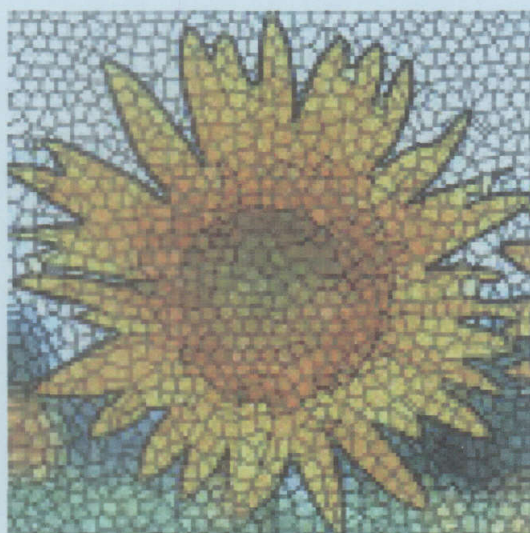


**CARACTERIZACIÓN DE LAS ACIL-ACP TIPOESTERASAS
DE SEMILLA EN DESARROLLO DE GIRASOL
(*Helianthus annuus* L.) Y OBTENCIÓN DE NUEVAS LÍNEAS
ALTO SATURADO.**



M^a Josefa Serrano Vega

Universidad de Sevilla, 2004

TD

319



Facultad de Biología
Biblioteca

TD
319

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi
Tesis Doctoral

CARACTERIZACIÓN DE LAS ACIL-ACP TOESTERASAS DE SEMILLAS EN DESARROLLO DE GIRASOL (Helianthus annuus L.) Y OBTENCIÓN DE NUEVAS LÍNEAS ALTO SATURADO

Sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de usuarios.
- Otros términos.

Firmado:

MARIA JOSEFA SERRANO VEGA

Sevilla, a 09 de NOVIEMBRE de 2005

0-10983843

**CARACTERIZACIÓN DE LAS ACIL-ACP TIPOESTERASAS DE SEMILLA EN
DESARROLLO DE GIRASOL (*Helianthus annuus* L.) Y OBTENCIÓN DE
NUEVAS LÍNEAS ALTO SATURADO.**



Trabajo presentado para optar al grado de Doctora en Ciencias
Biológicas por la Licenciada:

M^a Josefa Serrano Vega

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'JS' with a large flourish.

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

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Enrique Martínez Force'.

Tutora:
Dra. Tahía Benítez Fernández
Catedrático de Universidad
Universidad de Sevilla

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Tahía Benítez Fernández'.

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

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Rafael Garcés Mancheño'.

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Departamento de Genética**

A mis padres, a mi hermana.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Fisiología y Tecnología de Productos Vegetales del Instituto de la Grasa y sus Derivados (CSIC) de Sevilla, bajo la dirección de los Dr. Enrique Martínez Force y Dr. Rafael Garcés Mancheño, correspondiendo la tutoría universitaria a la Dra. Tahía Benítez Fernández, a los cuales deseo expresar mi máximo agradecimiento por sus constantes ayudas y orientaciones.

Ha sido posible gracias a la concesión de una Ayuda para el Intercambio de Personal Investigador entre Industrias y Centros Públicos de Investigación concedida por el Ministerio de Educación y Cultura, y a la Ayuda con cargo a Proyectos de Investigaciones Científicas del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

Este agradecimiento quisiera hacerlo también extensivo a todas aquellas personas que han ayudado directa o indirectamente a la realización de esta tesis:

Al Instituto de la Grasa por poner a mi disposición el material e instrumental disponible para la realización de este trabajo, así como a todo el personal competente, cuya colaboración me fue brindada en todo momento.

A M^a Carmen Ruiz por su ayuda en la realización de los análisis de cromatografía gaseosa y su ayuda en la interpretación de éstos. Por estar siempre dispuesta a resolver cualquier duda... del ámbito que fuera.

A Pilar y Alberto, por el cuidado de mis plantas, por ayudar a mis girasoles a sobrevivir en tantos momentos de "crisis".

A Valle, por transmitirme su experiencia en el laboratorio, mostrarme el maravilloso mundo de la informática, y en general por tantos consejos y opiniones que me han sido de gran utilidad para conocer el terreno que pisaba.

A Mónica, por estar siempre dispuesta para darme una segunda opinión, por compartir conmigo lo mejor y lo peor de la vida de investigación.

A Noemí, por acompañarme en los planes y proyectos más "creativos", por hacerme sentir tan bien en el laboratorio.

A Diana, por su ayuda y colaboración en la maravillosa aventura de los TAG y la lipólisis, por ser capaz de sorprenderme cada día con una nueva experiencia.

A Rafael, por contar conmigo hasta el final, por ser más que mi director de tesis.

A Quique, por su dedicación, por no llegar a hartarse nunca de todas mis dudas y comentarios (o al menos saber disimularlo muy bien), por las discusiones acerca del trabajo y su apoyo profesional y personal.

A Luisma, por servir de nexo con otra forma de entender la ciencia. Por sus consejos e ideas. Por estar siempre a mi lado y no defraudarme nunca, por ser el “so mejor”.

A Quino, Rafa, Adrián y Elia, por estar ahí.

A las Mosketeras, por permanecer siempre juntas, por la perseverancia y ser las más campeonas.

A mi abuela, mi tía Carmen y mi tía Carmelita por estos 10 años de convivencia, por hacerme sentir en casa.

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. EL GIRASOL: ASPECTOS GENERALES.	1
1.1. Sistemática.	1
1.2. Morfología y fisiología.	2
2. ÁCIDOS GRASOS.	4
3. LÍPIDOS COMPLEJOS DE PLANTAS.	6
4. EL ACEITE DE GIRASOL.	8
5. BIOSÍNTESIS DE LOS LÍPIDOS DE RESERVA EN LA SEMILLA.	9
5.1. Síntesis de novo de los ácidos grasos.	9
5.2. Biosíntesis de glicerolípidos.	13
5.3. Síntesis activa de lípidos de reserva.	17
5.4. Efecto de la temperatura sobre la composición de ácidos grasos en el aceite.	17
6. UTILIZACIÓN DE LA RESERVA LIPÍDICA EN LA GERMINACIÓN.	18
7. MODIFICACIÓN DE LOS LÍPIDOS DE PLANTAS.	19
7.1. Problemática actual.	19
7.2. Semillas oleaginosas con composición de ácidos grasos modificada.	21
8. MUTANTES DE GIRASOL ALTO-SATURADO.	23
8.1. Obtención de las líneas mutantes de girasol con alto contenido de ácidos grasos	23
8.2. Composición de ácidos grasos de los aceites de las líneas mutantes.	23
8.3. Actividades enzimáticas implicadas.	25
8.4. Herencia de los caracteres alto-saturado de girasol.	26
9. ACIL-ACP TIOESTERASAS.	26
9.1. Descripción y clasificación.	26
9.2. Estructura primaria.	28
9.3. Expresión de <i>fatA</i> y <i>fatB</i> .	29
 OBJETIVOS	 31
 MATERIALES Y MÉTODOS	 33

1. MATERIALES.	33
1.1. Material vegetal.	33
1.1.1. <u>Girasol.</u>	33
1.1.2. <u>Condiciones de cultivo.</u>	33
1.2. <i>Escherichia coli.</i>	34
2. MÉTODOS.	35
2.1. Biología molecular.	35
2.1.1. <u>Extracción de DNA y mRNA de plantas.</u>	35
2.1.1.1. <i>Extracción de DNA.</i>	35
2.1.1.2. <i>Extracción de mRN.</i>	35
2.1.2. <u>Síntesis de la primera cadena de cDNA.</u>	36
2.1.3. <u>Estimación de la concentración de ácidos nucleicos.</u>	36
2.1.4. <u>Electroforesis de DNA.</u>	36
2.1.5. <u>Amplificación del DNA mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).</u>	37
2.1.5.1. <i>Diseño de cebadores.</i>	37
2.1.5.2. <i>Condiciones de amplificación.</i>	39
2.1.5.3. <i>Amplificación rápida de los extremos del cDNA (RACE).</i>	40
2.1.6. <u>Análisis de niveles de expresión del mRNA mediante PCR a tiempo real.</u>	41
2.1.6.1. <i>Reacciones de PCR a tiempo real para fatA y fatB.</i>	42
2.1.6.2. <i>Cuantificación de los productos de PCR.</i>	43
2.1.7. <u>Clonación de productos de PCR.</u>	43
2.1.7.1. <i>Ligación.</i>	43
2.1.7.2. <i>Obtención de células competentes.</i>	44
2.1.7.3. <i>Transformación de E. coli.</i>	44
2.1.7.4. <i>Extracción de DNA plasmídico.</i>	45
2.1.7.5. <i>Secuenciación y análisis de secuencias.</i>	45
2.1.8. <u>Expresión heteróloga en E. coli.</u>	46
2.2. Análisis lipídico.	47
2.2.1. <u>Metodología general para analítica de lípidos de girasol.</u>	47
2.2.1.1. <i>Análisis de semillas. Técnica de la media semilla.</i>	47
2.2.1.2. <i>Extracción de lípidos totales.</i>	48
2.2.1.3. <i>Análisis de ácidos grasos. Metilación de lípidos.</i>	48

2.2.1.4. <i>Determinación del contenido lipídico y riqueza grasa.</i>	49
2.2.1.5. <i>Separación de los distintos tipos de lípidos.</i>	49
2.2.1.5.1. <i>Cromatografía en capa fina.</i>	49
2.2.1.5.2. <i>Separación de polares por cromatografía líquida.</i>	50
2.2.1.5.3. <i>Separación de los distintos lípidos polares por CCF.</i>	51
2.2.1.6. <i>Análisis de triglicéridos.</i>	51
2.2.1.6.1. <i>Purificación de triglicéridos.</i>	51
2.2.1.6.2. <i>Análisis de triglicéridos.</i>	52
2.2.1.6.3. <i>Análisis posicional de los ácidos grasos en los triglicéridos.</i>	52
2.2.1.6.4. <i>Síntesis de triglicéridos patrón.</i>	53
2.2.2. <u>Extracción y análisis de lípidos de <i>E. coli</i>.</u>	54
2.3. <u>Bioquímica.</u>	55
2.3.1. <u>Extracción de proteínas y análisis.</u>	55
2.3.1.1. <i>Extracción de proteínas de semillas de girasol.</i>	55
2.3.1.2. <i>Extracción de proteínas de <i>E. coli</i>.</i>	55
2.3.1.3. <i>Determinación cuantitativa de proteínas.</i>	55
2.3.1.4. <i>Electroforesis de proteínas. SDS-PAGE.</i>	55
2.3.2. <u>Purificación de proteínas.</u>	56
2.3.3. <u>Ensayos de actividad acil-ACP tioesterasa.</u>	57
2.3.3.1. <i>Síntesis de sustratos radiactivos.</i>	57
2.3.3.1.1. <i>Síntesis de la sal amónica de los ácidos grasos.</i>	57
2.3.3.1.2. <i>Síntesis de los acil-ACPs.</i>	57
2.3.3.1.3. <i>Cuantificación de la radiactividad y determinación de la concentración de los acil-ACPs sintetizados.</i>	58
2.3.3.2. <i>Determinación de la actividad tioesterasa.</i>	58

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

BLOQUE I. ESTUDIO DE LAS ACIL-ACP TIOESTERASAS DE GIRASOL.

1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS mRNA DE LOS GENES

<i>HafatA1</i> y <i>HafatB</i> EN SEMILLA EN DESARROLLO DE <i>Helianthus annuus</i>.	61
1.1. <i>HafatA1</i> : Acil-ACP tioesterasa de tipo FatA de <i>Helianthus annuus</i> .	61
1.1.1. <u>Amplificación de un fragmento de <i>HafatA1</i> a partir de semilla de 15 DDF de la línea control RHA-274.</u>	61
1.1.2. <u>Obtención de la secuencia completa del cDNA correspondiente a <i>HafatA1</i>.</u>	62
1.2. <i>HafatB</i> : Acil-ACP tioesterasa de tipo FatB de <i>Helianthus annuus</i> .	65
1.2.1. <u>Clonación y secuenciación del cDNA correspondiente a <i>HaFatB</i> de semillas de 15 DDF de la línea control RHA-274.</u>	65
1.3. Análisis comparativo de las secuencias de los genes <i>HafatA1</i> y <i>HafatB</i> .	67
1.4. Estructura tridimensional.	68
2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE FRAGMENTOS GENÓMICOS DE LOS GENES <i>HafatA1</i> y <i>HafatB</i>.	72
2.1. Amplificación de las secuencias genómicas de <i>HafatA1</i> y <i>HafatB</i> .	72
2.2. Análisis comparativos con otras secuencias genómicas.	72
3. SECUENCIAS DE LOS GENES <i>HafatA1</i> y <i>HafatB</i> EN MUTANTES ALTO SATURADO DE GIRASOL.	76
3.1. Aislamiento del gen <i>HafatA1</i> de los mutantes alto esteárico CAS-3 y CAS-4 y los alto palmítico CAS-5 y CAS-12.	76
3.2. Aislamiento del gen <i>HafatB</i> del mutante alto esteárico CAS-3 y los alto palmítico CAS-5 y CAS-12.	76
4. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE <i>HaFatA1</i> y <i>HaFatB1</i> MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL.	77
5. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE <i>HafatA1</i> y <i>HafatB</i> EN <i>Escherichia coli</i>.	79
5.1. Expresión de <i>HafatA1</i> .	79
5.1.1. <u>Purificación de la proteína recombinante HIS-FATA.</u>	81
5.1.2. <u>Análisis cinéticos.</u>	82
5.1.3. <u>Alteraciones en la síntesis de ácidos grasos de <i>E. coli</i>.</u>	84
5.2. Expresión de <i>HafatB</i> .	86
5.2.1. <u>Efecto tóxico derivado de la expresión de <i>HafatB</i>.</u>	86
5.2.2. <u>Medida de actividad de HaFATB.</u>	89
5.2.3. <u>Modificación del perfil de ácidos grasos en <i>E. coli</i>.</u>	89
5.3. Actividad tioesterasa en semilla de girasol de 15 DDF.	90

6. DISCUSIÓN.	91
 BLOQUE II. SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS CAS-18 Y CAS-25.	
1. OBTENCIÓN DE NUEVAS LÍNEAS DE GIRASOL POR RECOMBINACIÓN DE LOS CARACTERES PRESENTES EN LAS LÍNEAS ALTO SATURADAS CAS-3 Y CAS-5.	97
2. SELECCIÓN DE LAS LÍNEAS CAS-18 Y CAS-25.	99
2.1 Composición de ácidos grasos de la semilla.	99
2.2. Efecto de la temperatura.	100
2.3. Estudio de la composición de los lípidos neutros del aceite.	101
2.3.1. <u>Composición de los ácidos grasos de triacilglicéridos (TAG) y diacilglicéridos (DAG).</u>	101
2.3.2. <u>Análisis de especies de TAG por cromatografía gaseosa (GLC).</u>	102
2.3.3. <u>Estudio de las posiciones <i>sn</i>-2 y <i>sn</i>- (1+3).</u>	106
2.4. Estudio de la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos del aceite.	107
2.4.1. <u>Estudio de los principales fosfolípidos de la semilla.</u>	107
3. DISCUSIÓN.	109
 CONCLUSIONES	 115
 BIBLIOGRAFÍA	 117

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

12:0	Ácido láurico
14:0	Ácido mirístico
16:0	Ácido palmítico
16:0-ACP	Palmitil-ACP
16:0-CoA	Palmitil-CoA
16:1	Ácido palmitoleico
16:2	Ácido palmitolinoleico
17:0	Ácido heptadecanoico
18:0	Ácido esteárico
18:0-ACP	Estearil-ACP
18:0-CoA	Estearil-CoA
18:1	Ácido oleico
18:1A	Ácido asclépico
18:1-ACP	Oleil-ACP
18:1-CoA	Oleil-CoA
18:1-PC	Oleil fosfatidilcolina
18:2	Ácido linoleico
18:2-PC	Linoleil fosfatidilcolina
18:3	Ácido linolénico
20:0	Ácido araquídico
22:0	Ácido behénico
A	Ácido aráquico
ACAT	Acetil Coa:ACP transacilasa
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ACP	Proteína transportadora de acilos
ADP	Adenosina difosfato
AG	Ácidos grasos
As	Ácido asclépico
ATP	Adenosina trifosfato
B	Ácido behénico
BCCP	Proteína transportadora de biotina carboxilada
BHT	Butilhidroxitolueno
CCF	Cromatografía en capa fina
CDP	Citidina difosfato
CMS	Androesterilidad citoplásmica
CoA	Coenzima A
CTD	Citidina trifosfato
DAG	Diacilglicéridos
DAGAT	Diacilglicerol aciltransferasa
DDF	Días después de floración
DDS	Días después de siembra
DGDG	Digalactosilglicérido
DH	Dehidratasa de hidroaxil-ACP
DMP	Dimetoxipropano
DMS	Dimetilsulfato
DPM	Desintegraciones por minuto
DTT	Ditiotreitól

E	Ácido esteárico
EMS	Etilmetano sulfonato
ENR	Reductasa de enoil-ACP
F	Fragmento
FAS I	Complejo ácido graso sintetasa I
FAS II	Complejo ácido graso sintetasa II
FAS III	Complejo ácido graso sintetasa III
FL	Fosfolípido
Fd	Ferredoxina
G-3-P	Glicerol-3-fosfato
GBq	GigaBéqueres
GLC	Cromatografía gas-líquido
GPAT	Glicerol-3-fosfato aciltransferasa
HDL	Lipoproteína de alta densidad
I	Ácido graso Insaturado
KAS	Sintetasa de β -cetoacil-ACP
KDa	Kilodalton
KR	Reductasa de 3-oxoacil-ACP
L	Ácido linoleico
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDS	Linoleato desaturasa
Ln	Ácido linolénico
LP	Lípidos polares
LPAAT	Lisofosfatidil aciltransferasa
LT	Lípidos totales
MAG	Monoacilglicérido
MCAT	Malonil-CoA:ACP transacilasa
mg	miligramo
MGDG	Monogalactosildiglicérido
ml	mililitro
mM	milimolar
mmol	milimol
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducida
O	Ácido oleico
ODS	Oleato desaturasa
OTE	Oleil-ACP tioesterasa
P	Ácido palmítico
PC	Fosfatidil colina
PDAT	Fosfolípido:diacilglicerol aciltransferasa
PE	Fosfatidil etanolamina
PF	Peso fresco
PI	Fosfatidil inositol
Pi	Fosfato inorgánico
Pl	Ácido palmitolinoleico
Po	Ácido palmitoleico
rpm	Revoluciones por minuto
S	Ácido graso saturado
SAD	Estearato desaturasa
TAG	Triacilglicérido

TE	Acil-ACP tioesterasa
UDP	Uridina difosfato
UTP	Uridina trifosfato
v	volumen

INTRODUCCIÓN

1. EL GIRASOL: ASPECTOS GENERALES.

El girasol (*Helianthus annuus* L.) por su alto contenido de aceite en la semilla (48-52%) es una típica planta oleaginosa. En los últimos 37 años el cultivo del girasol ha experimentado un importante desarrollo, triplicándose prácticamente la superficie mundial dedicada a su cultivo desde 1965 hasta 2002, pasando de 7,5 a 19,0 millones de Ha (Faostat, 2003). En España este aumento ha sido aun mayor, multiplicándose por cien el área cultivada al pasar de 8.800 a 754000 hectáreas en 2002.

Las razones del éxito de este cultivo se resumen en que el girasol es una planta rústica de fácil cultivo y buena adaptación a una gran variedad de suelos. Su aceite ha encontrado desde el primer momento una excelente acogida entre los consumidores y ha obtenido el respaldo de científicos y dietistas, especialmente como sustitutivo de las grasas de origen animal. La relativa sencillez de las técnicas industriales para su extracción así como su fácil conservación, son otras tantas ventajas para su industrialización y su comercio (Alba y Llanos, 1990).

Actualmente el girasol es una de las cinco oleaginosas para consumo humano más cultivadas en todo el mundo.

1.1. Sistemática.

El girasol pertenece al orden *Synandrales*, familia *Asteridae*, género *Helianthus* y especie *annuus*. El nombre latino del género alude a la forma y aspecto de la inflorescencia y el de la especie a la característica de anualidad del ciclo vegetativo-reproductivo de la planta. El género *Helianthus* comprende 68 especies, de las que *annuus* tiene la mayor extensión geográfica y es la más variable del género. *H. annuus* se cultiva como planta oleaginosa y ornamental, siendo por tanto la más importante dentro del género.

En cuanto al origen del girasol actual, algunos autores (Jackson y Murray, 1983) piensan que *Helianthus*, con un número de cromosomas $n=17$, procede de la hibridación de dos especies ancestrales del género *Viguiera*, con $n=8$ y $n=9$. Así se produjo un híbrido con 17 cromosomas que pasó a tener 34 al duplicarse espontáneamente evitando la inestabilidad en meiosis. De esta forma, aunque se comporte como un diploide en general, hay que tener en cuenta el hecho de un posible origen tetraploide y de que existan cromosomas homeólogos.

Las variedades de girasol cultivadas en el mundo son el resultado de un largo proceso de adaptación a distintos ambientes y de selección dirigida normalmente a la obtención de plantas con mayor contenido en aceite.

1.2. Morfología y fisiología.

La duración del ciclo del girasol depende de la variedad y el momento de la siembra, y se divide en varias etapas (Alba y Llanos, 1990).

La germinación y emergencia van desde la siembra hasta la aparición de los cotiledones. En función de la humedad y la temperatura puede durar de 10 a 30 días. La formación de las primeras hojas va desde la emergencia hasta la aparición de 4-5 pares de hojas. Durante esta fase se produce un rápido crecimiento de la raíz, lo que condiciona el posterior vigor de la planta. En esta etapa la disponibilidad de agua es muy importante, siendo perjudicial tanto la falta como el exceso de ésta. Esta fase dura entre 15 y 25 días.

A partir de este momento tiene lugar la fase de crecimiento más activo y de máxima absorción de elementos minerales del suelo que dura hasta el principio de la floración. Cuando se forma el botón floral es cuando la planta es más sensible al estrés hídrico. Esta fase tiene una duración entre 40 y 50 días. La floración comprende todo el periodo en el que las flores se van abriendo.

La inflorescencia consiste en un disco de 10 a 40 cm de diámetro (según variedades y condiciones de cultivo), que puede ser plano, cóncavo o convexo. Está formado por un tejido de naturaleza esponjosa en el que se insertan las flores que nacen sobre su cara superior (Figura 1A). El verticilo o anillo exterior del capítulo está formado por flores liguladas estériles (Figura 1B-e), con una función de exhibición y atracción visual para los insectos polinizadores. Las flores propiamente dichas son las tubulosas que están en el interior del capítulo y forman círculos espirales desde el centro (Figura 1B-a-d). Las primeras flores en abrir son las de la parte de afuera del capítulo y continúa con la apertura de los anillos exteriores hacia el centro, a razón de 1 a 5 anillos diarios. En esta etapa se determina el número de flores que van a convertirse en semillas. En este momento la planta es muy sensible a la falta de agua y a las temperaturas elevadas. Las flores liguladas (pétalos amarillos) que rodean el capítulo se secan y empiezan a caerse un día después de abrirse las últimas flores del centro del capítulo. Tarda de 10 a 12 días en completarse todo el proceso. La polinización y fecundación, llevada a cabo por insectos, es generalmente alógama (fecundación cruzada entre flores distintas).

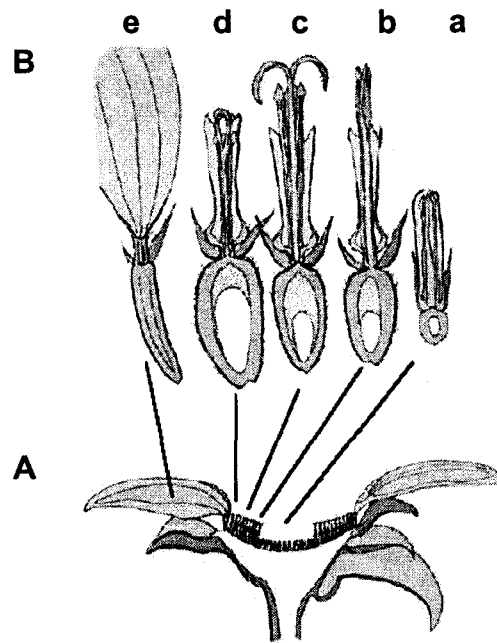


Figura 1. A. Sección longitudinal de un capítulo de girasol; B. Flores liguladas (e) y tubulosas en diferentes estadios de desarrollo: antes de abrirse (a); abriéndose (emergencia de estambres) (b); abierta (c) y después de fecundada (d) (Alba y Llanos, 1990).

Los óvulos una vez fecundados reciben sustancias de reserva hasta que se convierten en semilla madura.

La fase de maduración de la semilla va desde el final de la floración hasta el estado de madurez fisiológica. Durante este periodo se llena la semilla y se produce la biosíntesis del aceite. Esta finaliza cuando la semilla tiene aproximadamente un 40% de humedad. El periodo de maduración puede durar entre 35 y 50 días.

El fruto, es un aquenio de entre 3 y 20 mm de largo; 2 y 13 mm de ancho; y 2,5 y 5 mm de grueso (Figura 2). Las flores del centro del capítulo generalmente no se transforman en frutos. El pericarpio (envuelta exterior del fruto) es duro y fibroso y queda pegado a la semilla, menos en sus aristas. La membrana seminal crece con el endospermo y forma una película fina que cubre el embrión de la semilla y asegura la adherencia entre pericarpio y semilla. Los cotiledones representan la reserva energética de la semilla, y entre estos está la gémula.

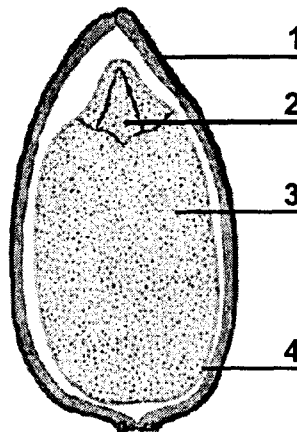


Figura 2. Sección longitudinal de un achenio: 1. Pericarpio; 2. Gémula; 3. Cotiledón; 4. Membrana seminal (Vrânceanu, 1977).

2. ÁCIDOS GRASOS.

Los lípidos son un grupo muy heterogéneo de sustancias con algunas características comunes, como su insolubilidad en agua (hidrofobicidad) y la solubilidad en disolventes orgánicos apolares. Existe una gran variabilidad en cuanto a su composición química y hay que recurrir a propiedades físicas para definirlos.

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 de 2 a 80, pero los más habituales son de 12 a 22 átomos de carbono.

Existen varias formas de nombrarlos, todos tienen un nombre sistemático y uno abreviado, y algunos de ellos 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 que indican su posición respecto al extremo carboxílico o al extremo opuesto (Δ si se cuenta

desde el grupo carboxilo y ω si se cuenta desde el grupo metilo) 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^9c según la abreviada.

No todos los ácidos grasos que se conocen en la naturaleza, que son cientos, tienen la misma importancia (Naudet, 1996). Según este criterio los ácidos grasos se clasifican en *mayoritarios* que, aun siendo muy pocos constituyen al menos el 95% del total (ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico); en ácidos grasos *minoritarios* que son los constituyentes secundarios (ácidos palmitoleico, aráquico o behénico); y los ácidos grasos *inusuales* que sólo se encuentran en algunas especies vegetales como es el caso del ricinoleico o erúxico. En la Tabla 1 se indican los principales ácidos grasos del girasol, así como su nomenclatura y punto de fusión.

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 medios, largos y muy largos según la longitud de su cadena.

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

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

Común	Sistemático	Abreviado	Tf (°C)
Palmítico	Hexadecanoico	16:0	60
Esteárico	Octadecanoico	18:0	69
Aráquico	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 $\Delta^{9c,12c}$	-5
α -linolénico	9,12,15-octadecatrienoico	18:3 $\Delta^{9c,12c,15c}$	-11

Como se muestra en la Figura 3, los dobles enlaces con isomería *cis* (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* (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 (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. El doble enlace *trans*, sin embargo, no distorsiona tanto la molécula por lo que el punto de fusión se mantiene en 44°C.

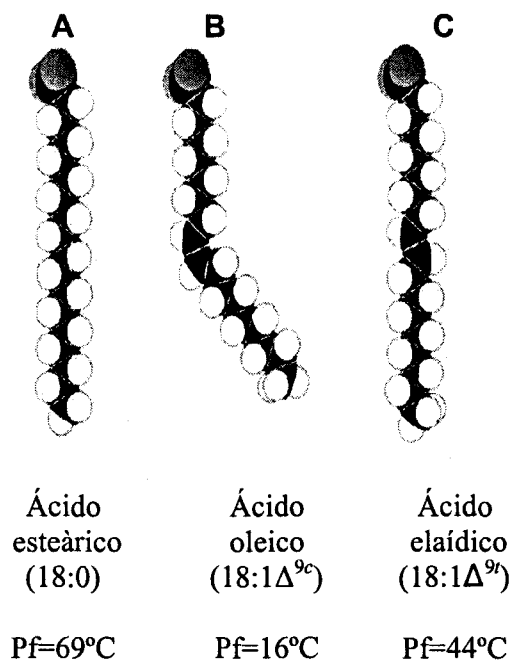


Figura 3. Estructura de los ácidos grasos: A) esteárico (18:0), B) oleico (18:1Δ^{9c}) y C) eláidico (18:1 Δ^{9t}).

3. LÍPIDOS COMPLEJOS DE PLANTAS.

Los lípidos complejos son ésteres del glicerol o glicerolípidos y se clasifican, en general, como lípidos neutros y lípidos polares. Los acilgliceroles (lípidos neutros) están formados por ácidos grasos esterificados con una molécula de glicerol, dependiendo del número de ácidos grasos que se unan son mono- (MAG), di- (DAG) o triglicéridos (TAG). Los TAG son los más abundantes y principales constituyentes de los aceites, los MAG y DAG son intermediarios metabólicos suyos (Figura 4).

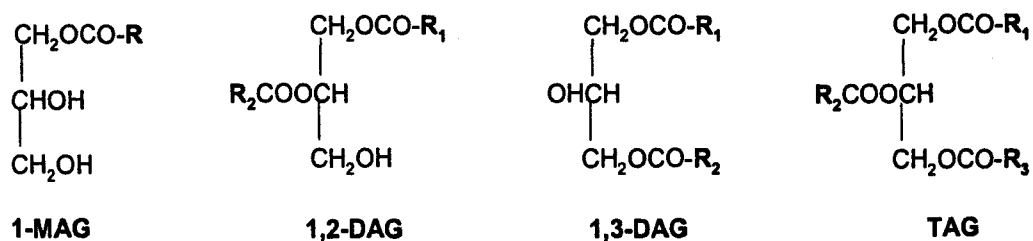


Figura 4. Acilgliceroles. MAG: monoglicérido, DAG: diglicérido, TAG: triglicérido, R: cadena de ácido graso.

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

Tabla 2. Principales fosfolípidos, naturaleza de su sustituyente, 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

Las principales funciones de los lípidos son:

-Reserva de energía: en los oleosomas se acumulan los lípidos neutros o triglicéridos para obtener energía con su degradación.

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

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

4. EL ACEITE DE GIRASOL.

El aceite de girasol es un aceite comestible excelente, con un alto contenido en ácidos grasos insaturados (85-91%), representados en la mayor parte por los ácidos oleico y linoleico. El hecho de que prácticamente no tenga ácido linolénico tiene como consecuencia su razonable estabilidad oxidativa. Existe una fuerte relación inversa entre el contenido de ácido oleico y linoleico, causada por el genotipo y la temperatura durante la formación de la semilla. 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). Con la temperatura se produce un incremento en la cantidad de oleico, reduciéndose la cantidad de linoleico. También se ha descrito la relación inversa entre la temperatura y el contenido de esteárico, que es mayor a temperaturas menores (Lajara *et al.*, 1990). Asimismo, también existen ligeras variaciones en cuanto al contenido de los ácidos linoleico, palmítico y oleico de las semillas 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, 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. En la Tabla 3 se representan los porcentajes de las distintas clases de triglicéridos mayoritarios en un aceite de girasol normal, con aproximadamente un 57% de ácido linoleico. Los TAG restantes no llegan a representar un 1% (Merrien, 1996).

En general, en el aceite de girasol el 97-98% de las especies de triglicéridos son las que están formadas por tres ácidos grasos insaturados o por dos de insaturados y un saturado. El 2% restante están formadas por dos saturados y un insaturado. El contenido de ácidos grasos libres es del orden del 0,5%, igual que en otras semillas oleaginosas (Campbell, 1983). 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 tocoferoles 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, y un 0,01% γ -tocoferol, el primero es la vitamina E, y el segundo es un buen antioxidante natural (Warner *et al.*, 1990).

Tabla 3. Especies de TAG del aceite de girasol. P, palmítico; E, esteárico; O, oleico; L, linoleico; B, behénico.

Clase de TAG	mol%
OLL	28,0
LLL	19,0
OOL	15,6
POL	13,0
PLL	9,1
EOL	6,4
OOO	5,1
EOO	1,2
PLE	1,1
PLP	0,9
BLL	0,6

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). La presencia de vitaminas liposolubles, esteroides (α -tocoferol, β -tocoferol y γ -tocoferol), lecitinas, y otros componentes, también contribuyen a su alto valor nutritivo (Gunstone *et al.*, 1994).

5. BIOSÍNTESIS DE LOS LÍPIDOS DE RESERVA EN LA SEMILLA.

5.1. Síntesis *de novo* de los ácidos grasos.

La síntesis *de novo* de los ácidos grasos constituye una ruta metabólica primaria encontrada en todas las células, siendo esencial para su crecimiento (Ohlrogge y Jaworski, 1997). En plantas tiene lugar en el plastidio de semillas y tejidos no verdes, y en el cloroplasto de los tejidos verdes. Es llevada a cabo mediante la acción combinada de dos sistemas multienzimáticos: la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y las sintetasas de ácidos grasos (FAS). Consiste en la extensión de las cadenas de acilos (ácidos grasos) por ciclos de condensación de dos unidades de carbono (Figura 5). En la naturaleza encontramos dos

tipos de FAS, el de tipo I, presente en animales y levaduras, donde las actividades enzimáticas, así como las proteínas transportadoras de acilos (ACP) están localizadas en uno o dos polipéptidos multifuncionales, y el que comparten procariontes y plantas, denominado tipo II, o disociado, donde las enzimas que lo componen son independientes. En ambas las cadenas crecientes de acilos están unidas a ACP mediante un enlace tioéster, ya que muchas enzimas de la ruta, como las FAS, usan el acil-ACP como sustrato (Harwood, 1996).

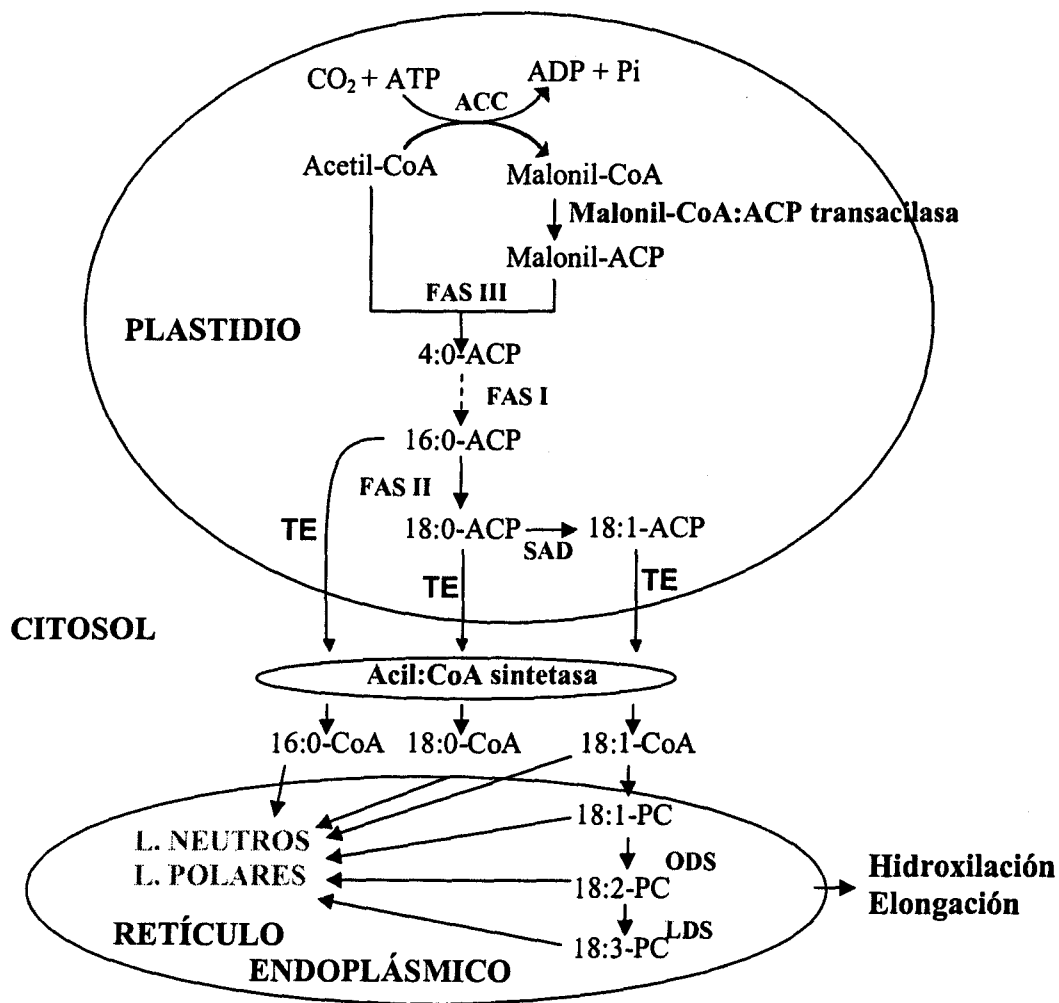


Figura 5. Esquema general de la biosíntesis de ácidos grasos en semillas oleaginosas. ACC, acetil-CoA carboxilasa; FAS I, II, III, complejo ácido graso sintetasa I, II, III; SAD, estearato desaturasa; ODS, oleato desaturasa; LDS, linoleato desaturasa.

En primer lugar, el acetil-CoA es carboxilado a malonil-CoA en el plastidio de las plantas no gramíneas por una ACC heteromérica, con cuatro subunidades (Sasaki et al. 1993, 1995): la α -carboxiltransferasa (α -CT), codificada por un gen plastidial; la

β -carboxiltransferasa (β -CT), la proteína transportadora de biotina carboxilada (BCCP) y la biotina carboxilasa (BC), codificados por genes nucleares.

El malonil-CoA producido pasa a malonil-ACP mediante la acción de la **malonil-CoA:ACP transacilasa**. La posterior extensión de las cadenas de acilos viene dada por ciclos de condensación-reducción-deshidratación-reducción de las mismas; reacciones llevadas a cabo por enzimas que residen en los complejos FAS: **sintetasa de β -cetoacil-ACP (KAS), reductasa de 3-oxoacil-ACP (KR), deshidratasa de hidroxiaxil-ACP (DH), y reductasa de enoil-ACP (ENR)**. El grupo 3-oxo de los acilos es secuencialmente reducido a grupo metileno (KR) con grupos hidroxil y enoil como intermediarios (DH y ENR). La condensación inicial tiene lugar entre malonil-ACP y acetil-CoA y está catalizada por la KAS III, enzima que da nombre al complejo FAS III. Posteriormente tienen lugar condensaciones sucesivas de 2 unidades de carbono procedentes de malonil-ACP a la cadena saturada del acil-ACP por la acción de la FAS I (KAS I) hasta llegar a los 16 átomos de carbono (palmitil-ACP), sustrato de la FAS II (KAS II) que añade dos unidades de carbono más dando una molécula de 18 átomos de carbono (estearil-ACP). Su papel es determinante en la relación palmítico/estearico.

Una vez que la cadena de acil-ACP llega a 16 ó 18 carbonos, es sustrato para distintas reacciones en el plastidio. El estearil-ACP es el sustrato de la **estearil-ACP desaturasa (SAD)** que introduce un doble enlace en la posición $\Delta 9$ formando oleil-ACP. Es una enzima soluble que se localiza en el estroma del plastidio. Normalmente tiene mayor actividad relativa que la FAS II, lo que explica la menor acumulación de estearico que de palmítico en plantas (Harwood, 1996). Aunque el estearil-ACP es su sustrato natural la SAD presenta una actividad relativa de un 1% hacia el palmitil-ACP, produciendo en este caso ácido palmitoleico como producto. Las K_m para ambos sustratos son similares (McKeon y Stumpf, 1982).

La biosíntesis intraplastidial de los ácidos grasos termina con la hidrólisis de los acil-ACP. Esta reacción es llevada a cabo por las **acil-ACP tioesterasas (TE)**, posteriormente los ácidos grasos libres se exportan fuera del plastidio y se esterifican con CoA. Estos acil-CoA son los sustratos para la síntesis de los lípidos de membrana y de reserva. Dado que el objetivo principal de esta Tesis es el estudio de estas acil-ACP tioesterasas, se les dedica más adelante un apartado completo de la Introducción.

La expresión de todos estos genes implicados en la síntesis *de novo* de ácidos grasos parece estar regulada y sincronizada. En semillas de *Brassica napus*, donde se han estudiado los niveles de expresión, se obtienen las mayores acumulaciones de mRNA de

estos genes entre los 20 y 29 días después de floración (DDF), coincidiendo con el periodo de mayor síntesis de ácidos grasos (O'Hara *et al.*, 2002).

