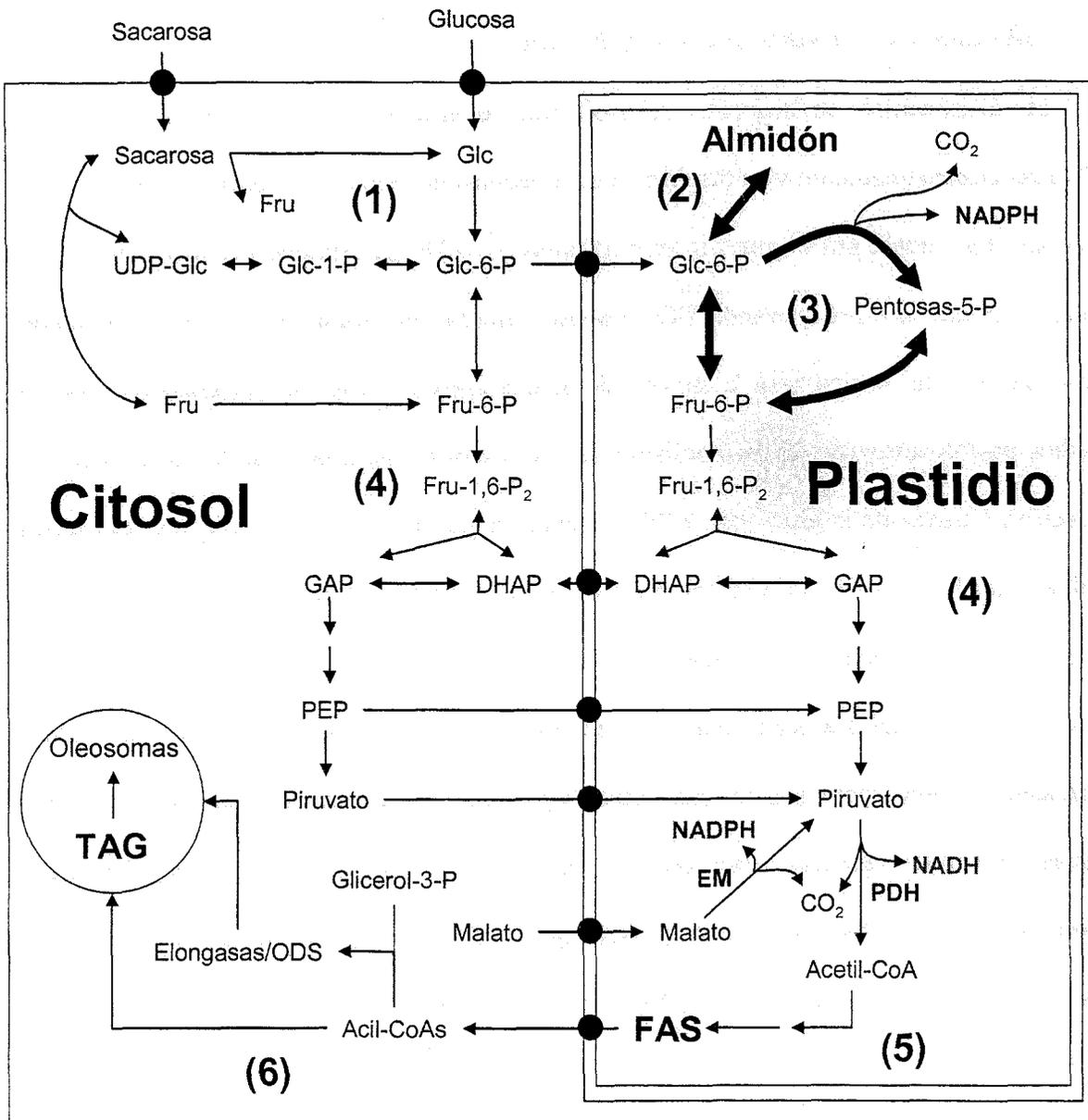


Figura 5. Esquema del metabolismo del carbono en embriones en desarrollo durante la acumulación de aceite. (1) Degradación de sacarosa hasta hexosa y hexosa fosfato; (2) Síntesis de almidón; (3) Ruta oxidativa de las pentosas fosfato; (4) Glucólisis; (5) Síntesis de ácidos grasos. EM: enzima málica, PDH: complejo de la piruvato deshidrogenada, FAS: sintetasa de ácidos grasos; (6) Síntesis de triacilglicéridos y formación de oleosomas.

3.3.1. Glucolisis y piruvato deshidrogenada.

En la glucolisis se degrada una molécula de glucosa en una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente y se originan dos moléculas de piruvato, conservándose parte de la energía libre cedida por la glucosa en moléculas de ATP. El piruvato originado puede ser metabolizado por la PDH liberando CO_2 y poder reductor en forma de NADH, y generando acetil-CoA, el sillar básico para la síntesis de ácidos grasos. Tanto en cloroplastos como en plastidios no-fotosintéticos, el metabolismo de las hexosas o hexosas fosfato hacia el acetil-CoA ocurre a través de la glucolisis y PDH, siendo la glucosa, fructosa y Glc-1-P los puntos de inicio para la glucolisis en plantas. Se acepta que aparte de la fosfoglicerato mutasa, los cloroplastos poseen todas las enzimas de la ruta glucolíticas así como de la PDH (Dennis y Miernyk, 1982). Gracias a determinaciones enzimáticas se sabe que la fosfoglicerato mutasa está ausente en cloroplasto de guisantes (Stitt y ap Rees, 1979), mientras que los cloroplastos de hojas de espinaca parecen tener una ruta glucolítica y una PDH completas (Yamada y Nakamura, 1975). Se ha demostrado también que la PDH se encuentra en cloroplastos de hojas de guisante, espinaca y cebada (Williams y Randall, 1979; Liedvogel, 1986; Hoppe *et al.*, 1993).

Una ruta glucolítica parcial o completa se ha encontrado en plastidios no fotosintéticos de varios tejidos. Así, por ejemplo se ha demostrado la existencia de una ruta glucolítica completa en plastidios aislados de endospermo de ricino, brotes de coliflor, embriones de guisante, y amiloplastos aislados de endospermo de trigo (Simcox *et al.*, 1977; Journet y Douce, 1985; Denyer y Smith, 1988; Foster y Smith, 1993; Entwistle y ap Rees, 1988). En contraste, amiloplastos aislados de cultivo de células de sicomoro y plastidios de raíces de guisante tienen una ruta glucolítica incompleta, ya que la actividad fosfoglicerato mutasa medida en plastidios aislados no excedió de la esperada por contaminaciones citosólicas

(Frehner *et al.*, 1990; Trimming y Emes, 1993). Por tanto las capacidades de la ruta glucolítica pueden estar reducidas o incluso incompletas en los tramos finales en algunas especies vegetales.

Al igual que en cloroplastos, plastidios no-fotosintéticos de varios tejidos vegetales poseen una PDH completa. Reid *et al.* (1975) aislaron plastidios procedentes de endospermo de semillas de ricino en desarrollo, ausentes de cualquier contaminación mitocondrial y demostraron la presencia de actividad PDH. Esta enzima está también presente en plastidios de embriones de guisante en desarrollo (Denyer y Smith, 1988). Sin embargo, esta actividad no se detectó en plastidios de semillas de ricino en germinación (Rapp y Randall, 1980).

Sin ninguna duda, la presencia de las enzimas glucolíticas y del complejo de la piruvato deshidrogenasa en los plastidios es un factor clave para determinar si los intermediarios glicolíticos y el piruvato pueden utilizarse como sustratos para la síntesis de ácidos grasos en cloroplasto y en plastidios no fotosintéticos.

3.3.2. Gluconeogénesis.

En los plastidios, las enzimas de la ruta gluconeogénica son las responsables de sintetizar ADP-glucosa, el sustrato inmediato para la síntesis de almidón. En cloroplastos, las triosas fosfato generadas a partir de la fotosíntesis actúan como sustrato para la síntesis de ADP-glucosa. Sin embargo, en plastidios no fotosintéticos, la síntesis de almidón es dependiente del carbono importado desde el citosol. Sin embargo, las rutas implicadas en la conversión de triosas fosfato en hexosas fosfato están incompletas en algunos tejidos vegetales, por lo que en estos plastidios las triosas fosfato importadas no pueden ser sustrato para la síntesis de almidón. Esto sugiere que las hexosas o las hexosas fosfato son probablemente las fuentes de carbono para la síntesis de almidón en plastidios de ciertos tejidos no fotosintéticos (Entwistle y ap Rees, 1988).

3.3.3. Ruta oxidativa de las pentosas fosfato.

La ruta oxidativa de las pentosas fosfato (OPPP) es la encargada de producir ribosa-5-fosfato y poder reductor en forma de NADPH en la fase oxidativa de la ruta, y reciclar las pentosas fosfato de nuevo en hexosas fosfato mediante una fase no oxidativa, para que continúe la fase oxidativa y por tanto la producción de NADPH. Además, la ruta oxidativa de las pentosas fosfato está también implicada en el metabolismo de las hexosas fosfato y triosas fosfato (Figura 5). Las enzimas de esta ruta no se han estudiado tanto como las de las rutas anteriores, sin embargo, esta claro que al menos algunas de las enzimas de esta ruta están presentes como isoformas tanto en el citosol como en el plastidio de tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos.

Esta descrito el papel que juega la OPPP como suministrador de NADPH para el metabolismo del nitrógeno (Bowsher *et al.*, 1992; Foster y Smith, 1993). En leucoplastos obtenidos de endospermo de ricino, Smith *et al.* (1992) apuntaban que la enzima málica podría ser la responsable del suministro de poder reductor para la síntesis de ácidos grasos. Recientemente se han presentado evidencias directas que conectan la OPPP con la síntesis de ácidos grasos en plastidios de colza (Schwender *et al.*, 2003 y Hutching *et al.*, 2004).

Así pues, la síntesis de ácidos grasos en plastidios de plantas, requiere del suministro de poder reductor, el cual en plastidios de tejidos no fotosintéticos podría ser suministrado por la ruta oxidativa de las pentosas fosfato y/o la glucólisis y el complejo de la piruvato deshidrogenasa.

3.4. Fuentes de carbono para la síntesis de ácidos grasos y almidón en plastidios.

La síntesis *de novo* de ácidos grasos en semillas de plantas ocurre en el interior de los plastidios. El primer paso comprometido de la síntesis de ácidos grasos es la formación de malonil-CoA a partir de acetil-CoA y bicarbonato, paso catalizado en el interior del plastidio por la acetil-CoA carboxilasa (ACC) (Harwood, 1988). Teniendo en cuenta que la molécula de acetil-CoA no puede cruzar la membrana plastidial, esta debe ser generada dentro del propio plastidio a partir de intermediarios de la glucólisis. Estos intermediarios pueden ser sintetizados en el interior del propio plastidio o ser importados activamente desde el citosol.

La capacidad de los plastidios por utilizar substratos exógenos capaces de mantener sus rutas biosintéticas y catabólicas depende de la actividad de las propias enzimas plastidiales, y en mayor medida, de la presencia de transportadores específicos situados en la envuelta del plastidio. En la actualidad se dispone de un vasto conocimiento sobre la naturaleza de los precursores usados para la síntesis de ácidos grasos por los plastidios aislados de diferentes especies vegetales. Entre estos substratos están la glucosa-6-fosfato (Glc-6-P), dihidroxiacetonafosfato (DHAP), fosfoenolpiruvato (PEP), piruvato, malato y acetato, y su tasa relativa de utilización depende de la especie vegetal, del órgano o tejido estudiado y de su estado de desarrollo. Así, por ejemplo, la Glc-6-P y el piruvato son los principales substratos para la síntesis de ácidos grasos en plastidios aislados de semillas de colza (*Brassica napus* L.) en desarrollo, para los estadios iniciales-intermedios y para los estadios finales, respectivamente. (Eastmond y Rawsthorne, 2000). En cambio, plastidios aislados de endospermo de ricino (*Ricinus communis* L.) en desarrollo soportan sus mayores tasas de síntesis de ácidos grasos cuando se les suministra malato y piruvato (Smith *et al*, 1992).

En tejidos no-fotosintéticos, las fuentes potenciales de carbono para la síntesis de almidón que se importan desde el citosol al interior del plastidio incluyen hexosas, hexosas fosfato, triosas fosfato y ADP-glucosa, y el sustrato preferido por los plastidios suele variar entre las especies estudiadas. Se ha determinado que la Glc-6-P sirve como principal suministrador de carbono para la síntesis de almidón en plastidios aislados de embriones de guisante (*Pisum sativum* L) y de embriones de colza (*Brassica napus* L) (Hill y Smith, 1991; Kang y Rawsthorne, 1994). También puede ser metabolizada a través de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato (OPPP) en plastidios aislados de embriones de colza en desarrollo (Kang y Rawsthorne, 1996; Eastmond y Rawsthorne, 2000; Hutching *et al.*, 2004).

3.5. Ruta de síntesis de ácidos grasos.

3.5.1 Síntesis intraplastidial.

La síntesis *de novo* de ácidos grasos en plantas y las reacciones que para ello se llevan a cabo dentro del plastidio, están muy bien caracterizadas (Roughan y Slack, 1982; Harwood, 1988; Slabas y Fawcett, 1992; Murphy *et al.*, 1993; Ohlrogge y Browse, 1995). El primer paso implicado en la síntesis de ácidos grasos es la conversión ATP-dependiente de acetil-CoA y bicarbonato en malonil-CoA por la acción de la acetil-CoA carboxilasa (ACC).

Esta enzima existe en plantas en dos isoformas distintas (Sasaki *et al.*, 1995). La forma procariota de la ACC es un complejo de múltiples subunidades que está localizado en el plastidio de dicotiledoneas y monocotiledoneas no Gramineae (Sasaki *et al.*, 1993). La forma eucariota de la ACC es una enzima multifuncional que está presente en el citosol, y también en el plastidio de Gramineae (Slabas y Hellyer, 1985; Egli *et al.*, 1993) y posiblemente de otras plantas superiores (Roesler *et al.*, 1997).

El otro complejo enzimático responsable de la síntesis *de novo* de ácidos grasos es la ácido graso sintasa (FAS). Las plantas contienen una FAS de tipo II que consisten en cinco polipéptidos disociables que actúan *in vivo* como un complejo, estando el sustrato unido a una proteína transportadora de grupos acilos (ACP). Las cinco enzimas son la acetil-CoA-ACP transacilasa, la 3-acetoacil-ACP sintasa, la 3-cetoacil-ACP reductasa, la 3-hidroxiacil-ACP deshidratasa y la enoil-ACP reductasa. El complejo cataliza la adición secuencial de dos átomos de carbono, derivados del malonil-CoA, sobre una cadena de acilos formada inicialmente a partir del acetil-CoA (Figura 6). La cadena de acilos en crecimiento es trasladada entre los distintos enzimas que componen el proceso cíclico de la síntesis *de novo* de ácidos grasos por la molécula de ACP a la cual permanece unida. La reacción de condensación inicial de la FAS está catalizada por la β -cetoacil-ACP sintasa III (KAS III), que forma butiril-ACP (4:0-ACP).

A continuación, la enzima KAS I toma el relevo encargándose de catalizar las reacciones de condensación cíclica hasta originar el palmitil-ACP (16:0-ACP). Una nueva enzima del complejo, KAS II, se encarga entonces de condensar la molécula de palmitil-ACP y malonil-ACP para formar estearil-ACP (18:0-ACP). Este a su vez es sustrato del enzima estearil-ACP desaturasa (SAD, EC 1.12.99.6) que introduce un doble enlace en la cadena carbonada entre C₉ y C₁₀ originando el oleil-ACP (18:1-ACP). Estos productos son interceptados en la ruta principal y transferidos fuera del plastidio gracias a la acción de las enzimas acil-ACP tioesterasas (TE, EC 3.1.2.14), que hidrolizan el enlace entre el grupo acilo y la molécula de ACP. Una vez fuera, los acilos generados se incorporarán al pool de acil-CoAs, gracias a la enzima acil-CoA sintetasa (Roughan y Slack, 1982).

En plantas superiores se han identificado dos tipos de acil-ACPs tioesterasas: FatA y FatB (Jones *et al*, 1995). Los genes FatA codifican para tioesterasas de ácidos grasos de

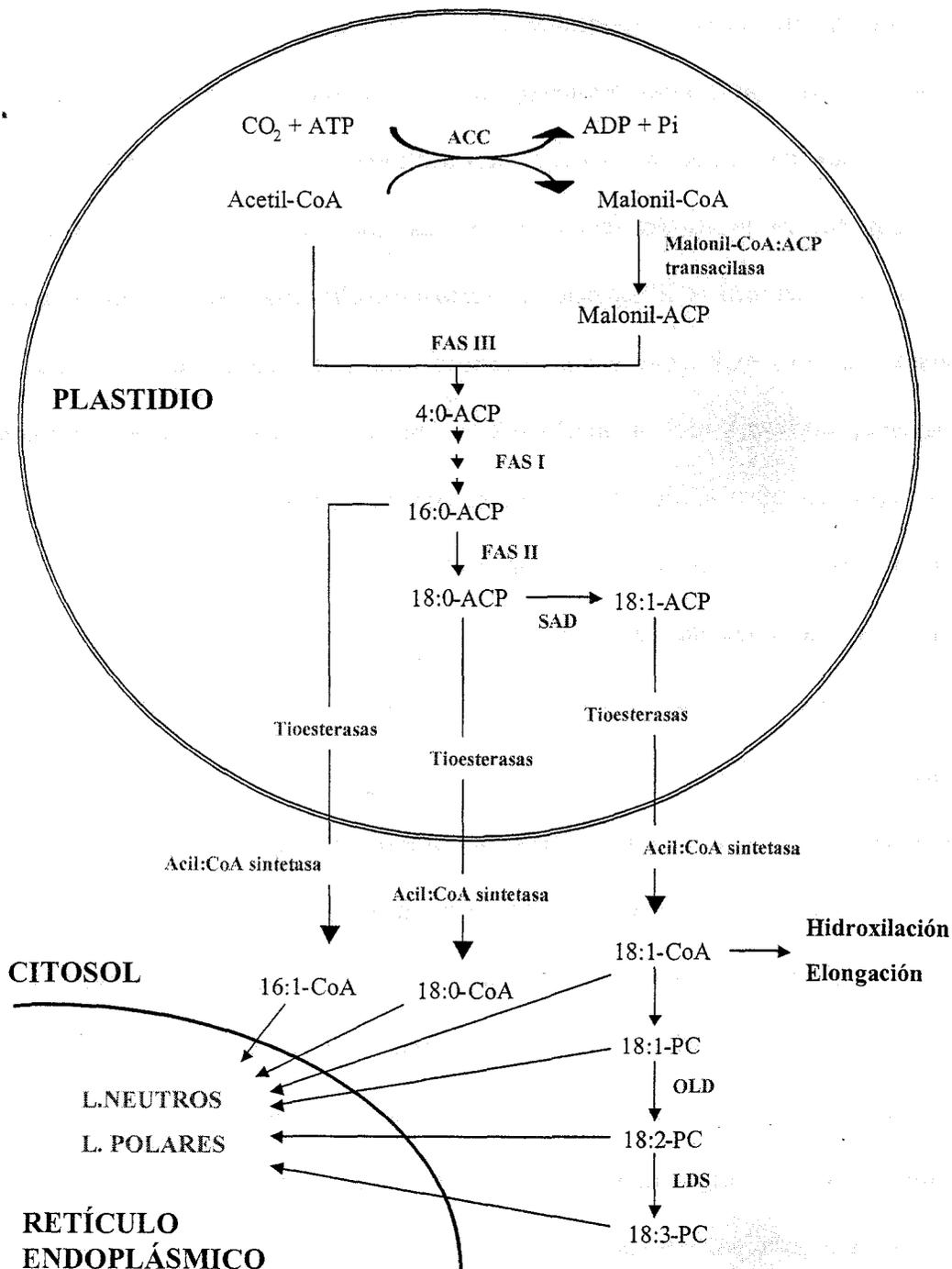


Figura 6. Esquema general de la biosíntesis de ácidos grasos en semillas oleaginosas. ACC, acetil-CoA carboxilasa; FAS I, II, III, complejo ácido graso sintasa I, II, III; SAD, estearato desaturasa; ODS, oleato desaturasa; LDS, linoleato desaturasa.

cadena larga, con una alta especificidad por el 18:1-ACP, y una afinidad reducida por el 16:0-ACP y el 18:0-ACP. Los genes FatB, codifican para tioesterasas con una afinidad mayor por los acil-ACPs saturados. En semillas de girasol en desarrollo, Martínez-Force *et al.* (2000) indicaron la presencia de al menos dos enzimas tioesterasas con propiedades diferentes: una tioesterasa tipo FatA, con alta afinidad por 18:1-ACP, y una tioesterasa tipo FatB, con preferencia por ácidos grasos saturados de cadena larga. También demostraron que la actividad acil-ACP tioesterasa variaba cualitativa y cuantitativamente durante el periodo de síntesis activa de lípidos (15-30 DDF). Así, mientras que el sustrato preferido era siempre el 18:1-ACP, la afinidad por 16:0-ACP decrecía mientras que la afinidad por 18:0-ACP incrementaba durante el desarrollo.

Aunque estas enzimas tienen una influencia clara sobre la composición ácida final de los aceites de semilla, el resultado final de la síntesis *de novo* de ácidos grasos deriva, tal como propuso Davies (1993), de la interacción de estas tioesterasas con enzimas claves de la ruta principal de síntesis como son la KAS II y la SAD (Martínez-Force *et al.*, 2000; Cantisán *et al.*, 2000).

3.5.2. Modificaciones extraplastidiales.

a) Biosíntesis de ácido linoléico

El ácido linoléico (18:2 Δ 9c, 12c) es uno de los ácidos grasos mayoritarios en los aceites vegetales que tiene además una gran importancia desde el punto de vista nutricional ya que es un ácido grasos esencial para la dieta humana. La síntesis de ácido linoleico ocurre fuera del plastidio por la desaturación del ácido oleico (18:1 Δ 9c) introduciendo un segundo doble enlace en configuración *cis* entre los carbonos 12 y 13 por la acción de la enzima oleil-fosfatidilcolina desaturasa (OLD) localizada en la fracción microsomal de la célula. Este

enzima no utiliza como sustrato la molécula de oleil-CoA, sino que el oleico es transferido a la posición *sn*-2 de la fosfatidilcolina (PC) por la acción de la 18:1-CoA lisofosfatidilcolina aciltransferasa originando *sn*-2-oleil-PC. Una vez producida la desaturación del oleico esterificado a la posición *sn*-2 de la PC, el linoleato formado, mediante un mecanismo de intercambio de acilos, pasa al conjunto de acil-CoAs de la célula para ser a continuación utilizado de forma selectiva en la acilación del glicerol-3-fosfato y continuar en la ruta biosintética de los TAG. El intercambio de acilos entre acil-CoA y PC juega un papel determinante en la regulación de la cantidad de ácidos grasos insaturados para la síntesis del aceite (Stobart *et al.*, 1983).

Dada su importancia, el mecanismo de síntesis y regulación ha sido ampliamente estudiado (Harwood, 1988; Garcés y Mancha, 1991; Garcés *et al.*, 1992; Hongtrakul *et al.*, 1998; Martínez-Rivas *et al.*, 2000). Las condiciones ambientales durante el desarrollo del embrión, principalmente la temperatura de crecimiento, modifican las proporciones relativas de ácido oleico (18:1) y linoleico (18:2), de tal forma que un descenso de la temperatura provoca un incremento en el contenido de 18:2 en el aceite. Son varios los mecanismos propuestos para explicar cómo la temperatura regula la actividad ODS. García-Díaz *et al.* (2002) propusieron dos mecanismos para explicar la regulación por temperatura de la actividad ODS en semillas de girasol en desarrollo: (i) un efecto directo relacionado con la baja estabilidad térmica de la enzima, de tal forma que las altas temperaturas inactivarían a la enzima disminuyéndose así la síntesis de 18:2; y (ii) un efecto indirecto por el cual la temperatura determina la disponibilidad de oxígeno dentro del aquenio, el cual a su vez es sustrato de la reacción. Una mayor temperatura disminuiría la concentración de oxígeno disponible para la ODS, incrementándose el contenido de 18:1 en el aceite.

En girasol se han caracterizado tres genes de la ODS: *FAD2-1*, *FAD2-2* y *FAD2-3* (Martínez-Rivas *et al.*, 1998). El gen *FAD2-1* se expresa a altos niveles exclusivamente en las semillas en desarrollo, mientras que los genes *FAD2-2* y *FAD2-3* lo hacen ampliamente en todos los tejidos estudiados. Estudios recientes han revelado que la baja estabilidad térmica de la isoforma *FAD2-1* (Sánchez-García *et al.*, 2004) junto con la represión del gen *FAD2-1* a alta temperatura son los principales factores que controlan el efecto directo de la temperatura sobre la actividad ODS en semillas de girasol en desarrollo.

b) Elongaciones extraplasmáticas.

Se consideran ácidos grasos de cadena muy larga (AGML) aquellos que tienen 20 átomos de carbono (C₂₀) o más. Normalmente se encuentran formando parte de superficies protectoras de plantas como ceras y cutinas, aunque hay algunas semillas oleaginosas que acumulan grandes cantidades de AGML, generalmente de menos de C₂₄ tanto saturados como insaturados, estos últimos de una insaturación. Entre las especies que acumulan AGML saturados destacan *Nephelium lappaceum* y *Scheleichera trifuga* que acumulan un 35% y 30% de ácido araquídico (20:0), respectivamente. En cuanto a los AGML monoinsaturados destacan las semillas de colza (*Brassica napus*) que acumulan ácido erúico (22:1Δ13c) hasta en un 49% del total de su aceite o la semilla de mostaza (*Brassica alba*) que acumula hasta un 43%.

Las enzimas responsables de la síntesis de AGML son las elongasas, enzimas presentes en la fracción microsomal que llevan a cabo la elongación de los ácidos grasos a partir de acil-CoA y malonil-CoA (Harwood, 1996). Aunque la mayor parte de los AGML se sintetizan fuera del plastidio, Domergue y Post-Beittenmiller (2000) definieron la existencia en epidermis de puerro (*Allium porrum* L.) de una inusual actividad KAS II capaz de aceptar 18:0-ACP y 20:0-ACP como sustrato para sintetizar 20:0-ACP y 22:0-ACP.

c) Biosíntesis de glicerolípidos y de fosfolípidos.

La formación de las moléculas de triacilgliceroles (TAG) se lleva a cabo por la ruta de Kennedy (Murphy *et al.*, 1993; Ohlogge y Browse, 1995). Esta ruta es llevada a cabo por una serie de enzimas unidas a membranas situadas en el retículo endoplásmico e implica tres pasos consecutivos de acilación (Figura 7). En el primer paso, la molécula de acilo del correspondiente acil-CoA es esterificada a la posición *sn*-1 de la molécula de glicerol-3-fosfato por la acción de la glicerol-3-fosfato acil transferasa (GPAT) y se forma ácido lisofosfatídico. La enzima ácido lisofosfatídico aciltransferasa (LPAAT) cataliza entonces la unión de otro grupo acilo esta vez a la posición *sn*-2 del glicerol para generar el ácido fosfatídico. Este se transforma en diacilglicerol y fosfato inorgánico por la acción de la fosfatidato fosfatasa. Finalmente, se une la última molécula de acilo a la posición *sn*-3 del diacilglicerol gracias a la acción de la diacilglicerol aciltransferasa. Los TAG así formados se almacenan en los denominados oleosomas, que cuando maduran se rodean por una monocapa de fosfolípidos en la cual se ensamblan pequeñas proteínas hidrofóbicas denominadas oleosinas. Estas oleosinas llegan a constituir hasta el 20% del contenido total de proteína dentro de la semilla de girasol (Tzen y Huang, 1992)

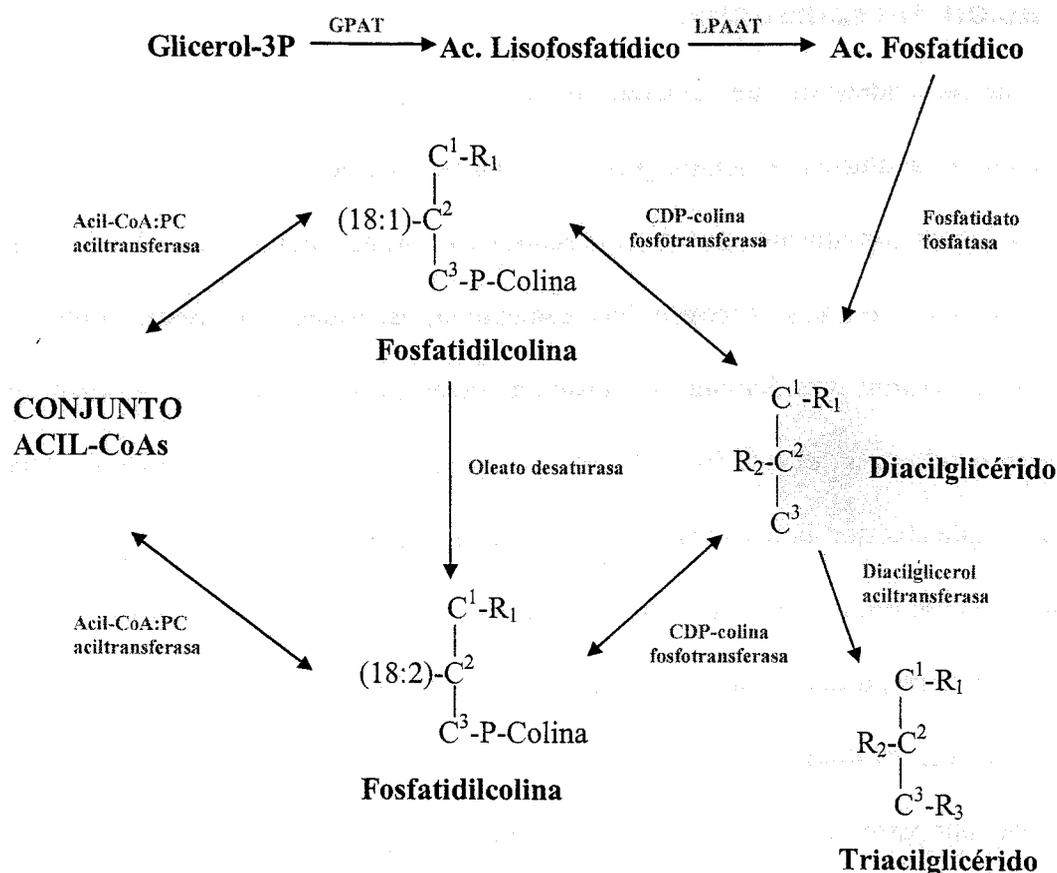


Figura 7. Formación de triacilglicéridos a través de la ruta del glicerol-3-P o ruta de Kennedy, y su relación con la PC. GPAT; glicerol-3-fosfato acil transferasa, LPAAT, ácido lisofosfatídico aciltransferasa.

4. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS.

En la actualidad no está claro dónde se encuentran los puntos claves que controlan la síntesis de ácidos grasos, ni en tejidos fotosintéticos ni en no fotosintéticos. A lo largo de los últimos 20 años han sido múltiples los estudios encaminados a responder o al menos aclarar este punto, muchos de ellos interesantes pero ninguno definitivo.

4.1. Regulación intraplastidial.

Son varias las evidencias que sugieren que la ACC puede representar un sitio clave para la regulación de la síntesis de ácidos grasos, ya que se trata de la primera enzima de la ruta. La evidencia más convincente para esto descansa en tejidos fotosintéticos. La tasa de síntesis de ácidos grasos en hojas se reduce drásticamente en oscuridad. Post-Beittenmiller *et al.* (1991,1992) observaron que durante la transición luz/oscuridad el nivel de acetil-ACP disminuye. Asumiendo que el acetil-ACP está en equilibrio con el acetil-CoA, este descubrimiento implicaba que la actividad ACC estaba regulada y que a su vez limitaba la tasa de síntesis en la oscuridad. Shintani y Ohlogge (1994) también mostraron que los niveles de acetil-ACP caen en respuesta a altas concentraciones de ácidos grasos libres, lo que sugiere que la ACC debe estar también regulada vía un mecanismo de inhibición por retrocontrol. Page *et al.* (1994) utilizaron inhibidores de la ACC para determinar el coeficiente de control de flujo de esta enzima sobre la síntesis de ácidos grasos en hojas iluminadas de maíz y cebada. Se determinó en estos tejidos un coeficiente de control de flujo de aproximadamente 0,5, lo que sugería que la ACC era importante en la regulación de la síntesis de ácidos grasos.

En tejidos no fotosintéticos se ha medido la actividad ACC y se ha visto que es igual o inferior a la requerida para sustentar la tasa de biosíntesis de lípidos (Simcox *et al.*, 1979; Turnham y Northcoat, 1983; Charles *et al.*, 1986; Bettey y Smith, 1990). Se ha comunicado también que la acumulación de lípidos de reserva durante el desarrollo de las semillas coincide aproximadamente con el incremento de la actividad ACC (Simcox *et al.*, 1979; Turnham y Northcoat, 1983; Charles *et al.*, 1986). Observaciones como esta han hecho que se considere a la ACC como un factor limitante en la biosíntesis de ácidos grasos en semillas oleaginosas (Harwood, 1988). Sin embargo, Kang *et al.* (1994) mostraron que la actividad ACC no se correlaciona positivamente con la tasa de síntesis de lípidos durante el desarrollo

de semillas de colza. Roesler *et al.* (1997) sobreexpresaron la forma eucariota de la ACC en embriones de soja en desarrollo usando una secuencia diana plastidial. El incremento resultante en la actividad ACC dentro del plastidio solo provocó un ligero incremento (5%) en la acumulación de lípidos de reserva en la semilla, por lo que concluyeron que la ACC debía ejercer algún control sobre la tasa de síntesis de aceite pero que otras enzimas de la ruta debían también jugar un papel significativo en esta regulación. Por su parte, Klaus y Dörmann (2003) observaron que la expresión de la ACC en amiloplastos de tubérculos de patata conducía a un fuerte incremento de la síntesis de ácidos grasos y a un incremento de hasta 5 veces en el contenido de TAG, demostrando que los tubérculos de patata tienen la capacidad de sintetizar lípidos de reserva y que el malonil-CoA representa un factor también limitante en la acumulación de aceite.

4.2. Regulación extraplastidial.

Se han descrito otros mecanismos capaces de regular la síntesis *de novo* de ácidos grasos mediante el retrocontrol que ejercen los productos finales de la ruta sobre la entrada de nuevas fuentes de carbono al interior del plastidio. La Glc-6-P es uno de los principales suministradores de carbono para la síntesis *de novo* de ácidos grasos en plastidios aislados de semillas de colza en desarrollo. Johnson *et al.* (2000) observaron que la tasa de síntesis de ácidos grasos a partir de la Glc-6-P se reducía de 3-4 veces en presencia de CoA y ATP, substratos necesarios para la síntesis de acil-CoAs, y que esta inhibición se veía aliviada por la adición de la proteína de unión de acil-CoAs (ACBP), la cual se une 1:1 con las moléculas de acil-CoAs. Por su parte Fox *et al.* (2000) demostraron que las moléculas de acil-CoA ejercían una inhibición sobre el transporte de Glc-6-P al interior del plastidio. La adición de acil-CoAs con longitud de cadena menor de C₁₀ no inhibía la entrada de Glc-6-P. Sin embargo

lauril-CoA (C_{12:0}) causaba una inhibición del 34%, miristil-CoA (C_{14:0}) provocaba una inhibición del 62%, y acil-CoAs de longitud de cadena mayor, por ejemplo el palmitoil-CoA (C_{16:0}) inhibía un 73% la entrada de Glc-6-P al interior del plastidio. Sin embargo, ni CoA ni tioesteres de cadena muy corta como acetil-CoA o malonil-CoA ejercieron ningún efecto sobre el transporte de Glc-6-P. También demostraron que tanto los acil-CoAs de cadena larga como la ACBP se encontraban en la misma concentración dentro de las células. Así, que mientras la concentración de acil-CoAs de cadena larga fruto de la síntesis intraplastidial permaneciera por debajo de la de ACBP, se mantendría un alto flujo de carbono a través de la ruta hacia la síntesis de TAG mediadas por las aciltransferasas. Una disminución en el uso de acil-CoAs por las acil-transferasas conduciría a un exceso en las concentraciones de acil-CoAs por encima de las concentraciones de ACBP, esto causaría una inhibición en el suministro de Glc-6-P al plastidio, y por tanto una disminución de esqueletos carbonados y de poder reductor para la síntesis de ácidos grasos. La inhibición desaparecería una vez que el suministro de ácidos grasos se redujera lo suficiente como para soportar la tasa de síntesis en ese momento.

De la misma manera Fox *et al.* (2001) mostraron que el oleil-CoA también inhibía la entrada de Glc-6-P al interior de los plastidios aislados de raíces de plantas de guisante y que dicha inhibición era revertida por la adición de ACBP. De la misma manera, en presencia de ATP y de CoASH, la entrada de Glc-6-P era inhibida hasta un 60%, debido a la síntesis de acil-CoAs. Del mismo modo, la adición de oleil-CoA disminuía el flujo de carbono desde la Glc-6-P hacia la síntesis de almidón y a través de la OPPP hasta un 73% y 40%, respectivamente. La incorporación de acetato dentro de la fracción de ácidos grasos también se inhibía por la adición de oleil-CoA.

El papel que tiene el suministro de fuentes de carbono a través de transportadores proteicos en la regulación de la síntesis de ácidos grasos ha sido puesto de manifiesto mediante la clonación del transportador proteico de fosfoenolpiruvato(PEP)/fosfato. El PEP, al igual que el piruvato y la Glc-6-P, es un metabolito de potencial importancia para el suministro de esqueletos carbonados para la síntesis de ácidos grasos en embriones de colza (Kubis *et al.*, 2004). La sobreexpresión de este transportador en la membrana de plastidios de embriones de colza en desarrollo parece afectar al contenido de aceite almacenado en semilla. Así, Pike *et al.* (2003) definieron una correlación directa entre el número de copias de este gen en el genoma de plantas transformadas y el contenido de aceite.

4.3. Regulación luz/oscuridad.

El tiempo es un aspecto estrechamente relacionado con la mayoría de los procesos biológicos. Las plantas son capaces de ajustar su crecimiento y desarrollo a los ciclos diarios de luz/oscuridad. Esta adaptación les permite mantener el ritmo de múltiples procesos fisiológicos y anticiparse a los diferentes eventos cíclicos que ocurren en su ambiente, proporcionándoles de esta manera ventajas adaptativas (Harmer *et al.*, 2000; Staiger, 2002). Esta capacidad reside en un oscilador bioquímico interno o reloj circadiano. La oscilación generada por este oscilador circadiano interno se caracteriza por tres propiedades (Barak *et al.*, 2000):

- La oscilación rítmica persiste con un periodo aproximado de 24 horas bajo condiciones constantes.
- Señales ambientales como ciclos de luz-oscuridad o temperatura, pueden reajustar la fase del ritmo para ajustarla a los ciclos ambientales.
- La temperatura puede afectar al periodo de la oscilación.

En plantas se han definido múltiples procesos biológicos que están regulados por el reloj circadiano, dependientes directa o indirectamente de la expresión también rítmica de multitud de genes. La inducción de floración por fotoperiodo, los movimientos rítmicos del hipocotilo y cotiledones, o la apertura de los estomas, son ejemplos de ello. Uno de esos procesos regulados por el reloj circadiano hace referencia a la necesidad de mantener la fluidez de las membranas biológicas en respuesta a los cambios de temperatura entre el día y la noche. Esta necesidad ha provocado que parte de los genes implicados en la modificación de lípidos estén regulados por el reloj circadiano.

En *Arabidopsis*, los niveles de mRNA de multitud de genes han sido analizados mediante microarray y se ha encontrado que los niveles de expresión de varias desaturasas tienen picos de expresión máximos justo antes del inicio de la noche (Harmer *et al.*, 2000; Schaffer *et al.*, 2001). Esta expresión diferencial durante el día de enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos, podría ser la responsable por ejemplo, de las fluctuaciones diurnas medidas en la composición de ácidos grasos en hojas de espinaca (Browse *et al.*, 1981) o en plántulas de algodón (Rikin *et al.*, 1993).

5. EL ACEITE DE GIRASOL.

5.1. Características generales.

El aceite de girasol es un excelente aceite comestible que tiene un alto contenido en ácidos grasos insaturados (85-91%), representados en su mayor parte por los ácidos oleico y linoleico. El hecho de que prácticamente no tenga ácido linolénico (18:3) le proporciona una razonable estabilidad oxidativa. En la mayoría de los casos, el aceite de girasol es rico en ácido linoleico, ya que representa del 50% al 70% del total, mientras que el ácido oleico suele

suponer del 15 al 45 % de todos los ácidos grasos del aceite (Murphy, 1993). En el aceite de girasol existe una fuerte relación inversa entre el contenido de ácido oleico y linoleico, causada por el genotipo y la temperatura ambiental que soportan las plantas durante la formación de la semilla: a mayor temperatura, mayor proporción de 18:1 y menor de 18:2. También se ha descrito la relación inversa entre la temperatura y el contenido de 18:0, que es mayor a temperaturas menores (Lajara *et al.*, 1990). Esta es la causa por la que la misma variedad de girasol, cultivada en puntos geográficos diferentes y bajo condiciones ambientales distintas, tenga una composición de ácidos grasos distinta. Asimismo, también existen ligeras variaciones en cuanto al contenido de los ácidos linoleico, palmítico y oleico respecto a la posición espacial dentro del capítulo. Los dos primeros aumentan y el oleico disminuye desde el perímetro hacia el centro (Zimmerman y Fick, 1973). El 98-99% del aceite está formado por acilglicéridos, de ellos el 95% son triacilglicéridos, el resto son sustancias que se pueden agrupar con el término genérico de "insaponificable". Por ello, la composición de ácidos grasos de los triglicéridos es prácticamente igual a la del aceite.

Los fosfolípidos mayoritarios, que suponen un 2% del aceite total, son la fosfatidilcolina (48,7%), fosfatidilinositol (27,9%), fosfatidiletanolamina (21,2%) y ácido fosfatídico (2,2%) (Chapman, 1980). En la fracción insaponificable hay sustancias de naturaleza muy diversa como ceras, mucílagos, carbohidratos, esteroides y tocoferoles. En el aceite de girasol el contenido total de tocoferol es del orden de 700 mg/Kg, valor similar al que se encuentra en otros aceites vegetales como el de soja, maíz y semilla de algodón (Landers y Rathmann, 1981). En porcentaje con respecto al total del aceite, el 0,06% es α -tocoferol o vitamina E y un 0,01% es γ -tocoferol, un buen antioxidante natural (Warner *et al.*, 1990). El aceite de girasol, desde el punto de vista de su valor calórico y del grado de asimilación por el organismo humano, se sitúa entre los mejores aceites vegetales (Vrânceanu,

1977) y la presencia de vitaminas liposolubles, esteroides, lecitinas, y otros componentes, hacen que tenga un alto valor nutritivo (Gunstone *et al.*, 1994).

5.2. Usos industriales del aceite de girasol

Los aceites y grasas utilizados para la alimentación humana se dividen en dos grupos: los de consumo directo y los que emplea la industria alimentaria para la preparación de margarinas, productos precocinados, bollería, pastelería, etc. Las grasas con alto contenido en ácidos grasos saturados son semisólidas y untables a temperatura ambiente, por lo que la industria las utiliza para la fabricación de margarinas, pastelería y bollería. Originariamente y para este fin, la industria alimentaria usaba grasas de origen animal, como la manteca de cerdo y la mantequilla. Debido a la riqueza de estas grasas animales en determinados ácidos grasos saturados en la posición central de las moléculas de TAG, que inciden negativamente sobre los niveles de colesterol en sangre (James, 1996; Willett, 1994), en los últimos 20 años se ha promovido su sustitución por aceites de origen vegetal. Los aceites vegetales, debido a su elevado contenido en ácidos grasos insaturados son líquidos a temperatura ambiente. Esta propiedad los hace poco apropiados para la fabricación de margarinas, pero muy beneficiosos para el consumo humano ya que apenas poseen ácidos grasos saturados en la posición central de los TAG. Los ácidos grasos saturados de más de 18 carbonos que están en la posición central (*sn-2*) de los TAG son preferentemente absorbidos a través de la pared intestinal, mientras que los liberados por la hidrólisis de la lipasa de las posiciones externas (*sn-1* o *sn-3*) son mayoritariamente excretados y por tanto no asimilados por el organismo (Zock *et al.*, 1995). De lo anterior se deduce la importancia de incrementar el consumo de aceites con ácidos grasos insaturados en la posición *sn-2* de los TAG, mucho más beneficiosos para la salud que los saturados en esa misma posición.

Para conseguir que los aceites vegetales tengan una consistencia más sólida, se manipulan químicamente de manera que se les modifica su composición de ácidos grasos y/o la estructura de sus TAG. Para ello se someten a un proceso industrial denominado hidrogenación. La hidrogenación es un proceso químico que se realiza a altas temperaturas, utilizando hidrógeno y ciertos catalizadores metálicos, normalmente níquel, para convertir los aceites vegetales líquidos en grasas sólidas. El proceso de hidrogenación no es completo sino parcial, ya que de lo contrario las grasas resultantes serían demasiado sólidas. Este proceso químico produce un cambio en las propiedades físicas y químicas de la grasa, ya que parte de los ácidos grasos insaturados se transforman en saturados, lo que le confiere a la grasa un punto de fusión más elevado y en consecuencia una consistencia semisólida a temperatura ambiente. Como consecuencia de la hidrogenación también se producen isomerizaciones de los dobles enlaces de los ácidos grasos (Patterson, 1994). De los isómeros artificiales producidos, los *isómeros trans*, pueden llegar a representar hasta un 40% del total, y son diferentes a los isómeros *trans* que se encuentran de forma natural en los productos lácteos, estos últimos originados por fermentación bacteriana (Lawson, 1995).

