

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA VEGETAL Y BIOLOGÍA MOLECULAR

REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD OLEATO DESATURASA

EN GIRASOL

Memoria del trabajo realizado para optar al título de Doctora
en Biología por la Licenciada



Cristina Mercedes Sarmiento Gas



Director
Dr. Rafael Garcés Mancheño
Colaborador Científico
del C.S.I.C.



Tutor
Dr. Miguel García Guerrero
Catedrático de Bioquímica
y Biología Molecular

TD
304



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para
que mi Tesis Doctoral REGULACION DE LA
ACTIVIDAD OLEATO DESATURASA
EN GIRASOL
sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

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

Firmado: CRISTINA M. SARMIENTO GAS

Sevilla, a 20 de ABRIL de 1995

3^{er} Culo

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SERVICIO DE BIBLIOTECA

Que se registra este Tesis Doctoral
al folio 220 número 113 del libro
correspondiente.

Sevilla, 29 OCT 1993

El Jefe del Negociado de Tesis,

Álvaro Caffre

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en *Bioquímica Vegetal y
Biología Molecular*
de la *Facultad de Biología*
de esta Universidad desde el día 25-10-93
hasta el día 11-11-93

Sevilla de de 19

EL DIRECTOR DE

Ángel José Ferrero

A mis padres y
a Tamás.

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de la Grasa (C.S.I.C.) bajo la dirección del Dr. Rafael Garcés Mancheño, a quien quiero agradecer su esfuerzo y dedicación.

Este agradecimiento quisiera hacerlo extensivo:

Al Instituto de la Grasa por poner a mi disposición el material e instrumental necesario para la realización de este trabajo, así como a su personal, cuya colaboración y apoyo me fueron brindados en todo momento.

A los miembros del equipo de investigación, especialmente al Dr. Manuel Mancha Perelló por sus consejos y orientaciones, y a D^a Carmen Ruíz Bayona por su cordial ayuda.

A Mercedes García de la Vega, Jose M^a García Martos, Gloria Márquez Ruíz, Manolo Alaiz y en general al personal de la "segunda planta" por sus correcciones y ayudas.

Al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de una beca del Plan Nacional de Formación de Personal Investigador.

INDICE DE MATERIAS

Indice de materias.....	i
Abreviaturas.....	vi
Indice de figuras.....	viii
Indice de tablas.....	ix

INTRODUCCIÓN

I. EL GIRASOL. IMPORTANCIA Y CARACTERÍSTICAS.....	1
I.1. Origen histórico e importancia del cultivo de girasol.....	1
I.1.1. Origen histórico.....	1
I.1.2. Importancia del cultivo y sus productos.....	2
I.2. Ciclo de vida del girasol.....	4
I.2.1. Ciclo de vida.....	4
I.2.2. Inflorescencia y frutos del girasol.....	5
I.2.3. Desarrollo de las semillas.....	7
I.3. Composición del aceite de girasol.....	8
I.4. El girasol alto oleico.....	10
II. LÍPIDOS DE PLANTAS. ESTRUCTURA Y DISTRIBUCIÓN.....	14
II.1. Los ácidos grasos.....	14
II.2. Los lípidos neutros.....	17
II.3. Los lípidos polares.....	18
III. BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS EN PLANTAS.....	21
III.1. Biosíntesis intraplástidial de ácidos grasos.....	21
III.1.1. Complejo acetil-CoA carboxilasa (ACC).....	23
III.1.2. Complejo ácido grasos sintetasa (FAS).....	24
III.1.3. Biosíntesis del ácido oleico.....	29
III.1.4. Transferencia de los ácidos grasos al citoplasma.....	30
III.1.5. Mecanismos de terminación de la síntesis "de novo".....	31
III.2. Biosíntesis extraplástidial de ácidos grasos.....	32
III.2.1. Desaturasas extraplástidiales.....	32
III.2.1.1. Biosíntesis de ácido linoleico.....	33
III.2.1.2. Biosíntesis de ácido linolénico.....	43
III.2.2. Biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga.....	45
III.2.3. Otras modificaciones extraplástidiales.....	47
III.2.3.1. Hidroxilaciones.....	47
III.2.3.2. Epoxidaciones.....	47

IV. BIOSÍNTESIS DE GLICEROLÍPIDOS EN PLANTAS.....	49
IV.1. Biosíntesis de lípidos neutros.....	49
IV.1.1. La ruta del glicerol-3-fosfato.....	49
IV.1.1.1. Formación del ácido fosfatídico.....	50
IV.1.1.2. Formación de los diacilglicéridos.....	51
IV.1.1.3. Acilación de los diacilglicéridos.....	53
IV.1.2. Papel de la PC en la formación de los TAG.....	54
IV.1.3. Interconversión entre PC y DAG.....	56
IV.2. Biosíntesis de fosfolípidos.....	58
IV.3. Biosíntesis de galactolípidos.....	62
IV.4. Formación de oleosomas.....	65
 V. REGULACIÓN DE LA DESATURACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POR TEMPERATURA...	69
V.1. Efecto de la temperatura en la insaturación de los lípidos en microorganismos.....	72
V.1.1. Microorganismos procariotas.....	72
V.1.2. Microorganismos eucariotas.....	75
V.2. Efecto de la temperatura en la insaturación de los lípidos en animales.....	77
V.3. Efecto de la temperatura en la insaturación de los lípidos en plantas.....	78
V.3.1. Regulación por temperatura de la desaturación de los ácidos grasos en hojas.....	79
V.3.2. Regulación por temperatura de la desaturación de los ácidos grasos en tejidos de reserva.....	81

MATERIALES Y MÉTODOS

I. MATERIALES.....	87
I.1. Material biológico.....	87
I.2. Condiciones de cultivo.....	88
 II. MÉTODOS.....	89
II.1. Métodos generales.....	89
II.1.1. Extracción de lípidos totales.....	89
II.1.2. Metilación de los lípidos.....	90
II.1.3. Determinación del contenido en lípidos.....	91
II.2. Métodos cromatográficos de separación de lípidos.....	92
II.2.1. Cromatografía en capa fina (CCF).....	92
II.2.1.1. Preparación de placas.....	92
II.2.1.2. Detección e identificación de las bandas.....	93
II.2.1.3. Separación de las principales clases de lípidos.....	93
II.2.1.4. Separación de los distintos lípidos polares.....	94
II.2.1.5. Separación de los distintos ácidos grasos.....	96

II.2.1.6. Análisis posicional de los ácidos grasos en los triacilglicéridos.....	96
II.2.2. Cromatografía gaseosa (GC).....	98
II.3. Obtención del ext ^o crudo y fracciones subcelulares.....	99
II.3.1. Obtención del extracto crudo.....	99
II.3.2. Obtención de oleosomas.....	99
II.3.3. Obtención de microsomas.....	100
II.4. Determinación de la actividad oleato desaturasa (ODS).....	101
II.4.1. Preparación de los sustratos radiactivos.....	101
II.4.1.1. Preparación del [¹⁴ C]-oleato amónico.....	101
II.4.1.2. Preparación del [¹⁴ C]-oleil-CoA.....	101
II.4.2. Determinación de la radiactividad en lípidos.....	102
II.4.2.1. Contador de centelleo líquido.....	102
II.4.2.2. Analizador lineal de placas.....	102
II.4.3. Determinación de la actividad ODS "in vivo".....	103
II.4.3.1. Incubación de tejido intacto.....	103
II.4.3.2. Análisis del producto de la reacción.....	103
II.4.4. Determinación de la actividad ODS "in vitro".....	105
II.4.4.1. Mezcla de reacción.....	105
II.4.4.2. Condiciones de la reacción.....	105
II.4.4.3. Análisis del producto de la reacción.....	105
II.5. Determinación de la actividad aciltransferasa.....	107
II.6. Inducción y represión de la actividad ODS por temperatura..	107
II.7. Incubaciones con antibióticos.....	108
II.8. Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida....	108
II.8.1. Preparación del ext ^o . de proteínas microsomales.....	108
II.8.1.1. Obtención y solubilización de microsomas.....	108
II.8.1.2. Medida de la concentración de proteínas.....	110
II.8.2. Electroforesis bidimensional.....	111
II.8.3. Tinción y secado de los geles.....	113
II.8.4. Análisis de los resultados.....	114

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE CULTIVO DE LAS PLANTAS EN EL GRADO DE INSATURACIÓN DE LOS LÍPIDOS DE LAS SEMILLAS DE GIRASOL.....	115
I.1. Efecto de la temperatura de cultivo en la composición de ácidos grasos del girasol normal y alto oleico.....	115
I.1.1. Plantas crecidas a temperatura variable día/noche.....	115
I.1.1.1. Composición de ácidos grasos de lípidos totales.....	116
I.1.1.2. Composición de ácidos grasos de lípidos polares.....	119
I.1.2. Plantas crecidas a temperatura constante día/noche.....	123
I.1.2.1. Plantas crecidas a 24°C constante.....	123
I.1.2.2. Plantas crecidas a 12°C constante.....	125
I.2. Efecto de la temperatura de crecimiento en la actividad ODS..	128

I.2.1.	Efecto de la temperatura de ensayo en la actividad ODS de palntas crecidas a alta y baja temperatura.....	128
I.2.2.	Efecto de la temperatura de crecimiento y preincubación en la actividad ODS.....	130
II.	INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD OLEATO DESATURASA POR FRÍO.....	134
II.1.	Inducción de la actividad ODS en semillas incubadas a cinco temperaturas.....	134
II.1.1.	Composición de ácidos grasos de los lípidos totales.....	135
II.1.2.	Actividad ODS "in vivo".....	136
II.1.3.	Incorporación de los ácidos grasos radiactivos en los distintos tipos de lípidos.....	137
II.2.	Inducción de la desaturación del oleico por frío y determinación de la actividad "in vitro".....	139
II.2.1.	Composición de ácidos grasos de lípidos totales, triacilglicéridos y fosfatidilcolina.....	140
II.2.2.	Actividad ODS "in vivo" e incorporación de linoleato en distintos tipos de lípidos.....	141
II.2.3.	Actividad ODS "in vitro".....	143
II.3.	Inducción de la actividad ODS a tiempos más cortos en plantas de girasol.....	144
II.4.	Factores que afectan a la inducción de la actividad ODS por frío.....	146
II.4.1.	Efecto del volúmen de agua.....	146
II.4.2.	Efecto de oxígeno.....	148
II.4.3.	Efecto de la agitación.....	150
II.4.4.	Efecto del troceamiento.....	152
II.4.5.	Inducción de la actividad ODS a 5°C.....	154
II.4.6.	Inducción de la ODS a distintas edades.....	155
II.5.	Efecto de la cicloheximida en la inducción de la actividad ODS por frío.....	157
II.5.1.	En la inducción durante 24 horas a 10°C.....	158
II.5.2.	En la inducción durante 4 horas a 10°C.....	159
II.6.	Metabolismo de los triacilglicéridos en la inducción de la desaturación del ácido oleico por frío.....	162
II.6.1.	Determinación de los contenidos netos de ácido oleico y linoleico en lípidos de reserva antes y después de la incubación en frío.....	162
II.6.2.	Estudio "in vivo" del metabolismo de los TAG durante la inducción de la desaturación del ácido oleico por frío..	166
III.	DETECCIÓN POR ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DE POLIPÉPTIDOS RELACIONADOS CON LA DESATURACIÓN DEL ÁCIDO OLEICO Y SU REGULACIÓN POR TEMPERATURA.....	171

III.1. Comparación de polipéptidos microsomales de girasol normal y alto oleico.....	174
III.2. Comparación de polipéptidos microsomales de girasol normal inducido y no inducido por frío.....	178
IV. REPRESIÓN Y REINDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD OLEATO DESATURASA POR CAMBIOS DE TEMPERATURA.....	181
IV.1. Inducción y represión de la actividad ODS a 10°C durante 48 horas.....	182
IV.2. Represión de la actividad ODS por alta temperatura y reinducción por frío.....	185
IV.3. Estudio de la represión y reinducción en distintas fracciones subcelulares.....	189
IV.4. Estudio de la represión y reinducción en distintos tipos de lípidos polares.....	194
IV.5. Estudio de la inducción por frío y represión por calor en hojas de girasol.....	203
CONCLUSIONES.....	208
BIBLIOGRAFÍA.....	212

ABREVIATURAS

ACC	Acetil-CoA Carboxilasa
ACP	Proteína Transportadora de Lípidos
ADP	Adenosin Difosfato
AMP	Adenosin Monofosfato
ATP	Adenosin Trifosfato
BHT	Butilhidroxitolueno
CCF	Cromatografía en capa fina
CD	Citidilo
CDP	Citidil Difosfato
CMP	Citidil Monofosfato
CoA	Coenzima A
DAG	Diacilglicéridos
DDF	Días Después de Floración
DDT	Ditiotreitol
DGDG	Digalactosildiacilglicéridos
DPG	Difosfatidilglicerol
DPM	Desintegraciones por minuto
DSQG	Diacilsulfoquinovosilglicerol
EDTA	Ácido Etilendiaminotetracético
EDS	Estearato desaturasa
FAS	Ácido Graso Sintetasa
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2- etanosulfónico
IEF	Isoelectroenfoque
KAS	β -Cetoacil Sintetasa