En el citosol, los ácidos grasos pueden sufrir más desaturaciones, dando lugar a los ácidos linoleico ($18:2\Delta^{9c,12c}$) y linolénico ($18:3\Delta^{9c,12c,15c}$). La **oleil-PC desaturasa (ODS) o $\Delta 12$ desaturasa** es la enzima responsable de la conversión del ácido oleico en ácido linoleico. Es de localización microsomal (Dubacq *et al.*, 1976) y de gran importancia ya que este ácido graso es esencial para los vertebrados. A diferencia de la SAD, la ODS no desatura acil-ACP sino ácidos grasos unidos a lípidos polares, es una acil-lípido desaturasa (Murata y Wada, 1995). En semillas de cártamo se observó que el oleil-CoA se incorpora a la fosfatidilcolina (PC) y posteriormente ocurre la desaturación de manera que el linoleato aparece unido a la PC antes que a cualquier otro lípido analizado (Stymne y Appelqvist, 1978). La **18:1-CoA lisofosfatidilcolina aciltransferasa** es la enzima responsable de la transferencia del oleil-CoA a la posición *sn*-2 de la PC. El producto principal de esta reacción es el 1-acil-2-oleil-PC, que es el sustrato de la ODS, existiendo un acoplamiento funcional entre estas dos enzimas (Murphy *et al.*, 1985).

El linoleico recién formado pasa al acervo de acil-CoA mediante un intercambio de acilos, donde se usa selectivamente para formar ácido fosfatídico, precursor de triglicéridos y lípidos polares. 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). La actividad ODS no es constante durante el desarrollo de la semilla. Estudios con semillas de girasol indicaron que se producía un máximo de actividad en el periodo de los 16 a los 20 DDF, disminuyendo drásticamente a continuación (Garcés y Mancha, 1991).

El ácido linolénico ($18:3\Delta^{9c,12c,15c}$) es muy abundante en la naturaleza ya que es el principal componente de las membranas tilacoidales de los cloroplastos. Este representa el 65% de los lípidos de la hoja. La síntesis del 18:3 la lleva a cabo la **$\omega 3$ o $\Delta 15$ desaturasa** mediante la introducción de un tercer doble enlace al 18:2. Esta enzima está unida a membrana y se ha comprobado que existen dos sustratos diferentes, en función de la localización de la isoenzima: linoleil-PC (cuando se encuentra en las membranas del retículo endoplásmico, como la ODS), y linoleil-MGDG (monogalactosil diglicérido) (en las envueltas cloroplásticas). En *Arabidopsis thaliana* se han descrito tres isoenzimas, *FAD3* codifica para una ω -3 desaturasa con localización microsomal, mientras que *FAD7* y *FAD8* codifican para isoenzimas plastidiales (Berberich *et al.*, 1998).

Otra modificación que pueden sufrir los ácidos grasos es su elongación, hasta más de 20 átomos de carbono. Son los ácidos grasos de cadena larga. Normalmente se encuentran formando parte de las superficies protectoras de las plantas, aunque hay algunas semillas oleaginosas que acumulan grandes cantidades, normalmente con menos de 24 carbonos. Las enzimas que los sintetizan son las **elongasas**, que están presentes en la fracción microsomal (Barrett y Harwood, 1998).

5.2 Biosíntesis de glicerolípidos.

El 98% de los lípidos de reserva acumulados por la semilla durante su desarrollo son TAG, que serán utilizados como fuentes de energía durante la germinación. La biosíntesis de TAG tiene lugar en el retículo endoplásmico a través de la ruta del glicerol-3-fosfato o ruta de Kennedy (Figura 6). La síntesis se realiza a partir del glicerol-3-fosfato y los acil-CoA procedentes de la síntesis intraplasmática, que se van colocando de forma específica en las tres posiciones, en función de la especificidad de las enzimas que intervienen (Gurr y Harwood, 1991).

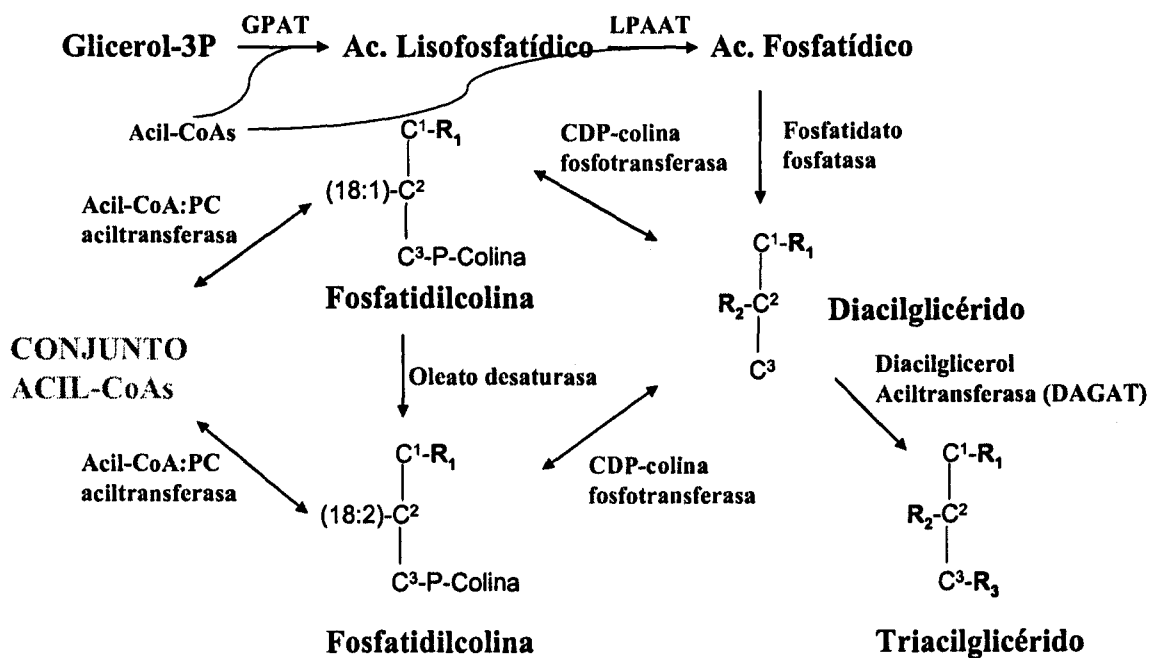


Figura 6. Formación de triglicéridos a través de la ruta del glicerol-3P o ruta de Kennedy, y su relación con la desaturación del ácido oleico en la PC.

La ruta se divide en varias etapas:

i) **Formación del ácido fosfatídico:** Las enzimas acil-CoA:*sn*-glicerol-3-P aciltransferasa (glicerol-3-P aciltransferasa; GPAT) y la acil-CoA:*sn*-1-acilglicerol-3-P aciltransferasa (lisofosfatidil aciltransferasa; LPAAT) forman el ácido fosfatídico transfiriendo un acilo a las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 del glicerol-3-fosfato respectivamente. Estas enzimas muestran cierta especificidad en el girasol, la GPAT tiene preferencia por palmítico, aunque utiliza todos los sustratos y la LPAAT muestra una fuerte preferencia por ácidos grasos insaturados y casi una total exclusión de saturados, igual que en semillas de cártamo (Stymne y Stobart, 1984; Griffiths *et al.*, 1985).

El ácido fosfatídico es el sustrato precursor tanto para la síntesis de algunos lípidos polares como para la de lípidos neutros.

ii) **Síntesis de diglicéridos:** La fosfatidato fosfatasa (3-*sn*-fosfatidato fosfohidrolasa) hidroliza el fosfato de la posición *sn*-3 del ácido fosfatídico, formando fosfato inorgánico y diglicérido (DAG). Esta enzima presenta una clara preferencia por ácido fosfatídico con dos ácidos grasos insaturados en posiciones *sn*-1 y *sn*-2 que sobre aquellas especies del tipo 1-palmitil-2-oleil. Esto no parece tener mucha importancia *in vivo*, ya que debido a las especificidades de la GPAT y de la LPAAT, el ácido fosfatídico es mayoritariamente del tipo diinsaturados o 1-saturado-2-insaturado (Ichiara, 1991).

Los DAG son los precursores de la mayoría de los lípidos de membrana extracloroplásticos así como de los TAG.

iii) **Síntesis de triglicéridos:**

La diacilglicerol aciltransferasa (DAGAT) cataliza la última acilación en la posición *sn*-3 de los DAG formando los triglicéridos (TAG). Ésta parece ser la enzima limitante en la formación de TAG en cártamo, ya que tiene menor actividad que otras aciltransferasas; por otra parte, no muestra preferencia por sustrato *in vitro* (Ichiara *et al.*, 1988). Sin embargo, en girasol, al utilizar *in vitro* una mezcla equimolar de 16:0-CoA, 18:0-CoA y 18:1-CoA, la enzima muestra mayor preferencia por 16:0-CoA en detrimento del 18:0-CoA. Tampoco parece ser el paso limitante ya que presenta una actividad similar a las otras dos aciltransferasas (Wiberg *et al.*, 1994).

La selectividad de esta enzima en semillas que acumulan ácidos grasos inusuales (como *Cuphea procumbens* y *Ricinus communis*) apoyan la idea de que juega un papel

crucial en la canalización de ácidos grasos inusuales hacia los TAG y su exclusión de lípidos de membrana (Wiberg *et al.*, 1994). Esto mismo ocurre en semillas de *Lunaria annua* que acumula ácidos grasos muy largos (Fehling y Mukherjee, 1990).

En muchas semillas oleaginosas, la mayoría de los ácidos grasos que vienen del plastidio no intervienen inmediatamente en la formación de los TAG. Los ácidos grasos que se encuentran acilados a la PC pueden sufrir desaturaciones u otras modificaciones. Estos ácidos grasos pueden pasar a formar parte de los TAG de dos formas distintas: en primer lugar pueden pasar a formar parte del conjunto de acil-CoA libres mediante la acción de la acil-CoA aciltransferasa (Stymne y Stobart, 1987), y de esta forma incorporarse a los TAG. Por otra parte puede actuar la CDP-colina fosfotransferasa (Slack *et al.*, 1983) sobre la PC, formando CDP-colina y DAG, este DAG es el que acaba dando lugar a un TAG (Figura 6).

Algunos autores sostienen la existencia de una ruta independiente de los acil-CoA en la que fosfolípidos (PC o PE) actuarían directamente como donadores de acilos. La reacción estaría catalizada por la enzima fosfolípido:diacilglicerol aciltransferasa (PDAT). Esta enzima ha sido caracterizada a partir de preparaciones microsomales de semillas oleaginosas de girasol (*Helianthus annuus*), ricino (*Ricinus communis*), y *Crespis palaestina*, siendo responsable de la acumulación de ácidos grasos hipoxilados (ácido ricinoleico) y epoxilados (ácido vernólico) en TAG de *R. Communis* y de *C. Palaestina* respectivamente (Dahlqvist *et al.*, 2000).

Los TAG no juegan un papel estructural sino que constituyen la reserva de carbono de la planta. En la semilla madura los TAG se almacenan y se encuentran densamente empaquetados en los oleosomas, con formas casi esféricas y con un diámetro medio de 1µm (Murphy, 1993; Herman, 1994), el ácido oleico de los TAG almacenados en ellos puede ser desaturado a ácido linoleico (Garcés *et al.* 1994). La acumulación de aceite se acompaña de un incremento en el número de oleosomas. Éstos están limitados por una monocapa de fosfolípidos y proteínas llamadas oleosinas.

Las propiedades físicas y químicas de los aceites están determinadas por la abundancia relativa de cada especie de TAG, de manera que cada aceite tiene su patrón característico.

iv) **Síntesis de lípidos polares:** El ácido fosfatídico es precursor de algunos lípidos de membrana, o lípidos polares (Figura 7). Por acción de una fosfatasa específica pasa a DAG, liberándose un grupo fosfato de la posición *sn*-3 del glicerol, o bien se forma una

molécula de citidina difosfato-diacilglicerol (CDP-DAG). Las moléculas de DAG son utilizadas para la síntesis de fosfatidilcolina (PC), y fosfatidiletanolamina (PE), mientras que el CDP-DAG interviene en la síntesis de fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilglicerol (PG) (Browse y Somerville, 1991; Kinney, 1993).

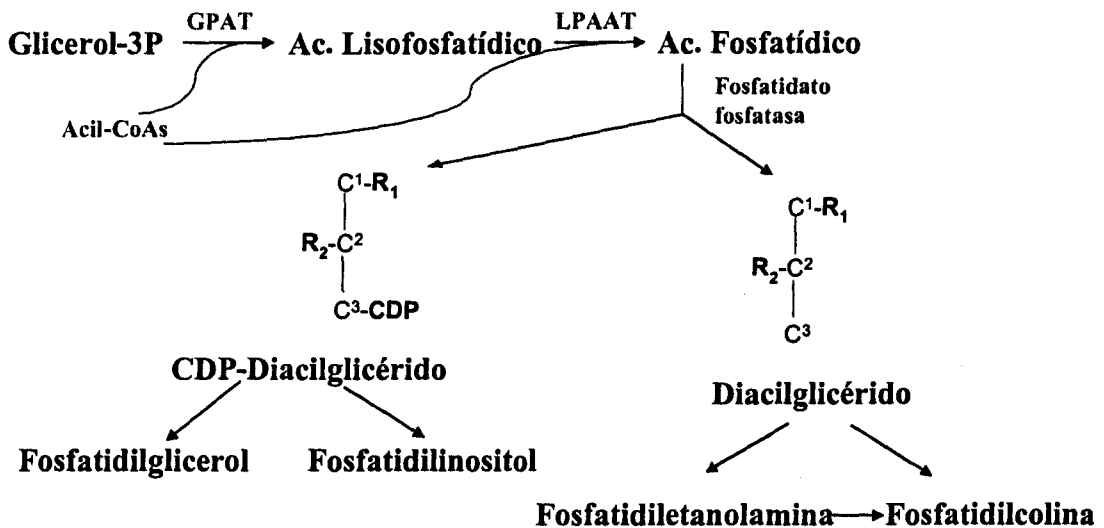


Figura 7. Ruta de biosíntesis de los principales lípidos polares.

Los lípidos polares mono- y digalactosildiglicérido, MGDG y DGDG respectivamente, son los componentes principales de las membranas fotosintéticas, aunque también pueden encontrarse en membranas de tejidos de reserva donde han quedado de forma residual. La biosíntesis de los galactolípidos tiene lugar en los cloroplastos, a partir de DAG al que se le une en posición *sn*-3 una o dos moléculas de galactosa (Figura 8; Joyard *et al.*, 1993). A partir de DAG y UDP-Galactosa (uridin difosfato-galactosa) se forma MGDG, que puede ser transformado en DGDG por la unión de otra molécula de UDP-Gal.

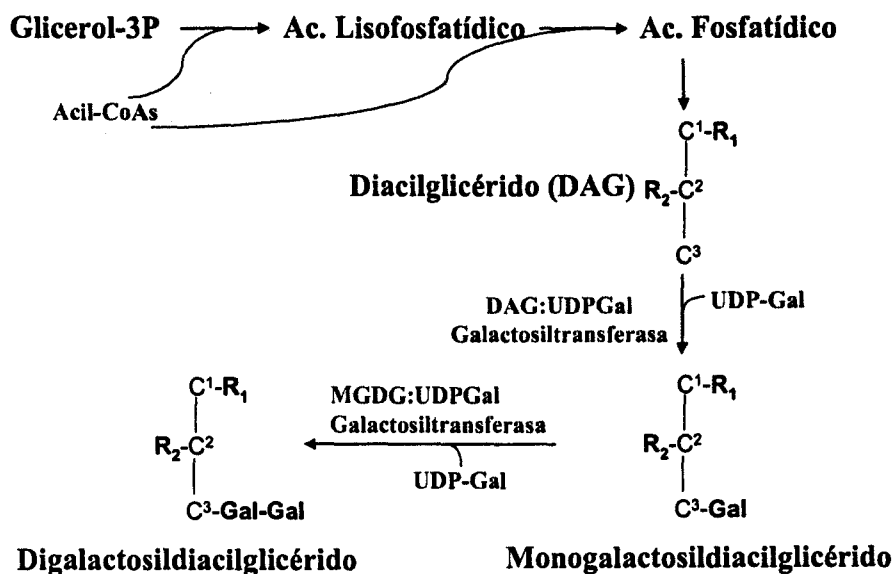


Figura 8. Ruta de biosíntesis de galactolípidos.

5.3. Síntesis activa de lípidos de reserva.

En la síntesis de TAG en semillas oleaginosas hay una etapa específica de acumulación rápida de lípidos, aproximadamente cuando ha transcurrido la cuarta parte del desarrollo de la semilla, en la que se produce un aumento rápido en la síntesis de ácidos grasos debido al incremento de todas las actividades enzimáticas implicadas en la ruta, salvo de la ODS que está retrasada unos días respecto a las demás. En girasol la etapa de acumulación de aceite ocurre entre los 10 y los 30 DDF (Monga *et al.*, 1983; Garcés *et al.*, 1989; Luthra *et al.*, 1991). La síntesis de TAG y LP ocurre en etapas diferentes, en semillas con menos de 8 DDF los TAG solo representan un 50% y los LP más de un 25% de los lípidos totales, a los 12 DDF los TAG ya constituyen el 87% y en semilla madura llegan al 94% mientras que los LP sólo al 2,7% (Garcés *et al.*, 1989).

5.4. Efecto de la temperatura sobre la composición de ácidos grasos en el aceite.

En general en todas las semillas oleaginosas, el efecto de la temperatura de cultivo es el mismo, los niveles de ácidos grasos saturados apenas se afectan, mientras que se produce un aumento del porcentaje de 18:2 a temperaturas más bajas: soja (Rennie y Tanner, 1989), colza (Trémolières *et al.*, 1982), girasol (Harris *et al.*, 1978, Fernández-

Martínez *et al.*, 1986), cártamo y ricino (Canvin, 1965). Como excepción, cabe citar que en la línea mutante de soja A6, el contenido de ácido esteárico se ve muy afectado por la temperatura de cultivo, pasando de ser un 2,5% a 15/12°C a un 22,3% a 28/22°C (Rennie y Tanner, 1989). El fenómeno contrario, aunque no tan acusado, se ha visto en líneas mutantes de girasol con contenido medio de esteárico, CAS-4 y CAS-8, produciéndose una disminución de 18-20% a 20/10°C a 11-12% a 30/20°C. Estas líneas mutantes aumentan el contenido de palmítico al aumentar la temperatura de crecimiento. Este aumento es mayor en la línea alto-palmítico CAS-5. La relación linoleico/oleico de estos mutantes de girasol no se ve afectada tanto con la temperatura como la línea control, aunque a alta temperatura siempre hay un aumento de oleico. Sólo el mutante CAS-5 tiene un nivel de desaturación similar a cualquier temperatura, siendo de 3,5 a 11 veces mayor al de otras líneas (Martínez-Force *et al.*, 1998).

6. UTILIZACIÓN DE LA RESERVA LIPÍDICA EN LA GERMINACIÓN.

Durante la germinación de las semillas oleaginosas se produce la degradación de los lípidos de reserva acumulados durante el desarrollo de la semilla y la síntesis de nuevos lípidos, fundamentalmente glicerofosfolípidos (para formar membranas celulares) y en menor medida TAG (Wilson y Kwanyuen, 1986; Harwood, 1985). Las lipasas son las encargadas de la degradación de los TAG que están almacenados en los oleosomas, el mecanismo de acción no se conoce con certeza. La especificidad de sustrato de las lipasas se ha estudiado en diferentes especies de plantas y existe cierta controversia, en cuanto a la hidrólisis de las distintas especies moleculares de los TAG durante la germinación. Estudios llevados a cabo con *Pinus edulis* parecen indicar que las lipasas son inespecíficas para las especies de TAG durante la germinación, y que éstas disminuyen a la misma velocidad (Hammer y Murphy, 1994). Sin embargo, en otras plantas se ha visto que hay especies moleculares que son preferentemente hidrolizadas debido a cierta especificidad de sustrato de las lipasas (Yoshida., 1984; Lin *et al.*, 1986; Hills y Murphy, 1988). Así en girasol se observan dos fases diferentes, una inicial con alta actividad catalítica y preferencia por moléculas de TAG con al menos dos ácidos oleicos; y una segunda con menor tasa de degradación y preferencia por moléculas con dos ácidos grasos saturados acompañadas por una de ácido oleico (Fernández-Moya *et al.*, 2000 b).

7. MODIFICACIÓN DE LOS LÍPIDOS DE PLANTAS.

7.1. Problemática actual.

Los aceites vegetales se usan tanto en alimentación como en industria (productos farmacéuticos, jabones, pinturas, cosméticos, etc.) (Röbbelen, 1990). Los aceites y grasas que utilizamos en alimentación son de dos tipos: 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, y son las que utiliza la industria para la fabricación de margarinas, pastelería y bollería. Anteriormente se utilizaban grasas de origen animal, como la manteca de cerdo y la mantequilla; pero estas, debido a su riqueza en determinados ácidos grasos saturados en la posición central del TAG, inciden negativamente sobre los niveles de colesterol en sangre (James, 1996; Willett, 1994). Los ácidos grasos 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 *sn*-(1+3) son mayoritariamente excretados (Zock *et al.*, 1995). Así los aceites vegetales, como es el caso de la manteca de cacao, que tiene un alto porcentaje de saturados, tanto ácido palmítico como ácido esteárico, localizados principalmente en las posiciones *sn*-(1+3), tienen un efecto neutro en los lípidos del suero en las personas (Bracco, 1994). En el caso de experimentos donde se han usado aceites con distintas proporciones de ácidos grasos saturados en la posición *sn*-2, se ha observado una correlación positiva entre la cantidad encontrada y el efecto perjudicial (Renaud *et al.*, 1995).

Por ello, desde mediados de los 80, se está promoviendo la sustitución de las grasas animales por los aceites vegetales. Sin embargo, dichos aceites son ricos en ácidos grasos insaturados que no tienen las propiedades físicas apropiadas para este uso: son líquidos a temperatura ambiente. Para solucionar este problema los aceites se manipulan químicamente de manera que se modifica su composición de ácidos grasos y/o la estructura de sus TAG para conseguir aceites de consistencia más sólida. Los principales procesos que se utilizan con este fin son la hidrogenación y la transesterificación.

La **hidrogenación** consiste en adicionar una corriente de hidrógeno en presencia de un catalizador de paladio o níquel, de este modo se producen cambios en las propiedades

físicas y químicas del aceite ya que los ácidos grasos insaturados se transforman en saturados, con el consecuente aumento en el punto de fusión. Como resultado colateral, aparecen isómeros de los ácidos grasos que pueden ser de conformación espacial al pasar de configuración *cis* a *trans* (Patterson, 1994) (Figura 3, pág. 6). Existen numerosos estudios que han relacionado el consumo de ácidos grasos *trans* con enfermedades cardiovasculares y con el cáncer. En estos trabajos se concluye que el consumo de ácidos grasos *trans* aumenta la concentración plasmática de colesterol de baja densidad (LDL) y disminuye la de colesterol de alta densidad (HDL), en mayor proporción que lo hace el consumo de saturados. Por otra parte, el consumo de ácidos grasos *trans* aumenta la lipoproteína A, que es otro posible factor de riesgo para estas enfermedades (Willett, 1994; Ascherio y Willet, 1997; Ip, 1997; Shapiro, 1997). Además el isómero *trans* del linoleico o sus derivados metabólicos inhiben algunas de las enzimas implicadas en la síntesis de prostaglandinas que juegan un papel crítico en la modulación de muchos procesos fisiológicos (Kinsella *et al.*, 1981).

La **transesterificación** es un proceso mediante el cual se reordenan los ácidos grasos en la molécula de TAG, bien dentro de un mismo TAG, intraesterificación, o bien entre unos y otros, interesterificación. La transesterificación se hace en presencia de un catalizador, normalmente hidróxido sódico, a 80°C y durante 30-60 minutos. Por este proceso se produce la distribución aleatoria de los ácidos grasos saturados en la molécula del TAG cambiando así las características físicas del aceite, posteriormente se procede al fraccionamiento de los mismos, al disminuir la temperatura, los TAG con más saturados forman una fase sólida que se puede separar de la líquida por filtración o centrifugación (Gunstone *et al.*, 1994). Este tipo de tratamiento produce en un aceite vegetal un incremento del contenido de ácidos grasos saturados en la posición central del TAG, con lo que se pierde una de las propiedades saludables de este tipo de aceite, convirtiéndolo en una grasa mas parecida a la animal.

Según los expertos, el aceite o grasa que debe usar la industria tiene que ser de origen vegetal, sin manipulación química (que disminuye la calidad nutricional del aceite y eleva el coste), pudiendo tener un mayor contenido en ácidos grasos saturados en las posiciones *sn*-(1+3), ya que la estructura natural de los TAG de aceites vegetales permite este incremento sin ser perjudicial para la salud.

Con el propósito de cubrir ésta demanda se han desarrollado programas de selección de nuevas variedades de oleaginosas ya que, a pesar de la gran variabilidad genética y de la mejora de la producción con la utilización de híbridos, no se cubren completamente estas necesidades actuales. Así se ha recurrido a distintas técnicas como la mutagénesis, tanto química como física, y a la ingeniería genética, consistente en la introducción en la planta de secuencias específicas de DNA.

7.2. Semillas oleaginosas con composición de ácidos grasos modificada.

En general las modificaciones que se buscan en las plantas oleaginosas son de dos tipos: en primer lugar se busca en los aceites ricos en ácidos grasos poli-insaturados un aumento en la estabilidad mediante la disminución del contenido de estos ácidos grasos y un aumento en la composición de monoinsaturados y, en segundo lugar, se busca un aumento en el contenido de ácidos grasos saturados, principalmente de esteárico, para evitar el uso de grasas animales o de aceites vegetales hidrogenados.

En la Tabla 4 se muestra la composición normal de los principales aceites vegetales tanto de semillas como de frutos como oliva o palma.

Tabla 4. Composición de ácidos grasos de algunos aceites vegetales (Martínez-Force y Garcés, 1999).

	Composición de ácidos grasos (mol%)								
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	22:1
Canola ^a	3-6		1-3	52-67	16-25	6-14		<3	<2
Lino	6-7	<1	4-6	15-40	15-18	35-56			
Maiz	9-17		1-3	20-42	39-63				
Oliva	8-20	<4	<5	55-83	4-21	<2	<1		
Cártamo	5-8		2-3	8-21	68-83			<2	
Soja	8-13		2-5	18-26	50-57	5-10			
Girasol	5-8		3-7	14-39	48-74		<1		
Palma	40-48		3-6	36-44	6-12				

^a Canola es el derivado de colza (*Brassica napus*), con bajo contenido en ácido erúico y glucosinolatos, usado en la actualidad.

En las siguientes tablas se recogen variedades de plantas oleaginosas seleccionadas para obtener bajo contenido en ácidos grasos poli-insaturados (Tabla 5), alto contenido en

ácido oleico (Tabla 6), o modificaciones en el contenido de ácidos grasos saturados (Tabla 7), ya sea por ingeniería genética (IG), cruzamiento y selección (C), o mutagénesis (M).

Tabla 5. Composición de ácidos grasos de aceites vegetales con bajo contenido en ácidos grasos poliinsaturados (Martínez-Force y Garcés, 1999).

		Composición de ácidos grasos (mol%)					
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:1
Soja	M	10,1	5,3	41,1	41,2	2,2	
	IG	10,1	3,4	20,1	65,0	1,4	
Canola	M	4,2	2,2	80,2	4,5	5,2	1,8
	IG	3,7	2,2	83,3	5,0	5,8	
Lino	IG	3,0	1,4	88,4	2,9	4,0	
	M	9,4	2,6	24,0	32,9	31,1	
	M	10,1	2,6	24,8	33,7	28,9	
	M	8,7	5,5	33,5	50,7	1,6	

Método usado para modificar la línea: IG, ingeniería genética y M, mutagénesis.

Tabla 6. Composición de ácidos grasos de algunos aceites vegetales con alto contenido de ácido oleico (Martínez-Force y Garcés, 1999).

		Composición de ácidos grasos (mol%)						
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:1	22:1
Soja	IG	7,9	3,0	78,9	3,0	5,8		
	IG	*	*	85,0	1,0	2,0		
Canola	M	2,3	1,0	89,0	1,5	3,2	1,3	0,2
	IG	3,0	1,4	88,4	2,9	4,0		
Girasol	M	4,0	3,7	91,3	0,5			

* Datos no disponibles en las referencias. Método usado para modificar la línea: IG, ingeniería genética y M, mutagénesis.

Tabla 7. Composición de ácidos grasos de aceites vegetales con el contenido de ácidos grasos saturados modificado (Martínez-Force y Garcés, 1999).

		Composición de los ácidos grasos (mol%)								
		16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	22:0	24:0
Soja	M	19,8		*	*	*				
	M	8,0		28,1	19,8	35,5	6,6	2,0		
Canola	IG	27,0	1,2	2,8	28,8	23,2	14,0	2,0	1,0	
	IG	4,0		27,5	15,0	19,5	23,0	7,0	2,5	1,0
Girasol	M	25,2	3,7	3,5	11,4	55,1				
	M	30,7	7,6	2,1	56,0	3,1				
	M	5,1		26,0	13,8	55,1				
Maiz	C	13,8		18,0	30,0	38,2				
Cártamo	M	28,4	4,0	3,8	13,5	6,3	43,0			

* Datos no disponibles en las referencias. Método usado para modificar la línea: C, cruzamiento y selección; IG, ingeniería genética y M, mutagénesis.

8. MUTANTES DE GIRASOL ALTO-SATURADO.

8.1. Obtención de las líneas mutantes de girasol con alto contenido de ácidos grasos saturados.

En 1988 se inició un programa de mutagénesis con el objetivo de inducir variabilidad en la composición de ácidos grasos del aceite de semilla del girasol. Se expusieron semillas maduras de las líneas BSD-2-691 y RDF-1-532, elegidas por sus buenas características agronómicas, a varios agentes mutagénicos, como el etilmetanosulfonato (EMS), la azida sódica y los rayos X (Osorio *et al.*, 1995).

De esta forma se obtuvieron las líneas mutantes CAS-3, CAS-4, CAS-8 y CAS-5 (Tabla 8). El hecho de que las tres líneas alto-esteárico se seleccionaran a partir de una línea (RDF-1-532) y la alto-palmitico de otra, da idea de la importancia del fondo genético de la línea parental. Además, no fue posible la selección de mutantes a partir de otras líneas con los mismos tratamientos mutagénicos.

Tabla 8. Mutantes de girasol con alto contenido en ácidos grasos saturados.

Línea	Fenotipo	Línea original	Mutágeno
CAS-3	Alto 18:0	RDF-1-532	EMS; 70 mM
CAS-4	Medio 18:0	RDF-1-532	Azida sódica; 2 mM
CAS-8	Medio 18:0	RDF-1-532	Azida sódica; 2 mM
CAS-5	Alto 16:0	BSD-2-691	Rayos X; 160Gy
CAS-12	Alto 16:0/Alto 18:1	BSD-2-423	Rayos X; 160Gy

El mutante CAS-12 (Tabla 8) se obtuvo a partir de la línea BSD-2-423 (Fernández-Martínez *et al.*, 1997) isogénica de la línea BSD-2-691, salvo para el carácter alto-oleico, derivado de la variedad Pervenets (Soldatov, 1976) e incorporado en la primera por retrocruzamiento.

8.2. Composición de ácidos grasos de los aceites de las líneas mutantes.

Álvarez-Ortega *et al.* (1997) caracterizaron los distintos lípidos de las semillas de las líneas mutantes de girasol, y encontraron que todos tenían mayor contenido de ácidos grasos saturados, especialmente los TAG.

La composición de los ácidos grasos del aceite es la que aparece en la Tabla 9, donde se puede observar como el aumento de los saturados se produce a expensas del ácido

oleico. En cuanto al contenido de los ácidos grasos minoritarios (aráquico y behénico), no existen diferencias significativas. En los mutantes alto-palmitico aparecen también ácidos grasos inusuales como el palmitoleico (16:1 Δ^9), el palmitolinoleico (16:2 $\Delta^{9,12}$) y el asclépico (18:1 Δ^{11}).

Tabla 9. Composición de ácidos grasos del aceite de semilla de las líneas control (RHA-274), control alto-oleico (HA-OL9) y mutantes (CAS-5, CAS-12, CAS-3, CAS-4 y CAS-8).

Línea	Composición de ácidos grasos (%)								
	16:0	16:1	16:2	18:0	18:1	18:1 Δ^{11}	18:2	20:0	22:0
RHA-274	6,4	- ^a	-	4,9	30,8	-	56,2	0,3	1,0
HA-OL9	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

^a <0,2%; desviación estándar <2,5% del valor medio

Los lípidos polares tienen una composición de ácidos grasos compatible con el funcionamiento de las membranas biológicas durante la formación de la semilla. En el caso del fosfatidilinositol, por ejemplo, el contenido de saturados en las líneas control es cercano al 50%, siendo el palmítico el ácido graso mayoritario. Parece que es necesaria una relación saturado:insaturado de 1:1. En los mutantes alto-esteárico el palmítico se sustituye por esteárico y el linoleico por oleico en las variedades alto-oleico.

En estos aceites los ácidos grasos saturados están excluidos de la posición *sn*-2 de los triglicéridos (Álvarez-Ortega *et al.*, 1997; Fernández-Moya *et al.*, 2000 a), como en la mayoría de los aceites vegetales y a diferencia de las grasas animales (Mattson y Lutton, 1958).

Los lípidos de los tejidos vegetativos, no presentaron variaciones significativas con los de las líneas control. El carácter mutante no se expresa en ellos, salvo en el caso del cotiledón durante la germinación (Cantisán *et al.*, 1999). Los niveles de palmítico y esteárico durante la misma de las respectivas líneas se mantienen altos en los primeros días, y después alcanzan valores similares a los del control, salvo en el caso de CAS-3, que de un 26% en la semilla pasa a ser un 17% en el cotiledón de 15 DDF, frente a un 4% en el control RHA-274. Estas diferencias no inciden en el crecimiento y desarrollo completo de la planta (Cantisán *et al.*, 1999).

8.3. Actividades enzimáticas implicadas.

Al estudiar las actividades enzimáticas de los mutantes alto-esteárico, CAS-3, CAS-4 y CAS-8 se encontró que el fenotipo resultaba de la combinación de dos efectos; por una parte una actividad SAD reducida y una acil-ACP tioesterasa con mayor actividad sobre el estearil-ACP (Figura 9C). El mismo incremento se observó en la actividad tioesterasa sobre palmitil-ACP, lo que sugiere que se trate de una tioesterasa de tipo FatB (Cantisán *et al.*, 2000).

En los alto-palmitico CAS-5 y CAS-12, el fenotipo mutante parece ser debido a la combinación de una actividad reducida de la FASII y a un incremento de la actividad tioesterasa sobre el palmitil-ACP (Figura 9B). Como consecuencia de esto, aparecen tres ácidos grasos nuevos, el palmitoleico ($16:1\Delta^9$), el ascléptico ($18:1\Delta^{11}$) y el palmitolinoleico ($16:2\Delta^{9,12}$). El ácido palmitoleico, se forma por la actividad de la estearato desaturasa sobre el ácido palmítico acumulado en el plastidio; una vez fuera de éste, puede ser desaturado a palmitolinoleico por acción de la oleato desaturasa, lo cual explica que no aparezca 16:2 en CAS-12 (Álvarez-Ortega *et al.*, 1997). El ácido ascléptico se forma como consecuencia de la actuación de la FASII sobre el ácido palmitoleico acumulado, al añadir dos carbonos a la cadena, el doble enlace queda en posición Δ^{11} ($18:1\Delta^{11}$) (Martínez-Force *et al.*, 1999).

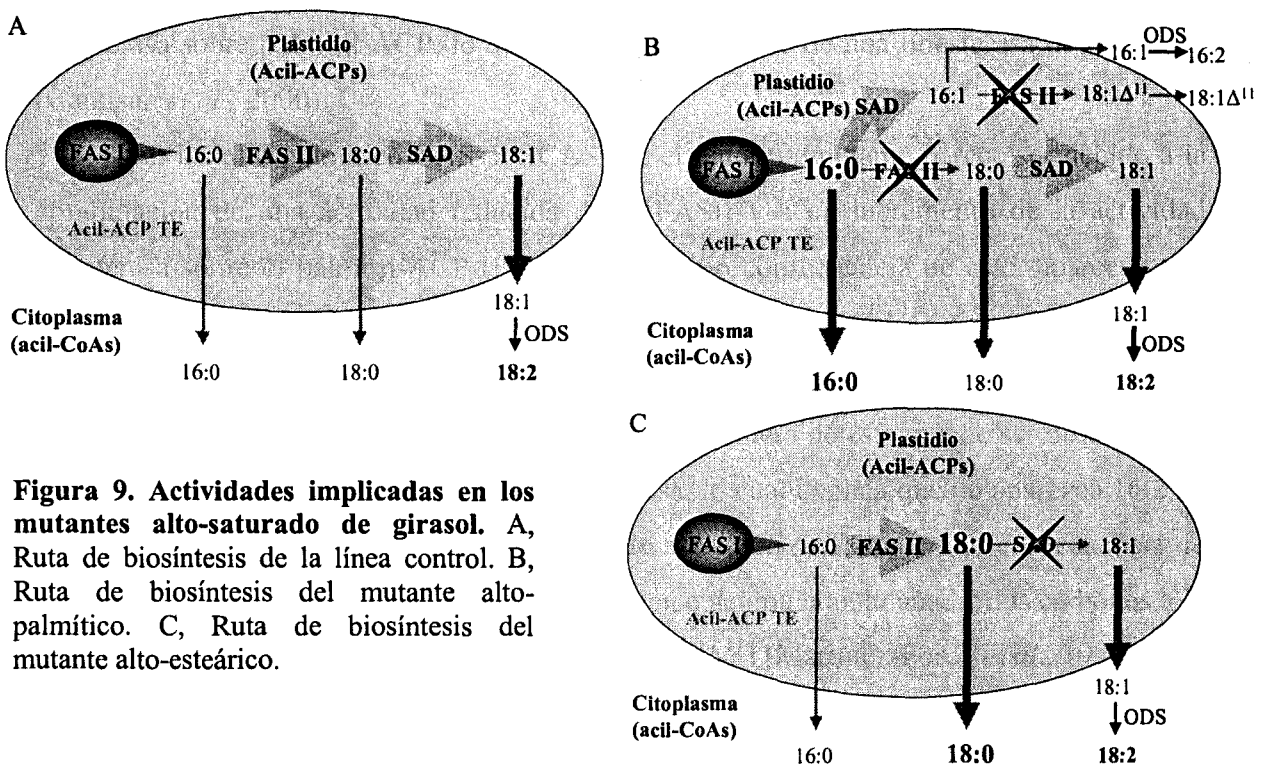


Figura 9. Actividades implicadas en los mutantes alto-saturado de girasol. A, Ruta de biosíntesis de la línea control. B, Ruta de biosíntesis del mutante alto-palmitico. C, Ruta de biosíntesis del mutante alto-esteárico.

8.4. Herencia de los caracteres alto-saturado de girasol.

En todos los casos, dada la baja probabilidad de que se produzca un evento doble de mutagénesis en los tratamientos, se ha propuesto que sólo se modificó uno de los genes presentes en la línea original, dando lugar a un alelo mutante.

El estudio del control genético de la línea mutante CAS-3 determinó que en el alto contenido de ácido esteárico están implicados dos loci independientes *E1* y *E2*. Estos genes presentan acción aditiva y su contribución al contenido en ácido esteárico no es igual (Pérez-Vich *et al.*, 1999 b). En la línea original RDF-1-532 el locus *E2* se considera inalterado y presente en forma recesiva, y la alteración genética producida por mutagénesis es una modificación en el locus *E1*.

El estudio de la herencia del carácter alto-palmitico de la línea mutante CAS-5 determinó la implicación de tres loci distintos *P1*, *P2* y *P3*. Al igual que en CAS-3 estos genes presentan acción aditiva y la contribución al contenido en ácido esteárico no es igual (Pérez-Vich *et al.*, 1999 a). Los genotipos con alto contenido en palmitico son homocigotos para el alelo recesivo *p1*, y para, al menos, uno de los otros dos alelos recesivos, *p2* o *p3*. El alelo *p1* es resultado de la mutación de *P1*, mientras que los otros dos alelos están presentes en la línea parental BSD-2-691, demostrando que el fondo genético de la línea parental original puede ser uno de los factores más importantes para obtener nuevos fenotipos para la composición de ácidos grasos en las semillas oleaginosas después de un tratamiento mutagénico.

A partir cruzamientos de la línea CAS-3 con HA-89 (línea control), y su parental, RDF-1-532 se obtuvieron las líneas CAS-19 y CAS-20 (Pérez-Vich *et al.*, 1998). Así se obtuvieron líneas portadoras de las alteraciones genéticas que determinan el fenotipo mutante de CAS-3.

9. ACIL-ACP TIOESTERASAS.

9.1. Descripción y clasificación.

Las acil-ACP tioesterasas (EC 3.1.2.14) hidrolizan el enlace tioéster del acil-ACP, permitiendo su salida del plastidio y posterior esterificación con CoA (Harwood *et al.*, 1988). Puesto que estas enzimas determinan los ácidos grasos que salen al citosol para la posterior biosíntesis de lípidos, su especificidad tiene un papel muy importante en la

composición final de éstos en los aceites. De ahí el interés despertado por la purificación y caracterización de las mismas en distintas especies vegetales, para así determinar su especificidad, y la posibilidad de ser modificadas y empleadas en la mejora de plantas oleaginosas.

Las acil-ACP tioesterasas son proteínas homodímeras, codificadas por genes nucleares. Se clasifican en dos grupos bien diferenciados en función de su especificidad por los distintos acil-ACPs y sus secuencia génicas: *fatA* y *fatB* (Figura 10). Dichos genes son parálogos, derivan de la duplicación de un gen más antiguo (antes de la separación de las distintas familias de plantas), aparentemente del tipo de las FatB. Las tioesterasas del tipo FatA, u oleoil-ACP tioesterasas presentan una gran especificidad por 18:1-ACP, y menos por 16:0-ACP y 18:0-ACP, mientras que las del tipo FatB tienen preferencia por ácidos grasos saturados. Dentro de las de tipo FatB hay dos grupos funcionales, el primero con especificidad por cadenas de 8 a 14 carbonos, se han encontrado sólo en especies que producen ácidos grasos de cadena media, y el segundo con especificidad por cadenas de 14 a 18 carbonos (Jones *et al.*, 1995).