Los alimentos elaborados con este tipo de grasas y aceites hidrogenados contienen por tanto ácidos grasos *trans* y son la principal fuente de ácidos grasos *trans* en la dieta típica de los Estados Unidos (Satchithanandam, 2004). Son múltiples los estudios realizados para un amplio rango de condiciones de ensayo, regiones geográficas y poblaciones que ponen de manifiesto la relación adversa entre la ingesta de grasas *trans* y el riesgo de enfermedades coronarias. Así, el consumo de ácidos grasos *trans* aumenta el nivel de colesterol de baja densidad (LDL), disminuye el colesterol de alta densidad (HDL) e incrementa el nivel de lipoproteína A, otro lípido asociado a enfermedades cardiovasculares (Willet, 1994; Ascherio y Willet, 1997; Ip, 1997; Shapiro, 1997).

5.3. Alternativas a la hidrogenación.

Los inconvenientes de la hidrogenación han motivado que en los últimos años se busquen nuevas grasas alimentarias, que manteniendo la funcionalidad requerida para la industria, tengan a su vez los beneficios para la salud que no ofrecen las grasas hidrogenadas. Entre las posibles alternativas estaría incrementar el uso de aceites vegetales ricos en ácido palmítico (16:0) que tienen un alto grado de estabilidad y son semisólidos a temperatura ambiente. Estos aceites tienen como inconveniente las propiedades nutricionales adversas del ácido palmítico, ya que su ingesta incrementa el colesterol LDL (James, 1996). Una mejor alternativa sería el uso de aceites vegetales ricos en ácido oleico (18:1) y en ácido esteárico (18:0) que reúnen en un mismo aceite la estabilidad oxidativa y las propiedades beneficiosas para la salud que aporta el 18:1, y la mayor plasticidad que aporta el 18:0, teniendo este un efecto nulo sobre los niveles de colesterol en sangre (Purdy, 1986; Wardlaw y Snook, 1990; Ascherio y Willet, 1997).

En los últimos años y con el fin de buscar alternativas al uso de grasas hidrogenadas, se han desarrollado nuevas variedades vegetales que incrementan el contenido de estos ácidos grasos en el aceite de las semillas. Utilizando la variabilidad natural o generada por mutación, se han obtenido nuevas variedades vegetales con una composición modificada en el contenido de ácidos grasos. Así se han obtenido líneas alto esteárico de soja (*Glycine max* L.) (Graef *et al.*, 1985), alto oleico de colza (*Brassica napus* L.) (Auld *et al.*, 1992) o alto oleico de cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) (Norden *et al.*, 1987). También se han aplicado técnicas de biología molecular para modificar la composición de ácidos grasos del aceite. Knutzon *et al.* (1991) obtuvieron variedades transgénicas alto esteárico en colza mediante la incorporación de secuencias antisentido para el gen de la estearil-ACP desaturasa en su genoma. Liu *et al.* (2002) mediante silenciamiento génico también obtuvieron nuevas variedades transgénicas de

algodón (*Gossypium hirsutum*) con alto contenido en esteárico al silenciar el gen SAD, y con alto contenido en oleico al silenciar el gen de la oleil-PC ω 6-desaturasa. Así mismo, mediante el cruce de ambas líneas transgénicas, consiguieron segregantes F₂ alterados en ambas actividades que tenían un alto contenido en ácido esteárico y ácido oleico en su aceite.

En girasol mediante mejora clásica tras mutación inducida, se han obtenido nuevas líneas que tienen un alto contenido en ácido oleico (Soldatov, 1976; Fernández-Martínez *et al.*, 1993) así como otras con un mayor contenido de ácidos grasos saturados (Osorio *et al.*, 1995) en el aceite de las semillas (Tabla 3), sin que dicho carácter se manifieste en la composición de ácidos grasos de otros tejidos de las plantas (Álvarez-Ortega *et al.*, 1997).

Tabla 3. Composición de ácidos grasos del aceite de semilla de las líneas control (RHA-274), control alto-oleico (HAOL-9) y mutantes (CAS-5, CAS-12, CAS-3, CAS-4 y CAS-8). SD < 2,5 % del valor medio; ^{-a} < 0,2 %.

| Línea | Composición de ácidos grasos (%) | | | | | | | | |
|---------|----------------------------------|---------------|------|-------------|-------------|-------|------|------|------|
| | 16:0 | 16:1 | 16:2 | 18:0 | 18:1 | 18:1A | 18:2 | 20:0 | 22:0 |
| RHA-274 | 6,4 | ^{-a} | - | 4,9 | 30,8 | - | 56,2 | 0,3 | 1,0 |
| HAOL-9 | 5,2 | - | - | 3,7 | 88,1 | - | 1,5 | 0,3 | 1,1 |
| CAS-5 | 30,2 | 4,3 | 1,5 | 4,2 | 4,0 | 4,0 | 50,1 | - | 1,2 |
| CAS-12 | 27,8 | 7,6 | - | 1,7 | 52,7 | 4,0 | 4,4 | 0,3 | 1,3 |
| 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 |

El análisis enzimático de los mutantes alto-esteárico, CAS-3, CAS-4 y CAS-8, reveló que el fenotipo resultaba de la combinación de dos efectos; por una parte una actividad SAD reducida y una acil-ACP tioesterasa mejorada sobre el esteárico (Cantisán *et al.*, 2000). En los mutantes alto-palmitico CAS-5 y CAS-12, el fenotipo mutante parecía deberse a la

combinación de una actividad FAS II reducida y una actividad tioesterasa mejorada sobre el palmitil-ACP. Como consecuencia de la acumulación intraplasmática de palmitil-ACP aparecen tres ácidos grasos nuevos, el palmitoleico (16:1 $\Delta 9$), el ascléptico (18:1 $\Delta 11$) y el palmitolinoleico (16:2 $\Delta 9 \Delta 12$). Estos tres ácidos grasos se sintetizan a partir del palmitil-ACP por la acción de la SAD, la SAD y la FAS II, y la SAD y la ODS, respectivamente (Martínez-Force *et al.*, 1999).

5.4. Herencia del carácter alto esteárico y alto oleico.

Para estudiar la herencia del carácter alto 18:0, el mutante de girasol CAS-3 se cruzó recíprocamente con la línea RDF-1-532, parental original a partir de la cual se obtuvo, y con la línea control HA-89 (Pérez-Vich *et al.*, 1999). El patrón de herencia del 18:0 en los cruces entre CAS-3 y RDF-1-532 se ajustaba al modelo de un solo locus, (denominado *Es1*) con dos alelos (*Es1*, *es1*), donde existía dominancia parcial del carácter bajo contenido en 18:0 sobre el carácter alto contenido en 18:0. Los patrones de segregación en los cruces CAS-3 x HA-89 indicaron la presencia de un segundo locus independiente (denominado *Es2*) con dos alelos (*Es2*, *es2*), que también mostraba dominancia parcial del carácter bajo sobre el alto contenido de 18:0 en el aceite. Los genotipos propuestos para cada una de las líneas usadas en el estudio genético fueron: CAS-3 = *es1es1 es2es2*, RDF-1-1532 = *Es1Es1 es2es2* y HA-89 = *Es1Es1 Es2Es2*. La relación entre estos genotipos y su contenido en 18:0, así como los patrones de segregación en los distintos cruces estudiados, indicaban que el locus *Es1* tenía un efecto mucho mayor sobre los niveles de 18:0 que el locus *Es2*, pero que ambos loci *Es* tenían efecto aditivo sobre el contenido final de 18:0 en el aceite. Aparentemente, la mutagénesis realizada sobre RDF-1-532 había causado la mutación de *Es1* a *es1*, pero el alelo *es2* ya estaba presente en la línea RDF-1-532 antes de que ésta fuera mutagenizada.

Los primeros estudios genéticos realizados sobre líneas alto 18:1 de girasol apuntaban a que un único gen parcialmente dominante (Fick, 1984) o dominante (Urie, 1984) designado como *Ol* (Fick, 1984) controlaba el carácter alto 18:1. Esta mutación *Ol* producía un incremento significativo de la concentración de 18:1 en el aceite y era esencial a la hora de producir fenotipos alto oleico en girasol. La mutación *Ol* segregaba como un único gen dominante en las poblaciones F_2 , en las cuales la progenie se podía asignar inequívocamente a la clase dominante ($Ol_$, fenotipo alto 18:1) o la clase recesiva ($olol$, bajo 18:1) (Fick, 1984; Urie, 1984). Fernández-Martínez *et al.* (1989), identificaron dos genes adicionales dominantes y complementarios de *Ol*, que controlaban también el carácter alto 18:1. Los tres genes se denominaron Ol_1 , Ol_2 y Ol_3 . Aquellos fenotipos con alto contenido de 18:1 en el aceite acarreaban tres alelos dominantes (genotipo $Ol_1_ Ol_2_ Ol_3_$), mientras que dos alelos dominantes Ol_1 y Ol_2 con el tercer gen en homocigosis recesiva (genotipo $Ol_1_ Ol_2_ ol_3ol_3$) expresaban niveles intermedios de 18:1.

5.5. Control genético del carácter alto esteárico y alto oleico.

De los datos disponibles en la bibliografía más reciente es posible especular acerca de la función que los distintos loci Es_1 , Es_2 y Ol tienen dentro de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos en semillas de girasol. La cantidad de 18:0 disponible para ser incorporado a los lípidos de reserva de las semillas es probable que esté controlada por la regulación combinada de las siguientes enzimas de la ruta biosintética de ácidos grasos: β -cetoacil-ACP sintasa II (KAS II), estearil-ACP desaturasa (SAD), acil-ACP tioesterasas (TE) y acil-ACP aciltransferasa, ya que todas ellas usan 18:0-ACP como sustrato (Harwood, 1996). La caracterización bioquímica del mutante alto esteárico CAS-3, indicó que dos actividades enzimáticas estaban implicadas en la determinación del fenotipo mutante, la estearil-ACP

desaturasa y la acil-ACP tioesterasa (Cantisán *et al.*, 2000). Las TE en plantas se han clasificado en dos grupos de acuerdo a su especificidad por sustrato: FatA y FatB (Jones *et al.*, 1995) y Cantisán *et al.* (2000) sugirieron que la TE alterada en el mutante CAS-3 podía ser del tipo FatB, TE con mayor afinidad por acil-ACP saturados que FatA.

La cantidad final de 18:1 almacenado en la semilla podría estar afectada por una regulación alterada de la enzima oleil-fosfatidilcolina desaturasa (OLD), la cual desatura oleato a linoleato, aunque también de algunas de las enzimas que canalizan el tránsito de oleato desde el plastidio hacia la fosfatidil colina (Stymne y Stobart, 1987). Líneas de girasol alto 18:1 presentan niveles reducidos de actividad OLD (Garcés y Mancha, 1989) así como bajos niveles de ARNm del gen OLD (Kabbaj *et al.* 1996; Hogtrakul *et al.* 1998; Martínez-Rivas *et al.* 1998; Lacombe y Bervillé, 2000). Sin embargo, las regiones codificantes del gen OLD7 son idénticas tanto en líneas de girasol alto y bajo 18:1 (Hongtrakul *et al.* 1998), lo que apunta a que la mutación *Ol* presente en las líneas alto 18:1 descansa en alguna secuencia reguladora del gen.

Mediante análisis de QTLs, genes candidatos y la construcción de mapas de ligamiento a partir del uso de marcadores para RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción), Pérez-Vich *et al.* (2002) encontraron que un locus de la 18:0-ACP desaturasa (SAD17A) localizado en el LG1 y un locus de la oleil-PC desaturasa (OLD7) localizado en el LG14, cosegregaban con los genes *Es1* y *Ol*. Sin embargo, no encontraron asociación alguna entre un locus polimórfico de la tioesterasa FatB y el contenido final de 18:0 en el aceite. Con el fin de asignar una función génica al locus *Es2*, Pérez-Vich *et al.*, (2004a) realizaron un análisis QTL de poblaciones segregantes derivadas de la línea de girasol medio esteárico CAS-20 (genotipo *Es1Es1 es2es2*) obtenida a partir del mutante CAS-3 (Pérez-Vich *et al.*, 2004b). Para este análisis RFLP, utilizaron marcadores para los dos tipos

de TEs: FatA y FatB. Concluyeron que a pesar de que las evidencias bioquímicas de Cantisán *et al.*, (2000) apuntaban a que las TEs estaban implicadas en el fenotipo alto esteárico del mutante CAS-3, y que ambas se expresan durante el desarrollo de las semillas (Martínez-Force *et al.* 2000), ninguno de los loci polimórficos mapeados en ese estudio tenía un efecto significativo sobre el contenido de 18:0. A pesar de lo cual los mismos autores indicaban que los genes FatA y FatB no deberían descartarse como potenciales candidatos del fenotipo alto 18:0 en el mutante CAS-3, ya que el análisis RFLP había proporcionado también fragmentos de restricción monomórficos para el gen FatB. Estos fragmentos podrían formar parte de otros loci FatB duplicados dentro del genoma de girasol, uno de los cuales podría ser el locus mutado en CAS-3. Del mismo modo los fragmento polimórficos detectados para el gen FatA, no necesariamente deben ser los únicos ya que podrían aparecer otros más si las hibridaciones se hubieran realizado en otras condiciones de ensayo (Pérez-Vich *et al.* 2004b).

Pérez-Vich *et al.* (2000) estudiaron las relaciones genéticas entre los caracteres alto 18:0 y 18:1 en girasol, mediante cruces entre variedades mutantes alto esteárico, CAS-3 (Osorio *et al.*, 1995) y mutantes de girasol alto oleico HAOL-9 (Fernández-Martínez *et al.*, 1993). Los patrones de segregación para 18:0 y 18:1 obtenidos se ajustaban a los descritos con anterioridad cuando ambos ácidos grasos se estudiaban independientemente. Sin embargo, en la segregación combinada F₂ no se recuperaban las semillas recombinantes alto 18:0/alto 18:1. Además, el análisis de la generación F₃ de esos mismos cruces reveló que aquellas semillas F₂ que tenían las mayores concentraciones de 18:0 en fondo alto 18:1, seguían segregando tanto para 18:0 como para 18:1, lo que los autores explicaron como la existencia de un ligamiento génico entre los alelos *Es2* y *Ol* (Pérez-Vich *et al.*, 2000). A pesar de lo cual, Pérez-Vich *et al.* (2002) no encontraron evidencias directa sobre el ligamiento existente entre ambos alelos cuando realizaron un análisis de QTLs de los mismos cruces,

pero Pérez-Vich *et al.* (2004b) mapearon el locus de la Fata en el LG1 de genoma de girasol a 36,8 cM del locus ODS, y tan solo a 11,4 cM del locus de la SAD. Todo lo cual indica que la herencia del carácter alto 18:0 en girasol es más compleja de lo que en un principio se pensó.

Con la finalidad de obtener elevados niveles de esteárico en fondos alto oleico, Pérez-Vich *et al.* (2000) propusieron diversas alternativas: (i) el uso de aproximaciones bioquímicas y moleculares que suministraran más información sobre la naturaleza de las relaciones existentes entre los caracteres alto esteárico y alto oleico. (ii) el análisis de un mayor número de poblaciones segregantes, lo que incrementaría la probabilidad de recuperar el recombinante alto esteárico/alto oleico, o (iii) la utilización de otros fondos alto oleico distintos de HAOL-9, que contribuyeran a superar las limitaciones impuestas por el ligamiento Es2-O1₁ detectado en su investigación.

II. Materiales y Métodos.

1. MATERIAL VEGETAL, CONDICIONES DE CULTIVO Y CRUCES.

1.1. Material vegetal.

Durante el desarrollo de esta tesis se han empleado diferentes plantas de girasol (*Helianthus annuus* L.), procedentes tanto de líneas control como de líneas mutantes.

Las líneas control con fenotipo normal utilizadas tenían una composición estándar de ácidos grasos, y fueron RHA-274 y CAS-6. Como línea control con fenotipo alto-oleico se utilizó HAOL-9 (Fernández-Martínez *et al.*, 1993) derivada en última instancia de una línea original Pervenets, que fue la primera línea mutante alto-oleico que se obtuvo (Soldatov, 1976).

Las líneas mutantes alto saturado que se utilizaron durante el transcurso de esta tesis fueron: (i) CAS-3, línea mutante con elevado contenido en ácido esteárico en el aceite (26%) en comparación con el valor normal (4%) de líneas control (Osorio *et al.*, 1995), y (ii) CAS-5, línea mutante con elevado contenido en ácido palmítico, 25% respecto al 6% de las líneas con contenido estándar (Osorio *et al.*, 1995) (ver Tabla 3. Introducción).

1.2. Condiciones de cultivo.

Las semillas de girasol, tanto semillas enteras como $\frac{1}{2}$ semillas, se ponían a germinar en placas de Petri con perlita expandida, donde permanecían en oscuridad durante tres días a 25°C para facilitar la germinación. Posteriormente, se pasaban a cámaras de germinación a una temperatura de 25/15°C (día/noche) con un fotoperiodo de 16 h y una intensidad de luz de $300 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, en las que se suministraba riego por goteo. Pasados 15 días, las plántulas se pasaban a las cámaras de cultivo donde crecían normalmente a una temperatura de 25/15°C (día/noche) con un fotoperiodo de 16 h y una intensidad de luz de $300 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. El riego se

realizaba de forma automática con una frecuencia de dos riegos diarios de 2-3 minutos. El abonado se llevó a cabo con abono líquido una vez a la semana.

1.3. Cruces.

Para realizar los cruces se usaron las líneas alto oleico seleccionadas como donadoras de polen y la línea mutante CAS-3 como receptora de polen, ya que de esta manera debido a la dominancia de los genes que controlan el carácter alto oleico (Pérez-Vich *et al.*, 2000) si se producía la fecundación por polen de alto oleico, la semilla F_1 tendría carácter alto oleico y no alto esteárico como la planta madre.

Las plantas alto oleico se pusieron a germinar con dos semanas de antelación respecto a las plantas CAS-3 para que su floración estuviera completada antes de que las receptoras de polen abrieran las primeras flores liguladas. Se recogía el polen de las plantas alto oleico por las tardes y se guardaba a -80°C en tubos con gel de sílica. El día que las plantas receptoras abrían las primeras flores liguladas, se pasaban a condiciones constantes de luz ($300 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$), para evitar de esta manera que produjeran polen. A partir de ese día, cada mañana se pulverizaba agua sobre los capítulos de las plantas receptoras CAS-3 para inutilizar por ósmosis aquel polen que pudiera haberse producido. Una vez que las plantas receptoras tuvieron abiertos los tres primeros arcos de flores, por las tardes se frotaba sobre el capítulo el polen recogido de la planta alto oleico, previamente atemperado. Este proceso se repetía diariamente hasta que se completaba la apertura de todas las flores del capítulo receptor.

Las semillas producidas sobre los capítulos de las plantas CAS-3 se analizaban para determinar la composición de ácidos grasos, y solo aquellas $\frac{1}{2}$ semillas con carácter alto oleico se pusieron a germinar. Tras 15 días, aproximadamente, y cuando las plántulas tenían 3-4 hojas verdaderas se transplantaron a invernadero donde crecían hasta floración. Un día

antes del inicio de la floración, las cabezas de las plantas se cubrían para evitar la contaminación con polen externo y una vez que las plantas alcanzaron la madurez fisiológica se recolectaban individualmente, separando las semillas de cada capítulo para su posterior análisis.

2. METODOLOGÍA GENERAL PARA EL ANÁLISIS DE LÍPIDOS.

2.1. Extracción de lípidos totales.

Los lípidos totales se extrajeron por homogenización de los embriones en hexano/isopropanol (3:2, v/v), adición de solución acuosa de sulfato sódico 6,7% para generar la separación de fase y re-extracción de la fase acuosa y residuos insolubles con hexano/isopropanol (7:2, v/v) como fue descrito por Hara y Radin (1978). Este proceso se llevó a cabo en tubos de cristal (100 x 13 mm) utilizando una varilla de vidrio y arena de mar lavada para facilitar la homogenización del tejido. Para separar la fase orgánica de la acuosa se centrifugaban los tubos 5 minutos a 2000 rpm y se recuperaba la fase orgánica superior que se pasaba a otro tubo y se evaporaba el disolvente bajo corriente de nitrógeno, para luego resuspenderse en un volumen conocido de hexano/isopropanol (7:2, v/v).

2.2. Separación de lípidos.

Una vez extraídos los lípidos se procedía a separar sus diferentes componentes mediante cromatografía en capa fina, utilizando como soporte o fase fija placas de sílice y como fase móvil disolventes orgánicos mezclados en diferentes proporciones según la polaridad requerida para separar los lípidos.

2.2.1. Separación de lípidos neutros.

Los lípidos neutros se separaban por cromatografía en placa fina (TLC) sobre placas de sílice 20 x 20 cm y 0,25 mm de grosor (Silica gel 60.Merck, Darmstadt, Germany) desarrolladas con hexano/éter etílico/ácido fórmico (75:25:1; v/v/v) (Christie, 1982). Para ello, una vez extraídos los lípidos totales de las semillas, se resuspendían en 100 μ l de hexano/isopropanol (7:2, v/v), se cargaba la mitad del volumen en la parte inferior de la placa y se introducía la placa en el interior de una cubeta con el líquido de desarrollo. Para detectar la posición de los distintos componentes tras el desarrollo, las placas se cubrían parcialmente por un cristal y se exponían a vapores de yodo (Figura 8).

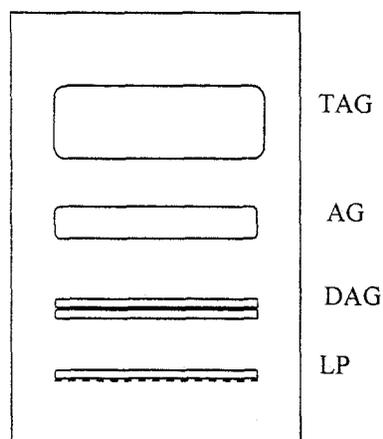


Figura 8. Distribución de los distintos lípidos en una placa desarrollada con hexano/éter dietílico/fórmico (75:25:1 v/v/v).

Los lípidos se separaban desde el origen en el siguiente orden: fosfolípidos (LP), que no ascendían sobre la placa al ser polar, diacilglicéridos (DAG), que al tener un grupo hidroxilo libre le confieren cierta polaridad, ácidos grasos libres (AG) debido a la polaridad del grupo carboxilo y por último los triglicéridos (TAG), que es la fracción más apolar y por tanto la que menos se retiene en la sílice. Las bandas correspondientes a los lípidos que interesaban en cada caso se raspaban con una espátula y se eluían de la sílice con 3 ml de éter etílico en el caso de TAG y con 3 ml de cloroformo/metanol (2:1, v/v) en el caso de los

fosfolípidos.

2.3. Formación de ésteres metílicos de los ácidos grasos.

Para analizar la composición de ácidos grasos de los lípidos, se deben formar sus correspondientes ésteres metílicos (EM). En el caso de EM de medias semillas maduras o de cotiledones individuales, se formaban en un solo paso usando el método desarrollado por Garcés y Mancha (1993). Para lo cual, se cortaba un trozo de aproximadamente 1/3 del tamaño de la semilla madura o cotiledón por el extremo opuesto a la gémula y se pasaba a un vial de vidrio de 2 ml. A este trozo se le añadían 0,9 ml de la mezcla metanol/ tolueno/ DMP/ H₂SO₄ (33:14:2:1, v/v/v/v) y 0,9 ml de heptano. Se tapaba con un cierre hermético y se dejaba durante 1 hora a 80°C. Al enfriarse el vial se formaban dos fases, siendo la superior donde se encontraban los EM. El resto de la semilla madura o de la plántula en germinación se conservaba hasta conocer su composición de ácidos grasos. Es entonces cuando se decidía si interesaba o no obtener la siguiente generación a partir de la ½ semilla restante o de la plántula que estaba en germinación.

Si se querían obtener los EM a partir de la sílice raspada de una placa TLC, esta se pasaba a un tubo de cristal y se calentaba junto con 3 ml de metanol/tolueno/H₂SO₄ (88:10:2 v/v/v) en un baño a 80°C durante 1 h. Una vez enfriada se le añadía 1 ml de heptano y 1 ml de solución acuosa de sulfato sódico al 6,7 %. Se agitaba vigorosamente y se centrifugaba 5 minutos a 2000 rpm. Se recuperaba la fase superior donde se encontraban los EM y se pasaba a otro tubo donde se evapora el disolvente bajo corriente de nitrógeno y se resuspendía en un pequeño volumen conocido de heptano.

2.4. Separación y cuantificación de los ésteres metílicos.

2.4.1. Cromatografía gaseosa.

Los ésteres metílicos se separaban y cuantificaban mediante cromatografía gas-líquido con un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890, con una columna capilar SP-2380 (30 m de longitud, 0,25 mm de luz interna y 0,2 μm de grosor de fase) de sílice fundida (Supelco, Bellefonte, PA, USA). El gas portador era hidrógeno y la velocidad del gas de 28 cm/seg. La temperatura del detector era de 240°C, la del inyector 220°C, y la temperatura inicial del horno de 160°C, alcanzando la temperatura final de 176°C en un tiempo total de 8 minutos. Los picos correspondientes a los ácidos grasos se identificaron por comparación con patrones conocidos (Sigma).

2.4.2. Cromatografía en capa fina.

Los ésteres metílicos marcados radiactivamente se separaban mediante TLC de fase inversa sobre placas de sílice impregnadas en solución de aceite de vaselina (Panreac. Barcelona. Spain.) 2,5% en hexano, desarrolladas con una solución acetonitrilo:hexano (90:10, v/v). Utilizando este tipo de cromatografía, los ésteres metílicos tanto de ácido palmítico (16:0) como de ácido oleico (18:1) migran a la misma posición. Para separarlos se raspaban de la placa y la sílice se transfería a una columna de plástico de 5 ml, de las que se eluían añadiendo 3 ml de eter dietílico. La mezcla de ésteres metílicos se cargaba sobre placas de sílice impregnadas en solución de AgNO_3 al 10% en acetonitrilo que se desarrollaban con una solución hexano/eter (85:15; v/v).

Los distintos lípidos y ácidos grasos radiactivos se localizaron y cuantificaron mediante un detector lineal de radiaciones Instant Imager (Packard Instrument Co., Meriden, CT), gracias al desarrollo conjunto con patrones conocidos. La identificación de los ácidos

grasos de cadena muy larga (AGML; ácido araquídico, 20:0; ácido behénico, 22:0; y ácido lignocérico, 24:0) se realizó mediante el análisis de los EM aislados de la placa de vaselina mediante espectrometría de masa GLC de sus esteres picolínicos, usando ionización de impacto electrónica a 70 eV (Christie, 1987).

3. INCUBACIONES DE SEMILLAS EN DESARROLLO CON [14C]ACETATO.

3.1. Condiciones de incubación.

Las semillas utilizadas para los ensayos de marcaje de lípidos se recogían siempre a la misma hora del día y de los 2 arcos externos del capitulo. Las semillas, tras ser despojadas de la cutícula y tegumento y registrar su peso fresco, se cortaban en tres secciones transversales de igual tamaño, de manera de formasen 6 trozos de tejido, y se colocaban en tubos de vidrio de 10 ml. Un ensayo estándar, modificación del método de Singh *et al.* (1986), contenía 300 µl de buffer MES (2-N-morfolino etanolsulfónico, sal sódica) 50 mM pH 6,0 (Sigma-Aldrich. Steinheim, Germany) y 200 µl de solución de [2-14C]acetato (actividad específica 2,11 GBq/mmol, Amersham Pharmacia. Buckinghamshire, UK.) 0,75 mM en buffer MES. Los tubos se incubaban en baño con agitación suave a 20°C durante 4 horas. La reacción se detenía pasando los tubos a un baño a 80°C durante 10 minutos, tras lo cual se retiraba del tubo el medio de incubación y se lavaban las muestras 3 veces con 5 ml de agua para eliminar todo el [2-14C]-acetato que pudiera estar adherido al tejido.

3.2. Utilización de inhibidores.

El metil viológeno (Sigma-Aldrich. Steinheim, Germany) se diluía en el mismo tampón MES 50 mM, pH 6,0. De esta solución se añadía a la mezcla radiactiva el volumen

necesario para alcanzar la concentración final indicada en el texto. La cerulenina (2,3-Epoxy-4-oxo-7,10-dodecadienamida, de *C. caerulens*, 95%, Sigma-Aldrich. Steinheim, Germany) se resuspendía en etanol. De esta solución se añadía a la mezcla radiactiva el volumen necesario para alcanzar la concentración final indicada en el texto. Ambos inhibidores se añadían siempre inmediatamente antes del [2-¹⁴C]acetato, tiempo cero de cada ensayo.

4. PREPARACIÓN Y PROPIEDADES DE LOS PLASTIDIOS.

4.1. Consideraciones previas.

Para conseguir una buena preparación de plastidios es necesario: (i) que los plastidios aislados se recuperen lo más intactos posibles, (ii) que estén libres de contaminantes procedentes de otros orgánulos o del citosol, (iii) que puedan ser cuantificados y, además, (iv) que sean metabólicamente funcionales. A lo largo de los últimos 25 años, han sido múltiples los métodos desarrollados para aislar plastidios de multitud de tejidos vegetales. Para el desarrollo de esta tesis el método que utilizamos se basó en el desarrollado por Kang y Rawsthorne (1994) para la obtención de plastidios de embriones de colza en desarrollo.

4.2. Aislamiento de plastidios.

Para la obtención de unas buenas preparaciones de plastidios, todas las soluciones empleadas han de prepararse el mismo día de la obtención de plastidios y mantenerse en todo momento a 4°C. Del mismo modo, las preparaciones de plastidios obtenidas deben utilizarse en las 2 horas siguientes a su obtención y no son funcionales si una vez obtenidas se las almacena a -20°C o a -80°C.

Previamente a la recogida de semillas se preparaban 50 ml de medio de aislamiento de plastidios dos veces concentrado (PIM 2X). Para ello a una solución concentrada que contenía

40 mM Hepes/NaOH (pH 7,4), 1 M Sorbitol, 20 mM KCl, 2 mM MgCl₂ y 2 mM EDTA, se le añadían 1 g de BSA y 0,0711 g DTT. A diferencia del protocolo inicial descrito por Kang y Rawsthorne (1994), no se le añadía etanodiol al medio PIM2X. Esa solución se diluía con agua destilada para obtener dos soluciones de 50 ml PIM 1X.

Se recogían 50 semillas de los arcos externos del capítulo a las que se les despojaba de la testa y cutícula, y se registraba el peso fresco. A continuación, ayudado de dos hojas de cuchilla de afeitar y sobre una placa de Petri de 55 mm diámetro conteniendo 10 ml de PIM 1X, se troceaban los embriones hasta obtener una mezcla lo más homogénea posible. El extracto se filtraba a través de dos capas de Miracloth (Calbiochem, La Jolla, CA). El residuo que quedaba sobre el Miracloth se homogenizaba de nuevo usando esta vez 7 ml de PIM 1X y se volvía a filtrar. Este proceso se volvía a repetir una vez más, y los filtrados se combinaban hasta obtener un homogenizado inicial (OH) de 25-30 ml. De este homogenizado original se guardaba 1 ml en hielo para análisis enzimáticos posteriores. El resto se centrifugaba a 4°C 750 g durante 5 minutos. De este sobrenadante (SP) se guardaba 1 ml en hielo y se eliminaba el resto. El pellet se resuspendía entonces en 1 ml de PIM 1X usando para ello una punta de 1 ml cortada para dar lugar a la fracción cruda de plastidios (P₁). Si se quería hacer algún tipo de análisis enzimático a P₁, se guardaba una alícuota en hielo. Si no era necesario, P₁ se mezclaba de nuevo con 25 ml de PIM 1X y se volvía a centrifugar a 4°C 750 g durante 5 minutos. Se eliminaba el sobrenadante y el segundo pellet se resuspendía de la misma manera en 1,5-2 ml de PIM 1X, obteniéndose la fracción lavada de plastidios (P₂).

4.3. Verificación de la pureza durante la extracción.

Durante el proceso de aislamiento de plastidios se ensayaban dos actividades enzimáticas: un marcador citosólico que nos servía para saber si acarreábamos contaminación

por restos del citosol, y un marcador plastidial, para verificar que nuestras preparaciones eran en realidad plastidios.

Estudiando la actividad enzimática de un marcador plastidial en la fracción del plastidios y comparándola con la actividad de ese mismo marcador en el material inicial, se obtiene una medida denominada *recuperación*. La recuperación de una actividad plastidial es reflejo de la cantidad de plastidios presentes en dicha preparación. Además, la recuperación de la actividad de un marcador enzimático presente en el citosol podía usarse para estimar la contaminación de la preparación de plastidios por fracciones de citosol.

4.3.1. Marcadores.

Como marcador citosólico se utilizaba el enzima fosfofructoquinasa dependiente de pirofosfato (FFK-PPi) que medimos siguiendo el protocolo propuesto por Denyer y Smith (1988), con modificaciones.

- **FFK-PPi:** Extracto (20 μ l), Tris pH 8,0 100 mM, $MgCl_2$ 2 mM, NADH 0,1 mM, Fructosa-2,6-bisfosfato 2 μ M, $Na_4P_2O_7$ 0,2 mM, 1 unidad de aldolasa, 10 unidades de triosa fosfato isomerasa y 1,3 unidades de glicerol-3-fosfato isomerasa. Se determinó midiendo el consumo de NADH a 340 nm tras la adición de 25 μ l de fructosa-6-fosfato 200 mM.

Como marcador plastidial utilizamos el enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenada dependiente de NADPH (GAPdH-NADPH) que medimos según el protocolo propuesto por Denyer y Smith (1988), con modificaciones. Para ello se preparaba en primer lugar una mezcla de reacción que contenía: 55 mM MOPS/NaOH (pH 7,8), 10 mM $MgCl_2$, 4,5 mM ATP, 0,18 mM NADPH y 22,5 unidades de 3-fosfogliceroquinasa. Debido a que la enzima a medir era intraplastidial, antes de medir actividad era necesario disgregar todas las membranas, para lo cual se procedía de la siguiente manera: se añadía Triton-X-100 al

extracto a una concentración final del 0,1% (v/v), se agitaba la muestra vigorosamente y se introducía dentro de nitrógeno líquido durante 5 minutos. Se volvía a agitar de nuevo la muestra y se utilizaba directamente para medir la actividad.

- **GAPdH-NADPH:** Pasar a una cubeta de espectrofotometría 880 μ l de la mezcla de reacción, añadir 20 μ l del extracto y medir absorbancia a 340 nm, iniciando la reacción con la adición de 50 μ l de solución de ácido 3-fosfoglicérico 100 mM.

4.3.2. Verificación de la integridad. Latencia.

La integridad de la preparación de plastidios se midió comparando la actividad enolasa de las preparaciones de plastidios antes y después de disolver las membranas con Triton-X-100 (Smith *et al.*, 1992). Para lo cual se preparaba la siguiente mezcla de reacción: Tampón TES (pH 7,5) 50 mM, 0,5 M de sorbitol, 10 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM NADH, 1 Mm ADP y 2 unidades piruvato quinasa y 2 unidades de lactato deshidrogenada. Se añadían 530 μ l de esta mezcla de reacción en 2 cubetas, a cada una se le añadían 50 μ l de la preparación de plastidios. A una de ellas se le añadía 10 μ l de Triton-X-100 y se agitaba. A continuación se medía la absorbancia a 340 nm y se iniciaba la reacción añadiendo 20 μ l de ácido 2-fosfoglicérico (volumen final 600 μ l).

5. INCORPORACIÓN DE ^{14}C DESDE SUSTRATOS MARCADOS AL INTERIOR DE LOS PLASTIDIOS.

Cada reacción, con independencia del destino final del sustrato radiactivo donde se quisiera analizar su destino, contenía medio de aislamiento de plastidios (PIM), cofactores y el sustrato marcado radiactivamente. A continuación se indicará la composición de la mezcla

de reacción y en cada sección de resultados del Bloque III se indicará el substrato radiactivo utilizado.

5.1. Mezcla de reacción.

Una mezcla de reacción tipo (165 μ l) contenía por ensayo: PIM 1X, 6 mM $MgCl_2$, 4 mM ATP, 10 mM $NaHCO_3$, 0,5 mM NAD, 0,2 mM Coenzima A (CoA), 0,2 mM tiamina pirofosfato (TPP), 15 μ l de solución 1-3 mM del metabolito ^{14}C -marcado y 25 μ l de fracción lavada de plastidios (P_2).

5.2. Incorporación de ^{14}C dentro de los ácidos grasos.

Para medir la incorporación de ^{14}C dentro de la fracción de ácidos grasos se siguió el método descrito por Kang y Rawsthorne (1994), con ligeras modificaciones. La reacción se llevó a cabo dentro de tubos eppendorf de 2 ml y se inició con la adición de la fracción lavada de plastidios a la mezcla de reacción. Tras 60 minutos a 25°C y en agitación suave, se paró la reacción mediante la adición de 66,6 μ l de solución 4M NaOH en metanol. Después de saponificar las muestras durante 1 hora a 80°C, se extraía la fase orgánica añadiendo a cada tubo 33,3 μ l de 12M HCl, 200 μ l de solución NaCl saturada y 500 μ l de iso-hexano. Después de agitar vigorosamente la muestra y centrifugar 30 segundos a 10.000 rpm, se recuperaba la fase orgánica superior y se secaba bajo corriente de nitrógeno. La fase orgánica se resuspendía en una solución de ácido oleico 1 mg/ml en hexano y sus componentes se separaban mediante cromatografía en capa fina (TLC) sobre placas de sílice G (Analtech, Luton, UK) usando como líquido de desarrollo hexano/dietileter/ácido acético (v:v:v, 70:30:1) (Mudd y Dezacks, 1981). Los ácidos grasos se localizaban mediante vapores de yodo, se raspaban de la placa y se les determinaba la radiactividad mediante contador líquido de centelleo.

5.3. Incorporación simultánea de ^{14}C en almidón y liberación de $^{14}\text{CO}_2$.

La incorporación de ^{14}C desde [^{14}C]Glucosa-6-fosfato a la fracción de almidón (material insoluble en metanol/KCl) y la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ vía la ruta oxidativa de las pentosas fosfato (OPPP), se midió simultáneamente de acuerdo al método de Kang y Rawsthorne (1996). La reacción se llevaba a cabo en un tubo abierto de microcentrífuga de 0,4 ml (Thermo Life Science LTD. UK) que contenía la mezcla de reacción, tubo que se depositaba dentro de un vial de centelleo de 5 ml con 0,1 ml de solución acuosa KOH 15 % (w/v) en su interior. Una vez que se iniciaba la reacción, los viales se sellaban inmediatamente con tapones de goma (Stopper, Suba-seal, rubber. 12,5 mm diameter. Philip Harris Scientific. UK). La reacción se paraba con la inyección de 0,5 ml de ácido fórmico 6M dentro de la mezcla de reacción y se dejaban los tubos sellados durante 12 horas. La solución de KOH actuaba como una trampa para el $^{14}\text{CO}_2$ liberado durante la reacción, que se medía mezclando los 0,1 ml de KOH con 0,3 ml de agua y se determinaba la radiactividad incorporada mediante contador líquido de centelleo. La incorporación de ^{14}C en almidón se determinó de acuerdo con el método de Hill y Smith (1991), con modificaciones. Para ello el mismo tubo de centelleo se centrifugaba a 1.600 g durante 5 minutos, se eliminaba el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 0,3 ml de agua más 3 ml de solución metanol en agua 75% (v/v) / KCl 1% (w/v). Este paso se repitió al menos cuatro veces, tras lo cual se resuspendía el pellet insoluble en metanol/KCl en 0,3 ml de agua y se determinaba el contenido en ^{14}C gracias a un contador líquido de centelleo.

6. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS Y PRODUCTOS DE RESERVA.

6.1. Preparación de extracto total de semillas.

Para determinar actividades enzimáticas y referirlas a embriones completos, se preparaban los extractos totales de la siguiente manera. Se homogenizaban 3 semillas, sin cutícula ni tegumento (150-200 mg peso fresco) en 1 ml de PIM 1X a 4°C en un homogenizador de cristal. El extracto obtenido se centrifugaba a 16.000 g durante 20 minutos a 4°C y se guardaba el sobrenadante en hielo para usarlo en los ensayos de actividad en las 2 horas siguientes a su obtención.

6.2. Determinación del contenido de metabolitos en embriones enteros.

6.2.1. Extracción de metabolitos.

Los metabolitos se extrajeron de acuerdo al método de Jelitto *et al.* (1992). Para ello se molían 20 embriones en nitrógeno líquido sobre un mortero previamente enfriado. Cuando se obtenía un fino polvo, se añadía al mortero 1500 µl (en dos veces) de tricloroacético (TCA) al 16% (p/v) en éter dietílico. Después de 15 minutos a -80°C se añadía al mortero 800 µl de solución acuosa de TCA al 16% (p/v). Una vez descongelada, la mezcla se pasaba a un tubo Eppendorf de 2 ml y se centrifugaba a 13.000 rpm 5 minutos a 4°C. La fase acuosa inferior se trasvasaba a un nuevo tubo Eppendorf de 2 ml y se lavaba al menos 4 veces con 400 µl de éter saturado con agua. La fase acuosa se neutralizaba con 10-15 µl de solución 5M KOH/1M trietanolamina, verificando el pH gracias a varillas indicadores de pH (Neutralit® pH 5-10. Merck. Darmstadt, Germany). Una vez neutralizado, se centrifugaba a 13.000 rpm durante 5 minutos a 4°C, y se utilizaba el sobrenadante directamente para medir metabolitos.

6.2.2. Determinación enzimática de metabolitos.

Las cantidad de metabolitos presente en cada extracto se midió enzimáticamente siguiendo los métodos descritos por Stitt *et al.* (1989). Los ensayos se llevaban a cabo a 25°C en un volumen final de 1 ml y se iniciaban con la adición del enzima señalado al final de la mezcla de reacción. Se medía la absorbancia a 340 nm utilizando para ello un espectrofotómetro Ultrospec 3300 pro (Amersham Biosciences).

Glucosa-6-fosfato: Extracto (100 μ l), Hepes/NaOH 50mM pH 7,0, MgCl₂ 5 mM, NADP 0,6 mM y 2 unidades de Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

Malato: Extracto (100 μ l), Hepes/NaOH 50mM pH 7,0, MgCl₂ 5 mM, NAD 0,6 mM y 5 unidades de enzima málica dependiente de NAD.

Fosfoenolpiruvato (PEP): Extracto (100 μ l), Hepes/NaOH 50mM pH 7,0, MgCl₂ 15 mM, KCl 100 mM, NADH 0,15 mM, 1 mM de ADP, 10 unidades de lactato deshidrogenada y 5 unidades de piruvato quinasa.

Piruvato: Extracto (100 μ l), Hepes/NaOH 50mM pH 7,0, MgCl₂ 5 mM, NADH 0,18 mM, 2,5 mM de ADP y 6 unidades de lactato deshidrogenada.

Acetato: Extracto (100 μ l), Hepes/NaOH 50mM pH 7,0, 5 mM de malato, 5 mM de ATP, 0,1 mM de CoA, 0,6 mM de NAD, 10 unidades de malato deshidrogenada, 1 unidad de Acetil-CoA sintetasa y 1 unidad de citrato sintetasa.

6.3. Determinación del contenido de almidón en semillas.

El almidón de embriones de girasol en desarrollo se extrajo siguiendo el método de Denyer *et al.* (1995), con ligeras modificaciones. Se homogenizaban 5 embriones de girasol en 1 ml de etanol 80% usando un homogenizador de cristal. A continuación se añadían 4 ml más de etanol 80% y se pasaba la mezcla a un tubo Falcon de 15 ml con tapón de rosca. Esta mezcla se calentaba 10 minutos en un baño a 90°C, y se centrifugaba a 1.600 g durante 10 minutos. Se eliminaba el sobrenadante y el pellet se resuspendía de nuevo en 5 ml de etanol al 80% y se volvía a centrifugar 10 minutos a 1.600 g. A continuación se resuspendía el pellet en 1 ml de acetato de sodio 70 mM pH 4,8 y se calentaba 1 y ½ horas a 90°C. Pasado ese tiempo se dejaba enfriar la muestra sobre hielo y se añadían al tubo 2 unidades de α -amilasa y 2 unidades de α -amiloglucosidasa. La mezcla se incubaba a 37°C durante 3 horas tras lo cual se centrifugaba 1 minuto a 1.600 g básicamente para precipitar las paredes celulares y se utilizaba el sobrenadante para medir la glucosa en solución. La cantidad de glucosa en el extracto se medía espectrofotométricamente utilizando el siguiente ensayo enzimático acoplado:

Una reacción tipo (900 μ l) contenía HEPES/KOH 50 mM pH 7,0, $MgCl_2$ 5 mM, NADP 0,9 mM, ATP 1,4 mM y 0,6 unidades de glucosa-6-fosfato deshidrogenada y 100 μ l del extracto. La reacción se iniciaba añadiendo 1 unidad de hexoquinasa y midiendo la producción de NADPH a 340 nm.

El almidón es básicamente un polímero de glucosa, por lo que los moles de glucosa medidos en el extracto se tradujeron a mg de de glucosa, equivalentes a mg de almidón, y los resultados se expresaron como mg almidón/semilla.

6.4. Determinación del contenido de aceite en semilla.

La determinación del contenido de aceite en semillas se realizó utilizando medidas directas e indirectas en función de la cantidad de muestra disponible.

6.4.1. Medidas directas.

El contenido de aceite de semilla se midió aplicando el método de Kochhar y Rossell (1987). Para lo cual se partía de 4 gramos de semilla homogenizada previamente en mortero y se extraía el aceite usando éter de petróleo en ebullición.