MAG	Monoacilglicéridos
MGDG	Monogalactosildiacilglicéridos
ODS	Oleato desaturasa
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
PGP	Fosfatidilglicerolfosfato
PI	Fosfatidilinositol
PS	Fosfatidilserina
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo
RE	Retículo Endoplasmático
SDS	Dodecilsulfato sódico
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilendiamina
TRIS	Tris-Hidroximetil-aminometano
UDP	Uridil difosfato
14:0	Ácido mirístico
16:0	Ácido palmítico
16:1	Ácido palmitoleico
16:3	Ácido hexadecatrienoico
17:0	Ácido heptadecanoico
18:0	Ácido esteárico
18:1	Ácido oleico
18:2	Ácido linoleico
18:3	Ácido linolénico
20:0	Ácido araquídico
22:0	Ácido behénico
22:1	Ácido erúcico
24:0	Ácido lignocérico

INDICE DE FIGURAS

Fig.1. Inflorescencia de girasol.....	5
Fig.2. Fruto de girasol.....	6
Fig.3. Estructura de los lípidos neutros.....	17
Fig.4. Estructura de los principales fosfolípidos.....	18
Fig.5. Estructura de los principales glucolípidos.....	19
Fig.6. Esquema general de la biosíntesis de ácidos grasos en plantas.....	22
Fig.7. Estructura del complejo ácido graso sintetasa.....	27
Fig.8. Ruta del glicerol-3-P incluyendo el papel de la fosfatidilcolina en la formación de los TAG.....	55
Fig.9. Biosíntesis de fosfolípidos en plantas.....	61
Fig.10 Biosíntesis de galactolípidos en plantas.....	62
Fig.11. Diferencias entre la rutas procariota y eucariota de síntesis de galactolípidos.....	64
Fig.12. Modelo de Wanner de formación de los oleosomas.....	67
Fig.13. Productos de la hidrólisis de TAG con lipasa pancreática...	97
Fig.14. Cuantificación de la radiactividad en lípidos mediante el analizador lineal de radiactividad.....	104
Fig.15. Cuantificación de la radiactividad incorporada a lípidos polares mediante el analizador lineal de radiactividad....	106
Fig.16. Recta de calibrado para la determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford.....	110
Fig.17. Efecto de la temperatura de ensayo en la actividad ODS microsomal de semillas crecidas a alta y baja temperatura..	129
Fig.18. Efecto de la temperatura en la actividad ODS "in vivo"....	137
Fig.19. Incorporación de [¹⁴ C]-ácidos grasos en los distintos tipos de lípidos.....	138
Fig.20. Efecto de la edad de las semillas en la inducción de la actividad ODS por frío.....	156
Fig.21. Patrones de proteínas microsomales del girasol normal y alto oleico.....	176
Fig.22. Patrones de proteínas microsomales del girasol normal inducido y no inducido por frío.....	179
Fig.23. Represión y reinducción por cambio de temperatura de la actividad ODS microsomal.....	187

INDICE DE TABLAS

Tab.1. Composición de ácidos grasos del aceite de girasol normal.....	8
Tab.2. Ejemplos de los principales ácidos grasos vegetales.....	16
Tab.3. Líneas de girasol usadas en esta tesis.....	87
Tab.4. Composición de ácidos grasos en lípidos totales de semillas de girasol normal y alto oleico crecidos a alta y a baja temperatura variable.....	117
Tab.5. Composición de ácidos grasos en lípidos polares de semillas de girasol normal y alto oleico crecidos a alta y a baja temperatura variable.....	120
Tab.6. Composición de ácidos grasos en lípidos totales de semillas de girasol normal y alto oleico crecidos a 24°C.....	124
Tab.7. Composición de ácidos grasos en lípidos totales de semillas de girasol normal crecido a 12°C.....	126
Tab.8. Efecto de la temperatura de crecimiento y preincubación en la actividad ODS "in vitro".....	132
Tab.9. Composición de ácidos grasos de semillas incubadas a cinco temperaturas.....	136
Tab.10. Composición de ácidos grasos de lípidos totales, TAG y PC a tres temperaturas.....	141
Tab.11. Actividad ODS "in vivo" e incorporación de linoleato en TAG y PC a tres temperaturas.....	142
Tab.12. Actividad ODS "in vitro" a tres temperaturas.....	143
Tab.13. Actividad ODS "in vitro" y composición de ácidos grasos total y microsomal de semillas inducidas por frío.....	145
Tab.14. Efecto del volumen de agua en la inducción de la actividad ODSporfrío.....	147
Tab.15. Efecto del oxígeno en la inducción de la actividad ODSporfrío.....	149
Tab.16. Efecto de la agitación en la inducción de la actividad ODSporfrío.....	151-152
Tab.17. Efecto del troceamiento en la inducción de la actividad ODSporfrío.....	153
Tab.18. Inducción de la actividad ODS a 5 y 10°C.....	154
Tab.19. Efecto de la cicloheximida en la inducción de la actividad ODS durante 24 horas a 10°C.....	159
Tab.20. Efecto de la cicloheximida en la inducción de la actividad ODS durante 4 horas a 10°C.....	160
Tab.21. Cuantificación de la desaturación del ácido oleico en lípidos totales y TAG.....	164-165

Tab.22. Metabolismo del [¹⁴ C]-oleato en TAG de semillas inducidas por frío.....	167
Tab.23. Composición de ácidos grasos de semillas de girasol normal, normal inducido por frío y alto oleico para electroforesis....	172
Tab.24. Actividad ODS y aciltransferasa en semillas de girasol normal, normal inducido por frío y alto oleico para electroforesis....	173
Tab.25. Diferencias entre los patrones polipéptidicos microsomales del girasol normal y alto oleico.....	175
Tab.26. Diferencias entre los patrones polipéptidicos microsomales del girasol normal inducido y no inducido por frío.....	175
Tab.27. Inducción de la actividad ODS en semillas de girasol durante 24 horas a 10°C.....	183
Tab.28. Inducción, represión y reinducción de la actividad ODS en distintas fracciones subcelulares.....	192
Tab.29. Composición de ácidos grasos de distintos tipos de lípidos en la inducción, represión y reinducción de la actividad ODS..	197
Tab.30. Composición de ácidos grasos de distintos lípidos polares en la inducción, represión y reinducción de la actividad ODS..	201
Tab.31. Composición de ácidos grasos de lípidos totales de hojas de girasol a distintas temperaturas.	

INTRODUCCIÓN

I. EL GIRASOL. IMPORTANCIA Y CARACTERÍSTICAS.

I.1. Origen histórico e importancia del cultivo de girasol.

I.1.1. Origen histórico.

El cultivo del girasol (*Helianthus annuus* L.) parece que comenzó en Arizona y Nuevo Méjico alrededor del año 3000 a.C. (Semelczi-Kovacs, 1975). Existen pruebas históricas y etnográficas que atestiguan la utilización de las semillas de girasol silvestre por los indios norteamericanos como alimento y condimento en tiempos precolombinos. Algunas tribus lo usaron además con fines curativos y en ceremonias religiosas. No se sabe si, en la época precolombina, los indios conocían la posibilidad de utilización de las semillas de girasol como fuente de aceite (Vrânceanu, 1977). Los colonizadores españoles en Norteamérica usaron el girasol en su alimentación y lo introdujeron en España a mediados del siglo XVII. Desde la península ibérica el girasol se difundió muy rápidamente por Francia, Italia, Norte y Este de Europa. Durante casi los 250 años posteriores el girasol se cultivó, principalmente, como planta ornamental. No fue hasta principios del siglo XVIII cuando el girasol destaca como planta oleaginosa, aunque en principio su aceite no se introdujo como un aceite comestible sino como materia prima en la industria textil. En los primeros decenios del siglo XIX el girasol fue aclimatado a Rusia y en 1830 comenzó allí la producción de aceite a nivel industrial y su uso en

alimentación, que posteriormente se fue extendiendo sobre todo a otros países de la Europa del Este. Sin embargo, el gran aumento en la producción de girasol y de otros aceites vegetales no tuvo lugar hasta la segunda mitad del presente siglo, y se debió a un inmenso esfuerzo para mejorar la producción de los cultivos y gracias a la existencia de nuevas tierras de cultivo.

I.1.2 Importancia del cultivo y sus productos.

Los cultivos de plantas productoras de aceite han aumentado mucho en todo el mundo, convirtiéndose en una parte vital del sector agrícola en muchos países. Entre las plantas productoras de aceite se pueden distinguir tres tipos: 1) plantas anuales o bianuales como la soja, el girasol, la colza, el cártamo y el cacahuete. 2) plantas perennes tipo árbol como el coco, el olivo y la palma. 3) plantas como el algodón o el maíz en las que el aceite obtenido de las semillas o el germen es un producto secundario. La mayoría de los aceites vegetales se obtienen de las semillas oleaginosas aunque hay plantas como la palma o el olivo en los que el aceite se extrae de la parte carnosa del fruto. Las zonas templadas son las principales áreas productoras de semillas oleaginosas. En Europa y América se producen el 60% de las semillas oleaginosas del mundo (datos de 1984/86, Hatje, 1989). En la campaña 1991/92 se produjeron en el mundo 7.2 millones de toneladas métricas de aceite de girasol,

principalmente en Rusia, Argentina, China, la Comunidad Europea y EEUU. El aceite de girasol ocupa hoy día el cuarto lugar mundial en la producción de aceites para alimentación tras la soja, la palma y la colza (Dossier Oleo, 1992). En la Comunidad Europea el girasol ocupa el segundo lugar en producción tras la colza (Hauman et al., 1988). El crecimiento del cultivo de girasol en España ha sido espectacular pasándose de 38.000 Has en 1968 a 1.200.000 en 1990 (Anuario de Estadística Agraria, 1991) de las cuales cerca de 500.000 Has se encuentran en Andalucía.

El aceite de girasol se usa principalmente para consumo alimentario como aceite para cocinar y para ensaladas, y en la fabricación de margarinas y "shortenings" (Sonntag, 1979). Las semillas de girasol con alto contenido en grasa (40%) son las que generalmente se cultivan para la producción de aceite, mientras que las de bajo contenido graso (30%) se cultivan para el consumo directo de animales y humanos (White, 1992). El aceite de girasol no es comúnmente empleado para usos industriales, sin embargo, se usa en ciertas cantidades para fabricación de pinturas, barnices y plásticos. También se usa en la fabricación de jabones y detergentes.

I.2. Ciclo de vida del girasol.

El girasol es una planta dicotiledónea, anual y herbácea perteneciente a la familia Compositae. Existen una gran cantidad de subespecies y variedades, tanto silvestres como cultivadas, de la especie *Helianthus annuus* L.

I.2.1. Ciclo de vida.

El ciclo de vida del girasol es de unos tres a cuatro meses, pudiendo dividirse en cinco fases:

I. Germinación y emergencia. Desde la siembra hasta la aparición de los cotiledones. Dura de 5 a 7 días.

II. Formación de las primeras hojas. Desde la aparición de los cotiledones hasta la formación de dos o tres pares de hojas verdaderas. Dura de 7 a 10 días.

III. Crecimiento activo. Comprende desde la anterior hasta la formación del botón floral. Dura de 50 a 60 días.

IV. Floración. Comienza con la apertura de las flores liguladas a la que sigue la apertura de la flores de los anillos interiores del capítulo. En ella se produce la polinización y fecundación de las flores. Dura de 10 a 12 días.

V. Maduración. Comienza con el final de la floración y llega hasta el estado de madurez fisiológica del aquenio. Dura 30-40 días.

La duración de las distintas fases varía según la temperatura de cultivo, siendo el crecimiento más lento a temperaturas bajas.

I.2.2. Inflorescencia y frutos del girasol.

La inflorescencia o capítulo del girasol es un disco de 10 a 40 cm de diámetro formado por un tejido de naturaleza esponjosa donde se insertan las flores. El anillo exterior del capítulo está formado por flores liguladas estériles con función de atracción. Las flores interiores son tubulares y forman círculos espirales desde el centro hacia afuera. Las primeras flores en abrirse son las más externas del capítulo. Cada día durante la floración se abren de uno a varios anillos de flores. La polinización y fecundación son rápidas. Los óvulos una vez fecundados crecen llenándose de sustancias de reserva hasta que se convierten en el aquenio maduro (fig.1).