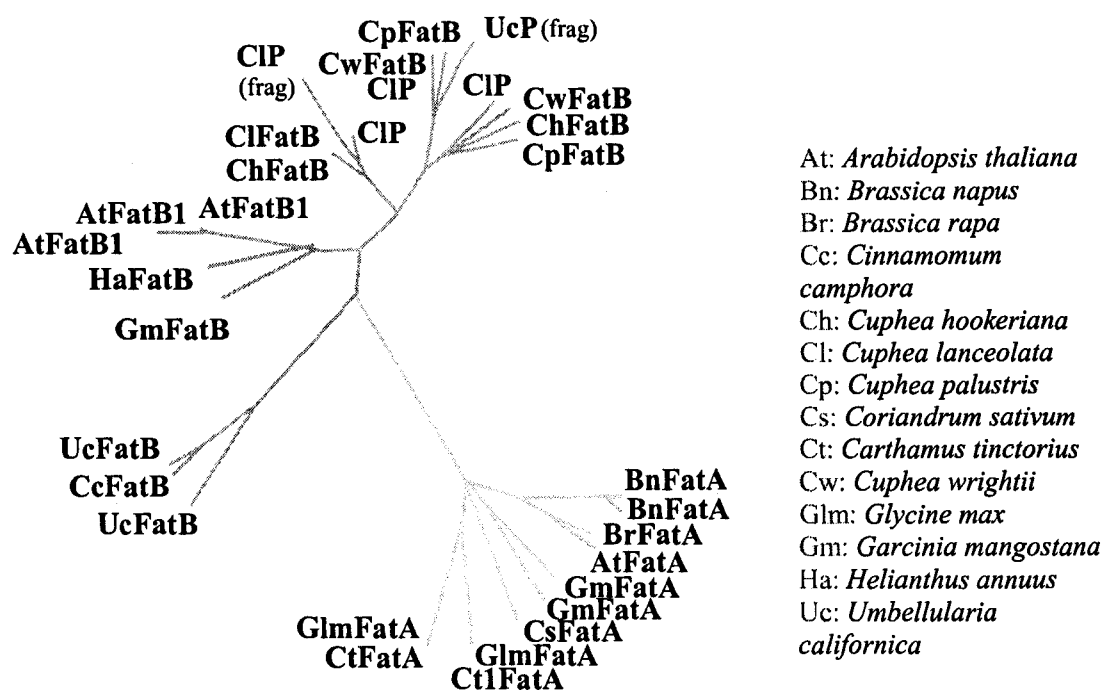


Figura 10. Árbol filogenético de las acil-ACP tioesterasas. Las ramas en amarillo se corresponden con tioesterasas del tipo FatA, las verdes con tioesterasas del tipo FatB.

9.2. Estructura primaria.

Mientras que los genes *fatA* están muy conservados en todas las plantas superiores, posiblemente porque el oleico es el precursor de la mayoría de los ácidos grasos encontrados en fosfolípidos y triglicéridos, los genes de tioesterasas tipo *fatB* muestran una gran variabilidad, dada la diferencia de afinidad por sustratos entre las distintas tioesterasas de este tipo. Al alinear las secuencias de ambos tipos de tioesterasas podemos distinguir una serie de segmentos con distinto grado de conservación. Ésta estructura se conserva dentro de los dos grupos, existiendo regiones con gran homología entre ambos y regiones más específicas (Facciotti *et al.*, 1998). En la Figura 11 se representan esquemáticamente las distintas regiones encontradas en los dos tipos de tioesterasas.

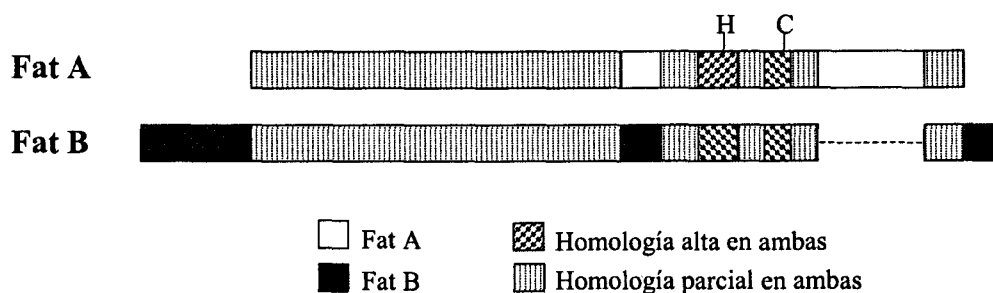


Figura 11. Esquema de las secuencias de FatAs y FatBs, sin el péptido señal (Facciotti *et al.*, 1998).

Ambas tioesterasas presentan un péptido señal, de unos 60 aminoácidos (aa), que facilita su transporte al plastidio, una vez allí es eliminado. En ambos casos el péptido señal es muy variable, dado que su secuencia no afecta a la función. A continuación del péptido señal, las TEs FatB tienen una región conservada entre ellas, altamente hidrofóbica, de unos 35 aa. Este dominio está ausente en las TEs FatA. Tras el péptido señal, ambas tioesterasas presentan una región parcialmente homóloga (hasta el 40% de identidad), de unos 140 aa, seguida de una región no homóloga de unos 20 aa. De nuevo encontramos una homología parcial para los siguientes 15 aa, seguidos de una región muy conservada (más del 70% de identidad en 17 aa). Otra región conservada, de 8 aa, esta separada de la primera por 24 aa de homología parcial. En estas dos cajas conservadas en todas las tioesterasas, encontramos una histidina, y una cisteína, con papel catalítico (Yuan *et al.*, 1996). Tras la segunda caja conservada, ambas enzimas presentan una región parcialmente

homóloga de 20 aa. Los siguientes 21 aa son parcialmente homólogos dentro de las FatA TEs, sin embargo no están en las FatB TEs. Una última región de unos 20 aa, homóloga entre las dos clases, se observa de nuevo, donde termina FatA. El extremo C-terminal de FatB se extiende al menos unos 10 aa más, siendo muy variable entre las distintas FatB TEs, ya que la especificidad entre ellas también varía.

Se han realizado varios intentos por localizar la región responsable de la especificidad de las TEs. Quimeras formadas por regiones de FatA y FatB de *Arabidopsis thaliana* revelan la mitad N-terminal de las proteínas como responsables de ésta (Salas *et al.*, 2002), mientras que en anteriores trabajos había sido localizada en el extremo C-terminal (Yuan *et al.*, 1995; Facciotti *et al.*, 1998).

Sin embargo, cambios en aa concretos son susceptibles de hacer variar la especificidad de las TEs. Así, los cambios específicos M197R y R199H, generados mediante mutagénesis dirigida, dieron lugar, a partir de una 12:0 TE de la nuez de California (*Umbellularia californica*) una 12:0/14:0 TE. Una mutación adicional T231K generaba una TE con especificidad para 14:0. Sin embargo, estos aa mutados no interaccionan con los sustratos, sino que modifican la estructura secundaria (Yuan *et al.*, 1995). De la misma manera, se generaron siete mutantes de una FatA de *Garcinia mangostana* que incrementaron hasta un 13% la actividad específica por estearil-ACP *in vitro*. Esta misma FatA de *Garcinia* modificada, en S111A y en V193A, incrementó un 55-68% la cantidad de estearato en plantas transgénicas del género *Brassica* (Facciotti *et al.*, 1999).

9.3. Expresión de *fatA* y *fatB*.

Ambos grupos de tioesterasas pueden expresarse simultáneamente. Así se ha observado expresión de ambos genes en semillas de especies como *Cuphea hookeriana* (Dorman *et al.*, 1993), *Arabidopsis thaliana* (Dorman *et al.*, 1993), o *Garcinia mangostana* (Hawkins y Kridl, 1998), siendo la actividad FatA la principal, enmascarando otras actividades TEs. Dormann *et al.* (1995) sugieren que pueden encontrarse otras actividades TEs diferentes a la FatA en plantas como la nuez de California (*Umbellularia californica*), *Cuphea*, coco (*Cocos nucifera*) o mesocarpo de palma. En algodón se ha comprobado que FatB presenta una actividad perfectamente distinguible de FatA (Huynh *et al.*, 2002).

Muchas de estas TEs han sido clonadas y expresadas tanto en plantas (Hawkins *et al.*, 1998; Voelker *et al.*, 1992) como en *Escherichia coli* (Huynh *et al.*, 2002; Heller *et al.*,

Ohlrogge *et al.*, 1995) para caracterizar su actividad tanto *in vivo* como *in vitro*. La expresión de algunas TEs, fundamentalmente del tipo FatB, en *E. coli* ha presentado problemas en algunas cepas, posiblemente por interferencia con la FAS endógena de la célula, resultando la proteína madura extremadamente tóxica (Dormann *et al.*, 1995). La expresión de dichas TEs modifica la composición de ácidos grasos, ya sea en plantas, como en procariontes, indicando hasta que punto su actividad es decisiva en el perfil final de ácidos grasos que presentará una semilla.

Así, mediante el estudio y caracterización tanto *in vivo*, como *in vitro* se ha llegado a la determinación de las actividades TE presentes en semillas oleaginosas, y a la correlación entre dichas actividades y el contenido final de ácidos grasos de las mismas. Se ha demostrado cómo la modificación de dichas TE llevan a una alteración en la composición de ácidos grasos, lo cual resulta una herramienta muy útil en la búsqueda de TEs que presenten perfiles determinados para la mejora de características de los aceites en función de la aplicación que se les desee dar.

OBJETIVOS

Los objetivos de esta tesis son, por un lado la caracterización de las tioesterasas expresadas en las semillas en desarrollo de girasol:

- Clonación, secuenciación e identificación de los distintos tipos de tioesterasas, así como su estudio en los distintos mutantes.
- Expresión, purificación y caracterización de los parámetros cinéticos de las proteínas.
- Estudio de su expresión en los distintos tejidos, así como a lo largo del desarrollo de la semilla, tanto en la línea control RHA-274, como en las líneas mutantes CAS-3 y CAS-5.

Por otro la obtención de nuevas líneas de girasol por combinación de los caracteres presentes en las líneas mutantes alto-saturadas CAS-3 y CAS-5:

- Selección de nuevas combinaciones de cara a la mejora de la calidad del aceite, disminuyendo el contenido de los ácidos palmitoleico y ascléptico, manteniendo altos niveles de ácidos grasos saturados.
- Caracterización bioquímica de su aceite, consistente en el estudio de la composición de los distintos ácidos grasos, así como su distribución en las distintas especies de triglicéridos y lípidos polares.
- Influencia de la temperatura sobre la composición del aceite.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES.

1.2. Material vegetal.

1.2.1. Girasol.

Como material de trabajo se han empleado líneas control y mutantes de Girasol (*Helianthus annuus* L.). La línea empleada como control es **RHA-274**, que presenta un perfil estándar en cuanto a la composición de ácidos grasos. Los mutantes presentan un contenido variable de ácidos grasos:

✓ **CAS-3 y CAS-4**, líneas mutantes con alto contenido en ácido esteárico, 26% y 15% respectivamente, en comparación al valor en torno a un 4% en líneas con contenido normal. Se obtuvieron mediante mutagénesis química de la línea RDF-1-532. (Osorio *et al.*, 1995).

✓ **CAS-5 y CAS-12**, líneas mutantes con elevado contenido en ácido palmítico, 25%, respecto al 6% de las líneas con contenido estándar (Osorio *et al.*, 1995) y, en el caso de CAS12 además alto contenido en ácido oleico, más del 50% (<5% de ácido linoleico), frente al 30% de las líneas estándar (Fernández-Martínez *et al.*, 1997).

✓ **CAS-18 y CAS-25**, líneas obtenidas en esta tesis por cruzamiento de CAS-5 y CAS-12 con CAS-3 respectivamente, y su posterior segregación y selección. Ambas presentan un alto contenido en palmítico (>30%) y bajos contenidos en palmitoleico y ascléptico (la suma de ambos es menor del 4%), éstos son ácidos grasos derivados de la acumulación de palmítico. CAS-25 presenta además bajo contenido en linoleico (<10%).

Tanto la mutagénesis química que dio origen a **CAS-3 y CAS-4**, como la mutagénesis física de la que se obtuvieron **CAS-5 y CAS-12**, tuvieron lugar en un programa de mutagénesis en girasol desarrollado conjuntamente por el Instituto de la Grasa (CSIC, Sevilla) y el Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC, Córdoba).

1.2.2. Condiciones de cultivo.

Las semillas fueron germinadas en placas de Petri con perlita expandida húmeda. Previamente se las sometió a un tratamiento con una solución de lejía al 50% con unas gotas de Tritón durante unos 20 minutos con agitación y aclaradas con abundante agua.

Con este tratamiento se evitan posibles infecciones por hongos. Las semillas se incubaron a 25°C en oscuridad durante dos o tres días. A continuación se pasaron a macetas pequeñas con turba húmeda donde continuó el crecimiento y tras dos semanas aproximadamente se trasplantaron a macetas de mayor tamaño con turba.

El crecimiento de las plantas tiene lugar normalmente en cámaras de cultivo, salvo los casos en los que se quiera multiplicar la línea, que es llevada al campo (ver más adelante). El crecimiento en cámaras se realiza con temperatura y fotoperiodo controlado. La iluminación se realiza con tubos fluorescentes que producen una densidad de flujo de fotones de 300 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. La temperatura de crecimiento suele ser de 25°C/15°C (día/noche), salvo en los experimentos de temperatura en los que se cultivaron plantas a 20°C/10°C y 40°C/25°C. El riego en las cámaras se realiza de forma automática tres veces al día y el abonado dos veces por semana.

Siembra de primavera en campo

Los ensayos de campo se llevaron a cabo en parcelas pertenecientes a la empresa ADVANTA IBÉRICA (Marchena, Sevilla), y en el invernadero del Instituto de la Grasa. Se trasplantaron plantas de aproximadamente 15 días, con 1 ó 2 pares de hojas verdaderas. La fecha de siembra fue en general a finales de Abril y principios de Mayo de manera que la floración se produjo en Julio. Un día antes de su floración las cabezas de las plantas se cubrieron con una bolsa de papel para evitar la contaminación con polen externo. Durante todo este tiempo se llevó un control de la temperatura. Una vez que las plantas llegaron a la madurez fisiológica se recolectaron individualmente.

1.2. *Escherichia coli*.

Durante el desarrollo de esta Tesis se han empleado dos estirpes de *E. coli*, tanto para clonar, como para expresar los distintos genes. Dichas células, así como sus genotipos, vienen descritos en la Tabla 10.

Como medio habitual de crecimiento se usó el de Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989): 1% bacto triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl, pH 7,0, para medio sólido añadir 1,5% agar. El medio completo se esterilizó por autoclavado. Los antibióticos,

esterilizados por filtración, se añadieron al medio de cultivo cuando fue necesario y fueron ampicilina (100 mg/ml), cloranfenicol (25 mg/ml), y kanamicina (50 mg/ml).

Los cultivos en medio líquido se realizaron en tubos o matraces, incubándose a 37°C con agitación continua a 220 rpm. Los cultivos sólidos se realizaron en cajas de Petri incubándose a 37°C.

Tabla 10. Estirpes de *E. coli* empleadas en este trabajo.

ESTIRPES	GENOTIPOS
DH5- α	$\Phi 80dlacZ\Delta M15$, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r_k^- , m_k^-), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , $\Delta(lacZYA-argF)U169$
BL21	F- <i>ompT hsdS_B(r_B- m_B-)</i> <i>dcm gal</i> λ (DE3)

2. MÉTODOS.

2.1. Biología molecular.

2.1.1. Extracción de DNA y mRNA.

2.1.1.1. *Extracción de DNA genómico.*

Para cada extracción se partió de 0,3 g de cotiledón congelado. Se trituraron en morteros estériles, previamente esterilizados en horno a 110°C, con nitrógeno líquido. Las extracciones se realizaron utilizando el Kit Nucleon Phitopure de Amersham. Tras la precipitación de DNA, éste se resuspendía en 50 μ l de 10 mM Tris-Cl pH 8,5.

2.1.1.2 *Extracción de mRNA.*

Las extracciones de mRNA se realizaron utilizando el Kit Micro-Fast Track de Invitrogen a partir de 0,2 g de semillas congeladas, que fueron peladas y trituradas en morteros estériles con nitrógeno líquido. El mRNA se resuspendía en 50 μ l de 10 mM Tris-Cl pH 8,5. En el caso de emplearse para la síntesis de cDNA, se resuspendía en 66 μ l de agua destilada autoclavada.

2.1.2. Síntesis de la primera cadena de cDNA.

La síntesis de cDNA a partir del mRNA se realizó con el Kit T-Primed First-Strand de Amersham-Pharmacia Biotech, siguiendo las instrucciones de la firma.

2.1.3. Estimación de la concentración de ácidos nucleicos.

La concentración y pureza de los ácidos nucleicos se determinó midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro Ultrospec 3300 pro (Pharmacia), la relación de las absorbancias a 260 y 280 nm, 260/280, nos indica la pureza de los ácidos nucleicos y el valor de la absorbancia a 260 nm nos permite estimar la concentración de ácidos nucleicos en la muestra.

Una relación 260/280 próxima a 1,8 nos indica que el DNA es puro y una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 50 µg/ml de DNA de doble cadena (Sambrook *et al.*, 1989).

En el caso del RNA la relación 260/280 nm debe aproximarse a 2, y 40 µg/ml de una solución de RNA tienen una absorbancia de 1 a 260 nm (Sambrook *et al.*, 1989).

2.1.4. Electroforesis de DNA.

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

A cada muestra se añadía 1/10 del volumen de tampón de carga consistente en azul de bromofenol al 0,25% (p/v), xileno-cianol FF al 0,25% (p/v) y glicerol al 30% (v/v) en agua. Para determinar el tamaño de los fragmentos de DNA se emplearon como marcadores la escalera de 1 Kb, y la Mass Ruler para cuantificar, ambas suministradas por Fermentas.

Tras la electroforesis los geles se sumergían en una solución de bromuro de etidio en agua, y se analizaban y fotografiaban con iluminación ultravioleta, en un transiluminador Vilber Lourmat, usando una cámara digital DC120 de Kodak a la que se había acoplado un filtro de color naranja.

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

2.1.5.1. 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 *fatB* tanto a partir de cDNA como de DNA genómico, se diseñaron un par de cebadores correspondientes a secuencias de los extremos 3' y 5' de una secuencia de *fatB* de girasol silvestre presente en la base de datos (TioB1 y TioB2). A partir de las secuencias que iban obteniéndose, se fueron diseñando oligonucleótidos internos para conseguir la secuenciación completa de los fragmentos (B1M1, B1M2, B2M1, B1T1, B1T2 y B2T1).

Para *fatA* se diseñaron cebadores degenerados a partir de los alineamientos de regiones internas conservadas de secuencias de proteínas de la base de datos: FatA1 (5'-GARATHAYARRTAYCCNGC-3'; degenerado 384 veces) y FatAB (5'-CAYTCNCKNCKRTANTC-3'; degenerado 1024 veces) (Figura 12). Así se obtuvo un fragmento interno, a partir del cual se diseñaron cebadores específicos para amplificar hacia los extremos (GSP1-6), además de un cebador a partir de la cola de poli adeninas del extremo 5' del cDNA (Fa2Z). Una vez obtenida la secuencia completa, se diseñaron cebadores correspondientes a los extremos 5' (FATA0), y 3' (FATA2), así como oligonucleótidos internos para conseguir las secuencias completas de los distintos clones de DNA genómico (GSP2I1, GSP2I3 y GSP2I4).

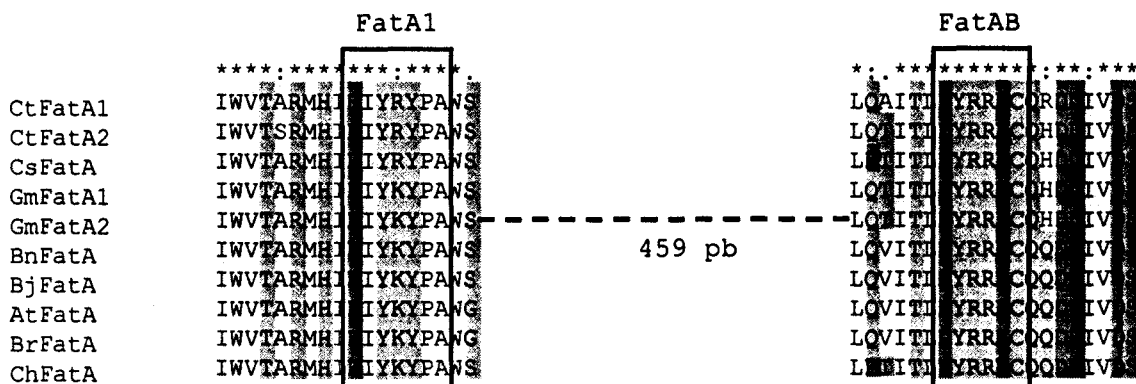


Figura 12. Alineamiento parcial de secuencias aminoacídicas de tioesterasas mediante el programa Clustal X v1.8. *Carthamus tinctorius* FatA1 y FatA2 thioesterase (CtFatA1, CtFatA2), *Carthamus sativa* (CtFatA), *Garcinia mangostana* FatA1 y FatA2 (GmFatA1, GmFatA2), *Brassica napus* (BnFatA), *Brassica juncea* (BjFatA), *Arabidopsis thaliana* (AtFatA), *Brassica rapa* (BrFatA), y *Cuphea hookeriana* (ChFatA). La línea sobre el alineamiento marca las posiciones conservadas. (*) indica residuo conservado, (: y .) indican la presencia de aminoácidos del mismo grupo o grupos similares.

Para la expresión de ambos genes se diseñaron cebadores que eliminasen los péptidos señal de las proteínas, incluyendo dianas de restricción (SacIFATA0 y KpnIFATA2 para *fatA*, y SacITioB1-2 y KpnITioB2, y NcoITioB1 y Bpu1102ITioB2 para *fatB*). Los aminoácidos candidatos para los extremos N-terminales fueron Leu88 para FatB y Met56 para FatA. Éstos fueron calculados a partir de alineamientos de proteínas sin el péptido señal y con el programa CloroP para la identificación de péptidos señal cloroplásticos.

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).

Los cebadores de secuencia específica se diseñaron a partir de las secuencias nucleotídicas.

Todos los cebadores fueron sintetizados por Amersham Bioscience (Roosendaal, The Netherlands).

Las características de los oligonucleótidos empleados como cebadores en la PCR se citan a continuación (Tabla 11).

Tabla 11. Cebadores diseñados para la amplificación por PCR.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tm (° C)
TioB1	ATGGTAGCTATGAGTGC	50,1
TioB2	TTAAACATTTCCAGC	54,8
B1M1	CCTTTATCAACCAATTGCCC	62,9
B1M2	GGGCAATTGGTTGATAAAGG	62,9
B2M1	GTGAAATCACTGACCTCGG	60,7
B2M2	CGAGGTCAGTGATTTCCACC	60,7
B1T1	GTGGTGACAAAGATGCAGG	56,7
B1T2	ATTGGCCTGTCTGTTTTGAC	55,3
B2T1	GGCGCATACCATTTTTCC	56,7
FatA1*	GARATHHTAYARRTAYCCNGC	47,2
FatAB*	CAYTCNCKNCKRTANTC	42,8
GSP1	GAGATCTACAAGTATCCCC	53,4
GSP2	TTGGTGTCAAGGTGAAGGG	63,6
GSP3	GTCGATAACTTCTTGTGGG	57,0
GSP4	TCGTCTGGGCACAAGACCG	69,9
GSP5	AAGGGCTACAAGCAAGTGGG	65,2
GSP6	GCTAATCTCAGTGTCTTGGG	58,9
Fa2Z	AACTGGAAGAATTCCGCGG	62,7
FATA0	ATGCTCTCCAGAGGTGTTCCGACC	70,8
FATA2	TTTTTTTGC GGGTTTTTTTCCCTCCATTCAGTGCGACCCC	84,1
GSP2I1	GCTGCATGTTAATGGGAAATGG	58,4
GSP2I3	CGACACTCGGTCTTGTGG	58,2
GSP2I4	CGAGGTCGGTAAACAAATTCTATGATCC	63,7
SacIFATA0	GAGCTCATGGCGGTGAAGTTGATGAGCAGC	72,1
KpnIFATA2	GGTACCTTTTTTTGC GGGTTTTTTTCCCTCCATTCAGTGCG	71,6
SacITioB1-2	GAGCTCCTGGAATGGAAGACCAAACGC	64,0
KpnITioB2	GGTACCTTAAACATTTCCAGC	59,0
NcoITioB1	CCATGGCTGGAATGGAAGACCAAACGC	68,0
BpuTioB2	GCTCAGCTTAAACATTTCCAGC	58,4

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

2.1.2.2. Condiciones de amplificación.

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

Para obtener *fatA* y *fatB* 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 55°C 1 min, extensión a 72°C 1 min, seguido de un último paso de extensión a 72°C 5 min.

Para los fragmentos de *fatB* se necesitó una segunda reacción de PCR (RePCR), puesto que los niveles de expresión son considerablemente más bajos. 10 µl del producto de PCR con la misma mezcla de reacción anterior con el mismo procedimiento, salvo que la temperatura de alineamiento era de 50°C y el número de ciclos se redujo a 23.

Para la obtención de fragmentos a partir de **DNA genómico con oligos específicos, así como 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.

2.1.5.3. *Amplificación rápida de los extremos del cDNA (RACE).*

Para el extremo 3' de *fatA* se empleó el kit de optimización con un cebador interno del fragmento obtenido con los oligos degenerados y otro diseñado a partir de la cola de poliadenina del mRNA (FA2Z). El procedimiento seguido es el descrito para este kit.

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 2.1.1.2. Tras la síntesis de la primera cadena de cDNA, según las instrucciones del kit, se realizó una reacción de PCR utilizando el primer universal (UPM) suministrado por el kit junto con el oligo FATA2, diseñado a partir del extremo 3' de *fatA*. 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 5 seg, alineamiento a 70°C 10 seg, extensión a 72°C 3 min, y por último veinte ciclos con desnaturalización a 94°C 5 seg, alineamiento a 68°C 10 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 NUP (Nested Universal Primer,

2.1.6. Análisis de niveles de expresión del mRNA mediante PCR a tiempo real.

El Northern Blot es una técnica que requiere gran cantidad de mRNA de partida y con la que se alcanzan bajos niveles de sensibilidad. Puesto que los niveles de expresión de nuestros genes son muy bajos, en concreto *fatB*, recurrimos a la técnica de la PCR a tiempo real para determinar los niveles de transcripción de *fatA* y *fatB* tanto en semilla en formación, como en tejidos vegetativos.

Mediante la combinación de técnicas de fluorescencia y la capacidad de detección, la PCR a tiempo real permite monitorizar el proceso de reacción siguiendo su desarrollo ciclo a ciclo (Heid *et al.*, 1996; Bustin, 2002).

Durante el proceso de la PCR la reacción pasa por dos fases distintas. Una primera fase donde tiene lugar un incremento exponencial de las moléculas de DNA, una mayor cantidad de DNA de partida implica mayor producto de reacción. Y una segunda fase, en la que la reacción alcanza una fase estacionaria en la que los componentes de la mezcla de reacción comienzan a ser limitantes, los inhibidores de la reacción se acumulan y la polimerasa pierde actividad.

El incremento en la emisión de fluorescencia (ΔR_n) que tiene lugar durante el transcurso de la reacción está directamente relacionado con el incremento en la amplificación de la secuencia diana. Cuando este incremento es expresado frente al número de ciclos se obtiene una curva de amplificación. El parámetro C_u (ciclo umbral) se define como el ciclo en el cual la señal de fluorescencia cruza el umbral superando la línea base. En este punto en el cual la curva de fluorescencia cruza el umbral, la reacción se encuentra en fase exponencial, existiendo relación lineal entre el logaritmo de cambio de fluorescencia y el número de ciclos. Cuanto mayor es la cantidad de DNA molde de partida menos ciclos son necesarios para que el producto de reacción se acumule y pueda ser detectado y, por tanto, más rápido se alcanza el C_u . El C_u nos permite cuantificar el DNA presente en la muestra y así, la expresión del gen.

Como método de generación de fluorescencia se empleó el SyberGreen®, cuya fluorescencia se ve incrementada cuando se une al surco menor del DNA de doble cadena generadas en la PCR. La diferenciación entre productos específicos y no específicos se logra mediante la representación de la fluorescencia como una función de la temperatura, generando una “curva de melting” para cada producto de amplificación. Así cada producto

posee un “pico de melting” característico en función de su composición nucleotídica, que permite distinguirlo de posibles artefactos generados durante la amplificación.

Para la cuantificación del producto de PCR la señal de fluorescencia, medida durante el transcurso de la reacción, es digitalizada y transformada en un valor numérico que corresponde al valor de C_u para cada uno de los productos amplificados. En nuestro caso, los valores de C_u nos permitieron la cuantificación absoluta, es decir, la determinación del número de copias de los transcritos de los genes *fatA* y *fatB*, relacionando la señal de PCR con una curva de calibración (Bustin, 2000).

2.1.6.1. Reacciones de PCR a tiempo real para *fatA* y *fatB*.

Tal y como se describe en Materiales y Métodos, Apartados 2.1.1. y 2.1.2., se aisló el mRNA de las muestras y se obtuvo el cDNA, que se cuantificó tal y como se detalla en Materiales y Métodos, Apartado 2.1.3.

El estudio de la expresión de cada uno de los genes fue realizado mediante la amplificación de una región concreta de los mismos, de unas 100 pb. En cuanto a los cebadores, se emplearon GSP5 y GSP6 para *fatA* y B1T1 y B2T1 para *fatB* (Materiales y Métodos, Apartado 2.1.2.1.). Estos cebadores fueron diseñados para la secuenciación de *fatA* y *fatB*, tienen un tamaño de entre 15 y 20 pb, su porcentaje de G/C es menor al 70%, y no forman dímeros entre ellos, eso nos hizo probarlos en las reacciones de PCR a tiempo real dando buenos resultados, si bien fue necesario aumentar el tiempo de reacción.

Como reactivo para la emisión de fluorescencia se empleó SYBR Green (Quiagen). Las reacciones de amplificación a tiempo real se realizaron en un volumen final de 25 μ l, conteniendo 12 μ l de 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master mix (con una concentración final de $MgCl_2$ de 2,5 mM), cebadores con concentración final de 0,3 μ M, agua libre de RNasa hasta llegar al volumen de 25 μ l, y 2 μ l de muestra. Para cada muestra se realizaron medidas de tres diluciones.

Las reacciones de amplificación se realizaron empleando el sistema de detección Smart Cycler II (Cepheid), con tubos de 25 μ l (Cepheid), siguiendo un protocolo en tres pasos:

- (1) Desnaturalización: 95°C, 120 seg (1 ciclo).
- (2) Amplificación: 95°C, 30 seg; 55°C, 90 seg; 72 °C 150 seg (40 ciclos).
- (3) Melting: comenzando a 60°C y subiendo 0,2°C por segundo hasta 95°C.

Tras finalizar la reacción se comprobó la ausencia de dímeros de cebadores y la especificidad de productos de PCR mediante el análisis de las “curvas de melting”, dando un pico para *fatA* entorno a 75,5°C, y para *fatB* 78,5°C (con desviaciones menores a 0,5°C).

2.1.6.2. Cuantificación de los productos de PCR.

Para la cuantificación del número de copias de los transcritos de los genes *fatA* y *fatB* se realizó una curva de calibración para cada uno de ellos. Para ello se calcularon las Cu de diluciones de 10 en 10 de construcciones de *fatA* y *fatB* en pGEM-T easy, con el mismo protocolo y los mismos oligos que se iban a usar con las muestras de cDNA. Las rectas de calibración se llevaron a cabo conociendo el número de copias de moléculas de plásmido/μl DNA y su Cu, con el mismo software del Smart Cycler II (Cepheid):

$$\begin{array}{ll} - \textit{fatA}: -0,295x + 12,940 & r^2 = 0,993 \\ - \textit{fatB}: -0,281x + 12,156 & r^2 = 1 \end{array}$$

2.1.7. Clonación de productos de PCR.

2.1.7.1. 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.

2.1.7.2. *Obtención de células competentes.*

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

Las células se cultivaron 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% agar) durante la noche. Pasado este tiempo se usó una sola colonia para preinocular en 5 ml de medio ψBroth (2% bactotripton, 0,5% extracto de levadura, 0,4% MgSO₄, 10 mM KCl) y se cultivó en agitación continua a 37°C hasta que la DO₅₅₀ fue 0,375 (3 horas aproximadamente). El preinóculo se añadió a 100 ml de ψBroth precalentado a 37°C en un matraz de 500 ml. Este se incubó a 37°C en agitación (200 rpm) hasta que la DO₅₅₀ fue de 0,48. A continuación el cultivo se incubó 10 min en hielo, se transfirió a tubos de centrifuga previamente enfriados en hielo, y se centrifugó durante 5 min a 4°C y a 3000 rpm, en una centrifuga Sorvall (modelo RC5C). Tras la centrifugación se descartó el sobrenadante y las células sedimentadas se resuspendieron en 30 ml de solución TjBI (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂·4H₂O, 30 mM acetK, 10 mM CaCl₂, 15% glicerol; ajustado a pH 5,8 con acético 0,2 M y esterilizado por filtración) previamente enfriada. Se incubó en hielo 10 minutos, de nuevo se sedimentaron las células y se resuspendió en TjBII (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM Cl₂Ca, 15% glicerol; ajustado a pH 7 con NaOH, esterilizado por filtración) preenfriado. Finalmente las células se distribuyeron en alícuotas de 100 o 200 µl, se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C.

2.1.7.3. *Transformación de E. coli.*

El método utilizado para la transformación fue el descrito por Sambrook *et al.*, (1989). El volumen de ligación se mezcló con 100 µl de células competentes previamente descongeladas en hielo. La mezcla se incubó durante 15-30 min en hielo y pasado este

tiempo se sometió a un choque térmico durante un minuto y medio a 42°C. Posteriormente se mantuvo 7 min a temperatura ambiente e inmediatamente después se añadió 1,5 ml de LB líquido. Se incubó a 37°C y en agitación durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se sembró 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). La placa de Petri fue incubada durante 10-12 horas a 37° C. En los transformantes que contienen el inserto se interrumpe la secuencia codificante del gen beta-galactosidasa y pueden ser identificados por el tipo color de las colonias en la placa suplementada con X-Gal como sustrato. Los clones que contienen el inserto producen colonias blancas y las que no lo tienen azules.

2.1.7.4. 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 plasmidico fueron llevadas a cabo mediante lisis alcalina y se purificaron mediante columnas, con el GFX™ Micro Plasmid Prep Kit de Amersham-Pharmacia Biotech. El DNA resultante se eluyó con 50-100 μ l de H₂O.

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

2.1.7.5. 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.

2.1.8. Expresión heteróloga en *E. coli*.

Una vez clonados en p-GEMT y comprobada la secuencia de los productos de PCR destinados a ser expresados (Materiales y Métodos, Apartado 2.1.7.), fueron subclonados en las dianas SacI-KpnI del vector de expresión pQE30, de Quiagen. Este plásmido contiene seis histidinas en la región anterior a la zona de inserción del fragmento a expresar, resultando proteínas de fusión con una cola de histidinas en la región N-terminal, facilitando así su purificación por cromatografía de afinidad por unión a Ni²⁺.

Las ligaciones se llevaron a cabo a 22°C durante toda la noche con la ligasa de T4 en un volumen final de 10 µl. Con las construcciones resultantes se transformó la estirpe de *E. coli* BL21 (pREP4). Estas células portan el plásmido pREP4, que contiene resistencia a kanamicina, así como un represor de la expresión del operon lac (lac I^q). Mediante secuenciación se comprobó que los insertos habían sido correctamente ligados siguiendo la pauta de lectura del gen clonado. Las construcciones resultantes se denominaron pQEFATA y pQEFATB. Como control de crecimiento y expresión se utilizó la estirpe BL21 (pREP4/pQE30).

Cultivos de 50 ml de LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml) fueron inoculados con un preinóculo crecido durante toda la noche a 37°C con las células transformadas con pQEFATA, pQEFATB y pQE30, y posteriormente puesto a crecer a 37°C. Al alcanzar una DO₆₀₀ 0,6 fueron inducidos con 1 mM isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG), y continuaron en incubación unas cuatro horas más. Las células se recogieron por centrifugación, 10 min a 16000 xg, y fueron resuspendidas en 2 ml de 50 mM Tris-HCl (pH 8,0).

Para el análisis de lípidos los cultivos fueron de 250 ml, e inducidos a DO₆₀₀ 0,8. Las células fueron posteriormente tratadas según Materiales y Métodos, Apartado 2.2.2.

En el caso de *fatB* también subclonamos el fragmento de PCR en las dianas NcoI-Bpu1102I del plásmido de expresión pET-3d (Novagen). Este plásmido carece de cola de histidinas, sin embargo fue elegido por presentar menores niveles de expresión que el anterior, lo que pudiera facilitar la expresión de *fatB*, dado un posible efecto tóxico de dicho gen en las células (Huynh *et al.*, 2002; Hawkins *et al.*, 1998; Dormann *et al.*, 1995). La construcción se denominó pETFATB. La ligación se realizó como ya se citó anteriormente, y la construcción se clonó en BL21 (DE3) pIZ227, éste plásmido contiene resistencia a cloranfenicol, además de una lisozima que inhibe la expresión del operon lac

(lac I^q), además de lisar las células al descongelarse. Se probaron distintas condiciones de crecimiento:

- cultivos de 100 ml de LB suplementados con ampicilina (100 µg/ml) y cloramfenicol (25 µg/ml), crecidos tanto a 30, como a 37°C.
- cultivos de 100 ml de medio mínimo M9 (Sambrook *et al.*, 1989): sales 5x (6,4% Na₂HPO₄ x 7H₂O, 1,5% KH₂PO₄, 0,25% NaCl, 0,5% NH₄Cl), 2 mM MgSO₄, 20% glucosa, 0,1 mM CaCl, suplementados con ampicilina (100 µg/ml) y cloramfenicol (25 µg/ml), crecidos tanto a 30, como a 37°C.
- cultivos de 100 ml de 2x YT (Sambrook *et al.*, 1989): 1,6% bactotripton, 1% extracto de levadura, 0,5% NaCl, pH 7.0, suplementados con 0,4% de glucosa, ampicilina (100 µg/ml) y cloramfenicol (25 µg/ml) crecidos a 30°C.

En estos casos las células fueron inducidas a una DO₆₀₀ 0,6, con concentraciones de IPTG de 0,5 y 1 mM, y centrifugadas y tratadas como se describe anteriormente.

2.2. Análisis lipídico.

Todas las soluciones que se han utilizado contenían un 0,01% de butilhidroxitolueno (BHT) como antioxidante. Todos los análisis lipídicos, a menos que se indique, se realizaron sobre semillas maduras de 35 DDF.

2.2.1. Metodología general para analítica de lípidos de girasol.

2.2.1.1. *Análisis de semillas. Técnica de la media semilla.*

Esta técnica permite la extracción de los lípidos de la semilla y la obtención de los ésteres metílicos de sus ácidos grasos a partir de media semilla, pudiendo ser así analizados mediante cromatografía gaseosa. De esta manera se puede conocer la composición de ácidos grasos de las semillas en un solo paso y todavía puede germinarse el resto de la semilla analizada. El método se lleva a cabo según Garcés y Mancha (1993).

Para ello se corta un trozo de endospermo del extremo opuesto al embrión de una semilla seca o germinada de 2-4 días (DDG). Al trozo de semilla se le añaden 0,9 ml de la mezcla metanol/tolueno/DMP/H₂SO₄ (33:14:2:1, v/v/v/v) y 0,9 ml de heptano. Las

muestras así procesadas se cerraron herméticamente y se incubaron a 80°C durante 1 hora. Al enfriar se forman dos fases, siendo la superior donde se encuentran los ésteres metílicos.

2.2.1.2. Extracción de lípidos totales.

La extracción de los lípidos totales de las semillas se realizó mediante el método de Hara y Radín (1978), con algunas modificaciones. Las muestras se trituraron con ayuda de una varilla de vidrio, arena de mar lavada y 25 ml de una mezcla de hexano/isopropanol (3:2, v/v) por gramo de muestra. Después se añadió la mitad del volumen de sulfato sódico, se agitó vigorosamente para facilitar la extracción de los lípidos y se centrifugó durante 5 min a 2000 rpm a temperatura ambiente. Tras la centrifugación se forman dos fases, en la inferior se encuentran los componentes hidrofílicos en agua/isopropanol y en la superior los lípidos extraídos en una mezcla de hexano/isopropanol. La fase superior se retiró con ayuda de una pipeta pasteur, el disolvente se evaporó con una corriente de nitrógeno y los lípidos se resuspendieron en un volumen conocido de disolvente.

2.2.1.3. Análisis de ácidos grasos. Metilación de lípidos.

Para determinar la composición de ácidos grasos de los lípidos mediante cromatografía gaseosa es necesario formar ésteres metílicos de los ácidos grasos. Para ello se empleó un método de metilación rápida (Garcés y Mancha, 1993), que consiste en añadir a las muestras 3 ml de una mezcla compuesta por metanol/tolueno/H₂SO₄ (88:10:2, v/v/v) y 1 ml de heptano, y calentarlas durante una hora a 80°C. Posteriormente se añade 1 ml de agua para separar la fase orgánica de la acuosa y tras centrifugar 5 min a 2000 rpm los ésteres metílicos se recuperan con la fase superior, que se evapora con nitrógeno, y se resuspenden en un volumen de disolvente adecuado.