6.4.2. Medidas indirectas.

Para estimar el contenido de aceite en muestras de pocas semillas utilizamos el método propuesto por James y Dooner, (1990). Para lo cual las muestras (2-3 embriones) se secaban previamente durante 24 horas temperatura suave (60-70°C) tras lo cual se homogenizaban y metilaban durante 2 horas a 80°C en 1 ml de solución 1 N HCl en 100% de metanol. Los ésteres metílicos se extraían con 1,5 ml de una solución 0,9% (w/v) NaCl y 1 ml de hexano (conteniendo 0,1 mg/ml de 17:0 metil ester como patrón interno). El contenido de ácidos grasos se cuantificaba mediante cromatografía gaseosa y se estimaba la masa de aceite de la muestra a partir de la del patrón interno.

6.5. Determinación de proteínas.

La concentración de proteínas se midió de acuerdo al método de Bradford (1976). Para ello, se homogenizaban tres embriones en 1 ml de Hepes/NaOH 50 mM pH 7,4 utilizando un homogenizador de vidrio. La solución de proteínas (50 μ l de 1-10 μ g. ml⁻¹) se mezclaba con 950 μ l de solución Bradfor BIO-RAD:agua (v/v, 1:5). Entre 10 y 60 minutos después, se

medía la absorbancia de la muestra espectrofotométricamente a 595 nm. La concentración de proteínas se calculaba utilizando seroalbumina bovina (BSA) como estándar.

6.6. Contador líquido de centelleo.

Todas las muestras para contar se mezclaron con 3 ml de cóctel de centelleo (Ecoscint™ H.National Diagnostics. Hessle Hull.UK) en viales de centelleo de 5 ml. Las muestras se analizaron usando un contador líquido de centelleo Beckman Coulter LS 6500.

7. BIOLOGÍA MOLECULAR.

7.1. Extracción de mRNA de semillas.

Las extracciones de mRNA de semillas se realizaron utilizando el Kit Micro-FastTrack™ 2.0 (Invitrogen, UK), utilizando 0,1-0,2 g de semillas congeladas, a las que se les despojó de la cáscara y cutícula, para ser pulverizadas en mortero estéril con nitrógeno líquido. El mRNA se resuspendía en 50 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8,5. En caso de emplearse para la síntesis de cDNA, se resuspendía en 66 µl de agua destilada autoclavada.

7.2. Síntesis de la primera cadena de cDNA.

La síntesis de cDNA a partir del mRNA aislado, se realizó con el Kit T-Primed First-Strand (Amersham-Pharmacia Biotech, UK) siguiendo el protocolo propuesto por la marca.

7.3. Estimación de la concentración de ácidos nucleicos.

La concentración y pureza de los ácidos nucleicos se determinó midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Ultrospec 3300 pro (Pharmacia). La relación entre la absorbancia medida a 260 nm y a 280 nm (260/280), indicaba la pureza de

los ácidos nucleicos, mientras que la absorbancia medida a 260 nm permitía estimar la concentración de ácidos nucleicos presentes en la preparación.

Así, una relación 260/280 próxima a 1,8 indica que el DNA es puro, correspondiendo una unidad de absorbancia a 260 nm a una concentración de 50 µg/ml de DNA de doble cadena. Para el caso del RNA, la relación 260/280 debe aproximarse a 2, correspondiendo una unidad de absorbancia a 260 nm a una concentración de 40 µg/ml de RNA (Sambrook *et al.*, 1989).

7.4. Electroforesis de DNA.

Se llevó a cabo según Sambrook *et al.* (1989), utilizando geles de agarosa al 0,7-1,5%, preparados en tampón TAE (1X) (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH 8,0). El desarrollo de las electroforesis se llevó a cabo en ECPS 3000/150 suministrado por Pharmacia.

Cada muestra de cDNA se mezclaba con 1/10 de volumen de tampón de carga, azul de bromofenol al 0,25% (p/v), xileno-cianol FF al 0,25% (p/v) y glicerol al 30% (v/v) en agua. En el mismo gel y en otro carril se desarrollaba un marcador de tamaño GeneRuler TM 1Kb, suministrado por la casa Fermentas. Tras la electroforesis los geles se sumergían en una solución de bromuro de etidio en agua, y se analizaba la distribución de bandas en un transiluminador Vilber Lourmat, usando una cámara digital Kodak DC120 con filtro naranja para registrar la imagen.

7.5. Amplificación del DNA mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

7.5.1. Diseño de cebadores

El diseño se llevó a cabo siguiendo los siguientes requisitos:

- Longitud del cebador entre 20-25 pares de bases (pb).
- Contenido G+C mayor o igual al 50%.
- Temperatura de hibridación (T_m) igual o menor a 72°C.

$$T_m = 4x(G+C) + 2x(A+T)$$

- G o C en posición 3'.
- No formar estructuras secundarias.
- No hibridar entre ellos.

Para la obtención de la secuencia de *gpt* correspondiente al transportador de glucosa-6-fosfato de la membrana del plastidio de girasol (GPT) a partir de cDNA, se diseñaron cebadores degenerados a partir del alineamiento de regiones internas conservadas de aminoácidos de otras proteínas GPT de plantas, usando para ello el programa Clustal X v18: GPTF2 (5'-AAY GCN TWY CCN TWY CCN TGG-3', degenerado 2048 veces) y GPTR1 (5'-CKY TTC ATN GTR TTN CC-3', degenerado 128 veces) (Figura 9). Así se obtuvo un fragmento interno, a partir del cual se diseñaron cebadores específicos para amplificar hacia los extremos: GPTR1_{RACE}, GPTR2_{RACE} y GPTF_{ND}. Para amplificar el fragmento inicial del gen se diseñó como cebador externo el oligo NUP2, obtenido a partir de una modificación del oligo no degenerado UPM long del kit BD SMARTTM RACE y para amplificar el fragmento final del gen, se utilizó como cebador externo a FA2Z, obtenido a partir de la cola de poli adenina del extremo 5' del cDNA (Tabla 4). Para las degeneraciones se siguió el código siguiente: R: purinas (guanina o adenosina), Y: pirimidinas (timina o citosina), V: guanina, citosina o adenina y K: nucleótidos con grupo ceto (guanina o timina), S (guanina o citosina), W (adenina o timina) y H (adenina, citosina o timina). Todos los cebadores fueron sintetizados por Amersham Bioscience (Roosendaal, The Netherlands).

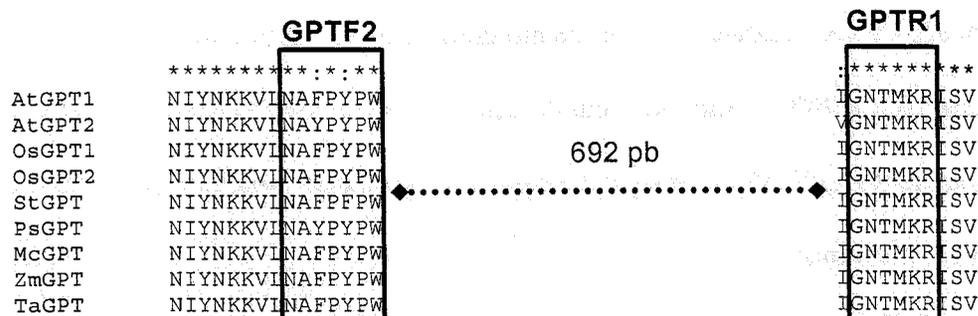


Figura 9. Alineamiento parcial de secuencias aminoacídicas de transportadores de glucosa-6-fosfato mediante el programa Clustal X v1.8. *Arabidopsis thaliana* GPT1 y GPT2 (AtGPT1, AtGPT2), *Oryza sativa* (OsGPT1 y OsGPT2), *Solanum tuberosum* (StGPT), *Pisum sativum* (PsGPT), *Mesembryanthemum crystallinum* (McGPT), *Zea mais* (ZmGPT) y *Triticum aestivum* (TaGPT). La línea sobre el alineamiento marca las posiciones conservadas. (*) Indica residuo conservado, (:) indica la presencia de aminoácidos del mismo grupo.

Tabla 4. Cebadores diseñados para la amplificación por PCR.

| Nombre | Secuencia (5'-3') | T _m (°C) |
|-----------------------|-------------------------|---------------------|
| GPTF2* | AAYGCNTWYCCNTWYCCNTGG | 59,8 |
| GPTR1* | CKYTTTCATNGTRTTNCC | 49,2 |
| GPTR1 _{RACE} | GTTGAAATTGAGTTCGGTAAG | 58,9 |
| GPTR2 _{RACE} | CGACGTTGGGAACGTTTC | 61,8 |
| NUP2 | ACTCACTATAGGGCAAGCAGTGG | 62,4 |
| GPTF _{ND} | TGCAATTGCGGTTGAAGG | 53,7 |
| Fa2Z | AACTGGAAGAATTCGCGG | 54,0 |

*IUB/GCG: R, A/G; Y, C/T; K, G/T; H, A/C/T; N, G/A/T/C.

7.5.2. Condiciones de amplificación.

Las reacciones de PCR tuvieron lugar en un termociclador Clinus Microcycler 96. Las condiciones dependieron de la T_m de los cebadores, así como de la longitud esperada de los fragmentos.

Para obtener *gpt* a partir de los cDNAs se preparaban 100 µl de reacción con 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada deoxinucleótido trifosfato,

5U de ECOTAQ DNA Polymerase (Hoffman-La Roche, New Jersey, USA), 100 pmol de cada cebador y el cDNA. El procedimiento era el siguiente: un paso inicial de desnaturalización a 96°C 5 min, un segundo paso con 35 ciclos con desnaturalización a 96°C 1 min, alineamiento a 47,5°C 1 min, extensión a 72°C 1 min, seguido de un último paso de extensión a 72°C 5 min.

Para la obtención de fragmentos a partir de cDNAs con oligos no específicos, se utilizó un kit de Optimización de Invitrogen que utiliza distintos tampones variando la concentración de MgCl₂ y el pH. El volumen de reacción es de 50 µl con 0,25 µg de cada cebador, 10 µl de tampón, 5U de polimerasa y el cDNA. El método consistía en un primer paso de desnaturalización a 94°C 5 min, un segundo paso de 30 a 35 ciclos con desnaturalización a 94°C 1 min, alineamiento 55°C 2 min, extensión a 72°C 3 min, seguido de un último paso de extensión a 72°C 7 min. La temperatura de alineamiento puede variar según la T_m de los oligos, así como la duración del tiempo de extensión, que aumenta para fragmentos de genómico más grandes. En algunos casos se realizaba una segunda PCR como se describió anteriormente.

7.5.3. Amplificación rápida de los extremos del cDNA (RACE).

Para el **extremo 3'** de *gpt* se empleó el kit de optimización con un cebador interno del fragmento obtenido con los oligos degenerados, el oligo GPTF_{ND} y otro diseñado a partir de la cola de poliadenina del mRNA (FA2Z).

Para el **extremo 5'** se utilizó el SmartTM-RACE cDNA amplification kit (Clontech). La extracción de mRNA se realizó como se describe en el apartado 2.7.1. Tras la síntesis de la primera cadena de cDNA, según las instrucciones del kit, se realizó una reacción de PCR utilizando el primer no degenerado NUP2 obtenido a partir de una modificación del oligo no

degenerado UPM long del kit, junto con el oligo interno GPTR1_{RACE}, diseñado a partir del fragmento obtenido con los oligos degenerados. Las condiciones de la PCR fueron: un paso inicial de desnaturalización a 96°C 5 min, un segundo paso con cinco ciclos con un paso de desnaturalización a 94°C 5 seg, seguido de 3 min a 72°C, posteriormente cinco ciclos con desnaturalización a 94°C 30 seg, alineamiento a 57°C 30 seg, extensión a 72°C 3 min, y por último veinte ciclos con desnaturalización a 94°C 30 seg, alineamiento a 57°C 30 seg, extensión a 72°C 3 min. A continuación se realizó una segunda PCR de optimización, utilizando los tampones del kit de Invitrogen, y los oligos NUP2 y GPTR2_{RACE}, con las condiciones de la PCR de optimización y una temperatura de alineamiento de 59,8°C, utilizando como cDNA el producto diluido 1/10 de la primera PCR.

7.6. Clonación de productos de PCR.

7.6.1. Ligación.

Los productos de PCR, una vez separados electroforéticamente, fueron purificados del gel con el Kit NucleonSpin Extract de Macherey-Nagel. Para calcular la cantidad apropiada de inserto (producto de PCR) a incluir en la reacción de ligación, se usó la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{Kb de inserto}}{\text{Kb del vector}} \times \text{proporción inserto : vector} = \text{ng de inserto}$$

La proporción inserto:vector óptima fue 3:1.

Los fragmentos de PCR fueron clonados en el plásmido pGEM-T Easy (Promega). Estos plásmidos derivan del mismo pGEM-T Easy, obtenidos por corte con *EcoRV* y adición de deoxitimina en sus extremos 3' mediante una transferasa terminal. Las colas de DNA de cadena simple 3'-T del sitio de inserción aumentan la eficiencia de ligación para productos de

PCR, previniendo la recirculación del vector y proporcionando colas compatibles a las generadas en la PCR por las polimerasas termoestables usadas. Estas polimerasas añaden deoxiadenina al extremo 3' de los fragmentos amplificados.

La ligación en estos plásmidos se realizó a 15°C durante 2 horas, en una mezcla de reacción 10 µl para pGEM-T y 18 µl para pGEM-T Easy que contenía 30 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP, 5% PEG, 55 ng de vector, 3U de ligasa de T4 (Promega) y una cantidad apropiada de DNA.

7.6.2. Obtención de células competentes.

El método seguido fue el descrito por Sambrook *et al.* (1989). Las estirpes de *E. coli* utilizadas fueron DH5-α y BL21. Para su preparación se siguió el protocolo siguiente:

Las células se cultivaban a 37°C en medio LB sólido (1% bactotripton, 0,5% extracto de levadura, 1% NaCl, pH 7,0, para medio sólido se añadió 1,5% de agar) durante la noche. Pasado este tiempo se usaba una sola colonia para preinocular en 5 ml de medio LB y se cultivaba en agitación continua a 37°C durante la noche.

El cultivo líquido se transfería a un matraz junto con 500 ml de LB, que se incubaba en agitación continua a 37°C hasta que DO₆₀₀ alcanzaba 0,325 (4 horas aproximadamente). El matraz se pasaba a hielo durante 30 minutos, tras lo cual su contenido se transfería a 2 tubos de centrifuga previamente enfriados en hielo, donde se centrifugaba durante 15 min a 4°C y 5.000 g en una centrifuga Sorvall (modelo RC5C). Tras la centrifugación se descartaba el sobrenadante y las células sedimentadas se resuspendían en 40 ml de solución previamente autoclavada de PIPES 10 mM pH 7, 60 mM CaCl₂ y 15% (p/v) glicerol. Tras lo cual se volvía a centrifugar 10 minutos a 3.000g a 4°C, tras lo cual el pellet se resuspendía en 20 ml de la misma solución anterior para volver a centrifugarse 10 minutos a 3.000g a 4°C. Tras

resuspender el pellet de nuevo en 20 ml de la misma solución, las células se distribuían en alícuotas de 100 o 200 μ l, se congelaban en nitrógeno líquido y se conservaban a -80°C .

7.6.3. Transformación de *E. coli*.

El método utilizado para la transformación fue el descrito por Sambrook *et al.* (1989). El volumen de ligación se mezclaba con 100 μ l de células competentes previamente descongeladas en hielo. La mezcla se incubaba durante 15-30 min en hielo y pasado este tiempo se sometía a un choque térmico durante 100 segundos a 42°C . Posteriormente, se mantenía 7 min a temperatura ambiente e inmediatamente después se le añadía 1,5 ml de LB líquido precalentado a 37°C , y se incubaba en agitación durante 1 hora a 37°C . Transcurrido este tiempo se sembraba la mezcla en medio LB sólido al 1% de agar (p/v) suplementado con 100 mg/ml de ampicilina y 250 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal) sobre placa Petri que se incubaba durante 10-12 horas a 37°C . En los transformantes que contienen el inserto se interrumpe la secuencia codificante del gen β -galactosidasa y pueden ser identificados por el tipo color de las colonias en la placa suplementada con X-Gal como sustrato. Los clones que contenían el inserto producían colonias blancas y las que no azules.

7.6.4. Extracción de DNA plasmídico.

Las colonias blancas fueron seleccionadas e inoculadas en 3,5 ml de LB+Amp, los cultivos se incubaron a 37°C durante toda la noche. Las extracciones de DNA plasmídico fueron llevadas a cabo mediante lisis alcalina y se purificaron mediante columnas, con el GFXTM Micro Plasmid Prep Kit de Amersham-Pharmacia Biotech. El DNA resultante se eluyó con 50-100 μ l de H_2O .

Como comprobación de la presencia del inserto el DNA resultante fue digerido añadiendo 10 U de endonucleasa de restricción por cada μg de DNA en el tampón requerido por la enzima. La mezcla se incubaba al menos una hora y media a 37°C. El resultado de la restricción se visualizaba por electroforesis en gel de agarosa 1%.

7.6.5. Secuenciación y análisis de secuencias.

La secuenciación del DNA plasmidial fue llevada a cabo en los laboratorios GATC GmbH (Konstanz, Alemania). Las secuencias remitidas fueron identificadas mediante homología con secuencias conocidas utilizando el programa BLAST. El alineamiento de secuencias homologas se llevó a cabo utilizando el programa informático ClustalX v1.8 (Thompson *et al.*, 1997) y la construcción de árboles filogenéticos mediante el uso del programa Treview 1.6.6 (Page, 1996). Asimismo, el paquete informático DNATools 6.0 (Calsberg) nos aportó numerosas herramientas para manejar las secuencias.

III. Objetivos.

III. Resultados y Discusión.

BLOQUE I: INCUBACIONES DE EMBRIONES DE GIRASOL EN
DESARROLLO CON [2-¹⁴C]ACETATO.

1. PUESTA A PUNTO DEL ENSAYO.

El propósito inicial de esta tesis fue la puesta a punto de un método capaz de medir el metabolismo de síntesis de ácidos grasos en las semillas de girasol *in vivo* durante el desarrollo. El método debería ofrecer una visión global, reproducible y diferencial entre genotipos, de las principales actividades liposintéticas responsables de la síntesis *de novo* de ácidos grasos, que pudiera ser utilizado para la selección de nuevos alelos de las distintas actividades enzimáticas implicadas, y en particular para la selección de líneas alto esteárico en fondo alto oleico. Teniendo en cuenta que en la composición final de un aceite intervienen múltiples actividades enzimáticas, la incorporación diferencial de [2-¹⁴C]acetato dentro de la fracción de ácidos grasos reflejaría:

- La presencia de una distinta maquinaria enzimática
- La interacción entre estas actividades enzimáticas y la ruta principal de síntesis de ácidos grasos.
- La afinidad de las diferentes actividades tioesterasas por sus respectivos substratos, así como la competencia entre ellos.

Analizando el conjunto de ácidos grasos marcados sintetizados *de novo*, obtendríamos evidencias acerca de diferentes actividades enzimáticas presentes en las semillas y generadas por la aparición de alelos específicos o mutados en las semillas analizadas.

Para poner a punto el método de marcaje de ácidos grasos deberíamos establecer previamente las condiciones de la incubación, para que los resultados reflejaran dentro de lo posible el metabolismo real de las semillas. Una vez definidas las condiciones, los resultados deberían ser repetitivos y comparativos entre los distintos genotipos que se ensayaran. Como punto de partida tomamos las condiciones propuestas por Singh *et al.* (1986) para

incubaciones de semillas de *Cuphea lutea* con [2-¹⁴C]acetato, método a partir del cual se adaptaron para girasol todas las condiciones de incubación.

1.1. Estado fisiológico de las semillas.

Inicialmente se llevaron a cabo incubaciones con semillas recién recolectadas de 15 DDF procedentes de la línea control RHA-274 y semillas de la misma edad guardadas en congelador a -20°C. Las semillas congeladas incorporaban menor cantidad de radioactividad en la fracción lipídica ($3,5 \pm 0,5$ pmol [2-¹⁴C]acetato mg peso fresco (pf)⁻¹) con respecto a lo que hacían las semillas frescas de la misma edad ($79,0 \pm 6,2$ pmol [2-¹⁴C]acetato mg pf⁻¹). La distribución de radioactividad entre los distintos componentes de la fracción lipídica también variaba. Mientras que en semillas congeladas el 38% de la radioactividad total incorporada aparecía en la fracción de lípidos polares (LP), correspondiente en su gran mayoría a los fosfolípidos, y no se marcaba la fracción de triacilglicéridos (TAG), cuando usábamos semillas frescas, el 54,3% de la radioactividad total correspondía a TAG, y el 31% aparecía en LP (Figura I.1.A). Por otro lado, cuando se analizó la distribución de radioactividad destinada a la fracción de ácidos grasos también se observaron diferencias notables entre semillas frescas y congeladas (Tabla I.1).

Mientras que en semillas frescas aparecía marcaje en la mayor parte de los ácidos grasos presentes en el aceite de semilla, en semillas congeladas tan solo se marcaban el ácido palmítico (16:0) y el ácido oleico (18:1). El marcaje encontrado en semillas congeladas en lo referente a la distribución de lípidos y de ácidos grasos, podría deberse al hecho de que las membranas de tejidos congelados no conservan sus sistemas de membrana intactos. Por tanto, eran las semillas frescas incubadas con acetato las que mejor asemejaban la distribución de los distintos componentes de la fracción lipídica presentes *in vivo* en semillas de girasol.

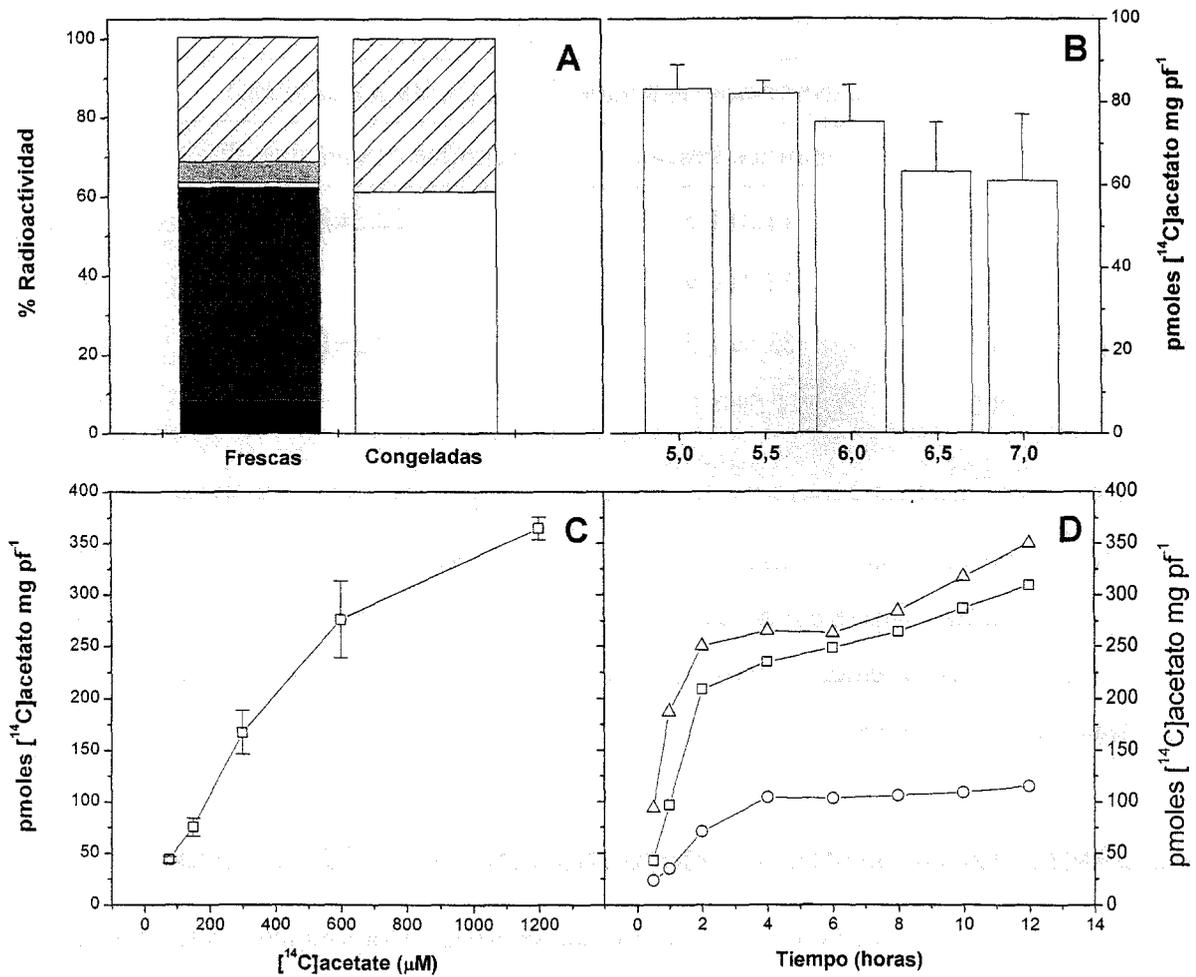


Figura I.1. Incorporación de [2-¹⁴C]acetato a la fracción de lípidos totales en semillas de la línea RHA-274 de 15 DDF. (A) Distribución de radioactividad dentro de las diferentes clases de lípidos: fosfolípidos (▨), diacilglicéridos (▤), ácidos grasos (□), triacilglicéridos (▣) y ceras (■) en experimentos con semillas frescas y semillas congeladas (-20°C). (B) Efecto del pH del medio de incubación. (C) Efecto de la concentración de [2-¹⁴C]acetato. (D) Efecto de la temperatura y del tiempo de incubación. 10 °C (○), 20 °C (□) y 30 °C (△).

Tabla I.1. Distribución de radioactividad en la fracción de ácidos grasos de semillas frescas y congeladas ^a

| Distribución de ácidos grasos (% Radioactividad) | | |
|--|------------------|---------------------------|
| | Semillas frescas | Semillas congeladas -20°C |
| 16:0 | 12,2±1,5 | 22,8±1,9 |
| 18:0 | 12,4±0,9 | - |
| 18:1 | 62,9±1,5 | 77,2±1,9 |
| 18:2 | 1,5±0,9 | - |
| AGLM | 11±0,9 | - |

^a Semillas procedentes de plantas RHA-274 de 15 DDF se incubaron con 300 µM de [2-¹⁴C]acetato durante 4 horas a 20 °C. Los lípidos totales se transesterificaron y los correspondientes ácidos grasos se separaron y cuantificaron según Materiales y Métodos.

1.2. Efecto del pH sobre la incorporación de [2-¹⁴C]acetato.

Para definir las condiciones a las que las semillas incorporaban mayor cantidad de radioactividad, se incubaron semillas de 15 DDF con [2-¹⁴C]acetato a distinto pH. Las semillas incorporaban más radioactividad en la fracción de lípidos a medida que disminuía el pH del medio de incubación (Figura I.1.B). El pH óptimo se encontraba entre 5-6, rango similar al encontrado en ensayos con semillas de *Cuphea* en desarrollo (Singh *et al.*, 1986). Mientras que no se encontraron diferencias significativas entre la cantidad de radioactividad incorporada a pH entre 5,0 y 6,0; esta sí fue significativamente diferente para pH 6,5 y 7,0 (t-test, p>0,05).

1.3. Efecto de la concentración de $[2-^{14}\text{C}]$ acetato.

Para definir aquella concentración del sustrato radioactivo que suministrara un marcaje suficiente para los análisis posteriores se incubaron semillas de girasol a distintas concentraciones de $[2-^{14}\text{C}]$ acetato y se midió la cantidad de radioactividad incorporada en la fracción lipídica. Las concentraciones ensayadas estaban dentro de los rangos fisiológicos encontrados en distintas plantas (Roughan, 1995; Bao *et al.*, 2000).

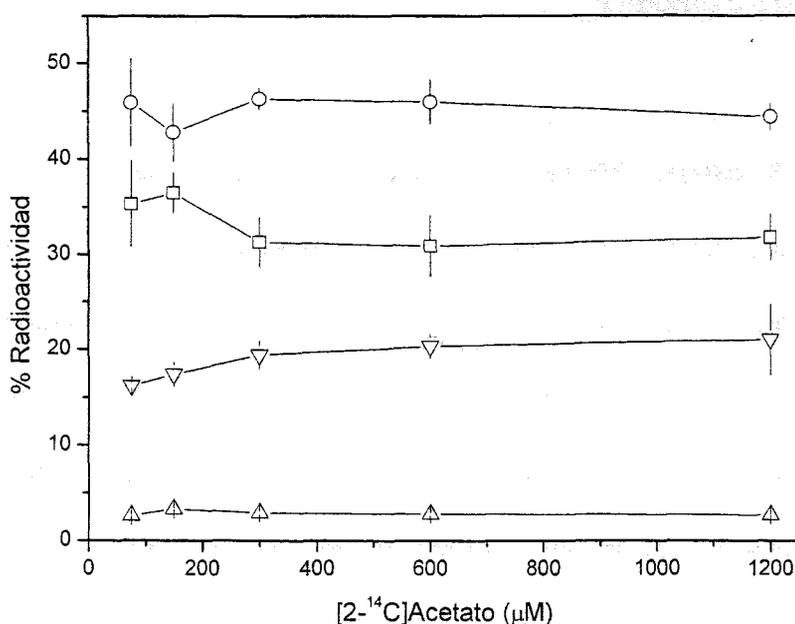


Figura I.2. Distribución de radioactividad a los distintos componentes de la fracción lipídica con la concentración de $[2-^{14}\text{C}]$ acetato en el medio de incubación. Ceras (\square), triacilglicéridos (\circ), lípidos polares (∇) y diacilglicéridos (\triangle). Los resultados son promedio \pm SD, de 3 repeticiones independientes usando semillas de 15 DDF de tres plantas RHA-274.

La tasa a la cual se incorporaba la radioactividad a la fracción de lípidos, en torno a $300 \text{ pmol } [2-^{14}\text{C}]$ acetato $\cdot \text{mg pf}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, mostraba un comportamiento bifásico con una tendencia

al plató a concentraciones de substrato superiores a 600 μM (Figura I.1.C). Una cinética de incorporación similar se observó en ensayos llevados a cabo con semillas de *Cuphea lutea* donde la tendencia al plató ocurría a concentraciones en torno a 2 mM (Singh *et al.*, 1986). La distribución de radioactividad en los diferentes componentes de las fracciones lipídicas, así como en la fracción de ácidos grasos de los TAG, no variaba significativamente con respecto a las diferentes concentraciones de [2-¹⁴C]acetato utilizadas (Figura I.2). De este modo, la concentración óptima de [2-¹⁴C]acetato elegida para los sucesivos ensayos fue 300 μM , la cual producía un marcaje suficiente.

1.4. Efecto de la temperatura y tiempo de incubación.

Para determinar tanto la temperatura como el tiempo de incubación apropiados, se incubaron series de semillas de girasol de 15 DDF en tres baños a tres temperaturas distintas y a intervalos de tiempo se detuvo la reacción y se analizó la distribución de radioactividad en los distintos componentes de la fracción lipídica. La incorporación de radioactividad dentro de la fracción lipídica se incrementó linealmente hasta las 3-4 horas dependiendo de la temperatura de incubación. Después de 4 horas, la tasa de incorporación de radioactividad a la fracción de lípidos totales descendía para todas las temperaturas ensayadas, siendo al final del ensayo menor para las semillas incubadas en baño a 10°C ($100 \pm 4 \text{ pmol mg pf}^{-1}$) que a 20°C y 30°C (247 ± 8 y 253 ± 9 , respectivamente) sin diferencias apreciables entre estas dos temperaturas (Figura I.1.D). Para todas las temperaturas ensayadas, a medida que incrementaba el tiempo de incubación, la radioactividad que se depositaba en la fracción de TAG se incrementaba, alcanzando el $78 \pm 7\%$ del total tras 12 horas de incubación, al tiempo que disminuía el porcentaje de radioactividad presente en la fracción de lípidos polares (Figura I.3).

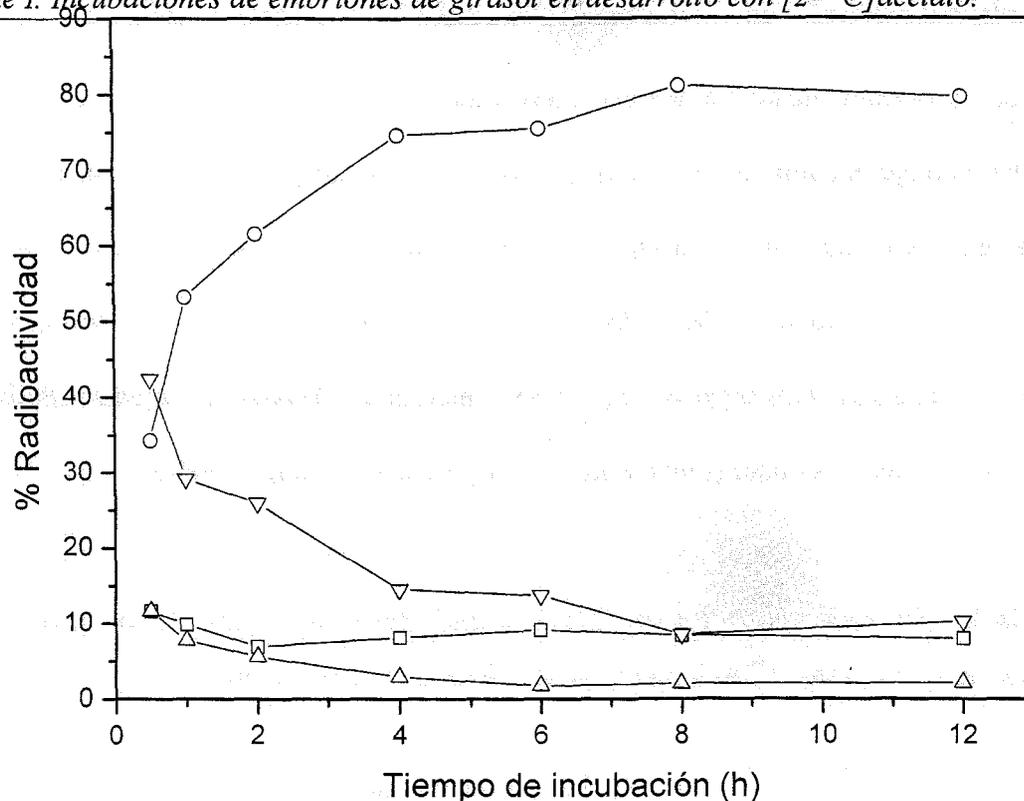


Figura I.3. Distribución de radioactividad en los distintos componentes de la fracción lipídica durante el tiempo de incubación. Ceras (□), triacilglicéridos (○), fosfolípidos (▽) y diacilglicéridos (△). Los resultados son promedio de 3 repeticiones independientes usando semillas de 15 DDF de tres plantas RHA-274 incubadas a 20°C con 300 μM de $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ acetato. (SD < 2,5%).

Cuando analizamos la distribución de radioactividad en los distintos ácidos grasos de la fracción de TAG a lo largo del tiempo de incubación, el marcaje encontrado en los ácidos grasos insaturados (18:1 y 18:2) se incrementó durante las primeras 4 horas de incubación (Tabla I.2). De ese tiempo en adelante solo se observaron pequeñas oscilaciones poco significativas en la radioactividad destinada a los distintos ácidos grasos de la fracción de TAG.

El patrón de ácidos grasos ^{14}C -marcados en las semillas era similar pero no idéntico a la composición fría del aceite. Para todas las condiciones ensayadas, había más marcaje en los ácidos grasos saturados y en el ácido oleico, y menor en el ácido linoleico, cuya síntesis

dependía de la enzima oleato desaturasa microsomal, cuya reacción tiene lugar fuera del plastidio. El marcaje encontrado en ácidos grasos C₂₀ y más largos, a partir de incubaciones de semillas en desarrollo con [¹⁴C]acetato ha sido previamente documentado en al menos 4 especies vegetales distintas: colza (*Brassica napus*) (Downey y Craig, 1964), jojoba (*Simmondsia chinensis*) (Ohlrogge *et al.*, 1978), capuchina (*Tropaeolum majus*) (Pollard y Stumpf, 1980a) y meadow-foam (*Limnanthes alba*) (Pollard y Stumpf, 1980b).

Tabla I.2. Variación en la incorporación de radioactividad dentro de los ácidos grasos de la fracción de TAG, a lo largo del tiempo de incubación ^a

| Tiempo (h) | Ácidos grasos marcados (%) | | | | |
|------------|----------------------------|------|------|------|------|
| | 16:0 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | AGML |
| 0,5 | 17,3 | 17,9 | 49,1 | 2,4 | 13,1 |
| 1 | 10,8 | 15,2 | 63,6 | 2,8 | 7,6 |
| 2 | 12,2 | 10,0 | 66,4 | 8,8 | 2,5 |
| 4 | 10,1 | 13,0 | 66,4 | 6,8 | 3,8 |

^a Las semillas utilizadas tenían 15 DDF de líneas control RHA-274, y se incubaron con 300 μM de [2-¹⁴C]acetato a 20 °C de 0,5 a 4 h. Nomenclatura igual que la de la Tabla I.1 y AGML, ácidos grasos muy largos (20:0, ácido araquídico; 22:0, ácido behénico; 24:0 ácido lignocérico).

De hecho, se cree que este patrón de marcaje refleja los diferentes conjuntos de acetato que contribuyen tanto a la síntesis *de novo* de ácidos grasos como a las reacciones de elongación de cadena. Un incremento en el porcentaje de ácido palmítico y esteárico marcados, como el observado, solo sería esperado en aquel punto del desarrollo de las semillas donde la síntesis *de novo* de ácidos grasos fuera superior a la que normalmente está

asociada a los niveles de FAS II y SAD, que presentan las semillas de girasol de 15 DDF (Martínez-Force y Garcés, 2002).

1.5. Efecto de la edad de la semilla.

Una vez examinada la variación de la incorporación de [2-¹⁴C]acetato a la fracción lipídica de las semillas al cambiar las condiciones del ensayo, quisimos estudiar también cómo este marcaje variaba durante el desarrollo de las semillas para así poder elegir la edad de las semillas que mejor se adaptara a los objetivos para los que el método había sido previsto. Para ello se recogieron semillas a lo largo del periodo de llenado del capítulo desde los 12 a los 29 DDF, y se incubaron con [2-¹⁴C]acetato. En semillas de la línea control RHA-274, la máxima incorporación de radioactividad ocurría entre los 14 y los 18 DDF, alcanzando valores de incorporación de 300 pmol [2-¹⁴C]acetato mg pf⁻¹ o superiores. A 26 DDF se incorporaban 250 pmol [2-¹⁴C]acetato mg pf⁻¹, a partir de entonces la incorporación caía bruscamente incorporándose sólo 50 pmol [2-¹⁴C]acetato mg pf⁻¹ a 29 DDF (Figura I.4). De todas las fracciones orgánicas ¹⁴C-marcadas, la fracción de los triacilglicéridos era la que recibía la mayor cantidad de radioactividad y por tanto donde se encontraban la gran mayoría de los ácidos grasos sintetizados *de novo*. Tanto los periodos descritos de mayor y menor tasa de incorporación de [2-¹⁴C]acetato, así como la fracción orgánica hacia donde se dirige mayoritariamente la radioactividad incorporada, coincidían con los periodos activos de mayor y menor síntesis de aceite en la semilla, aceite que en su gran mayoría está compuesto por TAG, tal y como había sido descrito con anterioridad por Luthra *et al.* (1991).

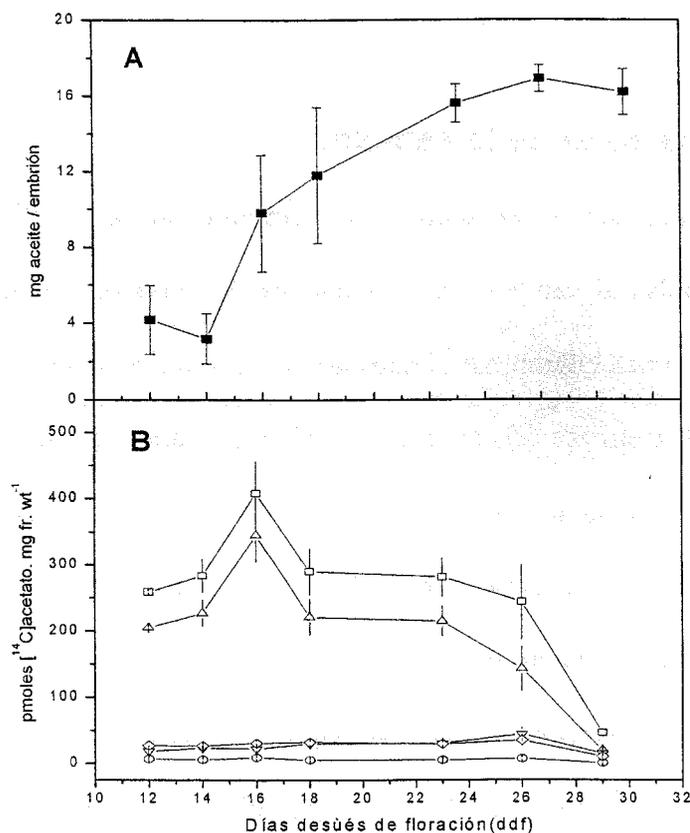


Figura I.4. (A) Acumulación de aceite en semillas de girasol durante el desarrollo. (B) Incorporación de radioactividad en lípidos. Fracción de lípidos totales. (□), ceras (○), triacilglicéridos (△), diacilglicéridos (▽) y fosfolípidos (◇), en semillas de girasol incubadas durante 4 h a 20 °C con 300 μM de [2-¹⁴C]acetato. Los resultados en (A) son promedio de 12 plantas distintas. Los resultados en (B) son promedio ± SD de tres ensayos diferentes realizado cada uno con semillas procedentes de tres plantas distintas.

Estos resultados nos indicaban que la tasa de incorporación de radioactividad a lípidos cuando se suministra [¹⁴C]acetato a semillas de girasol en desarrollo, podía ser utilizada como medida indirecta de la tasa a la cual el aceite estaba siendo sintetizado, y que la fracción de los

triacilglicéridos era la más adecuada para estudiar los productos sintetizados *de novo*, ya que era el destino mayoritario de la síntesis lipídica.

1.6. Incubaciones con semillas de distintos genotipos.

En plantas de girasol de línea control RHA-274, Martínez-Force *et al.* (2000) midieron la actividad acil-ACP tioesterasa en las semillas durante el desarrollo. Para los distintos sustratos utilizados, la mayores actividades para los acil-ACP saturados se encontraba entre 15 y 20 DDF. Este hecho, unido a que para esas edades existía una buena tasa de incorporación de radiactividad a la fracción lipídica, hizo que limitáramos los ensayos de incubación a la radioactividad encontrada en la fracción de TAG de semillas de 15 y 20 DDF, utilizando para ellos distintas líneas de girasol con distinta composición de ácidos grasos en el aceite de la semillas (Tabla I.3 y Tabla I.4).

En semillas de la línea control RHA-274, se incorporaba mayor proporción de radioactividad en [¹⁴C]16:0 y [¹⁴C]18:0 a 15 DDF y menor a 20 DDF. El hecho de que el porcentaje de radioactividad dirigida a los AGML también se redujera a 20 DDF no era extraño teniendo en cuenta que los AGML son sintetizados a partir del 18:0. Por tanto estos resultados estaban de acuerdo con los datos previos mostrados por Martínez-Force *et al.* (2000) al igual que con el patrón estándar de biosíntesis de ácidos grasos *in vivo*. Se analizó también el porcentaje de ácidos grasos marcados utilizando semillas de la misma edad pero procedentes de líneas alto oleico (HAOL-9), alto esteárico (CAS-3) y alto palmítico (CAS-5) (Tabla I.3).

En las líneas mutantes CAS-3 y CAS-5, el porcentaje de radioactividad encontrado en los ácidos grasos saturados fue superior al encontrado en semillas de la línea control RHA-274, mientras que en semillas de la línea control alto oleico HAOL-9 era donde se encontraba

el mayor porcentaje de radioactividad en el ácido oleico, ambos hechos estaban de acuerdo con la composición de ácidos grasos en el aceite de cada una de las líneas (Tabla I.4).

Tabla I.3. Composición de ácidos grasos en el aceite de semillas procedentes de líneas de girasol control RHA-274, alto oleico HAOL-9, alto esteárico CAS-3 y alto palmítico CAS-5 ^a

| | Composición de ácidos grasos (mol %) | | | | | | |
|---------|--------------------------------------|------|------|------|------|------|-------|
| | 16:0 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 20:0 | 22:0 | Otros |
| RHA-274 | 6,4 | 4,9 | 30,8 | 56,2 | 0,3 | 1,0 | |
| CAS-3 | 5,4 | 26,1 | 14,2 | 51,3 | 1,4 | 1,3 | |
| CAS-5 | 30,2 | 4,2 | 8,0 | 50,1 | - | 1,2 | 5,8 |
| HAOL-9 | 5,2 | 3,7 | 88,1 | 1,5 | 0,3 | 1,1 | |

^a 16:0, ácido palmítico; 18:0, ácido esteárico; 18:1, ácido oleico; 18:2, ácido linoleico; 20:0, ácido aráquico; 22:0, ácido behénico; Otros (16:1 Δ 9, ácido palmitoleico; 16:2 Δ 9 Δ 12, ácido palmitolinoleico y 18:1 Δ 11, ácido asclepico). SD < 2,5%.