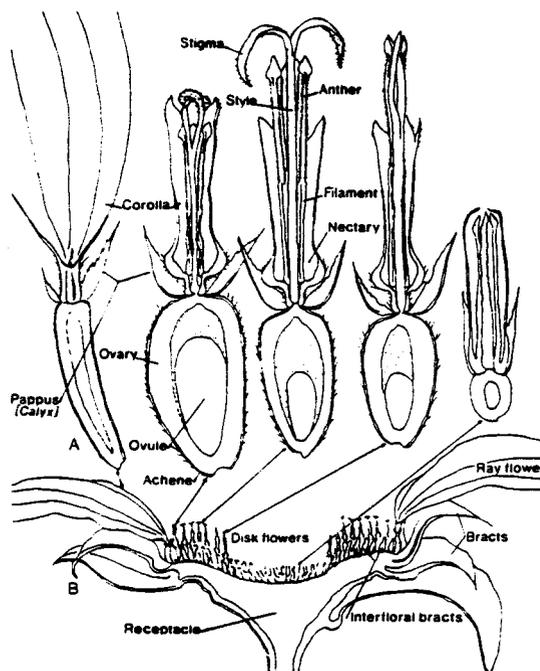


Figura 1. Sección longitudinal de una cabeza de girasol con flores individuales (Tomado de Fick, 1989).

El fruto de girasol es un aquenio de tamaño variable de 7 a 17 mm de longitud que consta de las siguientes partes:

- Pericarpo (cáscara): Envuelta exterior dura y fibrosa que queda pegada a la semilla excepto en sus aristas.

- Semilla (con frecuencia se llama semilla al fruto completo) está en el interior del pericarpo recubierta con una envuelta llamada membrana seminal que crece con ella. Consta de dos cotiledones y de la gémula (fig. 2). Los cotiledones representan la reserva principal de aceite de la semilla. La gémula, situada entre los dos cotiledones, está formada principalmente de células alargadas que al germinar la semilla pueden dar lugar rápidamente a la radícula (Vrâceanu, 1977).

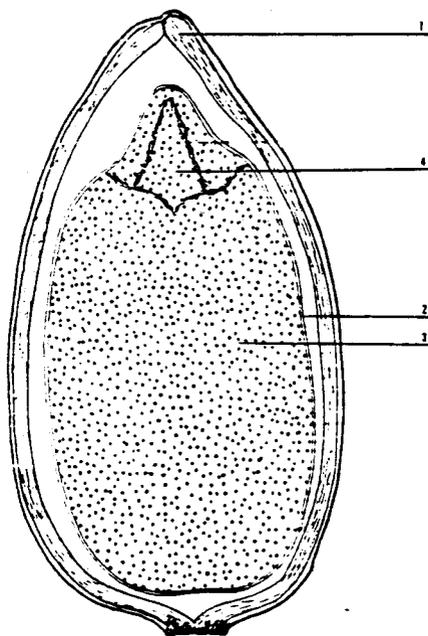


Figura 2. Sección longitudinal de un aquenio. 1. Pericarpo; 2. Membrana seminal; 3. Cotiledón; 4. Gémula. (Tomado de Vrâceanu, 1977).

I.2.3. Desarrollo de las semillas.

La formación de lípidos en las semillas oleaginosas durante el desarrollo se puede dividir en tres etapas (revisión en Slack y Browse, 1984). En la etapa inicial, antes del inicio de la acumulación rápida de lípidos (en girasol hasta 12-14 DDF), predominan los lípidos estructurales (lípidos polares) y son escasos los lípidos de reserva (triacilglicéridos). En la segunda etapa se produce un crecimiento de las semillas mucho más rápido que coincide con el período de acumulación del aceite. En girasol esta etapa comienza entre 12-14 DDF y continúa hasta aprox. 30 DDF. El almacenamiento de aceite es muy rápido en este período así como el aumento del peso seco de las semillas (Roberston *et al.*, 1978). Los triacilglicéridos se convierten en los lípidos predominantes. A partir de los 30 DDF no se produce prácticamente síntesis de lípidos, la semilla va alcanzando su madurez, el peso seco de la semilla y el contenido en aceite aumentan muy poco y se produce una progresiva disminución en el contenido de agua.

Los lípidos polares, que incluyen fundamentalmente fosfolípidos y glucolípidos, constituyen una proporción importante (más del 50%) de los lípidos totales presentes en los estadios iniciales de formación de las semillas. Sin embargo, tan pronto como comienza la síntesis y acumulación activa de lípidos de reserva (12-14 DDF) se convierten en una fracción minoritaria, siendo en la semilla madura menos de un 3% de los lípidos totales (Grewal *et al.*, 1978).

I.3. Composición del aceite de girasol.

El aceite de girasol tiene una composición de ácidos grasos muy variable, que se ve afectada por factores genéticos y por la temperatura ambiente. Los ácidos grasos mayoritarios (tab. 1) son el ácido linoleico (18:2), el ácido oleico (18:1), el ácido esteárico (18:0) y el ácido palmítico (16:0). También se detecta algo de ácido araquídico (20:0). En proporciones menores al 1% se pueden detectar los ácidos mirístico (14:0), palmitoleico (16:1), linolénico (18:3), gadoleico (20:1), behénico (22:0), erúcico (22:1), y lignocérico (24:0). Todos los ácidos grasos insaturados tienen los dobles enlaces en posición *cis* (Gunstone *et al.*, 1986).

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

Ácido Graso	%	Ácido Graso	%	Ácido Graso	%
14:0	< 0.5	18:1	14-65	20:1	< 0.5
16:0	3-10	18:2	20-75	22:0	< 1.0
16:1	< 1.0	18:3	< 0.7	22:1	< 0.5
18:0	1-10	20:0	< 1.5	24:0	< 0.5

En el girasol normal, existe una fuerte relación entre la temperatura y los contenidos relativos de los ácidos oleico y linoleico. A mayor temperatura durante la maduración

de las semillas, mayor proporción de 18:1 y menor de 18:2, variando los contenidos entre aproximadamente un 13-50% de oleico y un 44-75% de linoleico (Nagao y Yamazaki, 1983). Las modificaciones genéticas producidas en girasol mediante el uso de agentes mutagénicos han dado lugar a mutantes de girasol con distinta composición de ácidos grasos. Hasta ahora se han descrito dos mutantes de girasol con la composición de ácidos grasos modificada. El primero es el llamado girasol "alto oleico" (Soldatov, 1976), cuyo aceite contiene entre un 80-90% de ácido oleico y que se ve poco afectado por la temperatura de cultivo. El segundo es un mutante "alto palmítico" obtenido por Ivanov *et al.* (1988) y que contiene aproximadamente un 25% de ácido palmítico, frente al 3-10% que se considera normal en girasol.

Los triacilglicéridos mayoritarios en el aceite de girasol son LLO, LLL, LOO, LLS y LOS, designando los ácidos grasos como L=18:2, O=18:1, S=saturados (18:0 y 16:0); los minoritarios (<1%) son: LSS, OOS y OSS (Gunstone *et al.*, 1986). El aceite de girasol contiene además algunas ceras (<0.01%) y mucílagos pero menos que el de maíz o el de semilla de algodón. Su contenido en ácidos grasos libres es del 0.5%, similar a otros aceites de semillas oleaginosas (Campbell, 1983). Los fosfolípidos mayoritarios son la fosfatidilcolina (48.7%), el fosfatidilinositol (27.9%), la fosfatidiletanolamina (21.2%) y el ácido fosfatídico (2.2%) (Chapman, 1980). En total no suponen más del 1% en peso del aceite de girasol. El contenido total en tocoferoles es de alrededor de 700 mg/Kg (0.07%), similar al de soja, maíz o

algodón (Landers y Rathmann, 1981). Sin embargo, el girasol tiene un contenido en α -tocoferol (600 mg/kg de aceite) mayor que la soja, colza, cártamo, cacahuete, maíz, coco. El α -tocoferol es el de mayor actividad como vitamina E (Campbell, 1983). En menores cantidades contiene β -tocoferol (17 mg/Kg) y γ -tocoferol (11 mg/Kg). Este último es el de mayor actividad antioxidante (Müller-Mulot, 1976).

El alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados hace que el aceite de girasol esté muy bien considerado desde un punto de vista nutricional. Generalmente, se acepta que aumentar la proporción de ácidos grasos insaturados respecto a los saturados en la dieta reduce el nivel de colesterol en plasma, el cual está relacionado positivamente con la incidencia de enfermedades coronarias (McNamara, 1992). Por su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados, el aceite de girasol es bastante susceptible a sufrir alteraciones oxidativas siendo menos estable térmicamente que otros aceites vegetales (Waner et al., 1989).

I.4. El girasol alto oleico.

El girasol alto oleico, que se comenzó a comercializar en EEUU en 1984 (Purdy, 1986), y que ya se puede adquirir en los mercados españoles, se obtiene de las semillas del mutante alto oleico de girasol. Este mutante fue obtenido en Rusia por Soldatov (1976), mediante tratamiento de semillas de girasol normal con el mutágeno dimetilsulfato. La

selección y mejora de su progenie dio lugar a girasoles (var. Pervenet) con alto contenido de ácido oleico (80-90%) estable en diferentes condiciones climáticas. Posteriormente en EEUU, Fick (1984) desarrolló progenies de la variedad Pervenet incorporando en híbridos los genes adecuados para su producción comercial. Y al mismo tiempo, en España, Fernández-Martínez et al. (1987) obtuvieron dos líneas puras del mutante alto oleico también a partir del mutante ruso.

La expresión del carácter alto oleico en este mutante tiene lugar exclusivamente en las semillas en desarrollo (Garcés et al., 1989), que sufren una falta de capacidad de desaturar ácido oleico (Garcés y Mancha, 1989), encontrándose su actividad oleoil-fosfatidilcolina desaturasa microsomal reducida a niveles despreciables desde el momento en que comienza la síntesis activa de los lípidos en las semillas. El mutante alto oleico presenta actividad desaturasa en los primeros días de la formación de las semillas previos a la síntesis activa de lípidos. Esto puede deberse a la existencia de suficiente actividad oleato desaturasa residual para cubrir las pequeñas demandas en este período, pero cuando se acelera la síntesis de lípidos, ésta actividad residual no es suficiente. Alternativamente, es posible que el mutante alto oleico haya sufrido alguna alteración en los mecanismos regulatorios que provoque que la actividad oleato desaturasa no se induzca o bien sea reprimida prematuramente. Esta última hipótesis parece más consistente con los resultados de experimentos realizados con marcaje radiactivo (Garcés y Mancha, 1989) que mostraron que la actividad oleato

desaturasa microsomal desaparece drásticamente de las semillas del mutante alrededor de los 15 DDF mientras que en las semillas de girasol normal está aumentando a esa edad. Las otras actividades implicadas en la desaturación del ácido oleico en los microsomas, es decir la lisofosfatidilcolina aciltransferasa y las de la cadena transportadora de electrones, permanecen inalteradas en este mutante (Garcés y Mancha, 1989; Sperling *et al.*, 1990).

El control genético del carácter alto oleico parece ser bastante complejo. Miller *et al.* (1987) propusieron un modelo consistente en un gen parcialmente dominante, *Ol*, en conjunción con un segundo gen, *Ml*, cuyo alelo recesivo, *ml*, era necesario para la expresión de este carácter. Más tarde, Fernández-Martínez *et al.* (1989), propusieron un modelo diferente en el cual tres genes dominantes y complementarios, *Ol₁*, *Ol₂* y *Ol₃*, eran necesarios para explicar la herencia del carácter alto oleico. Las discrepancias entre estos resultados pueden ser debidas al distinto fondo genético de las variedades empleadas. Se puede concluir que al menos tres genes están implicados en la transmisión de este carácter y que la naturaleza dominante de la mutación alto oleico no parece correlacionarse fácilmente con la falta de actividad oleato desaturasa en este mutante. Estos resultados sugieren que la falta de actividad oleato desaturasa no se debe a pérdida o alteración del enzima pues en ese caso sería de esperar una herencia recesiva, sino que lo que posiblemente estén alteradas en el mutante sean proteínas reguladoras de la expresión de la actividad oleato desaturasa (Ohlrogge *et*

al., 1991).

La composición del aceite de girasol alto oleico, se diferencia de la del girasol normal, únicamente, en la composición de ácidos grasos. El girasol alto oleico contiene un 80-90% de ácido oleico, un 6-9% de ácido linoleico, un 3-4 % de ácido palmítico y un 3-4% de ácido esteárico. Los otros componentes de este aceite incluyendo ácidos grasos libres, ceras, esteroides, fosfolípidos, etc. se encuentran a los mismos niveles que en el aceite de girasol normal (Purdy, 1986). La otra diferencia importante con el girasol normal es que el grado de insaturación de este aceite es bastante constante respecto a la temperatura de cultivo de la planta, fluctuando solamente unas 3-5 unidades de porcentaje al ser cultivado en un amplio intervalo de temperaturas (Fernández-Martínez *et al.*, 1986).

La ventaja principal del uso del aceite de girasol alto oleico frente al girasol normal es su mayor estabilidad a la termooxidación, lo que lo hace muy recomendable como aceite para frituras pues muestra un comportamiento muy similar al del aceite de oliva (Dobarganes *et al.*, 1993).