Una vez obtenidos los ésteres metílicos se separan y cuantifican mediante cromatografía gaseosa en un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5890 (Palo Alto, CA), con una columna capilar de sílice fundida SP2380 (30 m de longitud, 0,25 mm de luz interna y 0,20 µm de grosor de fase) (Supelco, Bellefonte, Penn., USA) y un detector de ionización de llama. El gas portador es hidrógeno con una velocidad lineal de 28 cm/seg. La temperatura del detector y del inyector es de 220°C, y la temperatura del horno 170°C y el radio de división 1:50, siendo el tiempo para cada análisis individual de 8 min. La

identificación de los picos cromatográficos correspondientes a los ácidos grasos se determinaron por comparación con patrones conocidos (Sigma).

2.2.1.4. Determinación del contenido lipídico y riqueza grasa.

Al realizar la extracción de los lípidos totales podemos calcular tanto la riqueza grasa (mg lípidos/mg muestra) como la cantidad neta de un determinado ácido graso presente en la muestra gracias a la adición de un patrón interno, que servirá como referencia. Este patrón interno es el ácido heptadecanoico (17:0), por no estar presente en ninguna grasa natural.

Se prepararon disoluciones de éste ácido con concentraciones conocidas en metanol que se adicionaron a las muestras durante la extracción en un volumen adecuado para que el ácido heptadecanoico represente alrededor del 20% del total de ácidos grasos presentes en la muestra (el contenido en aceite de las semillas se puede considerar de un 30% del peso). Posteriormente se analizaron las muestras por cromatografía gaseosa (GC). El ácido heptadecanoico se separa perfectamente del resto de los ácidos grasos siendo fácilmente reconocible, con un tiempo de retención comprendido entre el ácido palmítico y el ácido esteárico. A partir del porcentaje de 17:0 en el cromatograma, y conociendo la cantidad añadida, se puede calcular la concentración del resto de los ácidos grasos, así como la cantidad de lípidos totales, expresada en ácidos grasos.

2.2.1.5. Separación de los distintos tipos de lípidos.

Los métodos empleados para la separación de los distintos tipos de lípidos presentes en el aceite fueron la separación en capa fina (CCF) y la cromatografía líquida.

2.2.1.5.1. Cromatografía en capa fina.

Dentro de esta técnica hay multitud de métodos de separación en función tanto del soporte sólido como del líquido de desarrollo, permitiendo así la separación e identificación de las diferentes clases de lípidos y ácidos grasos. La cromatografía en placa fina se basa en la distinta adsorción de los lípidos a un soporte sólido y en la distinta solubilidad de los mismos en la fase líquida móvil.

En este trabajo se han utilizado placas de gel de sílice (MERCK). Los lípidos totales disueltos en un pequeño volumen de hexano/isopropanol (7:2, v/v) se colocaron en el extremo inferior de la placa y se desarrollaron en una cubeta de vidrio utilizando hexano/éter dietílico/ácido fórmico (75:25:1, v/v/v) como líquido de desarrollo, para separar los lípidos neutros (Christie, 1982). Para visualizar la posición de los distintos lípidos se cubrió la placa parcialmente con un cristal y se expuso durante unos instantes a vapores de yodo. Con esta técnica tenemos separados desde el origen de la placa de mayor a menor polaridad, los fosfolípidos (LP), los diglicéridos (DAG), los ácidos grasos libres (AG) y los triglicéridos (TAG) (Figura 13). Las bandas de interés fueron raspadas con espátula y eluidas de la sílice con 4 ó 5 ml de cloroformo/metanol (2:1, v/v).

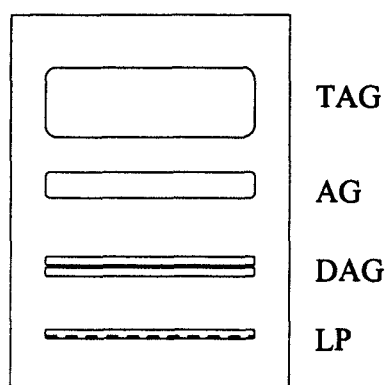


Figura 13. Distribución de los distintos lípidos en una placa desarrollada con hexano/éter dietílico/ácido fórmico (75:25:1 v/v/v).

2.2.1.5.2. Separación de fosfolípidos por cromatografía líquida.

Esta técnica fue utilizada para separar las distintas clases de lípidos, en el caso de partir de gran cantidad de aceite.

Se extrajo el aceite y se pesó aproximadamente 1 gramo. Se preparó una columna de sílice con celita (80/20), pesando 1 g de la mezcla, previamente activada durante 30 min a 110°C, y se disolvió en 3,5 ml de cloroformo/metanol (2:1, v/v). Se agitó y se vertió en una columna, dejándose decantar. El aceite se disolvió en 2,5 ml de una mezcla hexano/éter etílico (95:5, v/v) y se fue añadiendo en la columna con cuidado. A continuación se van añadiendo distintos disolventes para ir eluyendo las distintas clases de lípidos. Con unos 10 ml de hexano:éter etílico (95:5, v/v) se eluyeron los TAG, y posteriormente los LP con 6 ml de cloroformo/metanol (1:4, v/v). La muestra de LP fue concentrada y resuspendida en un volumen adecuado de disolvente para posteriormente separar los distintos tipos por CCF.

2.2.1.5.3. Separación de los fosfolípidos por CCF.

Los fosfolípidos, raspados de una placa de sílice y eluidos (Materiales Y Métodos, Apartado 2.2.1.5.1), o bien separados del resto de lípidos mediante columna (Materiales Y Métodos, Apartado 2.2.1.5.2), se concentraron en un pequeño volumen evaporando el disolvente con nitrógeno. Según la placa y el líquido de desarrollo utilizados se separan en bandas bien definidas unos fosfolípidos u otros. Como patrón se usa un extracto de lípidos totales de hoja de espinaca, donde predominan los LP, así como patrones comerciales de fosfatidilinositol, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. Los desarrollos empleados en su separación fueron los siguientes:

- Placas de sílice desarrolladas con cloroformo/metanol/ácido acético/agua (85:15:10:3,5, v/v/v/v) (Mancha, 1974). Estas permiten separar desde el origen los siguientes LP: PI, PC, DGDG, PG, PE, EG (esterol glucósido), y MGDG. Las bandas de PC y DGDG suelen aparecer juntas por lo que hay que recurrir a otro desarrollo de LP con otro patrón de separación.

- Placas de sílice impregnadas con sulfato amónico desarrolladas con acetona/benceno/agua (90:30:9, v/v/v), (Khan y Williams, 1977). Estas permiten separar desde el origen: PC, PI, PE, DGDG, PG y MGDG. De esta forma se pueden raspar por separado las bandas de PC y DGDG, aunque las de PI y PE aparecen juntas.

Las bandas fueron visualizadas con vapores de yodo para su localización (Materiales Y Métodos, Apartado 2.2.1.5.1). Si no se pretende recuperar las bandas, las placas pueden ser impregnadas con ácido sulfúrico al 50% y quemadas, de manera que aparecen bandas de distintos colores: PC, PI y PE de color amarillo-marrón, y MGDG y DGDG de color violeta. Al raspar las placas, es conveniente dejar un poco de cada banda para posteriormente quemar las placas y así comprobar que lo raspado correspondía a lo que se quería.

2.2.1.6. *Análisis de triglicéridos.*

2.2.1.6.1. Purificación de triglicéridos.

Para cada análisis se usaron muestras de aceite de tres plantas diferentes, la extracción de los lípidos totales, así como de los triglicéridos tuvo lugar como se describió

anteriormente. Las muestras de triglicéridos purificados se analizaron por cromatografía gaseosa.

2.2.1.6.2. Análisis rápido de triglicéridos.

Para ello se utiliza el método de Ruiz-López *et al.* (2003) cortando un trozo de endospermo del extremo opuesto al embrión de una semilla seca o germinada de 2-4 días (DDG). Al trozo de semilla se le añaden 0,6 ml de la mezcla de NaCl : metanol (10 g/l) y 0,9 ml de heptano. Las muestras así procesadas se cerraron herméticamente y se incubaron a 80°C durante 1 hora. Al enfriar se forman dos fases, siendo la superior donde se encuentran los triglicéridos, y se pincha en el cromatógrafo de gases. La identificación de los picos cromatográficos correspondientes a los ácidos grasos se determinaron por comparación con patrones conocidos (Materiales y Métodos, Apartado 2.2.1.3).

2.2.1.6.3. Análisis posicional de los ácidos grasos en los triglicéridos.

Los triglicéridos se digieren con lipasa pancreática, que hidroliza específicamente los acilos de las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 de la molécula del triglicérido, dejando intacta la posición *sn*-2 (Luddy *et al.*, 1964).

Para hacer la hidrólisis parcial de los TAG, a 10 mg de triglicéridos purificados se añadían 2 mg de lipasa pancreática de cerdo (Mancha y Vázquez, 1970), 1 ml de tampón tris-HCl 1 mM y pH 8,0, 0,1 ml de una solución de CaCl₂ al 22% y 0,25 ml de deoxicolato al 0,1%. Agitando 1 o 2 minutos vigorosamente, cuando aproximadamente el 60% de los triglicéridos se ha hidrolizado. La reacción se paró añadiendo 0,5 ml de ácido clorhídrico 6N. Se extraen 2 veces los lípidos con 1,5 ml de éter etílico y separan en placas de gel de sílice los productos de la reacción. El desarrollo, con hexano/éter dietílico/fórmico (75:25:1, v/v/v), da una distribución como la que se indica en la Figura 14. Las bandas de los ácidos grasos y *sn*-2-monoglicéridos son representativas de las posiciones *sn*-(1-3) y *sn*-2 de los triglicéridos, respectivamente. Estas bandas se raspan, se metilan, mediante el protocolo descrito en el apartado 3, y se determina su composición de ácidos grasos por cromatografía de gases.

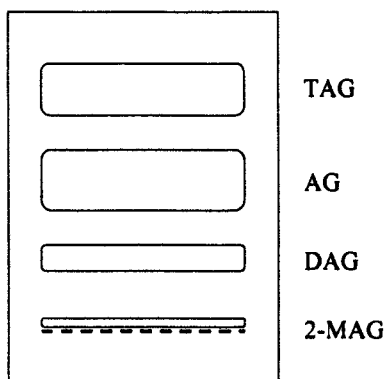


Figura 14. Distribución de los distintos productos de la lipólisis en una placa desarrollada con hexano/éter dietílico/ácido fórmico (75:25:1 v/v/v).

Como control, se compara la composición de ácidos grasos de los triglicéridos originales con la de los que quedaban después de la hidrólisis parcial.

Las especies moleculares esperadas de los triglicéridos se calcularon a partir de estos datos, según la hipótesis de distribución de los ácidos grasos de Vander Wall (1960), usando una macro de cálculo para Microsoft Excel disponible en <http://www.cica.es/aliens/glsoig/>.

2.2.1.6.4. Síntesis de triglicéridos patrón.

Los triglicéridos se sintetizaron conforme a Rios *et al.* (1992) con algunas modificaciones.

- i.) 1,2 dipalmitoil-3 oleil glicerol (PPO), 1,2 dipalmitoil-3 asclepoil glicerol (PPAs), trioleína (OOO), 1,2 dioleil-3 asclepoil glicerol (OOAs) y 1,3 dioleil-2 asclepoil glicerol (OAsO), se sintetizaron a partir de 14 mg de diglicéridos (1,2 dipalmitina, 1,2 ó 1,3 dioleina) y 10 mg de cloruro de ácidos grasos (oleil o asclepoil cloruro).
- ii.) 1,2 dioleil-3 araquidoil glicerol (OOA), 1,2 dioleoil-3 behenoil glicerol (OOB), 1,2 dilinoleoil-3 araquidoil glicerol (LLA) y 1,2 dilinoleoil-3 behenoil glicerol (LLB) se sintetizaron a partir de 14 mg de diglicéridos (1,2 dioleina o 1,2 dilinoleina) y 10 mg de cloruro de ácidos grasos (araquidoil o behenoil cloruro).
- iii.) Oleoil-linoleoil-behenoil glicerol (OLB), se sintetizó con 14 mg de 1-monooleoína, 10 mg de linoleoil cloruro y 10 mg de behenoil cloruro.

Las reacciones se llevaron a cabo a 30°C en presencia de piridina/diclorometano (7:25 v/v) durante 2 h. Todos los productos se adquirieron en Sigma.

2.2.2. Extracción y análisis de lípidos de *E. coli*.

Para la extracción de lípidos de *E. coli* se utilizó el método de Bligh y Dyer (1959), mejorado por Kates (1986), con algunas modificaciones. Para ello centrifugamos 250 ml de cultivo a 5000 rpm durante 5 min a 4°C. El precipitado así obtenido fue resuspendido en H₂O (1/10 del volumen inicial). El volumen se distribuyó en tubos de metilar (10 ml por tubo, aproximadamente) y se guardó a 4°C hasta el día siguiente. Los tubos, recogidos el día anterior, fueron centrifugados a 3000 rpm durante 5 min, y el precipitado se resuspendió en 1 ml de H₂O y 3,75 ml de una mezcla metanol-cloroformo (2:1 v/v) (unos 50-40 mg de células, peso fresco). Estos se dejaron a temperatura ambiente 1-2 horas en agitación, mezclando con vortex cada 10 min. Tras ese tiempo, se centrifugaron a 3000 rpm durante 2 min. Se tomó el sobrenadante y se le añadieron 2 ml de H₂O y 1 ml de cloroformo. De nuevo fue centrifugado a 3000 rpm durante 2 min. Se cogió la fase inferior y se concentró evaporando en atmósfera de nitrógeno.

Finalmente se resuspendió en 200 µl de cloroformo-metanol (2:1 v/v) y se cargó en una placa de sílice (20x20), con una gota de aceite diluido como patrón. Como líquido de desarrollo se usó hexano/éter dietílico/ácido acético (70:30:1 v/v/v) (Figura 15). Tras el desarrollo se rasparon las bandas de fosfolípidos y ácidos grasos libres y se metilaron (Materiales y Métodos, Apartado 2.2.1.5.3).

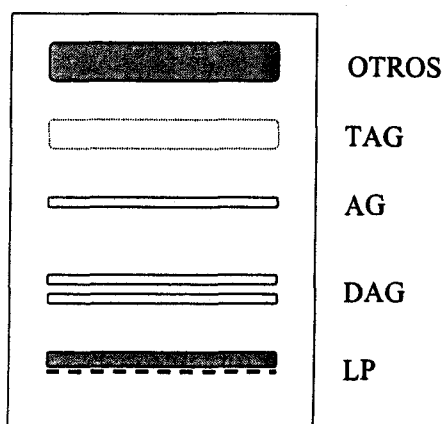


Figura 15. Distribución de los distintos lípidos de *E. coli* en una placa desarrollada con hexano/éter dietílico/ácido acético (70:30:1 v/v/v).

2.3. Bioquímica.

2.3.1. Extracción de proteínas y análisis.

2.3.1.1. *Extracción de proteínas de semillas de girasol.*

Semillas congeladas de 15 días después de floración (DDF), se pelaron y trituraron en un homogenizador con tampón de extracción (50 mM Tris-HCl (pH 8,0) and 5 mM dithiothreitol (DTT)) (Martinez-Force *et al.*, 2000) en una proporción de 10 ml de tampón/g de semilla. Todo el proceso de obtención del extracto crudo se llevó a cabo a temperatura ambiente, y una vez finalizado, el extracto se mantuvo en hielo. Para separar actividades de membrana de las de la fase soluble, se centrifugó el extracto crudo anteriormente obtenido a 13000 xg durante 10 min a 4 °C. El precipitado se lavó dos veces con tampón de extracción, y se resuspendió en 1 ml del mismo.

2.3.1.2. *Extracción de proteínas de E. coli.*

Una vez inducidos los cultivos, y tras el tiempo de inducción (Materiales y Métodos, Apartado 2.1.8), las células fueron centrifugadas a 16000 xg y resuspendidas en 2 ml de 50 mM Tris-HCl (pH 8.0). La lisis celular se realizó añadiendo 0,5% Triton X-100, 5 mM DTT, 10 U DNase I y 5 mg lisozima (tampón de lisis) e incubando 45 min a 4°C con agitación permanente. El lisado celular así obtenido fue centrifugado a 13000 xg 10 min a 4°C, y tanto el precipitado (lavado dos veces en 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 5 mM DTT y resuspendido en 1 ml del mismo tampón), como el sobrenadante, se recogieron para ser ensayada la actividad TE.

2.3.1.3. *Determinación cuantitativa de proteínas.*

La concentración de proteínas se determinó siguiendo las instrucciones de medida de un kit de Biorad, (Protein Assay) usando como patrón concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina (BSA).

2.3.1.4. *Electroforesis de proteínas. SDS-PAGE.*

Las muestras para electroforesis en geles SDS-PAGE fueron preparadas mezclándolas con tampón de solubilización (sacarosa 27%, glicina 0,3%, mercaptoetanol

10%, SDS 4% y azul de bromofenol 0,1%) a pH 6,8 en proporción 1:1 (v:v). Las electroforesis de proteínas se desarrollaron en geles de poliacrilamida NuPAGE (4-12% Bis-Tris) (Invitrogen) a un voltaje de entre 80 y 120 V en una cubeta XCell II mini-Cell (Novex).

El tampón electrolito empleado estaba compuesto por MES 0,25 M, TRIS 0,25 M, EDTA 0,004 M, SDS 0,5% pH 7,3. Una vez terminada la electroforesis, las muestras fueron fijadas con una solución ácido acético/metanol/agua (7,4:20:72 v/v/v) y a continuación teñidas en una solución de Coomassie Brilliant Blue G 250 al 0,5% en ácido acético/metanol/agua (7,4:20:72 v/v/v). El desteñido de los geles se realizó en la solución de fijado.

La determinación de los pesos moleculares de las proteínas se realizó para cada gel mediante rectas de calibración en las que se representaron las movilidades relativas de las proteínas frente a los logaritmos de sus pesos moleculares. Como patrón se utilizó un kit de proteínas de bajo peso molecular compuesto por fosforilasa b (94 kDa), albúmina de suero bovino (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina de soja (20.1 kDa) y α -lactoalbúmina (14.4 kDa) (Bio-Rad).

2.3.2. Purificación de proteínas.

Para la purificación de la proteína recombinante HIS-FATA se utilizó un cultivo de 1 l de *E. coli* transformada con el plásmido pQEFATA. El cultivo fue inducido con IPTG (1 mM) y después de 4 horas las células fueron recogidas y lisadas tal y como ha sido descrito en apartados anteriores (Materiales y Métodos, Apartado 2.3.1.2.). El extracto obtenido se centrifugó a 7000 xg y la fase soluble fue filtrada utilizando filtros de 0,45 μ m. Para la purificación de la proteína se empleó una columna HiTrap Chelating de 1 ml y el sistema Äktaprime, ambos de Amersham Bioscience.

La columna se saturó de iones Ni^{2+} usando una solución de 0,1 M NiCl_2 , de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. La elución de las proteínas marcadas con la cola de histidina de la columna se llevó a cabo con un gradiente de imidazol, desde 10 a 500 mM. Los pasos de lavado y elución se llevaron a cabo con un flujo constante de 1 ml/min. Durante los lavados y los pasos específicos de elución, la absorbancia se monitorizó a 280 nm, y se tomaron fracciones de 15 y 1 ml respectivamente. Las fracciones así obtenidas se

sometieron a ensayos de actividad TE directamente, y se comprobó la presencia de la proteína recombinante en un gel SDS-PAGE (Materiales y Métodos, Apartado 2.3.1.4.).

Una vez localizada la actividad se repitió una nueva purificación, en las mismas condiciones, y todas las fracciones correspondientes al pico de elución dicha actividad se concentraron mediante centrifugación a 8000 xg, 15 min, en frío usando una columna de filtración de 4 ml (Millipore). Las proteínas se recuperaron con 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) and 5 mM DTT y se guardaron a -20°C hasta ser usadas en los ensayos de actividad. La columna fue regenerada para usos posteriores mediante un lavado con 500 mM EDTA en PBS, que elimina los iones Ni^{2+} . El uso repetido de la columna no afectó a la reproducibilidad de los experimentos.

2.3.3. Ensayos de actividad acil-ACP Tioesterasa.

2.3.3.1. *Síntesis de sustratos radiactivos.*

2.3.3.1.1. Síntesis de la sal amónica de los ácidos grasos.

Los ensayos enzimáticos se realizaron en medio acuoso, donde los ácidos grasos son insolubles, de modo que fue necesario sintetizar la sal amónica de cada uno. Los ácidos $[1-^{14}\text{C}]$ palmitico, $[1-^{14}\text{C}]$ esteárico, $[1-^{14}\text{C}]$ oleico (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) y $[9,10-^3\text{H}]$ palmitoleico (American Radiolabeled Chemicals Inc, St. Louis, MO., USA) fueron utilizados para la síntesis de acil-ACPs. Para sintetizar la sal de estos se cogió un volumen determinado de cada ácido graso, se evaporó el disolvente (generalmente tolueno) y se resuspendió en 100 μl de etanol. Se neutralizó con 5 μl de hidróxido amónico y se dejó evaporar el etanol añadido. Para terminar se resuspendió en 100 μl de 10% Tritón X-100 libre de peróxidos, se agitó y se incubó a 50°C durante 10 min. Finalmente, se determinó en un contador de centelleo líquido (LS6500, Beckman Coulter) el nivel de radiactividad para calcular la cantidad de sal amónica de cada ácido graso y ACP a usar en la síntesis de acil-ACPs.

2.3.3.1.2. Síntesis de los acil-ACPs.

Los acil-ACP radiactivos se prepararon usando una acil-ACP sintetasa recombinante de *E. coli* suministrada por el Dr. John Shanklin (Brookhaven National

Laboratory, EEUU). Las reacciones de acilación contenían 50 µg de ACP-I recombinante de espinaca (Sigma), 660 MBeq (aprox. 0,1 µmol) de la sal amónica del ácido graso marcado [$1\text{-}^{14}\text{C}$] (^3H), en el caso de palmitoleico), 5 mM ATP, 2 mM DTT, 4 mM LiCl_2 , 10 mM MgCl_2 , 100 mM Tris pH 8,0 y 10 µg de la acyl-ACP sintetasa en un volumen final de 0,5 ml.

Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente, durante 3-4 horas y los acil-ACPs se purificaron y concentraron por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-sefarosa tal como describen Rock y Garwin (1979).

2.3.3.1.3. Cuantificación de la radiactividad y determinación de la concentración de los acil-ACPs sintetizados.

Para medir la radiactividad presente en los acil-ACPs sintetizados se utilizó un contador de centelleo líquido (LS6500, Beckman Coulter) previamente calibrado. Para ello, se utilizaron viales de centelleo de polietileno de 5 ml de capacidad a los que se les añadió 3 ml de líquido de centelleo, EcoscintTM H (National Diagnostics, Hesse, England). Después de agitar fuertemente se cuantificó la radiactividad durante 240 segundos.

Para determinar la concentración de los acil-ACP radiactivos de una muestra, las desintegraciones por minuto (DPM) cuantificadas en el contador de centelleo se dividieron por 60 para conocer las desintegraciones por segundo (DPS) o becquerel (Bq), unidad recomendada por el sistema internacional (Salisbury, 1991). Esta cantidad se dividió a continuación por la actividad específica (A.E.) del producto (2,0 GBq/mmol) y por el volumen (µl) del ensayo. La concentración obtenida (mM) se multiplicó por 1000 para trabajar con valores mayores (µM). La fórmula sería:

$$\frac{DPM}{60} \times A.E. \times \mu l \times 1000 = \text{Concentración } (\mu M)$$

2.3.3.2 Determinación de la actividad tioesterasa.

La actividad acil-ACP tioesterasa se ensayó en un volumen final de reacción de 1 ml, conteniendo 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM DTT, 0,8 nmol de sustrato acil-ACP marcado (170 Beq aprox.), y 0,2-12 µg de la preparación de proteína (ver Materiales y

Métodos, Apartado 2.3.1.1). Las reacciones tuvieron lugar a temperatura ambiente durante 5 min y finalizaron por adición de 0,250 ml de 1 M ácido acético en 2-propanol. Los ácidos grasos no esterificados se extrajeron dos veces con 0,3 ml de hexano.

La actividad acil-ACP tioesterasa en los ensayos se determinó midiendo la radiactividad en la fase acuosa, donde se encontraban los ácidos grasos que habían sido hidrolizados por la acción de la acil-ACP tioesterasa. La fase acuosa se transfirió a viales de centelleo, a los que se añadió 3 ml de líquido de centelleo y se cuantificó la radiactividad en el contador de centelleo líquido. Una vez determinada la radiactividad (DPM) se calculó la concentración de producto como se ha explicado anteriormente (MM 2.3.3.1.3). La actividad acil-ACP tioesterasa fue expresada como pmoles de acil-ACP hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína.

Para calcular los parámetros cinéticos aparentes, K_m y V_{max} , los datos obtenidos se ajustaban a la ecuación de Michaelis-Menten por medio del test de Student, haciendo el análisis de regresión de los mínimos cuadrados con el programa Microcal Origin 7.0 con un intervalo de confianza del 95% ($P < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

BLOQUE I. ESTUDIO DE LAS ACIL-ACP TIPOESTERASAS DE GIRASOL.

1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS mRNA DE LOS GENES *HafatA1* y *HafatB* EN SEMILLAS EN DESARROLLO DE *Helianthus annuus*.

1.1. *HafatA1*: Acil-ACP tioesterasa de tipo FatA de *Helianthus annuus*.

1.1.1. Amplificación de un fragmento de *HafatA1* a partir de semillas de 15 DDF de la línea control RHA-274.

A partir de las regiones conservadas de secuencias conocidas de proteínas de acil-ACP tioesterasas de tipo FatA de plantas, se diseñó una pareja de oligonucleótidos degenerados denominados FatA1 y FatAB (Figura 12; Materiales y Métodos, Apartado 2.1.5.1). Mediante PCR (Materiales y Métodos, Apartado 2.1.5.2) y con estos oligos como cebadores, se obtuvo un fragmento de 459 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 2.1.7) 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 tioesterasas del tipo FatA (Figura 16).

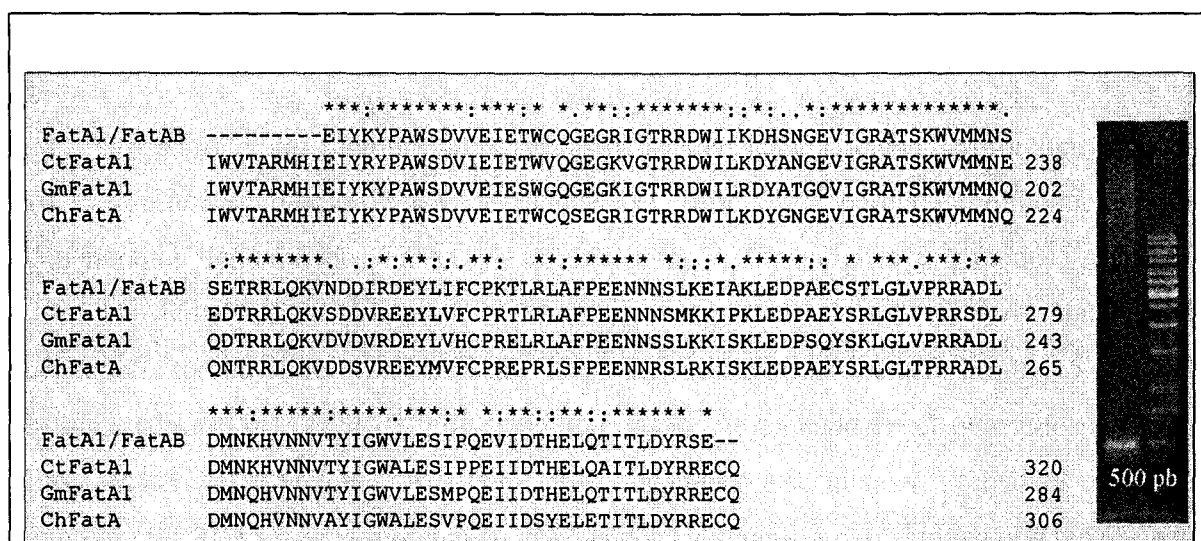


Figura 16: Alineamiento del fragmento de PCR FatA1/FatAB. Alineamiento, mediante el uso del programa ClustalX v1.8 de la proteína codificada por el fragmento de PCR FatA1/FatAB y las secuencias proteicas de las tioesterasas de tipo FatA de *Carthamus tinctorius* (CtFatA1), *Garcinia mangostana* (GmFatA1) y *Cuphea hookeriana* (ChFatA). 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 500 pb correspondiente al fragmento de PCR obtenido con los cebadores FatA1 y FatAB, el marcador es el de 1Kb (Materiales y Métodos, Apartado 2.1.4).

1.1.2. Obtención de la secuencia completa del cDNA correspondiente a *HafatA1*.

En la Figura 17 se esquematiza la estrategia de clonación y secuenciación seguida para *HafatA*.

Los extremos del gen se obtuvieron gracias al diseño de cebadores internos, utilizando la secuencia del fragmento de 459 pb obtenido, y cebadores desde los extremos 5' y 3'.

Para la obtención del extremo 3' se utilizó el oligo GSP2 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 750 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. Una vez conocido el extremo 3' de *HafatA*, se diseñó un oligo correspondiente al extremo carbolíxico de la proteína, FATA2.

La obtención del extremo 5' se realizó mediante RACE, tal y como se detalla en Materiales y Métodos, Apartado 2.1.5.3, utilizando el cebador UPM, desde el extremo 5', y FATA2 en una primera reacción de PCR. Posteriormente se realizó otra PCR con una temperatura más baja de alineamiento y oligos internos, NUP y GSP4. Como producto de esta última PCR se obtuvo un fragmento de unas 800 pb, que fue clonado y secuenciado. Una vez identificado el extremo amino de la proteína en la secuencia, se diseñó el oligo FATA0, con el fin de poder clonar el gen completo. Para ello amplificamos por PCR el cDNA con el par de oligos FATA0 y FATA2, con una temperatura de alineamiento de 65°C y con los tampones del kit de optimización. En esta primera PCR no se observó banda alguna. A los distintos productos de PCR se les realizó una segunda PCR, con los mismos oligos, la misma temperatura de alineamiento, y las condiciones mencionadas en los Materiales y Métodos, Apartado 2.1.5.2, observándose una banda de 1100 pb en los productos de PCR correspondientes al tampón con una concentración de MgCl₂ de 3,5 mM.

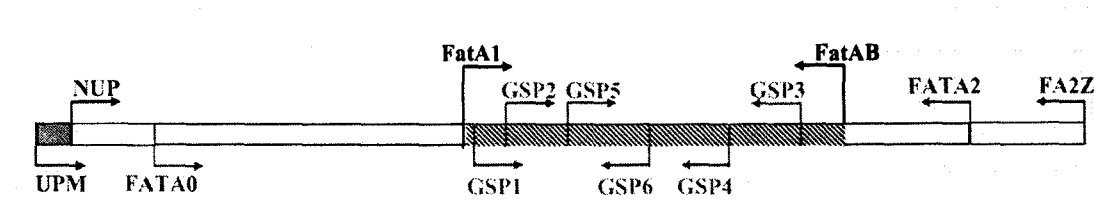


Figura 17. Esquema de la obtención de *HafatA* por PCR. A partir de los oligos degenerados FatA1 y FatAB (marcados en azul), se obtuvo el fragmento interno que se muestra sombreado en la Figura. A partir de la secuencia de éste se diseñaron una serie de oligonucleótidos internos, GSP1-6 (rojo). Con GSP2/FA2Z se obtuvo el extremo 3' restante, y con UPM/FATA2 más NUP/GSP4 se obtuvo el 5' restante. El resto de oligos internos (en rojo) sirvió para secuenciar el fragmento completo. FATA0 y FATA2 (en verde) amplifican el cDNA completo de la pauta abierta de lectura.

El clon de cDNA obtenido se denominó *HafatA1*, y su identidad como tioesterasa del tipo FatA fue confirmada por homología mediante el uso del programa BLAST. La expresión de *HafatA1* generaría una preproteína de 365 aminoácidos, con un peso molecular de 41,2 kDa y un punto isoeléctrico de 8,1. Al igual que el resto de las secuencias de tioesterasas de tipo FatA descritas hasta la fecha, *HaFatA1* presenta un péptido señal para su direccionamiento al plastidio/cloroplasto. Mediante alineamiento con secuencias conocidas de tioesterasas y el uso del programa de predicción ChloroP v1.1 (Emanuelsson et al., 1999), el comienzo de la proteína madura se localizó en la metionina M56 (Figura 18). La pérdida del péptido señal genera una proteína de 310 aminoácidos con un peso molecular alrededor de 35,2 kDa y un punto isoeléctrico de 6,6. Como se muestra en la Figura 18 los dos aminoácidos catalíticos, histidina H274 y cisteína C309, identificados por Yuan *et al.* (1996) están perfectamente conservados.

ACGGGGTATCGACACTCCACACTATACATAACCCACTCCGTACCCTCACAAAACCTTC	60
ACACCTAACCTTTTCCGGCGACTCCACGGCGCGATACACCGATCACCATGCTCTCCAGA	120
M L S R	4
GGTGTTCGACCGCCACCGCCACCGCCTACAATGACGTAATCAAAGAAACCGCTCGTTCC	180
G V P T A T A T A Y N D V I K E T A R S	24
GTCACCAATTCGGATCTATCGATTCCGTTTCAATTCGACGAAGAAACAACGGTTTTGTG	240
V T N S R S I D S V S I R R R N N G F V	44
TCCAATTCGTTGTGCCGGAGAGTTGCCCGGTAAGGGCGGTGAAGGTTGATGAGCAGCGG	300
S N S L C R R V A P V M A V K V D E Q R	64
ACCGGAGTCGGGTTCGATGTTACGGAGAAACGGCTCGCGGACCGGTTGCGGATGGGGAGC	360
T G V A V D V T E K R L A D R L R M G S	84
TTGACGGAAGACGGATTGTCGTATAAGGAGAGGTTATTATTAGGTGTTATGAGGTCCGG	420
L T E D G L S Y K E R F I I R C Y E V G	104
ATTAATAAGACGGCGACTGTTGAGACGATGCGAATCTGTTGCAGGAGGTAGGAGGAAAT	480
I N K T A T V E T I A N L L Q E V G G N	124
CATGCTCAGAATGTCGGATTTTCGACGGATGGATTGCAACTACAACCACCATGAGAAAG	540
H A Q N V G F S T D G F A T T T T M R K	144
TTGAATCTCATATGGGTCACTTCACGAATGCACATTGAAATTTACAGATATCCTGCTTGG	600
L N L I W V T S R M H I E I Y R Y P A W	164
AGCGATGTGGTTGAAATGAGACTTGGTGCAAGGTGAAGGGAGAATCGGGACTAGACGT	660
S D V V E I E T W C Q G E G R I G T R R	184
GATTGGATTATCAAAGATCATGCCAATGGTGAGGTTCATCGGAAGGGCTACAAGCAAGTGG	720
D W I I K D H A N G E V I G R A T S K W	204
GTGATGATGAACTCAGAAACTAGAAGACTCCAGAAAGTCAATGACGATATAAGAGATGAA	780
V M M N S E T R R L Q K V N D D I R D E	224
TATTTAATATTTGTCCCAAGACACTGAGATTAGCATTCCCTGAAGAGAACAACAATAGC	840
Y L I F C P K T L R L A F P E E N N N S	244
CTGAAAAAATAGCAAACTGGAAGATCCTGCTGAGTGTTTCGACACTCGGTCTGTGCC	900
L K K I A K L E D P A E C S T L G L V P	264
AGACGAGCGGATCTTGATATGAACAAGCA TGTTAACAATGTACCTACATTGGATGGGTT	960
R R A D L D M N K H V N N V T Y I G W V	284
CTCGAGAGCATCCACAGAAGTTATCGACACTCATGAACTACAAACAATCACCTTAGAT	1020
L E S I P Q E V I D T H E L Q T I T L D	304
TACAGCGTGAATGCCAGCATGATGATGTAGTCGATTCCCTCAGAGTTCGAAATCACCC	1080
Y R R E C Q H D D V V D S L T S S E S P	324
GCTGTTAACGGTGTGTAGTGGTGAATAATTAAGCAAGTTTTTGCATCTACTAAGATCA	1140
A V N G C A S G E N L S K F L H L L R S	344
TCTGGTGAAGGTCCTGAACTAAACAGGGTTCGCACTGAATGGAGGAAAAAACCGCAAAA	1200
S G E G L E L N R G R T E W R K K P A K	364
AAATAATAAGCATATTAGCATTGTCTTTCTGTTTTGTTTTGTTTTGTCATCTGTGT	1260
K	384
TTCGTATTTATCCTTTCTGCATTTCGCCTATTCTGGGATATAGGCTAGTTTCCTGATTCT	1320
TAAATCAGTGGGAGTGATTTTGTATCTTTCTTTATTATCCTATGTTGTTGTATAA	1380
CCGTATGAATCTTTTATCTATAAAATATTTAAAAA	1440

Figura 18. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos (deducida a partir de la primera) de *HafatA1*. La secuencia de nucleótidos fue depositada en el GenBank con el número de acceso AY078350. Los números a la derecha se refieren a los residuos de nucleótidos y aminoácidos. El péptido señal se corresponde con los primeros 55 aa, en azul, siendo la metionina M56 el sitio de rotura del mismo. Los aminoácidos catalíticos, histidina y cisteína conservados en todas las tioesterasas, en rojo, se corresponden a los residuos H274 y C309.

1.2. *HafatB*: Acil-ACP tioesterasa de tipo FatB de *Helianthus annuus*.

1.2.1. Clonación y secuenciación del cDNA correspondiente a *HafatB* de semillas de 15 DDF de la línea control RHA-274.

Tomando como molde la secuencia de una tioesterasa del tipo FatB de girasol silvestre disponible en la base de datos (número de acceso del GenBank AFO36565), se diseñaron dos cebadores correspondientes a los extremos de la secuencia: TioB1 y TioB2 (Materiales y Métodos, Apartado 2.1.5.1). Posiblemente, por el menor nivel de expresión de este gen, fue necesaria una segunda reacción de PCR para la obtención del fragmento de 1,3 Kb a partir del cDNA de semillas de 15 DDF de la línea control de girasol RHA-274, tal y como se detalla en materiales y métodos, apartado 2.1.5.2. Dicho fragmento fue clonado en el plasmido pGEM-T Easy (Invitrogen) y secuenciado (Figura 19). El análisis de la secuencia obtenida mediante el uso del programa BLAST muestra una gran similitud con las tioesterasas del tipo FatB, resultando idéntica a la secuencia de FatB de girasol de la base de datos, el clon obtenido se denominó *HafatB*. La expresión de este gen generaría una preproteína de 431 aminoácidos, con un peso molecular de 47,6 kDa y un punto isoeléctrico de 7,59. Al igual que las tioesterasas del tipo FatA, las tioesterasas del tipo FatB también presentan un péptido señal. El alineamiento con otras secuencias de tioesterasas y el programa de predicción ChloroP v1.1 (Emanuelsson et al., 1999), permitió localizar el comienzo de la proteína madura en la leucina L115. El procesamiento del péptido señal genera una proteína de 316 aminoácidos con un peso molecular alrededor de 35,6 kDa y un punto isoeléctrico de 5,8. De nuevo, los aminoácidos catalíticos, histidina H321 y cisteína C355, identificados por Yuan *et al.* (1996) están perfectamente conservados (Figura 19).