Cantisán *et al.* (2000) habían descrito que semillas de la línea mutante CAS-3 tenían una menor actividad SAD y una mayor actividad TE sobre saturados que la línea control RHA-274. De hecho, en nuestros ensayos de incubación con [¹⁴C]acetato, la cantidad de radioactividad incorporada en 18:0 era superior tanto a 15 como a 20 DDF, al igual que la cantidad incorporada en AGML. Como era esperado, en semillas de la línea mutante CAS-5 el contenido en [¹⁴C]16:0 en la fracción de TAG se incrementaba significativamente con respecto a la línea control RHA-274, ya que Martínez-Force *et al.* (1999) encontraron una menor actividad KAS II y una mayor actividad TE por 16:0-ACP en semillas de la línea CAS-5 con respecto a las actividades medidas en líneas control RHA-274. Por otro lado, el mutante

alto oleico tiene una menor actividad oleato desaturasa microsomal (Garcés y Mancha, 1991), y en los ensayos con [¹⁴C]acetato la cantidad de 18:2 marcados en la fracción de TAGs estaba reducida con respecto a la línea control.

Tabla I.4. Radioactividad incorporada en los ácidos grasos de la fracción de TAG en semillas de 15 y 20 DDF. Las semillas analizadas procedían de líneas RHA-274 (con un contenido de ácidos grasos estándar), HAOL9 (alto oleico), CAS-3 (alto esteárico) y CAS-5 (alto palmítico) ^a

| DDF | | Ácidos grasos marcados (%) | | | | |
|---------|----|----------------------------|------------|------------|-----------|------------|
| | | 16:0 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | AGML |
| RHA-274 | 15 | 14,1 ± 2,0 | 27,2 ± 3,9 | 41,8 ± 5,3 | 3,9 ± 1,9 | 13,0 ± 2,3 |
| | 20 | 10,4 ± 0,8 | 19,1 ± 3,2 | 57,2 ± 7,1 | 4,4 ± 0,5 | 9,0 ± 2,7 |
| CAS-3 | 15 | 7,9 ± 1,2 | 43,4 ± 2,3 | 31,9 ± 3,4 | 3,4 ± 1,3 | 13,5 ± 1,3 |
| | 20 | 8,7 ± 1,0 | 46,9 ± 1,9 | 34,6 ± 2,4 | 2,1 ± 0,3 | 7,8 ± 0,6 |
| CAS-5 | 15 | 47,0 ± 1,6 | 13,6 ± 1,5 | 24,9 ± 3,1 | 3,9 ± 0,8 | 10,5 ± 1,5 |
| | 20 | 40,8 ± 1,3 | 13,9 ± 1,6 | 31,3 ± 2,9 | 7,1 ± 0,3 | 6,8 ± 1,3 |
| HAOL-9 | 15 | 10,1 ± 0,9 | 18,6 ± 2,7 | 57,2 ± 5,3 | 0,6 ± 0,3 | 16,5 ± 2,6 |
| | 20 | 10,3 ± 0,7 | 15,7 ± 1,9 | 67,6 ± 3,8 | - | 7,8 ± 1,3 |

^a Las incubaciones se llevaron a cabo con 300 µM de [2-¹⁴C]acetato a 20°C durante 4 h. Los datos son media ± SE de al menos 4 plantas diferentes. La nomenclatura es idéntica a la de la Tabla II.2.

2. ENSAYO CON METIL VIOLÓGENO.

Tal y como hemos indicado en el capítulo anterior, la incubación de semillas de girasol en desarrollo con [¹⁴C]acetato y el posterior análisis de la radioactividad incorporada a los ácidos grasos de la fracción de TAG reflejan la síntesis *in vivo* de ácidos grasos. Se pueden diferenciar genotipos afectados en distintas actividades enzimáticas y podría ser una herramienta de gran utilidad para la búsqueda de alelos responsables de la síntesis *de novo* de ácidos grasos, en particular de aquellos implicados en la síntesis de ácidos grasos saturados,

ya que amplifica el porcentaje de estos. Sin embargo, no deja de ofrecer una visión global de las múltiples actividades enzimáticas en ella involucradas. La capacidad de inhibir *in vivo* ciertas actividades enzimáticas ofrece una herramienta muy útil para el estudio de la ruta de síntesis de ácidos grasos, ya que reduce la interacción que los distintos productos ejercen entre sí, permitiendo manifestar las potencialidades enzimáticas existentes (Sánchez y Stumpf, 1984; Golz *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1995b; Jones *et al.*, 2000). La inhibición *in vivo* de la actividad SAD conduciría a una disminución en la síntesis de 18:1-ACP y al aumento del contenido de acil-ACPs saturados en el interior del plastidio. El análisis de los porcentajes de ácidos grasos marcado en estas condiciones, nos suministraría una herramienta para estudiar las interacciones que existen entre las diferentes combinaciones de alelos para TE y para una mejor selección de alelos para TE que favorezcan la síntesis de ácidos grasos saturados (ver Introducción, Figura 6). Griffiths *et al.* (1998) utilizaron el metil viológeno para inhibir *in vitro* a la enzima estearil-ACP desaturasa purificada de semillas de girasol. Aplicando el ensayo puesto a punto, pretendimos inhibir *in vivo* a esta actividad enzimática.

2.1. Efecto del metil viológeno sobre la síntesis de lípidos.

Semillas de 15 DDF se incubaron con [2-¹⁴C]acetato en presencia de distintas concentraciones de metil viológeno (MV) y tras 4 horas de incubación a 20°C, se midió la radiactividad total incorporada en la fracción de lípidos totales y su distribución entre los distintos componentes (Figura I.5). La radioactividad total incorporada en la fracción de lípidos se incrementó hasta concentraciones de MV de 20 mM (Figura I.5.A). Sin embargo a concentraciones superiores a 20 mM, se observó una reducción en el contenido total de radioactividad, a pesar de que el porcentaje de radioactividad encontrada en la fracción de los TAG se mantuvo constante (Figura I.5.B).

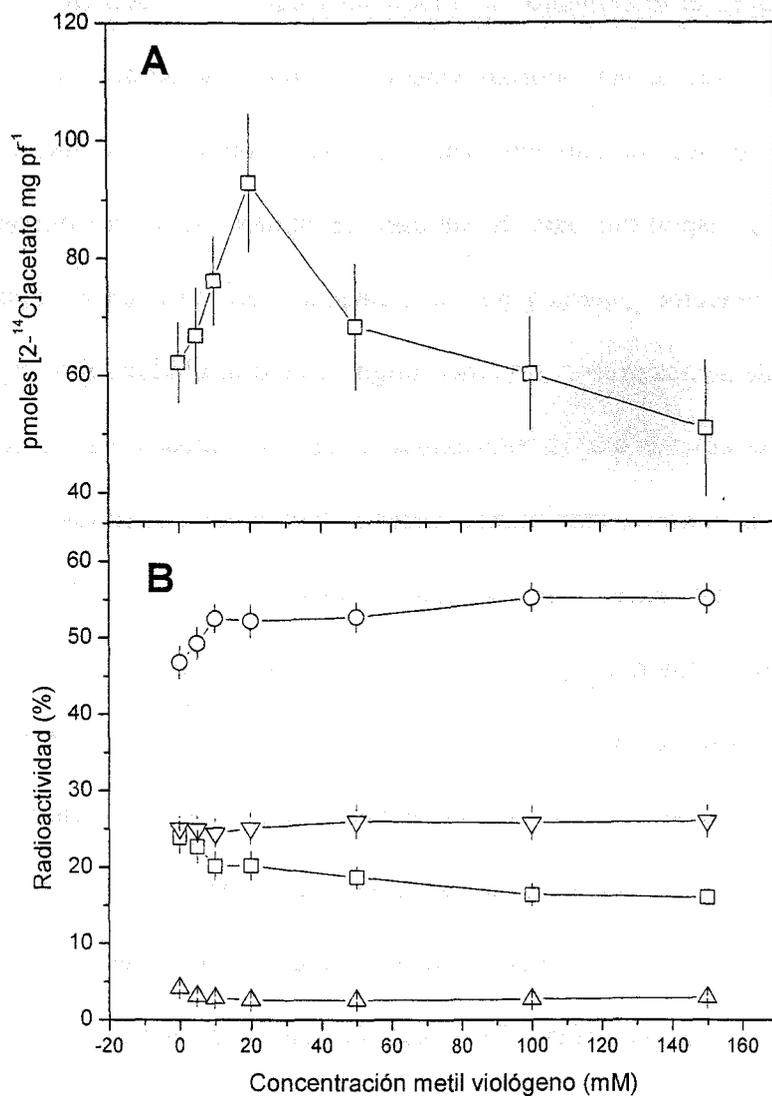


Figura I.5. (A) Efecto del metil viológeno sobre la incorporación de [2-¹⁴C]acetato dentro de la fracción de lípidos. (B) Distribución dentro de las diferentes clases de lípidos: ceras (□), triacilglicéridos (○), diacilglicéridos (△) y lípidos polares (▽). Semillas de plantas RHA-274, de 15 DDF incubadas con 300 μ M de [2-¹⁴C]acetato durante 4 horas a 20°C en presencia o en ausencia de distintas concentraciones de metil viológeno. Los resultados son promedio \pm SD (n=16)

Teniendo en cuenta que el acetato se asimila por difusión pasiva a través de las membranas plastidiales, el incremento de la radioactividad encontrada en lípidos totales para pequeñas concentraciones de MV podrían deberse a la inactivación por parte del inhibidor de otras rutas extraplastidiales que también usen al acetato como sustrato, haciendo así que una mayor cantidad esté disponible para la síntesis de lípidos. Otra posibilidad sería que la demanda de poder reductor generada por la molécula fuera suficiente como para tirar del proceso de síntesis de ácidos grasos, sin tener ningún efecto inhibitor sobre el propio proceso. Se ha descrito recientemente que la ruta oxidativa de las pentosas fosfato (OPPP) tiene un papel importante a la hora de suministrar poder reductor para la síntesis intraplastidial de ácidos grasos en plastidios aislados de semillas de girasol en desarrollo (Pleite *et al.*, 2005).

Por otro lado, Hutching *et al.* (2005) han demostrado en plastidios aislados de embriones de colza (*Brassica napus* L.) en desarrollo, que la actividad OPPP en presencia de metil viológeno se incrementaba más del doble con respecto a la actividad medida durante la síntesis de ácidos grasos. Así pues, el incremento en la radioactividad medida para pequeñas concentraciones de MV, podría reflejar el efecto potenciador que este compuesto tenga sobre la síntesis de ácidos grasos dentro del plastidio. La reducción en la incorporación de radioactividad medida a concentraciones mayores de MV podría ser el resultado de la interferencia que este producto pudiera causar en las reacciones enzimáticas redox, tales como la reacción de elongación llevadas a cabo por el complejo FAS que dependen directamente de la presencia de poder reductor dentro del plastidio.

2.2. Efecto del metil viológeno sobre la síntesis de novo de ácidos grasos.

Una vez comprobado el efecto que el MV tenía sobre la síntesis de lípidos, nos preguntamos si tendría un efecto similar al observado para ensayos *in vitro* por Griffiths *et al.* (1998), es decir, si podríamos observar una reducción en la síntesis de 18:1-ACP, medida como reducción en el porcentaje de [¹⁴C]18:1 presente en la fracción de triacilglicéridos. Para ello, incubamos semillas de 15 DDF procedentes de distintas líneas de girasol (Tabla I.4) en presencia de distintas concentraciones de MV en el medio, y analizamos la distribución de radioactividad entre los distintos ácidos grasos dentro de la fracción de TAG (Figura I.6).

Para todos los genotipos ensayados, a medida que se incrementaba la concentración de MV en el medio de incubación, disminuía el porcentaje de ácidos grasos insaturados marcados radiactivamente (Figura I.6.C) y se incrementaba el porcentaje de [¹⁴C]18:0 presente en la fracción de TAG (Figura I.6.B). El efecto que el MV tenía sobre el resto de los ácidos grasos marcados no estaba claro. El porcentaje de [¹⁴C]16:0 permanecía constante para todas las concentraciones de MV en todas las líneas ensayadas a excepción del mutante alto palmítico CAS-5 (Figura I.6.A), lo que no era extraño. Por su parte, el porcentaje de radioactividad incorporada en los AGML se incrementaba ligeramente hasta concentraciones próximas a 10 mM y luego disminuía también ligeramente para concentraciones superiores del inhibidor, sin observarse diferencias significativas a lo largo de todas las concentraciones ensayadas, salvo para la línea alto oleico HAOL-9 (Figura I.6.D). Los AGML son constituyentes menores en el aceite de semilla de girasol, y su síntesis ocurre fuera del plastidio por elongación de moléculas de 18:0-CoA gracias a las elongasas de acil-CoAs microsomales (Evenson y Post-Beittenmiller, 1995).

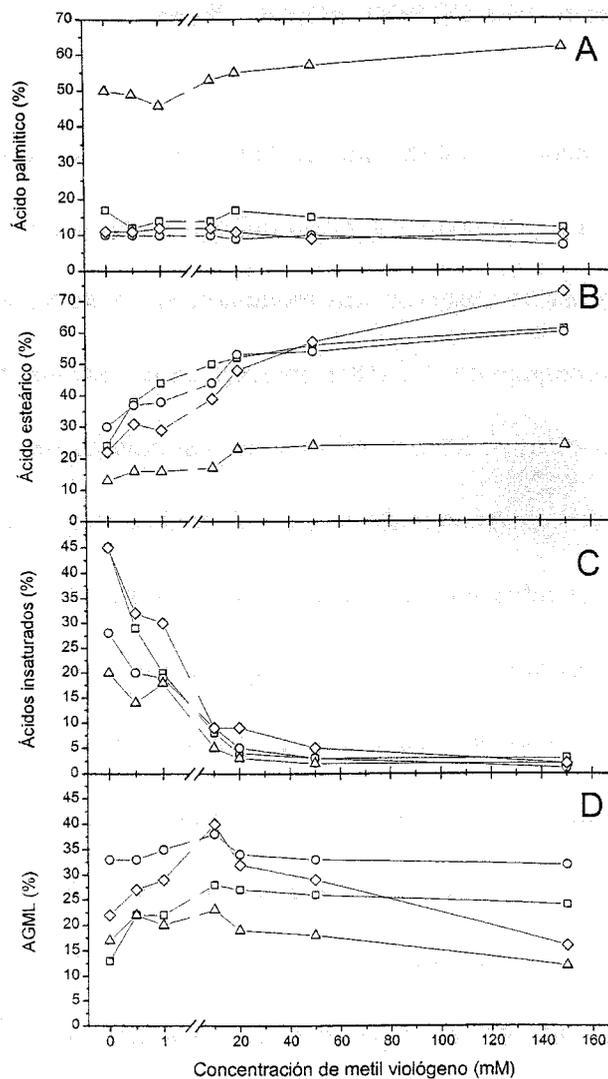


Figura I.6. Efecto del metil viológeno sobre la distribución de radioactividad en los ácidos grasos de la fracción de TAG. (A) ácido palmítico, (B) ácido esteárico, (C) ácidos grasos insaturados (18:1+18:2) y (D) ácidos grasos de cadena muy larga (AGML) (20:0 + 22:0 + 24:0). Las líneas de girasol ensayadas fueron: RHA-274 (□), CAS-3 (○), CAS-5 (△) y HAOL-9 (◇). Resultados son promedio de 3 ensayos distintos (SD<10%).

El origen del marcaje en los AGML podría estar en las elongaciones que las moléculas de 18:0-CoA sufren en el citosol gracias al $[^{14}C]$ acetato disponible en el citoplasma, y la diferencia observada entre los porcentajes de AGML marcados entre líneas de girasol

podrían ser consecuencia de la presencia de distintas actividades elongasas existentes en fondos genéticos distintos, dado que en la semilla de girasol se han encontrado dos elongasas con diferente afinidad por los sustratos dependiendo de la longitud de la cadena (Salas *et al.*, 2004), y que como ocurre con otras actividades en estas semillas son capaces de utilizar más o menos eficientemente el [¹⁴C]acetato disponible en el citoplasma para elongar más o menos eficientemente al 18:0-CoA. Los AGML son sustrato para la síntesis de ceras y parece probable que el descenso observado en su síntesis se deba al efecto del MV sobre este tipo de enzimas, hecho que se apoyaría en la disminución de radioactividad encontrada en la fracción de ceras para concentraciones altas de MV (Figura I.5).

Un importante efecto colateral que se extrae de la exposición a MV está relacionado con la disponibilidad de sustratos para las acil-ACP tioesterasas. En semillas expuestas a MV se reducen los niveles de ácido oleico en el interior de los plastidios, a la par que se incrementan los niveles de 18:0-ACP, alterando de esta manera la disponibilidad de sustratos para las TEs allí presentes. Dependiendo del genotipo de cada planta, estarán presentes en las semillas distintos alelos FatA o FatB. Así una menor acumulación intraplastidial de 18:1-ACP produciría (i) una mayor actividad por el 16:0-ACP, dependiendo de la afinidad relativa por los sustratos; o (ii) una menor actividad hacia el 16:0-ACP, cuando el incremento en el 18:0-ACP dentro del plastidio inhibiera la afinidad de las TEs por el 16:0-ACP.

Por ejemplo, el porcentaje de [¹⁴C]16:0 presente en la fracción de TAG en semillas de la línea alto palmítico CAS-5, se incrementaba de un 40% a un 57% en presencia de concentraciones saturantes de MV (Figura I.6.A), es decir, la reducción del principal sustrato 18:1-ACP, incrementa la actividad de las tioesterasas presentes en esas semillas por el 16:0-ACP. Este patrón de marcaje está de acuerdo con estudios previos realizados sobre semillas de esta línea de girasol, que mostraban una actividad tioesterasa sobre el 16:0-ACP cinco

veces mayor que la actividad medida en líneas control RHA-274 sobre ese mismo sustrato (Martínez-Force *et al.*, 1999). Por otro lado, el porcentaje de [¹⁴C]18:0 en TAG de líneas alto esteárico CAS-3 para bajas concentraciones de MV era mayor que el hallado usando otros genotipos, pero similar cuando las concentraciones de MV eran altas. Sin embargo, las cantidades de [¹⁴C]16:0 acumuladas en la fracción de TAG no se veían afectadas por la presencia de MV, lo que concuerda con los resultados de Cantisán *et al.* (2000) que midieron actividad TE en semillas de la línea alto esteárico CAS-3 y encontraron que la actividad sobre 18:0-ACP era dos veces mayor que la medida en líneas control RHA-274.

3. ENSAYO CON CERULENINA.

Como ya hemos indicado al analizar la composición de ácidos grasos marcados en la fracción de TAG tras incubar las semillas de girasol en desarrollo con [¹⁴C]acetato, se encontraron gran cantidad de ácidos grasos de cadena muy larga (AGML). La sobreproducción de ácido esteárico dentro del plastidio debido a la inhibición de la SAD por la acción del MV podría causar este efecto colateral, la producción de AGML a partir del esteárico gracias a la acción de la enzima β -cetoacil-ACP sintetasa II (KASII). Este efecto ha sido descrito con anterioridad por Knutzon *et al.* (1992) al estudiar la modificación que en el perfil de ácidos grasos en plantas de *Brassica*, causaba la expresión de un gen anti-sentido de la enzima SAD. La expresión de este gen conducía a la reducción de la concentración y actividad de esta proteína, y en consecuencia se incrementaba el contenido de esteárico en la semilla. Este incremento tenía como efecto colateral el incremento en los niveles de ácidos grasos de cadena larga, 20:0, 22:0 y 24:0, que los autores relacionaban más con la elongación intraplastidial del exceso de 18:0-ACP por la acción de la enzima KAS II, que por elongaciones citoplásmicas. La cerulenina es un inhibidor de la síntesis *de novo* de ácidos

grasos en plantas superiores, que mimetiza al sustrato de varias enzimas KAS del complejo FAS, uniéndose a ellas de forma irreversible (Shimakata y Stumpf, 1982; Jaworski *et al.*, 1989).

Para verificar si parte del incremento en el porcentaje de [¹⁴C]AGML que sucede para concentraciones de MV de hasta 10 mM es el resultado de las elongaciones del 18:0-ACP dentro del plastidio, se examinó el efecto de la cerulenina, inhibidor del complejo FAS, sobre la síntesis de ácidos grasos a partir de [2-¹⁴C]acetato y además se midió la actividad KAS II intraplastidial sobre el 18:0-ACP.

3.1. Incubaciones de semillas con [2-¹⁴C]acetato y cerulenina.

Semillas procedentes de plantas de 15 DDF se incubaron en presencia de [2-¹⁴C]acetato junto con distintas concentraciones de cerulenina, y se midió la radioactividad incorporada en la fracción de TAG y en los distintos ácidos grasos (Tabla I.5).

Tabla I.5. Incorporación de radioactividad dentro de la fracción de TAG y ácidos grasos en presencia de cerulenina ^a

| Cerulenina (mM) | Acetato | | | | | |
|-----------------|------------------------|--------------------|------|------|------|------|
| | incorporado en TAG (*) | Radioactividad (%) | | | | |
| | | 16:0 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | AGML |
| 0 | 177 | 17 | 24 | 45 | 0 | 13 |
| 0,1 | 82 | 10 | 32 | 45 | 3 | 11 |
| 0,5 | 59 | 3 | 37 | 50 | 1 | 9 |
| 1,0 | 38 | 2 | 32 | 54 | 4 | 8 |

^a Semillas de 15 DDF de plantas RHA-274 se incubaron con 300 μM of [2-¹⁴C]acetate durante 3 horas a 20°C. Nomenclatura como en la Tabla 1.X. (*) pmol [2-¹⁴C]acetato mg pf⁻¹ Resultados son promedio (n=3). SD < 2,5%.

La incubación con cerulenina disminuyó considerablemente la incorporación de radiactividad a la fracción de TAG, hecho esperado teniendo en cuenta que es esta fracción hacia donde se dirigen mayoritariamente los productos de nueva síntesis. En cuanto a los ácidos grasos, la incubación con cerulenina disminuyó la incorporación de radioactividad en 16:0, lo cual es explicable porque la cerulenina inhibe mayoritariamente el complejo FAS I, responsable de su síntesis. Al mismo tiempo se observó un incremento en el porcentaje de 18:0 y una disminución en el contenido de AGML lo cual sugería que al menos, parte del marcaje encontrado en la fracción de AGML era debido a la elongación intraplastidial del 18:0. Por otro lado, también se ha demostrado que la cerulenina es capaz de inhibir las elongaciones extraplastidiales en hojas de puerro (*Allium porrum* L.) y en semillas de lunaria (*Lunaria annua* L.) (Evenson y Post-Beittenmiller, 1995; Harwood, 1996), por lo que no podría descartarse que la reducción en el porcentaje de AGML fueran debidos a la inhibición de las enzimas implicadas en la elongación extraplastidial.

3.2. Medidas de la actividad KAS II sobre 16:0-ACP y 18:0-ACP.

Para aclarar más el origen del marcaje en los AGML, se optó por medir la actividad FAS II *in vitro* en semillas de 15 DDF utilizando como sustrato 16:0-ACP, su sustrato natural, y 18:0-ACP, el sustrato que estaría en exceso en el interior del plastidio en presencia de MV (Figura I.7).

Cuando se usaba [¹⁴C]16:0-ACP como sustrato, el extracto de semillas era capaz de sintetizar 18:0 y 20:0. (Figura I.7; L3). Sorprendentemente, cuando el extracto de las semillas se incubaba en presencia de [¹⁴C]18:0-ACP, también era capaz de sintetizar 20:0 (Figura I.7; L4). Cuando ese mismo extracto se incubaba 10 minutos antes con 100 mM de cerulenina, se

reducía la síntesis de 20:0 (Figura I.7; L5), lo cual indicaba que la actividad KAS II intraplastidial era capaz de utilizar al 18:0-ACP como sustrato para sintetizar 20:0. Esta inusual actividad KAS II encontrada en semillas de girasol, ha sido descrita previamente en hojas de puerro (Domergue y Post-Beittenmiller, 2000). Estos autores describieron la síntesis de ácidos grasos de hasta 22 átomos de carbono de longitud, sugiriendo que la actividad KAS II era capaz de aceptar como sustrato tanto 18:0-ACP como 20:0-ACP.

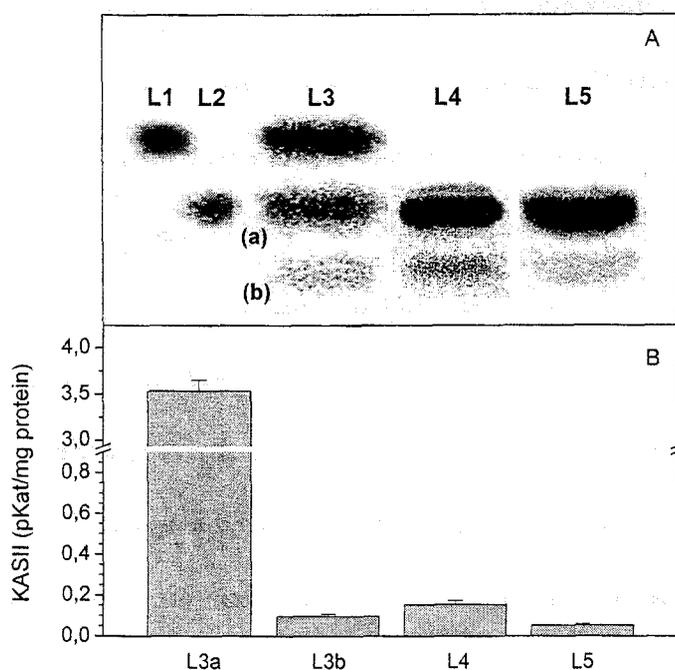


Figura I.7. Análisis de la actividad FASII *in vitro* en semillas de girasol en desarrollo de 15 DDF. A) TLC de los sustratos y productos radiactivos de la reacción. B) Actividad FAS II expresada como pKat mg⁻¹ proteína. Patrones: 16:0 (L1); 18:0 (L2). Ensayo con 16:0-ACP como sustrato (L3); ensayo con 18:0-ACP como sustrato (L4) y ensayo con 18:0-ACP como sustrato en presencia de cerulenina (L5). Resultados son promedio y las barras de error indican la desviación estándar de tres repeticiones. (a) FASII actividad sobre 16:0-ACP y (b) sobre 18:0-ACP

Estos resultados explicarían en parte el incremento en el porcentaje de AGML marcados que se producía cuando se incubaban las semillas con concentraciones crecientes de MV en el medio de incubación (Figura I.6.D). El exceso de 18:0-ACP producido artificialmente en el interior del plastidio debido a la incapacidad de las semillas por producir desaturaciones en presencia de MV, podría ser utilizado por la actividad KAS II presente para producir 20:0-ACP en el interior del plastidio. Knutzon *et al.* (1992) apuntaban a la elongación intraplastidial de 18:0-ACP como la causa más probable del incremento en el contenido de AGML, en líneas alto saturado de colza obtenidos por la expresión de un gen antisentido de la estearil-ACP desaturasa. A pesar de estos resultados, en el mutante alto-esteárico de girasol CAS-3, donde se incrementa el contenido de ácido esteárico (18:0) en el aceite cinco veces, tan solo se duplica el contenido de AGML, respecto de la línea control RHA-274 (ver Tabla I.3). Si los AGML fueran fruto de la elongación intraplastidial del exceso de 18:0-ACP generado por la mutación en la SAD de semillas CAS-3, deberían incrementarse en la misma proporción en la que se incrementa el esteárico.

Para el caso concreto del mutante alto-esteárico de colza, Knutzon *et al.* (1992) apuntaban a la elongación interna, ya que la variedad inicial de donde se obtuvo el mutante carecía de la ruta de elongación desde 18:1-CoA a 22:1-CoA. Salas *et al.* (2004) no observaron diferencias significativas entre el sistema de elongasas entre semillas de la línea mutante CAS-3 y de la línea control RHA-274.

Podemos concluir que si bien *in vitro* y a concentraciones suficientemente altas de 18:0-ACP es posible observar elongaciones debidas a la β -ceto acil ACP-sintetasa II (KAS II) en semillas de girasol, el incremento observado en el porcentaje de los AGML al incrementar el contenido de MV en el medio se debe a la elongación extraplastidial del 18:0 que se está

produciendo en exceso dentro del plastidio en presencia de pequeñas concentraciones de MV. La disminución en el porcentaje de AGML a concentraciones superiores a 10 mM, a pesar del aumento observado en el porcentaje de 18:0 marcado sería consecuencia del efecto inhibitor que el MV tiene también sobre las elongasas extraplastidiales.

4. OSCILACIONES RÍTMICAS DEL METABOLISMO LIPÍDICO.

Como hemos comprobado en los capítulos anteriores, el suministro de precursores radioactivos a semillas de girasol en desarrollo y el análisis del destino final de estos dentro de la fracción lipídica, suministra información de la capacidad de síntesis de aceite de las semillas así como de las actividades enzimáticas que dentro del plastidio son responsables de la síntesis *de novo* de ácidos grasos. Por tanto si hubiera alguna oscilación en la síntesis de lípidos o de ácidos grasos durante los ciclos luz/oscuridad encontraríamos variación en la tasa de incorporación de [2-¹⁴C]acetato a la fracción de lípidos, y/o en el patrón de marcaje de ácidos grasos, para semillas ensayadas a lo largo del periodo día/noche.

4.1. Incorporación de [2-¹⁴C]acetato a lípidos durante los ciclos luz/oscuridad.

Con el fin de estudiar el metabolismo liposintético de semillas de girasol durante los ciclos luz/oscuridad, semillas muestreadas durante el periodo día/noche se incubaron con [2-¹⁴C]acetato y se midió la incorporación de radioactividad en las distintas fracciones lipídicas (Figura I.8). Para plantas crecidas en cámaras de cultivo la tasa de incorporación de radioactividad en las fracciones de lípidos totales (LT), triacilglicéridos (TAG) y fosfolípidos (LP) fluctuó durante los ciclos luz/oscuridad (Figura I.8.A). La mayor incorporación de radioactividad ocurría en el punto central del día, mientras que la menor incorporación de

radioactividad ocurrió durante el periodo de oscuridad. Resultados similares han sido previamente descritos en hojas de espinaca (Browse *et al.*, 1981). Cuando el $[2-^{14}\text{C}]$ acetato se suministraba a preparaciones de cloroplastos aislados de hojas o directamente a discos de hojas, la incorporación de radioactividad a la fracción lipídica era mayor en presencia de luz; además era en presencia de luz y no en oscuridad cuando ocurría la acumulación neta de aceite en las hojas. Por otro lado Rikin *et al.*, (1993), observaron que plántulas de algodón mantenidas durante dos días seguidos en luz continua, incrementaban ligeramente el contenido de aceite en las hojas.

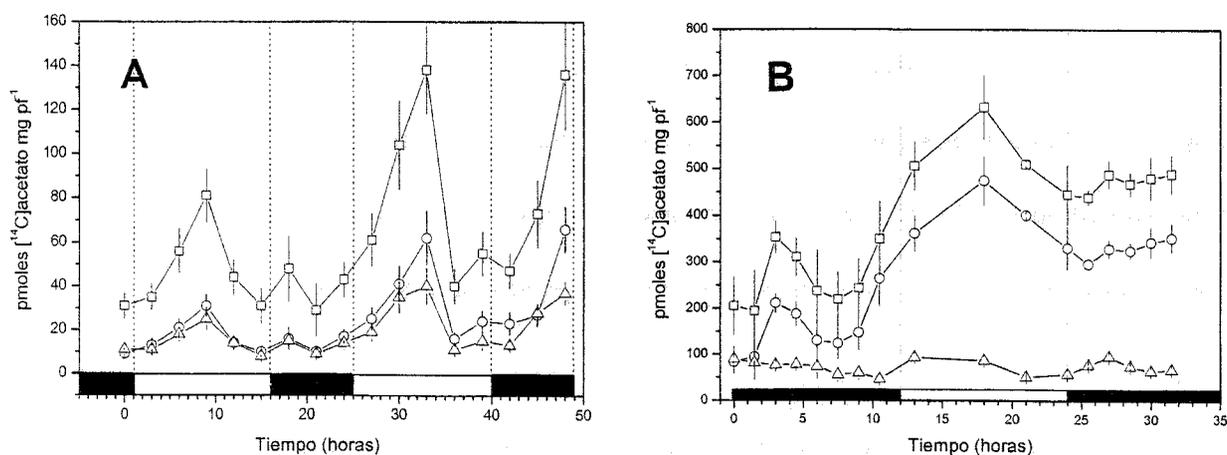


Figura I.8. Incorporación de $[2-^{14}\text{C}]$ acetato a lípidos de semillas de girasol de 16 DDF en desarrollo durante los ciclos luz/oscuridad. Plantas de la línea RHA-247 (A) crecidas en cámaras de cultivo 20/10°C día/noche, 16 h de fotoperiodo y 300 $\mu\text{Einstein m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y (B) crecidas en campo, bajo una temperatura promedio de 30/20°C día/noche, 12 h de fotoperiodo y 1200 $\mu\text{Einstein m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se muestra la radioactividad presente en las fracciones orgánicas de lípidos totales ($-\square-$), triacilglicéridos ($-\circ-$) y fosfolípidos ($-\triangle-$); periodo diurno (barras blancas), periodo nocturno (barras negras). Los resultados son promedio \pm SD. A) $n=2$ y B) $n=3$.

Cuando este mismo ensayo se llevó a cabo usando semillas procedentes de plantas de girasol crecidas en campo, un patrón de marcaje observado fue similar (Figura I.8.B.). La incorporación de radioactividad a la fracción orgánica también era mayor en el punto central del día y era menor durante el periodo nocturno. A diferencia de lo que ocurría en plantas cultivadas en cámara, para una misma edad, las plantas crecidas en campo tenían una magnitud mayor en la fase de oscilación. Aschoff (1979) observó que los incrementos en la intensidad de la luz hacían incrementar la magnitud de la fase de una oscilación de los ritmos biológicos. Por otro lado, las semillas procedentes de plantas crecidas en campo, destinaban a la fracción de TAG una mayor cantidad del [2-¹⁴C]acetato absorbido, frente a lo que ocurría en plantas crecidas en cámaras de cultivo. En girasol, a medida que avanza el llenado de la semilla, el flujo de carbono dirigido hacia lípidos se destina principalmente a lípidos de reserva (TAG) y no a lípidos estructurales (LP). Así, la mayor radiactividad encontrada en TAG de semillas procedentes de plantas crecidas en campo era esperada porque las plantas se encontraban en un estado fisiológico más adelantado. Con independencia de las condiciones de cultivo y de la línea, las semillas eran capaces de anticiparse al inicio del periodo luminoso, ya que la mayor incorporación de [2-¹⁴C]acetato se iniciaba antes incluso del encendido de luces o salida del sol (Figura I.8).

Las semillas de girasol no son órganos fijadores de carbono, como pueden serlo las semillas de otras plantas que poseen actividad fotosintética como colza o soja. Esto significa que para sintetizar aceite dependen exclusivamente del suministro de carbono fijado por la fotosíntesis en las hojas. En girasol parte de la sacarosa se dirige hacia el capítulo de la planta y es durante la síntesis de aceite cuando este flujo se incrementa (Connor y Hall, 1997). Es lógico pensar que el distinto patrón de incorporación de radiactividad a lípidos de semilla

durante el día y la noche sea el reflejo de los flujos de carbono disponibles por las semillas en el momento del ensayo.

4.2. Síntesis *de novo* de ácidos grasos durante los ciclos luz/oscuridad.

Una vez comprobado que existía una oscilación en la incorporación de [2-¹⁴C]acetato a la fracción lipídica, quisimos estudiar si la maquinaria enzimática implicada en la síntesis *de novo* de ácidos grasos en semillas de girasol poseía también un comportamiento oscilatorio durante los ciclos luz/oscuridad y si este comportamiento se veía afectado al mantener constantes las condiciones de luz y temperatura. Para ello plantas crecidas en condiciones normales de luz/oscuridad, fueron pasadas a condiciones continuas de luz y temperatura y durante ambos periodos se recogieron muestras de semillas cada 3 horas, se incubaron con [2-¹⁴C]acetato y determinamos el porcentaje de radiactividad de los distintos ácidos grasos dentro de fracción de TAG (Figura I.9).

Durante la fase de luz/oscuridad, el porcentaje de [¹⁴C]16:0 no mostró ningún patrón de oscilación que pudiera relacionarse con los ciclos luz/oscuridad, tan solo disminuía con la edad de las semillas analizadas tal y como habíamos mostrado anteriormente durante la puesta a punto del método (Figura I.10.A) y está de acuerdo con el descenso que se observa en el contenido en ácido palmítico del aceite de semillas en formación (Martínez-Force *et al.*, 2000). En cambio, los porcentajes de [¹⁴C]18:0 y de [¹⁴C]18:1 oscilaban siguiendo un patrón propio (Figura I.10.B y C).

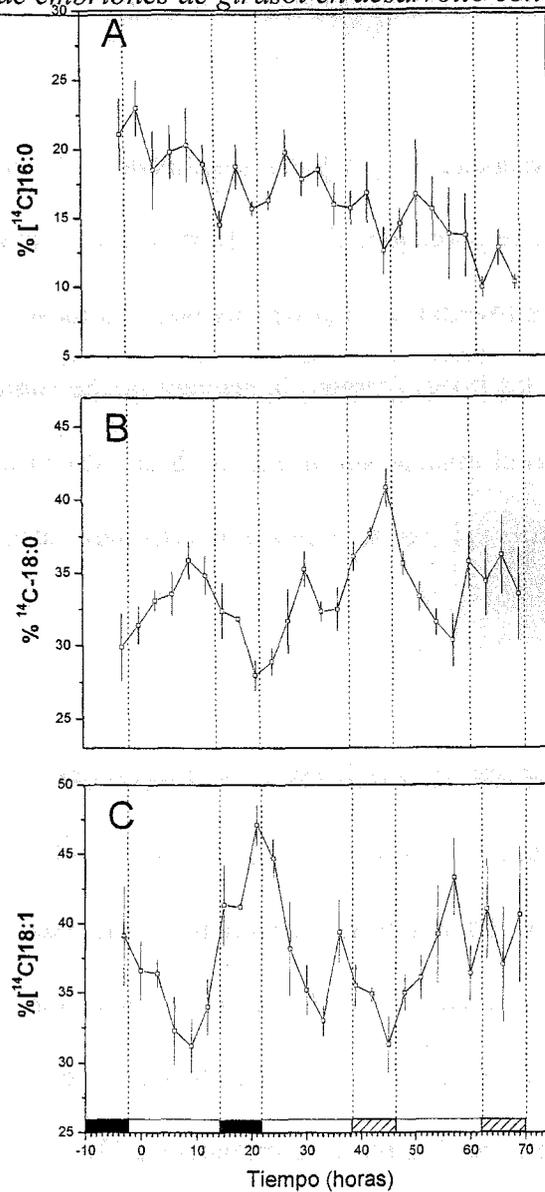


Figura I.9. Síntesis *de novo* de ácidos grasos durante los ciclos luz/oscuridad. Plantas de la línea RHA-274 crecidas en cámaras de cultivo, 25/15°C, 16 h fotoperiodo y $300 \mu\text{Einstein m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fueron pasadas a luz continua y 25°C. Cada 3 horas se recogieron muestras que fueron incubadas durante 4 horas con $[2-^{14}\text{C}]$ acetato, tras lo cual se extrajo la fracción lipídica. Tras extraerse, los triacilglicéridos se mutilaron, separándose los correspondientes ésteres metílicos mediante TLC en fase inversa. **A)** palmítico, **B)** esteárico y **C)** oleico. Periodo diurno (barra blanca), periodo nocturno (barra negra) y noche subjetiva (barra rayada). Los resultados son promedio de 3 plantas distintas \pm SD.

Durante el día, el porcentaje de [¹⁴C]18:1 sintetizado y dirigido hacia la fracción de TAG disminuía, mientras que el porcentaje de [¹⁴C]18:0, sustrato para la síntesis del primero, aumentaba. Esta tendencia se invertía al final del periodo luminoso y continuaba durante la noche hasta el encendido de las luces. Durante la primera noche subjetiva los porcentajes de [¹⁴C]18:0 y [¹⁴C]18:1 seguían el mismo patrón que el observado en las semillas muestreadas durante el día, momento a partir del cual se volvía a invertir para estabilizarse tras 48 horas en luz continua.

4.3. Oscilación rítmica de la actividad estearil-ACP desaturasa.

Analizando el porcentaje de ácidos grasos marcados en la fracción de TAG obtenemos una visión global y puntual de las actividades enzimáticas implicadas en su síntesis, pero no podemos responsabilizar a ninguna de las fluctuaciones observadas, para lo cual se hace necesario un análisis independizado. Sería lógico pensar que la actividad estearil-ACP desaturasa (SAD) responsable de la síntesis intraplásmica de ácido oleico, pudiera ser la responsable de la oscilación observada en los porcentajes de [¹⁴C]18:1/18:0. Por tanto, se midió la actividad SAD *in vitro* en semillas en desarrollo de plantas crecidas en luz/oscuridad y cambiadas a condiciones constantes de luz y temperatura (Figura I.10).

La actividad SAD oscilaba siguiendo una pauta rítmica, con valores mínimos al final del día, momento en el que aumentaba hasta alcanzar su máximo nivel de actividad a media mañana. La actividad SAD medida en semillas muestreadas durante la primera noche subjetiva aumentaba tal y como ocurría cuando las plantas estaban en oscuridad (Figura I.10). Resultados similares obtuvieron Harmer *et al.*, (2000) al medir los niveles de mRNA en *Arabidopsis* a intervalos de 4 horas durante los ciclos día/noche. Entre los genes que

presentaban un comportamiento rítmico encontraron a la SAD, que tenía máximos de transcripción al final de la noche subjetiva y mínimos niveles de mRNA al final del día, comportamiento que se repetía en condiciones constantes de luz y temperatura.

El patrón de marcaje observado en los porcentajes de [¹⁴C]18:0 y [¹⁴C]18:1 a diferencia de lo esperable no estaba de acuerdo con los valores de actividad SAD medidos. Si bien es cierto que la síntesis de [¹⁴C]18:1 disminuía durante el día al igual que lo hacía la actividad SAD, esta disminución no coincidía en su totalidad ya que durante los momentos iniciales del día la actividad SAD crecía pero el porcentaje de [¹⁴C]18:1 disminuía. Otro hecho era durante la primera noche subjetiva la actividad SAD seguía creciendo a pesar de lo cual seguía decreciendo el porcentaje de [¹⁴C]18:1. Así pues la respuesta observada en el patrón de marcaje radioactivo seguía las pautas marcadas por la luz/temperatura y no exclusivamente por la capacidad de la enzima SAD, hecho por otra parte esperado ya que el patrón de marcaje de los ácidos grasos es el producto de múltiples actividades enzimáticas y no de una sola.

Habíamos observado que durante el periodo luminoso, los flujos de carbono hacia la síntesis de ácidos grasos crecían en presencia de luz hasta alcanzar su máximo en el punto central de día para luego mantenerse en mínimos durante la noche, momento en el que las plantas no hacen fotosíntesis (Figura I.8). Teniendo en cuenta estos datos previos, podríamos explicar el patrón de marcaje radioactivo en TAG como el resultado del equilibrio entre el flujo de carbono que llega a la semilla y está disponible para la síntesis *de novo* de grasos y la capacidad que en cada momento tenga la actividad SAD por metabolizar ese sustrato.

Así, durante el día el flujo de carbono que recibiera la actividad SAD en forma de 18:0-ACP sería mayor que el metabolizable hasta 18:1-ACP. Tan solo al final del día y durante la noche, momento en el que los flujos de carbono disponibles fueran menores, la

actividad SAD presente podría hacer frente al 18:0-ACP sintetizado y desaturarlo hasta 18:1-ACP, que saldría fuera del plastidio y formaría parte de los TAG. Durante la noche subjetiva, la fotosíntesis estaría activa y por tanto el flujo de carbono se incrementaría, este flujo sería superior al que podría metabolizar la enzima de ahí el incremento medido en el porcentaje de $[^{14}\text{C}]$ 18:0. La presumible estabilización en la tasa de suministro de carbono a la semilla tras la noche subjetiva y el aumento medido de la actividad SAD, explicaría el incremento en el porcentaje de $[^{14}\text{C}]$ 18:1 incorporado en la fracción de TAG.

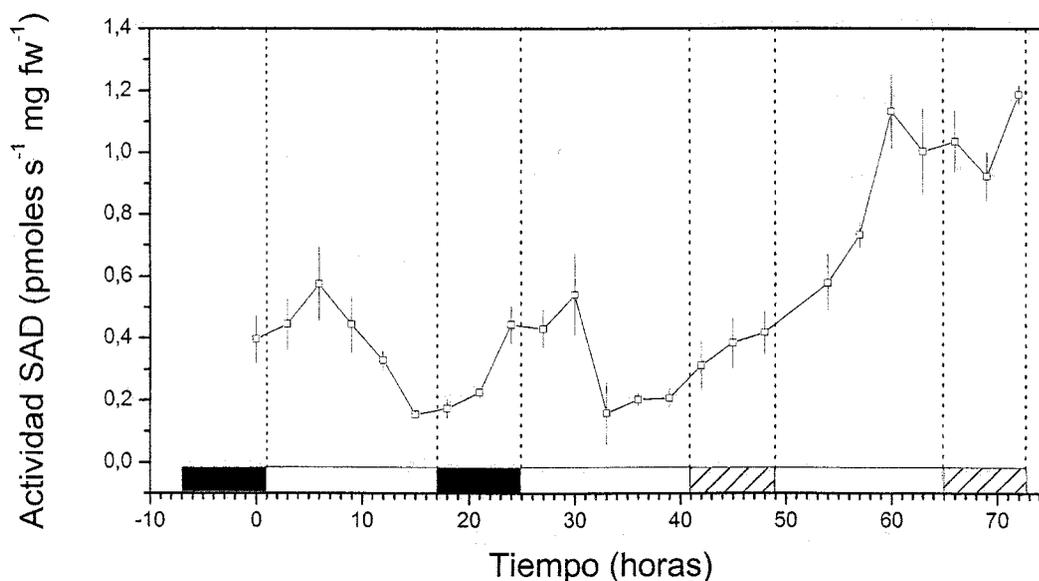


Figura I.10. Oscilación rítmica de la actividad estearil-ACP desaturasa (SAD) en semillas de girasol. Plantas RHA-274 crecidas en cámaras de cultivo, 25/15°C, 16 h fotoperiodo y 300 $\mu\text{Einstein m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se pasaron a luz continua y 25°C. Las muestras de semillas fueron recogidas cada 3 horas y la actividad SAD se midió de acuerdo a Materiales y Métodos. Periodo diurno (barra blanca), periodo nocturno (barra negra) y noche subjetiva (barra cruzada). Para cada ensayo fueron utilizadas 3 semillas y los resultados son promedio de las medidas realizadas a 3 plantas distintas \pm SD.