II. LÍPIDOS DE PLANTAS. ESTRUCTURA Y DISTRIBUCIÓN.

Tradicionalmente, se consideran lípidos a aquellos compuestos naturales que son solubles en disolventes orgánicos como eter de petróleo, eter etílico o cloroformo. Incluyen una gran variedad de estructuras diferentes, de las que la mayoría contienen ésteres de ácidos grasos. Los principales lípidos vegetales pueden dividirse en lípidos simples, formados únicamente por ácidos grasos y glicerol; y lípidos complejos, que además de glicerol y ácidos grasos contienen otros compuestos no lipídicos o polares. A estos últimos se les denomina también lípidos polares. Algunos autores incluyen dentro del concepto de lípido a sustancias no glicéridas como las ceras, los carotenos y los esteroides.

II.1. Los ácidos grasos.

Los ácidos grasos son los constituyentes fundamentales de todas las clases de lípidos. La mayoría de las especiales propiedades físicas y químicas de los lípidos se deben a las largas cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos. Los ácidos grasos de origen natural están formados por una cadena hidrocarbonada con un número par de átomos de carbono y un grupo carboxilo en uno de los extremos. Varios cientos de ácidos grasos han sido detectados en tejidos vegetales (Hilchcock y Nichols, 1971), pero la mayoría de ellos se encuentran en pocas especies vegetales.

Los ácidos grasos mayoritarios son, los ácidos grasos saturados, laúrico, mirístico, palmítico y esteárico; y los ácidos grasos insaturados, oleico, linoleico y linolénico (tab. 2). Estos siete ácidos grasos constituyen el 94% de los ácidos grasos de los aceites comerciales y el 89-97% de los ácidos grasos de tejidos verdes. Los ácidos grasos monoinsaturados contienen un doble enlace, generalmente *cis*, en posición $\Delta 9$ (contando a partir del grupo carboxilo) y los poliinsaturados tienen los dobles enlaces *cis* interrumpidos por un grupo metileno.

Los ácidos grasos minoritarios tienen estructuras similares a los mayoritarios pero difieren, normalmente, en la longitud de la cadena. Los ácidos grasos de cadena larga, araquídico (20:0), behénico (22:0) y lignocérico (24:0) forman parte de las ceras de semillas y hojas (Kolattukudy, 1970). De los ácidos grasos minoritarios los más importantes son el palmitoleico (16:1, *trans*), que forma parte de los lípidos polares de tejidos fotosintéticos y el araquídico, que es muy abundante en helechos y mohos (Wolff, 1966).

Los ácidos grasos inusuales solo se encuentran en las semillas de pocas especies vegetales. Entre ellos se pueden encontrar ácidos grasos con triples enlaces, ramificados, con distintos substituyentes (epoxi, hidroxilo, etc.) y con estructuras cíclicas.

Tabla 2. Algunos ejemplos de los principales ácidos grasos vegetales.

Nombre Común	Símbolo	Estructura
<u>1) Ácidos Grasos Mayoritarios</u>		
Laúrico	12:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
Mirístico	14:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
Palmítico	16:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
Estearico	18:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
Oleico	18:1(Δ^9)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Linoleico	18:2($\Delta^9, 12$)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Linolénico	18:3($\Delta^9, 12,$ 15)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$ $(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
<u>2) Ácidos Grasos Minoritarios</u>		
Palmitoleico	16:1(Δ^9, t)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Araquídico	20:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
Behénico	22:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$
<u>3) Ácidos Grasos Inusuales</u>		
Tarírico		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$
Esterculico		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\underset{\text{CH}_2}{\text{C}}=\text{C}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Vernólico		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\underset{\text{O}}{\text{CH}}-\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Ricinoleico		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CHOHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$

II.2. Los lípidos neutros.

Los lípidos neutros son los triacilglicéridos (TAG), diacilglicéridos (DAG) y monoacilglicéridos (MAG). Los TAG son los principales componentes de este grupo, encontrándose en concentraciones enormemente altas en las semillas oleaginosas donde son la principal reserva energética. Los DAG y MAG, al ser intermediarios metabólicos que no se acumulan, se encuentran en cantidades mucho menores. Químicamente, los TAG son ésteres de glicerol con tres ácidos grasos de igual o distinto tipo. Los DAG sólo están esterificados en dos posiciones y pueden ser 1,2-DAG, 2,3-DAG ó 1,3-DAG. Por último, los MAG tienen un solo ácido graso esterificando las posiciones *sn*-1, *sn*-2 ó *sn*-3 (fig. 3)

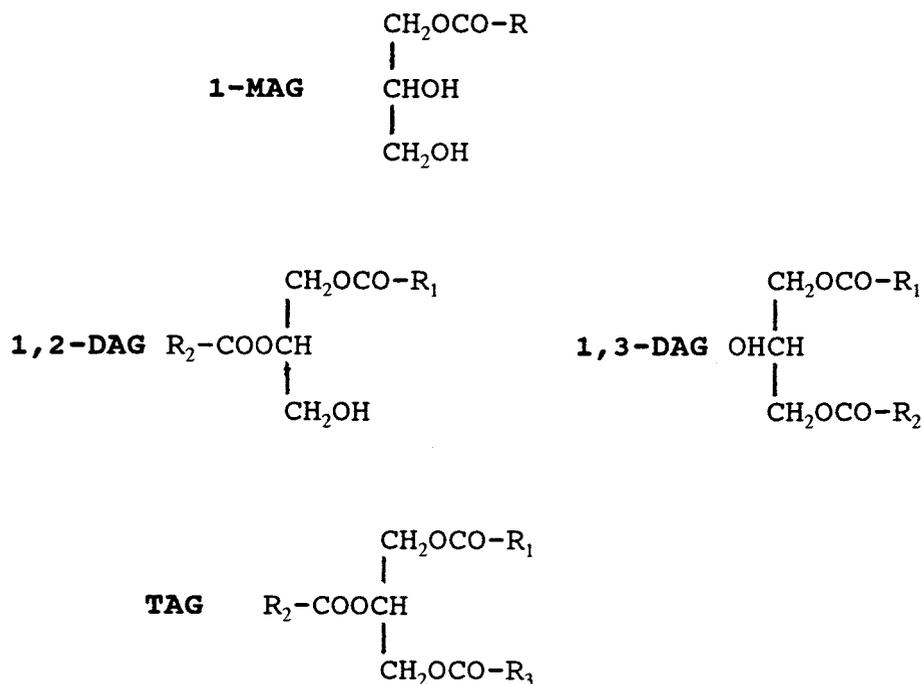


Figura 3. Lípidos neutros. R=grupo acilo.

II.3. Los lípidos polares.

Los lípidos polares o lípidos complejos de plantas se pueden dividir en dos grupos.

1) Los fosfoglicerolípidos o fosfolípidos son aquellos que contienen glicerol, ácidos grasos, fosfato inorgánico y una base orgánica o un compuesto polihidroxiado. Los componentes no grasos se encuentran siempre unidos a la posición *sn*-3 del glicerol por lo que tienen configuración L (fig. 4). Los fosfolípidos se encuentran en todos los tejidos vegetales generalmente formando parte de las membranas vegetales. La fosfatidilcolina (PC) es el fosfolípido principal en la mayoría de los tejidos, seguida por la fosfatidiletanolamina (PE) y el fosfatidilinositol (PI). El fosfatidilglicerol (PG) es el fosfolípido más importante de los cloroplastos y suele contener altas proporciones de ácido palmítico y palmitoleico.

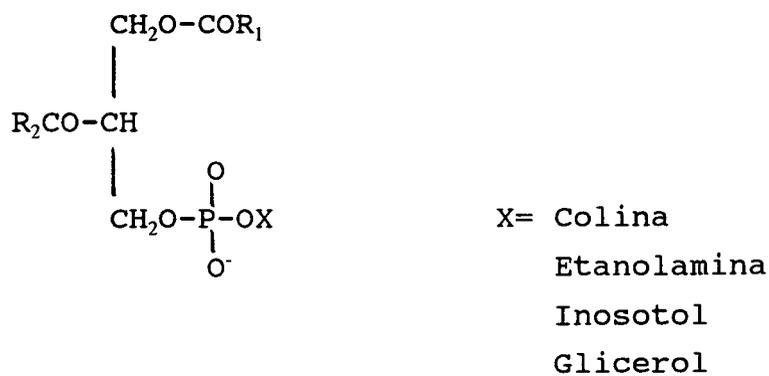


Figura 4. Estructura de los principales fosfolípidos. R=grupos acilos. X=substituyentes polares.

2) Los glucoalcolípidos o glucolípidos son aquellos lípidos polares que están compuestos por glicerol, ácidos grasos y azúcares (fig. 5). Son principalmente lípidos de plantas y bacterias, aunque se han encontrado en cantidades traza en el cerebro. Los glucolípidos, monogalactosildiacilglicéridos (MGDG) y digalactosildiacilglicéridos (DGDG), se encuentran en cantidades muy altas en las membranas plastidiales. En plantas, existe además un único sulfolípidos, que también contiene una molécula de azúcar, el diacilsulfoquinovosilglicerol (DSQG) y que también se encuentra en los plastidios, principalmente en membranas cloroplásticas.

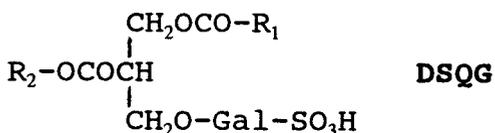
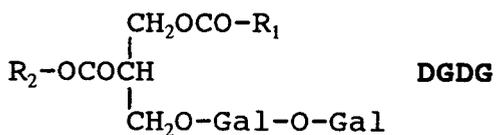
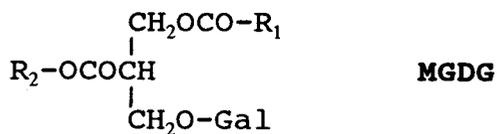


Figura 5. Estructura de los glucolípidos. R=grupo acilo. Gal=galactosa.

Todos los lípidos polares forman parte de las estructuras celulares membranosas, y es gracias a su carácter anfipático el que las membranas tengan una estructura en bicapa. Su composición es por tanto muy importante para el funcionamiento celular de todos los organismos (revisión en Harwood, 1980).

III. BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS EN PLANTAS.

En las plantas se puede distinguir entre la biosíntesis de lípidos en tejidos fotosintéticos, fundamentalmente hojas, y en tejidos de reserva, principalmente semillas y algunos frutos. Aunque la mayoría de las rutas biosintéticas son muy similares, existen reacciones específicas de cada tejido y sobre todo varía la compartimentalización de alguna de ellas. Nosotros nos vamos a centrar en la biosíntesis de ácidos grasos y de lípidos en tejidos de reserva aunque trataremos de abordar resumidamente algunas de las principales diferencias con los tejidos verdes.

III.1. Biosíntesis Intraplastidial de Ácidos Grasos.

Tanto en los tejidos verdes como en los de reserva de plantas superiores existen dos compartimentos celulares que participan en la síntesis de ácidos grasos (fig. 6). En el cloroplasto (tejidos verdes) y en los plastidios (tejidos de reserva) es donde se produce la llamada síntesis "de novo" de la cadena grasa hasta el ácido palmítico y el alargamiento a ácido esteárico. El ácido oleico, principal ácido graso intraplastidial, se forma por la desaturación del esteárico. Posteriormente estos ácidos son exportados al citosol y en el retículo endoplasmático (RE) sufren las distintas reacciones de modificación, desaturaciones, hidroxilaciones, elongaciones, etc. En el RE también se forman los glicerolípidos.