ATGGTAGCTATGAGTGCTACTGCGTGCCTGTTCCGGTTTCTTCCCAAACCTCACTCT	60
M V A M S A T A S L F P V S S P K P H S	20
GGAGCCAAGACATCTGATAAGCTTGGAGGTGAACCAGGTAGTGTGTGCTGCGCGAATC	120
G A K T S D K L G G E P G S V A V R G I	40
AAGACAAAATCTGTTAATCCGGTGGTATGAAAGTTAAGGCTAACGCACAGGCTCCTACT	180
K T K S V N S G G M K V K A N A Q A P T	60
GAGGTGAATGGGAGTAGATCACGTATCACGCATGGCTTCAAACCGATGATTATTCTACA	240
E V N G S R S R I T H G F K T D D Y S T	80
TCACCTGCCCGAGAACCTTTATCAACCAATGCCCATTGGAGCATGCTTCTTGCTGCA	300
S P A P R T F I N Q L P D W S M L L A A	100
ATCACAAATCTTCTTGGCTGCAGAGAAGCAATGGATGATGCTGGAAATGGAAGACAAA	360
I T T I F L A A E K Q W M M L E W K T K	120
CGCCCCGATATGATTGCTGATATGGATCCTTTCGGTTTAGGGAGGATTGTTCAAGATGGC	420
R P D M I A D M D P F G L G R I V Q D G	140
CTTGATTCCGTCAAAACCTTCTATTAGATCATATGAAATAGGGGCTGATCGAACTGCA	480
L V F R Q N F S I R S Y E I G A D R T A	160
TCGATAGAAACCCTAATGAATCATTTACAAGAAACGGCCCTTAATCATGTAAGTCTGCG	540
S I E T L M N H L Q E T A L N H V K S A	180
GGTCTTCTGGGCGATGGATTTCGGTTCAACACCAGAAATGTGCAAGAAGAATCTATTTGG	600
G L L G D G F G S T P E M C K K N L F W	200
GTGGTGACAAAGATGCAGGTGATAGTTGACCGTTATCCAAGTGGGGTGTGTGTTCAA	660
V V T K M Q V I V D R Y P T W G D V V Q	220
GTAGATACTTGGGTAGCCCCAAATGGGAAAATGGTATGCGCCGTGATTGGTGCTTCGC	720
V D T W V A P N G K N G M R R D W L L R	240
GATTATAAACAGGCGAGATTTAACAAGAGCCTCAAGTAAGTGGGTATGATGAATAAA	780
D Y K T G E I L T R A S S N W V M M N K	260
GAGACAAGGAGGTTATCGAAAATCCCAGATGAAGTTCGAGGTGAAATAGAGCATTACTTT	840
E T R R L S K I P D E V R G E I E H Y F	280
GTAGATGCACCTCCGGTTGTGGAGGATGATTCTAGAAAATTATCTAAACTTGACGAAAGC	900
V D A P P V V E D D S R K L S K L D E S	300
ACTGCTGACTATGTTCCGCGACGGTTTATTCCAAGATGGAGTATTGGATGTCAACCAG	960
T A D Y V R D G L I P R W S D L D V N Q	320
CATGTTAACAATGTGAAGTATATTGGCTGGATCCTTGAGAGTGTCCACAAGTTGGGAG	1020
H V N N V K Y I G W I L E S A P Q V V E	340
AAGTACGAGCTTGGCTCGCATTACTCTCGAGTACCGTAGAGAATGTAGGAAGGATAGTGTG	1080
K Y E L A R I T L E Y R R E C R K D S V	360
GTGAAATCACTGACCTCGGTATTAGGTGGTGGCGACGACACAATGGTGGAAATAGCGGAT	1140
V K S L T S V L G G G D D D N G G I G D	380
TCTGGCCGTGTTGATTGCCAACATGTGCTCTGTTTGGGGTGGTGGAGATGGTACTCT	1200
S G R V D C Q H V L L F A G G G D G T P	400
GGTGGCAGATTGTGAAGGAAGGACCCAGTGGCGGCCGAAATATGAGAAACAAGATGGG	1260
G G E I V K G R T Q W R P K Y E K Q D G	420
AGTGTGATCACTTCTGCTGGAAATGTTAA	1293
S V D H F S A G N V *	440

Figura 19. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos (deducida a partir de la primera) de *HafatB*. Los números a derecha e izquierda se refieren a los residuos de nucleótidos y aminoácidos. El péptido señal se corresponde con los primeros 114 aa, en azul, siendo la leucina L115 el sitio de rotura del mismo. Los aminoácidos catalíticos, histidina y cisteína conservados en todas las tioesterasas se corresponden con los residuos H321 y C355. Las secuencias empleadas en el diseño de cebadores para la secuenciación están indicadas por flechas.

1.3. Análisis comparativo de las secuencias de los genes *HafatA1* y *HafatB*.

Como muestra el dendograma de la Figura 20 la secuencia codificada por *HafatA1* se engloba dentro del grupo de las tioesterasas de tipo FatA (recuadro naranja), más concretamente con aquellas pertenecientes a las Euasteridas II como *Carthamus tinctorius* (Knutzon *et al.*, 1992) y *Coriandrum sativum* (Dörmann *et al.*, 1994). Por su parte, HaFatB se engloba en la clase de las de tipo FatB, en el grupo de *Arabidopsis thaliana* y *Garcinia mangostana* (recuadro verde).

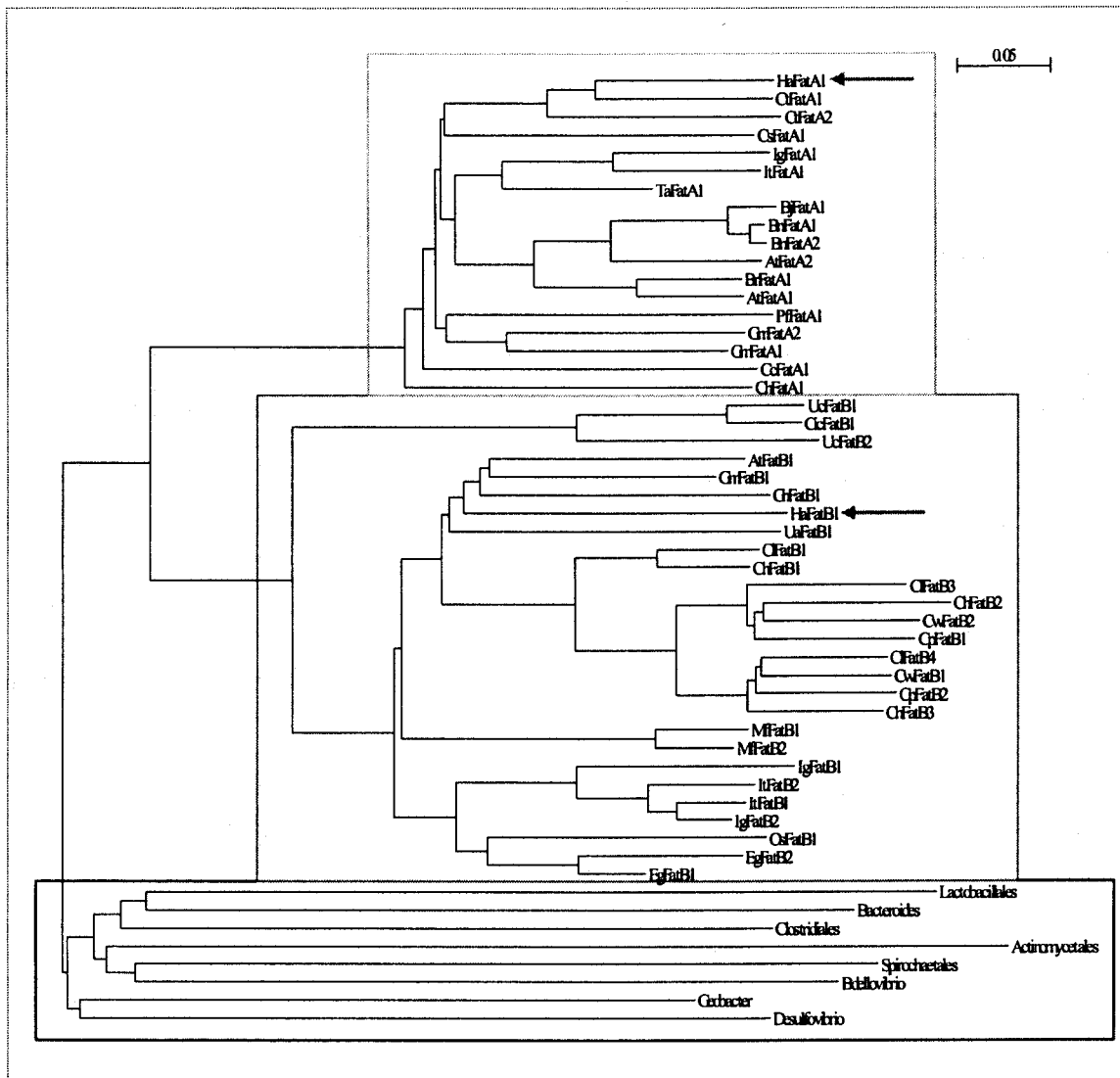


Figura 20. Dendrograma de acil-ACP tioesterasas. Los recuadros naranja, verde y azul se corresponden con los grupos de tioesterasas del tipo FatA, FatB y secuencias homólogas de procariotas respectivamente. Las flechas indican la posición de las proteínas codificadas por *HafatA1* y *HafatB*. At, *Arabidopsis thaliana*; Bj, *Brassica juncea*; Bn, *Brassica napus*; Br, *Brassica rapa*; Cc, *Capsicum chinense*; Ch, *Cuphea hookeriana*; Cic, *Cinnamomum camphora*; Cl, *Cuphea lanceolata*; Cp, *Cuphea palustris*; Cs, *Coriandrum sativum*; Ct, *Carthamus tinctorius*; Cw, *Cuphea wrightii*; Eg, *Elaeis guineensis*; Gh, *Gossypium hirsutum*; Gm, *Garcinia mangostana*; Ha, *Helianthus annuus*; Ig, *Iris germanica*; It, *Iris tectorum*; Mf, *Myristica fragrans*; Os, *Oryza sativa*; Pf, *Perilla frutescens*; Ta, *Triticum aestivum*; Ua, *Ulmus americana*; Uc, *Umbellularia californica*.

La disponibilidad de genomas procariotas completamente secuenciados de distintos grupos filogenéticos, nos permite calcular las distancias relativas entre las proteínas procariotas y las de plantas. Con el fin de simplificar el árbol filogenético aquellas secuencias procarióticas de organismos pertenecientes a un mismo orden han sido agrupadas en una sola entrada (*Lactobacillales*, *Clostridiales*, *Actinomycetales* y *Spirochaetales*) (recuadro azul).

1.4. Estructura tridimensional.

Debido a la falta de estudios estructurales y modelos tridimensionales toda la información disponible de las acil-ACP tioesterasas está basada en su secuencia de aminoácidos, en la construcción de quimeras y en la mutagénesis dirigida de algunos de sus residuos (Yuan *et al.*, 1995; Yuan *et al.*, 1996; Facciotti y Yuan, 1998; Facciotti *et al.*, 1999; Salas y Ohlrogge, 2002). La búsqueda inicial de homólogos de HaFatA1 en la base de datos de estructuras tridimensionales de proteínas RCSB PDB (Berman *et al.*, 2000) mediante el programa SWISS-MODEL (Guex y Peitsch, 1997) resultó infructuosa, por lo que la secuencia proteica codificada por *HafatA1* fue utilizada en la predicción de su estructura secundaria mediante el uso de los distintos métodos disponibles (PSIPRED, McGuffin *et al.*, 2000; JPRED, Cuff y Barton, 2000; PROF, Ouali y King, 2000; PHD, Rost, 1996; y SSpro, Pollastri *et al.*, 2002) (Figura 21).

SEQ 1	MLSRGVPTATATAYNDVIKETARSVTNSRSIDSVSIRRRNNGFVSNLCLRRVAPVMAVKV	60
PSS	CCCCCCCCCECCCCCEEECCCCCCCCCCCCCEEEEECCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHC	
61	DEQRTGVAVDVTEKRLADRLRMGSLTEDGLSYKERFI IRCYEVGINKTATVETIANLLQE	120
	CCCCCEEECCCCCCCCCCCCCHHHCCCCCEEEEEEEEEEEEEEECCCCCEEEHHHHHHHHHH	
121	VGGNHAQSVGFSTDFATTTTMRKLNLIWVTSRMHIEIYRYPAWSVDVVEIETWCQEGRI	180
	HHHHHHHHCCCCCCCCCHHHHHHCCCCCEEEEEEEEEEECCCCCCCCCEEEEEEEEEEEECCE	
181	GTRRDWIKDHSNGEVIGRATSKWVMNSETRRLQKVNDIRDEYLI FCPKTLRLAFPEE	240
	EEEEEEEEEECCCCCEEEEEEEEEEEEEEECCCCCCCCCHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCC	
241	NNNSLKKIAKLEDPAECSTLGLVPRRADLDMNKVNNVTYIGWVLESIPQEVIDTHELQT	300
	CCCEEECCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCHHCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCEEE	
301	ITLDYRREQHQDDVVDLSLTSSESPAVNGCASGENLSKFLHLLRSSGEGLELNRGRTEWRK	360
	EEEEEECCCCCEEEEEEEEEEECCCCCCCCCCCCCEEEEEEEEEEECCCCEEEEEEEEEEEC	
361	KPAKK	365
	CCCC	

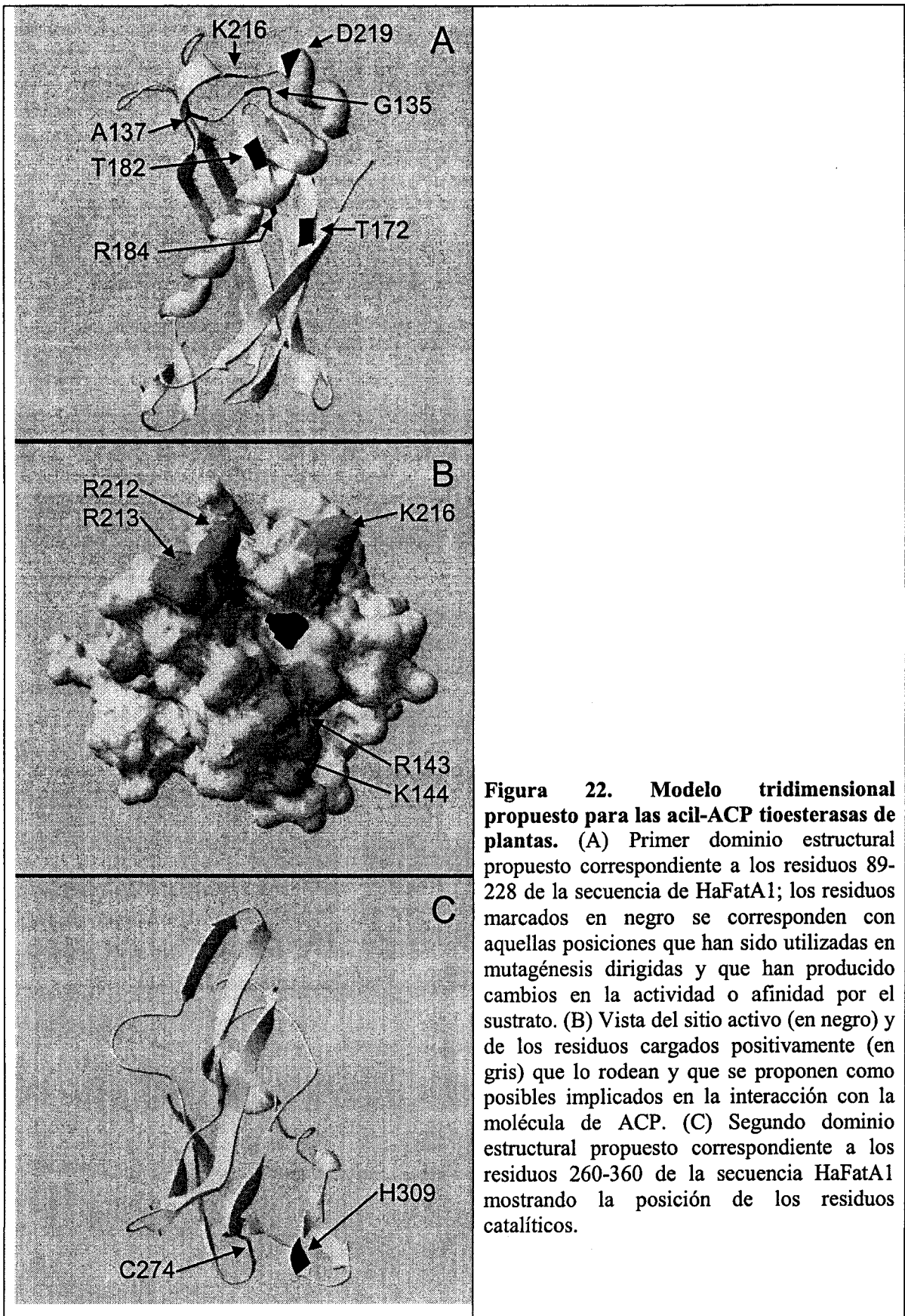
Figura 21: Estructura secundaria deducida a partir de la secuencia de aminoácidos de HaFatA1. H: α -hélice, E: hoja plegada β , C: conformación al azar. Marcados en recuadros, la M56 (inicio de la proteína madura), y los residuos catalíticos H274 y C309.

Con la estructura secundaria predicha junto con el programa 3D-PSSM (Kelley *et al.*, 2000) se obtuvieron “homólogos estructurales” (“spalog”, Varshavsky, 2004), para dos regiones de la preproteína: del residuo 89 al 228 y del residuo 260 al 360. La primera región incluye aquellos residuos detectados mediante mutagénesis dirigida que modifican la especificidad por sustrato en la tioesterasa FatA1 de *Garcinia mangostana* (Facciotti *et al.*, 1999) así como en la FatB de *Umbellularia californica* (Yuan *et al.*, 1995) además de la zona definida por los experimentos de construcción de quimeras como implicada en la especificidad de sustratos (Facciotti *et al.*, 1995; Salas y Olhrogge, 2002), y en la segunda región se incluyen los residuos de histidina (H274) y cisteína (C309) implicados en el centro activo de la proteína (Yuan *et al.*, 1996). La región comprendida entre ellas es específica de las tioesterasas de tipo FatA (Facciotti y Yuan, 1998). En la Figura 33 se muestran las posibles estructuras tridimensionales para ambas regiones.

Casualmente los homólogos estructurales propuestos fueron dos miembros de la superfamilia estructural “Thioesterase/thiol ester dehydrase-isomerase” (SCOP, Murzin *et al.*, 1995), más concretamente de la familia “4HBT-like”: la proteína Ybaw de *Escherichia coli* (Kim *et al.*, 2003) y la 4-hidroxibenzoil-CoA tioesterasa de *Pseudomonas sp.* (Benning *et al.*, 1998). Estas proteínas, homotetrámeros, se caracterizan por cinco regiones hoja plegada β antiparalelas, y tres α -hélices. La región del sitio activo observado en las estructuras está constituida por una ancha hendidura. El grupo acilo se podría acomodar al sitio activo mediante su inserción entre la α -hélice central y la superficie interna definida por las subunidades de hoja plegada β (Benning *et al.*, 1998). Es precisamente la primera región, mostrada en la Figura 22A, la que presenta una mayor homología estructural con la de la 4-hidroxibenzoil-CoA tioesterasa y se corresponde con las α -hélices y hojas plegadas β que forman parte de las paredes del sitio activo donde se introduciría el grupo acilo así como la zona de interacción con el ACP que suele estar formada por un bolsillo cargado positivamente adyacente al túnel del sitio activo (Zhang *et al.*, 2001). En la Figura 22A aparecen marcados los residuos equivalentes a los que mediante mutagénesis dirigida han modificado la afinidad por el sustrato en UcFatB1 (M197, R199 e T231) (Yuan *et al.*, 1995) y en GmFatA1 (G108, S111, S146, V193 e H202) (Facciotti *et al.*, 1999). La zona definida por experimentos de construcciones de proteínas quiméricas se corresponde con la pared formada por hojas plegadas β antiparalelas. Asimismo, rodeando la entrada del sitio activo se encuentran una serie de residuos cargados positivamente altamente conservados entre tioesterasas de tipo FatA y FatB (R143, K144, R212, R213 y K216) que pueden ser

los implicados en la interacción con el ACP que se encuentra electronegativamente cargado (Figura 22B).

La Figura 22C muestra la segunda región que incluye los residuos catalíticos H274 y C309 (marcados en negro) que se encuentran en contacto de forma similar a la que se encuentran en la 4-hidrobenzoil-CoA tioesterasa los residuos implicados en la catálisis (Benning *et al.*, 1998).



2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE FRAGMENTOS GENÓMICOS DE LOS GENES *HafatA1* y *HafatB*.

2.1. Amplificación de las secuencias genómicas de *HafatA1* y *HafatB*.

El DNA de la línea RHA-274 se obtuvo tal y como se describe en Materiales y Métodos, Apartado 2.1.1.1. La obtención de los fragmentos de DNA genómicos se llevó a cabo mediante PCR (Materiales y Métodos, Apartado 2.1.5.2), utilizando los oligos de los extremos de los cDNA de ambos genes. *HafatB* se amplificó de una vez, dando una banda de 2,2 Kb, y se secuenció con oligos internos, presentando cinco intrones (Figura 21 y Tabla 13).

En el caso de *HafatA* fue imposible amplificar el gen completo, por lo que se realizaron PCRs con cebadores internos, en concreto GSP2 y GSP3 (estos oligos no se encontraban interrumpidos por ningún intrón). En dicho fragmento se encontraron cuatro intrones (Figura 23 y Tabla 12). Desde GSP3 hasta el final del gen, fragmento amplificado utilizando GSP2 y FATA2, no se encontró ningún intrón. No ha sido posible obtener hasta la fecha el fragmento inicial del gen.

2.2. Análisis comparativo con otras secuencias genómicas de genes de tioesterasas.

El alineamiento de las secuencias genómicas de tioesterasas de girasol obtenidas junto con las de otras plantas encontradas en las bases de datos, dos *fatA* y una *fatB* de *Arabidopsis thaliana* (Sato *et al.*, 2000; Theologis *et al.*, 2000; Pohl *et al.*, 2001) una *fatA* de *Brassica napus* (Loader y Safford, 1995), una *fatB* de algodón (*Gossypium hirsutum*) (Yoder *et al.*, 1999) y una *fatB* de *Oriza sativa* (Sasaki *et al.*, 1999)), muestra cómo los intrones se encuentran localizados en las mismas posiciones (Figura 23). Los tres primeros intrones se encuentran presente en todos los tipos de tioesterasas analizados, el cuarto intrón solo se encuentra presente en las tioesterasas del tipo FatA, el quinto es común para ambos tipos de tioesterasas aunque no lo presentan las tioesterasas del tipo FatA de *Brassica napus* y una de las de *Arabidopsis thaliana*, y el sexto intrón está presente en todas las secuencias comparadas salvo en la tioesterasa de tipo FatB de *Arabidopsis*. En las Tablas 12 y 13 se detalla la comparación de los intrones encontrados, su localización, a nivel de secuencia y tamaño. Las secuencias de los exones de los sitios de inserción se encuentran muy conservadas. Tanto el tamaño, como las secuencias flanqueantes de los intrones varían considerablemente entre las distintas especies, salvo las dianas para la maduración,

correspondiéndose todas al tipo GT/AG , características de intrones de tipo U2 (Lynch, 2002).

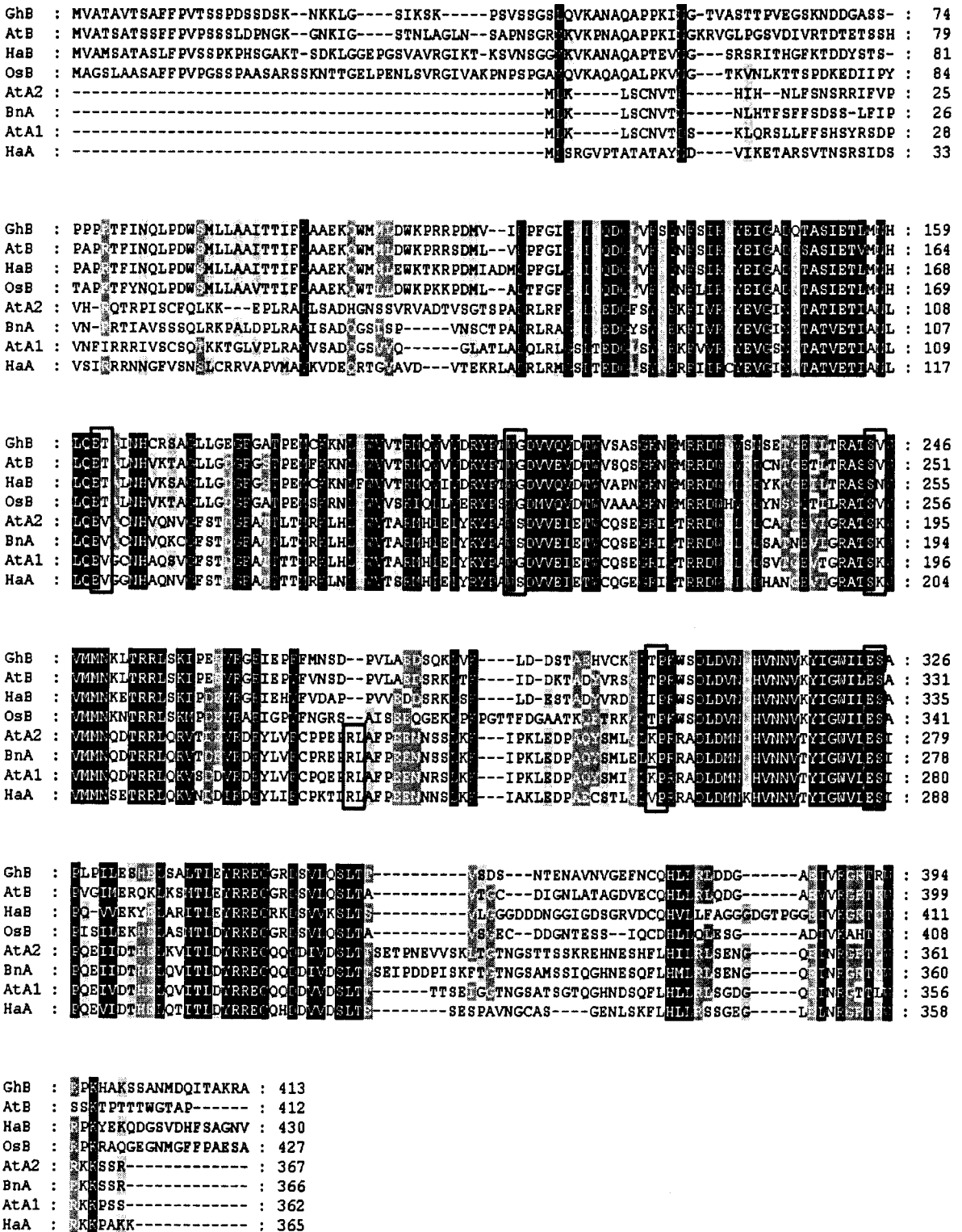


Figura 23. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de tioesterasas FatA y FatB. Los rectángulos señalan la inserción de intrones. At, *Arabidopsis thaliana*; Bn, *Brassica napus*; Gh, *Gossypium hirsutum*; Ha, *Helianthus annuus*; Os, *Oryza sativa*.

Tabla 12. Comparación de la organización exón/intrón de secuencias genómicas de *fatA*. En amarillo las secuencias de reconocimiento del intrón para su procesamiento.

Exones		Intrones				
nº	Tamaño (pb)	5'	nº	Tamaño (pb)	3'	
<i>fatA</i> de <i>H. annuus</i> RHA-274						
3		ACAAGgtgag	3	116	tgcagCAAGT	
4	96	CTGAGgttaa	4	94	ttcagATTAG	
5	88	TTGTGgtaaa	5	519	tacagCCCAG	
6	69	TCGAGgtcgg	6	134	gacagAGCAT	
7	239					
<i>fatA1</i> de <i>A. thaliana</i>						
1	333	TACAGgtcag	1	100	tatagGAGGT	
2	134	GCTTGgttta	2	104	tacagGGGTG	
3	114	ACAAGgtagg	3	270	ttcagCAACT	
4	96	CCGAGgtaaa	4	78	tatagGTTAG	
5	88	TTAAGgtaca	5	85	tgcagCCTAG	
6	69	TCGAGgtaag	6	86	tgcagAGCAT	
7	255					
<i>fatA2</i> de <i>A. thaliana</i>						
1	330	TGCAGgtttg	1	122	tgtagGAAGT	
2	134	GCTTGgtaag	2	70	tatagGAGTG	
3	114	ACAAGgtttt	3	158	ttcagCAAGT	
4	96	CCTAGgtgaa	4	71	tgtagACTAG	
5	157	TTGAGgtgag	5	87	ggcagAGCAT	
6	273					
<i>fatA</i> de <i>B. napus</i>						
1	327	TACAGgttcg	1	189	tatagGAGGT	
2	134	GCTTGgtatt	2	87	aacagGAGTG	
3	114	ACAAGgtttg	3	221	ctcagCAAGT	
4	96	CCCAGgtgaa	4	98	cgtagACTAG	
5	157	TTGAGgtgag	5	80	ggcagAGCAT	
6	273					

Tabla 13. Comparación de la organización exón/intrón de secuencias genómicas de *fatB*. En amarillo las secuencias de reconocimiento del intrón para su procesamiento.

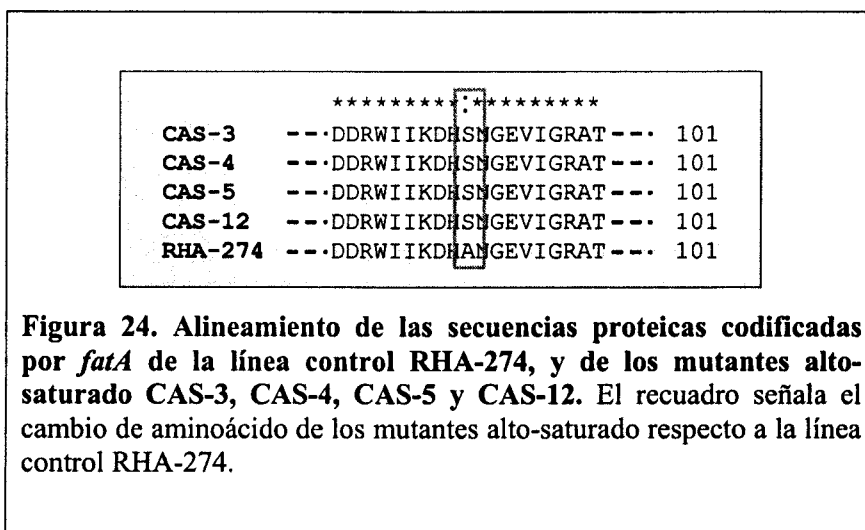
Exones		Intrones			
nº	Tamaño (pb)	5'	nº	Tamaño (pb)	3'
<i>fatB</i> de <i>H. annuus</i> RHA-274					
1	510	TACAAgtaat	1	83	accagGAAAC
2	134	ACTTGgtaag	2	80	tgcagGGGTG
3	114	TCAAGgttgt	3	98	tccagTAACT
4	172	TGATTgtgag	4	95	tgcagCCAAG
5	69	TTGAGgtaaa	5	506	cgcagAGTGC
6	294				
<i>fatB</i> de <i>A. thaliana</i>					
1	497	TGCAGgtaag	1	81	gagagGAAAC
2	134	ACTTGgtaag	2	227	cacagGGGTG
3	114	TCAAGgtgag	3	226	tgcagTGTGT
4	172	TGACTgtaag	4	90	ttcagCCTCG
5	321				
<i>fatB</i> de <i>G. hirsutum</i>					
1	503	TACAGgtaga	1	132	ggcagGAAAC
2	134	ACTTGgtaag	2	688	tgcagGGGTG
3	114	ACAAGgtcgg	3	250	tgcagTGTAT
4	172	TAACTgtaag	4	113	tgcagCCTAA
5	69	TTGAGgtaga	5	252	tgcagAGTGC
6	270				
<i>fatB</i> de <i>G. hirsutum</i>					
1	513	TACAGgtgat	1	100	tgcagGAAAC
2	134	TCATGgtact	2	1239	tttagGGGAG
3	114	ACAAGgtttg	3	104	tgcagTGTTT
4	187	TTACTgtaag	4	93	gtcagCCGAA
5	69	TTGAGgtaac	5	175	tcaagGTGCT
6	267				

3. SECUENCIAS DE LOS GENES *HafatA1* y *HafatB* EN MUTANTES ALTO-SATURADO DE GIRASOL.

3.1. Aislamiento del gen *HafatA1* de los mutantes alto-esteárico CAS-3, medio-esteárico CAS-4 y los alto-palmitico CAS-5 y CAS-12.

A partir de cDNA de semillas de 15 DDF de las líneas CAS-3, CAS-4, CAS-5 y CAS-12, mediante PCR con los cebadores FATA0 y FATA2 (Materiales y Métodos, Apartado 2.1.5.1), se obtuvieron fragmentos de 1 Kb con el programa de optimización, a 65°C, usando MgCl₂ a una concentración de 3,5 mM. Los fragmentos obtenidos fueron clonados en el plásmido pGEM-T Easy y secuenciados.

El alineamiento de las secuencias obtenidas utilizando el programa ClustalX reveló que las secuencias son idénticas salvo el residuo de alanina A92 de la línea control RHA-274, que cambia a serina en los mutantes alto-saturado CAS-3, CAS-4, CAS-5 y CAS-12 (Figura 24). Este cambio, no obstante es conservativo.



3.2. Aislamiento del gen *HaFatB* del mutante alto-esteárico CAS-3 y los alto-palmitico CAS-5 y CAS-12.

A partir de cDNA de semillas de 15 DDF de las líneas CAS-3, CAS-5 y CAS-12, mediante PCR con los cebadores TioB1 y TioB2, se obtuvieron fragmentos de 1,3 Kb tal y

como se describe para RHA-274 (Resultados y Discusión, Apartado 1.5). Los fragmentos fueron clonados en el plásmido pGEM-T Easy y secuenciados.

El alineamiento utilizando el programa ClustalX reveló que las secuencias de las proteínas de las diferentes líneas son idénticas.

4. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE *HafatA1* y *HafatB* MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL.

Con el fin de estudiar la expresión de los genes *HafatA1* y *HafatB* en los mutantes alto-saturado de girasol se recogieron semillas en formación de las líneas CAS-3, CAS-5 y de la línea control RHA-274. Los mRNA obtenidos a partir de estas fueron utilizados para la cuantificación de la expresión de estos genes mediante PCR cuantitativa. Los resultados obtenidos, expresados como moléculas/ng de cDNA (Materiales y Métodos, Apartado 2.1.3), muestran que los niveles de expresión para *HafatA1* son superiores a los de *HafatB* en todos los casos (Figura 25 A y B). A los 10 DDF ya se detecta la presencia de transcritos de ambos genes, presentando un máximo a los 16 DDF. En la línea control RHA-274 apenas se observa expresión a partir de esos 16 DDF, mientras que en los mutantes alto-saturado se conserva cierto nivel de transcritos, especialmente en la línea CAS-5, en la que la presencia de los mRNA siempre es superior que en las otras líneas. En dicho mutante a los 16 DDF, los niveles de *HafatA1* son más del doble de los de las otras líneas, llegando hasta las 400 moléculas/ng de cDNA, y manteniéndose altos hasta los 28 DDF. El incremento en los niveles de *HafatB* es aún más significativo tal y como muestra la razón *HafatA1/HafatB* (Figura 25C), a los 16 DDF es unas 3 veces inferior a los del control, alcanzando las 27 moléculas/ng de cDNA de *HafatB* a los 16 DDF, mientras que el control presenta 2,3 moléculas/ng de cDNA.

En el mutante alto-esteárico CAS-3 el aumento de transcritos no es tan pronunciado, a los 10 DDF mantiene niveles por debajo de la línea control, igualándola a los 16 DDF, y manteniéndolos por encima del control a los 22 y 28 DDF, tanto en el caso de *HafatA1* como de *HafatB*. La razón *HafatA1/HafatB* (Figura 25C) muestra como en CAS-3 se produce un incremento de la actividad *HafatA1* respecto a la de *HafatB*, al compararlo con la línea control RHA-274.

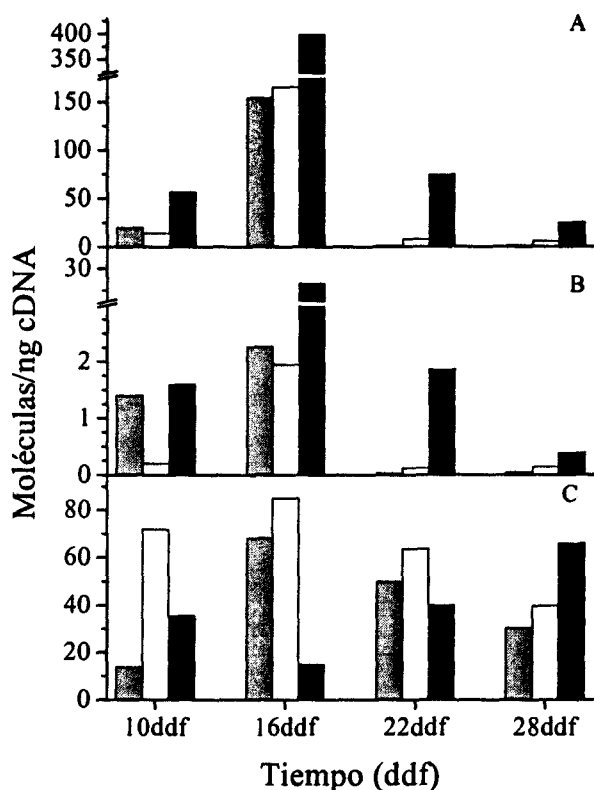


Figura 25. Medidas de los niveles de expresión de los genes *HafatA1* y *HafatB* en semillas en formación de la línea control RHA-274 y los mutantes alto-saturado CAS-3 y CAS-5 mediante PCR cuantitativa. Los valores para RHA-274 están en gris, para CAS-3 en blanco y para CAS-5 en negro. (A) Niveles de expresión de *HafatA1*. (B) Niveles de expresión de *HafatB*. (C) Relación entre la expresión de *HafatA1* y *HafatB*.

Para el estudio de la expresión de *HafatA1* y *HafatB* en los distintos tejidos de la planta, se obtuvieron mRNAs de raíz, tallo, cotiledón y hoja de la línea control RHA-274 (Materiales y Métodos, Apartado 2.1.1), asumiendo que en los mutantes CAS-3 y CAS-5 la expresión del carácter mutante se da exclusivamente en la semilla (Cantisán *et al.*, 1999). En el hipocotilo no se detectó expresión, mientras que en raíz y en hoja se observaron niveles entorno a 0,5 moléculas/ng cDNA de *HafatA1* y 0,1 moléculas/ng cDNA de *HafatB* (Tabla 14). En concreto la relación *HafatA1/HafatB* de la raíz fue menor que en la hoja, entorno a 4 y 7 veces, respectivamente.

Tabla 14: Medidas de los niveles de expresión de los genes *HafatA1* y *HafatB* en tejidos vegetativos de RHA-274.

	<i>HafatA1</i>	<i>HafatB</i>	<i>HafatA1/HafatB</i>
Raíz	0,47	0,13	3,61
Hipocotilo	- ^a	-	
Hoja	0,68	0,10	6,80

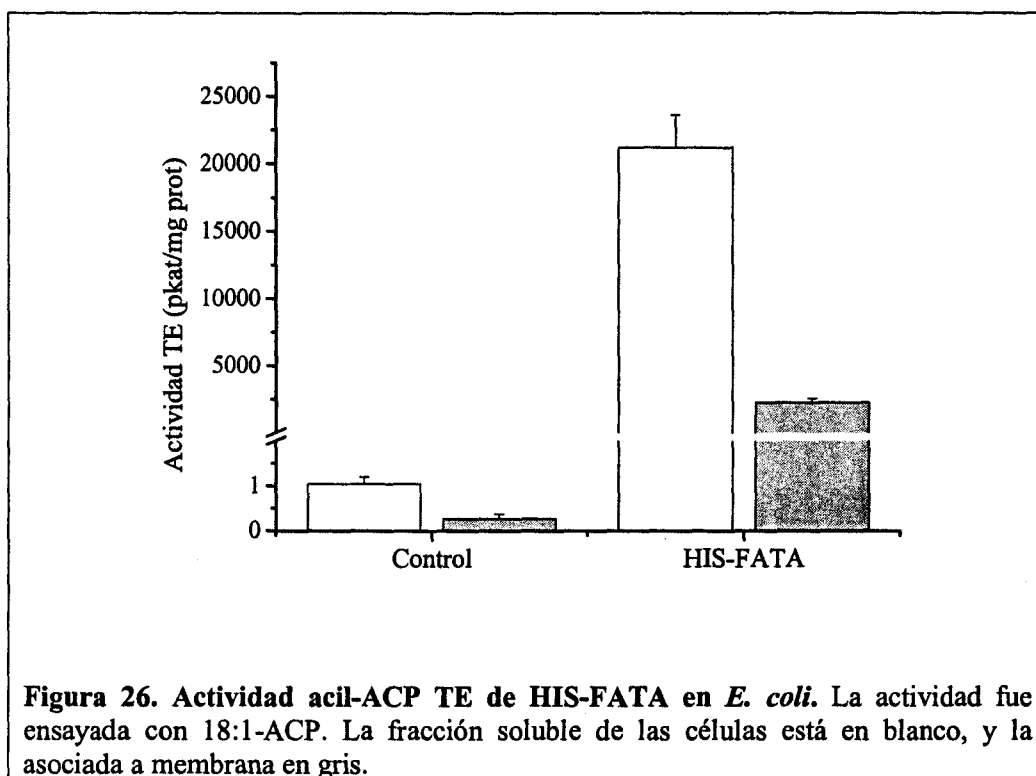
-^a: no detectados.

5. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE *HafatA1* y *HafatB* EN *Escherichia coli*.

5.1. Expresión de *HaFatA1*.

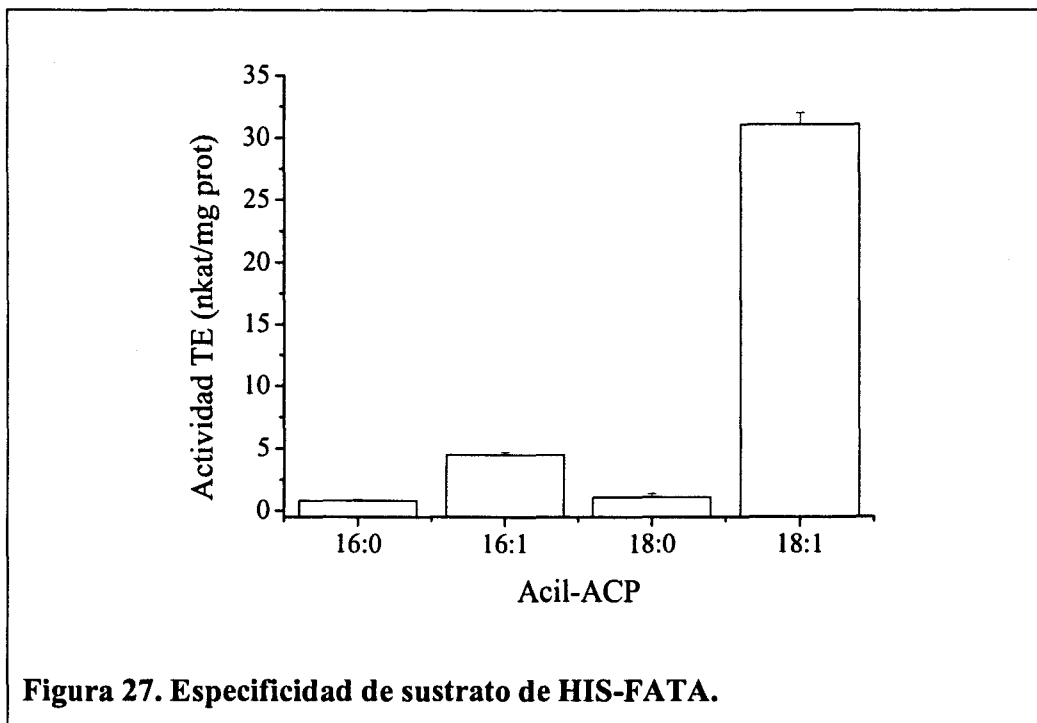
Para la expresión heteróloga de *HafatA1* en *Escherichia coli* se diseñaron cebadores que eliminasen el péptido señal de la proteína mediante PCR, añadiendo en sus extremos dianas de restricción para las enzimas *SacI* y *KpnI* (*SacIFATA0* y *KpnIFATA2*; Materiales y Métodos, Apartado 2.1.5.1). El producto de PCR obtenido fue clonado en el vector pQE-30, y la construcción resultante, denominada pQEFATA, fue utilizada para transformar *E. coli* BL21 (pREP4) tal y como se detalla en Materiales y Métodos, Apartado 2.1.6. La proteína de fusión resultante, de 310 aminoácidos de extensión con una cola de seis histidinas en el extremo N-terminal y un peso molecular estimado en 37 kDa, se denominó HIS-FATA. Como control para el estudio de la influencia de la tioesterasa en la composición de ácidos grasos de *E. coli* se utilizó BL21 (pREP4/pQE30).