**BLOQUE II: OBTENCIÓN DE LÍNEAS DE GIRASOL HSHO:
SELECCIÓN DE NUEVAS LÍNEAS ALTO OLEICO.**

En el capítulo anterior demostramos que la incubación de semillas en desarrollo con [¹⁴C]acetato y el posterior análisis del patrón de marcaje de ácidos grasos en la fracción de TAG, no coincidía con la composición de ácidos grasos del aceite de semilla madura, amplificando las diferencias determinadas entre los ácidos grasos saturados e insaturados

Las incubaciones realizadas en varias líneas de girasol con [¹⁴C]acetato y el inhibidor metil viológeno (MV), incrementaba aun más las diferencias respecto a la síntesis *de novo* de ácidos grasos saturados, suministrando además información sobre actividades intraplásticas tan importantes como las tioesterasas para acil-ACP saturados o la desaturasa del 18:0-ACP, y la relación entre ellas.

Si el método había sido capaz de diferenciar distintos genotipos mutantes entre sí, también debería detectar las diferencias, que con respecto a la síntesis de ácidos grasos saturados, existieran entre distintas líneas de girasol alto-oleico procedentes de distintos fondos genéticos.

Para comprobar esta hipótesis, decidimos incubar semillas de 15 DDF procedentes de distintas líneas de girasol alto-oleico con [¹⁴C]acetato y diferentes concentraciones de MV. A partir de los resultados obtenidos se seleccionarían líneas con las mejores y peores respuestas hacia la síntesis de ácidos grasos saturados, respuesta medida como la capacidad de exportar una mayor cantidad de esteárico al citoplasma para la síntesis de TAG. Si la mejor respuesta con [¹⁴C]acetato y MV era consecuencia de un fondo genético más favorable para la síntesis de ácidos grasos saturados, al menos algunas de las líneas alto-oleico así seleccionadas al cruzarse con líneas mutantes CAS-3, generarían líneas recombinantes alto-oleico con un contenido de 18:0 incrementado y mayor que el contenido de 18:0 de los obtenidos a partir del cruce con las líneas alto-oleico peores.

1. INCUBACIÓN DE SEMILLAS DE LÍNEAS ALTO-OLEICO CON [2-¹⁴C]ACETATO.

1.1. Caracterización inicial de líneas alto-oleico.

Para estudiar el comportamiento en las incubaciones con precursor radiactivo y MV, se eligieron líneas alto-oleico de nuestra colección de girasol, que a lo largo de varias generaciones se hubieran caracterizado por tener una mayor estabilidad en la composición de ácido oleico, así como otras cedidas gentilmente por José M^a Fernández Martínez del Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC. Córdoba) (Tabla II.1).

Tabla II.1. Composición de ácidos grasos en el aceite de semillas de distintas líneas de girasol alto-oleico, empleadas en este estudio ^(a)

| Material | Origen | 16:0 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | Rango 18:0 |
|----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| HAOL-9 | -Córdoba- | 3,7 ± 0,2 | 3,5 ± 1,2 | 89,1 ± 1,2 | 2,1 ± 0,3 | 2,6-5,4 |
| AB-95 | RAO-261 | 3,4 ± 0,4 | 7,1 ± 1,3 | 84,7 ± 2,5 | 2,8 ± 1,0 | 4,8-0,0 |
| AC-01 | RAO-358 | 3,5 ± 0,4 | 8,0 ± 2,9 | 82,9 ± 4,9 | 3,0 ± 0,8 | 4,6-13,6 |
| AB-65 | BSA-682 | 3,3 ± 0,7 | 7,5 ± 2,1 | 84,9 ± 3,0 | 2,6 ± 0,9 | 4,3-11,3 |
| AB-88 | RAO-161 | 3,9 ± 0,1 | 11,7 ± 1,1 | 76,7 ± 0,3 | 4,4 ± 1,1 | 10,6-13,0 |
| VHO-17 | -Córdoba- | 4,1 ± 0,4 | 7,8 ± 1,7 | 83,5 ± 2,2 | 1,9 ± 0,4 | 5,2-11,4 |
| HO6-7 | RAO-261 | 3,2 ± 0,3 | 2,6 ± 0,3 | 87,9 ± 2,1 | 4,7 ± 1,3 | 2,1-3,1 |
| AF-47 | RAO-161 | 3,0 ± 0,2 | 5,7 ± 1,0 | 87,2 ± 1,4 | 2,8 ± 0,7 | 3,3-7,4 |
| AU-60 | RAO-2 | 4,0 ± 0,6 | 8,7 ± 1,7 | 80,9 ± 4,2 | 3,7 ± 1,9 | 6,0-12,1 |
| AB-73 | RAO-219 | 4,7 ± 1,4 | 10,7 ± 2,1 | 77,6 ± 4,5 | 3,7 ± 2,4 | 5,3-18,8 |
| BK-10 | VHO-17 | 4,1 ± 0,5 | 9,4 ± 1,5 | 82,5 ± 1,9 | 1,5 ± 0,2 | 6,7-11,4 |
| AF-43 | RAO-2 | 3,5 ± 0,2 | 7,6 ± 0,9 | 83,6 ± 1,0 | 2,9 ± 0,4 | 6,6-9,5 |
| AF-44 | RAO-261 | 3,2 ± 0,1 | 6,3 ± 0,7 | 85,7 ± 1,0 | 2,8 ± 0,4 | 5,5-7,5 |
| AB-99 | RAO-261 | 3,8 ± 0,9 | 13,1 ± 1,3 | 75,5 ± 2,0 | 3,7 ± 0,7 | 11,5-14,6 |
| HO20-4 | RAO-261 | 4,2 ± 0,1 | 4,5 ± 0,3 | 84,2 ± 2,5 | 4,6 ± 2,1 | 4,0-4,9 |
| HO1-1 | RAO-261 | 4,4 ± 0,6 | 3,5 ± 0,4 | 79,9 ± 6,7 | 10,4 ± 5,7 | 3,2-4,1 |

^(a) Los ácidos grasos se expresan en mol % y se muestra la media de al menos 24 determinaciones ± SD.

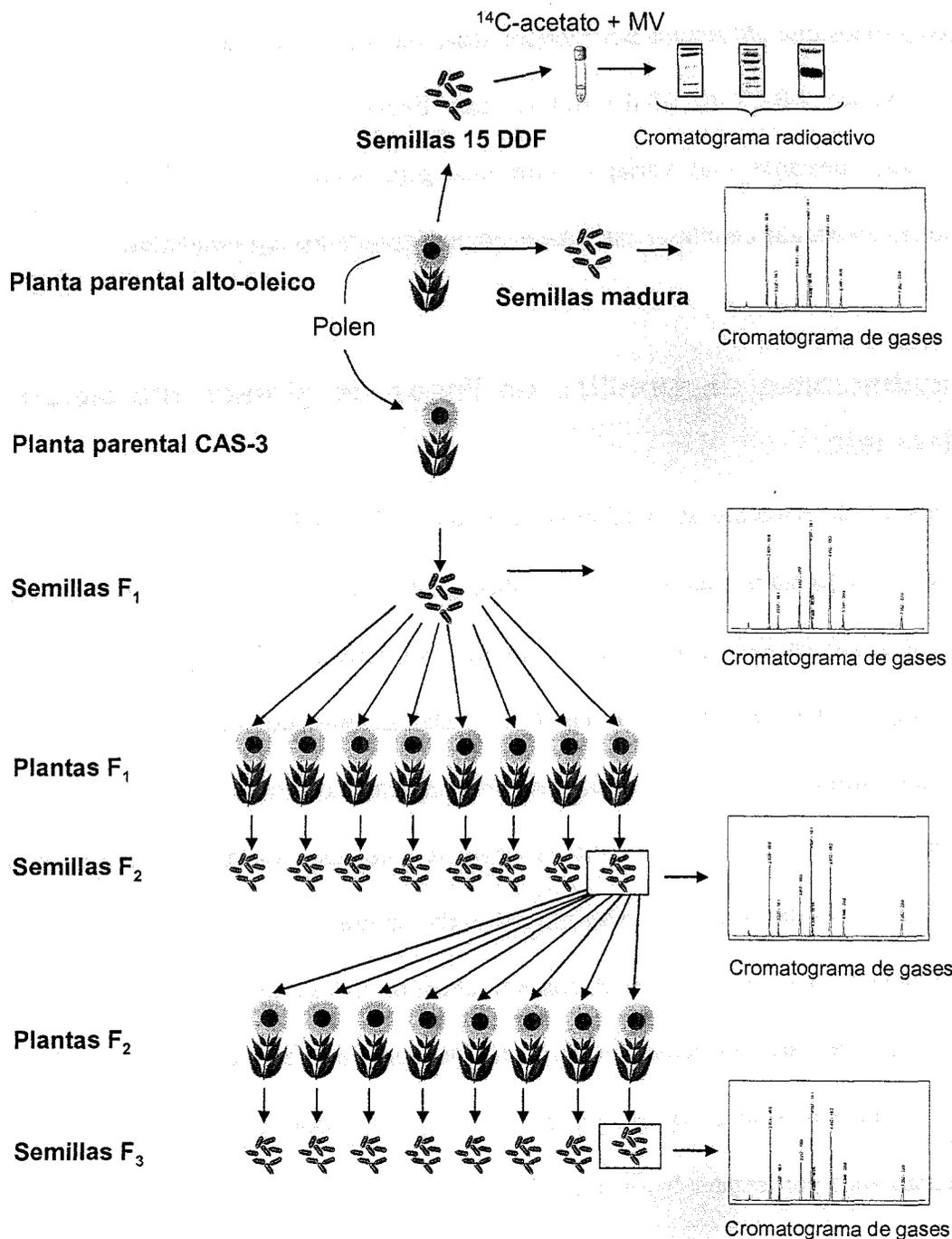


Figura II.1. Esquema seguido para estudiar el carácter alto esteárico en distintas líneas de girasol alto-oleico. Semillas de 15 DDF de cada parental alto-oleico se incubaron con ^{14}C -acetato y metil viológeno. El polen de cada parental alto-oleico se usó para fecundar flores de plantas alto esteárico CAS-3. Se analizó la composición de ácidos grasos de las semillas mediante cromatografía de gases, tanto de las plantas parentales como de las sucesivas cosechas.

Durante la puesta a punto del método se utilizaron estas mismas líneas alto oleico y los resultados previos que obtuvimos nos hicieron descartar varias de ellas: Líneas VHO-17, BK-10, AF-43, AF-44, AB-99, HO20-4 y HO1-1. Estas líneas mostraban un patrón de marcaje de ácidos grasos inestable que variaba entre una generación y la siguiente, lo que nos recomendaba prescindir de ellas si queríamos obtener resultados reproducibles.

1.2. Incubaciones de semillas de líneas de girasol alto-oleico con [2-¹⁴C]acetato.

En este experimento se incubaron semillas de 15 DDF procedentes de líneas alto-oleico con [2-¹⁴C]acetato, tras lo cual se analizó dentro de la fracción de TAG el patrón de marcaje radiactivo en los ácidos grasos saturados sintetizados *de novo* (Figura II.2). Este mismo ensayo se llevó a cabo a semillas de 15 DDF del mutante alto-oleico HAOL-9 y los mutantes alto saturado CAS-3 y CAS-5, que sirvieron como controles.

Ninguna de las líneas alto-oleico ensayadas tenía un patrón de marcaje de ácidos grasos saturados similar al de las líneas mutantes alto saturado CAS-3 ni CAS-5, con buenas tioesterasa para 18:0-ACP y 16:0-ACP, respectivamente. A pesar de lo cual, entre estas líneas alto-oleico, se observaba perfectamente un patrón de marcaje diferente en 18:0. Así, las líneas AF-47 y AU-60 tenían unos porcentajes elevados de 18:0; otras líneas como la AB-88 o la HO6-7 tenían unos porcentajes bajos, mientras que las líneas AB-65, AB-73, AB-95 y AC-01 tenían unos porcentajes medios y similares a los de la línea alto-oleico control HAOL-9.

Tras estos análisis previos, las líneas AF-47 y AU-60 fueron seleccionadas por mostrar un comportamiento mejor, las líneas AB-95 y AC-01 por mostrar un comportamiento similar y la línea HO6-7 por mostrar uno peor que la línea control HAOL-9, y todas se pusieron a crecer para así obtener semillas de 15 DDF a las que hacer los ensayos de incubación con

[¹⁴C]acetato y MV. Las mismas plantas alto-oleico seleccionadas se usaron además como donadoras de polen con el que llevar a cabo los cruces con las plantas CAS-3. El diseño del experimento completo se esquematiza en la Figura II.1. Para simplificar la forma de mostrar los resultados cada línea seleccionada se recodificó de la siguiente manera:

| | | | | | |
|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Línea: | <u>AB-95</u> | <u>HO6-7</u> | <u>AF-47</u> | <u>AU-60</u> | <u>AC-01</u> |
| Código: | A | C | D | E | F |

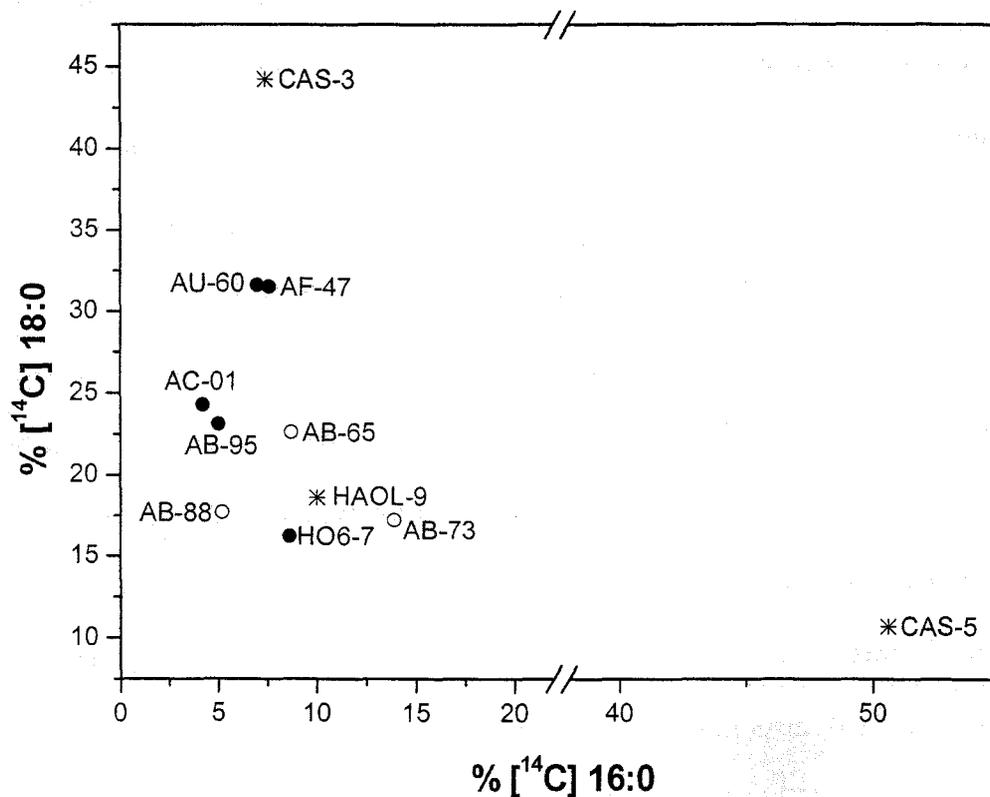


Figura II.2. Representación del porcentaje de ácido esteárico (18:0) frente a ácido palmítico (16:0) marcados radiactivamente procedentes de la fracción de TAG de semillas de 15 DDF incubadas con [¹⁴C]acetato. (○) Líneas alto-oleico no utilizadas para los cruces; (●) Líneas alto-oleico utilizadas para los cruces; (*) Líneas control. Los datos son promedio de al menos 3 incubaciones con distintas plantas.

1.3. Incubaciones de semillas de girasol alto-oleico con [2-¹⁴C]acetato y metil viológeno.

Tal y como se mostró en el Bloque I, el análisis del patrón de marcaje radioactivo de ácidos grasos de semillas en desarrollo tras incubaciones con [2-¹⁴C]acetato y metil viológeno (MV), proporciona información sobre las potencialidades que tienen esas semillas por sintetizar más o menos cantidad de ácidos grasos saturados, y en particular ácido esteárico, cuando se encuentran en un ambiente desfavorable para la síntesis de 18:1. El metil viológeno secuestra poder reductor del medio, impidiendo que el 18:0 sintetizado pueda desaturarse al mismo ritmo al que lo haría en su ausencia, mimetizando así el efecto que causaría en esas semillas una mutación de pérdida de actividad en la actividad estearil-ACP desaturasa (SAD). De esta manera conseguimos una fenocopia de un mutante alto esteárico al bloquear químicamente la conversión de ácido esteárico en ácido oleico (Figura II.3).

Nuestra hipótesis presuponía que aquellos alelos presentes en las líneas alto oleico que fueran favorables para la síntesis de ácidos grasos saturados, frente a una acumulación de ácido esteárico intraplastidial debida a MV, favorecerán que continúen todas las reacciones de acumulación de este hasta la síntesis de TAG más eficientemente de lo que lo harían otras líneas alto-oleico normales como HAOL-9. En consecuencia, estos alelos favorables serían capaces de sintetizar 18:0, disponible para la síntesis de TAG, a una tasa más elevada. Por ejemplo porque se les estaría eliminando la competencia ejercida por 18:1 sobre 16:0 y 18:0 a la hora de ser exportados al citosol. Por el contrario, aquellas líneas alto-oleico con peores alelos para la síntesis de saturados, para idénticas cantidades de inhibidor, serían capaces de sintetizar 18:0 a una tasa inferior.

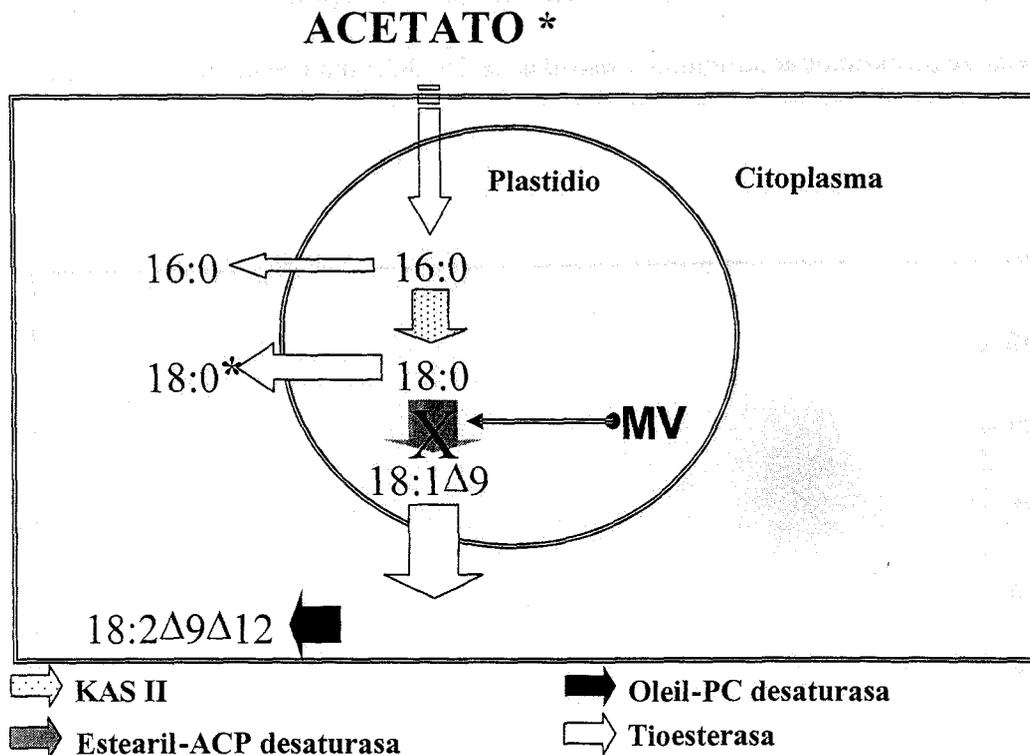


Figura II.3. Esquema del efecto del metil viológeno (MV) sobre la síntesis intraplasmática de ácidos grasos, en presencia de [^{14}C]acetato.

Como hemos indicado anteriormente, semillas de 15 DDF procedentes de las líneas alto-oleico utilizadas para los cruces, se incubaron con distintas concentraciones de MV (0-20 mM) y se midió el patrón de marcaje de ácidos grasos dentro de la fracción de TAG. Para expresar la respuesta de cada una de las líneas por sintetizar 18:0 ante la bajada en la síntesis de 18:1, medimos la relación existente entre el marcaje presente en 18:0 y los AGML frente al marcaje presente en los productos de insaturación, 18:1 y 18:2, al que denominamos *índice de saturación*. El porcentaje de AGML que se tuvo en cuenta a la hora de definir este índice fue el incremento que en su síntesis causaba la presencia del inhibidor, y no su valor absoluto que asumimos era consecuencia de las elongasas externas (Figura II.4). Este análisis no pudo

realizarse a plantas de la línea C, ya que a pesar de que los capítulos produjeron polen, no fueron capaces de proporcionar suficientes semillas de 15 DDF para realizar las incubaciones.

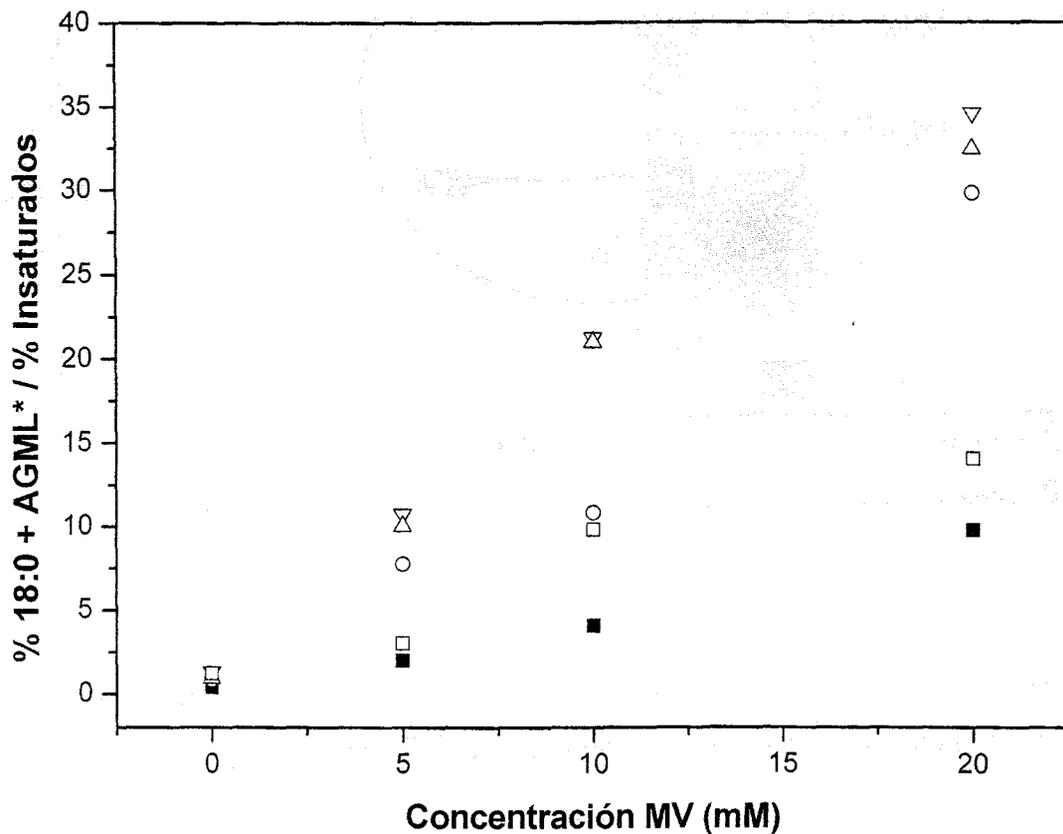


Figura II.4. Índice de saturación expresado como % $[^{14}\text{C}](18:0 + \text{AGML}^*) / \% [^{14}\text{C}]\text{insaturados}$ en función de la concentración del inhibidor metil viológeno (MV). Las líneas alto-oleico de girasol ensayadas fueron: A (-□-), F (-○-), D (-△-), E (-▽-) y el control alto-oleico HAOL-9 (-■-). Los datos son promedio de 3 plantas distintas, con al menos dos repeticiones por planta.

Las líneas alto-oleico D y E, eran las que tenían un índice de saturación mayor para las distintas concentraciones del inhibidor, mientras que las líneas F y A siempre tenían el índice menor, observándose las mayores diferencias entre líneas cuando la concentración del

inhibidor era 10 mM. Para todas las concentraciones ensayadas la línea control alto-oleico HAOL-9 tenía el índice más bajo

2. CRUCES ALTO-OLEICO X CAS-3.

2.1. Análisis de la primera generación F₁.

En semillas de girasol el carácter alto-oleico tiene dominancia completa sobre el bajo contenido de 18:1 de su aceite (Urie, 1985; Fernández-Marínez *et al.*, 1989). Por otro lado, Pérez-Vich *et al.* (2000) cuando cruzaron la línea mutante alto-oleico HAOL-9 con plantas mutantes alto-esteárico CAS-3 no observaron efecto materno en los cruces recíprocos.

Basándonos en estos datos previos, decidimos que las plantas alto-oleico actuaran como parentales donadores de polen (AOP) y que los capítulos de las plantas alto esteárico CAS-3 actuaran como receptoras en estos cruces. Procediendo de esta manera detectaríamos si había ocurrido cruce, analizando la composición de ácidos grasos de las semillas formadas sobre el capítulo de las plantas CAS-3. Aquellas semillas con un porcentaje de 18:1 similar al del parental CAS-3, no habrían recibido polen de las plantas alto-oleico y podrían descartarse como miembros de la población F₁.

Se recogió polen de los distintos parentales alto-oleico y se depositó sobre los capítulos de plantas CAS-3, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Posteriormente se analizó la composición de ácidos grasos de las semillas generadas sobre los capítulos CAS-3, así como de las semillas de las plantas que actuaron como donadores de polen (Tabla II.3 y Figura II.5).

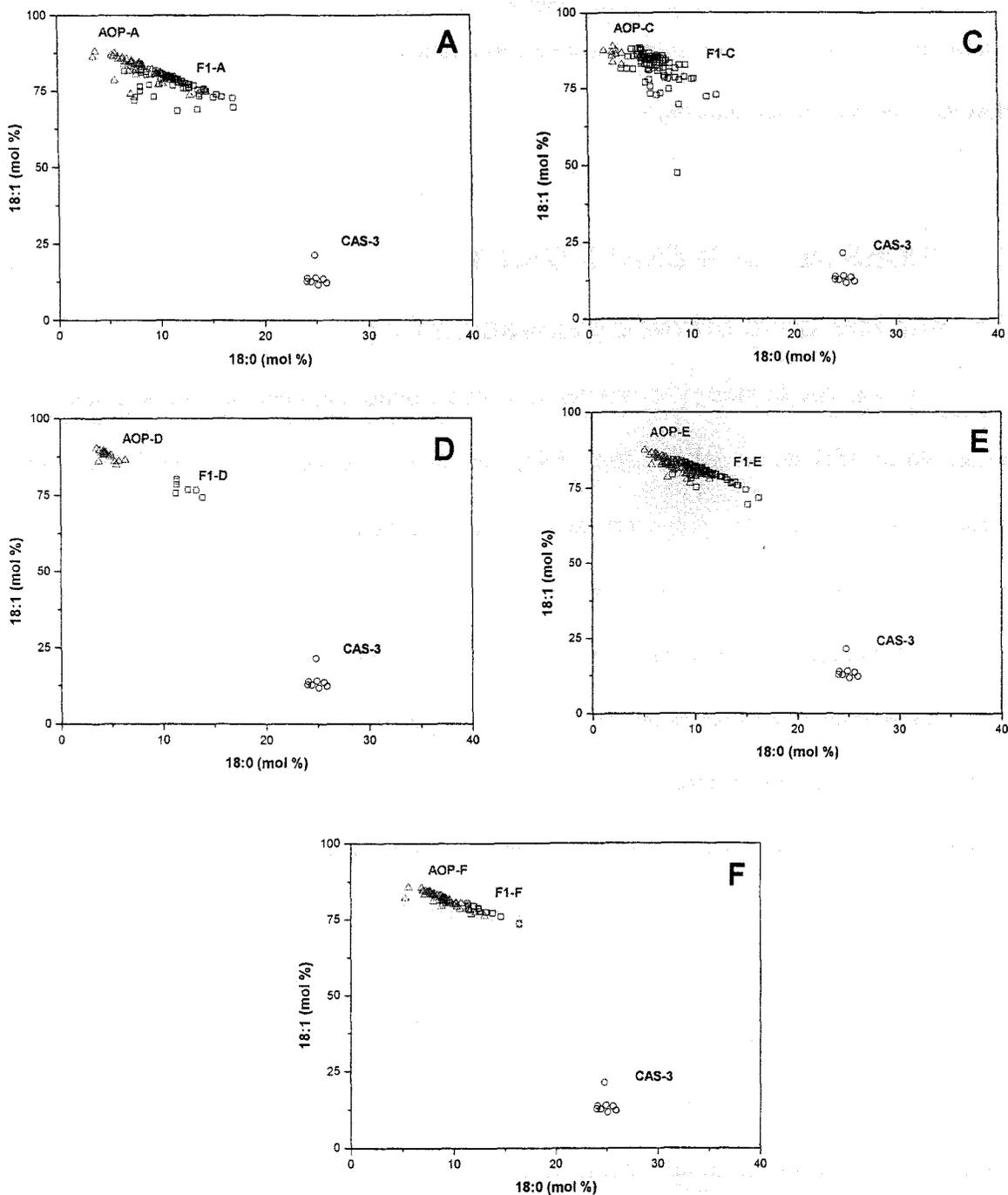


Figura II.5. Representación de ácido esteárico (18:0) frente a ácido oleico (18:1) en semillas de cosecha F_1 y sus correspondientes líneas parentales: parental alto-oleico donador de polen (AOP) y parental alto-esteárico receptor de polen (CAS-3).

El contenido de 18:0 en las medias semillas F_1 fue significativamente diferente del contenido presente en el parental CAS-3 ($24,9 \pm 0,7$), y del contenido presente en los parentales alto-oleico (t-test, $P = 0,05$). Por otro lado, el contenido de 18:0 en las semillas F_1 fue más bajo que el valor del medio parental $[(18:0_{CAS-3} + 18:0_{AOP})/2]$, indicando la dominancia parcial del carácter bajo 18:0 sobre el carácter alto contenido de 18:0, tal y como había sido descrito previamente por Pérez-Vich *et al.* (1999)

Tabla II.3. Composición de ácidos grasos de semillas de plantas alto-oleico donadoras de polen (AOP), procedentes de distintas líneas alto-oleico (A, C, D, E y F), de plantas mutantes CAS-3 receptoras de polen y de sus respectivos híbridos F_1 ^(a)

| Material ^(*) | 16:0 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 20:0 | 22:0 |
|--------------------------|-----------|------------|------------|------------|-----------|-----------|
| Parentales | | | | | | |
| CAS-3 ⁽⁹⁾ | 6,8 ± 0,4 | 24,9 ± 0,7 | 14,0 ± 3,3 | 51,6 ± 3,0 | 1,4 ± 0,2 | 1,4 ± 0,2 |
| AOP-A ⁽⁴⁶⁾ | 4,7 ± 1,0 | 8,0 ± 2,2 | 82,3 ± 3,8 | 2,5 ± 1,6 | 0,8 ± 0,3 | 1,7 ± 0,4 |
| AOP-C ⁽¹⁰⁾ | 5,7 ± 0,7 | 2,6 ± 0,5 | 86,0 ± 2,0 | 4,0 ± 1,2 | 0,5 ± 0,1 | 1,3 ± 0,2 |
| AOP-D ⁽²⁰⁾ | 4,2 ± 0,3 | 4,6 ± 0,7 | 88,1 ± 1,5 | 1,6 ± 0,8 | 0,4 ± 0,1 | 1,2 ± 0,2 |
| AOP-E ⁽⁶⁸⁾ | 4,5 ± 0,4 | 8,9 ± 2,0 | 81,6 ± 2,5 | 2,4 ± 1,1 | 0,8 ± 0,2 | 1,8 ± 0,3 |
| AOP-F ⁽⁷⁰⁾ | 4,7 ± 0,5 | 8,9 ± 1,4 | 81,8 ± 2,1 | 1,9 ± 0,6 | 0,8 ± 0,1 | 1,9 ± 0,3 |
| F_1 | | | | | | |
| F_1 -A ⁽⁸²⁾ | 4,5 ± 0,3 | 11,3 ± 2,1 | 77,9 ± 3,1 | 3,1 ± 2,2 | 1,0 ± 0,2 | 2,2 ± 0,3 |
| F_1 -C ⁽⁸⁹⁾ | 4,6 ± 0,7 | 6,7 ± 1,6 | 82,2 ± 5,5 | 4,4 ± 4,3 | 0,7 ± 0,2 | 1,4 ± 0,3 |
| F_1 -D ⁽⁷⁾ | 4,8 ± 0,5 | 12,2 ± 1,1 | 77,3 ± 2,1 | 2,3 ± 1,1 | 1,0 ± 0,1 | 2,3 ± 0,4 |
| F_1 -E ⁽⁸²⁾ | 4,3 ± 0,8 | 10,9 ± 1,8 | 80,2 ± 2,7 | 2,0 ± 1,0 | 0,9 ± 0,1 | 1,8 ± 0,3 |
| F_1 -F ⁽⁷¹⁾ | 4,5 ± 0,3 | 13,0 ± 1,6 | 77,7 ± 2,0 | 1,5 ± 0,3 | 1,0 ± 0,1 | 2,2 ± 0,1 |

(a) Los ácidos grasos se expresan en mol % y son media ± desviación estándar. (*) Indica el número de semillas analizadas

El contenido de 18:1 en la F_1 respecto del contenido de su respectivo AOP seguía un patrón fijo. Así, en todos los cruces realizados, el contenido de 18:1 fue significativamente distinto del contenido de 18:1 del AOP (t-test, $P = 0.05$) (Tabla II.3), a pesar de que escogimos solo semillas alto-oleico para asegurarnos que el cruce se había producido. Los datos obtenidos fueron similares a los descrito por Pérez-Vich *et al.* (2000) al cruzar plantas CAS-3 con el mutante alto-oleico HAOL-9, quienes sólo describieron pequeñas diferencias entre el contenido de 18:1 de las medias semillas F_1 y el del parental HAOL-9 (83,4-82,4 y 85,8, respectivamente). Todo lo cual confirmaba que se habían producido los cruces y que el carácter alto-oleico se heredaba con dominancia completa sobre el bajo contenido en ácido oleico, tal y como habían propuesto anteriormente Urie (1985), Fernández-Martínez *et al.* (1989) y Pérez-Vich *et al.* (2000).

2.2. Análisis de la segunda generación F_2 .

Plántulas procedentes de todas las semillas F_1 obtenidas de los diferentes cruces, así como de sus respectivos parentales, se trasplantaron a invernadero en la primavera del 2003 y se analizó la composición de ácidos grasos de las semillas F_2 resultantes de cada uno de los cruces (Tabla II.4 y Figura II.6). Del comportamiento agronómico de los híbridos F_1 hay que destacar que ninguna de las semillas F_1 de la línea A consiguió germinar, y aquellas que germinaron no consiguieron alcanzar el desarrollo fisiológico

Para el análisis genético, el contenido de 18:0 se asignó a dos clases fenotípicas distintas: bajo-intermedio contenido en esteárico ($18:0 \leq 19,5\%$) y alto contenido en esteárico ($18:0 > 19,5\%$). Todas las poblaciones F_2 analizadas se ajustaban a una segregación 15:1 (bajo-intermedio:alto) encontrándose los estadísticos de prueba por debajo del valor teórico para 1 grado de libertad y un nivel de significación del 0,95. Los valores de los estadísticos de

prueba estaban dentro del rango descrito por Pérez-Vich *et al.* (2000) para el cruce entre CAS-3 y HAOL-9, modificación de una segregación 1:14:1 (bajo:intermedio:alto) y la herencia del carácter alto-esteárico era consistente con los resultados previos descritos por Pérez-Vich *et al.* (1999).

Para el análisis genético, el contenido de 18:0 se asignó a dos clases fenotípicas distintas: bajo-intermedio contenido en esteárico ($18:0 \leq 19,5\%$) y alto contenido en esteárico ($18:0 > 19,5\%$). Todas las poblaciones F₂ analizadas se ajustaban a una segregación 15:1 (bajo-intermedio:alto) encontrándose los estadísticos de prueba por debajo del valor teórico para 1 grado de libertad y un nivel de significación del 0,95. Los valores de los estadísticos de prueba estaban dentro del rango descrito por Pérez-Vich *et al.* (2000) para el cruce entre CAS-3 y HAOL-9, modificación de una segregación 1:14:1 (bajo:intermedio:alto) y la herencia del carácter alto-esteárico era consistente con los resultados previos descritos por Pérez-Vich *et al.* (1999). De igual forma, el contenido de 18:1 en las poblaciones F₂ se asignó a dos clases de fenotipos: bajo-intermedio contenido en oleico ($18:1 \leq 62\%$) y alto contenido en oleico ($18:1 \geq 62\%$). Tres de las cuatro poblaciones F₂ estudiadas se ajustaban satisfactoriamente ($p < 0,05$) a una segregación 1:3 (bajo-intermedio:alto), mientras que la población F₂-D no se ajustaban a ninguna de las segregaciones esperadas para dos alelos *Ol* responsables del carácter oleico ($p < 0,05$) (Tabla II.4).

Tabla II.5. Herencia teórica del contenido en ácido esteárico (18:0) y en ácido oleico (18:1). B-I, porcentaje bajo-intermedio; A, porcentaje alto.

| Relación 1:3 | | 18:0 | |
|--------------|-------|------|---|
| | | B-I | A |
| | | 15 | 1 |
| 18:1 | B-I 1 | 15 | 1 |
| | A 3 | 45 | 3 |

| Relación 7:9 | | 18:0 | |
|--------------|-------|------|---|
| | | B-I | A |
| | | 15 | 1 |
| 18:1 | B-I 7 | 105 | 7 |
| | A 9 | 135 | 9 |

Tabla II.4. Distribución de frecuencia y análisis de Chi-Cuadrado para el contenido de 18:0 y 18:1 en semillas de plantas F₂, así como el índice de % [¹⁴C](18:0 + AGML*) / % [¹⁴C]insaturados a 10 mM de MV, procedentes del cruce de CAS-3 con distintas líneas alto-oleico (a)

| Línea alto-oleico | Índice 10 mM | F ₂ | Nº de semillas F ₂ | | | | Estadístico de prueba (p) | | | | |
|-------------------|--------------|-------------------|-------------------------------|----------|----------|--------|---------------------------|----------------|----------------|-------------------|----------------|
| | | | Fenotipos | | | | Clases independientes | | | Clases combinadas | |
| Código | | | B-I 18:0 | B-I 18:0 | A 18:0 | A 18:0 | 18:0 | 18:1 | | 18:0 y 18:1 | |
| | | | B-I 18:1 | A 18:1 | B-I 18:1 | A 18:1 | 15:1 [B-I : A] | 1:3 [B-I : A] | 7:9 [B-I : A] | 15:45:1:3 | 105:135:7:9 |
| A | 9.8 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| C | — | F ₂ -C | 54 | 133 | 5 | 0 | 5.63 (0.02) | 2.93 (0.09) | | 11.21 (0.01) | |
| D | 21.0 | F ₂ -D | 69 | 175 | 21 | 3 | 3.35 (0.07) | 10.53 (<0.001) | 11.26 (<0.001) | 76.08 (<0.001) | 52.61 (<0.001) |
| E | 21.2 | F ₂ -E | 113 | 495 | 30 | 15 | 0.46 (0.50) | 3.35 (0.07) | | 67.51 (<0.001) | |
| F | 10.8 | F ₂ -F | 44 | 141 | 7 | 0 | 2.22 (0.14) | 0.25 (0.62) | | 14.62 (0.00) | |

(a) Los límites entre las diferentes clases aparecen en el texto. A= Alto, I= Intermedio, B= Bajo. Las proporciones observadas dentro de cada clase fenotípica se compararon con las esperadas utilizando la prueba chi-cuadrado de bondad de ajuste. Se indica el valor del estadístico de prueba y el valor p de probabilidad para 1 grado de libertad (clases independientes) y 3 grados de libertad (clases combinadas). $\chi^2_{[0.95, 1]} = 3,84$ y $\chi^2_{[0.95, 3]} = 7,82$. Si χ^2 calculado es $< \chi^2_{[\alpha, n]}$ se considera entonces que la población se ajusta a la segregación esperada. (*) Número total de semillas F₂ analizadas; p, valor probabilidad.

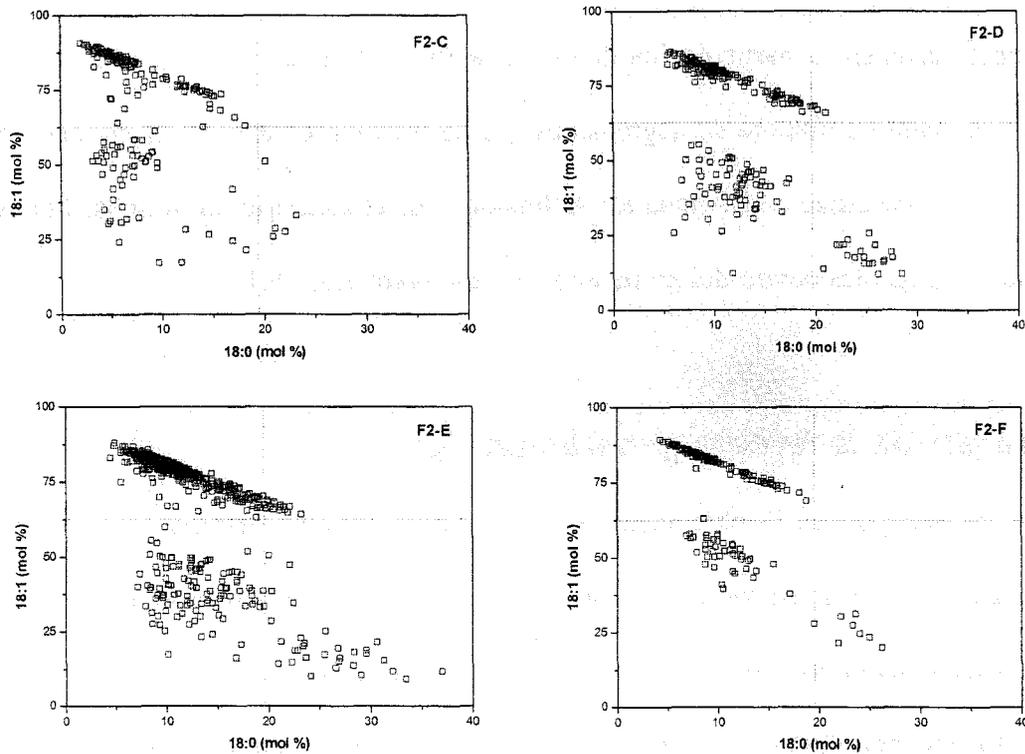


Figura II.6. Representación del ácido esteárico (18:0) frente al ácido oleico (18:1) en semillas de plantas F_2 crecidas a partir de las semillas F_1 procedentes del cruce entre CAS-3 y los distintos parentales alto-oleico

El buen ajuste de varias de las poblaciones F_2 a una segregación 15:1 (B-I 18:0 : A 18:0) para esteárico y 1:3 (B-I 18:1 : A 18:1) ó 7:9 (B-I 18:1 : A 18:1) para oleico, haría esperar que al estudiar conjuntamente ambos caracteres, obtuviéramos un ajuste de la población F_2 a una segregación 15:45:1:3, para una relación 1:3 de oleico o una 105:135:7:9 para una relación 7:9 de oleico (Tabla II.5). Sin embargo, ninguna de las poblaciones se ajustó satisfactoriamente a esta segregación combinada, a pesar de que aparecieron semillas con carácter alto-esteárico en fondo alto-oleico (Tabla II.4 y Figura II.6). Estos resultados apoyaban la idea propuesta por Pérez-Vich *et al*, (2000) acerca de la existencia de un

ligamiento génico entre los caracteres alto-oleico y alto esteárico, posteriormente ratificada por los estudios de localización cromosómica propuestos por Pérez-Vich *et al*, (2004b).

Como resumen, a partir de los datos de la F₂, podríamos concluir que las mejores resultados en cuanto a número de segregantes que se incluían dentro del grupo alto 18:0 en fondo alto 18:1, procedían de las línea E y la línea D. Por el contrario, ni la línea C ni la línea F producían segregantes dentro del grupo alto 18:0 en fondo alto 18:1.