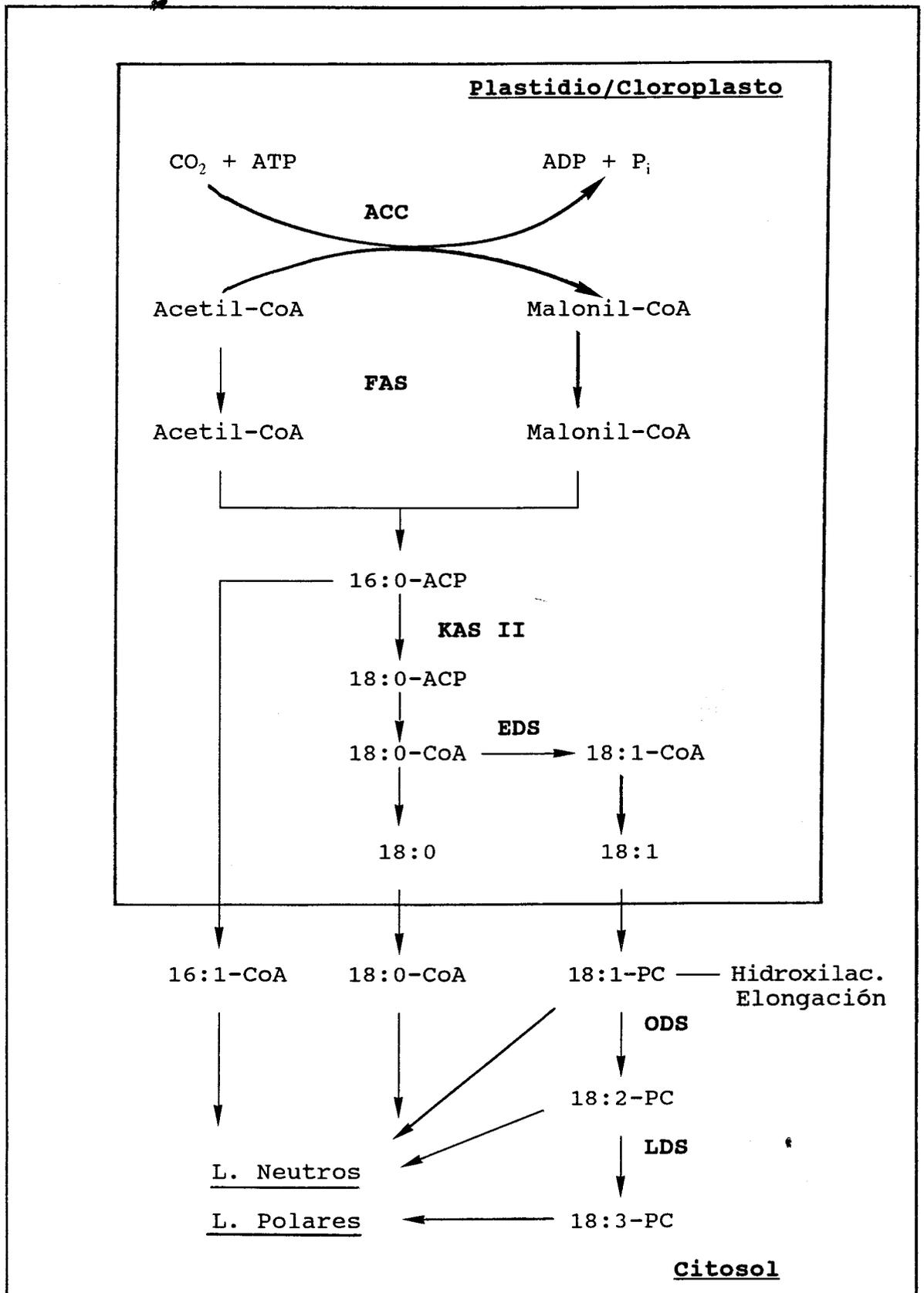


Figura 6. Esquema general de biosíntesis de ácidos grasos en plantas.

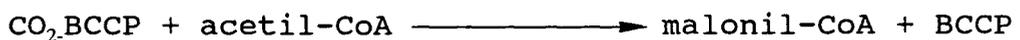
La síntesis "de novo" de los ácidos grasos requiere la acción concertada de dos complejos enzimáticos, la acetil-CoA carboxilasa y la ácido graso sintetasa.

III.1.1. Complejo Acetil-CoA Carboxilasa (ACC).

La acetil-CoA carboxilasa es la enzima que cataliza la formación dependiente de ATP de malonil-CoA a partir de acetil-CoA y bicarbonato. Este complejo consta de tres proteínas, la biotina carboxilasa, la biotina transportadora de carboxilos (BCCP) y la carboxiltransferasa. La reacción ocurre en dos pasos. Primero, la biotina de la BCCP es carboxilada, mediante la enzima biotina carboxilasa:



En segundo lugar, el grupo carboxilo es transferido al acetil-CoA mediante la enzima carboxil transferasa:



En organismos procariotas, como *E.coli*, estas tres proteínas son fácilmente dissociables (Volpe y Vagelos, 1976). En células animales, la acetil-CoA carboxilasa es un complejo multienzimático con las proteínas fuertemente unidas (revisión en Wakil et al., 1983).

En tejidos vegetales, la acetil-CoA carboxilasa fue por primera vez identificada en germen de trigo (Heinstein y Stumpf, 1969), siendo sus propiedades similares a las de células animales. Posteriormente se encontró que las preparaciones de acetil-CoA carboxilasas estaban fuertemente

degradadas por proteinasas vegetales. Egin-Buhler et al. (1980) encontraron que las acetil-CoA carboxilasas purificadas de germen de trigo y de perejil, cuando se aislaban en presencia de PMSF (inhibidor de proteinasas) estaban compuestas por un solo polipéptido de 240 kDa y 210 kDa respectivamente. Las acetil-CoA carboxilasas vegetales parecían estar reguladas "in vitro" por su requerimiento de ATP y resultaban inhibidas por ADP y AMP (Eastwell y Stumpf, 1983). La enzima de maíz era sensible a cambios de pH, ATP, ADP y Mg^{2+} que se producen durante la iluminación (Nikolau y Hawke, 1984). La acetil-CoA carboxilasa de colza también ha sido purificada encontrándose una proteína nativa de 420 kDa con una subunidad enzimática de 220 kDa (Slabas y Hellyer, 1985). Así pues, parece ser que las acetil-CoA carboxilasas vegetales son complejos enzimáticos de alto peso molecular de tipo multifuncional, similares a las aisladas de células animales pero que difieren en sus mecanismos de control (revisión en Harwood, 1988).

III.1.2. Complejo Ácido Graso Sintetasa (FAS).

El complejo ácido graso sintetasa (FAS) cataliza la formación de palmitil-ACP y su posterior elongación a estearil-ACP a partir de acetil-CoA y malonil-CoA. La conversión de acetil-CoA + malonil-CoA a palmitil y estearil-ACP ocurre mediante un conjunto de reacciones cíclicas, en las cuales se van añadiendo 2 átomos de carbono en cada

ciclo. Primero se produce la conversión del acetil-CoA y malonil-CoA a sus respectivos ACP derivados.

1. Acetil-CoA:ACP transacilasa

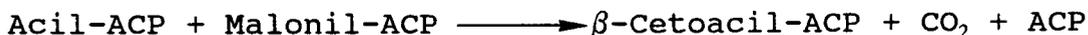


2. Malonil-CoA:ACP transacilasa

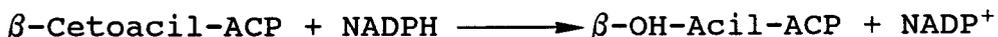


Posteriormente ocurre la condensación del acetil-ACP (C_2) y el malonil-ACP (C_3) para dar un compuesto de 4 átomos de carbono, butiril-ACP, con eliminación de CO_2 . A éste se van añadiendo de forma cíclica (reacciones 3-6) nuevas moléculas de malonil-CoA hasta formar una cadena de 16 carbonos (palmitil-ACP).

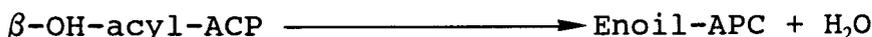
3. β -Cetoacil-ACP sintetasa I (KAS I)



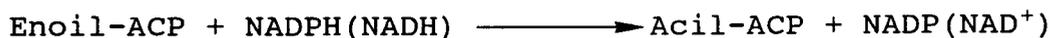
4. β -Cetoacil-ACP reductasa



5. β -Hidroxi-Acil-ACP deshidratasa



6. Enoil-ACP reductasa



El palmitil-ACP sufrirá luego una última condensación mediante la reacción 3' + 4-6 para dar estearil-ACP (revisión en Stumpf, 1989).

3'. β -Cetoestearil-ACP sintetasa II (KAS II)



La β -cetoacil-ACP sintetasa I (KAS I) es, por tanto, la enzima responsable de la mayoría de las condensaciones, usando como sustratos acil-ACPs desde 2:0-ACP hasta 14:0-ACP. La β -cetoacil sintetasa II (KAS II) actúa sólo sobre 16:0-ACP para catalizar la condensación que da lugar al ácido esteárico. Estas dos enzimas se diferenciaron gracias a su distinta sensibilidad frente al antibiótico cerulenina y a la temperatura. Mientras que la KAS I es muy sensible a cerulenina y se inhibía al 100% a concentraciones de 10 μ M de cerulenina, la KAS II sólo se inhibió al 50% con 50 μ M de cerulenina (Shimakata y Stumpf, 1982 a,b). Muy recientemente, Jaworsky et al. (1989) han encontrado una tercer enzima condensante en hojas de espinaca, llamada β -cetoacil-ACP sintetasa III (KAS III) que se diferencia de las anteriores en que es completamente insensible a cerulenina. Esta enzima resultó ser específica para la síntesis de ácidos grasos cortos (4:0-ACP y 6:0-ACP) y muestra preferencia por acetyl-CoA como sustrato en lugar de acetyl-ACP.

En células procariotas como *E. coli*, la síntesis de ácidos grasos ocurre en el citosol y el complejo ácido graso sintetasa es del tipo llamado no asociado, cada actividad enzimática se encuentra en polipéptidos separables que pueden purificarse y estudiar su cinética aisladamente (fig. 7). En levaduras, el complejo FAS es una molécula gigante de $2,4 \cdot 10^6$ Da de peso molecular formada por dos subunidades distintas α y β que conforman la FAS total como $\alpha_6\beta_6$. En tejidos animales, la FAS es también un complejo no dissociable pero con dos subunidades idénticas cada una con los dominios de todas las

actividades enzimáticas implicadas y siendo además el ACP otro de los dominios presentes en cada subunidad (revisión en Wakil *et al.*, 1983). La FAS de plantas es un complejo disociable del tipo de la de *E. coli*. Sin embargo, no ha sido hasta 1982 cuando las distintas proteínas individuales han sido purificadas de hojas de espinaca por Shimakata y Stumpf (1982 a,b;1983 a,b).

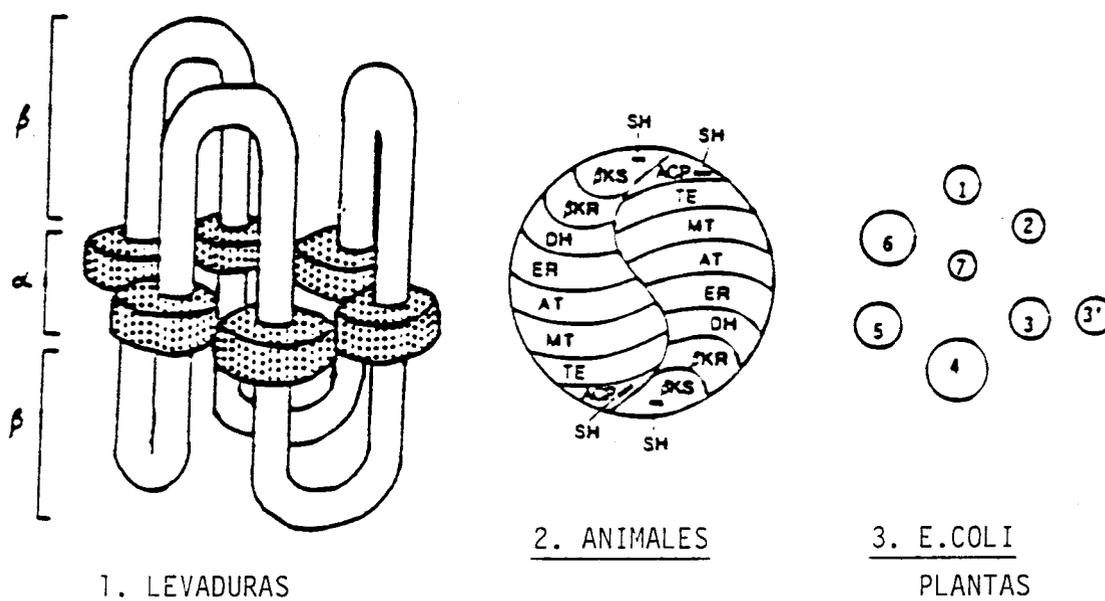


Figura 7. Estructura de los tres tipos conocidos de ácido graso sintetasa.

Desde su purificación han aparecido muchos trabajos tratando de elucidar cuales de las enzimas tienen un papel regulatorio en la síntesis "de novo" de ácidos grasos. Shimakata y Stumpf (1983 a,b) determinaron las velocidades de reacción de los distintos componentes de la FAS en diferentes

extractos vegetales y llegaron a la conclusión de que probablemente la acetil-CoA:ACP transacilasa era la enzima que catalizaba la reacción limitante. Sin embargo, hasta el momento, análisis cinéticos parecen indicar que la principal enzima reguladora de la síntesis de ácidos grasos intraplastidial es la acetil-CoA carboxilasa (Post-Beittenmiller et al., 1992).