Las células transformadas con y sin la construcción crecieron a 37°C, y a una DO₆₀₀ de 0,6 fueron inducidas con 1mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG), para seguir siendo incubadas durante otras cuatro horas más, tal y como se explica en Materiales y Métodos, Apartado 2.1.8. Después del periodo de expresión fueron lisadas (Materiales y Métodos, apartado 2.1.8.) y se recogieron las fracciones soluble e insoluble. En la Figura 26 se muestran las actividades encontradas en ambas fracciones solubles de las células expresando HIS-FATA y de las células control. El ensayo se realizó con 18:1-ACP como sustrato ya que es por el que muestran más afinidad y actividad las tioesterasas de tipo FatA. La mayor parte de la actividad tioesterasa fue localizada en la fracción soluble y fue aproximadamente 20000 veces mayor en las células que expresaban HIS-FATA que en las células control.



Una vez localizada la actividad tioesterasa en la fracción soluble, estudiamos su especificidad por sustrato usando los intermediarios más comunes en la síntesis de ácidos grasos en la semilla de girasol: 16:0-ACP, 18:0-ACP, 18:1-ACP, incluyendo además el 16:1-ACP (Figura 27). El 16:1 se encuentra habitualmente en pequeñas cantidades en la fracción lipídica de la mayoría de las plantas, incluido el girasol, y por esta razón no ha sido analizado en otras ocasiones (Knutzon *et al.*,1992; Hawkins *et al.*,1998). Sin embargo, los mutantes alto-palmítico de girasol, CAS-5 y CAS-12, contienen en su aceite hasta un 4,5% de este ácido graso, convirtiéndolo en un compuesto de interés para este estudio.

La Figura 27 muestra cómo la afinidad de la enzima es mucho mayor por los acil-ACP insaturados, que por los saturados, mostrando la mayor actividad por el 18:1-ACP. La actividad encontrada para los sustratos saturados fue muy similar e independiente de la longitud de la cadena de carbonos.



5.1.1. Purificación de la proteína recombinante HIS-FATA.

La purificación de la proteína HIS-FATA tuvo lugar tal y como se detalla en Materiales y Métodos en el Apartado 2.3.2. La proteína fue eluida como un pico único a una concentración de imidazol de 240 mM (Figura 28A). Se ensayó la actividad tioesterasa con 18:1-ACP radiactivo como sustrato en numerosas fracciones (Figura 28B) a la vez que se analizaron en un gel de SDS-poliacrilamida (Figura 28C) para identificar las fracciones que contuvieran la proteína purificada activa. Las fracciones 18, 19, 20 y 21 acumularon la mayor actividad de la fracción soluble del extracto pasado por columna, mostrando un pico de actividad correspondiente a la proteína eluida a 240 mM de imidazol (Figura 28A). El gel SDS/PAGE de las fracciones muestra una banda de unos 36,9 kDa en las líneas correspondientes con las fracciones 19 y 20, estando ausente en el resto de las fracciones (Figura 28C).

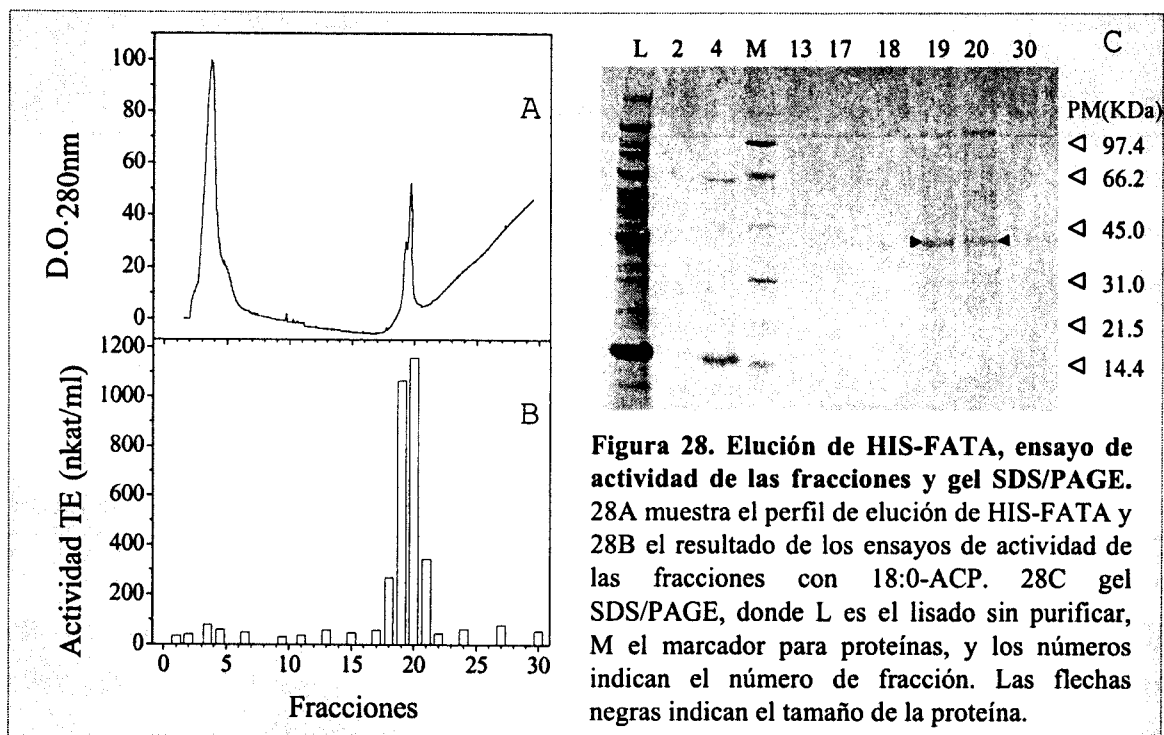


Figura 28. Elución de HIS-FATA, ensayo de actividad de las fracciones y gel SDS/PAGE. 28A muestra el perfil de elución de HIS-FATA y 28B el resultado de los ensayos de actividad de las fracciones con 18:0-ACP. 28C gel SDS/PAGE, donde L es el lisado sin purificar, M el marcador para proteínas, y los números indican el número de fracción. Las flechas negras indican el tamaño de la proteína.

El tamaño de la proteína purificada en las fracciones 19 y 20 concuerda con la masa molecular prevista para el polipéptido de 310 aminoácidos (37 KDa) y estas coinciden con el pico de mayor actividad mostrado en la Figura 26B. Las fracciones que contenían la proteína recombinante fueron unificadas y concentradas para el estudio de los parámetros cinéticos. Como resultado de la purificación se llevó a cabo una purificación parcial de 14 veces de la proteína, representando la misma un 34,5% de la proteína total del ensayo.

5.1.2. Análisis cinéticos.

Los análisis cinéticos se llevaron a cabo con la proteína purificada. La especificidad por sustrato se calculó variando las concentraciones de los mismos (16:0-ACP, 18:0-ACP, 16:1-ACP, y 18:1-ACP), tal y como se describe en Materiales y Métodos, Apartado 2.3.3.2.

Como muestra la Tabla 15, mientras que la K_m presenta valores similares para los distintos ácidos grasos, dentro del orden micromolar, es en la velocidad de la reacción (V_{max} , kcat) donde encontramos diferencias significativas. Los valores de la kcat para el 18:1-ACP es hasta 30 veces superior que para el resto, seguido por el 16:1-ACP, que es 4 veces mayor. Así, la eficiencia catalítica viene dada por la relación de la velocidad de reacción más la afinidad por el sustrato (kcat/ K_m) de la proteína, encontrándose que las mayores eficiencias de HIS-FATA son hacia los sustratos insaturados, siendo 12 veces mayor para el 18:1-ACP, que para el resto de los sustratos, seguido por el 16:1-ACP, 3,6 veces mayor.

Tabla 15: Parámetros cinéticos de la proteína recombinante HIS-FATA.

Sustrato	K_m (μM)	V_{max} (nkat/mg prot)	kcat (s^{-1})	kcat/ K_m ($\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)	%(V_{max})
18:1-ACP	2,1	105,5	11,4	5,4	100,0
18:0-ACP	0,9	3,6	0,4	0,4	3,4
16:1-ACP	0,6	8,2	0,9	1,6	7,7
16:0-ACP	1,3	4,3	0,5	0,4	4,1

Estos resultados son similares a las propiedades catalíticas determinadas en semillas de colza (Hellyer *et al.*, 1992) y Arabidopsis (Salas *et al.*, 2002): aunque mientras que los valores de K_m están dentro del mismo orden, el valor de la V_{max} o la kcat para el 18:1-ACP es significativamente superior en la FatA de girasol.

Por último, se determinó el pH óptimo de la actividad tioesterasa de HIS-FATA (Figura 29). El efecto del pH del tampón se determinó usando 18:1-ACP como sustrato, encontrándose el pH óptimo en el rango de 9-9,6. Estos valores entran dentro del rango establecido (pH 9-10) para las actividades tioesterasa de otras plantas (Hellyer *et al.*, 1992; Dörmann *et al.*, 1993; Dörmann *et al.*, 1995; Bhattacharjee *et al.*, 2002).

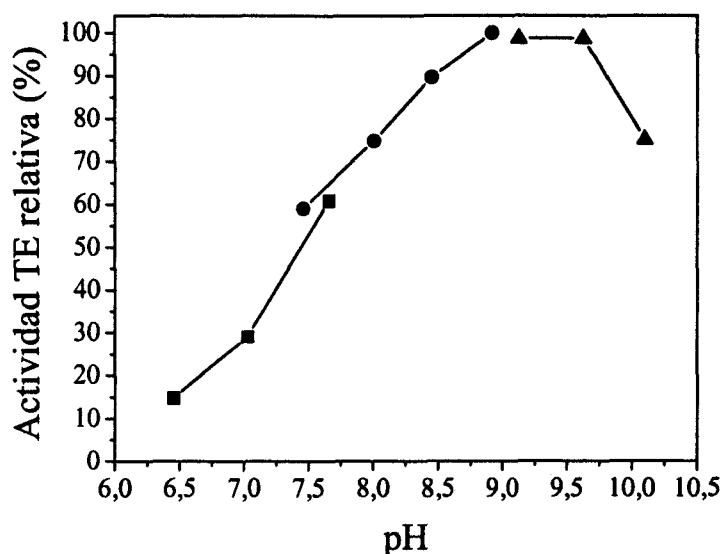


Figura 29. Efecto del pH en la actividad TE de HIS-FATA. La actividad se ensayó con 18:1-ACP, y los tampones empleados fueron MOPS-KOH (■), Tris-HCL (●), y CHES-KOH (▲). Los resultados se muestran como porcentaje respecto a la actividad máxima.

5.1.3. Alteraciones en la síntesis de ácidos grasos de *E. coli*.

La composición de ácidos grasos en *E. coli* se encuentra regulada por la temperatura y la edad del cultivo (Voelker *et al*, 1994), por ello, en nuestros experimentos, usamos cultivos crecidos en igualdad de condiciones e igual densidad óptica (número de células equivalentes). Dichos cultivos fueron crecidos a 37°C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,9 momento en que se indujeron con IPTG 1mM, y continuaron creciendo 4 horas más, tal y como se describe en Materiales y Métodos, Apartado 2.1.6. En ese momento los lípidos totales fueron extraídos según Materiales y Métodos (Apartado 2.2.2), cuantificados y separados por cromatografía en capa fina en lípidos polares (mayoritariamente fosfolípidos), y lípidos neutros (principalmente ácidos grasos libres) (Materiales y Métodos, Apartado 2.2.2). Posteriormente la composición de los distintos tipos de lípidos fue analizada por cromatografía gaseosa (Materiales y Métodos, Apartado 2.2.1.3).

En la Figura 30 se muestra un esquema de la ruta de biosíntesis de los ácidos grasos en *E. coli* para poner de manifiesto las diferencias existentes con la síntesis de ácidos grasos en plantas. A partir de la desaturación del ácido graso 10:0 en 10:1Δ³, la elongación de las

cadena de carbonos de ácidos grasos saturados e insaturados es independiente (Di Russo *et al.*, 1999). Los ácidos grasos insaturados palmitoleico, 16:1 y asclépico, 18:1 Δ^{11} esterificados en los fosfolípidos de membrana pueden sufrir una modificación postsíntesis dando lugar a los derivados ciclopropanos (CFA), los ácidos *cis*-9, 10-metilenhexadecanoico, 17:0 Δ y *cis*-11, 12-metilenhexadecanoico, 19:0 Δ , respectivamente (Cronan y Rock, 1987).

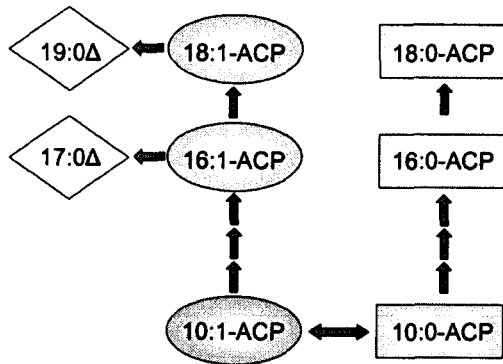


Figura 30. Ruta de biosíntesis de ácidos grasos en *E. coli*. Como puede observarse la síntesis de ácidos grasos en eubacterias y plantas difieren fundamentalmente en el origen de los ácidos grasos monoinsaturados. Mientras que en plantas estos derivan directamente de los saturados de igual longitud (Introducción, Apartado 5.1), en eubacterias estos siguen una ruta de síntesis independiente.

El efecto de la expresión de HIS-FATA en *E. coli* se muestra en la Tabla 16. Como resultado de la misma se produce un drástico incremento en el conjunto de ácidos grasos libres, pasando de un 2,8% en las células control a un 35% en las células que expresan la proteína. Estos resultados son similares a los obtenidos utilizando cepas de *E. coli* deficientes en la degradación de ácidos grasos expresando tioesterasas de plantas (Voelker *et al.* 1994, Dorman *et al.* 1995, Huynh *et al.* 2002).

Tabla 16. Composición de ácidos grasos de los diferentes tipos de lípidos de *E. coli* expresando o no la proteína HIS-FATA.

		Ácidos grasos (mol%)						μg
		16:0	16:1	17:0 Δ	18:0	18:1	19:0 Δ	
Control ^a	LT ^b	40,9	1,5	23,1	1,9	14,9	17,8	1156,0
	FL	40,0	1,4	23,6	1,7	14,8	18,6	946,9
	AG	39,9	3,6	13,6	21,6	10,9	10,4	33,8
HIS-FATA	LT ^b	42,4	16,6	19,5	2,0	15,1	4,5	1424,4
	FL	41,6	6,6	30,0	4,9	10,2	6,7	850,9
	AG	43,7	24,9	0,8	7,6	22,8	0,3	507,1

^a Control, células transformadas con pQE30.

^b LT, lípidos totales; FL, fosfolípidos; AG, ácidos grasos libres.

Respecto al contenido total de lípidos, éste sufre un incremento, ya que el desvío de ácidos grasos al conjunto de ácidos grasos libres no afecta a la cantidad de fosfolípidos (Voelker *et al.*,1994, Dorman *et al.*,1995). No se observan modificaciones en la ruta de biosíntesis de los ácidos grasos saturados, sin embargo, la especificidad por ácidos grasos insaturados de la proteína expresada se refleja en un incremento de 16:1 así como en un descenso de 19:0 Δ , mostrando que el 16:1-ACP restante en la ruta, pasa a 18:1-ACP, pero entonces es sacado de la misma dejando muy poco sustrato para 19:0 Δ .

En *E. coli* la mayor parte de los lípidos se encuentran en forma de fosfolípidos, de ahí que la composición de fosfolípidos y lípidos totales coincidan en las células control. Sin embargo, en las células que expresan HIS-FATA el incremento en 16:1 proporciona más sustrato en la membrana para la síntesis de 17:0 Δ a partir 16:1, y la menor cantidad de 18:1 hace que el contenido en 19:0 Δ decrezca considerablemente, ya que la tioesterasa HIS-FATA retira 18:1-ACP de la ruta de biosíntesis.

5.2. Expresión de *HafatB*.

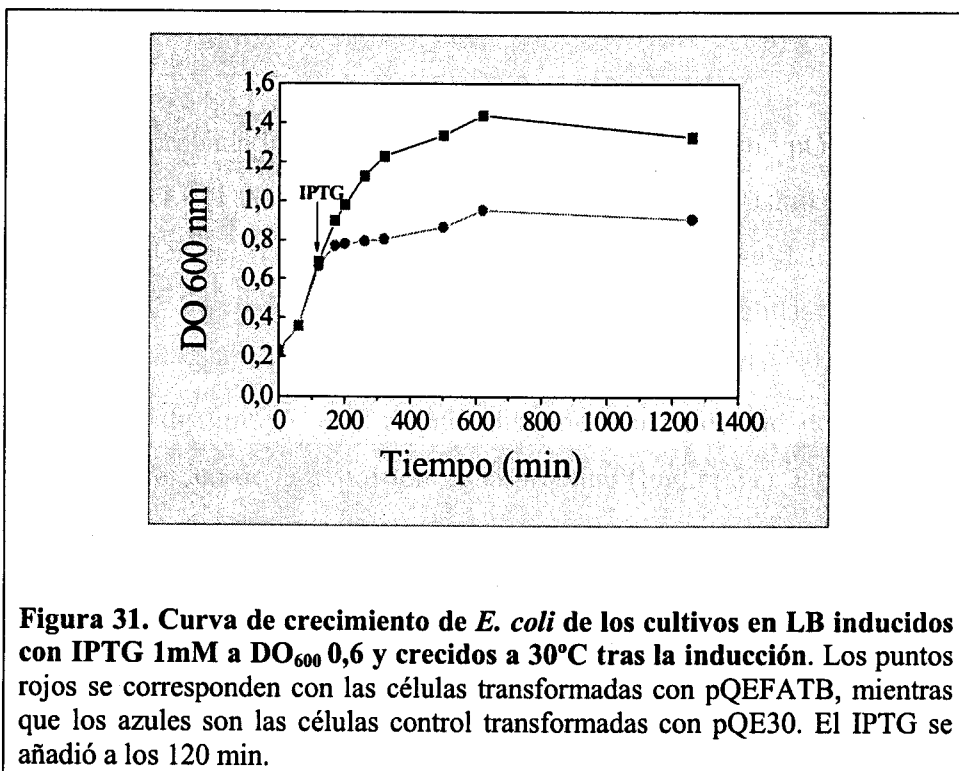
A diferencia de la falta de toxicidad encontrada en la expresión heteróloga de las tioesterasas de tipo FatA se han puesto anteriormente de manifiesto las dificultades que conlleva la expresión de tioesterasas de tipo FatB en *Escherichia coli* (Huynh *et al.*,2002; Hawkins *et al.*, 1998; Dormann *et al.*,1995).

5.2.1. Efecto tóxico derivado de la expresión de *HafatB*.

Tal y como se llevó a cabo con el gen *HafatA1*, *HafatB* fue clonado en el plásmido pQE-30 (Materiales y Métodos, Apartado 2.1.8). Para ello se diseñaron cebadores que además de eliminar el péptido señal incluían dianas de restricción para las enzimas SacI y KpnI en los extremos del fragmento obtenido mediante PCR (SacITioB1-2 y KpnITioB2; Materiales y Métodos, Apartado 2.1.2.1). La construcción así obtenida se denominó pQEFATB. Las células transformadas fueron *E. coli* BL21 (pREP4), tal y como se detalla en Materiales y Métodos, Apartado 2.1.8. Sin embargo al comprobar la secuencia de la construcción pQEFATB detectamos la presencia de una mutación en el triptófano W236, siendo sustituido por una arginina. Por ello se volvió a obtener el fragmento mediante PCR y esta vez el producto fue clonando en el vector pGEM-T Easy para comprobar la secuencia en una construcción que no permitiera la expresión del inserto (Materiales y Métodos, Apartado

2.1.7). Una vez comprobada la secuencia se subclonó en el plasmido pQE-30 y de nuevo se transformó BL21 (pREP4). Al secuenciar, se observó de nuevo el mismo cambio.

Al inducirse los cultivos con 1mM de IPTG, tal y como se detalla en Materiales y Métodos, apartado 2.1.6, se observó que el cultivo de las células transformadas con pQEFATB dejó de crecer. El cultivo se repitió manteniendo las condiciones salvo la temperatura, que se disminuyó a 30°C para disminuir la velocidad de crecimiento y así minimizar el efecto tóxico de la expresión de la proteína (Figura 31). Una vez recogidas las fracciones del lisado celular, se ensayaron no mostrando ninguna actividad. El experimento se repitió cambiando las condiciones de temperatura (37 y 30°C), concentración de IPTG (0,1-2 mM) y tiempo de inducción (DO₆₀₀ 0,6-0,9) obteniéndose resultados similares.



Para evitar el efecto tóxico de la proteína expresada probamos otro sistema de expresión. El plásmido pET3d ya había dado buenos resultados anteriormente con esta proteína (Dormann *et al.*, 1995), así que subclonamos en el sitio NcoI/Bpu1102I del mismo y transformamos BL21(DE3) pIZ227 tal y como se describe en Materiales y Métodos, Apartado 2.1.6. La construcción se mandó a secuenciar y se comprobó que el inserto presentaba la secuencia correcta y mantenía la pauta de lectura. La construcción se denominó pETFATB.

Matraces de LB y medio mínimo M9, suplementados con antibióticos (Materiales y Métodos, Apartado 2.1.8), se inocularon con células con la construcción pETFATB y células control con pET3d y se incubaron a 30 y 37°C. En el caso de los cultivos en medio LB se observó el mismo crecimiento a 30 y a 37°C, en ambos casos el IPTG (0,5 y 1 mM) no afectó al crecimiento, no se detectó actividad en los lisados. Con medio mínimo M9 las células crecieron muy lentamente, el IPTG tampoco afectó al crecimiento, y no se observó actividad.

Visto el efecto del medio mínimo, se probó con medio rico 2x YT, este medio, además de los antibióticos, se encuentra suplementado con 0,4% de glucosa, que inhibe aún más la expresión de la construcción. Los cultivos inoculados se crecieron a 30°C desde el principio y a DO₆₀₀ 0,6 se indujeron con 0,5 y 1 mM de IPTG. Tras cuatro horas de crecimiento, sin advertirse diferencias en el crecimiento entre el control y las células con pETFATB, se recogieron las células, se lisaron y se separaron las fases soluble e insoluble. Las células que habían sido inducidas con 0,5 mM de IPTG no presentaron actividad, sin embargo, como muestra la Figura 32, con 1mM de IPTG se indujo con éxito la proteína (HaFATB) dando actividad en la fracción correspondiente a las membranas celulares, con niveles hasta 46 veces mayores que los encontrados en el control. Como sustrato para la determinación de la actividad tioesterasa se utilizó 16:0-ACP.

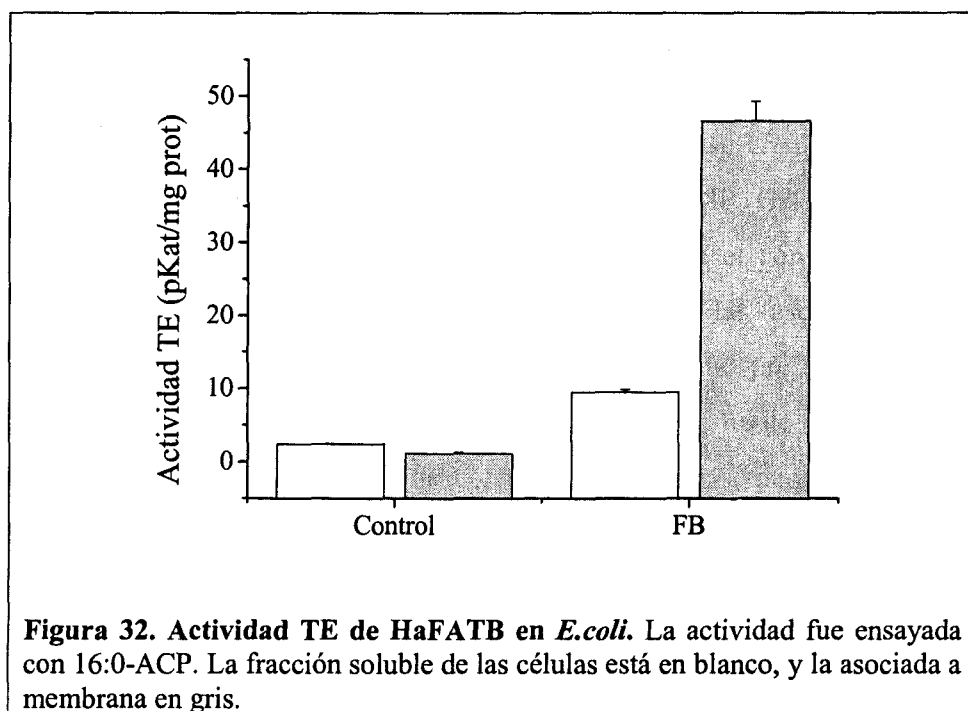
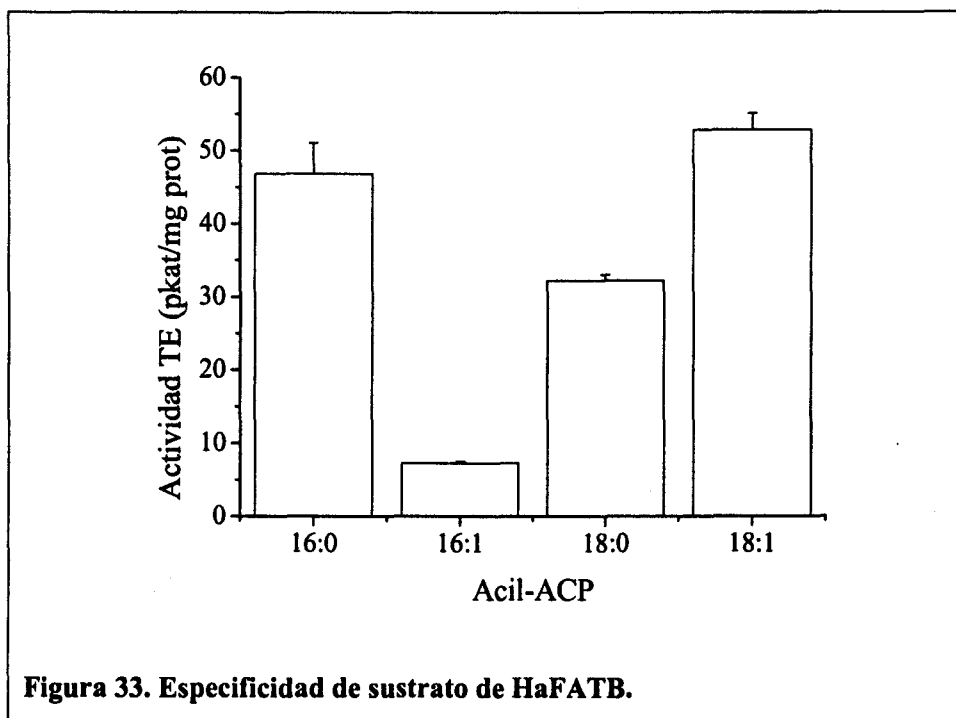


Figura 32. Actividad TE de HaFATB en *E.coli*. La actividad fue ensayada con 16:0-ACP. La fracción soluble de las células está en blanco, y la asociada a membrana en gris.

5.2.2. Medida de actividad de HaFATB.

La fracción de membrana se empleó en ensayos de actividad con: 16:0-ACP, 18:0-ACP, 16:1-ACP y 18:1-ACP. Las mayores actividades se obtuvieron con 18:1-ACP y 16:0-ACP, siendo la de 18:0-ACP ligeramente inferior, como ya se describiera para la tioesterasa de tipo FatB de *Arabidopsis thaliana* (Dörman *et al.*, 1995, Salas *et al.*, 2002) (Figura 33).



5.2.3. Modificación del perfil de ácidos grasos en *E. coli*.

Al analizar los lípidos totales de las células (Tabla 17) comprobamos que existían variaciones en el contenido de los ácidos grasos. Así aumentan el 16:1 y el 18:0, mientras que 18:1 y 19:0 Δ disminuyen.

Tabla 17: Composición de ácidos grasos de los lípidos totales de *E. coli* que expresan HaFATB.

	Ácidos grasos					
	16:0	16:1	17:0 Δ	18:0	18:1	19:0 Δ
Control ^a	32,2	24,2	3,4	1,7	34,2	2,4
HaFATB	32,3	37,9	3,7	3,7	20,7	1,6

^a Control, células transformadas con pQE30.

5.3. Actividad tioesterasa en semillas de girasol de 15 DDF.

La actividad tioesterasa en la semilla de girasol fue determinada tanto en el extracto crudo como en la fracción soluble del mismo y la fracción de membrana (Materiales y Métodos, Apartado 2.3.1.1). La actividad tioesterasa de la semilla claramente se encuentra en la fase soluble de las células, la fracción membranosa apenas presentó actividad, y los valores para los distintos sustratos de la fracción soluble y del extracto crudo coincidieron. En la Figura 34 se muestran las actividades tioesterasa de la fracción soluble (blanco) y del extracto (negro), la mayor actividad se corresponde con el 18:1-ACP, seguido por el 16:1-ACP y los saturados, en igual medida.

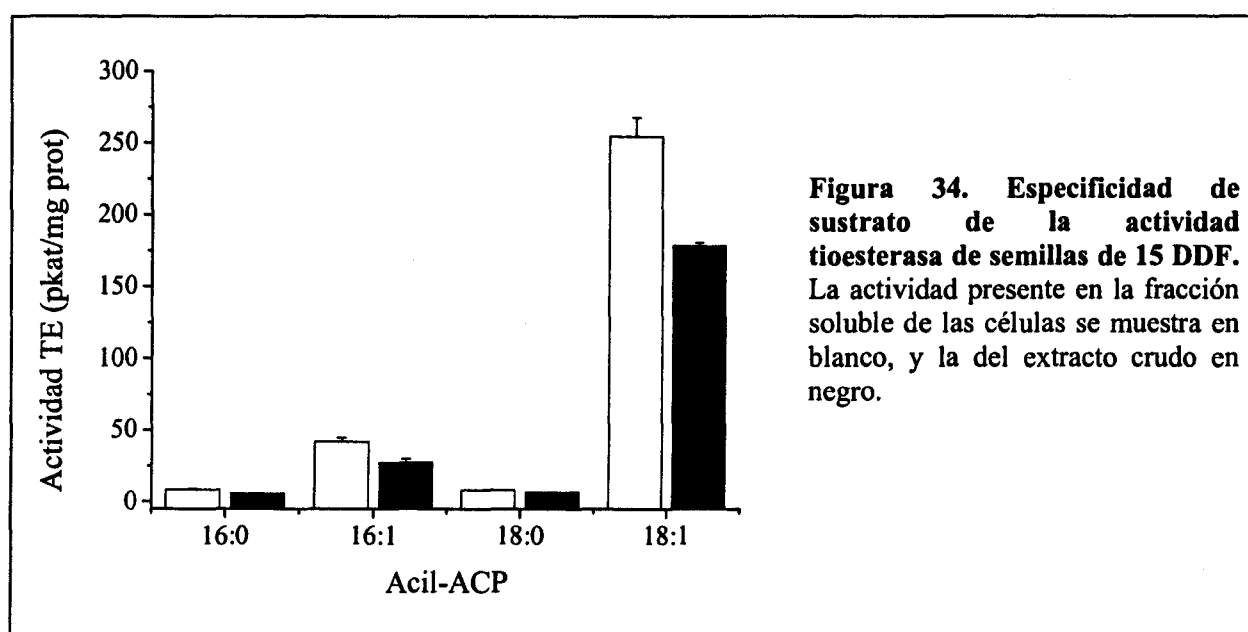


Figura 34. Especificidad de sustrato de la actividad tioesterasa de semillas de 15 DDF. La actividad presente en la fracción soluble de las células se muestra en blanco, y la del extracto crudo en negro.

6. DISCUSIÓN.

El aislamiento de un gen del tipo *fatA* (*HafatA1*) y otro del tipo *fatB* (*HafatB*) a partir de cDNA de semillas en desarrollo de girasol confirma la presencia de ambos tipos de tioesterasas tanto en la línea control RHA-274, como en los mutantes alto-saturado CAS-3, CAS-5 y CAS-12.

El estudio de los niveles de expresión de ambos genes, muestra cómo la expresión de estos genes se encuentra ligada a tejidos donde se produce una síntesis más activa de ácidos grasos, más concretamente en la semilla, alcanzando un máximo en la expresión en el momento de máxima síntesis de ácidos grasos (16 DDF).

Estos estudios, junto con los resultados de los ensayos de sus actividades sobre acil-ACPs de diferentes longitudes y desaturaciones llevan a determinar la importancia de cada enzima en el perfil de ácidos grasos de la semilla de girasol, así como su papel en el fenotipo de los mutantes alto-saturado. Al estudiar las actividades de ambas tioesterasas observamos que HaFATA1 es una proteína soluble, con un perfil típico de tioesterasas del tipo FatA, presentando una mayor afinidad por ácidos grasos insaturados, especialmente ácido oleico (18:1), y mostrando una menor actividad hacia los ácidos grasos saturados, no pareciendo influir el número de carbonos en la afinidad de dicha proteína por ácidos grasos saturados. A diferencia de HaFATA1, HaFATB es una proteína asociada a membrana, con una buena actividad con sustratos saturados, mientras que en los insaturados la afinidad parece depender del número de carbonos, siendo la afinidad por 18:1 similar a la de 16:0, mientras que la actividad por 16:1 es considerablemente menor.

La expresión de ambos tipos de tioesterasas ha sido descrita en otras plantas, como *Cuphea hookeriana* (Dörmann *et al.* 1993), *Arabidopsis thaliana* (Dörmann *et al.* 1993), *Garcinia mangostana* (Hawkins and Kridl, 1998). En ocasiones una mayor actividad FatA llega a enmascarar la actividad FatB, como sucede en *Arabidopsis* (Dormann *et al.* 1995), pudiendo presentarse también como dos actividades perfectamente separadas, como en el caso del algodón (Huynh *et al.* 2002). En los extractos de semilla de 15 DDF la actividad predominante coincide con la actividad de HaFATA1, mostrándose una clara preferencia por los sustratos insaturados, principalmente 18:1. Estos resultados, junto con los niveles de expresión de los respectivos genes obtenidos para una línea control, donde los niveles de transcrito para *HafatA1* son 65 veces los de *HafatB*, indican que la actividad tioesterasa predominante en semillas de girasol es del tipo FatA. Todo ello apunta a que la composición de ácidos grasos presente en las semillas de líneas normales de girasol se debe, en gran parte,

a los niveles de actividad de las enzimas KASII, SAD y FatA, teniendo una menor importancia la actividad FatB.

Los valores obtenidos de V_{\max} y k_{cat} de la actividad FatA de girasol para el ácido oleico son significativamente mayores que los correspondientes para otras FatA (Dörmann *et al.*, 1994; Salas y Ohlrogge, 2002), así, desde un punto de vista aplicado, líneas que sobreexpresen esta tioesterasa pueden constituir un magnífico fondo genético en el aislamiento de mutantes con niveles bajos de ácidos grasos saturados y/o altos niveles de ácido oleico.

Al caracterizar bioquímicamente los mutantes alto-saturados se observaron modificaciones en las actividades tioesterasa, como ya se comentó en la Introducción, Apartado 8.3. El análisis de las secuencias de los alelos clonados de los genes *HaFatA1* y *HaFatB* presentes en los mutantes alto-saturados, a falta de un segundo gen de tipo FatA, presente en otras especies, pone de manifiesto la falta de mutaciones en el gen estructural que justifiquen las diferencias observadas anteriormente respecto a la línea control RHA-274. Sin embargo, el estudio de los niveles de expresión de ambos genes mediante el uso de PCR cuantitativa revela la existencia de diferencias respecto a RHA-274. Ambos mutantes, CAS-3 y CAS-5, mantienen niveles de expresión elevados una vez pasados los 16 DDF, cuando en RHA-274 apenas se observa expresión, así como una mayor expresión de actividades tioesterasas en general, sobretodo en el caso de CAS-5. Asimismo, CAS-3 muestra mayores niveles de *HafatA1* que RHA-274, si bien la especificidad de esta tioesterasa es predominantemente el 18:1, también presenta actividad por ácidos grasos saturados. Así, aunque la actividad de la tioesterasa de tipo FatA de girasol por ácidos grasos saturados sea minoritaria, el incremento en el plastidio de ácido esteárico (18:0) originado por la disminución de la actividad SAD, junto con una actividad tioesterasa mantenida más tiempo durante la formación de la semilla, pueden justificar el alto contenido en ácido esteárico de las semillas. En el caso de CAS-5, los niveles de expresión de ambas tioesterasas son muy superiores a los de la línea control, en concreto los de *HafatB*, como muestra la razón *HafatA1/HafatB*. Como muestran los ensayos de actividad de *HafatB*, esta tioesterasa presenta una gran afinidad por ácido palmítico (16:0), así el exceso de 16:0 en esta línea mutante, originado por el bloqueo de la ruta de biosíntesis a nivel de la enzima KASII, es hidrolizado y exportado fuera del plastidio gracias al incremento de ambas tioesterasas, especialmente la del tipo FatB.

Como se ha mostrado en la Figura 20 las acil-ACP tioesterasas se dividen claramente en dos grupos, las de tipo FatA, y las de tipo FatB, sin embargo hasta el momento no se había encontrado ningún tipo de relación con otros grupos filogenéticos. Llama además la atención la falta de proteínas homólogas en el grupo de las cianobacterias, íntimamente relacionado con el origen del plastidio/cloroplasto presente en células vegetales. La disponibilidad de secuencias genómicas completas de organismos procarióticos nos ha permitido localizar proteínas homólogas a las acil-ACP tioesterasas de plantas dentro de algunos grupos de Eubacterias. Estas proteínas procariotas, no presentes en todos los grupos de eucariotas, presentan gran homología con las FatB de plantas, lo que sugiere que un posible ancestro de las tioesterasas plastidiales tuviera una especificidad del tipo FatB, como ya especulara Jones *et al.* (1995). Las secuencias procariotas no presentan el péptido señal, que habrá sido incorporado posteriormente para el direccionamiento al interior del plastidio, pero conservan el residuo catalítico de histidina, así como los aminoácidos adyacentes. Además, las secuencias correspondientes a Eubacterias de la subdivisión delta (δ) presentan también el residuo de cisteína así como la distancia entre éste y la histidina catalítica. La presencia de proteínas del tipo de las tioesterasas en Proteobacteria de la subdivisión δ (géneros *Geobacter*, *Desulfovibrio* y *Bdellovibrio*) respaldan las teorías de endosimbiosis acerca del origen de las células eucariotas como resultado de la simbiosis entre este tipo de bacterias con arqueobacterias (Moreira y López-García, 1998; Horiike *et al.*, 2002).

La conservación de la organización exón-intrón en genes homólogos es suficientemente alta como para poder determinar la evolución de los genes (Hardison, 1996), así la evolución de la estructura de los intrones de las distintas tioesterasas puede servir para determinar un modelo evolutivo de las clases de tioesterasas. La Figura 35 resume la Figura 23, así como las Tablas 12 y 13, e incluye el resto de secuencias genómicas de acil-ACP tioesterasas de plantas disponibles por el momento en las bases de datos. Los resultados del estudio de las secuencias genómicas, ganancia, pérdida y localización de intrones, apoya la teoría de la duplicación en un gen ancestral resultando dos tipos de tioesterasas, así como ya ocurriera para otros genes (Liaud *et al.* 1990; Frugoli *et al.* 1998). De esta manera observamos cómo se conserva la localización de los intrones en los dos tipos de tioesterasas, incluso en los casos de *fatB4* de *Cuphea lanceolata* (Cl) y *fatB* de *Oryza sativa* (Os) una delección o inserción en el exón IV no afectan a la organización exón-intrón.