2.3. Análisis de la tercera generación F₃.

De las poblaciones F₂ obtenidas, se seleccionaron aquellas semillas con carácter alto esteárico (18:0 > 19,5%) en fondo alto-oleico (18:1 > 62,0%), se pusieron a germinar y las plántulas resultantes junto con las procedentes de semillas de sus respectivos parentales alto-oleico y alto esteárico CAS-3, se transplantaron y cultivaron en invernadero la primavera del 2004. No todas las plantas F₃ produjeron capítulos con semillas. El porcentaje de capítulos con semillas vanas osciló entre el 54% para plantas F₃ procedentes del cruce CAS-3 x línea E y el 25% para las plantas F₃ procedentes del cruce CAS-3 x línea D.

Se analizaron las semillas de las plantas F₃ resultantes así como la cosecha de las plantas parentales (Tabla II.6 y Figuras II.7 a Figura II.8). Para poder comparar poblaciones F₃ entre sí y definir cual de los segregantes era la mejor expresando el carácter alto saturado, agrupamos las semillas diferenciando entre alto, medio y bajo contenido en 18:1. Basándonos en la composición de ácidos grasos de cada población, se definieron los siguientes rangos:

- Alto-oleico (A 18:1): 18:1 > 58%
- Medio oleico (M 18:1): 30% < 18:1 < 58%
- Bajo oleico (B 18:1) 18:1 < 30 %

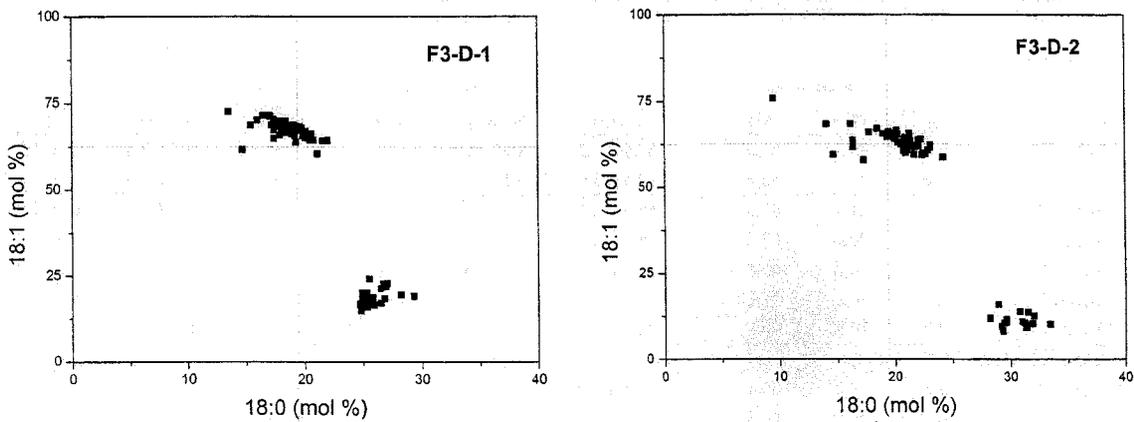


Figura II.7. Representación de ácido esteárico (18:0) frente a ácido oleico (18:1) en semillas maduras F_3 de plantas crecidas a partir de semillas F_2 de los cruces CAS-3 x Línea D.

Dentro de cada una de estas clases, se analizó el contenido en 18:0 (Tabla II.6). De los segregantes alto contenido en esteárico en fondo alto oleico (**A 18:1**), aquellos con mayor porcentaje de esteárico fueron las F_3 -D-2 y F_3 -E-2 (II.8). Mientras que de los segregantes bajo contenido en oleico (**B 18:1**), los mayores niveles de esteárico aparecieron en las F_3 -D-2 y F_3 -E-2 (II.8), superando incluso al contenido en esteárico de los mutantes CAS-3 ($30,2 \pm 2,0$ y $28,2 \pm 2,6$, respectivamente frente a un $25,6 \pm 5,4$) (Tabla II.6). Este hecho se explicaría por la presencia en sus respectivas líneas parentales D y E de nuevos alelos favorables al mayor contenido en esteárico en fondo alto-oleico, que en combinación con los alelos *es1* y *es2* presentes en la línea mutante parental CAS-3, contribuirían a incrementar el contenido de esteárico. Los resultados derivados del análisis de los segregantes F_2 y F_3 obtenidos confirman de esta manera nuestras hipótesis de partida.

Tabla II.6. Análisis del contenido en 18:0 y 18:1 en semillas de las distintas poblaciones F₃ procedentes del cruce entre distintas líneas alto-oleico y el mutante alto esteárico CAS-3. También se indica el contenido en 18:0 y 18:1 en semillas procedentes de plantas mutante CAS-3, también cultivadas en invernadero durante la primavera del 2004^(a)

| F ₃ (*) | 18:0 y 18:1 en semillas F ₂ | | Clase en la que se agrupa cada segregación F ₃ | | | | | | |
|------------------------|--|------|---|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Fig. | 18:0 | 18:1 | A 18:1 | % 18:0 | M 18:1 | % 18:0 | B 18:1 | % 18:0 |
| F3-D-1 ⁽⁹⁶⁾ | II.6 | 20,0 | 68,2 | 67,4 ± 2,2 | 18,6 ± 1,5 | — | — | 18,7 ± 2,4 | 25,8 ± 1,2 |
| F3-D-2 ⁽⁶⁷⁾ | II.6 | 21,1 | 65,8 | 63,4 ± 3,0 | 20,2 ± 2,6 | — | — | 11,1 ± 1,9 | 30,2 ± 2,0 |
| F3-E-1 ⁽⁴⁹⁾ | II.7 | 21,1 | 65,5 | 67,5 ± 3,1 | 19,1 ± 1,8 | — | — | 19,1 ± 4,5 | 26,6 ± 2,9 |
| F3-E-2 ⁽³¹⁾ | II.7 | 20,6 | 67,8 | 70,5 ± 2,3 | 17,9 ± 1,5 | — | — | — | — |
| F3-E-3 ⁽⁴⁵⁾ | II.7 | 20,2 | 66,8 | 73,8 ± 3,4 | 9,6 ± 1,8 | — | — | 27,0 ± 7,0 | 10,3 ± 1,8 |
| F3-E-4 ⁽⁴⁴⁾ | II.7 | 30,6 | 21,6 | — | — | — | — | 19,9 ± 3,4 | 25,5 ± 2,1 |
| F3-E-5 ⁽²⁷⁾ | II.7 | 20,9 | 66,5 | 76,5 ± 2,6 | 6,6 ± 1,7 | 44,6 ± 6,5 | 9,3 ± 2,9 | 20,4 ± 6,0 | 5,7 ± 2,4 |
| F3-E-1 ⁽²⁵⁾ | II.8 | 32,1 | 11,9 | — | — | — | — | 8,4 ± 0,8 | 21,9 ± 2,2 |
| F3-E-2 ⁽⁹⁶⁾ | II.8 | 19,8 | 66,1 | 61,6 ± 3,0 | 21,7 ± 2,5 | 47,1 ± 5,7 | 25,7 ± 1,4 | 10,6 ± 3,1 | 28,2 ± 2,6 |
| F3-E-4 ⁽⁹⁶⁾ | II.8 | 21,2 | 66,5 | 67,9 ± 5,3 | 13,8 ± 2,8 | 49,9 ± 8,3 | 15,7 ± 4,1 | 11,2 ± 4,2 | 16,0 ± 4,3 |
| F3-E-6 ⁽⁹⁶⁾ | II.8 | 20,0 | 68,4 | 66,6 ± 2,9 | 19,5 ± 2,0 | 48,3 ± 6,3 | 25,0 ± 1,8 | 18,6 ± 3,4 | 27,4 ± 2,4 |
| F3-E-5 ⁽³⁹⁾ | II.8 | 21,6 | 65,7 | 65,3 ± 2,9 | 19,4 ± 1,1 | — | — | 20,1 ± 2,0 | 27,3 ± 1,5 |
| F3-E-3 ⁽⁹⁶⁾ | II.8 | 21,5 | 66,7 | 71,8 ± 3,2 | 15,4 ± 2,0 | — | — | — | — |
| F3-E-7 ⁽⁹⁶⁾ | II.8 | 19,7 | 66,2 | 68,2 ± 3,3 | 15,7 ± 1,8 | — | — | — | — |
| CAS-3 ⁽²⁴⁾ | — | — | — | — | — | — | — | 12,8 ± 2,3 | 25,6 ± 5,4 |

(a) Los datos numéricos están representados en las distintas figuras del texto (Figura II.5 a Figura II.8). A 18:1: alto-oleico (18:0 > 58%), M 18:1: medio oleico (30% < 18:0 < 58%) y B 18:1: bajo oleico (18:1 < 30%). (*) Indica el número de semillas analizadas. ⁽¹⁾ Subpoblación bajo esteárico (18:0 < 15%) y ⁽²⁾ subpoblación alto esteárico (18:0 > 15%).

Como indicamos en la Introducción, un alto contenido de ácido 18:0 en el aceite de semillas puede ser la consecuencia de la presencia de buenas actividades TE para 18:0-ACP, de la presencia de una actividad SAD disminuida que transforme poco eficientemente el 18:0-ACP en 18:1-ACP en el plastidio o bien la combinación de ambos caracteres. El análisis de la composición de ácidos grasos en el aceite de semilla nos informa del resultado final de un proceso acumulativo en el que ambas actividades están implicadas. Analizar la composición de ácidos grasos marcados tras el suministro de un sustrato radiactivo ofrece también una visión global pero limitada a un espacio temporal mucho más pequeño y de más fácil comprensión.

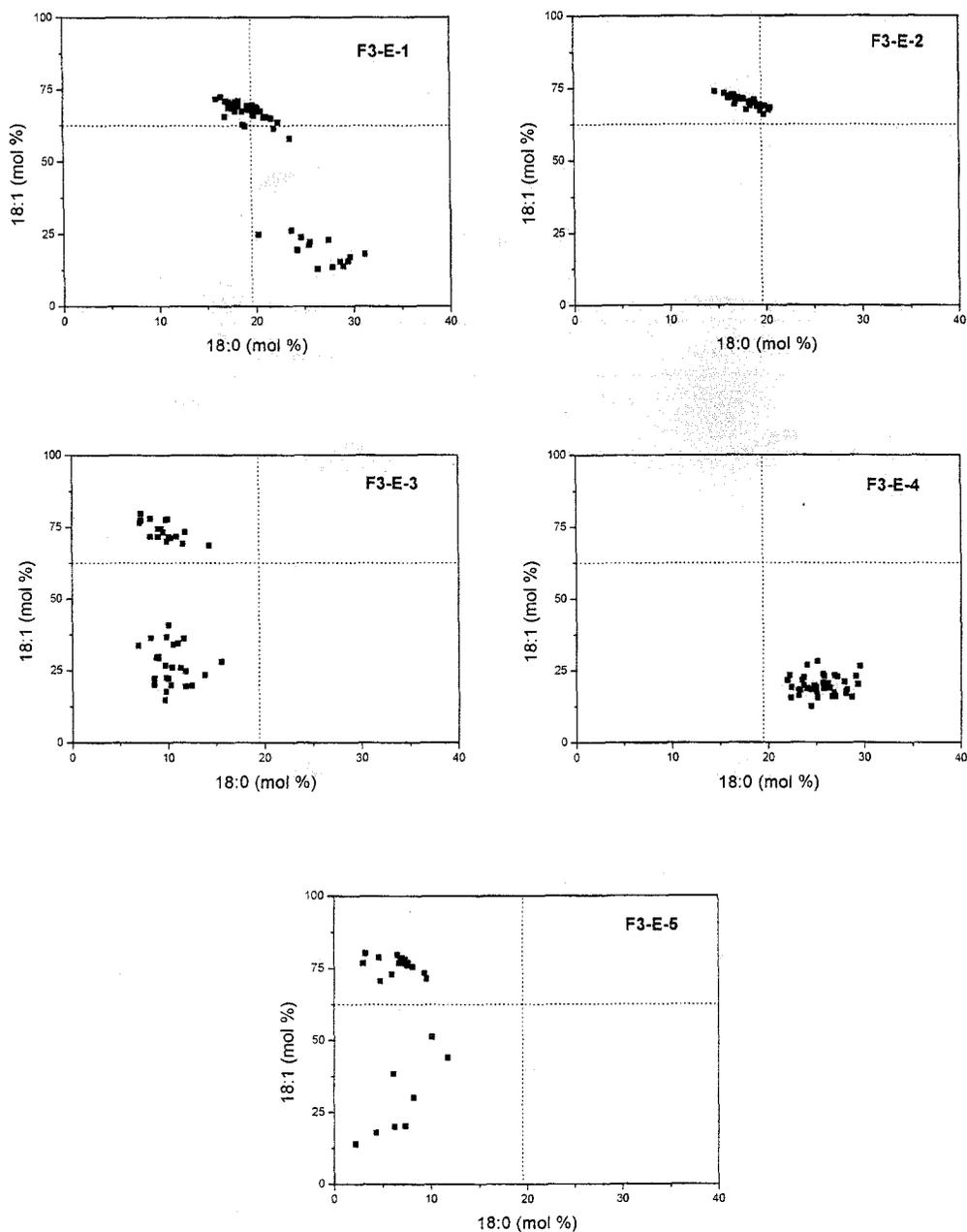


Figura II.8. Representación de ácido esteárico (18:0) frente a ácido oleico (18:1) en semillas F₃ de plantas crecidas a partir de semillas F₂ de los cruces CAS-3 x Línea E.

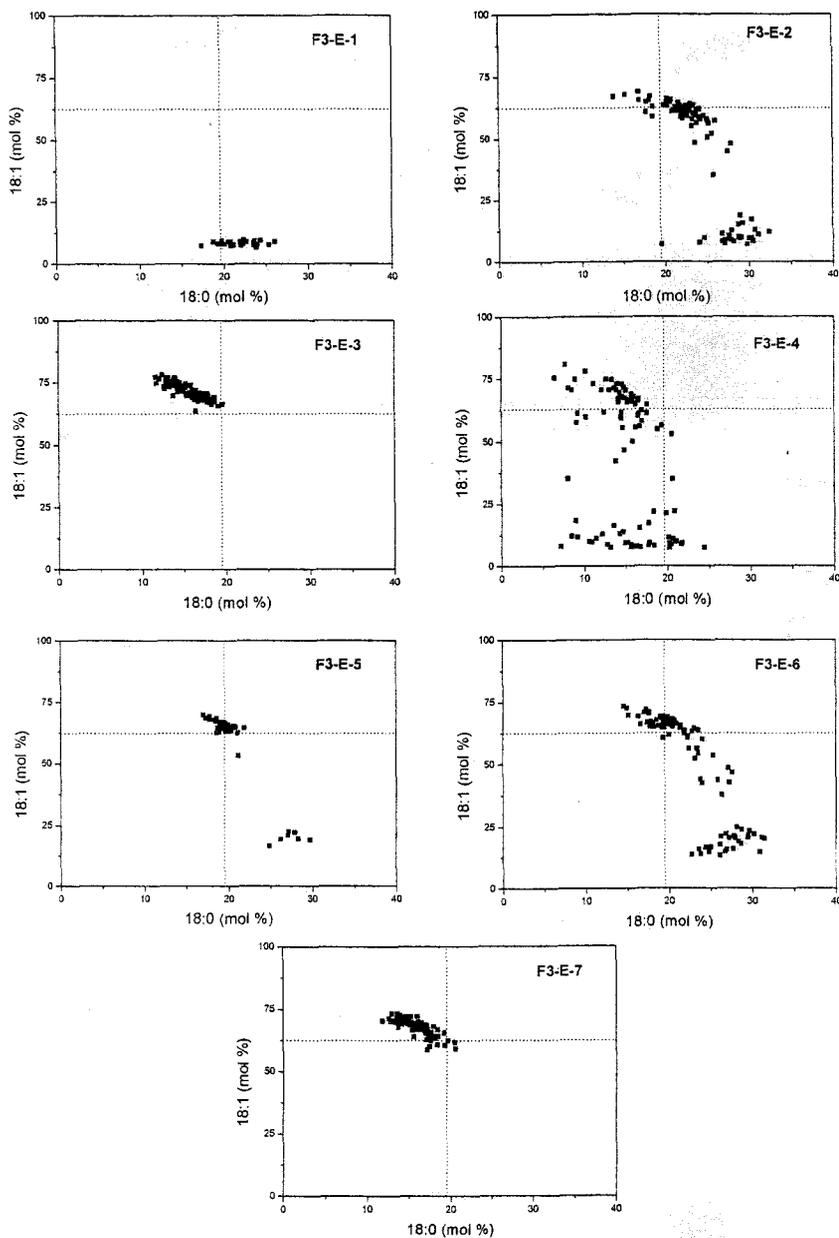


Figura II.9. Representación de ácido esteárico (18:0) frente a ácido oleico (18:1) en semillas F₃ de plantas crecidas a partir de semillas F₂ de los cruces CAS-3 x Línea E (continuación).

Nuestros resultados nos han mostrado que la composición final de ácidos grasos del aceite de semillas no puede ser utilizado como un criterio válido para la búsqueda de buenas actividades enzimáticas que favorezcan la síntesis de ácido esteárico, ya que líneas con bajo contenido de ácido esteárico en el aceite de semilla, como por ejemplo la línea D, poseen una combinación de alelos para la síntesis de 18:0, una vez que le hemos introducido el alelo alto esteárico *es1* de CAS-3, mejor que otras línea con mayor contenido de 18:0 en el aceite como la línea F, línea con malas actividades para la síntesis de 18:0 (ver Tabla II.1).

El análisis de la síntesis de ácidos en un espacio temporal limitado ha demostrado ser más eficaz a la hora de diferenciar estas capacidades (ver Figura II.1): La combinación del marcaje radiactivo junto con la adición de MV consigue mimetizar el efecto que en la ruta de síntesis de ácidos grasos causaría una mutación en la actividad SAD. Además de conseguir generar fenocopias de mutantes, posibilita diferenciar aun más las potencialidades presentes en cada una de las líneas.

Los resultados obtenidos en este capítulo muestran que es posible incrementar el contenido de ácido 18:0 en el aceite de semilla mucho más de lo que se ha conseguido hasta ahora, y además que es posible anticipar qué tipo de líneas de girasol alto-oleico son las más propicias para transmitir ese incremento. Así pues, concluimos que para desenmascarar los alelos mejores para incrementar el contenido de 18:0 en el aceite por cruces con líneas alto esteárico, se deberían incubar semillas de 15 DDF con [¹⁴C]acetato a una concentración 10 mM de metilviológico, analizar la composición de ácidos grasos marcados en la fracción de TAG y seleccionar aquellas líneas con un índice de saturación superior a 20.

**BLOQUE III: FUENTES DE CARBONO PARA EL METABOLISMO
PLASTIDIAL DE EMBRIONES DE GIRASOL EN DESARROLLO.**

Dado que la síntesis *de novo* de ácidos grasos ocurre en el interior de los plastidios, la purificación de los mismos era un paso necesario para estudiar el metabolismo del carbono a un nivel más específico que en el embrión completo.

Cuando iniciamos esta parte de la tesis, no se había publicado ningún estudio sobre el metabolismo en plastidios aislados en embriones de girasol, y por tanto no se disponía de un método para la obtención de los mismos. A pesar de lo cual sí que existían gran cantidad de métodos desarrollados para aislar plastidios de una gran variedad de tejidos vegetales. La mayor parte del trabajo experimental de esta parte de la tesis se desarrolló en una estancia en el Departamento de Colza, del Jonh Innes Center (Norwich, UK), por lo que aplicamos a girasol las mismas técnicas que allí disponían para el aislamiento de plastidios a partir de embriones de colza, técnicas desarrolladas por Kang (1995) y Eastmond (1998). Las variaciones de estos protocolos para su adaptación al caso concreto del girasol se llevaron a cabo gracias a los útiles consejos de los doctores Stephen Rawsthorne y Marilyn J. Pike.

1. PREPARACIÓN Y PROPIEDADES DE LOS PLASTIDIOS.

En el aislamiento de plastidios de embriones de colza Kang y Rawsthorne (1996) detectaron muy poca contaminación de la preparación de plastidios aislados por otros orgánulos como mitocondrias, RE o peroxisomas. Como nuestro objetivo era conseguir preparaciones funcionalmente activas de plastidios de girasol, nos preocupamos en asegurar que nuestras preparaciones estuvieran libres de marcadores citosólicos y enriquecidas en algún marcador plastidial.

1.1. Fosfofructoquinasa dependiente de pirofosfato (FFK-PPi).

Se ha descrito ampliamente esta actividad como marcador enteramente citosólico (Hill y Smith 1991; Kang y Rawsthorne, 1994). Durante el aislamiento de plastidios se fueron tomando alícuotas del homogeneizado inicial (HO), del sobrenadante de la primera centrifugación (SP), del primer precipitado o fracción cruda de los plastidios (P1) y del segundo precipitado o fracción lavada de plastidios (P2), fracción esta última que utilizaríamos para todos los ensayos posteriores. En cada una de estas fracciones se midió la actividad FFK-PPi (Tabla III.1).

Comprobamos que la mayor parte de esta actividad enzimática permanecía en el sobrenadante tras la primera centrifugación, y que se recuperaba en promedio menos del 0,4% en la fracción lavada de plastidios, llegando en ocasiones incluso a no detectarse.

1.2. Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH (GAPdH-NADPH).

Este marcador enzimático ha sido ampliamente utilizado para monitorizar la purificación de las preparaciones de plastidios en multitud de tejidos vegetales, y aunque en un principio se usó como marcador para la purificación de cloroplastos, Kang y Rawsthorne (1994) demostraron que en la fracción lavada de plastidios la recuperación de la actividad GAPdH-NADPH era idéntica a la de otro marcador plastidial la ADP-glucosa pirofosforilasa. En vista de las similitudes y dado que nos resultó muy difícil medir esta última actividad en plastidios de girasol, utilizamos la actividad GAPdH-NADPH para asegurarnos que las preparaciones que usábamos en los ensayos, además de carecer del marcador citosólico, estaban enriquecidas en un marcador plastidial. Para ello se midió esta actividad en el homogeneizado inicial y en la fracción lavada de las preparaciones de plastidios utilizadas.

Basandonos en la recuperación de esta actividad enzimática, pudimos calcular que el porcentaje de plastidios lavados con respecto al homogeneizado inicial estuvo en torno al 17.4% (Tabla III.1).

Tabla III.1. Recuperación del marcador plastidial, y confirmación de inexistencia de contaminación por componentes citosólicos durante el proceso de aislamiento de plastidios. Durante cada proceso de aislamiento de plastidios se midió la actividad del marcador citosólico fosfofructoquinasa dependiente de pirofosfato (FFK-PPi) y del marcador plastidial gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenada dependiente de NADP (GAPdH-NADP) en distintos pasos del proceso de aislamiento. Los valores se expresan como media \pm SD de las medidas hechas en al menos tres preparaciones de plastidios distintas ^(a)

| Fracción | FFK-PPi | | GAPdH-NADP | |
|----------|--|---------------------|--|---------------------|
| | Actividad (nmoles min ⁻¹ mg pf ⁻¹) | Recuperación (%) | Actividad (nmoles min ⁻¹ mg pf ⁻¹) | Recuperación (%) |
| TE | 2,49 \pm 0,30 | -nd | -nd | -nd |
| HO | 1,37 \pm 0,24 | -nd | 0,19 \pm 0,04 | -nd |
| SP | 1,37 \pm 0,22 | 100,4 \pm 1,3 | -nd | -nd |
| P1 | 0,02 \pm 0,01 | 0,1 \pm 1,6 | -nd | -nd |
| P2 | 0,00 \pm 0,03 | 0,4 \pm 0,1 | 0,034 \pm 0,005 | 17,6 \pm 2,8 |

^(a) La recuperación de cada fracción es la actividad medida en esa fracción expresada como porcentaje de la actividad encontrada en el homogeneizado inicial. La recuperación total (suma de todas las recuperaciones) estuvo entre 95.9% y 104.9%. TE (extracto total), HO (homogeneizado inicial), SP (sobrenadante), P1 (preparación cruda), P2 (preparación lavada de plastidios) y -nd (no determinado).

1.3. Actividad enolasa.

La integridad de los plastidios se midió usando la latencia de la actividad enolasa. Para todas las preparaciones de plastidios utilizadas se midió la diferencia entre el valor de esta actividad enzimática para plastidios intactos y para plastidios lisados en presencia de Triton-X-100, obteniéndose valores de latencia comprendidos entre 75-90%.

La recuperación de marcadores citosólicos y plastidiales, así como los valores de integridad medidos en las preparaciones de plastidios obtenidos de semillas de girasol fueron suficientes como para asegurar que el material con el que trabajábamos cumplía los requisitos básicos para ser utilizados en los experimentos de incorporación de sustratos al interior.

La nula recuperación del marcador citosólico FFK-PPi nos garantizaba una mínima contaminación de las preparaciones con fracciones de citosol. Utilizando el mismo protocolo de aislamiento de plastidios, Kang y Rawsthorne (1994) obtuvieron una recuperación para el mismo marcador muy similar a la obtenida para nuestras preparaciones de girasol ($0,20\% \pm 0,05$ frente a $0,40\% \pm 0,10$ obtenido en nuestros experimentos). En ese mismo estudio midieron la recuperación de marcadores específicos de otros orgánulos, como mitocondrias, retículo endoplasmático y peroxisomas. La recuperación de los correspondientes marcadores en la fracción lavada de plastidios no superó para ninguno de ellos valores por encima del 3,3%. Por lo que en vista de los resultados obtenidos en girasol para la recuperación de la actividad FFK-PPi, sería esperable tener una mínima contaminación por otros orgánulos distintos de los plastidios.

La recuperación de la actividad GAPdH-NADPH en las fracciones de plastidios ensayadas, fue en promedio del 17,6% (Tabla III.1). Estos valores son similares a los encontrados en la purificación de plastidios de otras especies vegetales como endospermo de trigo (20%) (Tetlow *et al*, 1993) y semillas de colza en desarrollo (10,8%-9,4%) (Kang y

Rawsthorne, 1994; Hutching *et al.*, 2004), plastidios ampliamente utilizados para el estudio de la incorporación de sustratos.

Por último, los valores de integridad, obtenidos para las preparaciones de plastidios de girasol, fueron muy similares a los encontrados usando este mismo método en plastidios aislados de endospermo de ricino (Smith *et al.* 1992) y en plastidios aislados de semillas de colza en desarrollo (Eastmond *et al.*, 1997).

Por tanto, los plastidios aislados a partir de semillas de girasol en desarrollo utilizando el método propuesto por Kang y Rawsthorne (1994) eran fisiológicamente activos, tenían poca contaminación de fracciones citosólicas y la proporción de plastidios íntegros era más que suficiente para ser utilizados en el estudio del transporte de metabolitos a través de la membrana.

2. FUENTES DE CARBONO PARA LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS EN PLASTIDIOS.

Los datos presentados en la sección anterior sugerían que las preparaciones de plastidios aislados eran en gran parte metabólicamente activas, sin embargo siempre debería contarse con la existencia de contaminaciones con orgánulos distintos a los plastidios y dicha contaminación podría llegar a afectar a los experimentos de incorporación de sustratos. Así por ejemplo, piruvato exógeno podría utilizarse por las mitocondrias y transformarse enzimáticamente en acetato, y este entrar en los plastidios y servir para la síntesis de ácidos grasos. Por otro lado, ácidos grasos sintetizados en el plastidio podrían utilizarse para sintetizar lípidos en el retículo endoplásmico. Para evitar esta posibilidad y asegurar una directa incorporación de los distintos sustratos suministrados, se determinó para cada metabolito la tasa de síntesis de ácidos grasos tanto para plastidios intactos como para

plastidios rotos, y además estas tasas de síntesis se determinaron bajo las mismas condiciones *in vitro* para todos los substratos ensayados.

Tal y como se indicó en la Introducción, varios intermediarios citosólicos de la glicólisis podrían potencialmente servir como substratos para la síntesis de ácidos grasos en plastidios de semillas de girasol en desarrollo. Ya que no se disponía de ningún dato *a priori*, decidimos utilizar aquellos intermediarios glicolíticos que habían sido descritos como principales suministradores de carbono para distintas especies vegetales. Y a partir de los datos obtenidos desarrollar una hipótesis.

Por esta razón los intermediarios glicolíticos utilizados fueron: glucosa-6-fosfato (Glc6P), malato, piruvato y acetato. La Glc6P porque había sido descrito como principal substrato para la síntesis de ácidos grasos en plastidios de semillas de colza en desarrollo. Malato, piruvato y acetato, porque representan tres rutas distintas generadoras de acetil-CoA en el interior del plastidio y porque los dos primeros habían sido descritos como principales suministradores de carbono para la síntesis de ácidos grasos en plastidios aislados de endospermo de ricino, una planta de comportamiento distinto a la colza.

Las condiciones de incubación seleccionadas fueron básicamente las definidas por Kang y Rawsthorne (1994) para plastidios de colza, pero con las modificaciones que el desarrollo de ese mismo método introdujeron Eastmond y Rawsthorne (2000).

A la hora de determinar la tasa de síntesis de ácidos grasos por los plastidios aislados, se tuvo en cuenta que tal y como había sido descrito con anterioridad por Kang y Rawsthorne (1994), los productos generados en el plastidio podrían ser ácidos grasos libres, pero también derivados de esos ácidos grasos libres como acil-ACPs, acil-CoAs o incluso glicerolípidos sintetizados en el plastidio para formar parte de la membrana. Por este motivo se midió la incorporación de ^{14}C en la fracción orgánica, con lo que se evitaban material soluble en agua

como acil-ACP/CoAs, y dicha fracción orgánica se saponificaba y separaba mediante TLC, cuantificándose solo la fracción de ácidos grasos.

2.1. Análisis previos.

Los valores dados de tasa de síntesis *in vitro* de ácidos grasos se determinaron utilizando el valor de incorporación neta de radioactividad, que se obtenía restando los valores de radioactividad obtenidos en las fracciones de ácidos grasos para las incubaciones control de los plastidios con los substratos a tiempo cero, de la incorporación de radioactividad en la fracción de ácidos grasos después de 60 minutos de incubación. Rutinariamente, la cantidad de radioactividad encontrada en los productos en los ensayos a tiempo cero, fue del 3-25% de la encontrada tras 60 minutos de incubación.

Para poder hacer una comparación significativa entre los resultados obtenidos a partir de distintas preparaciones de plastidios procedentes de distintas plantas, los datos de incorporación de radioactividad se expresaron de la siguiente manera: En primer lugar en base a la cantidad de proteína presente en cada preparación de plastidios utilizada, para así poder hacer una comparación entre distintas preparaciones de plastidios y en segundo lugar, la incorporación se expresó en base a los equivalentes de acetil-CoA para permitir así una comparación directa entre las tasas de incorporación obtenidas entre distintos metabolitos.

2.2. Síntesis de ácidos grasos dependiente de tiempo y concentración.

Se incubaron preparaciones de plastidios con Glc6P, malato, piruvato y acetato, marcados radiactivamente con ^{14}C y se estudió la incorporación de radioactividad en la fracción de ácidos grasos. En 2 experimentos independientes usando como precursor el

malato, la incorporación de radioactividad en preparaciones de plastidios osmóticamente rotas fue en promedio un 4,4% de la incorporación obtenida cuando se usaron plastidios intactos y la incorporación de radioactividad en ácidos grasos cuando el ATP se eliminaba del medio de incubación fue en promedio un 85,8% inferior. Se estudió la incorporación de radioactividad a la fracción de ácidos grasos dependiente del tiempo de incubación, observándose que la tasa de incorporación fue lineal esencialmente dentro de los 60 minutos de incubación (Figura III.1).

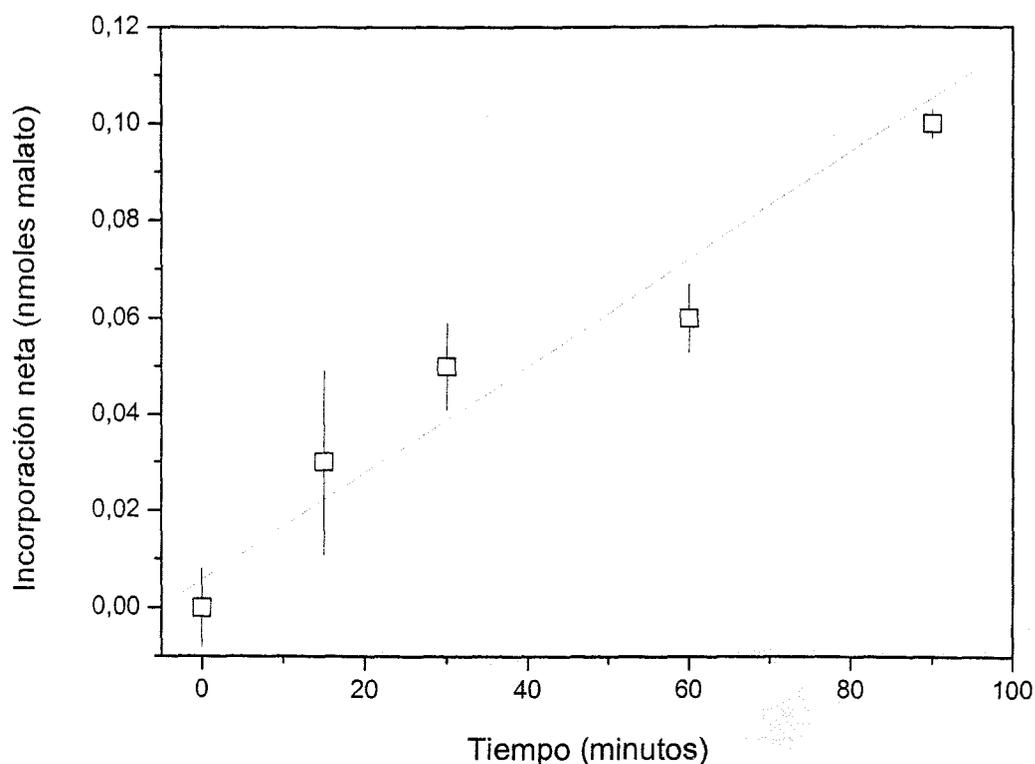


Figura III.1. Incorporación de radioactividad en la fracción de ácidos grasos de plastidios, dependiente de tiempo de incubación. Se suministró 1 mM [^{14}C]malato como fuente de carbono a plastidios aislados de semillas de girasol de 17 DDF. Cada punto representa el promedio \pm SD de dos preparaciones de plastidios, con al menos tres repeticiones por preparación.

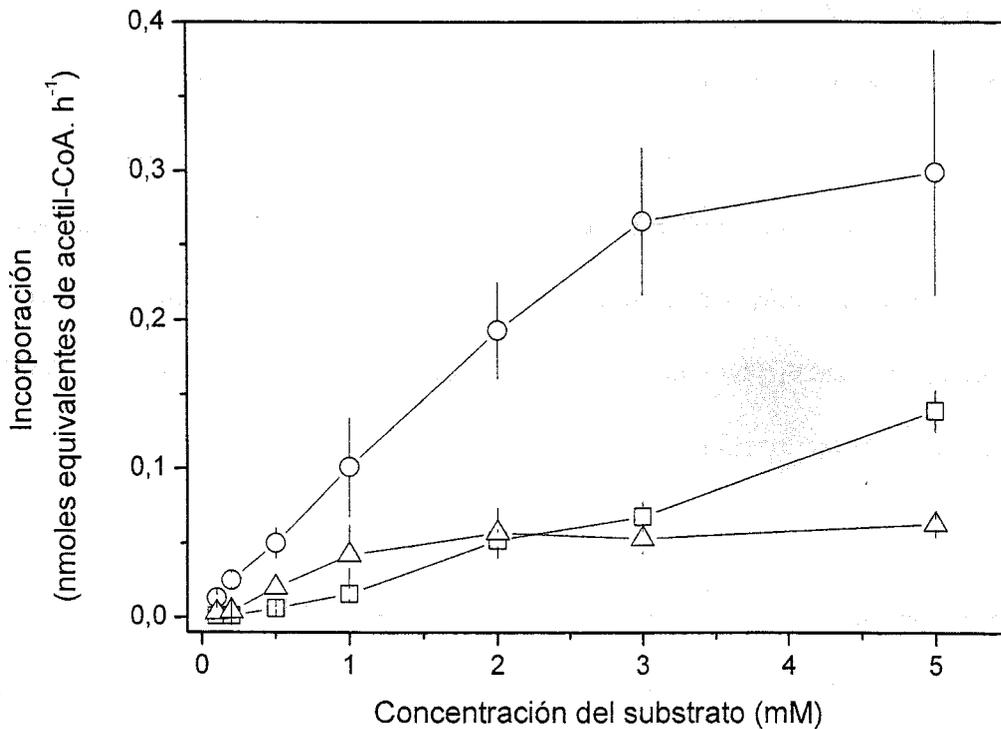


Figura III.2. Incorporación de radioactividad a la fracción de ácidos grasos dependiente de concentración de sustrato. Los plastidios aislados de semillas de 17 DDF se incubaron con distintas concentraciones de acetato, malato y piruvato radiactivos, y se midió la radioactividad incorporada en la fracción de ácidos grasos tras 60 minutos de incubación. La incorporación se expresa en base a nmoles de equivalentes de acetil-CoA. Cada valor representa la media \pm SD de 3 preparaciones de plastidios distintas con al menos tres repeticiones por preparación. (Δ , piruvato; \square , acetato; \circ , malato).

También se determinó la variación de la tasa de incorporación de los distintos sustratos a la fracción de ácidos grasos en función de la concentración. El acetato se incorporaba y era utilizado para la síntesis de ácidos grasos en el plastidio de una manera independiente de la concentración; sin embargo, malato y piruvato lo eran de una manera dependiente de concentración, alcanzando saturación a 3 mM y 1 mM respectivamente

(Figura III.2). La constante media de saturación para la incorporación de malato dentro de ácidos grasos fue de 1,5 mM, aproximadamente 3 veces la de piruvato (0,5 mM). Resultados muy similares se hallaron al hacer los mismos experimentos en leucoplastos aislados de endospermo de ricino (*Ricinus communis* L.), en los que la tasa de incorporación de substratos radioactivos en la fracción de ácidos grasos alcanzaba saturación a concentraciones de 3-5 mM para malato y 1 mM para piruvato (Smith *et al.* 1992). Los plastidios aislados de semillas de girasol no sintetizaban ningún ácido graso radioactivo cuando [¹⁴C]Glc6P se suministraba al medio de incubación

2.3. Síntesis de ácidos grasos durante el desarrollo.

Para determinar si la afinidad de los distintos substratos cambiaba durante el desarrollo de las semillas, se aislaron plastidios de semillas de 17 y 24 DDF y se incubaron con 3 mM de Glc6P, malato piruvato y acetato (Figura III.2). Para ninguna de las edades ensayadas se utilizaba la Glc6P como fuente de carbono para la síntesis de ácidos grasos. Plastidios aislados de semillas de 17 DDF preferían el malato como fuente de carbono para la síntesis de ácidos grasos, y lo utilizaban a una tasa de $3,0 \pm 0,3$ nmoles de equivalentes de acetyl-CoA h⁻¹ mg proteína⁻¹. El piruvato se utilizaba a una tasa 5 veces menor ($0,56 \pm 0,05$ nmoles de equivalentes de acetyl-CoA h⁻¹ mg proteína⁻¹) y el acetato a una tasa 15 veces menor ($0,20 \pm 0,03$ nmoles de equivalentes de acetyl-CoA h⁻¹ mg proteína⁻¹). De la misma manera, los plastidios aislados de semillas de girasol con 24 DDF también preferían malato como fuente de carbono para la síntesis de ácidos grasos. Lo utilizaban a una tasa 12 veces mayor que piruvato, $1,27 \pm 0,21$ frente a $0,10 \pm 0,05$ nmoles de equivalentes de acetyl-CoA h⁻¹ mg proteína⁻¹. Frente a lo que ocurría con plastidios aislados de semillas de 17 DDF, la afinidad por los distintos substratos utilizados descendía. Así, malato era utilizado como fuente de

carbono para la síntesis de ácidos grasos a una tasa 54% inferior, piruvato a una tasa 82% inferior y acetato no se utilizaba como fuente de carbono para la síntesis de ácidos grasos.

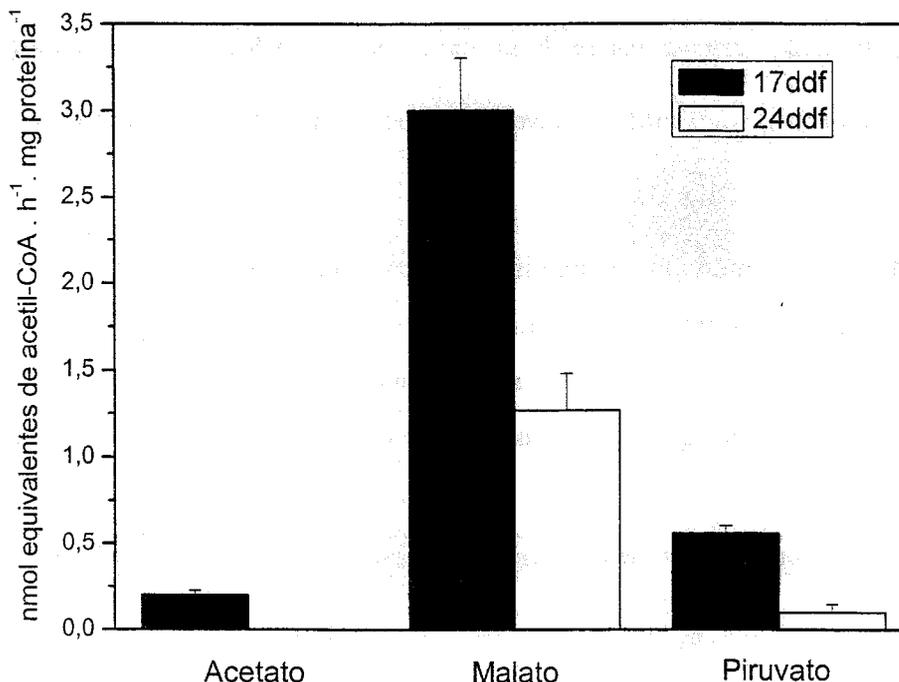


Figura III.3. Incorporación de [¹⁴C]substratos dentro de la fracción de ácidos grasos por plastidios aislados de semillas de girasol en desarrollo. La incorporación de radioactividad se expresa como nmoles de equivalentes de acetil-CoAs incorporados en la fracción de ácidos grasos. Cada valor representa al media ± SD de tres preparaciones de plastidios distintas, aisladas de semillas de girasol de 17 y 24 DDF, con al menos tres repeticiones por cada substrato en cada una.

2.4. Contenido de metabolitos en la semilla.

Se determinó la cantidad de los distintos metabolitos en semillas mediante ensayos enzimáticos, y se estimó su concentración asumiendo que estaban distribuidos uniformemente a lo largo del volumen de agua de la semilla (Tabla III.2). Los valores para malato, piruvato y

acetato fueron respectivamente 0,28, 0,38 y 0,45 mM. Aunque estos valores son inferiores a las concentraciones utilizadas para los ensayos de incubación, la compartimentación de los mismos dentro de la célula se desconoce. A pesar de lo cual parece probable que todos estén presentes en el citosol a concentraciones lo suficientemente grandes como para soportar la alta tasa de síntesis de ácidos grasos que se da *in vivo*. Por otro lado, la concentración de Glc6P medida en semillas fue de 1,26 mM, la mayor de todos los metabolitos ensayados.

Tabla III.2. Contenido de metabolitos en semillas de girasol. Los valores se expresan como la media \pm SD de al menos 5 medidas distintas de semillas de girasol de entre 17-19 DDF. Para estimar la concentración mM, se midió en cada ensayo el contenido en agua de las semillas que osciló entre 15-17 μ l/embrión.

| Metabolito | Cantidad (nmoles/embrión) | Recuperación (%) | mM en embrión |
|------------|---------------------------|------------------|-----------------|
| Glc6P | 10,7 \pm 0,7 | 56,0 | 1,26 \pm 0,05 |
| Malato | 1,1 \pm 0,2 | 25,3 | 0,28 \pm 0,04 |
| Piruvato | 3,3 \pm 0,4 | 54,5 | 0,38 \pm 0,05 |
| Acetato | 6,8 \pm 0,1 | ~ 100 | 0,45 \pm 0,02 |

El comportamiento de los plastidios aislados de semillas de girasol descrito en este capítulo fue muy parecido al descrito previamente para plastidios aislados de endospermo de ricino, en los que la tasa más alta de síntesis de ácidos grasos ocurría cuando se suministraba malato como precursor (Smith *et al.* 1992; Miernyk y Dennis, 1983). Piruvato y acetato también eran precursores para la síntesis de ácidos grasos, pero se utilizaban a una tasa 4,5 y 120 veces menor. De la misma manera, la tasa de utilización de malato se saturaba para concentraciones mayores (3-5 mM) que la de piruvato (1 mM). Cuando se suministraba [¹⁴C]Glucosa a los plastidios, no se detectaba ningún marcaje en la fracción de ácidos grasos (Smith *et al.*, 1992). Al igual que pasaba con plastidios de girasol, Miernyk y Dennis (1983)

observaron que la tasa de incorporación de Glc6P en ácidos grasos por plastidios aislados de endospermo de ricino, era insignificante comparada con la tasa de síntesis a partir de piruvato.

En cambio el comportamiento de los plastidios de girasol en desarrollo difiere de lo que ocurre en plastidios de embriones de colza (*Brassica napus* L.) en desarrollo. Se ha definido que durante los estadios iniciales e intermedios del desarrollo de las semillas, es la Glc6P la que sostiene las mayores tasas de síntesis de ácidos grasos. En cambio, durante el principal estadio de síntesis de ácidos grasos de las semillas, es el piruvato suministrado *in vitro* el que sostiene las mayores tasas de síntesis de ácidos grasos, comparado con la Glc6P (Kang y Rawsthorne, 1994; Kang y Rawsthorne, 1996; Eastmond y Rawsthorne, 2000).