Es interesante mencionar algunos conceptos sobre las proteínas transportadoras de acilos (ACPs). En 1964, Overath y Stumpf encontraron por primera vez una proteína de bajo peso molecular, estable al calentamiento y que era necesaria para la síntesis de ácidos grasos a partir del malonil-CoA. Esta proteína fue identificada como una ACP vegetal ya que era muy similar a la de *E. coli*. Desde entonces se han aislado muchas ACP de diferentes tejidos vegetales y se han encontrado distintas isoformas de ACPs en distintas partes de una misma planta, e incluso en algunos tejidos se han encontrado varias isoformas distintas (revisión en Harwood, 1988). Todavía hoy no se conoce la razón de la existencia de las distintas isoformas de ACPs ni de su distribución específica en distintos tejidos. No se han podido usar ACPs vegetales en experimentos "in vitro" por la dificultad de purificarlos en cantidades apreciables. La reciente expresión de la ACP-I de espinaca en *E. coli* (Bereman et al., 1987) podría permitir obtener cantidades suficientes para poder evaluar la especificidad de las ACPs en las distintas reacciones del metabolismo de ácidos grasos en las que participan.

III.1.3. Biosíntesis del ácido oleico.

El ácido oleico es el principal ácido graso monoinsaturado de la mayoría de los lípidos vegetales. Su síntesis ocurre, dentro de plastidios y cloroplastos, mediante la introducción de un doble enlace *cis* en la posición Δ -9 de la cadena hidrocarbonada del ácido esteárico. Esta desaturación ocurre por un mecanismo aeróbico que requiere oxígeno, una molécula reductora, normalmente NADH o NADPH, un transportador de electrones, normalmente ferredoxina en plantas y citocromo b_5 en animales y levaduras, y una desaturasa de función mixta, que presumiblemente acopla el reductor al oxígeno molecular para formar especies de oxígeno capaces de arrancar átomos de H a los grupos $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ formando un doble enlace *cis* (Stumpf, 1989).

En plantas, la desaturasa que cataliza esta reacción es la estearil-ACP desaturasa que resulta ser una enzima soluble que se encuentra tanto en los plastidios de tejidos no verdes como en el estroma de los cloroplastos de tejidos verdes, y cataliza la desaturación de 18:0-ACP a 18:1-ACP (Shine et al., 1976). McKeon y Stumpf (1982) purificaron la estearil-ACP desaturasa de cártamo, resultando ser en su estado nativo un dímero de 68 kDa de peso molecular. Por el contrario, en levaduras y células animales se trata de una enzima unida a membrana que actúa sobre estearil-CoA en vez de sobre estearil-ACP. La secuencia de nucleótidos del gen que codifica para la estearil-ACP desaturasa de semillas de colza

ha sido recientemente determinada (Slocombe *et al.*, 1992). La secuencia de aminoácidos derivada de la anterior contiene 399 aminoácidos y muestra gran homología con otras estearil-ACPs desaturadas aisladas de cártamo (Thompson *et al.*, 1991) y calabaza (Shanklin y Somerville, 1991).

III.1.4. Transferencia de los ácidos grasos formados intraplastidialmente al citoplasma.

Los ácidos grasos palmítico, esteárico y oleico, formados dentro del plastidio en forma de acil-ACPs deben ser transferidos al citoplasma celular donde algunos serán sometidos a distintas reacciones de modificación y donde serán usados para la formación de los lípidos neutros y de la mayoría de los lípidos polares. Los ácidos grasos en el citoplasma se encuentran como acil-CoAs. La secuencia de reacciones implicadas en esta transferencia al exterior incluye dos actividades enzimáticas. Primero actúa una acil-ACP tioesterasa que en la mayoría de las semillas oleaginosas muestra una fuerte preferencia por oleil-ACP (Shine *et al.*, 1976). Esta enzima se encuentra presente en el interior de los plastidios (Ohlrogge *et al.*, 1978) y da lugar a la liberación de los ácidos grasos libres y a ACP libre que será reutilizado en la síntesis "de novo" de ácidos grasos. Los ácidos grasos libres deberán atravesar las membranas que forman las envueltas plastidiales, por un mecanismo aún desconocido, aunque parece estar implicado el sistema

transportador de carnitina (Thomas et al., 1983). La unión de los ácidos grasos libres al Coenzima A ocurre mediante la acción de una acil-CoA sintetasa que está localizada en las membranas de cloroplastos y plastidios (Roughan y Slack, 1977).

III.1.5. Mecanismos de terminación de la síntesis "de novo" de ácidos grasos.

Algunas especies vegetales acumulan importantes cantidades de ácidos grasos de cadena media y corta (C8-C14) en sus semillas. Algunos de estos ácidos grasos y las plantas que los producen son comercialmente muy importantes por su uso en la industria oleoquímica para fabricación de detergentes y otros productos. Por ejemplo, los aceites de coco y palmiste contienen aproximadamente un 45 % de ácido laúrico (12:0). Varios mecanismos han sido propuestos para explicar la acumulación de estos ácidos grasos, incluyendo, tioesterasas específicas, aciltransferasas específicas, ácido graso sintetasa modificadas, altos niveles de malonil-ACP y de ACPs, una KAS específica, etc. (revisión en Harwood, 1988). En animales se sabe de la existencia de acil-ACP tioesterasas específicas para cadenas cortas, que producen la liberación de los ácidos grasos, evitando así la posterior elongación de los mismos (Smith y Libertini, 1979). Recientemente se ha aislado una acil-ACP tioesterasa específica para ácidos grasos cortos de semillas de laurel (Pollard et al., 1991). La introducción de este gen en un

mutante de *E.coli* ha resultado en la producción de altas cantidades de ácidos grasos cortos (revisión en Slabas y Fawcett, 1992).

III.2. Biosíntesis Extraplastidial de Ácidos Grasos.

En los tejidos de reserva, la biosíntesis de los ácidos grasos poliinsaturados (18:2, 18:3) y de los de cadena muy larga (>C18) ocurre en el citoplasma celular, mediante la actuación de enzimas asociados a membranas del retículo endoplasmático, por modificaciones de los ácidos grasos procedentes del plastidio. De igual forma se producen otras reacciones de modificación como hidroxilaciones dando lugar a ácidos como el ricinoleico (12-OH-18:1), reducciones para dar lugar a alcoholes de cadena larga que formarán las ceras, condesaciones, etc.

III.2.1. Desaturasas extraplastidiales.

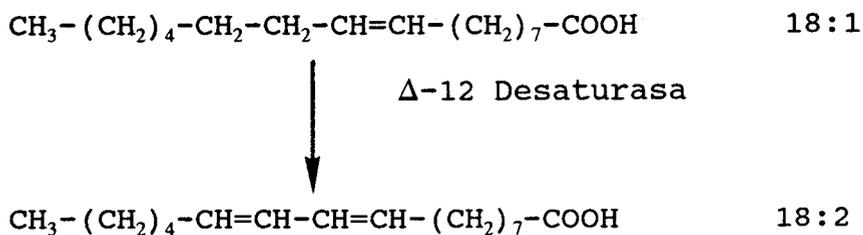
Los ácidos grasos linoleico y linolénico forman parte de la mayoría de los aceites vegetales comercialmente importantes y además son los ácidos grasos principales de las membranas fotosintéticas. A pesar de su interés, su biosíntesis ha sido y aún está siendo difícil de elucidar. Al contrario de la estearato desaturasa, los sistemas enzimáticos que catalizan su formación no han podido ser

purificados hasta el momento ya que necesitan la integridad de las membranas para mantener su actividad. Además, la biosíntesis de estos ácidos grasos ocurre por distintas rutas y con distintos sustratos en distintos compartimentos y tejidos vegetales, y está íntimamente asociada al metabolismo de glicerolípidos.

Vamos a ocuparnos principalmente de la descripción de las rutas de desaturación de los tejidos de reserva por ser éstas objeto de estudio en esta tesis.

III.2.1.1. Biosíntesis del ácido linoleico.

La formación del ácido linoleico ocurre mediante la desaturación aeróbica del ácido oleico en la posición Δ -12 de la cadena hidrocarbonada, contando desde el grupo carboxilo, mediante una actividad oleato desaturasa (ODS) o Δ -12 desaturasa (Harris y James, 1964).



Desde los años sesenta se ha dedicado bastante esfuerzo al estudio del mecanismo de esta reacción, de su localización celular, de sus sustratos, de sus características y de su regulación, pero el progreso ha sido muy lento. Vamos ha

intentar resumir lo que se conoce hoy sobre cada uno de estos aspectos.

1) Localización celular de la oleato desaturasa.

Todos los estudios realizados sobre la ODS indican que está localizada en la fracción microsómica, presumiblemente en el RE. Vijay y Stumpf (1971) localizaron la actividad ODS de semillas de cártamo en la fracción microsomal obtenida por centrifugación a 105.000·g. Usando marcadores específicos de RE sugirieron la localización de esta enzima en las membranas del RE. También en semillas de soja (Stymne y Glad, 1981) y de girasol (Stymne, 1980) y en tubérculo de patata (Ben Abdelkader, 1973) la actividad se encontró en la fracción microsomal. En tejidos verdes, como las hojas de maíz (Slack et al., 1976) y de guisante (Murphy et al., 1984a) el RE es el lugar donde ocurre la desaturación del ácido oleico. La única excepción la constituyen las hojas de espinacas, donde se detectó actividad ODS en cloroplastos aislados (Heinz y Roughan, 1983). Sin embargo, como veremos más adelante se trata de una actividad diferente también en otros aspectos.

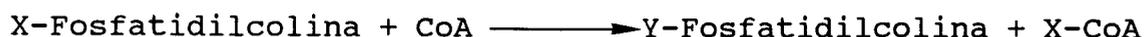
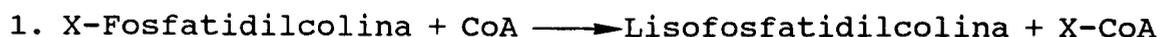
2) Sustrato de la oleato desaturasa (ODS).

Los primeros estudios realizados midiendo la incorporación de [¹⁴C]-acetato en *Chlorella vulgaris* (Gurr et al., 1969) y en hojas de calabaza (Roughan, 1970), sugerían que el sustrato de la reacción era la oleil-fosfatidilcolina (18:1-PC). Sin embargo, el primer estudio hecho "in vitro" con fracción microsomal de semillas de cártamo (Vijay y

Stumpf, 1971) concluyó que el sustrato era el oleil-CoA. Más tarde, Stymne y Appelqvist (1978) reexaminaron el sistema microsomal de cártamo y demostraron que después de que el [¹⁴C]-oleil-CoA añadido había desaparecido, incorporándose principalmente en PC, la síntesis de ácido linoleico continuaba. La controversia continuó hasta que Stymne (1980) incubó microsomas, esta vez de semillas de soja con [¹⁴C]-oleil-CoA y NADH y demostró la relación sustrato-producto existente entre la 18:1-PC y la 18:2-PC. Stymne y Glad (1981) demuestran también en soja que la 18:2-PC aparece substancialmente antes que el 18:2-CoA. Actualmente se acepta que el sustrato principal de la ODS microsomal es la *sn*-2-oleil-fosfatidilcolina, ocurriendo la reacción preferentemente en posición *sn*-2, aunque también se ha observado desaturación en la posición *sn*-1 (Stobart y Stymne, 1985a).

El mecanismo de entrada del ácido oleico en la posición *sn*-2 de la fosfatidilcolina también ha sido objeto de controversia. En principio, parecía ocurrir gracias a la acción de una acil-CoA:lisofosfatidilcolina aciltransferasa que fue solubilizada y caracterizada en semillas de cártamo (Moreau y Stumpf, 1981). Se encontró que el oleil-CoA era su mejor sustrato aunque también mostró buena velocidad de reacción con linoleil-CoA y con acil-CoAs saturados. El mejor monoacilfosfolípido aceptor fue la 1-oleil-liso-PC. Sin embargo, la importancia de la reacción de desaturación del ácido oleico en muchas semillas oleaginosas implica la existencia de un mecanismo que regenere al aceptor del ácido

oleico, es decir, a la liso-PC. En animales, esto ocurre mediante la acción de una fosfolipasa A₂ que específicamente libera el acilo de la posición sn-2 de los fosfolípidos (Van der Bosch *et al.*, 1972). En plantas, no se ha encontrado hasta la fecha esta actividad. Stymne y Glad (1981) observaron que la cantidad de [¹⁴C]-oleil-CoA transferida a PC era mucho mayor de lo que podía explicarse conociendo la cantidad de lisoPC preexistente. Esto sugirió la posibilidad de la existencia de un intercambio de acilos entre la PC y el conjunto de acil-CoAs citoplasmáticos. Este intercambio fue confirmado, actuando a gran velocidad, en semillas de cártamo (Stymne *et al.*, 1983), de girasol (Stymne y Stobart, 1984a) y lino (Stymne y Stobart, 1985a). Este intercambio está catalizado por la acción reversible de la acil-CoA: lisofosfatidilcolina aciltransferasa y ocurre en dos pasos, siendo X e Y dos acilos cualquiera:



La selectividad de acilos de esta reacción mostró una preferencia por los ácidos oleico y linoleico a igual velocidad, el ácido linolénico fue intercambiado a aproximadamente la mitad de la velocidad y los ácidos grasos saturados, palmítico y esteárico fueron prácticamente excluidos de la acilación a fosfatidilcolina cuando estaban

presentes en una mezcla con ácidos grasos insaturados. Sin embargo, si palmitil o estearil-CoA estaban presentes como único sustrato, se producía intercambio de acilos, pero a una velocidad mucho menor que para los ácidos insaturados. En los tejidos estudiados parece que sólo la fosfatidilcolina es capaz de intercambiar su acilo en posición *sn*-2 con los acil-CoAs del conjunto citoplasmático (Stymne y Stobart, 1984b).