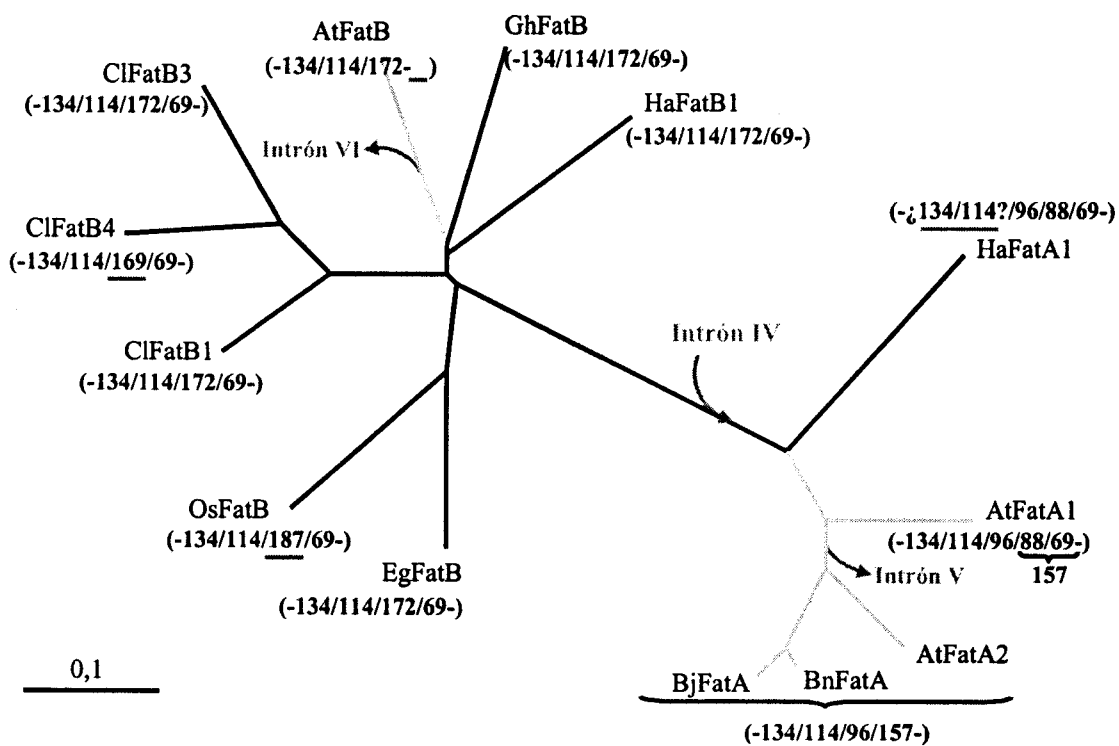


Figura 35. Modelo de evolución de la estructura de intrones de las dos clases de tioesterasas. *Arabidopsis thaliana* (At) (At3g25110 *fatA1*, At4g13050 *fatA2*, At1g08510 *fatB*), *Brassica napus* (Bn) (X87842 *fatA*), *Brassica juncea* (Bj) (AJ294419 *fatA*), *Cuphea lanceolata* (Cl) (AJ131739 *fatB1*, AJ131740 *fatB3*, AJ131741 *fatB4*), *Elaeis guineensis* (Eg) (AF430248 *fatB*), *Gossypium hirsutum* (Gh) (AF076535 *fatB*), *Helianthus annuus* (Ha), *Oryza sativa* (Os) (BAA83582 *fatB*). Las cifras en azul indican la longitud de los exones (excepto los exteriores), las ramas del árbol en verde se corresponden a la familia *Brassicaceae*.

Tanto la pérdida, como la incorporación de intrones, son mecanismos relativamente comunes durante la evolución génica (Boudet *et al.*, 2001; Lynch, 2002; Rogozin *et al.* 2003). Así a partir de un ancestro con 5 intrones parecido a FatB, se produjo la duplicación, generando los dos tipos de tioesterasas. Posteriormente la clase de tioesterasas del tipo FatA ganarían el intrón número cuatro (Figura 35). El mecanismo de ganancia de intrones no está del todo descrito, si bien la pérdida viene dada por la retrotranscripción y recombinación homóloga entre un cDNA y la región de DNA genómico (Clegg *et al.* 1997), la ganancia pudiera ser bien por duplicación de un intrón preexistente (Tarrío *et al.* 1998), o por inserción de transposones (Nouaud *et al.* 1999). La pérdida de intrones en la familia de las *Brassicaceae* pudiera responder a la asociación de la pérdida de intrones y la disminución del tamaño del genoma, siendo característico de genomas de pequeño tamaño como es el caso de *Arabidopsis*.

Los estudios anteriormente llevados a cabo para la localización de residuos catalíticos, residuos implicados en el reconocimiento del sustrato y dominios estructurales apoyan los modelos propuestos de estructura terciaria y la relación estructural de las acil-ACP tioesterasas de plantas con aquellas incluidas en la familia estructural de proteínas similares a 4HBT. Todos los mutantes estructurales obtenidos con modificaciones de la afinidad se localizan en el modelo propuesto sobre la pared formada por las hojas plegadas β y la α -hélice de mayor tamaño que formaban el bolsillo que acoge al grupo acilo del acil-ACP. Así mismo, la zona de entrada al mismo se encuentra rodeada por residuos conservados cargados positivamente, implicados en el anclaje de la molécula de ACP. Los experimentos de proteínas quiméricas que inicialmente mostraban resultados discordantes, Yuan *et al.*, (1995) y Facciotti *et al.* (1998) encontraron la región carboxílica de la proteína como responsable de la especificidad, mientras que los resultados de Salas y Ohlrogge (2002) apuntaron hacia la zona amino-terminal, encajan en el modelo propuesto, ambos resultados delimitan una zona común que coincide con las estructuras de hoja plegada β de la primera región estructural definida. Por otra parte, los residuos catalíticos se encuentran localizados en el mismo lugar que la 4-hidroxibenzoil-CoA tioesterasa de *Pseudomonas* presenta su sitio activo. Todos estos datos apoyan las estructuras propuestas.

La utilización de los modelos propuestos para el diseño de mutagénesis dirigidas permitirá ampliar el rango de actividades de las acil-ACP tioesterasas para su uso biotecnológico.

**BLOQUE II. SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
LAS LÍNEAS CAS-18 Y CAS-25.**

1. OBTENCIÓN DE NUEVAS LÍNEAS DE GIRASOL POR COMBINACIÓN DE LOS CARACTERES PRESENTES EN LAS LÍNEAS ALTO-SATURADO CAS-3 Y CAS-5.

Los estudios genéticos llevados a cabo en la línea alto-esteárico CAS-3 y en las alto-palmitico CAS-5 y CAS-12 han puesto de manifiesto la existencia de 2 (e1 y e2) y 3 (p1, p2 y p3) alelos mutantes respectivamente en la herencia de dichos fenotipos (Pérez-Vich *et al.*, 1999 a y b). Asimismo, estudios bioquímicos han señalado a las actividades SAD, FASII y acil-ACP tioesterasa como las implicadas en dichas mutaciones (Martínez-Force *et al.*, 1999; Cantisán *et al.*, 2000). Con el ánimo de recombinar estos alelos en nuevas líneas con fenotipos novedosos y cuyos aceites presenten nuevas características se ha llevado a cabo un programa de selección a partir de cruces CAS-5xCAS-3 y CAS-12xCAS-3. En la Figura 36 se representa una F2 de un cruce CAS-5xCAS-3 en función de sus contenido en ácidos palmítico, palmitoleico y esteárico.

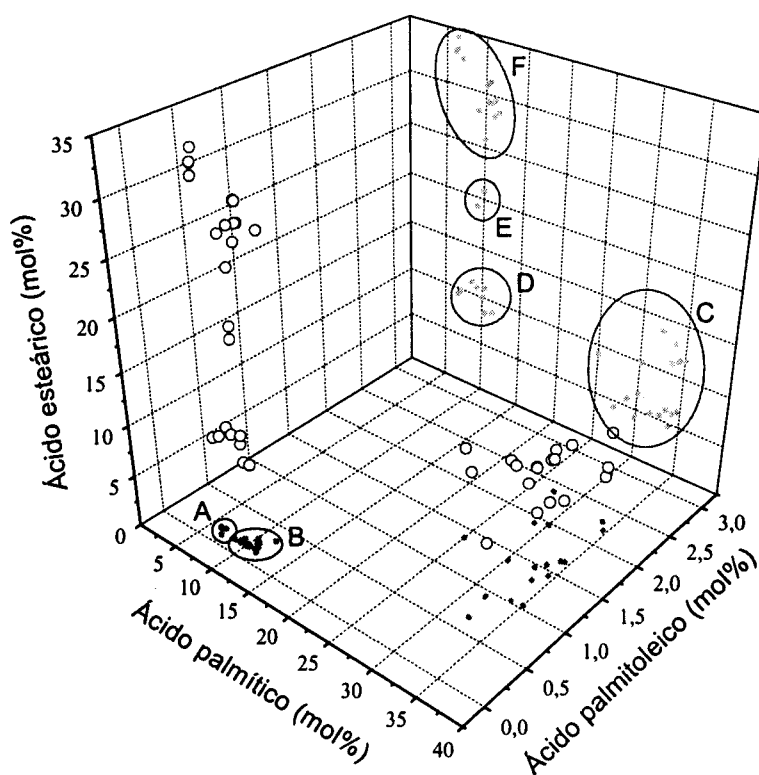


Figura 36. F2 de un cruce CAS-5xCAS-3 en función de sus contenido en ácidos palmítico, palmitoleico y esteárico. ○ valores de cada semilla, ● proyección en el eje de las x, * proyección en el eje de las y.

Dentro de la segregación observada se establecieron diferentes grupos de semillas. En función del contenido en ácido palmítico se distinguieron los grupos A, B y C, bajo, medio y alto contenido en 16:0. A su vez dentro de los grupos A y B se agruparon aquellas semillas que presentaban medio (D), alto (E) y muy alto (F) contenido en ácido esteárico. Dentro del grupo de semillas con niveles altos de ácido palmítico se distinguían dos subgrupos dependiendo de si su contenido en ácido esteárico era bajo o medio; además estos grupos de semillas diferían en sus valores de ácido palmitoleico. Aquellas semillas alto-palmítico con contenido medio en esteárico presentaban contenidos menores de palmitoleico que aquellas que tenían valores bajos de esteárico. En la Tabla 18 se muestra la distribución de estos grupos en uno de los cruces CAS-5xCAS-3 analizados.

Tabla 18. Distribución de los distintos grupos establecidos en la F2 del cruce CAS-5xCAS-3 9770933-1.

Grupo	Fenotipo	Composición (mol%) Media±DS			Nº de semillas
		16:0	18:0	16:1	
A	Bajo-palmítico	6,6±0,4			25
B	Medio-palmítico	10,4±1,0			52
C	Alto-palmítico (Ap)	31,8±2,7			19
D (A+B)	Medio-esteárico		10,2±1,6		18
E (A+B)	Alto-esteárico		20,3±1,0		3
F (A+B)	Muy alto-esteárico		29,4±3,5		56
G (C)	Ap Bajo-esteárico		5,7±0,9	1,9±0,3	11
H (C)	Ap Medio-esteárico		11,4±1,5	1,2±0,3	8

Partiendo de semillas del tipo H de cruces CAS-5xCAS-3 y CAS-12xCAS-3 se seleccionaron después de seis generaciones los mutantes alto-palmítico bajo-palmitoleico CAS-18 y CAS-25 respectivamente. El mutante CAS-25 en fondo alto-oleico. Asimismo, se intentó la selección de otros dos fenotipos, el mutantes CAS-23 con valores medios de palmítico y alto contenido en esteárico (subgrupo BE), y el mutante p1p1P2P2P3P3 con bajo contenido en ácidos grasos saturados pero niveles altos de ácido linoleico a partir de cruces de la líneas CAS-5 con una línea normal de girasol. Sin embargo, tras siete generaciones seleccionando las plantas con los caracteres deseados, se desistió en la obtención de las líneas CAS-23 y p1p1P2P2P3P3, ya que resultó imposible fijar dichos fenotipos, produciéndose segregación de los caracteres en todas las generaciones.

2. SELECCIÓN DE LAS LÍNEAS CAS-18 Y CAS-25.

Una de las características más relevantes de los mutantes alto-palmitico de girasol es la acumulación de ácidos grasos inusuales por la desaturación del ácido palmítico por la estearato desaturasa. Con la finalidad de disminuir los niveles de estos ácidos grasos inusuales manteniendo niveles altos de ácido palmítico, se seleccionaron semillas procedentes de cruces CAS-5xCAS-3 y CAS-12xCAS-3 que presentaran estas características. La selección se llevó a cabo mediante el análisis de media semilla (Materiales y Métodos, Apartado 2.2.1.1.) y por autofecundación de aquellas seleccionadas se obtuvieron finalmente las líneas CAS-18 y CAS25, esta última en fondo alto-oleico.

2.1. Composición de ácidos grasos de la semilla.

Como resultado de los cruces se obtuvieron fenotipos similares a CAS-5 y CAS-12 con disminución en el contenido de los ácidos palmitoleico (16:1) y asclépico (18:1 Δ^1), así como la ausencia de palmitolinoleico (16:2), aún manteniendo alto el valor del ácido palmítico (16:0), e incluso, aumentando el contenido en ácido esteárico (18:0) (Tabla 19). En el caso de CAS-18, procedente del cruce CAS-5xCAS-3, la suma de los ácidos palmitoleico y asclépico apenas supera el 3%, comparado con el 8,5% de la suma en CAS-5, y el ácido palmitolinoleico desaparece. Los valores de palmítico se mantienen y se aumenta el esteárico hasta alcanzar más del 10% a expensas del oleico. CAS-25, descendiente del cruce CAS-12xCAS-3, reduce a más de la mitad la suma de los ácidos palmitoleico y asclépico que se alcanzaba en CAS-12, siendo más acentuado el descenso de ácido palmitoleico (de un 7,6 a un 2,1%). Al igual que en CAS-18, mantiene el valor de ácido palmítico y aumenta el de ácido esteárico (6,8%). El ácido linoleico (18:2) aumenta de un 3,0 a un 10,2%.

Tabla 19. Composición de ácidos grasos del aceite de las líneas CAS-18 y CAS-25 así como de sus parentales CAS-3, CAS-5 y CAS-12, y de la línea de fenotipo silvestre RHA-274, en condiciones normales de cultivo (cámara a 25/15°C).

Línea	Composición de ácidos grasos (mol %)								
	16:0	16:1	16:2	18:0	18:1	18:1 Δ^{11}	18:2	20:0	22:0
RHA-274	6,4	- ^a	-	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	4,3	1,5	4,2	4,0	4,0	50,1	0,5	1,2
CAS-12	27,8	7,6	-	1,7	52,7	4,0	4,4	0,2	1,3
CAS-18	33,2	1,4	-	11,4	4,0	1,4	45,8	1,2	1,5
CAS-25	30,1	2,1	-	6,8	45,8	2,3	10,2	1,0	1,6

^a: <0,5%; desviación estándar <2,5% de la media.

2.2. Efecto de la temperatura.

La composición de ácidos grasos de los lípidos de la semilla viene determinada fundamentalmente por el genotipo de la planta, sin embargo, factores ambientales como la temperatura también afectan a la composición de ácidos grasos de un aceite. En una línea normal de girasol, los porcentajes del par oleico/linoleico se invierten en respuesta a la temperatura, así a baja temperatura el contenido en ácido linoleico aumenta en respuesta a la inducción de la ODS, aumentando así la fluidez de las membranas, siendo el ácido oleico el sustrato de la desaturación. En las líneas alto-oleico de girasol la actividad ODS está alterada, por lo tanto el efecto de la temperatura en el valor oleico/linoleico es mínimo (Garcés y Mancha, 1991).

Por otra parte, los mutantes alto-saturado, presentan una particular respuesta a la temperatura. El incremento de la misma produce una disminución en la cantidad de 18:0 en líneas normales de girasol y mutantes medio-esteárico (Lajara *et al.*, 1990, Martínez-Force *et al.*, 1998), sin embargo, en el mutante CAS-3 el bloqueo de la ruta a nivel de la SAD produce una acumulación de 18:0 que no se ve afectada por la temperatura, manteniendo valores similares a alta o baja temperatura.

En el caso de CAS-5, con la KASII alterada, el contenido de palmítico es elevado independientemente de la temperatura, y para compensar la rigidez que este ácido graso confiere a las membranas, aumenta el contenido en 18:2, lo que se traduce en una gran estabilidad de su composición en ácidos grasos frente a la temperatura (Martínez-Force *et al.*, 1998).

Para determinar hasta que punto pudiera afectar la temperatura de cultivo sobre la composición de ácidos grasos de los mutantes CAS-18 y CAS-25, estos se crecieron a temperatura baja (20/10°C), media (25/15°C) y alta (30/20°C), junto con la planta control, RHA-274 (Tabla 20).

Tabla 20. Composición de ácidos grasos de las semillas de CAS-18 y CAS-25, cultivadas a baja (20/10°C), media (25/15°C) y alta (30/20°C) temperatura.

Línea	Temperatura	16:0	16:1	18:0	18:1	18:1 Δ^1	18:2	18:2/18:1
RHA-274	20/10°C	5,5	- ^a	5,4	33,7	-	54,1	1,6
	30/20°C	5,0	-	3,2	55,9	-	34,6	0,6
CAS-18	20/10°C	33,8	2,0	9,3	4,8	1,6	48,5	10,0
	25/15°C	32,5	1,2	9,8	4,8	1,8	49,2	10,2
	30/20°C	32,0	2,1	7,8	4,8	2,0	51,2	10,6
CAS-25	20/10°C	30,3	2,5	6,7	49,2	1,8	9,5	0,2
	25/15°C	31,1	2,3	7,1	48,1	2,6	8,9	0,2
	30/20°C	30,1	2,9	6,1	51,7	2,5	6,7	0,1

^a: <0,5%; desviación estándar <10% de la media.

En la línea control RHA-274 se aprecia un claro efecto de la temperatura en la razón 18:2/18:1, produciéndose un incremento de 18:1 a alta temperatura a expensas del 18:0 y el 18:2. Sin embargo, en los mutantes alto-saturado CAS-18 y CAS-25 la respuesta a la temperatura es casi nula, tal y como ocurría en los mutantes CAS-5 y CAS-3. La razón 18:2/18:1 no se ve afectada y los porcentajes de los ácidos grasos saturados tampoco varían considerablemente.

2.3. Estudio de la composición de los lípidos neutros del aceite.

2.3.1. Composición de los ácidos grasos de triglicéridos (TAG) y diglicéridos (DAG).

A partir del aceite, obtenido como se describe en Materiales y Métodos, Apartado 2.2.1.2, se purificaron los TAG y DAG, Apartado 2.2.1.5.1, y se obtuvieron los ésteres metílicos de sus ácidos grasos, Apartado 2.2.1.3.

La composición total de ácidos grasos de los TAG es muy similar a la de los lípidos totales, dado que los TAG constituyen prácticamente el 94% de los lípidos de la semilla

(Garcés *et al.*, 1989). Así se observa el alto contenido en ácidos grasos saturados a la vez que se mantienen bajos los valores de 16:1 y 18:1 Δ^{11} , como ya se viera en los lípidos totales (Tabla 21). En el análisis de las distintas especies de triglicéridos de los mismos se observará la repercusión de estos cambios respecto a los parentales.

En cuanto a los DAG, el contenido en saturados, 16:0 y 18:0, es elevado, aunque no tan alto como en los TAG, posiblemente debido a que los ácidos grasos saturados tienden a excluirse de la posición *sn*-2 de manera que los DAG sólo tienen la posición *sn*-1 para su esterificación con dichos ácidos. Para comprobar su exclusión de la posición *sn*-2 se recurrirá al análisis posicional de los TAG, como se verá más adelante. Así mismo se observa un incremento en el contenido de ácidos grasos insaturados respecto a los TAG y los lípidos totales.

Tabla 21. Composición de ácidos grasos de los TAG de las líneas CAS-18 y CAS-25.

Línea	Lípido	Composición de ácidos grasos de TAG (mol%)						
		16:0	16:1	16:2	18:0	18:1	18:1 Δ^{11}	18:2
CAS-18	TAG	33,6	1,4	-	11,0	5,2	1,2	47,6
	DAG	28,1	1,3	-	8,2	8,8	1,1	52,6
CAS-25	TAG	31,9	2,8	-	5,0	52,3	2,4	5,6
	DAG	16,6	1,7	-	3,0	66,0	3,9	8,8

^a: <0,5% ; desviación estándar <10% de la media.

2.3.2. Análisis de especies de TAG por cromatografía gaseosa (GLC).

Las alteraciones en la composición de ácidos grasos de las líneas mutantes de girasol se reflejan en su perfil de triglicéridos (Fernández-Moya *et al.*, 2000). La resolución de las especies de TAGs en GLC presenta una gran sensibilidad y buena distribución de los picos aparte de no tener los problemas de solubilidad de los TAG saturados como ocurre con los solventes en la cromatografía líquida.

Los tiempos de retención de las especies de TAG aumentan con la longitud de las cadenas carbonadas y con el número de insaturaciones de los ácidos grasos que las constituyen. En algunos casos, cuando dos TAG tienen tiempos de retención similares y la cantidad de uno de ellos es al menos seis veces mayor que la del otro no es posible separarlos bien, en estos casos el valor que se representa en las tablas es la suma de ambos.

En la Figura 37 y la Tabla 22, se presentan la composición de las distintas especies de TAGs de las líneas mutantes: CAS-5, CAS-18, CAS-12, CAS-25 y CAS-3. Para nombrar las distintas especies de TAG, tomamos las iniciales de los ácidos grasos que las forman y las colocamos en el orden en el que mayoritariamente se encuentran en esa especie, por ejemplo, en las especies disaturadas colocamos el ácido graso insaturado en el medio. Las principales diferencias vienen por el aumento de esteárico (E), y la disminución de palmitoleico (Po) y ascléptico (As), así como la desaparición de palmitolinoleico (PI), en las líneas CAS-18 y CAS-25.

Así en CAS-18, respecto a CAS-5, encontramos la aparición de **ELE** (3,1%), un incremento en **PLE** (4,0-14,5%) y **ELL** (4,9-8,75%), y la disminución de **PPoL** (14,0-2,1%), **PAsL** (6,9-2,5%), **PoLL** (3,7-0,3%) y **AsLL** (5,6-0,4%). Las especies con palmitolinoleico han desaparecido en la línea CAS-18. Aparte encontramos un descenso en trilinoleína, **LLL** (13,6-4,4%), y un aumento en las especies que llevan dos palmíticos y un insaturado: **PLP** (14,5-25,1%), y **POP** (0,8-2,2%).

En CAS-25, respecto a CAS-12, vemos un fenómeno similar, solo que con fondo alto-oleico. Aparece **EOE** (1,7%), y aumentan **POE** (2,4-8,3%) y **EOO** (2,5-7,7%). Disminuyen, **PPoO** (11,5-5,5%), **POAs** (5,6-3,4) y **OOAs** (3,9-2,8%). Además encontramos un descenso en **OOO** (6,9-4,1%).

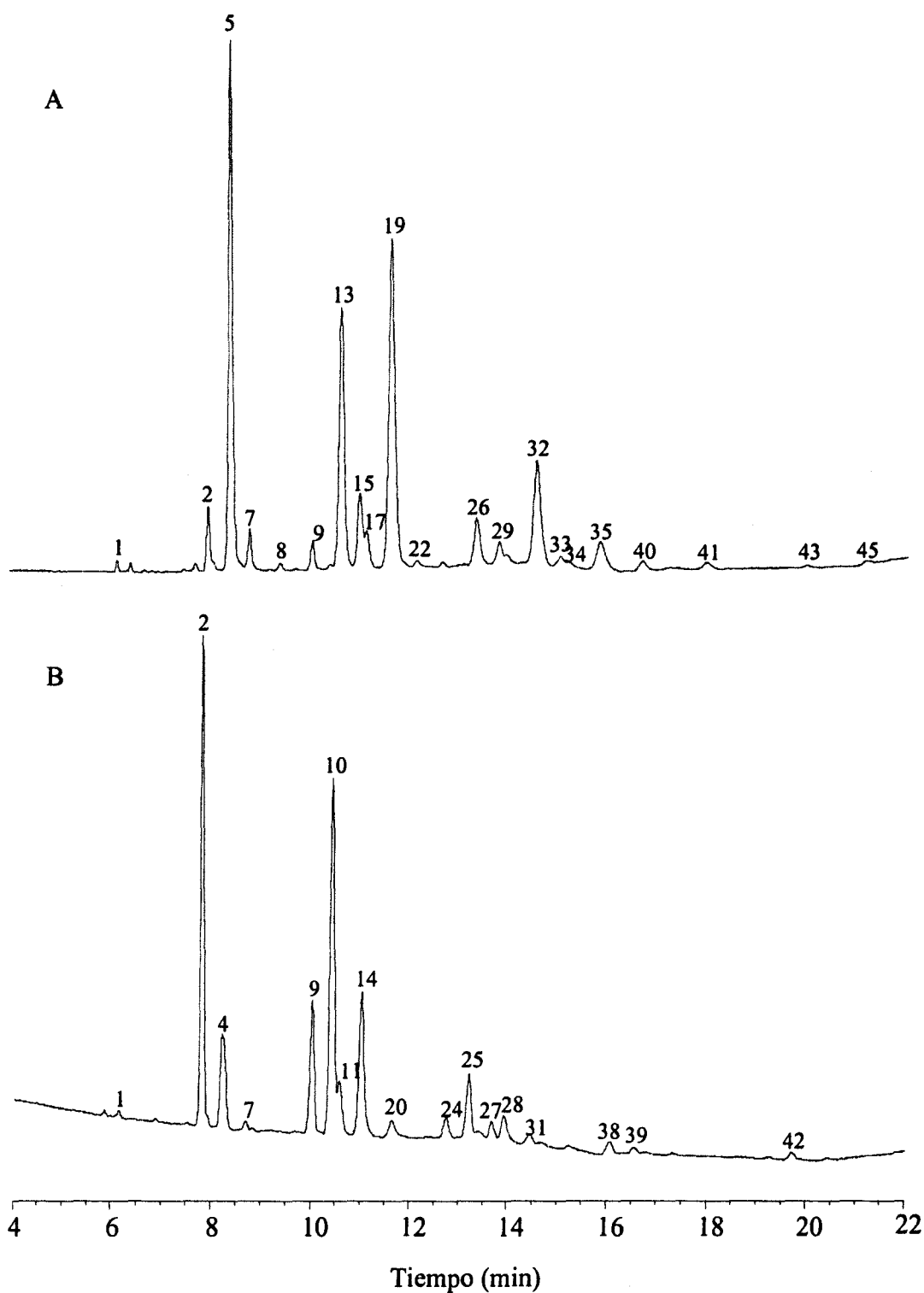


Figura 37. Cromatogramas de GLC de triglicéridos purificados de las líneas CAS-18 (A) y CAS-25 (B). El número de identificación (N.I.) se asignó dependiendo del tiempo de retención de todos los picos analizados en este estudio (Tabla 22).

Tabla 22. Composición de las especies de triglicéridos de las líneas CAS-5, CAS-18, CAS-12, CAS-25 y CAS-3.

N.I.		CAS-5	CAS-18	CAS-12	CAS-25	CAS-3
1	PPoP	0,2	0,3	0,9	0,2	-
2	POP	0,8	2,2	19,4	20,2	-
3	PAsP	0,2	-	^a	^a	-
4	PPoO	-	-	11,5	5,5	-
5	PLP	14,5	25,1	^a	^a	0,8
6	PoPoO	-	-	1,5	-	-
7	PPoL	4,0	2,1	^a	0,3	-
8	PPIL	1,7	0,5	-	-	-
9	POE	-	1,1	2,4	8,3	2,1
10	POO	-	-	30,3	30,9	1,0
11	POAs	-	-	5,6	3,4	-
12	PoOE	-	-	^a	^a	-
13	PLE	4,0	14,5	-	-	6,8
14	PoOO	-	-	10,1	9,2	-
15	POL	3,9	3,8	^a	^a	3,3
16	PoOAs	-	-	^a	^a	-
17	PAsL	6,9	2,5	-	-	-
18	PoLE	^a	^a	-	-	-
19	PLL	28,9	26,2	-	-	4,8
20	PoOL	^a	^a	0,8	0,9	-
21	PoAsL	^a	^a	-	-	-
22	PoLL	3,7	0,3	-	-	-
23	PILL	1,1	-	-	-	-
24	EOE	-	-	-	1,7	3,6
25	EOO	-	-	2,5	7,7	4,1
26	ELE	-	3,1	-	-	12,0
27	OOO	-	-	6,9	4,1	^a
28	OOAs	-	-	3,9	2,8	-
29	EOL	0,5	1,1	-	-	14,6
30	EAsL	0,8	-	-	-	-
31	OOL	-	-	1,3	1,5	2,7
32	ELL	4,9	8,7	-	-	24,6
33	OLL	2,8	0,6	-	-	6,5
34	AsLL	5,6	0,4	-	-	-
35	LLL	13,6	4,4	-	-	7,6
36	ELA	-	-	-	-	1,1
37	OLA	-	-	-	-	0,8
38	POB	-	-	1,3	1,4	-
39	OOA	-	-	-	0,8	-
40	PLB	0,9	1,5	-	-	-
41	LLA	-	0,6	-	-	1,2
42	OOB	-	-	1,5	1,3	-
43	ELB	-	0,4	-	-	0,7
44	OLB	-	-	-	-	0,8
45	LLB	1,0	0,6	-	-	0,9

-: no detectado. ^a: no separados, e incluidos en el valor anterior. Desviación estándar <10% del valor medio.

2.3.3. Estudio de las posiciones *sn*-2 y *sn*-(1+3).

La calidad nutricional de un aceite viene dada tanto por su composición de ácidos grasos, como por la distribución de estos en los TAG, ya que sólo los ácidos grasos saturados de la posición *sn*-2 son absorbidos eficientemente por la pared intestinal después de sufrir lipólisis (Small, 1991). Los ácidos grasos saturados de las posiciones *sn*-(1+3) forman sales insolubles que son excretadas. Por lo tanto, un aspecto importante de la calidad de un aceite es su contenido de ácidos grasos saturados en la posición *sn*-2 de los TAG, ya que estos, excluyendo al ácido esteárico, están íntimamente relacionados con enfermedades cardiovasculares. Por ello se llevó a cabo el análisis posicional de los ácidos grasos de los TAG del aceite de los mutantes CAS-18 y CAS-25 mediante lipólisis con lipasa pancreática (Materiales y Métodos, Apartado 2.2.1.6.3).

En la Tabla 23 se muestra la composición de ácidos grasos de las posiciones *sn*-(1+3) y *sn*-2 de los mutantes y de sus parentales.

Tabla 23. Composición de ácidos grasos (mol%) de las posiciones *sn*-(1+3) y *sn*-2 de los TAG de las líneas CAS-18, CAS-25, y sus parentales CAS-3, CAS-5 y CAS-12.

Línea	Posición	Composición de ácidos grasos (mol%)								
		16:0	16:1	16:2	18:0	18:1	18:1 Δ ¹¹	18:2	20:0	22:0
CAS-3	<i>sn</i> -(1+3)	10,6	- ^a	-	38,2	15,2	-	32,3	1,9	1,8
	<i>sn</i> -2	0,7	-	-	1,6	32,4	-	65,4	-	-
CAS-5	<i>sn</i> -(1+3)	40,9	5,6	1,8	5,0	4,1	7,1	34,0	0,8	1,0
	<i>sn</i> -2	1,4	2,9	0,7	1,1	6,9	1,8	85,4	-	-
CAS-18	<i>sn</i> -(1+3)	49,3	1,2	-	20,2	2,3	1,5	21,9	1,5	2,2
	<i>sn</i> -2	1,6	0,8	-	0,7	5,6	0,4	90,9	-	-
CAS-12	<i>sn</i> -(1+3)	43,4	9,9	-	3,1	33,3	5,3	2,4	1,0	1,6
	<i>sn</i> -2	1,6	3,1	-	0,8	85,9	3,8	4,8	-	-
CAS-25	<i>sn</i> -(1+3)	44,2	2,5	-	9,5	30,5	2,7	6,7	1,5	2,4
	<i>sn</i> -2	2,0	1,4	-	1,4	76,4	1,6	17,2	-	-

^a: <0,5%; desviación estándar <10% de la media.

Al igual que ya se viera en las líneas parentales (Álvarez-Ortega *et al.*, 1997), las líneas CAS-18 y CAS-25 no tienen apenas ácido palmítico en la posición *sn*-2, y lo mismo sucede para el ácido esteárico, a pesar de haber aumentado su presencia en los TAG, de manera que el contenido en ácidos grasos saturados de esta posición es muy bajo, como ocurre en la mayoría de los aceites vegetales. Aproximadamente el 98% de los ácidos grasos saturados se encuentran ocupando las posiciones externas *sn*-1 y *sn*-3.

Por lo tanto, la posición *sn*-2 es ocupada preferentemente por los ácidos grasos insaturados, linoleico y algo de oleico en CAS-18, al igual que en CAS-3 y CAS-5, y fundamentalmente por oleico y algo de oleico en el mutante CAS-25, como en CAS-12. Como ya describiera Álvarez-Ortega *et al.* (1997), el ácido palmitoleico presenta un comportamiento diferente al oleico, encontrándose en su mayoría en las posiciones *sn*-(1+3), poniendo de manifiesto la especificidad de la enzima 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa no solo por el grado de insaturación, sino también por la longitud de la cadena.

2.4. Estudio de la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos del aceite.

En los lípidos totales del aceite de la semilla, los fosfolípidos representan sólo un 3-4% (Garcés *et al.*, 1989) y se encuentran formando parte de las membranas de la misma. En la semilla los lípidos polares mayoritarios son fosfatidilinositol (PI), fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE), encontrándose trazas de LP de tejidos fotosintéticos como fosfatidilglicerol, monogalactosildiglicérido y digalactosildiglicérido.

2.4.1. Estudio de los principales fosfolípidos de la semilla.

A partir de los lípidos totales se separaron los distintos tipos de fosfolípidos (Materiales y Métodos, Apartado 2.2.1.5.3.), de manera que se pudo estudiar la composición de ácidos grasos de cada uno de ellos (Tabla 24).

Tabla 24. Composición de ácidos grasos de los principales fosfolípidos (mol%) de las líneas CAS-18 y CAS-25.

Línea	Lípido	Composición de ácidos grasos (mol%)				
		16:0	16:1	18:0	18:1*	18:2
CAS-3	PI	16,0		41,4	4,9	39,9
	PC	9,5		22,4	11,5	56,2
	PE	11,5		18,9	8,1	61,3
CAS-5	PI	41,9	0,4	3,1	3,4	51,0
	PC	26,1	2,7	1,7	9,7	59,5
	PE	25,2	1,8	1,4	5,5	65,7
CAS-12	PI	36,9	0,8	3,3	54,4	4,4
	PE	22,2	2,6	0,8	69,7	4,4
CAS-18	PI	38,2	0,2	8,9	5,9	46,8
	PC	27,1	1,1	6,0	8,7	57,2
	PE	30,4	0,9	3,8	5,5	59,4
CAS-25	PI	35,8	0,4	7,3	39,4	17,3
	PC	14,8	1,2	2,6	68,6	12,8
	PE	21,8	1,1	2,3	59,3	15,5

Desviación estándar <10% de la media. *: suma de 18:1 y 18:1 Δ^1 .

Los lípidos de membrana también reflejan el fenotipo mutante, dándose un alto contenido de saturado. Los ácidos grasos se distribuyen de manera diferente en los distintos LP, así el PI acumula más ácidos grasos saturados que los otros fosfolípidos, inclusive más que los TAG, principalmente 16:0. La PC presenta considerablemente menos cantidad de saturado y más de 18:1.

3. DISCUSIÓN.

Utilizando la información disponible sobre los genes que controlan el fenotipo de cada línea mutante y las correspondientes actividades enzimáticas asociadas a ellos, en los cruzamientos de las líneas CAS-5 y CAS-12 con CAS-3 se dirigió la selección a la obtención de líneas que habían heredado, por un lado, el carácter alto-palmítico de CAS-5 o CAS-12 y por otro una menor actividad de la SAD de CAS-3. Así a pesar del incremento de ácido palmítico en el plastidio por efecto de una disminución de la actividad KASII en los mutante alto-palmítico, un descenso en las desaturaciones se traduce en la reducción de la cantidad de 16:1, que servía de sustrato para la síntesis de 18:1 Δ^{11} y una vez fuera del plastidio de 16:2.

Los intentos en la obtención de la línea medio-palmítico y alto-esteárico, CAS-23, procedente del cruce CAS-5xCAS-3, y la línea con genotipo p1p1P2P2P3P3 (con posible fenotipo de bajo contenido en ácidos grasos saturados y niveles altos de ácido linoleico) a partir de cruces de la línea CAS-5 con una línea normal de girasol, resultaron infructuosos. Dichos fenotipos parecen estar ligados a alelos en heterosis, de manera que cada generación presentaba la segregación de los caracteres, resultando imposible la fijación de las líneas.

Las líneas CAS-18 y CAS-25 seleccionadas presentan un contenido en 16:0 muy similar a CAS-5 y CAS-12 respectivamente, así como una reducción en los ácidos grasos inusuales 16:1, 16:2 y 18:1 Δ^{11} (Tabla 19). Tal como muestra la Tabla 25, estas cuatro líneas presentan niveles de elongación similares, de alrededor de un 65% frente al 94% de RHA-274, con lo que se deduce que CAS-18 y CAS-25 han heredado la mutación en la actividad KASII (Tabla 25, Columna FASII). Asimismo, la inclusión de la mutación baja actividad estearato desaturasa de la línea CAS-3, produce una reducción de los niveles de los sustratos desaturados, alrededor de un 19% en el caso de CAS-18 respecto a CAS-5, y un 17% en el caso de CAS-25 respecto a CAS-12 (Tabla 25, Columna SAD/FASII). Además, la inclusión del alelo de la línea CAS-3 no sólo ha reducido la presencia de estos ácidos grasos no usuales sino que ha provocado un mayor contenido en ácido esteárico, y por lo tanto ha incrementado el contenido en ácidos grasos saturados hasta un 47,3% en el caso de la línea CAS-18 y un 39,5% en el caso de CAS-25, valores superiores en un 7,8% y un 4,1% respecto a los valores observados en las líneas CAS-5 y CAS-12, respectivamente. Asimismo, este mayor nivel de ácidos grasos saturados produce un efecto compensatorio reduciendo el nivel de ácido oleico a favor de un mayor contenido en ácido linoleico.

Tabla 25. Estudio pormenorizado de actividades relativas en función de la composición en ácidos grasos de las líneas mutantes CAS-3, CAS-5, CAS-12, CAS-18 y CAS-25 que aparece en la Tabla 18. [Sat], suma de los valores de ácidos grasos saturados (16:0 y 18:0); Inusual, suma de los valores de ácidos grasos inusuales (16:1, 16:2 y 18:1 Δ^{11}); FASII, suma de los productos de la FASII (18:0 y derivados); SAD, suma de los productos de la SAD (18:1 y derivados, en los alto-palmitico también 16:1 y derivados); SAD/FASII, indicativo de la cantidad de sustrato desaturado por la SAD respecto al elongado por la KASII.

Línea	[Sat]	Inusual	FASII	SAD	SAD/FASII	
RHA-274	12,6	0,0	93,6	87	0,92	← 23%
CAS-3	34,2	0,0	94,3	65,5	0,69	
CAS-5	35,6	9,8	64,0	63,9	0,99	← 19%
CAS-12	31,1	11,6	64,4	68,7	1,06	
CAS-18	47,3	2,8	65,3	52,6	0,80	← 17%
CAS-25	39,5	4,4	67,7	60,4	0,89	

La falta de respuesta a cambios en la temperatura de cultivo en estas nuevas líneas de girasol viene dada no solo por la presencia de alelos mutantes de las actividades FASII y SAD, sino también por el gran contenido en ácidos grasos saturados de sus aceites. El estudio de la respuesta de los parentales de estas líneas, CAS-3 y CAS-5, ya puso de manifiesto la influencia de un mayor contenido en ácidos grasos saturados sobre los niveles de desaturación total de sus ácidos grasos (Martínez-Force et al., 1998). La mayor rigidez de las membranas de estos mutantes inducen a éstas a mantener un mayor grado de insaturación, como si estas líneas mutantes “siempre sintieran frío” con lo que no existe respuesta a cambios en la temperatura exterior. Esto lo vemos de nuevo reflejado en estas líneas alto-palmitico bajo-palmitoleico (Figura 38).