Los resultados de incorporación de radioactividad en función de la concentración de los sustratos utilizados, apuntan a que el acetato, debido posiblemente a su pequeño tamaño, atraviesa las membranas del plastidio por difusión, mientras que malato y piruvato atraviesan la membrana del plastidio gracias a un mecanismo dependiente de saturación. De hecho, se han caracterizado multitud de translocadores en la membrana de plastidios, entre los que aparecen transportadores de malato en plastidios de ricino (Eastmond *et al.* 1997) y transportadores de piruvato en plastidios de embriones de colza (Eastmond y Rawsthorne, 2000).

El hecho de que la Glc6P no fuera utilizada por los plastidios de semillas de girasol como sustrato para la síntesis de ácidos grasos resultaba extraño, teniendo en cuenta que era el intermediario metabólico que se encontraba a mayor concentración relativa dentro de la semilla. Se asume que la Glc6P lleva a cabo dos funciones dentro de los plastidios aislados de semillas en desarrollo (ver Introducción, Figura 5). En primer lugar, la oxidación de la Glc6P dentro del plastidio puede suministrar unidades de acetil-CoA para la biosíntesis de ácidos grasos, como resultado de su paso a través de la glicólisis, acoplada al complejo de la piruvato

deshidrogenada (PDH). En segundo lugar, puede generar poder reductor; en forma de NADH si se metaboliza vía glicolisis y PDH ó en forma de NADPH si es metabolizada a través de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato (Schwender *et al.*, 2003; Hutchingn *et al.*, 2005).

3. SÍNTESIS DE ALMIDÓN EN PLASTIDIOS.

Como hemos comprobado en el capítulo anterior, la Glc6P no se utiliza como fuente de carbono para la síntesis de ácidos grasos en plastidios de embriones de girasol en desarrollo. Debido a su elevada concentración dentro de las semillas, quisimos averiguar si la Glc6P podría cruzar la envuelta del plastidio y ser utilizada como fuente de carbono para otras rutas metabólicas distintas de la síntesis de ácidos grasos, como la síntesis de almidón o la ruta oxidativa de las pentosas fosfato (OPPP). Para ello, aplicamos el ensayo puesto a punto por Kang y Rawsthorne (1996) con modificaciones de Eastmond y Rawthorne (2000), según el cual tras incubar las preparaciones de plastidios con [U-¹⁴C]Glc6P se medía la síntesis de almidón como marcaje presente en la fracción no soluble en metanol/KCl; y se medía su flujo a través de la OPPP como ¹⁴CO₂ desprendido durante la incubación.

De la misma manera que para la síntesis de ácidos grasos, antes de avanzar en los posibles usos de la Glc6P como substrato para el metabolismo de los plastidios de semillas de girasol y sus variaciones durante el desarrollo, quisimos en primer lugar establecer las condiciones óptimas del ensayo y comprobar que los plastidios de semillas de girasol tenían un comportamiento similar al de plastidios de otras especies vegetales. Como en el caso anterior para asegurar que los plastidios y el metabolismo que ocurría en su interior eran los responsables de los resultados, también se determinó la incorporación de radioactividad dependiente de integridad y de la presencia de ATP.

3.1. Análisis previos.

En primer lugar, se determinó la radioactividad encontrada en la fracción insoluble en metanol/KCl tras 60 minutos de incubación, para una concentración estándar de 1 mM de [U-¹⁴C]Glc6P. A tiempo cero la radioactividad medida fue menos del 5% de la encontrada tras 60 minutos de incubación.

A continuación se comprobó si la incorporación de Glc6P era dependiente de la integridad de los plastidios y de la presencia de ATP en el medio de incubación. Para 2 ensayos realizados, la radioactividad incorporada en la fracción insoluble en metanol/KCl disminuyó un 96% cuando se usaron plastidios previamente rotos para la incubación. También disminuyó en igual grado (92%), la radioactividad encontrada en la fracción insoluble en metanol/KCl cuando se eliminó el ATP del medio de incubación, para plastidios intactos.

Por último, para asegurar que la Glc6P era la hexosa fosfato preferida por los plastidios de semillas de girasol en desarrollo para marcar la fracción insoluble en metanol/KCl, se incubaron por separado preparaciones de plastidios con iguales cantidades de [¹⁴C]Glc6P y [¹⁴C]glucosa-1-fosfato (Glc1P). En los dos ensayos realizados, la incorporación neta de radiactividad detectada en la fracción insoluble en metanol/KCl tras 1 hora de incubación usando Glc1P fue el 16% de la encontrada cuando se utilizó Glc6P.

La incorporación de Glc6P dependiente de integridad y ATP, son resultados muy similares a los descritos para plastidios aislados de embriones de colza en desarrollo (Hill y Smith, 1991; Kang y Rawsthorne, 1994), y para amiloplastos aislados de endospermo de trigo (Tyson y ap Rees, 1988). En este estudio se describió que la eliminación del ATP del medio de incubación y las incubaciones realizadas con plastidios rotos, hacían que no se detectara ninguna marca radioactiva en la fracción insoluble en metanol/KCl. Las preferencias

encontradas en plastidios de girasol por la Glc6P frente a la Glc1P, son similares a las descritas para plastidios aislados de embriones de colza (Kang y Rawsthorne, 1994), en cambio son diferentes a las preferencias descritas para amiloplastos aislados de semillas de trigo (Tyson y ap Rees, 1988) en los que la Glc1P era el sustrato preferido.

3.2. Incorporación de radioactividad dependiente de tiempo y concentración.

Para conseguir unas tasas de marcaje considerables entre distintas preparaciones de plastidios, se estudió cómo dependía la incorporación de radioactividad en la fracción insoluble en metanol/KCl del tiempo y de la concentración de [¹⁴C]Glc6P. La tasa de incorporación de Glc6P en la fracción insoluble en metanol/KCl fue lineal durante los primeros 60 minutos de incubación (Figura III.4). Utilizando 60 minutos como tiempo de incubación, la incorporación de radioactividad en la fracción insoluble en metanol/KCl se saturaba esencialmente a concentraciones de Glc6P de 0,5 mM, siendo la constante media de saturación calculada para la incorporación de Glc6P próxima a 0,2 mM (Figura III.5).

Resultados muy similares a estos se habían encontrado estudiando la síntesis de almidón en plastidios aislados de embriones de colza en desarrollo a los que se les había suministrado Glc6P (Hill y Smith, 1991; Kang y Rawsthorne, 1994). Estos autores definieron que la incorporación de Glc6P a la fracción insoluble en metanol/KCl también era lineal en los primeros 60 minutos de incubación y que se saturaba básicamente a concentraciones próximas a 2 mM; también definieron una constante media de saturación próxima a 0,2 mM.

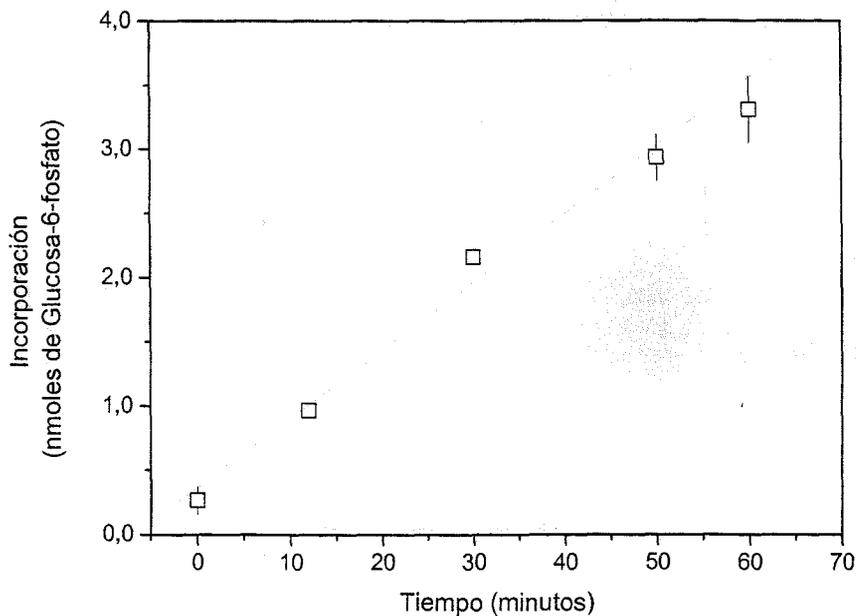


Figura III.4. Incorporación de radioactividad en la fracción insoluble en metanol/KCl, dependiente de tiempo de incubación. Se suministró 1 mM $[U^{14}C]Glc6P$ como fuente de carbono a plastidios aislados de semillas de girasol de 17 DDF y se midió la radioactividad incorporada en la fracción insoluble en metanol/KCl a distintos tiempos de incubación. Cada valor representa el promedio \pm SD de tres preparaciones de plastidios distintas con al menos 3 repeticiones por preparación.

Para asegurar que la radioactividad encontrada en la fracción insoluble en metanol/KCl era en realidad almidón, este producto radioactivo se incubó junto con enzimas degradadoras de almidón: α -amilasa y α -amiloglucosidasa de acuerdo al método utilizado por Hill y Smith (1991). Después de la incubación y tras sucesivos lavados, la radioactividad encontrada en el precipitado insoluble en metanol/KCl fue 0,0091 nmoles de Glc6P, menos del 3% de la encontrada originalmente que fue de 0,5461 nmoles de Glc6P, por lo que la fracción insoluble en metanol/KCl era almidón.

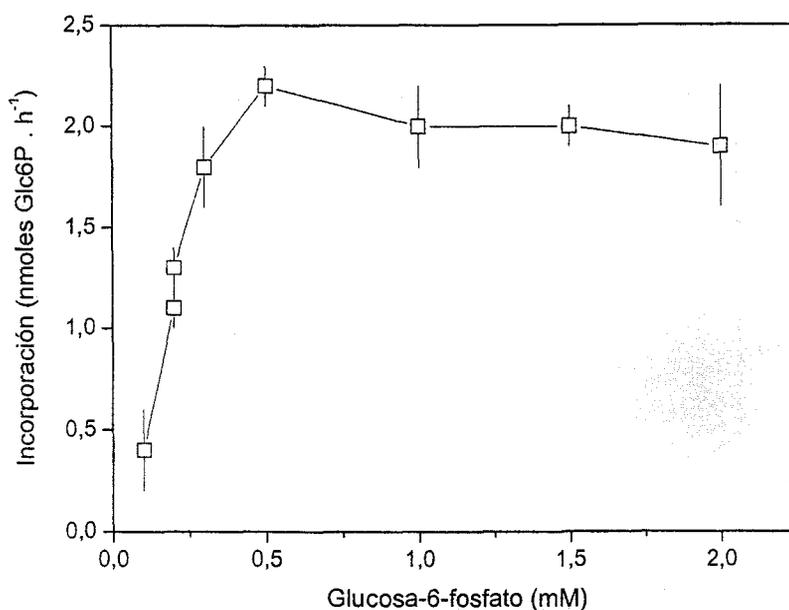


Figura III.5. Incorporación de radioactividad en la fracción insoluble en metanol/KCl, dependiente de concentración de sustrato. Se incubaron plastidios aislados de semillas de girasol de 17 DDF con distintas concentraciones de $[U^{14}C]Glc6P$ y se midió la radioactividad incorporada en la fracción insoluble en metanol/KCl tras 60 minutos de incubación. Cada valor representa el promedio \pm SD de tres preparaciones de plastidios distintos con al menos 3 repeticiones por preparación.

Encontrar que la Glc6P era utilizada por los plastidios aislados de semillas de girasol para la síntesis de almidón fue cuanto menos, un hallazgo interesante. El girasol no acumula almidón como producto de reserva en sus semillas, y tan solo se ha descrito la presencia de inclusiones de almidón cuando se analizaron cortes al microscopio de semillas de girasol en desarrollo, y solo en plastidios de semillas de girasol entre 10-18 DDF y dichas inclusiones desaparecían en número y tamaño a partir de los 18 DDF (Bolyakina y Raikhman, 1999). Otras semillas oleaginosas como la colza, a pesar de que tampoco acumulan almidón en la semilla madura, sí que lo acumulan temporalmente durante la fase inicial del llenado de los

cotiledones (da Silva *et al.*, 1997). Este hecho unido a que el marcaje que realmente medíamos en la fracción insoluble en metanol/KCl era almidón y que la cantidad neta de radioactividad encontrada en almidón era mayor que la encontrada en ácidos grasos, hizo que nos interesamos en saber si durante el llenado de las semilla girasol, al igual que ocurría en embriones de colza, había una acumulación temporal y considerable de almidón.

Se midió contenido de almidón en semillas de girasol en desarrollo a tres edades distintas: 5, 15 y 24 DDF. Los valores encontrados no superaban los 80 μg /semilla, lo que suponía menos del 0.1% del contenido total de aceite y proteínas.

Con todas estas consideraciones previas podíamos afirmar que la Glc6P si bien no suministraba esqueletos carbonados para la síntesis de ácidos grasos en plastidios de girasol, sí que era capaz de atravesar su envuelta y suministrar esqueletos carbonados para la síntesis de almidón, de lo cual se deducían dos hechos importantes: Primero, la existencia de una ruta gluconeogénica activa y funcional, en vista de que dentro del plastidio es posible sintetizar almidón. Y segundo, la ausencia de una ruta glicolítica completa o funcional. Además, la utilización de Glc6P dependiente de concentración también nos proporcionaba evidencias indirectas de que algún tipo de mecanismo activo debía mediar su entrada al interior del plastidio.

3.3. Utilización de la Glc6P durante el desarrollo.

Una vez demostrado que la Glc6P podía entrar al plastidio, quisimos estudiar a continuación las preferencias de los plastidios por esta molécula como suministrador de carbonos para la síntesis de almidón y como generador de poder reductor a través de la OPPP, durante el desarrollo de las semillas. Para ello se aislaron plastidios a partir de semillas de 17 y 24 DDF, se incubaron con 1 mM de [^{14}C]Glc6P y se midió la tasa de incorporación de

radioactividad en almidón y el flujo de carbono a través de la OPPP (Figura III.6) Para ambas edades, la tasa de utilización de Glc6P para la síntesis de almidón fue siempre mayor que el desprendimiento de CO₂. Además, la tasa de utilización de Glc6P fue mayor a 17 DDF, reduciéndose en torno al 85% cuando se utilizaron plastidios aislados de semillas de 24 DDF.

Estos resultados están de acuerdo con los descritos previamente para plastidios aislados de embriones de colza (Eastmond y Rawsthorne, 2000). Estos autores encontraron que en la etapa final del llenado de la semilla, la tasa de síntesis de almidón a partir de Glc6P disminuyó cerca del 70% con respecto a la tasa medida para plastidios aislados de embriones en las etapas iniciales de desarrollo, en cambio, el flujo de Glc6P a través de la OPPP se incrementó más del 50%.

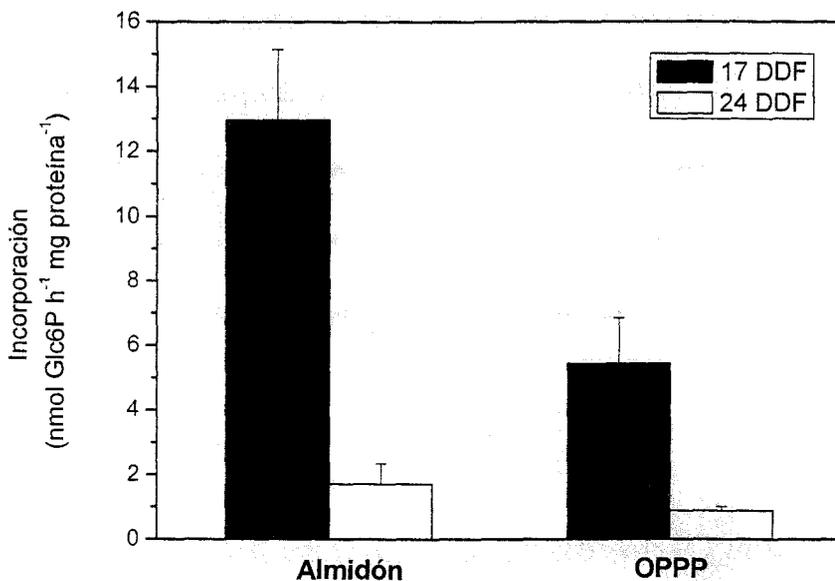


Figura III.6. Tasa de utilización de Glc6P para la síntesis de almidón y flujo a través de la OPPP en plastidios aislados de semillas de 17 y 24 DDF. Cada valor representa la media \pm SD de tres preparaciones de plastidios distintos con al menos 3 repeticiones por plastidio.

4. INTERACCIONES ENTRE LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS Y LA OPPP DURANTE EL METABOLISMO DE PLASTIDIOS.

En el capítulo anterior comprobamos cómo la Glc6P podía entrar al interior de los plastidios aislados de embriones de girasol en desarrollo, y si bien no servía como suministrador de carbono para la síntesis de ácidos grasos sí podía metabolizarse a través de la OPPP suministrando en consecuencia poder reductor en forma de NADPH. Son múltiples las evidencias directas e indirectas que relacionan la síntesis plastidial de ácidos grasos con la OPPP a través del suministro que esta ruta hace de poder reductor en plantas (Eastmond y Rawsthorne, 2000; Jonson *et al.*, 2000; Fox *et al.*, 2000; Schwender y Ohlrogge, 2002; Schwender *et al.*, 2003; Hutchings *et al.* 2004). En vista de lo cual nos interesamos por saber cómo el metabolismo de la Glc6P podría afectar a la síntesis plastidial de ácidos grasos

Incubamos para ello, preparaciones de plastidios aislados de semillas de girasol en desarrollo con concentraciones saturantes de [¹⁴C]malato y [¹⁴C]piruvato, en presencia y en ausencia de concentraciones saturantes de Glc6P sin marcar. De esta manera, si el poder reductor generado por el paso de la Glc6P a través de la OPPP afectara a la tasa de síntesis de ácidos grasos en plastidios de girasol, previsiblemente se observarían cambios en la tasa de incorporación de ambos substratos radioactivos.

Para obtener más información sobre la interacción entre ambos substratos, se estudió también el efecto de los substratos de la síntesis de ácidos grasos sobre el metabolismo de la Glc6P. Para ello se incubaron preparaciones de plastidios aislados a partir de semillas de girasol en desarrollo con concentraciones saturantes de ¹⁴C-Glc6P, en presencia o en ausencia de concentraciones saturantes de malato o piruvato sin marcar. Malato y piruvato son capaces de generar por sí solos poder reductor en el interior del plastidio. Si existiera una relación

entre el metabolismo de la Glc6P y la síntesis intraplastidial de ácidos grasos, la co-incubación afectaría al flujo de carbono de la Glc6P a través de la OPPP.

4.1. Efecto de la Glc6P sobre la síntesis de ácidos grasos.

Para investigar las interacciones entre la síntesis de ácidos grasos y la OPPP, se aislaron plastidios de semillas de girasol de 17 y 24 DDF y se incubaron con concentraciones saturantes de [¹⁴C]malato ó [¹⁴C]piruvato junto con 1 mM de Glc6P sin marcar. Tras 1 hora de incubación, se midió la radioactividad en la fracción de ácidos grasos (Figura III.5). Cuando [¹⁴C]piruvato se incubó junto con Glc6P y plastidios aislados de semillas de 17 DDF, la tasa de síntesis de ácidos grasos se incrementó en promedio 4,4 veces respecto a la tasa de síntesis en presencia solo de [¹⁴C]piruvato, alcanzándose una tasa de síntesis no significativamente inferior a aquella obtenida en presencia de malato ($3,0 \pm 0,5$ frente a $2,5 \pm 0,5$, $p > 0,05$). Pero no se observaron variaciones significativas entre la tasa de síntesis de ácidos grasos cuando [¹⁴C]malato se co-incubó con Glc6P (t-test, $p > 0,05$), y tampoco se observó estimulación significativa en la incorporación de carbono desde [¹⁴C]piruvato cuando se usaron plastidios aislados de semillas de 24 DDF.

Resultados similares se habían descrito en plastidios aislados de semillas de colza en desarrollo (Kang y Rawsthorne, 1996). Cuando plastidios aislados se incubaban con [2-¹⁴C]piruvato junto con Glc6P, también se incrementaba la tasa de síntesis de ácidos grasos, pero tan solo 0,35 veces. En cambio, estos mismos experimentos se repitieron por otros autores (Eastmond y Rawsthorne, 2000) y no observaron diferencias significativas en la tasa de síntesis de ácidos grasos en presencia o en ausencia de Glc6P.

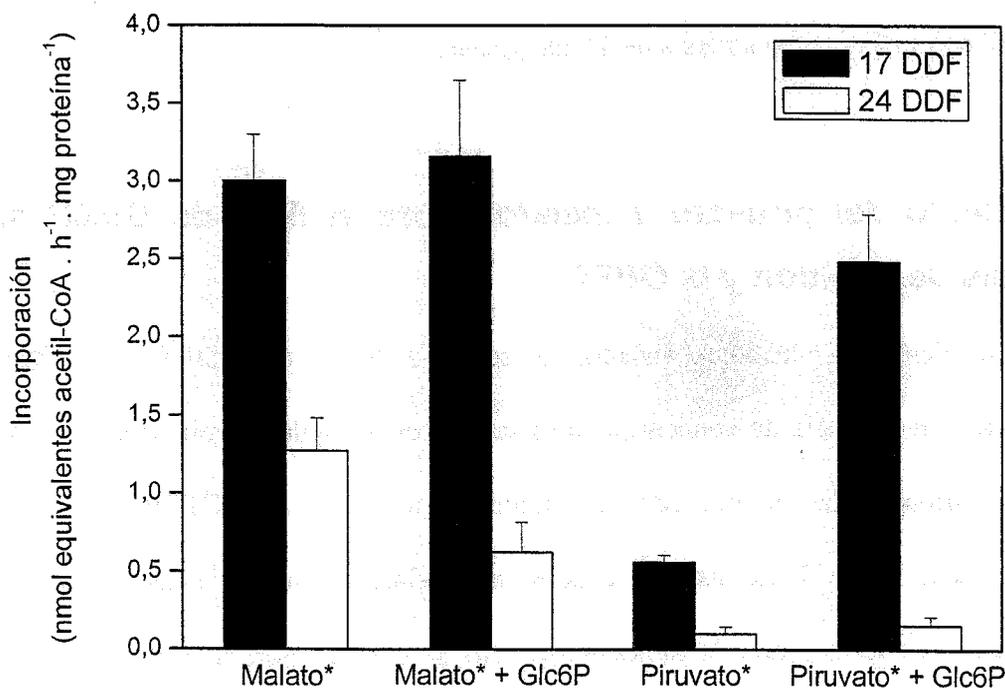


Figura III.7. Incorporación de radioactividad a la fracción de ácidos grasos a partir de [¹⁴C]malato o [¹⁴C]piruvato, en presencia o en ausencia de 1 mM de Glc6P. La incorporación de radioactividad se expresa como nmoles de equivalentes de acetil-CoAs. Cada valor representa la media ± SD de tres preparaciones de plastidios distintas aisladas de semillas de girasol de 17 y 24 DDF, cada una con al menos 3 repeticiones.

Teniendo en cuenta que en plastidios aislados de semillas de girasol en desarrollo, (i) la Glc6P no puede utilizarse como fuente de carbono para la síntesis de ácidos grasos, (ii) que la Glc6P puede usarse como sustrato de la OPPP, (iii) que se asume que el malato puede generar por sí mismo NADPH al ser metabolizado por la enzima málica y (iv) que el piruvato tan solo genera NADH cuando es sustrato del complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDH), entonces el aumento generado en la tasa de síntesis de ácidos grasos cuando [¹⁴C]piruvato se incubaba junto con Glc6P, debía ser causado por el poder reductor en forma

de NADPH que se generaba al atravesar la Glc6P la OPPP. Dicho aumento no se observaba cuando Glc6P se incubaba junto con [^{14}C]malato, porque este podría por sí solo generar el NADPH necesario para la síntesis de ácidos grasos.

4.2. Efecto del piruvato y malato sobre el flujo de Glc6P hacia la síntesis de almidón y la OPPP.

Se incubaron plastidios aislados de semillas de 17 y 24 DDF con [^{14}C]Glc6P en presencia y en ausencia de concentraciones saturantes de malato o piruvato sin marcar, y se midió la radioactividad incorporada en almidón y la actividad de la OPPP como liberación de $^{14}\text{CO}_2$ (Tabla III.3). Para las dos edades ensayadas, el malato causaba un incremento significativo en la cantidad de radiactividad que se dirigía hacia la síntesis de almidón, en cambio la incubación junto con piruvato no alteraba la cantidad de radioactividad que desde la Glc6P se dirigía hacia la fracción de almidón. Efectos similares se habían obtenido en plastidios aislados de semillas de colza en desarrollo, en los cuales la co-incubación de [^{14}C]Glc6P junto con piruvato frío no causaba ningún efecto sobre la síntesis de almidón (Kang y Rawsthorne, 1996; Eastmond y Rawsthorne, 2000). Sin embargo, tanto malato como piruvato afectaban al flujo de Glc6P a través de la OPPP, también para las dos edades ensayadas. La liberación de $^{14}\text{CO}_2$ disminuía casi un 80% cuando el malato era añadido junto con [^{14}C]Glc6P a la preparación de plastidios aislados de semillas de 17 DDF ($1,1 \pm 0,4$ frente a $5,4 \pm 1,4$). En cambio, la co-incubación de [^{14}C]Glc6P junto con piruvato, incrementaba el flujo de Glc6P a través de la OPPP más de tres veces ($16,4 \pm 2,0$ frente a $5,4 \pm 1,4$).

Tabla III.3. Partición de [U-¹⁴C]Glc6P dentro de la ruta de síntesis de almidón y de la OPPP. Se incubaron plastidios aislados de semillas de girasol de 17 y 24 DDF y se incubaron con 1 mM de [U-¹⁴C]Glc6P sólo o junto con 3 mM de malato o piruvato fríos. Tras 60 minutos de incubación se pararon las reacciones y se midió la radioactividad en la fracción de almidón y la OPPP, como liberación de ¹⁴CO₂. Los resultados son la media ± SD de tres preparaciones de plastidios distintas, con al menos 3 repeticiones por preparación.

| Ruta | Edad | ¹⁴ C Incorporación en nmoles Glc6P · h ⁻¹ · mg proteína ⁻¹ | | |
|---------|--------|---|-----------------|-------------------|
| | | Glc6P* | Glc6P* + malato | Glc6P* + piruvato |
| Almidón | 17 DDF | 13,0 ± 2,2 | 16,7 ± 1,2 | 12,7 ± 1,8 |
| | 24 DDF | 1,7 ± 0,6 | 2,6 ± 0,6 | 1,0 ± 0,3 |
| OPPP | 17 DDF | 5,4 ± 1,4 | 1,1 ± 0,4 | 16,4 ± 2,0 |
| | 24 DDF | 0,9 ± 0,1 | 0,20 ± 0,07 | 2,2 ± 0,6 |

Experimentos similares se llegaron a realizar con anterioridad usando plastidios aislados de semillas de colza en desarrollo pero con distintos resultados. Kang y Rawsthorne (1996) describieron que la adición de piruvato causaba un efecto nulo sobre la liberación de ¹⁴CO₂ a partir de [¹⁴C]Glc6P, respecto a lo que ocurría cuando sólo [¹⁴C]Glc6P era añadida al medio de incubación. En cambio, Eastmond y Rawsthorne (2000) hicieron un estudio más profundo de este posible efecto utilizando para ello plastidios aislados de semillas de colza de distintas edades. Así, la adición de 1 mM de piruvato junto con [¹⁴C]Glc6P no tenía ningún efecto sobre el flujo de la Glc6P a través de la OPPP si se usaban plastidios aislados de embriones en estados tempranos del desarrollo. Sin embargo, cuando usaron plastidios de los estados intermedios y finales del llenado de la semilla, la adición de piruvato estimulaba la actividad OPPP a partir de la Glc6P 0,12 y 0,24 veces, respectivamente.

Se ha descrito con anterioridad que (i) el flujo de Glc6P a través de la OPPP podría regularse por los niveles de NADPH/NADP⁺ presentes en el interior del plastidio debido al efecto de inhibición reversible que el NADPH tiene sobre la enzima glucosa-6-fostato deshidrogenasa (Wenderoth *et al.*, 1997) y que (ii) la enzima málica necesita de NADP⁺ para transformar malato en piruvato (Schwender *et al.*, 2003). Ambos hechos explicarían el desvío de la Glc6P hacia la síntesis de almidón y el descenso de su flujo a través de la OPPP cuando el malato se incluía en la incubación. La transformación de malato en piruvato, una vez dentro del plastidio, incrementaría por un lado los niveles de NADPH y en consecuencia reduciría los niveles de NADP⁺, inhibiendo de esta forma el flujo de la Glc6P a través de la OPPP porque la enzima glucosa-6-fostato deshidrogenasa estaría inactiva y porque disminuirían los niveles de NADP⁺ necesarios para que la OPPP estuviera activa. En cambio, la adición de piruvato al medio generaría una demanda de poder reductor en forma de NADPH necesario para la síntesis de ácidos grasos, que mantendría activa tanto la deshidrogenación de la Glc6P, como su flujo a través de la OPPP, ya que los niveles de NADP⁺ serían mayores que en presencia de malato.

Los resultados descritos en este último capítulo, junto con los de los capítulos previos suministran evidencias directas acerca de la relación entre la OPPP y la síntesis de ácidos grasos en plastidios de semillas de girasol en desarrollo, y nos hacen proponer un modelo del flujo de carbono necesario para sintetizar ácidos grasos en semillas de girasol en desarrollo (Figura III.8).

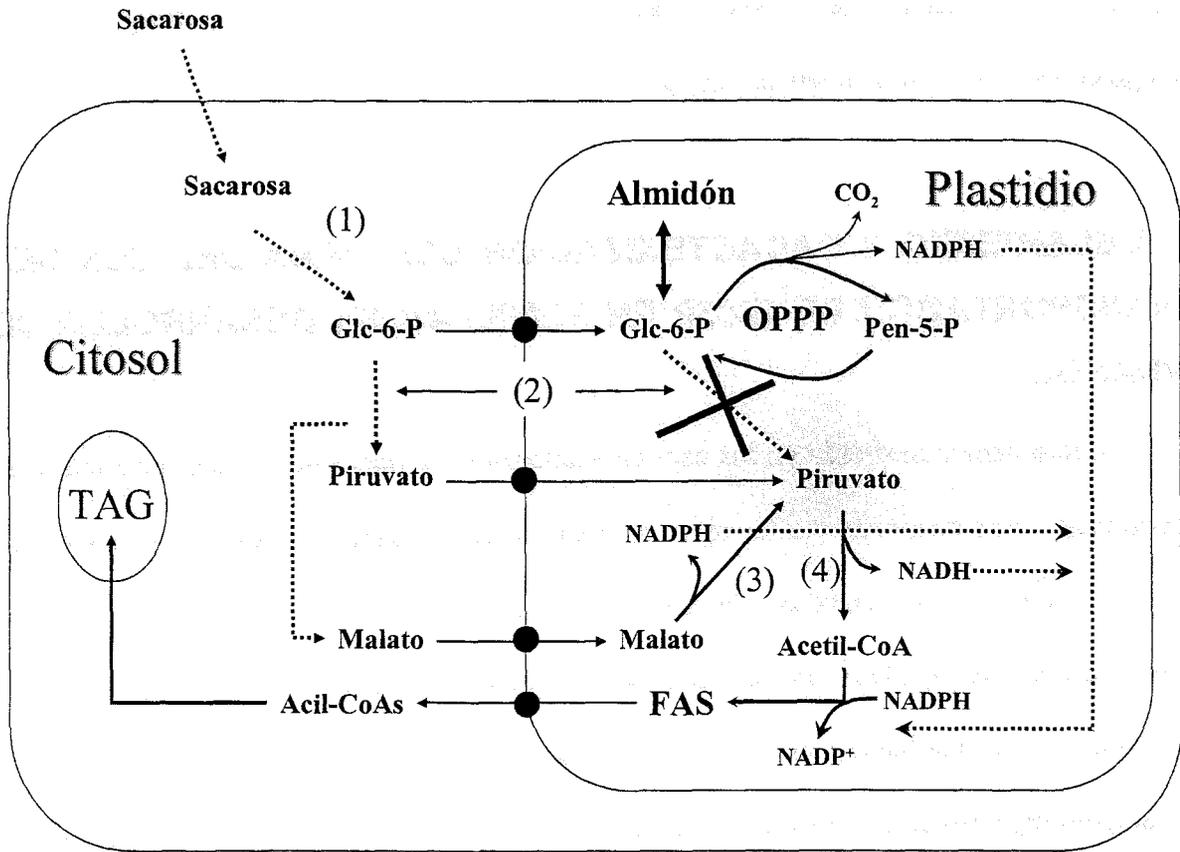


Figura III.8. Modelo de flujo de carbono en plastidios aislados de embriones de girasol en desarrollo. (1) Degradación de sacarosa hasta hexosa fosfato; (2) Glucólisis; (3) Enzima málica; (4) Complejo de la piruvato deshidrogenada; OPPO, Ruta Oxidativa de las Pentosas Fosfato; FAS, sintetasa de ácidos grasos; TAG, triacilglicéridos.

Así pues, en los tejidos de las semillas de girasol durante el desarrollo, la Glucosa-6-P generada en el citosol de las células a partir de la sacarosa importada desde los tejidos fotosintéticos de la planta, es transformada vía glicólisis en el citosol en malato y piruvato que atravesarán la membrana de los plastidios para ser utilizados como fuentes de carbono para la síntesis de ácidos grasos. Parte de la Glc6P atraviesa la membrana de los plastidios para ser utilizada como suministrador de poder reductor al ser metabolizada vía la OPPO. La demanda de Glc6P debe ser tan elevada hacia la síntesis de ácidos grasos y de aminoácidos, que tan

solo una muy pequeña parte de estas moléculas que entran al plastidio es interceptada por la ruta gluconeogénica para sintetizar almidón.

5. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL mRNA DEL GEN DEL TRANSPORTADOR DE Glc6P EN SEMILLAS EN DESARROLLO DE GIRASOL.

Como hemos mostrado en los capítulos anteriores la glucosa-6-fosfato tiene una gran importancia como suministrador de poder reductor necesario para la síntesis de ácidos grasos en el interior de los plastidios de semillas de girasol en desarrollo. De igual forma comprobamos que la Glc6P era utilizada por los plastidios de una manera dependiente de concentración, lo que hacía suponer que su entrada al interior del plastidios estaba mediada por un complejo proteico. Son varios los transportadores de Glc6P caracterizados en plantas. Así se han clonado y caracterizado el transportador de Glc6P en endospermo de maíz (*Zea mais*, L.) (Kammerer *et al.*, 1998), en semillas de arroz (*Oryza sativa*, L.) (Jiang *et al.*, 2003) y en endospermo de guisante (*Pisum sativum*, L.). Basándonos en estos antecedentes nos propusimos clonar la secuencia de cDNA que codificara gen *Hagpt* en semillas de girasol en desarrollo.

5.1. Amplificación de un fragmento de *Hagpt* a partir de semillas de 15 DDF de la línea control RHA-274.

A partir de las regiones conservadas de secuencias conocidas de proteínas del transportador plastidial de glucosa-6-fosfato de plantas, se diseñó una pareja de oligonucleótidos degenerados denominados GPTF2 y GPTR1 (Figura 9, Tabla 4; Materiales y Métodos, Apartado 2.7.5.1). Mediante PCR (Materiales y Métodos, Apartado 2.7.5.2) y con

estos oligos como cebadores, se obtuvo un fragmento de 692 pb a partir de cDNA de semillas de 15 DDF de la línea control RHA-274 de girasol. El fragmento fue clonado en el plásmido pGEM-T Easy (Materiales y Métodos, Apartado 2.7.6) y mandado a secuenciar. El análisis mediante el programa BLAST de la proteína codificada por la secuencia nucleotídica obtenida reveló que presentaba una gran similitud con transportadores de Glc6P (Figura III.6).

5.2. Obtención de la secuencia completa del cDNA correspondiente a *Hagpt*.

Para la obtención del extremo 3' se utilizó el oligo no degenerado GPTF2_{ND} junto con un cebador diseñado a partir de la cola de poli adeninas del extremo 5' del cDNA, Fa2Z. Mediante PCR, optimizando las condiciones (Materiales y Métodos, Apartado 2.1.5.2), se obtuvo un fragmento de X pb con los tampones correspondientes a 3,5 mM de MgCl₂. El fragmento fue clonado en pGEM-T Easy (Materiales y Métodos, Apartado 2.1.7) y mandado a secuenciar.

Para la obtención del extremo 5' se siguió el protocolo RACE, tal y como se detalla en Materiales y Métodos, Apartado 2.7.5.2, utilizando el cebador de la primera PCR a UPM, desde el extremo 5', y GPTR1_{RACE} desde el extremo 3'. Posteriormente se realizó otra PCR con una temperatura más baja de alineamiento y oligos internos, NUP y GPTR2_{RACE}. Como producto de esta última PCR se obtuvieron tres fragmentos de un tamaño inferior al esperado (Figura III.7). De esos fragmentos, se clonó y mandó a secuenciar el de mayor tamaño. El fragmento resultante comenzaba en el extremo 5' con los 6 primeros nucleótidos de la secuencia previamente clonada, seguidos de los 4 últimos nucleótidos GAGT del oligo UPM long y NUP usados en la primera y segunda PCR, respectivamente y se extendía hasta el segundo oligo no degenerado GPTR2_{RACE}. Al revisar la secuencia clonada observamos que esta coincidía en 6 nucleótidos con la parte final del oligo UPM long y NUP (Figura III.7).

Así, en la primera PCR la mezcla de oligos UPM long se unirían además de al inicio de la secuencia de cDNA 5'-RACE, a la parte interna del gen. Tras sucesivos ciclos de la primera PCR, se amplificaría principalmente la secuencia de cDNA interna debido a su menor longitud. Al realizar la segunda PCR con el producto de la primera usando como oligo a NUP, se amplificaría mayoritariamente el fragmento interno del gen (i) porque habría más cantidad de él en el producto de PCR diluido que se usó como molde y (ii) porque ese producto que serviría como molde, tendría no solo una secuencia de 6 nucleótidos (AACGCA) sino además 4 nucleótidos más (GAGT) procedentes del oligo UPM long (ver detalle en parte superior, Figura III.7).

En vistas de estos resultados se diseñó un nuevo oligonucleótido no degenerado NUP2, que coincidiera con la secuencia UPM, pero que no contuviera a la secuencia de 6 nucleótidos final coincidente con la secuencia ya clonada. Se realizó una primera PCR usando como oligos a NUP2 y GPTR1_{RACE} según las condiciones descritas en Materiales y Métodos, Apartado 2.7.5.3. El producto de esa primera PCR se diluyó 50 veces en TRIS 10 mM pH 8,5 y se usó como molde para una segunda PCR con las condiciones de optimización descritas en Materiales y Métodos, Apartado 2.7.5.2., apareciendo una banda en torno a 700 pb cuando la concentración del tampón fue 3,5 mM (Figura III.7, parte inferior). Este fragmento se clonó y se mandó a secuenciar identificándose como parte del fragmento animo del transportador de glucosa-6-fosfato, mediante el uso del programa BLAST

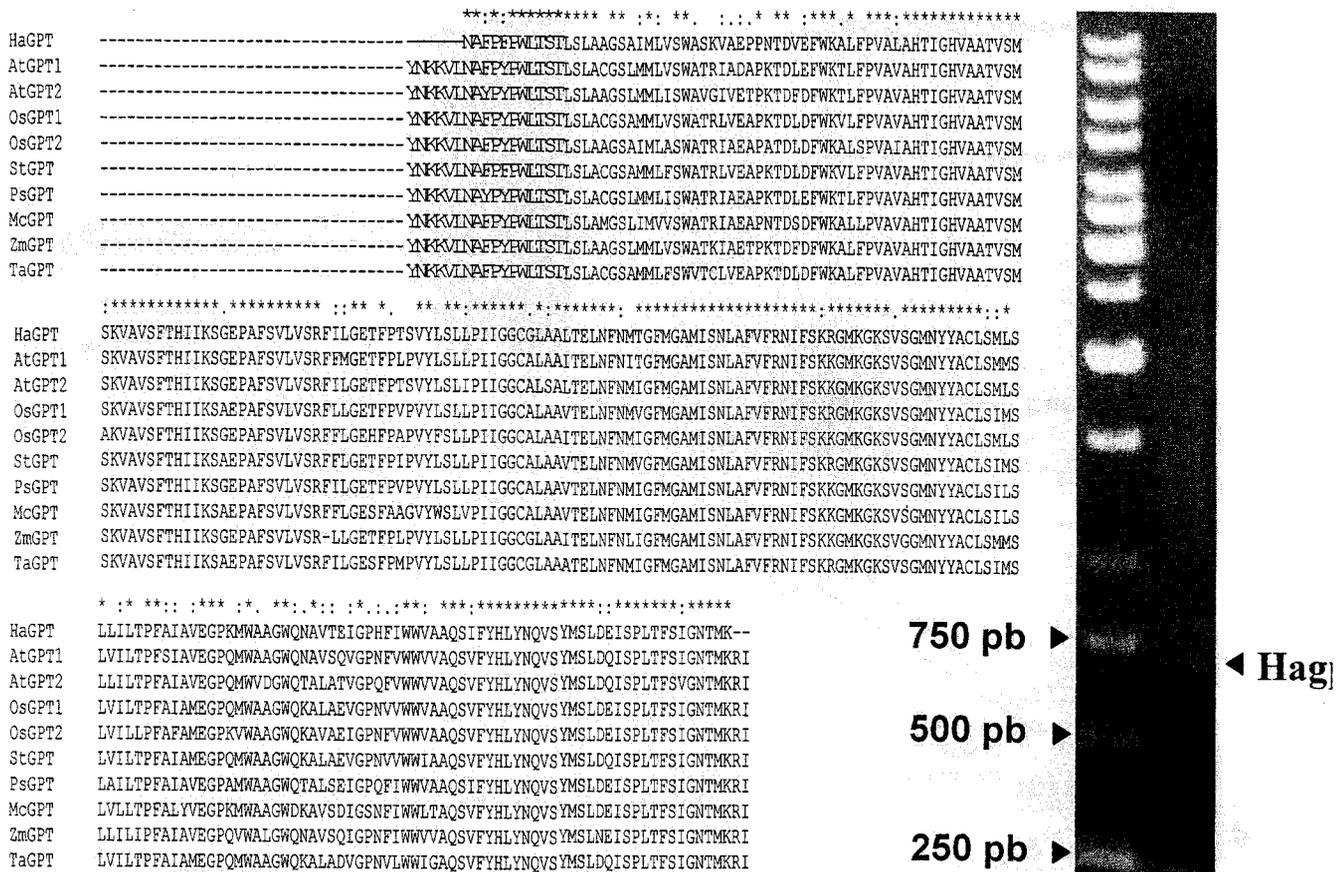


Figura III.9. Alineamiento del fragmento de PCR Hagpt. Alineamiento, mediante el uso del programa ClustalX v1.8 de la proteína codificada por el fragmento de PCR hagpt y las secuencias proteicas de los transportadores plastidiales de glucosa-6-fosfato de *Arabidopsis thaliana* (AtGPT1, AtGPT2), *Oryza sativa* (OsGPT1 y OsGPT2), *Solanum tuberosum* (StGPT), *Pisum sativum* (PsGPT), *Mesembryanthemum crystallinum* (McGPT), *Zea mais* (ZmGPT) y *Triticum aestivum* (TaGPT). La línea sobre el alineamiento marca el grado de conservación: (*) indica residuo conservado, (: y .) indican la presencia de aminoácidos del mismo grupo o grupos similares. El gel de agarosa muestra una banda de aproximadamente 700 pb correspondiente al fragmento de PCR obtenido con los cebadores GPTF2 y GPTR1, el marcador es el de 1Kb (Materiales y Métodos, Apartado 2.7.4).