Un segundo mecanismo de entrada del ácido oleico en fosfatidilcolina es la conversión de diacilglicéridos con oleato en posición *sn*-2 en *sn*-2-oleilfosfatidilcolina, mediante la acción de la enzima diacilglicerolcolina fosfotransferasa (Roughan y Slack, 1982). En cotiledones de cártamo y girasol la entrada de oleato en PC por este mecanismo es baja comparada con la que ocurre mediante el intercambio de acilos (Griffiths, 1986). Sin embargo, la importancia relativa de estas dos formas de entrada puede diferir en distintas especies vegetales (Stymne y Stobart, 1987). En tejidos verdes, la oleato desaturasa citoplasmática actúa sobre oleil-fosfatidilcolina, mostrando características muy similares a la de semillas. (Murphy *et al.*, 1984a; Murphy *et al.*, 1984b; Murphy *et al.*, 1985).

3) Propiedades de la oleato desaturasa.

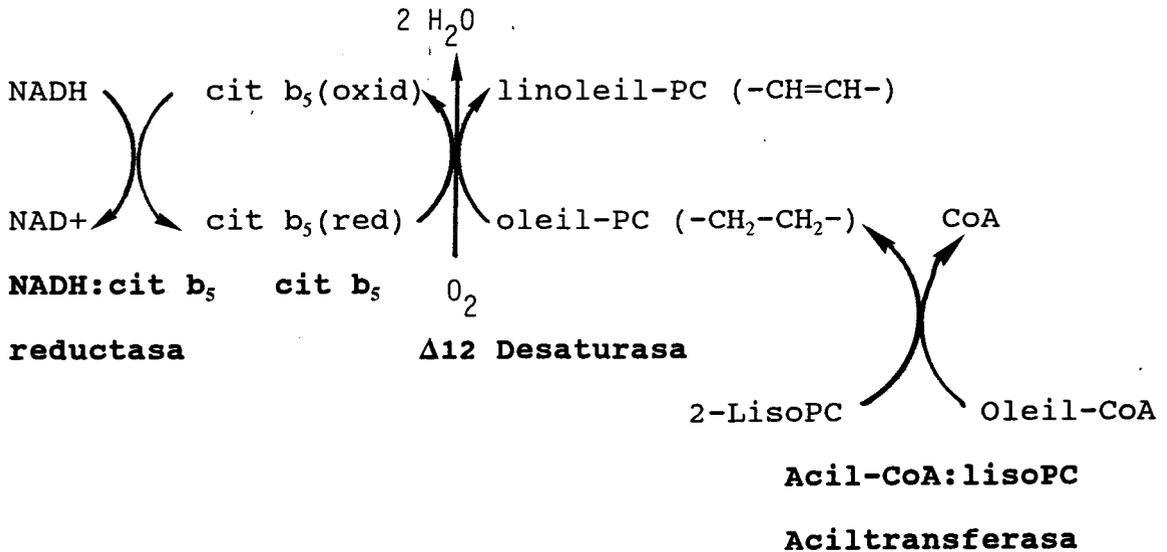
La caracterización inicial de la oleato desaturasa en semillas de cártamo (Vijay y Stumpf, 1972) mostró que esta actividad tiene un requerimiento absoluto de oxígeno. También requiere una fuente de electrones en forma de piridin nucleótidos. Se observó que existía una preferencia por NADH

sobre NADPH. También se intentó definir cuáles eran los componentes de la cadena transportadora de electrones asociada al sistema, descartándose la intervención del citocromo P₄₅₀, que está implicado en muchas reacciones de oxodoreducción microsomales, al no encontrarse ninguna inhibición por CO. Sí se encontró inhibición por cianuro. Estudiaron la posibilidad de que la ferredoxina fuera el transportador de electrones, como ocurre en el caso de la estearil-ACP desaturasa, pero la adición de anticuerpos antiferredoxina no afectó al sistema. Comprobaron que la adición de agentes quelantes de metales como la *p*-OH-quinona y de inhibidores de grupos tiol como la *N*-etilmaleimida eran potentes inhibidores de la desaturación. Sin embargo, en este sistema crudo no estaba claro si la inhibición ocurría sobre la desaturasa en sí o sobre la aciltransferasa. No ha sido hasta muy recientemente (Smith et al., 1990) que se ha podido caracterizar la cadena transportadora de electrones en semillas de cártamo. Esta cadena efectivamente está formada por citocromo b₅ y citocromo b₅ reductasa. En este estudio se vio que las concentraciones de estas proteínas bajan cuando las semillas maduran, siendo ínfimas a los 30 DDF.

La existencia de una asociación funcional y quizás física entre la oleil-PC desaturasa y la acil-CoA:lisopC aciltransferasa fue observada en hojas de guisante (Murphy et al., 1984a) y en semillas de cártamo (Gennity y Stumpf, 1985). Esta asociación explicaría la gran rapidez de la reacción de acilación del oleil-CoA a lisopC y el que en algunos sistemas "in vitro" se haya observado que la oleil-PC

exógena es mucho peor sustrato que la generada "in situ" al añadir oleil-CoA y lisófosfatidilcolina (Martin y Rinne, 1986).

De manera esquemática el mecanismo de la reacción de desaturación del ácido oleico es el siguiente:



La complejidad de este sistema explica la dificultad que tiene su purificación, que no ha podido ser llevada a cabo hasta la fecha. Los primeros estudios realizados con sustratos radiactivos "in vivo" eran difíciles de interpretar por las muchas interacciones existentes entre las rutas de formación de ácidos grasos y de glicerolípidos. Conseguir medir la actividad en sistemas membranosos "in vitro" también ha requerido bastante esfuerzo, siendo posible llevarlo a cabo sólo en sistemas donde la actividad es bastante alta, como las semillas oleaginosas ricas en ácido linoleico y en algunos tejidos verdes.

Últimamente un acercamiento de tipo genético está permitiendo profundizar en el estudio del mecanismo y

regulación de las actividades desaturadas. Se han obtenido una serie de mutantes de *Arabidopsis thaliana* (revisión en Sommerville y Browse, 1991) y de la cianobacteria *Synechocystis* PCC6803 (Wada y Murata, 1989), con alteraciones en la desaturación de ácidos grasos. El estudio de estos mutantes y la posibilidad de aislar los genes afectados a partir de ellos ya está empezando a dar resultados. Se consiguió aislar el gen de una $\Delta 12$ -desaturasa a partir de la cianobacteria *Synechocystis* PCC6803 por complementación con un mutante de esta mismo microorganismo que era deficiente en la desaturación del ácido oleico (Wada et al., 1990). Este gen llamado des A codifica para una proteína de 351 aminoácidos y al ser introducido en otra cianobacteria, *Anacystis nidulans*, que no tiene capacidad de síntesis de ácido linoleico, se obtuvo un transformante que produjo ácido linoleico en cantidades significativas. Hay que mencionar que la $\Delta 12$ -desaturasa de cianobacterias puede ser similar a la que se encuentra en cloroplastos de plantas superiores y que actúa sobre los galactolípidos, pero no a la oleato desaturasa microsomal.

Como ya hemos mencionado, el sistema descrito funciona tanto en hojas como en semillas. Sin embargo, en algunas hojas, especialmente en las de espinaca y otras plantas que contienen ácido hexadecatrienoico (16:3) en sus lípidos polares cloroplásticos, se ha observado que los cloroplastos aislados tienen cierta capacidad para sintetizar ácido linoleico por desaturación del ácido oleico. La oleato desaturasa o $\Delta 12$ -desaturasa cloroplástica también usa como

sustrato el ácido oleico unido a lípidos complejos, pero en vez de a fosfatidilcolina, desatura el oleato unido a MGDG (Heinz y Roughan, 1983). La cadena transportadora de electrones acoplada a esta desaturasa no tiene citocromo b_5 , sino ferredoxina, y usa NADPH como donador de electrones (Smichdt y Heinz, 1990). Esta oleato desaturasa cloroplástica ha podido ser purificada muy recientemente de cloroplastos de espinaca y su actividad ha podido ser medida "in vitro" en presencia de oxígeno y ferredoxina reducida (Schmidt y Heinz, 1993). Así pues, en las plantas llamadas "16:3", que como la espinaca contienen una alta proporción de este ácido graso en los lípidos polares de las membranas de sus cloroplastos, es posible que la formación del ácido linoleico ocurra tanto en el citoplasma como en los cloroplastos. Sin embargo, en las plantas llamadas "18:3", como el girasol, que contienen principalmente 18:2 y 18:3 en sus membranas cloroplásticas, la síntesis de 18:2 parece ocurrir únicamente en el citoplasma.

4) Regulación de la actividad oleato desaturasa.

La regulación de la actividad oleato desaturasa es bastante compleja. Por un lado, parece existir una regulación específica de cada tejido puesto que en la mayoría de las plantas la proporción de ácido linoleico es distinta en tejidos verdes y en tejidos de reserva. Por otro lado, también existe una regulación temporal ya que la actividad desaturasa de las semillas varía durante el desarrollo de las mismas. Así, por ejemplo, en girasol la actividad es muy baja

en los primeros días de formación de las semillas, aumenta fuertemente alrededor de los 12-14 DDF alcanzando su máximo a los 20 DDF, y posteriormente vuelve a disminuir a medida que las semillas terminan su maduración (Garcés y Mancha, 1989).

Estudios cinéticos sobre la desaturación del ácido oleico en PC mostraron que en preparaciones microsomales nunca se consigue una conversión completa del oleato exógeno a linoleato. La velocidad de desaturación fue dependiente de la concentración de oleato en fosfatidilcolina y cesó rápidamente cuando la cantidad de oleato se acercó a la existente en la fosfatidilcolina endógena de la semilla (Stymne *et al.*, 1983; Stymne y Stobart, 1986a). Esto puede ser debido a la afinidad de la oleato desaturasa por su sustrato o a una inhibición por linoleato presente en PC. Este tipo de control no ha podido ser demostrado "in vitro" en plantas superiores, aunque sí se ha descrito una regulación por producto en otras desaturasas de levadura (Bossie y Martin, 1989).

La actividad oleato desaturasa de plantas está además fuertemente regulada por factores medioambientales. Se han descrito pequeñas fluctuaciones día/noche (del orden del 5%) en los niveles de los ácidos oleico y linoleico en hojas de espinaca (Browse *et al.*, 1981). Varios autores han encontrado una estimulación de la biosíntesis de ácido linoleico por la luz en hojas de avena (Ohnishi y Yamada, 1983), en hojas de colza (Trémolières *et al.*, 1978), en cultivos celulares de *Arabidopsis* (Brockman *et al.*, 1990) y en cotiledones verdes

de calabaza (Murphy y Stumpf, 1979, 1980) y de *Pharbilis nil* (Tchang et al., 1985). Sin embargo, este efecto parece producirse sólo en tejidos verdes. Así, por ejemplo, en el girasol la luz estimuló la biosíntesis de ácido linoleico en las hojas pero no en las semillas (Tchang et al., 1981).

También el estrés hídrico y salino parecen afectar a la desaturación del ácido oleico. En hojas de algodón se ha observado una disminución de la cantidad de 18:2 presente en fosfolípidos de plantas sometidas a estrés hídrico (Pham Ti et al., 1985; 1987). Algunos experimentos con hojas de olivo han mostrado que un aumento de calcio en el suelo provocó una disminución en el porcentaje de ácido linoleico y un aumento del de ácido oleico (Marzouk et al., 1987).

Sin embargo, la temperatura es con diferencia el factor ambiental que más drásticamente afecta a la biosíntesis de ácido linoleico sobre todo en semillas. Se ha observado que a menor temperatura se sintetiza una mayor proporción de ácido linoleico. De la influencia de la temperatura en la actividad oleato desaturasa y de sus posibles mecanismos moleculares nos ocuparemos en el capítulo final de esta introducción.

III.2.1.2. Biosíntesis del ácido linolénico.