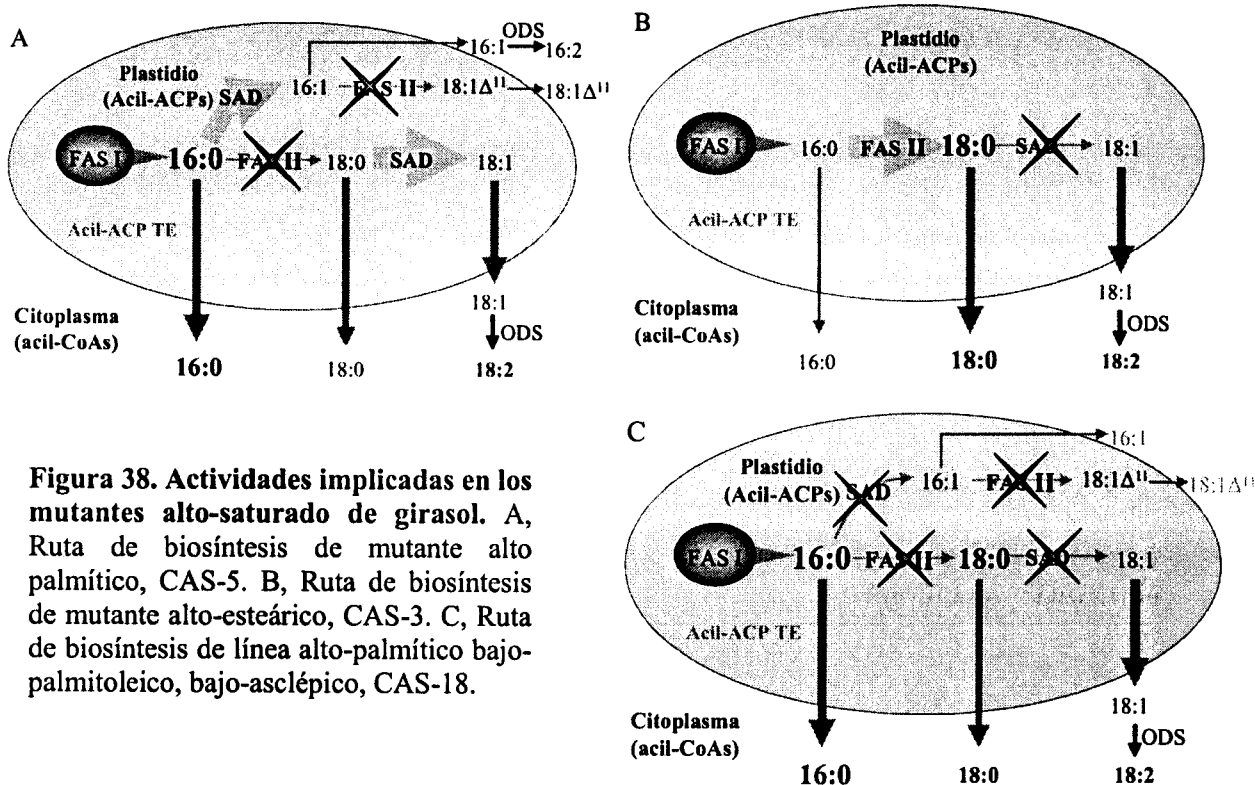


Figura 38. Actividades implicadas en los mutantes alto-saturado de girasol. A, Ruta de biosíntesis de mutante alto palmítico, CAS-5. **B,** Ruta de biosíntesis de mutante alto-esteárico, CAS-3. **C,** Ruta de biosíntesis de línea alto-palmítico bajo-palmitoleico, bajo-ascléptico, CAS-18.

La modificación en la composición de ácidos grasos de estos aceites repercute en las especies de triglicéridos formados y que a su vez modifican las características físico-químicas de los aceites. Como muestra la Tabla 26, que resume los datos presentados en la Tabla 22, los nuevos aceites obtenidos de las líneas CAS-18 y CAS-25 presentan un mayor contenido en ácidos grasos saturados que las líneas parentales utilizadas debido a la disminución en ácidos grasos insaturados no usuales presentes en las líneas alto-palmitico convencionales. Este aumento en ácidos grasos saturados se pone de manifiesto en un contenido de triacilglicéridos disaturados de un 48,2% y un 31,8% en las líneas CAS-18 y CAS-25 respectivamente.

Estudios sobre la estabilidad termo-oxidativa de los aceites de líneas alto-saturado de girasol han puesto de manifiesto que aquellas líneas con mayor contenido en ácidos grasos saturados y ácido oleico, presentan un comportamiento similar o mejor, como en el caso de la línea CAS-12 alto-palmitico alto-oleico, que la variedad alto-oleico de girasol (Márquez-Ruiz et al., 1999). A priori, el aceite de la línea CAS-25 presenta un perfil de ácidos grasos que lo hace más resistente a la termo-oxidación que las líneas parentales empleadas. Es

decir, el aceite de CAS-25 superaría los excelentes resultados obtenidos con el aceite de CAS-12 (Márquez-Ruiz et al., 1999; Guinda et al. 2003). Por otra parte el aceite de CAS-18 debería ser evaluado ya que su gran contenido en ácidos grasos saturados aun en fondo alto-linoleico debe haberle modificado sus propiedades termoxidativas.

Tabla 26. Contenido en ácidos grasos saturados y subgrupos de triglicéridos (SSS, SUS, SUU y UUU) presentes en los aceites de las líneas CAS-5, CAS-18, CAS-12, CAS-25 y CAS-3. S: ácido graso saturado; U: ácido graso insaturado.

	CAS-5	CAS-18	CAS-12	CAS-25	CAS-3
[Sat]	31,3	47,5	33,1	37,8	36,8
SSS	0	0	0	0	0
SUS	20,6	48,2	24	31,8	27,1
SUU	52,6	46,1	51,4	49,9	56,1
UUU	26,8	5,7	24,5	18,5	16,8

Desde el punto de vista nutricional de los aceites ricos en ácidos grasos saturados la cualidad mas importante es que estos no se encuentren o se encuentren en muy baja proporción en la posición central del TAG. Es decir, dependiendo de los ácidos grasos que ocupen la posición *sn*-2 en los TAG, una grasa o un aceite puede ser más o menos saludable. Por ejemplo, la manteca de cacao con altos niveles de esteárico (35%) y de palmítico (25%), pero localizados casi exclusivamente en las posiciones *sn*-(1+3), tendría un efecto menos nocivo a nivel de enfermedades coronarias que una grasa animal, como la manteca de cerdo, también con un alto contenido en ácidos palmítico (27%) y esteárico (16%), pero localizados mayoritariamente en posición *sn*-2. La menor absorción de los ácidos grasos saturados por estar en posición *sn*-(1+3), nos explica el efecto neutral de grasas como la manteca de cacao sobre los lípidos del suero en humanos (Bracco, 1994). Así grasas que contienen concentraciones similares de palmítico y esteárico como la grasa de la leche humana y bovina, presentan unos perfiles de absorción diferentes debido a la diferente localización de los ácidos grasos de los triacilglicéridos (Tomarelli *et al.*, 1969). Luego se puede decir que la nocividad de un aceite o una grasa no está determinada sólo por su alto o bajo contenido de ácidos grasos saturados sino también por la posición en la que se encuentran en la molécula de TAG.

Por todo ello, estos nuevos aceites alto-palmitico bajo-palmitoleico, CAS-18 y CAS-25, aunque no utilizables en la obtención de margarinas debido a la “mala prensa” del ácido palmítico y a sus restricciones en la normativa alimentaria de algunos países, pueden ser dos buenos ejemplos de aceites alto-saturado y a su vez no perjudiciales a nivel nutricional que podrían ser utilizados como sustitutos del aceite de girasol alto-oleico y de la oleina de palma en operaciones que conlleven el uso de altas temperaturas (como por ejemplo en fritura industrial).

CONCLUSIONES

1. A partir de semillas en desarrollo de girasol (*Helianthus annuus* L.) se han aislado, clonado y secuenciado los genes *HafatA1* y *HafatB1* que codifican acil-ACP tioesterasas de tipo FatA y FatB, respectivamente. Los estudios de especificidad llevados a cabo con proteínas sobreexpresadas en *Escherichia coli* muestran que ambas tioesterasas difieren en la especificidad por sustrato, mientras que HaFatA1 es una proteína soluble prácticamente específica para ácidos grasos insaturados, HaFatB1 está localizada en la membrana y presenta actividad tanto sobre ácidos grasos saturados como sobre ácido oleico.
2. Los genes *HafatA1* y *HafatB1*, se expresan preferentemente en semillas en desarrollo, presentando un máximo de expresión a los 16 días después de floración. El nivel de expresión en semillas de 16 DDF del gen *HafatA1* es unas 65 veces mayor que el encontrado para el gen *HafatB1*, con lo que la actividad de este último queda enmascarada por la de *HafatA1*.
3. El estudio de la secuencia de estos genes en las líneas alto-saturado de girasol muestra la falta de mutaciones estructurales. Sin embargo, se han observado diferencias en los niveles totales de actividad acil-ACP tioesterasa y en la expresión relativa de cada uno de estos genes. Los mayores niveles de actividad tioesterasa y mayor expresión relativa del gen *HaFatB1* se encontraron en la línea alto-palmitico CAS-5 señalando la implicación de este último en el fenotipo de la línea mutante. Asimismo, la línea alto-esteárico CAS-3 también mostró niveles superiores de actividad tioesterasa que la línea control RHA-274.
4. La comparación de las secuencias de las proteínas codificadas por estos genes ha puesto de manifiesto su relación con otras tioesterasas de plantas así como la relación de éstas con secuencias de organismos procarióticos que conservan los residuos catalíticos implicados en la actividad tioesterasa, los residuos que los circundan y la distancia entre ellos. La presencia de proteínas de proteobacterias de la subdivisión delta y la ausencia de otros grupos procarióticos dentro de este grupo de secuencias apuntan a un ancestro común relacionado con el origen de las células vegetales.

5. La conservación en la localización de intrones en ambos tipos de tioesterasas apoya la teoría de un ancestro común, posiblemente del tipo FatB. Mediante una duplicación, y la ganancia de un intrón, se originaron las tioesterasas del tipo FatA.
6. Los modelos propuestos de estructura terciaria de las acil-ACP tioesterasas, relacionando estas actividades con otras incluidas en la superfamilia estructural "Tioesterasa/Tiol ester dehidrasa-isomerasa", quedan validados con la localización de las mutaciones puntuales y construcciones de quimeras llevadas a cabo en otros estudios. La información que se deriva de dichos modelos puede ser utilizada para la obtención de nuevos alelos de estas tioesterasas mediante mutagénesis dirigida.
7. La combinación de genes presentes en las líneas alto-saturadas CAS-3 y CAS-5 ha permitido la obtención y fijación de la línea CAS-18. Esta línea, similar a CAS-5 en cuanto a contenido en ácido palmítico, presenta un menor contenido de ácidos grasos derivados del ácido palmítico (palmitoleico, palmitolinoleico y ásclepico) y un mayor nivel de este y de ácido esteárico, elevando el contenido total de ácidos grasos saturados a un 47,3%.
8. La combinación de genes presentes en las líneas alto-saturadas CAS-3 y CAS-12 ha permitido la obtención y fijación de la línea CAS-25. Esta línea, presenta un menor contenido de ácidos grasos derivados del ácido palmítico como la línea CAS-18 pero en un fondo alto oleico, por lo que presenta un menor incremento en ácido esteárico.
9. Las alteraciones en la composición de ácidos grasos de las líneas mutantes alto palmítico y bajo palmitoleico y asclépico, CAS-18 y CAS-25, se ven reflejadas en las especies moleculares de triglicéridos de sus aceites. Sin embargo, estas modificaciones no influyen en la composición de la posición central, *sn*-2, de los triglicéridos que sigue estando ocupada mayoritariamente por ácidos grasos insaturados.
10. El alto contenido de ácidos grasos saturados hace idóneo al aceite de las líneas CAS-18 y CAS-25 para su uso en la industria de fritura y como sustituto del aceite de palma.

BIBLIOGRAFÍA

- Alba, A. and Llanos, M. 1990. El cultivo del girasol. Colección agroguías mundi-prensa.
- Alvarez-Ortega, R., Cantisán, S., Martínez-Force, E. and Garcés, R. 1997. Characterization of polar and nonpolar seed lipid classes from highly saturated fatty acid sunflower mutants. *Lipids* 32: 833-837.
- Ascherio, A. and Willett W. C. 1997. Health effects of *trans* fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.* 66(suppl): 1006S-1010S.
- Barret, P.B. 1998. Characterization of fatty acid elongase enzymes from germinating pea seeds. *Phytochem.* 48: 1295-1304.
- Berberich T., Harada M., Sugawara K., Kodama H., Iba K., and Kusano T. 1998. Two maize genes encoding omega-3 fatty acid desaturase and their differential expression to temperature. *Plant. Mol. Biol.* 36: 297-306.
- Benning, M. M., Wesenberg, G., Liu, R., Taylor, K. L., Dunaway-Mariano, D. and Holden, H. M. 1998. The three-dimensional structure of 4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase from *Pseudomonas* sp. strain CBS-3. *J. Biol. Chem.* 273: 33572-33579.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. and Bourne, P. E. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* 28: 235-242.
- Bhattacharjee, A. Ghosh, S. K., Ghosh, D., Ghosh, S., Maiti, M. K. and Sen, S. K. 2002. Identification of a heat-stable palmitoyl/oleoyl specific acyl-acyl carrier protein thioesterase in developing seeds of *Madhuca butyracea*. *Plant Sci.* 163: 791-800.
- Bligh E.G. and Dyer W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Bioch. .Physiol.* 37: 911-917.
- Boudet N., Aubourg S., Toffano-Nioche C., Kreis M., Lecharny A. 2001. Evolution of intron/exon structure of DEAD helicase family genes in *Arabidopsis*, *Caenorhabditis*, and *Drosophila*. *Genome Res.* 11: 2101-2114.
- Bracco, U. 1994. Effect of triglyceride structure on fat absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* 60: 1002s-1009s.
- Browse, J. and Somerville, C. 1991. Glycerolipid síntesis: Biochemistry and Regulation, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 42, 467-506.
- Bustin, S.A. 2002. Quantificación de mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 29: 23-39.

- Bustin, S.A.** 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol Endocrinol.* 25: 169-193.
- Campbell, E.J.** 1983. Sunflower oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60: 387-395.
- Cantisán, S., Martínez-Force, E. and Garcés, R.** 2000. Enzymatic studies of high stearic acid sunflower seed mutants. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 377-382.
- Cantisán, S., Martínez-Force, E., Álvarez-Ortega, R. and Garcés, R.** 1999. Lipid characterization in vegetative tissues of high saturated fatty acid sunflower mutants. *J. Agric. Food Chem.* 47: 78-82.
- Canvin, D.T.** 1965. The effect of temperature on the oil content and fatty acid composition of the oils from several oil seed crops. *Can. J. Bot.* 43: 63-69.
- Chapman, G.W. Jr.** 1980. A conversion factor to determine phospholipid content in soybean and sunflower crude oils. *J. Am. oil Chem. Soc.* 59: 299-302.
- Cheesbrough, T.M.** 1990. Decreased growth temperature increases soybean stearyl-acyl carrier protein protein desaturase activity. *Plant Physiol.* 1993: 555- 559.
- Clegg M.T., Cummings M.P., Durbin M.L.** 1997. The evolution of plant nuclear genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94: 7791-7798.
- Cronan, J. E. Jr. and Rock, C. O.** 1987. Biosynthesis of membrane lipids, p. 474-497. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Cuff, J. A. and Barton, G. J.** 2000. Application of enhanced multiple sequence alignment profiles to improve protein secondary structure prediction. *Proteins: Structure, Function and Genetics* 40: 502-511.
- Dahlqvist A., Stahl U., Lenman M., Banas A., Lee M., Sandager L., Ronne H., and Stymne S.** 2000. Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6487-6492.
- Dörmann, P., Spener, F. and Ohlrogge, J.B.** 1993. Characterization of two acyl-acyl carrier protein thioesterases from developing *Cuphea* seeds specific for medium-chain- and oleoyl-acyl carrier protein. *Planta* 189, 425-432.
- Dörmann, P., Kridl, J.C. and Ohlrogge, J.B.** 1994. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a cDNA coding for the oleoyl-acyl carrier protein

- thioesterase from coriander (*Coriandrum sativum* L.). *Biochim. Biophys. Acta* 1212: 134-136.
- Dörmann P., Voelker T.A., and Ohlrogge J.B. 1995. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a novel thioesterase from *Arabidopsis thaliana* specific for long-chain acyl-acyl carrier proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 316: 612-618.
- Dubacq, J.P., Mazliak, P. and Tremolieres, A. 1976. Sub-cellular localization of the oleyl-CoA desaturase activity in pea leaves. *Febs Letters.* 66: 183-186.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H. and Von Heijne, G. 1999. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science* 8, 978-984.
- Facciotti M.T. and Yuan L. 1998. Molecular dissection of the plant acyl-acyl carrier protein thioesterases. *Fett-Lipid* 100: 167-172.
- Facciotti, M.T., Bertain, P.B. and Ling-Yuan. 1999. Improved stearate phenotype in transgenic canola expressing a modified acyl-acyl carrier protein thioesterase. *Nature Biotechnol.* 17: 593-597
- Faostat statistics database. <http://apps.fao.org/>. Food and agricultural organization of the United Nations.
- Fehling, E. and Mukherjee, K.D. 1990. Biosynthesis of triacylglycerols containing very long chain mono-unsaturated fatty acids in seeds of *Lunaria annua*. *Phytochem.* 29: 1525-1527.
- Fernández-Martínez, J.M., Jiménez, A., Domínguez, J. and Alcántara, M. 1986. Influencia de la temperatura en el contenido de ácido oleico and linoleico del aceite de tres genotipos de girasol. *Grasas y Aceites* 37: 326-331.
- Fernández-Martínez, J.M., Mancha, M., Osorio, J. and Garcés, R. 1997. Sunflower mutant containing high levels of palmitic acid in high oleic background. *Euphytica* 97: 113-116.
- Fernandez-Moya V., Martinez-Force E., and Garces R. 2000 a. Identification of triacylglycerol species from high-saturated sunflower *Helianthus annuus*. mutants. *J. Agric. Food Chem.* 48: 764-769.
- Fernandez-Moya V., Martinez-Force E., and Garces R. 2000 b. Metabolism of triacylglycerol species during seed germination in fatty acid sunflower *Helianthus annuus*. mutants. *J. Agric. Food Chem.* 48: 770-774.

- Frugoli J.A., McPeck M.A., Thomas T.L., McClung C.R.** 1998. Intron loss and gain during evolution of the catalase gene family in angiosperms. *Genetics* 149: 355-365.
- Garcés, R. and Mancha, M.** 1991. *In vitro* oleate desaturase in developing sunflower seeds. *Phytochem.* 30 : 2127-2130.
- Garcés, R. and Mancha, M.** 1993. One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Anal. Biochem.* 211: 139-143.
- Garcés, R., García J.M. and Mancha M.** 1989. Lipid characterization in seeds of a high oleic acid mutant. *Phytochem.* 30: 2127-2130.
- Garcés, R. and Martínez-Force, E.** 2000. Influence of fatty acid composition on sunflower lipid biosynthesis. *Lipids* 4: 151-159.
- Griffiths, G., Stobart, A.K. and Stymne, S.** 1985. The acylation of *sn*-glycerol 3-phosphate and the metabolism of phosphatidate in microsomal preparations from the developing cotyledons of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed. *Biochem. J.* 230: 379-388.
- Guex, N. and Peitsch, M.C.** 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18: 2714-2723.
- Guinda A., Dobarganes M.C., Ruiz-Mendez M.V., and Mancha M.** 2003. Chemical and physical properties of a sunflower oil with high levels of oleic and palmitic acids. *Eur. J.Lip. Sci. Tech.* 105: 130-137.
- Gunstone, F.D., Harwood, J.L. and Padley, F.B.** 1994. *The lipid handbook*, segunda edición. Chapman & Hall, London.
- Gurr, M.I. and Harwood, J.L.** 1991. *Lipid biochemistry*. Chapman & Hall (Great Britain).
- Hammer, M.F. and Murphy, J.B.** 1994. Lipase activity and *in vivo* triacylglycerol utilization during *Pinus edulis* seed germination. *Plant. Physiol. Biochem.* 32: 861-867.
- Hara, A. and Radin, N.** 1978. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal. Biochem.* 90: 420-426.
- Hardison R.C.** 1996. A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 5675-5679.

- Harris, H.C., McWilliam, J.R. and Mason, W.K. 1978. Influence of temperature on oil content and composition of sunflower seed. *Aust. J. Agric. Res.* 29: 1203-1212.
- Harwood, J.L. 1985. Lipid synthesis by germinating soybean. *Phytochem.* 14: 1985-1990.
- Harwood J.L. 1988. Fatty-Acid Metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 101-138.
- Harwood, J.L. 1996. Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* 1301: 7-56.
- Hawkins D.J., and Kridl J.C. 1998. Characterization of acyl-ACP thioesterases of mangosteen *Garcinia mangostana*. seed and high levels of stearate production in transgenic canola. *Plant J.* 13: 743-752.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. and Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6: 986-94.
- Herman, E.M. 1994. Cell and molecular biology of seed oil bodies. En; seed Development and Germination. Kigel, H. and Gailili, G. (eds). New York: Marcel Dekker, pp 195-214.
- Hellyer A., Leadlay P.F., and Slabas A.R. 1992. Induction, purification and characterisation of acyl-ACP thioesterase from developing seeds of oil seed rape *Brassica napus*.. *Plant Mol. Biol.* 20: 763-780.
- Hills, M.J. and Murphy, D.J. 1988. Characterization of lipases from the lipid bodies and microsomal membranes of erucic acid-free oilseed-rape (*Brassica napus*) cotyledons. *Biochem. J.* 249: 687-693.
- Horriike, T., Hamada, K. and Shinozawa, T. 2002. Origin of eukaryotic cell nuclei by symbiosis of archaea in bacteria supported by the newly clarified origin of functional genes. *Genes Genet. Syst.* 77: 369-376.
- Huynh T.T., Pirtle R.M., and Chapman K.D. 2002. Expression of a *Gossypium hirsutum* cDNA encoding a FatB palmitoyl-acyl carrier protein thioesterase in *Escherichia coli*. *Plant Physiol. and Bioch.* 40: 1-9.
- Ichiara, K. 1991. The action of phosphatidate phosphatase on the fatty-acil composition of safflower triacylglycerol and spinach glycerolipids. *Planta.* 183: 353- 358.
- Ichihara, K., Takahashi, T. and Fujii, S. 1988. Diacylglycerol acyltransferase in maturing safflower seeds: its influences on the fatty acid composition of triacylglycerol and on the rate of triacylglycerol synthesis. *Bioch. Biophys. Acta.* 958: 125-129.

- 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. *Am. J. Clin. Nutr.* 66: 1523S-1529S.
- Jackson, R.C. and Murray, B.G.** 1983. Colchicine induced quadrivalent formation in *Helianthus*: evidence of ancient polyploidy. *Theor. Appl. Genet.* 64: 219-222.
- James, W.P.T.** 1996. Nutritional disorders affecting the heart. En: *Diseases of the heart.* (2^a Ed.). Julian, Cammon, Fox, Hall, Poole, Wilson (eds). W.B. Saunders Company Ltd. London. 73:1442-1458
- Joyard, J., Block, M.A., Malherbe, A., Marachal, E., and Douce, R.** 1993. Origin and synthesis of galactolipid and sulfolipid headgroup, in *Lipid Metabolism in Plant*, Moore T.S. (ed), Boca Raton, FL: CRC Press, 231-253
- Jones, A., Davies, H.M. and Voelker, T.A.** 1995. Palmitoyl-acyl carrier protein (ACP) thioesterase and the evolutionary origin of plant acyl-ACP thioesterases. *Plant Cell.* 7: 359-371.
- Kates, M.** 1986. Lipid extraction procedures. *Techniques of lipidology.* Ed. Elsevier. Amsterdam. 100-111.
- Kelley, L. A., MacCallum, R. M. and Sternberg, M. J. E.** 2000. *J. Mol. Biol.* 299: 499-520.
- Khan, M.V. and Williams, J.P.** 1977. Improved thin-layer chromatographic method for the separation of major phospholipids and glycolipids from plant lipid extracts and phosphatidylglycerol and bis (monoacylglyceryl) phosphate from animal lipid extract. *J. Chromatogr.* 140: 179-185.
- Kim, Y., Joachimiak, A., Edwards, A., Xu, X. and Savchenko, A.** 2003. Crystal structure of *Escherichia coli* hypothetical protein Ybaw. No publicado.
- Kinney, A.J.** 1997. *Physiology, biochemistry and molecular biology of plant lipids*, J.P.Williams, M.U. Khan and N.W. Lem (Eds) Kluwer, London, 298.
- Kinsella, J.E., Bruckner, G., Mai, J. and Shimp, J.** 1981. Metabolism of *trans* fatty acids with emphasis on the effect of *trans*, *trans*- octadecadienoate on lipid composition, essential fatty acid, and prostaglandins: an overview. *Am. J. Clin. Nutr.* 34: 2307-2318.
- Knutzon, D.S., Thompson, G.A., Radke, S.E., Johnson, W.B., Knauf, V.C. and Kridl, J.C.** 1992. Modification of *Brassica* seed oil by antisense expression of a stearoyl-acyl carrier protein desaturase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 59: 2624- 2628.

- Lajara, J.R., Díaz U. and Díaz Quidiello, R. 1990. Definitive influence of location and climatic conditions on the fatty acid composition of sunflower seed oil. J. Amer. Oil Chem. Soc. 67: 618-623.
- Landers, R.E. and Rathmann, D.M. 1981. Vegetable oils effects of processing, storage and use on nutritional values. J. Am. Oil Chem. Soc. 58: 255.
- Liaud M.F., Zhang D.X., Cerff R. 1990. Differential intron loss and endosymbiotic transfer of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes to the nucleus. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 87: 8918-8922.
- Lin, Y.H., Yu, C. and Huang, A. H. 1986. Substrate specificities of lipases from corn and other seeds. Arch. Biochem. Biophys. 244: 346-356.
- Loader, N. and Safford, R. 1995. Sequence of an Oleoyl-ACP thioesterase gene from *Brassica napus*. Plant Physiol. 110: 336-336.
- Luddy, R.E., Barford, A., Herb, S., Magidman, P. and Riemenschneider, R.W. 1964. Pancreatic lipase hydrolysis of triglycerides by a semimicro technique. J. Am. Oil Chem. Soc. 41: 693-696.
- Luthra, R., Munshi, S.K. and Sukhija, P.S. 1991. Relationship of carbohydrate metabolism with lipid biosynthesis in developing sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. J. Plant Physiol. 137: 312-318.
- Lynch M. 2002. Intron evolution as a population-genetic process. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 6118-6123.
- Mancha, M. 1974. Fosfolípidos and glicolípidos de la pulpa de aceitunas maduras. Grasas y Aceites 25: 159-164.
- Mancha, M. and Vázquez, A. 1970. Transformación de los glicéridos durante la maduración de la aceituna. III. Distribución de los ácidos grasos en los triglicéridos. Grasas and Aceites 21: 127-131.
- Marquez-Ruiz G., Garces R., Leon-Camacho M., and Mancha M. 1999. Thermoxidative stability of triacylglycerols from mutant sunflower seeds. J. Am. Oil Chem. Soc. 76: 1169-1174.
- Martínez-Force, E. and Garcés, R. 1999. New oilseed varieties with modified fatty acid composition in the oil. Trends in Agronomy 2: 13-21.
- Martínez-Force, E., Álvarez-Ortega, R. and Garcés, R. 1999. Enzymatic characterization of high palmitic sunflower (*Helianthus annuus* L.) mutants. Planta 207: 533-538.

- Martínez-Force, E., Álvarez-Ortega, R., Cantisan, S. and Garcés, R.** 1998. Fatty acid composition in developing high saturated sunflower (*Helianthus annuus*) seed: Maturation changes and temperature effect. *J. Agric. Food Chem.* 46: 3577- 3582.
- Martínez-Force E., Cantisan S., Serrano-Vega M.J., and Garces R.** 2000. Acyl-acyl carrier protein thioesterase activity from sunflower *Helianthus annuus* L. seeds. *Planta* 211: 673-678.
- Mattson, F.H. and Lutton, E.S.** 1958. The specific distribution of fatty acid in the glycerides of animal and vegetable fats. *J. Biol. Chem.* 233: 868-871.
- McKeon, T.A. and Stumpf, P.K.** 1982. Purification and characterization of the stearyl-acyl carrier protein desaturase and the acyl-acyl carrier protein thioesterase from maturing seeds of safflower. *J. Biol. Chem.* 257: 12141-12147.
- McGuffin L.J., Bryson K. and Jones D.T.** 2000. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics.* 16: 404-405.
- Merrien, A.** 1996. Oleaginous seeds in temperature climates and their oils. *Oils & Fats Manual*, vol 1, Karlenskid, A. (ed), Properties Production Applications, Lavoisier publishing. 118-125.
- Monga, P.K., Munshi, S.K. and Suhija, P.S.** 1983. Lipid biosynthesis in the developing sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *Plant Science.* 31: 311-321.
- Murata, N. and Wada, H.** 1995. Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. *Biochem. J.* 308: 1-8.
- Moreira, D. and López-García, P.** 1998. Symbiosis between methanogenic archaea and δ -proteobacteria as the origin of eukaryotes: the synthophic hypotesis. *J. Mol. Evol.* 47, 517-530.
- Murphy, D.J., Woodrow, I.E., and Mukherjee, K.D.** 1985. Substrate specificities of the enzymes of the oleate desaturase system from photosynthetic tissue. *Biochem. J.* 225: 267-270.
- Murphy, D.J.** 1993. Structure, function and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants. *Prog. Lipid Res.* 32(3): 247-280.
- Murzin, A. G., Brenner, S. E., Hubbard, T. and Chothia, C.** 1995. SCOP: A Structural Classification of Proteins Database for the Investigation of Sequences and Structures. *J. Mol. Biol.* 247: 536-540.
- Naudet, M.** 1996. Main chemical constituents of fats. En: *Oils & Fats Manual*. Vol. 1. A. Karleskind, (ed). Paris (France).

- Nouaud D., Boeda B., Levy L., Anxolabehere D.** 1999. A P element has induced intron formation in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* 16: 1503-1510.
- O'Hara P., Slabas A.R., and Fawcett T.** 2002. Fatty acid and lipid biosynthetic genes are expressed at constant molar ratios but different absolute levels during embryogenesis. *Plant Physiol.* 129: 310-320.
- Ohlrogge J., Savage L., Jaworski J., Voelker T., and Post-Beittenmiller D.** 1995. Alteration of acyl-acyl carrier protein pools and acetyl-CoA carboxylase expression in *Escherichia coli* by a plant medium chain acyl-acyl carrier protein thioesterase. *Arch. Biochem. Biophys.* 317: 185-190.
- Ohlrogge, J.B. and Jaworski, J.G.** 1997. Regulation of fatty acid synthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 109-136.
- Osorio, J., Fernandez-Martinez J., Mancha M. and Garcés, R.** 1995. Mutant sunflowers with high concentration of saturated fatty acids in the oil. *Crop Sci.* 35: 739-742.
- Ouali, M. and King, R.D.** 2000. Cascaded multiple classifiers for secondary structure prediction. *Prot. Sci.* 9: 1162-1176.
- Page, R. D. M.** 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Patterson, H. B. W.** 1994. Hydrogenation of Fats and Oils: Theory and Practice. AOCS Press. USA.
- Pérez-Vich, B., Fernández, J., Garcés, R. and Fernández-Martínez, J. M.** 1999 a. Inheritance of high palmitic acid content in the seed oil of sunflower mutant CAS-5. *Theor. Appl. Genet.* 98: 496-501.
- Pérez-Vich, B., Garcés, R. and Fernández-Martínez, J. M.** 1999 b. Genetic control of high stearic acid content in the seed oil of the sunflower mutant CAS-3. *Theor. Appl. Genet.* 99: 663-669.
- Pérez-Vich B., Munoz-Ruiz J., and Fernandez-Martinez J.M.** 2004. Developing midstearic acid sunflower lines from a high stearic acid mutant. *Crop. Science* 44: 70-75.
- Pirtle R.M., Yoder D.W., Huynh T.T., Nampaisansuk M., Pirtle I.L., and Chapman K.D.** 1999. Characterization of a palmitoyl-acyl carrier protein thioesterase FatB1 in cotton. *Plant Cell Physiol.* 40: 155-163.

- Pohl, T., Weizenegger, T., Mewes, H.W., Lemcke, K. and Mayer, K.F.X.** 2001. *Arabidopsis thaliana* DNA chromosome 4, contig fragment No. 35. Unpublished.
- Pollastri, G., Przybylski, D., Rost, B. and Baldi, P.** 2002. Improving the prediction of protein secondary structure in three and eight classes using recurrent neural networks and profiles. *Proteins* 47: 228-235.
- Renaud, S.C., Ruf, J.C. and Petithory, D.** 1995. The positional distribution of fatty acids in palm oil and lard influences their biologic effects in rats. *J. Nutr.* 125: 229-237
- Rennie, B.D. and Tanner J.W.** 1989. Fatty acid composition of oil from soybean seeds grown at extreme temperatures. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 66: 1622-1624.
- Rios, J.J., Pérez-Camino, M.C., Márquez-Ruiz, G. and Dobarganes, M.C.** 1992. Comparison of oxidation of sucrose octaesters and triacylglycerols derived from olive oil. *Food Chem.* 44: 357-362.
- Röbbelen, G.** 1990. Mutation breeding for quality improvement a case study for oilseed crops. *Mutation Breeding Review. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture* 6: 1-44.
- Rogozin I.B., Wolf Y.I., Sorokin A.V., Mirkin B.G., Koonin E.V.** 2003. Remarkable interkingdom conservation of intron positions and massive, lineage-specific intron loss and gain in eukaryotic evolution. *Curr. Biol.* 13: 1512-1517.
- Rost, B.** 1996 PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. *Methods Enzymol.* 266: 525-39.
- Ruiz-López N., Martínez-Force E. and Garcés R.** 2003. Sequential one-step extraction and analysis of triacylglycerols and fatty acids in plant tissues. *Ann. Bioch.* 317: 247-254.
- Salas J.J. and Ohlrogge J.B.** 2002. Characterization of substrate specificity of plant Fata and FatB acyl-ACP thioesterases. *Arch. Biochem. Biophys.* 403: 25-34.
- Sambrook, J., Fritsh, E.F. and Maniatis, T.** 1989. *Molecular cloning. A laboratory Manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.
- Sasaki, Y., Hakamada, K., Suama, Y., Nagano, Y., Furusawa, I., and Matsuno, R.** 1993. Chloroplast-encoded protein as a subunit of acetyl-CoA carboxylase in pea plant. *J. Biol. Chem.* 268: 25118-25123.

- Sasaki, Y., Konishi, T., and Nagano, Y. 1995. The compartmentation of acetyl-coenzyme-a carboxylase in plants. *Plant Physiol* 108: 445-449.
- Sasaki, T., Matsumoto, T. and Yamamoto, K. 1999. *Oryza sativa* nipponbare(GA3) genomic DNA, chromosome 6, PAC clone:P0535G04. Unpublished.
- Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Katoh, T., Asamizu, E., Tabata, S. 2000. Structural analysis of *Arabidopsis thaliana* chromosome 3. I. Sequence features of the regions of 4,504,864 bp covered by sixty P1 and TAC clones. *DNA Res.* 7:131-5.
- Shapiro, S. 1997. Do *trans* fatty acids increase the risk of coronary artery disease? A critique of the epidemiologic evidence. *Am. J. Clin. Nutr.* 66(suppl): 1011S-1017S.
- Slack, C.R., Campbell, L.C., Browse, J.A. and Roughan, P.G. 1983. Some evidence for the reversibility of the cholinephosphotransferase-catalyzed reaction in developing linseed cotyledons in-vivo. *Biochem. J.* 263: 217-228.
- Small, D.M. 1991. The effect of glyceride structure on absorption and metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 11: 413-434.
- Soldatov, K.I. 1976. Chemical mutagenesis in sunflower breeding, *Proceedings of the Seventh International Sunflower Association*, pp. 352-357, Vlaardingen, The Netherlands.
- Stobart, A., Stymne, S. and 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). *Bioch. Biophys. Acta.* 754: 292-297.
- Stymne, S. and Appelqvist, L. 1978. The biosynthesis of linoleate from oleoyl- CoA via oleoyl-phosphatidylcholine in microsomes of developing safflower seeds. *Eur. J. Biochem.* 90: 223-229.
- Stymne, S. and Stobart, A.K. 1984. The biosynthesis of triacylglycerols in microsomal preparations of developing cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Biochem. J.* 220: 481-488.
- Stymne, S. and Stobart, A.K. 1987. Triacylglycerol biosynthesis. En: *The Biochemistry of Plants*, Vol. 9 pp. 175-214.
- Tarrio R., Rodriguez-Trelles F., Ayala F.J. 1998. New *Drosophila* introns originate by duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95: 1658-1662.

- Theologis, A., Ecker, J.R., Palm, C.J., Federspiel, N.A., Kaul, S., White, O., Alonso, J., Altafi, H., Araujo, R., Bowman, C.L., Brooks, S.Y., Buehler, E., Chan, A., Chao, Q., Chen, H., Cheuk, R.F., Chin, C.W., Chung, M.K., Conn, L., Conway, A.B., Conway, A.R., Creasy, T.H., Dewar, K., Dunn, P., Etku, P., Feldblyum, T.V., Feng, J., Fong, B., Fujii, C.Y., Gill, J.E., Goldsmith, A.D., Haas, B., Hansen, N.F., Hughes, B., Huizar, L., Hunter, J.L., Jenkins, J., Johnson-Hopson, C., Khan, S., Khaykin, E., Kim, C.J., Koo, H.L., Kremenetskaia, I., Kurtz, D.B., Kwan, A., Lam, B., Langin-Hooper, S., Lee, A., Lee, J.M., Lenz, C.A., Li, J.H., Li, Y., Lin, X., Liu, S.X., Liu, Z.A., Luros, J.S., Maiti, R., Marziali, A., Militscher, J., Miranda, M., Nguyen, M., Nierman, W.C., Osborne, B.I., Pai, G., Peterson, J., Pham, P.K., Rizzo, M., Rooney, T., Rowley, D., Sakano, H., Salzberg, S.L., Schwartz, J.R., Shinn, P., Southwick, A.M., Sun, H., Tallon, L.J., Tambunga, G., Toriumi, M.J., Town, C.D., Utterback, T., Van Aken, S., Vaysberg, M., Vysotskaia, V.S., Walker, M., Wu, D., Yu, G., Fraser, C.M., Venter, J.C., Davis, R.W.** 2000. Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 408:816-20.
- Thompson, G.A. and Li, C.** 1997. Altered fatty acid composition of membrana lipids in seeds and seedling tissues of high-stearate canola. *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Plant Lipids*, Williams J.P., Khan M.U. and Lem N.W., (eds), Kluwer, Dordrecht. ISBN 0-7923-4379-4. 313-315.
- Tomarelli, R.M., Meyer, B.J., weaber, J.R. and Bernhart, F.W.** 1969. Effect of positional distribution on the absorption of the fatty acids of human milk infant formulas. *J. Nutr.* 95: 583-590.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and 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.
- Trémolières, A., Dubacq, J.P. and Drapier, D.** 1982. Unsaturated fatty acids in maturing seeds of sunflower and rape: regulation by temperature and light intensity. *Phytochem.* 21: 41-45.
- Vander Wal, R.J.** 1960. Calculation of the distribution of the saturated and unsaturated acyl groups in fats, from pancreatic lipase hydrolysis data. *JAOCS*. 37: 18-20.

- Varshavsky, A. 2004. Spalog' and 'sequelog': neutral terms for spatial and sequence similarity. *Current Biology* 14: R181-183.
- Voelker, T.A., Worrel, A.C., Anderson, L., Bleibaum, J., Fan, C., Hawkins, D.J., Radke, S.E. and Davies, J.M. 1992. Fatty acid biosynthesis redirected to medium chains in transgenic oilseed plants. *Science*. 257: 72-74.
- Voelker T.A. and Davies H.M. 1994. Alteration of the specificity and regulation of fatty acid synthesis of *Escherichia coli* by expression of a plant medium-chain acyl-acyl carrier protein thioesterase. *J. Bacteriol.* 176: 7320-7327.
- Vrânceanu, A.V. 1977. El girasol. Ediciones mundi-prensa. Madrid.
- Warner, D., Mounts, T.L. and List, G.R. 1990. Effects of added tocopherols in the flavor stability of purified vegetable oils. *Inform* 1: 236.
- Wiberg, E., Tillberg, E. and Stymne, S. 1994. Substrates of diacylglycerol acyltransferase in microsomes from developing oil seeds. *Phytochem.* 36: 573- 577.
- Wilcox, J.R. and Cavins, J.F. 1985. Inheritance of low linolenic acid content of the seed oil of a mutant in *Glycine max*. *Theor. Appl. Genet.* 71: 74-78.
- Wilson, R.F. and Kwanyuen, P. 1986. Triacylglycerol synthesis and metabolism in germinating soybean cotyledons. *Biochim. Biophys. Acta.* 877: 231-237.
- Willett, W.C. 1994. Diet and health: What should we eat?. *Science* 264: 532- 537.
- Yoder, D.W., Nampaisansuk, M., Pirtle, I.L., Chapman, K.D. and Pirtle R.M. 1999. Molecular cloning and nucleotide sequence of a gene encoding a cotton palmitoyl-acyl carrier protein thioesterase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1446: 403-413.
- Yoshida, H. 1984. Molecular species and fatty acids distributions of triacylglycerols from germinating soybean cotyledons. *Lipids.* 19: 936-941.
- Yuan, L., Voelker, T. A. and Hawkins, D. J. 1995. Modification of the substrate specificity of an acyl-acyl carrier protein thioesterase by protein engineering. *Proc. Natl. Acac. Sci. USA.* 92: 10639-10643.
- Yuan, L., Nelson, B. A. and Gwyndolyn, C. 1996. The catalytic cysteine and histidine in the plant acyl-acyl carrier protein thioesterases. *J. Biol. Chem.* 271: 3417-3419.
- Zimmerman, D.C. and Fick, G.N. 1973. Fatty acid composition of sunflower (*Helianthus annuus* L.) oil as influenced by seed position. *J. Am. Oil Chem.Soc.* 50: 273-275.

- Zock, P.L., de Vries, J.H.M., de Fouw, N.J. and Katan, M.B.** 1995. Positional distribution of fatty acids in dietary triglycerides: effects on fasting blood lipoprotein concentrations in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 61: 48-55.
- Zhang, Y.-M., Rao, M. S., Heath, R. J., Price, A. C., Olson, A.J., Rock, C. O. and White, S. W.** 2001. Identification and analysis of the acyl carrier protein (ACP) docking site on β -ketoacyl-ACP synthase III. *J. Biol. Chem.* 276: 8231-8238.

Dr. M^c Josefa Serrano Vega
Caracterización de las Acul-ACP Tioesteradas de
semillas en desarrollo de girasol (*Helianthus annuus* L.)
y obtención de nuevas líneas alto saturado

19

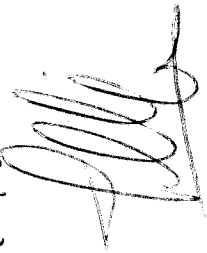
Julio

2009

Dr. Vazquez



El Presidente



Fuente: 

Dr. Vazquez