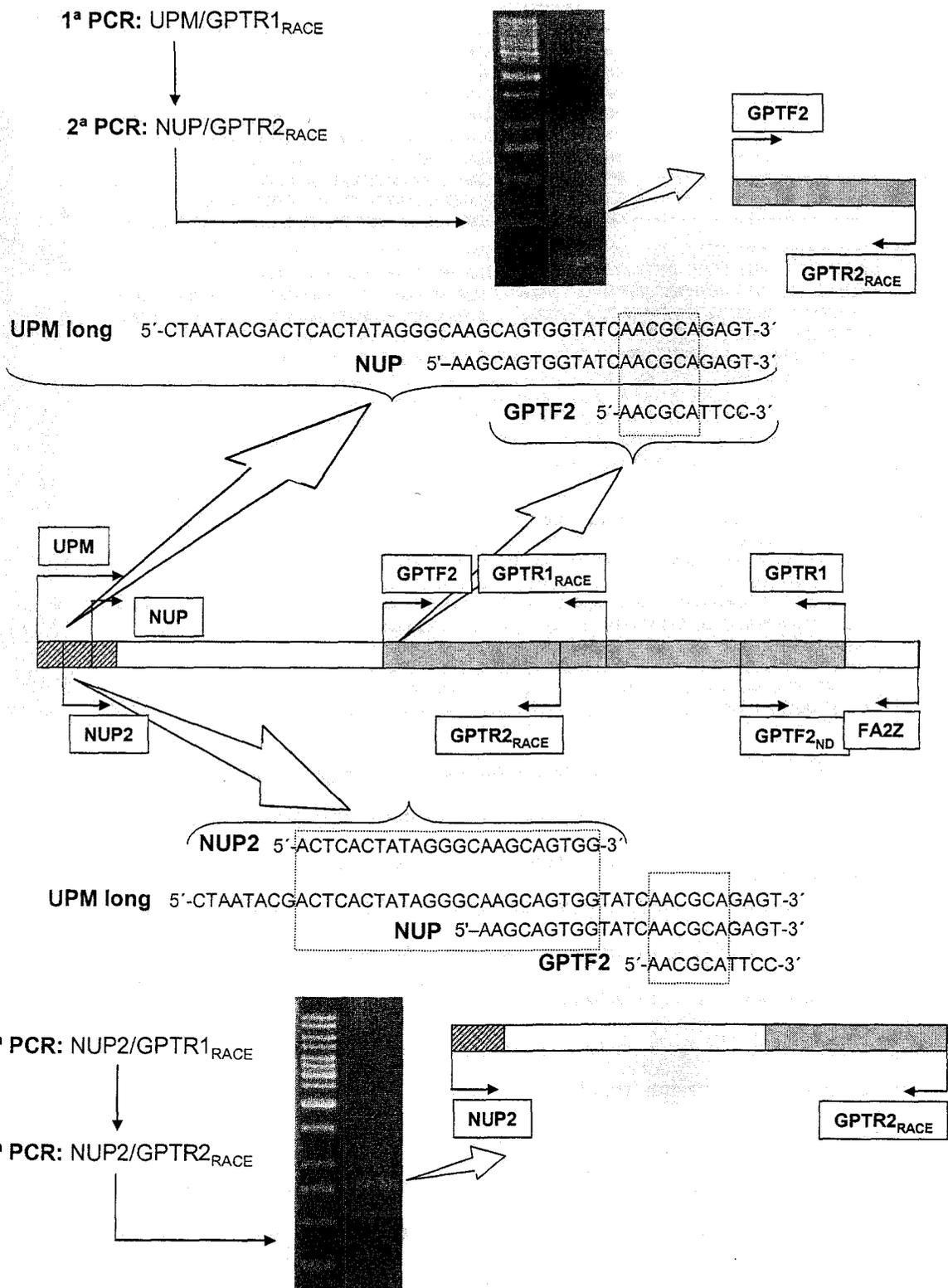


Figura III.10. Esquema de la obtención de *Hagpt* por PCR. A partir de los oligo degenerados GPTF2 y GPTR1 se obtuvo el fragmento interno. A partir de esta secuencia se diseñaron una serie de oligonucleótidos internos. Con NUP2 y GPTR1_{RACE}/GPTR2_{RACE} se obtuvo el extremo 5' y con GPTF2_{ND} y FA2Z el extremo 3' restante.

V. Conclusiones.

Conclusiones.

La incubación de semillas de girasol en desarrollo con [^{14}C]acetato y el posterior análisis de la radioactividad incorporada a los ácidos grasos de la fracción de TAG reflejan la síntesis *in vivo* de ácidos grasos, principalmente síntesis intraplástidial, y además permite diferenciar entre distintos genotipos afectados en distintas actividades enzimáticas responsables de la síntesis de novo de ácidos grasos.

La incubación de semillas de girasol en desarrollo con [^{14}C]acetato y metil viológeno reduce el marcaje de ácido oleico e incrementa el de ácido esteárico de los ácidos grasos sintetizados de novo que se incorporan a la fracción de triacilglicéridos del aceite de las semillas.

En líneas de girasol alto-oleico, el índice de saturación para 10 mM de metil viológeno indica las potencialidades existentes en el genoma de la planta por incrementar el contenido de ácido esteárico de los segregantes fruto del cruce con plantas mutantes alto esteárico CAS-3.

La actividad KAS II presente en semillas de girasol en desarrollo podría utilizar un exceso de 18:0-ACP como sustrato para producir 20:0-ACP en el interior del plastidio.

Se ha puesto de manifiesto la existencia de un ritmo biológico en el metabolismo liposintético de semillas de girasol en desarrollo, este ritmo es reproducible en distintas condiciones ambientales.

Las variaciones periódicas observadas en la composición de ácidos grasos marcados dentro la fracción de TAG, sugieren la existencia de variaciones cualitativas en la maquinaria enzimática responsable de la síntesis intraplastidial de ácidos grasos, junto con las oscilaciones en el flujo de carbono que llegan a las semillas, durante los ciclos luz/oscuridad. Esta hipótesis se ve apoyada por las fluctuaciones rítmicas medidas en la actividad enzimática estearil-ACP desaturasa.

Los plastidios aislados de semillas de girasol en desarrollo de 17 y 24 DDF no incorporan [$1-^{14}\text{C}$]glucose 6-phosphate (Glc6P) dentro de la fracción de ácidos grasos. El malato, cuando se les suministra sólo, es el responsable de las mayores tasas de síntesis de ácidos grasos para ambas edades. El piruvato es responsable de unas tasas de síntesis de ácidos grasos comparables a las obtenidas con malato, pero solo cuando es incubado junto con Glc6P.

El efecto estimulador que tiene la Glc6P sobre la utilización de piruvato como fuente de carbono para la síntesis de ácidos grasos en plastidios de 17 DDF, se relaciona con la rápida utilización de Glc6P a través de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato a esta edad.

Nuestras observaciones realizadas sobre la tasa de utilización de los distintos metabolitos para la síntesis intraplastidial de ácidos grasos y el flujo de carbonos a través de la OPPP, son consistentes con la regulación redox de la OPPP a partir de la actividad plastidial glucosa-6-fosfato deshidrogenasa debida a la demanda de poder reductor en forma de NADPH.

Se ha clonado parcialmente el mRNA que codifica al transportador de Glc6P presente en la membrana de plastidios de semillas de girasol en desarrollo.

VI. Bibliografía.

- Alba, A., Llanos, M.** 1990. El cultivo del girasol. Colección agroguías mundi-prensa.
- Alkio, M., Diepenbrock, W., Grimm, E.** 2002. Vascular connections between the receptacle and empty achenes in sunflower (*Helianthus annuus* L.). New Phytologist
- Ap Rees, T.** 1988. Hexose phosphate metabolism by non-photosynthetic tissues of higher plants. En: The Biochemistry of Plants (Davies, D.D. ed.) Academic press, New York 14: 1-33.
- Allen, E.J., Morgan, D.G., Ridgman, W.J.** 1971. A physiological analysis of the growth of the oilseed rape. Journal of Agricultural Science 77: 339-341.
- Ap Rees, T.** 1995. En: Sucrose Metabolism, Biochemistry, Physiology and Molecular Biology (Pontis, H.G., Salerno, G.L. and Echeverria, E.J., Eds.), Vol. 14, pp. 143-155, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.
- Ascherio, A., Willet, W.C.** 1997. Health effects of *trans* fatty acids. American Journal of Clinical Nutrition 66(Suppl.): 1006S-1010S.
- Aschoff, J.** 1979. Circadian rhythms: influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. Zeitschrift für Tierpsychologie 49: 225-249.
- Auld, D.L., Heikkinen, M.K., Erickson, D.A., Sernyk, J.L., Romero J.E.** 1992. Rapeseed mutants with reduced levels of polyunsaturated fatty acids and increased levels of oleic acid. Crop Science 32: 657-662.
- Bao, X., Focke, M., Pollard, M., Ohlrogge, J.** 2000. Understanding *in vivo* carbon precursor supply for fatty acid synthesis in leaf tissue. The Plant Journal 22: 39-50.
- Barak, S., Tobin, E.M., Ronis, C., Sugano, S., Green, R.M.** 2000. All in good time: the *Arabidopsis* circadian clock. Trends in Plants Science 5: 517-522.
- Betty, M., Smith, A.M.** 1990. Nature of the effect of the *r* locus on the lipid content of embryos of peas (*Pisum sativum* L.). Planta 180: 420-428

- Bolyakina, Y.P., Raikhman, L.A.** 1999. Structural aspects of protein accumulation in developing sunflower seeds. *Russian Journal of Plant Physiology* 46: 400-409.
- Bowsher, C.G., Boulton, E.L., Rose, J., Nayagam, S., Emes, M.J.** 1992. Reductant for glutamate synthase is generated by the oxidative pentose phosphate pathway in non-photosynthetic root plastids. *Plant Journal* 2: 893-898.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Browse, J.P., Roughan, G., Slack, R.** 1981. Light control of fatty acid synthesis and diurnal fluctuations of fatty acid composition in leaves. *Biochemical Journal*. 196: 347-354.
- Cantisán, S., Martínez-Force, E., Garcés, R.** 2000. Enzymatic studies of high stearic acid sunflower seed mutant. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 377-382.
- Chapman, G.W. Jr.** 1980. A conversion factor to determine phospholipid content in soybean and sunflower crude oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 59: 299-302.
- Charles, D.J., Hasegawa, P.M., Cherry, J.H.** 1986. Characterization of acetyl-CoA carboxylase in the seed of two soybean genotypes. *Phytochemistry* 25: 55-59.
- Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Messerli, G., Chen, J., Zeeman, S.C., Smith, S.M., Smith, A.M.** 2004. A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in *Arabidopsis* leaves at night. *The Plant Journal* 37: 853-863.
- Christie, W.W.** 1982. En: *Lipid analysis*. Christie, W.W.(ed). Pergamon Press, Oxford. 2^a edición: 1.

- Christie, W.W., Brechany, E.Y., Holman, R.T.** 1987. Mass spectra of the picolinyl esters of isomeric mono- and dienoic fatty acids. *Lipids* 22: 224-228.
- Connor, D.J., Hall, A.J.** 1997. Sunflower physiology. En: A.A. Schneiter and A.A. Seiler, (Eds.). *Sunflower Technology and Production, Agronomy Monograph, American Society of Agronomy, Madison, USA, 35:113-182.*
- Crookston, R.K., O'Toole, J., Ozbun, J.L.** 1974. Characterization of the bean pod as a photosynthetic organ. *Crop Science* 14: 708-712.
- Da Silva, P.M.F.R., Eastmond, P.J., Hill, L.M., Smith, A.M., Rawsthorne, S.** 1997. Starch metabolism in developing embryos of oilseed rape. *Planta* 203: 480-487.
- Davies, H.M.** 1993. Medium chain acyl-ACP hydrolysis activities of developing oilseeds. *Phytochemistry* 33: 1353-1356.
- Denyer, K., Foster, J. Smith, A.M.** 1995. The contributions of adenosine 5'-diphosphoglucose pyrophosphorylase and starch-branching enzyme to the control of starch synthesis in developing pea embryos. *Planta* 197: 57-62.
- Denyer, K., Smith, A.M.** 1988. The capacity of plastids from developing pea cotyledons to synthesize acetyl-CoA. *Planta* 173: 172-182.
- Domergue, F., Post-Beittenmiller, D.** 2000. Biochemical characterization of 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II from leek epidermis. *Biochemical Society Transactions* 28: 610-613.
- Downey, R.K., Craig, B.M.** 1964. Genetic control for fatty acid biosynthesis in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Journal of the American Oil Chemists' Society* 41: 475-478.
- De Jong, A., Koerselman-Kooij, J.W., Schuurmans, J.A.M.J., Borstlap, A.C.** 1996. Characterization of the uptake of sucrose and glucose by isolated seed coat halves of developing pea seeds. Evidence that a sugar facilitator with diffusional kinetics

- is involved in seed coat unloading. *Planta* 199: 486-492.
- Dennis, D.T., Miernyk, J.A.** 1982. Compartmentation of non-photosynthetic carbohydrate metabolism. *Annual Review of Plant Physiology* 33: 23-50.
- Denyer, K., Dunlap, F., Thorbjornsen, T., Keeling, P., Smith, A.M.** 1996. The major form of ADP-glucose pyrophosphorylase in maize endosperm is extra-plastidial. *Plant Physiology* 112: 779-785.
- Denyer, K., Smith, A.M.** 1988. The capacity of plastids from developing pea cotyledons to synthesize acetyl CoA. *Planta* 173: 172-182.
- Eastmond, P.J., Dennis, D.T., Rawsthorne, S.** 1997. Evidence that a malate/inorganic phosphate exchange translocator imports carbon across the leucoplast envelope for fatty acid synthesis in developing castor seed endosperm. *Plant Physiology* 114: 851-856.
- Eastmond, P.J., Rawsthorne, S.** 2000. Co-ordinate changes in carbon partitioning and plastidial metabolism during the development of oilseed rape (*Brassica napus* L.) embryos. *Plant Physiology* 122: 767-774.
- Egli, M.A., Gengenbach, B.G., Gronwald, J.W., Somers, D.A., Wyse, D.L.** 1993. Characterization of maize acetyl-coenzyme A carboxylase. *Plant Physiology* 101: 499-506.
- Entwistle, G., ap Rees, T.** 1988. Enzymic capacities of amyloplasts from wheat (*Triticum aestivum*) endosperm. *Biochemical Journal* 255: 391-396.
- Evenson, K.J., Post-Beittenmiller, D.** 1995. Fatty acid-elongating activity in rapidly expanding leek epidermis. *Plant Physiology* 109: 707-716.
- Faostat statistics database.** <http://apps.fao.org/>. Food and Agricultural Organization of the United Nations.

- Fernández-Martínez, J.M., Jiménez, A., Domínguez, J., García, J.M., Garcés, R., 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., Garcés, R.** 1997. Isolation of high palmitic mutants on high oleic background. *Euphytica* 97: 113-116.
- Fernández-Martínez, J.M., Muñoz, J., Gómez-Arnau, J.** 1993. Performance of near-isogenic high and low oleic acid hybrids of sunflower. *Crop Science* 33: 1158-1163.
- Fernández-Moya, V., Martínez-Force, E., Garcés, R.** 2002. Temperature effect on a high stearic acid sunflower mutant. *Phytochemistry* 59: 33-37.
- Fernández H., Baldini M., Olivieri A.M.** 1999. Inheritance of high oleic content in sunflower. *Journal of Genetics & Breeding*. 53: 99-103.
- Fick, G.N.** 1984. Inheritance of high oleic acid in the seed oil of sunflower. p. 9. En Proc. Sunflower Research Workshop, Bismark, ND. 1 Feb. 1984. National Sunflower Association. Bismark, ND.
- Fick, G.N.** 1989. Sunflower. En: *Oil Crops of the World*. Röbbelen, G., Downey, R., and Ashri, A. (Eds.), McGraw-Hill Publ. Comp., New York. pp. 301-318.
- Flinn, A.M., Atkins, C.A., Pate, J.S.** 1977. Significance of photosynthetic and respiratory exchanges in the carbon economy of the developing pea fruit. *Plant Physiology* 60: 412-418.
- Foster, J., Smith, A.M.** 1993. Metabolism of glucose 6-phosphate by plastids from developing pea embryos. *Planta* 190: 17-24.
- Frehner, M., Pozueta-Romero, J., Akazawa, T.** 1990. Enzyme sets of glycolysis, gluconeogenesis and oxidative pentose pathway are not complete in non-green highly purified amyloplasts of

- sycamore (*Acer pseudoplatanus*) cell suspensions. *Plant Physiology* 94: 538-544.
- Fox, S.R., Rawsthorne, S., Hills, M.J.** 2001. Fatty acid synthesis in pea root plastids is inhibited by the action of long-chain acyl-coenzyme A_s on metabolite transporters. *Plant Physiology* 126: 1259-1265.
- Fox, S.R., Hill, L.M., Rawsthorne, S., Hills, M.J.** 2000. Inhibition of the glucose-6-phosphate transporter in oilseed rape (*Brassica napus* L.) plastids by acyl-CoA thioesters reduces fatty acid synthesis. *Biochemical Journal* 352: 525-532.
- Garcés, R., Mancha, M.** 1991. In vitro oleate desaturase in developing sunflower seeds. *Phytochemistry* 30: 2127-2130.
- Garcés, R., Mancha, M.** 1989. Oleate desaturation in seeds of two genotypes of sunflowers. *Phytochemistry*, 28: 2593-2595.
- Garcés, R., Mancha, M.** 1993. One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Analytical Biochemistry* 211: 139-143.
- Garcés, R., Sarmiento, C., Mancha, M.** 1992. Temperature regulation of oleate desaturase in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *Planta* 186: 461-465.
- García-Díaz, M.T., Martínez-Rivas, J.M., Mancha, M.** 2002. Temperature and oxygen regulation of oleate desaturation in developing sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *Physiologia Plantarum* 114, 13-20.
- Goffner, D., Cazalis, R., Percie du Sert, C., Calmes, J., Cavalie, G.** 1988. ¹⁴C photoassimilate partitioning in developing sunflower seeds. *Journal of Experimental Botany* 39: 1411-1420.
- Golz, A, Focke, M, Lichtenthaler, H.K.** 1994. Inhibitors of de novo fatty acid biosynthesis in higher plants. *Journal of Plant Physiology* 143: 426-433.

- Graef, G.L., Fehr, W.R., Hammond, E.G.** 1985. Inheritance of three stearic acid mutants of soybean. *Crop Science*. 25: 1076-1079.
- Griffiths, G., Griffiths, W.T., Stobart, A.K.** 1998. Delta-9 desaturase activity in developing cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L). *Phytochemistry*, 48: 261-267.
- Gunstone, F.D., Harwood, J.L., Padley, F.B.** 1994. *The Lipid Handbook*. Second edition. Chapman & Hall, London.
- Gurr, M.I., Harwood, J.L.** 1991. *Lipid Biochemistry*. Chapman & Hall (Great Britain).
- Hall, A.J., Whitfield, D.M., Connor, D.J.** 1990. Contribution of pre-anthesis assimilates to grain-filling in irrigated and water-stressed sunflower crops. II. Estimates from a carbon budget. *Field Crops Research* 24: 273-294.
- Hara A, Radin N.S.** 1978. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry* 90: 420-426.
- Harmer, S.L., Hogenesch, J.B., Straume, M., Chang, H., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J.A., Kay, S.A.** 2000. Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* 290: 2110-2113.
- Harwood, J.L.** 1988. Fatty acid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39: 101-138.
- Harwood, J.L.** 1996. Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochimica et Biophysica. Acta* 1301: 7-56.
- Hill, L.M., Smith, A.M.** 1991. Evidence that glucose 6-phosphate is imported as the substrate for starch synthesis by the plastids of developing pea embryos. *Planta* 185: 91-96.
- Hongtrakul, V., Slabaugh, M.B., Knapp, S.J.** 1998. A seed specific Δ -12 oleate desaturase gene is duplicated, rearranged, and weakly expressed in high oleic acid sunflower lines. *Crop Science* 38: 1245-1249.

- Hoppe, P., Heintze, A., Riedel, A., Creuzer, C., Schultz, G.** 1993. The plastidic 3-phosphoglycerate → acetyl-CoA pathway in barley leaves and its involvement in the synthesis of amino acids, plastidic isoprenoids and fatty acids during chloroplast development. *Planta* 190: 253-262.
- Hutchings, D., Rawsthorne, S., Emes, M.J.** 2005. Fatty acid synthesis and the oxidative pentose phosphate pathway in developing embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Experimental Botany* (en prensa).
- Ip, C.** 1997. Review of the effects of *trans* fatty acids, oleic acid, n-3 polyunsaturated fatty acids, and conjugated linoleic acid on mammary carcinogenesis in animals. *American Journal of Clinical Nutrition* 66(Suppl.):1523S-1529S.
- Izquierdo, N., Aguirrezábal, L. rade, F., Peryra, V.** 2002. Night temperature affects fatty acid composition in sunflower oil depending on the hybrid and the phenological stage. *Field Crops Research* 77: 115-126.
- James, D.W., Dooner, H.K.** 1990. Isolation of EMS-induced mutants in *Arabidopsis* altered in seed fatty acid composition. *Theoretical and Applied Genetics* 80: 241-245.
- James, W.P.T.** 1996. Nutritional disorders affecting the heart. En: *Diseases of the heart*. (2^a Ed.) Julian DG, Cammon AJ, Fox KM, Hall RJC, Poole-Wilson PA, (eds). W. B. Saunders Company Ltd. London: 1442-1458.
- Jaworski, J.G., Clough, R.C., Barnum, S.R.** 1989. A cerulenin-insensitive short chain 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase in *Spinacia oleracea* leaves. *Plant Physiology* 90: 41-44.
- Jelitto, T., Sonnewald, U., Willmitzer, L., Hajirezaei, M.R., Stitt, M.** 1992. Inorganic phosphate content and metabolites in leaves and tubers of potato and tobacco plants expressing *E.coli* pyrophosphatase in their cytosol. *Planta* 188: 238-244.

- Jiang, H.W., Dian, W.M., Liu, F.Y., Wu, P.** 2003. Cloning and characterization of a glucose 6-phosphate/phosphate translocator from *Oryza sativa*. *Journal of Zhejiang University Science* 4: 331-335.
- Johnson, P.E., Fox, S.R., Hills, M.J., Rawsthorne, S.** 2000. Inhibition by long chain acyl-CoAs of glucose-6-phosphate metabolism in plastids isolated from developing embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Biochemical Journal* 348: 145-150.
- Jones, A., Davies, H.M., Voelker, T.A.** 1995. Palmitoyl-acyl carrier protein (ACP) thioesterase and the evolutionary origin of plant acyl-ACP thioesterases. *Plant Cell* 7: 359-371.
- Jones, A.L., Dancer, J.E., Harwood, J.L.** 1995. Effect of thiolactomycin on fatty acid synthesis in peas. *Phytochemistry* 39: 511-514.
- Jones, A.L., Herbert, D., Rutter, A.J., Dancer, J.E., Harwood, J.L.** 2000. Novel inhibitors of the condensing enzymes of the Type II fatty acid synthase of pea (*Pisum sativum*). *Biochemical Journal* 347: 205-209.
- Journet, E.P., Douce, R.** 1985. Enzymic capacities of purified cauliflower bud plastids for lipid synthesis and carbohydrate metabolism. *Plant Physiology* 79: 458-467.
- Kabbaj, A., Abbott, A.G., Bervillé, A.** 1996. Expression of stearate, oleate and linoleate desaturase genes in sunflower with normal and high oleic contents. *Proceedings of 14th International Sunflower Conference, Beijing, Shengyang, China*, 1: 60-65.
- Kammerer, B., Fischer, K., Hilpert, B., Schubert, S., Gutensohn, M., Weber, A., Flügge, U.** 1998. Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: the glucose 6-phosphate/phosphate antiporter. *The Plant Cell* 10: 105-117.

- Kang, F., Rawsthorne, S.** 1996. Metabolism of Glc-6-P and utilization of multiple metabolites for fatty acid synthesis by plastids from developing oilseed rape embryos. *Planta* 199: 321-327.
- Kang, F., Rawsthorne, S.** 1994. Starch and fatty acid synthesis in plastids from developing embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *The Plant Journal* 6: 795-805.
- Keiller, D.R., Morgan, D.G.** 1988. Effect of pod removal and plant growth regulators on the growth, development and carbon assimilate distribution in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Agricultural Science* 111: 357-362.
- Klaus, D., Döermann, P.** 2003. Manipulating lipid content in potato tubers. 1st European Symposium on Plant Lipids. September 10-13th. Aachen, Alemania. pp 99.
- Knutzon, D.S., Thompson, G.A., Radke, S.E., Johnson, W.B., Knauf, V.C., Kridl, J.C.** 1992. Modification of *Brassica* seed oil by antisense expression of a stearyl-acyl carrier protein desaturase gene. *Proceedings of the National Academia of Science of USA* 89: 2624-2628.
- Kochhar, S.P., Rossell, J.B.** 1987. Determination of oil in sunflowerseeds. *Journal of the American Chemists' Society* 64: 865-869.
- Köhler, R., Horn, R., Lössl, A. and Zetsche, K.** 1991. Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the co-transcription of a new open reading frame with the *atpA* gene. *Molecular and General Genetics* 227: 369-376.
- Lajara, J.R., Díaz U., Díaz Quidiello, R.** 1990. Definitive influence of location and climatic conditions on the fatty acid composition of sunflower seed oil. *Journal of the American Oil Chemists Society* 67: 618-623.

- Lamcombe, S., Bervillé, A.** 2000. Analysis of desaturase transcript accumulation in normal and in high oleic oil sunflower development seeds. In : Proceedings of 15th International Sunflower Conference. Toulouse, France. Volume T1, pp A1-A6.
- Landers, R.E., Rathmann, D.M.** 1981. Vegetable oils: effects of processing, storage and use on nutritional values. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 58: 255-259.
- Lawson, H.** 1995. Nutricional aspects of oils and fats. En: *Food oils and fats*. Chapman & Hall, USA, pp. 203-280.
- Lecharny, A., Tremolières, A., Wagner, E.** 1990. Correlation between the endogenous circadian rhythmicity in growth rate and fluctuations in oleic acid content in expanding items of *Chenopodium rubrum* L. *Planta* 182: 211-215.
- Liedvogel, B.** 1986. Acetyl coenzyme A and isopentenylpyrophosphate as lipid precursors in plant cells-biosynthesis and compartmentation. *Journal of Plant Physiology* 124: 211-222.
- Liu, Q., Singh, S.P., Green, A.G.** 2002. High-stearic and high-oleic cottonseed oils produced by hairpin RNA-mediated post-transcriptional gene silencing. *Plant Physiology*. 129: 1732-1743.
- Luthra, R., Munshi, S.K., Sukhija, P.S.** 1991. Relationship of carbohydrate metabolism with lipid biosynthesis in developing sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *Journal of Plant Physiology* 137: 312-318.
- Martínez-Force, E., Álvarez-Ortega, R., Garcés, R.** 1999. Enzymatic characterisation of high-palmitic acid sunflower (*Helianthus annuus* L.) mutants. *Planta* 207: 533-538.

- Martínez-Force, E., Cantisán, S., Serrano-Vega, M.J., Garcés, R.** 2000. Acyl-acyl carrier protein thioesterase activity from sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds, *Planta* 211: 673–678.
- Martínez-Force, E., Garcés, R.** 2002. Dynamic channelling during de novo fatty acid biosynthesis in *Helianthus annuus* seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 40:383-391.
- Martínez-Rivas, J.M., Sánchez-García, A., Sicardo, M.D., García-Díaz, M.T., Mancha, M.** 2003. Oxygen-independent temperature regulation of the microsomal oleate desaturase (FAD2) activity in developing sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *Physiologia Plantarum* 117: 179-185.
- Martínez-Rivas, J.M., Sperling, P., Lühs, W., Heinz, E.** 1998: Isolation of three different microsomal oleate desaturase cDNA clones from sunflower. Expression studies in normal type and high oleic mutant. In: J. Sánchez, J., Cerdá-Olmedo, E. and Martínez-Force, E. (Eds.), *Advances in Plant Lipid Research*. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain. pp. 137-139.
- McCourt, P., Somerville, C.R.** 1987. The use of mutants for the study of plant metabolism. En: *The Biochemistry of Plants*. Stumpf, P.K. and Conn, E.E. (eds) Academic Press, Inc. Vol. 13 pp. 33-63.
- McWilliam J.R., English, S.D., McDougall, G.N.** 1974. The effect of leaf age and position on photosynthesis and the supply of assimilates during grain development in sunflower. *Proceedings of the Sixth International Sunflower Conference*, Bucharest, Romania.

- Miernyk, J.A., Dennis, D.T.** 1983. The incorporation of glycolytic intermediates into lipids by plastids isolated from the developing endosperm of castor oil seeds. *Journal of Experimental Botany* 34: 712-718.
- Millar, A.J., Straume, M., Chory, J., Chua, N.H., Kay, S.A.** 1995. The regulation of circadian period by phototransduction pathways in *Arabidopsis*. *Science* 267: 1163-1166.
- Miller J.F., Zimmerman D.C., Vick B.A.** 1987. Genetic control of high oleic acid content in sunflower oil. *Crop Science* 27: 923-926.
- Mudd, J.B., Dezacks, R.** 1981. Synthesis of phosphatidylglycerol by chloroplasts from leaves of *Spinacia oleracea* L. (spinach). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 209: 584-591.
- Murphy, D.J., Rawsthorne, S., Hills, M.J.** 1993. Storage lipid formation in seeds. *Seed Science Research* 3: 79-95.
- Murphy, D.J.** 1993. Structure, function and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants. *Progress in Lipid Research* 32: 247-280.
- Naudet, M.** 1996. Main chemical constituents of fats. En: *Oils & Fats Manual*. Vol. 1. A. Karleskind, (ed). Paris (France).
- Norden, A.J., Gorbet, D.W., Knauff, D.A. Young, C.T.** 1987. Variability in oil quality among peanut genotypes in the Florida breeding program. *Peanut Science*. 14: 7-11.
- Norton, G. and Harris, J.F.** 1975. Compositional changes in developing rape seed (*Brassica napus* L.). *Planta* 123: 163-174.
- Ohlrogge, J.B., Browse, J.** 1995. Lipid biosynthesis. *Plant Cell* 7: 957-970.

- Ohlrogge, J.B., Pollard, M.R., Stumpf, P.K.** 1978. Studies on biosynthesis of waxes by developing jojoba seed tissue. *Lipids* 13: 203-210.
- Osorio, M., Fernández-Martínez, J.M., Mancha, M., Garcés, R.** 1995. Mutant sunflower with high concentration of saturated fatty acids in the oil. *Crop Science* 35: 739-742.
- Page, R.A., Okada, S., Harwood, J.L.** 1994. Acetyl-CoA carboxylase exerts strong flux control over lipid synthesis in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1210: 369-372.
- Page, R.D.M.** 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Patrick, J.W., Offler, C.E.** 1995. Post-sieve element transport of sucrose in developing seed. *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 681-702.
- Patterson, H.B.W.** 1994. "Hydrogenation of Fats and Oils; Theory and Practice." AOCS Press, American Oil Chemists' Society, Champaign, Ill.
- Pechan, P.M., Morgan, D.G.** 1985. Defoliation and its effects on pod and seed development in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Experimental Botany* 36: 458-468.
- Pérez-Vich, B., Fernández-Martínez, J.M., Grondona, M., Knapp, S.J., Berry, S.T.** 2002. Stearoyl-ACP and oleoyl-PC desaturase genes cosegregate with quantitative trait loci underlying high stearic and high oleic acid mutant phenotypes in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 338-349.
- Pérez-Vich, B., Garcés, R., Fernández-Martínez, J.M.** 1999. Genetic control of high stearic acid content in the seed oil of sunflower mutant CAS-3. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 663-669.

- Pérez-Vich, B., Garcés, R., Fernández-Martínez, J.M.** 2000. Genetic relationships between loci controlling the high stearic and the high oleic acid traits in sunflower. *Crop Science* 40: 990-995.
- Pérez-Vich, B., Knapp, S.J., León, A.J.; Fernández-Martínez, J.M., Berry, S.T.** 2004b. Mapping minor QTL for increased stearic acid content in sunflower seed oil. *Molecular Breeding* 13: 313-322.
- Pérez-Vich, B., Muñoz-Ruz, J., Fernández-Martínez, J.M.** 2004a. Developing midstearic acid sunflower lines from a high stearic acid mutant. *Crop Science* 44: 70-75.
- Pike, M., Kubis, S., Everett, C.J., Hill, L., Rawsthorne, S.** 2003. Expression of the phosphoenolpyruvate/inorganic phosphate translocator genes in oilseeds- from transcript to activity. 1st European Symposium on Plant Lipids. September 10-13th. Aachen, Alemania. pp 15.
- Pleite, R., Martínez-Force, E., Garcés, R.** 2004. Enzyme inhibitors of fatty acid biosynthesis in sunflower seeds: selecting thioesterases activities on saturated fatty acids. *Phytochemistry* (in press).
- Pollard, M.R., Stumpf, P.K.** 1980a. Long chain (C₂₀ and C₂₂) fatty acids biosynthesis in developing seeds of *Tropaeolum majus*: an in vivo study. *Plant Physiology* 66: 641-648.
- Pollard, M.R., Stumpf, P.K.** 1980b. Biosynthesis of C₂₀ and C₂₂ fatty acids by developing seeds of *Limnanthes alba*: chain elongation and Δ^5 desaturation. *Plant Physiology* 66: 649-655.
- Post-Beittenmiller, D., Jaworski, J.G., Ohlrogge, J.B.** 1991. *In vivo* pools of free and acylated Acyl Carrier Proteins in spinach: evidence for sites of regulation of fatty acid biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 266: 1858-1865.

- Post-Beittenmiller, D., Roughan, G., Ohlrogge, J.B.** 1992. Regulation of plant fatty acid biosynthesis. *Plant Physiology* 100: 923-930.
- Purdy, R.H.** 1986. High oleic sunflower: Physical and chemical characteristics. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 63: 1062-1066.
- Rapp, B.J., Randall, D.D.** 1980. Pyruvate dehydrogenase complex from germinating castor bean endosperm. *Plant Physiology* 65: 314-318.
- Reid, E.E., Lyttle, C.R., Canvin, D.T., Dennis, D.T.** 1975. Pyruvate dehydrogenase complex activity in proplastids and mitochondria of developing castor bean endosperm. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 62: 42-47.
- Rijven, A.H.G.C., Gifford, R.M.** 1983. Accumulation and conversion of sugars by developing wheat grains. 3. Non-diffusional uptake of sucrose, the substrate preferred by endosperm slices. *Plant Cell and Environment* 6: 417-425.
- Rikin, A., Dillwith, J.W., Bergman, D.K.** 1993. Correlation between the circadian rhythm of resistance to extreme temperatures and changes in fatty acid composition in cotton seedlings. *Plant Physiology*, 101: 31-36.
- Röbbelen, G., Downey, R.K. & Ashri, A.** 1989. *Oil crops of the world*, McGraw-Hill Publ. Company, New York.
- Roesler, K., Shintani, D., Savage, L., Boddupalli, S., Ohlrogge, J.** 1997. Targeting of the *Arabidopsis* homomeric acetyl-Coenzyme A carboxylase to plastids of rapeseeds. *Plant Physiology* 113: 75-81.
- Roughan, P.G.** 1995. Acetate concentrations in leaves are sufficient to drive *in vivo* fatty acid synthesis at maximum rates. *Plant Science* 107: 49-55.
- Roughan, P.G., Slack, C.R.** 1982. Cellular organization of glycerolipid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology* 33: 97-132.

- Rücker, B., Röbbelen, G. 1995. Development of high oleic acid rapeseed. Proceedings of the 9th International Rapeseed Congress, July 4-7, Cambridge, UK. 389-391.
- Salas, J.J., Martínez-Force, E., Garcés, R. 2004. Biochemical characterization of a high-palmitoleic acid *Helianthus annuus* mutant. Plant Physiology and Biochemistry 42: 373-381.
- Salomé, P.A., Michael, T.P., Kearns, E.V., Fett-Neto, A.G., Sharrock, R.A., McClung, C.R. 2002. The *out of phase 1* mutant defines a role for PHYB in circadian phase control in Arabidopsis. Plant Physiology 129: 1674-1685.
- Sambrook, J., Fritsh, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.
- Sánchez-García, A., Mancha, M., Heinz, E., Martínez-Rivas, J.M. 2004. Differential temperature regulation of three sunflower microsomal oleate desaturase (FAD2) isoforms overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*. European Journal of Lipid Science and Technology 106: 583-590.
- Sánchez, J., Stumpf, P.K. 1984. The effect of hypolipidemic drugs on plant lipids metabolism. Archives of Biochemistry and Biophysics 234: 45-45.
- Sarmiento, C., Garcés, R. Mancha, M. 1998. Oleate desaturation and acyl turnover in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed lipids during rapid temperature adaptation. Planta 205: 595-600.
- Sasaki, Y., Hakamada, K., Suama, Y., Nagano, Y., Furusawa, I., Matsuno, R. 1993. Chloroplast-encoded protein as a subunit of acetyl-CoA carboxylase in pea plant. Journal of Biological Chemistry 268: 25118-25123.
- Sasaki, Y., Konishi, T., Nagano, Y. 1995. The compartmentation of acetyl-coenzyme A carboxylase in plants. Plant Physiology 108: 445-449.

- Satchithanam, S., Oles, C.J., Spease, C.J., Brt, M.M., Yurawecz, M.P., Rader, J.I.** 2004. Trans, saturated, and unsaturated fat in foods in the united states prior to mandatory trans-fat labelling. *Lipids* 39: 11-18.
- Schaffer, R., Lgraf, J., Accerbi, M., Simon, V., Larson, M., Wisman, E.** 2001. Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 13: 113-123.
- Schussler, J.R., Brenner, M.L., Brun, W.A.** 1984. Abscisic acid and its relationship to seed filling in soybeans. *Plant Physiology* 76: 301-307.
- Schwender, J., Ohlrogge, J.** 2002. Probing *in vivo* metabolism by stable isotope labeling of storage lipids and proteins in developing *Brassica napus* embryos. *Plant Physiology* 130: 347-361.
- Schwender, J., Ohlrogge, J.B., Shachar-Hill, Y.** 2003. A flux model of glycolysis and oxidative pentosephosphate pathway in developing *Brassica napus* embryos. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 29442-29453.
- Shapiro, S.** 1997. Do *trans* fatty acids increase the risk of coronary artery disease? A critique of the epidemiologic evidence. *American Journal of Clinical Nutrition*, 66(Suppl.): 1011S-1017S.
- Shimakata, T., Stumpf, P.K.** 1982. Isolation and function of spinach leaf β -ketoacyl-[acyl-carrier-protein] synthases. *Proceedings of the National Academia of Science of USA* 79: 5808-5812.
- Shintani, D.K., Ohlrogge, J.B.** 1994. Characterization of a mitochondrial acyl carrier protein isoform isolated from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 104: 1221-1229.
- Simcox, P.D., Garland, W., Deluca, V., Canvin, D.T., Dennis, D.T.** 1979. Respiratory pathways and fat synthesis in the developing castor-oil seed. *Canadian Journal of*

Botany 57: 1008-1014.

- Simcox, P.D., Reid, E.E., Canvin, D.T., Dennis, D.T.** 1977. Enzymes of the glycolytic and pentose phosphate pathways in proplastids from the developing endosperm of *Ricinus communis* L. *Plant Physiology* 59: 1128-1132.
- Singh, S.S., Nee, T.Y., Pollard, M.R.** 1986. Acetate and mevalonate labeling studies with developing *Cuphea lutea* seeds. *Lipids* 21: 143-149.
- Slabas, A.R., Fawcett, T.** 1992. The biochemistry and molecular biology of plant lipid biosynthesis. *Plant Molecular Biology* 19: 169-191.
- Slabas, A.R., Hellyer, A.** 1985. Rapid purification of a high molecular-weight subunit polypeptide form of rape seed acetyl-CoA carboxylase. *Plant Science* 39: 177-182
- Slack, C.R., Roughan, P.G.** 1978. Rapid temperature-induced changes in the fatty acid composition of certain lipids in developing linseed and soya-bean cotyledons. *Biochemical Journal* 170: 437-439.
- Smith A.M., Zeeman, S., Thorneycroft, D., Smith, S.M.** 2003. Starch mobilization in leaves. *Journal of Experimental Botany* 54: 577-583.
- Smith, R.G., Gauthier, D.A., Dennis, D.T., Turpin, D.H.** 1992. Malate- and pyruvate-dependent fatty acid synthesis in leucoplasts from developing castor endosperm. *Plant Physiology* 98:1233-1238.
- Soldatov, K.I.** 1976. Chemical mutagenesis in sunflower breeding. Proceedings of the Seventh International Sunflower Association, Vlaardingen, The Netherlands. International Sunflower Association, Toowoomba, Australia: pp 352-357.
- Somers, D.E., Webb, A.A.R., Pearson, M. Kay, S.A.** 1998. The short mutant, *toc1-1*, alters circadian clock regulation of multiple outputs throughout development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 125: 485-494.

- Staiger, D.** 2002. Circadian rhythms in Arabidopsis: time for nuclear proteins. *Planta* 214: 334-344.
- Stitt, M., McLilley, R., Gerhardt, R., Heldt, H.W.** 1989. Metabolic levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods in Enzymology* 174: 518-552.
- Stitt, M. and Steup, M.** 1985. Starch and sucrose degradation. En: *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series Vol. 18.* (Douce, R. and Day, D.A. eds.) Springer-Verlag. Berlin. pp. 347-390.
- Stitt, M.** 1996. Plasmodesmata play an essential role in sucrose export from leaves: a step toward an integration of metabolic biochemistry and cell biology. *Plant Cell* 8: 565-571.
- Stitt, M., ap Rees, T.** 1979. Capacities of pea chloroplasts to catalyse the oxidative pentose phosphate pathway and glycolysis. *Phytochemistry* 18: 1905-1911.
- Stobart, A., Stymne, S., Glad, G.** 1983. The synthesis of linoleate and phosphatidic acid and its relationship to oil production in the microsomes of developing seeds of safflower (*Carthamus tinctorius*, L. Var. Gila). *Biochimica et Biophysica Acta* 754: 292-297.
- Stymne, S., Stobart A.K.** 1987. Triacylglycerol biosynthesis. En: Stumpf PK (ed) *The biochemistry of plants.* Academic Press, Orlando, USA: 175-214.
- Tetlow, I.J., Blissett, K.J., Emes, M.J.** 1993. A rapid method for the isolation of purified amyloplasts from wheat endosperm. *Planta* 189: 597-600.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G.** 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.

- Thorbjornsen, T., Villand, P., Denyer, K., Olsen, O.A., Smith A.M.** 1996. Distinct isoforms of ADP-glucose pyrophosphorylase occur inside and outside the amyloplast in barley endosperm. *The Plant Journal* 10: 243-250.
- Thorne, J.H.** 1985. Phloem unloading of C and N assimilates in developing seeds. *Annual Review of Plant Physiology* 36: 317-343.
- Trimming, B.A., Emes, M.J.** 1993. Glycolytic enzymes in non-photosynthetic plastids of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* 190, 439-445.
- Turnham, E., Northcote, D.H.** 1983. Changes in the activity of acetyl-CoA carboxylase during rapeseed formation. *Biochemical Journal* 208: 323-332.
- Tyson, R.H., Ap Rees, T.** 1988. Starch synthesis by isolated amyloplasts from wheat endosperm. *Planta* 175: 33-38.
- Tzen, J.T., Huang, A.H.** 1992. Surface structure and properties of plant seed oil bodies. *Journal of Cell Biology* 117: 327-335.
- Urie A.L.** 1985. Inheritance of high oleic acid in sunflower. *Crop Science* 25: 986-989.
- Urie, A.L.** 1984. Inheritance of very high oleic acid content in sunflower. p. 9-10. *Proceedings of the Sunflower Research Workshop, Bismark, ND. 1 Feb. 1984.* National Sunflower Association. Bismark, ND.
- Vrânceanu, A.V.** 1977. *El girasol.* Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Wang, X.D., Harrington, G., Patrick, J.W., Offler, C.E., Fieuw, S.** 1995. Cellular pathways of photosynthate transport in coats of developing seed of *Vicia faba* L. and *Phaseolus vulgaris* L.: principal cellular sites of efflux. *Journal of Experimental Botany* 45: 49-63.

- Wardlaw, G.M., Snook, J.T.** 1990. Effects of diets high in butter, corn oil, or high oleic acid sunflower oil on serum lipids and apolipoproteins in men. *American Journal of Clinical Nutrition* 51: 815-821.
- Warner, D., Mounts, T.L. List, G.R.** 1990. Effects of added tocopherols in the flavor stability of purified vegetable oils. *Inform* 1: 236.
- Wenderoth, I., Scheibe, R. von Schaewen, A.** 1997. Identification of the cysteine residues involved in redox modification of plant plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 26985-26990.
- Wilcox, J.R., Cavins, J.F.** 1985. Inheritance of low linolenic acid content of the seed oil of a mutant in *Glycine max*. *Theoretical and Applied Genetics* 71: 74-78.
- Willet, W.C.** 1994. Diet and Health: What should we eat?. *Science* 264: 532-537.
- Williams, M., Randall, D.D.** 1979. Pyruvate dehydrogenase complex from chloroplasts of *Pisum sativum* L. *Plant Physiology* 64: 1099-1103.
- Wilson, L.A., Birmingham, V.A., Moon, D.P., Snyder, H.E.** 1978. Isolation and characterization of starch from mature soybean. *Cereal Chemistry* 55: 661-670.
- Yamada, M., Nakamura, Y.** 1975. Fatty acid synthesis by spinach chloroplasts II. The path from PGA to fatty acids. *Plant Cell Physiology* 16: 151-162.
- Yanovsky, M. J., Kay, S. A.** 2001. Signaling networks in the plant circadian system. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 429-435.
- Zeeman, S.C., Pilling, E., Tiessen, A., Kato, L., Donald, A.M., Smith, A.M.** 2002. Starch synthesis in Arabidopsis; granule synthesis, composition and structure. *Plant Physiology* 129: 516-529.

Zimmerman, D.C., Fick, G.N. 1973. Fatty acid composition of sunflower (*Helianthus annuus* L.) oil as influenced by seed position. *Journal of the American Oil Chemists Society* 50: 273-275.

Zock, P.L., de Vries, J.H.M., de Fouw, N.J., Katan, M.B. 1995. Positional distribution of fatty acids in dietary triglycerides: effects on fasting blood lipoprotein concentrations in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 61: 48-55.

Zimmerman, D.C., Fick, G.N. 1973. Fatty acid composition of sunflower (*Helianthus annuus* L.) oil as influenced by seed position. *Journal of the American Oil Chemists Society* 50: 273-275.

Zock, P.L., de Vries, J.H.M., de Fouw, N.J., Katan, M.B. 1995. Positional distribution of fatty acids in dietary triglycerides: effects on fasting blood lipoprotein concentrations in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 61: 48-55.

RAPHAEL PLETTE GUTIÉRREZ
ANÁLISIS IN VIVO DEL METABOLISMO LIPOLÍTICO
EN SEMILLAS DE GIRASOL (*HELIANTHUS ANNUUS* L.)

Sobresaliente cum laude

por unanimidad
22

ABRIL

2005

Ángel Merida

El Presidente,

Diego L.D.