El ácido α -linolénico (18:3, Δ 9,12,15) es muy abundante en las hojas, donde constituye aproximadamente un 65% del total de ácidos grasos presentes. Es también abundante en

algunas semillas oleaginosas donde se acumula, como las de lino (60%), de nuez negra (62%), de nuez inglesa (55%) y de pino (44%) (Gunstone et al., 1986). A pesar de su importancia, se conoce poco acerca de su biosíntesis, principalmente debido a la dificultad de obtener fracciones celulares en las que estudiar su formación. Experimentos de marcaje radiactivo mostraron que el α -18:3 se forma a partir del 18:2 por la acción de una Δ 15-desaturasa (Harris y James, 1964). Estudios en el alga *Chlorella vulgaris* (Nichols et al., 1967) indicaron la posible implicación de glicerolípidos como sustratos de la Δ 15-desaturasa. En experimentos "in vivo" con hojas de *Vicia faba* se observó que la formación de 18:3 ocurría en MGDG (Heinz y Harwood, 1977). La implicación de los glucolípidos en la biosíntesis de 18:3 se demostró también en hojas de colza, trigo y guisante (Wharfe y Harwood, 1978). Posteriormente se encontró actividad Δ 15-desaturasa en MGDG de cloroplastos aislados de hojas de espinaca (Roughan et al., 1979). Así pues, en tejidos verdes el cloroplasto parece ser el lugar donde ocurre la biosíntesis de 18:3 a partir de 18:2-MGDG. En tejidos de reserva no verdes se ha detectado la existencia de actividad Δ 15-desaturasa sobre *sn*-2-linoleil-PC microsomal pero actuando a una velocidad mucho menor (Roughan y Slack, 1982). Recientemente, ha sido clonado el gen de la Δ 15-desaturasa en *Arabidopsis* (Arondel et al., 1992).

En tejidos verdes, el ácido linoleico debe ser transportado desde el retículo endoplasmático donde se sintetiza hasta los cloroplastos donde se incorporará a los

glicolípidos para ser posteriormente desaturado. No se conoce aún con exactitud el mecanismo por el cual se produce el movimiento de los lípidos en las células vegetales, pero se sabe que existen unas proteínas transportadoras de lípidos que están implicadas en el movimiento de fosfolípidos y glucolípidos entre las membranas (revisión en Yamada, 1992).

El ácido γ -linolénico (18:3 Δ 6,9,12) es un ácido graso poco común pero se sintetiza en cantidades apreciables en algunas plantas y microorganismos. Su biosíntesis ocurre mediante la desaturación del ácido linoleico en posición Δ 6, catalizada por una Δ 6-desaturasa microsomal (Stymne y Stobart, 1986a). Esta enzima utiliza como sustrato *sn*-2-linoleil-PC y requiere NADH. El ácido γ -linolénico sintetizado se incorpora en TAG preferentemente en posición *sn*-2 y *sn*-3 (Griffiths et al., 1988). Muy recientemente (Reddy et al., 1993), el gen que codifica para la Δ 6-desaturasa ha sido clonado en la cianobacteria *Synechocystis* PCC6803. La secuencia del polipeptido predicho a partir de la secuenciación del gen, tiene 359 aminoácidos y presenta una significativa similitud con la Δ 15-desaturasa de *Arabidopsis* (Arondel et al., 1992).

III.2.2. Biosíntesis de Ácidos Grasos de Cadena Larga.

Los ácidos grasos de cadena larga, de más de 18 átomos de carbono, son componentes o precursores de los lípidos protectores de superficies, ceras, cutina y suberina, de las

plantas. Inusualmente, se acumulan en algunas semillas oleaginosas. Además son componentes principales de membranas de algas y plantas inferiores. Las elongasas responsables de la formación de estos ácidos grasos se localizan en el retículo endoplasmático (Sanchez *et al.*, 1982). Las elongasas usan como sustrato a los ácidos grasos palmítico y esteárico en forma de acil-CoAs, a los que añaden 2 átomos de carbono mediante la adición de malonil-CoA sin requerir la presencia de ACPs (Agrawal *et al.*, 1984). Aunque los ácidos grasos una vez formados son transferidos a glicerolípidos, los primeros productos de la reacción de elongación son acil-CoAs (Lessire *et al.*, 1985a), ocurriendo la transferencia a glicerolípidos gracias a una acil-CoA transacilasa (Abdul-Karim *et al.*, 1982). En microsomas de helecho se demostró que el estearil-CoA era usado como sustrato de la elongación más efectivamente que el palmitil-CoA (Lessire *et al.*, 1985b). La solubilización de la actividad elongasa de microsomas de helecho (Agrawal y Stumpf, 1985) y de *Allium porrum* (Lessire *et al.*, 1987) ha mostrado la existencia en plantas de distintas elongasas específicas en la formación de ácidos con distinta longitud de cadena. Por otro lado, en varias semillas oleaginosas donde se sintetizan ácidos grasos insaturados de cadena larga, se ha visto que el doble enlace proviene del ácido oleico que actúa como sustrato de la elongación también en forma de oleil-CoA (Pollard y Stumpf, 1980 a,b).

III.2.3. Otras modificaciones extraplastidiales.

Además de las desaturaciones y elongaciones existen otras reacciones de modificación de los ácidos grasos que ocurren mediante enzimas asociados al RE. La mayoría son muy poco comunes y solo tienen lugar en pocas especies vegetales para la formación de ácidos grasos inusuales, por lo que no han sido muy estudiadas.

III.2.3.1. Hidroxilaciones.

La formación del ácido ricinoleico (12-OH-18:1), que constituye el 90% de los ácidos grasos en semillas de ricino, ocurre mediante hidroxilación en posición $\Delta 12$ del ácido oleico en la *sn*-2-oleil-PC, usando oxígeno y NADH como cofactores (Moreau y Stumpf, 1981). La enzima $\Delta 12$ -hidroxilasa se encuentra unida al RE. La cadena transportadora de electrones asociada a esta actividad se inhibe por anticuerpos obtenidos frente a citocromo b_5 de plantas (Bafor et al., 1991).

III.2.3.2. Epoxidaciones.

Los epoxi-ácidos grasos no son muy comunes en vegetales, pero tienen gran uso industrial, obteniéndose para diversos fines generalmente mediante procesos químicos a partir de

aceite de lino y de soja (Badami y Patil, 1981). Uno de estos ácidos grasos, el ácido vernólico (12-epoxi-18:1) es muy abundante en semillas de *Euphorbia lagascae* donde constituye un 58% de los ácidos grasos totales. En estas semillas se ha estudiado recientemente su biosíntesis (Bafor et al., 1993). Los resultados de este trabajo indican que el ácido vernólico se sintetiza por epoxidación del doble enlace en posición $\Delta 12$ del 18:2 esterificado en posiciones *sn*-1 y *sn*-2 de la fosfatidilcolina. Esta actividad requiere citocromo b_5 y se encuentra localizada en la fracción microsomal de estas semillas.

IV. BIOSÍNTESIS DE GLICEROLÍPIDOS EN PLANTAS.

IV.1. Biosíntesis de lípidos neutros.

Los lípidos neutros son fundamentalmente los triacilglicéridos y los metabolitos implicados en su biosíntesis y degradación, es decir, los diacilglicéridos y monoacilglicéridos. Las plantas almacenan lípidos casi exclusivamente en forma de TAG, y por tanto, éstos son los lípidos mayoritarios de los tejidos de reserva, constituyendo casi el 100% de los lípidos presentes en los aceites vegetales. También existen TAG en el resto de los tejidos aunque en proporciones mucho menores. Nos vamos a centrar en la descripción de la ruta de biosíntesis de TAG en tejidos de reserva aunque procuraremos mencionar las diferencias con los demás tejidos, especialmente las hojas.

IV.1.1. La ruta del glicerol-3-fosfato.

La ruta del glicerol-3-P, también llamada ruta de Kennedy, fue descrita por primera vez en hígado de animales (Kennedy, 1961). Poco después fue encontrada en plantas superiores (Barron y Stumpf, 1962). Esta ruta enzimática cataliza la formación de TAG a partir del glicerol-3P y acil-CoAs. A continuación describiremos las reacciones y enzimas implicadas en esta ruta.

IV.1.1.1. Formación del ácido fosfatídico.

La formación del ácido fosfatídico ocurre en dos pasos:

1. Glicerol-3-P + Acil-CoA \longrightarrow Ácido 1-Acil-lisofosfatídico
2. Ác. 1-Acil-lisofosfatídico + Acil-CoA \longrightarrow Ác. Fosfatídico

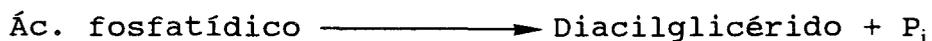
y requiere la participación de dos enzimas distintas (Tamai y Lands, 1974). La primera enzima, una glicerol-3-P 1-aciltransferasa acila el glicerol-3-P en posición *sn*-1 para dar ácido lisofosfatídico, que es el sustrato de la segunda enzima, 1-acilglicerol-3-P 2-aciltransferasa, dando lugar al ácido fosfatídico. Estas reacciones se han detectado en extractos crudos de tejidos de reserva vegetales (Porra, 1979) y en fracciones de membranas microsomales de semillas en desarrollo de cártamo (Stobart et al., 1983), girasol (Stymne y Stobart, 1984a) y lino (Stymne y Stobart, 1985a). La primera acilación en la posición *sn*-1 del glicerol-3P ocurre con distintas especies de acil-CoAs, pero en todas las semillas estudiadas muestra una selectividad preferente por ácidos grasos saturados, esencialmente palmítico y esteárico, aunque también puede incorporar ácidos grasos insaturados.

Por el contrario, la segunda acilación en la posición *sn*-2 muestra una fuerte selectividad por ácidos grasos insaturados, oleico y linoleico, y una total exclusión de los ácidos grasos saturados (Griffiths et al., 1985). Estas selectividades observadas "in vitro" son, esencialmente, las responsables de la distribución no-al-azar de los ácidos

grasos saturados e insaturados que se encuentra en los TAG vegetales naturales. Se sabe poco sobre las propiedades del sistema glicerolfosfato aciltransferasa en plantas. Vick y Beevers (1977) informaron que en ricino estas enzimas mostraban un requerimiento absoluto de cationes divalentes. Sin embargo, en cártamo éstos no son necesarios (Stobart y Stymne, 1985b). En semillas, estas enzimas tienen una localización extraplasmática, encontrándose las mayores actividades en la fracción microsomal obtenida por centrifugación a alta velocidad, donde las membranas del retículo endoplasmático son mayoritarias. Por tanto, es razonable asumir que se encuentran asociadas a membranas de RE (Griffiths *et al.*, 1985). También en hojas se han encontrado glicerol-P aciltransferasas en la fracción microsomal, que además presentan una selectividad por acil-CoAs igual a las de tejidos de reserva (Frentzen *et al.*, 1984). Sin embargo, existen también glicerol-P aciltransferasas dentro de los cloroplastos y éstas presentan una selectividad distinta, utilizando ácidos grasos saturados para acilar la posición *sn*-2 (Bertrams y Heinz, 1981).

IV.1.1.2. Formación de los diacilglicéridos.

La enzima fosfatidato fosfatasa o fosfatidato fosfohidrolasa cataliza la ruptura del enlace entre el fosfato y el glicerol para dar fosfato inorgánico y diacilglicéridos.



Esta enzima es activa en extractos crudos de tejidos vegetales que sintetizan TAG (Barron y Stumpf, 1962; Stymne et al., 1983; Ichiara, 1984). La actividad de esta enzima, localizada en la fracción microsomal de cártamo, fue estimulada por Mg²⁺ y inhibida por EDTA (Griffiths et al., 1985). En este sentido, la fosfatidasa de semillas oleaginosas se parece a la de tejidos animales (Sturton y Brindley, 1980), y es distinta a la que se encuentra en la membrana interna del cloroplasto (Block et al., 1983).

Esta reacción juega un papel regulatorio importante en la biosíntesis de TAG en animales, donde se considera el paso limitante de la ruta (Brindley, 1978). Resultados de estudios en plantas parecían indicar que también aquí puede jugar un papel relevante en el control de la biosíntesis de TAG (Stymne y Stobart, 1987). Recientemente (Ichiara et al., 1990), se ha profundizado en el estudio del papel regulatorio de esta enzima en la formación de TAG en semillas de cártamo. Se ha observado que la actividad fosfatidato fosfatasa se encuentra tanto en forma soluble en el citosol, como unida a membranas del retículo endoplasmático, variando las actividades relativas de estas dos formas de la enzima durante la maduración de las semillas. En el comienzo de la formación de las semillas, cuando la síntesis de TAG es aún insignificante, la mayoría de la actividad es soluble. Por el contrario, en semillas en fase de rápida acumulación de TAG, la mayoría de la actividad se encontró unida a membrana. En

este mismo trabajo se encontró que las sales potásicas de los ácidos oleico, palmítico y esteárico provocaron la translocación de la fosfatasa desde el citosol hasta las membranas microsomales. Por el contrario, las sales de laúrico y linoleico, que no son sintetizados en el plastidio de estas semillas, no tuvieron ningún efecto. Estas observaciones sugieren que en las semillas en desarrollo, la velocidad de la síntesis de ácidos grasos en el plastidio podría regular la translocación de la enzima fosfatidato fosfatasa entre el citosol y el retículo endoplasmático y que dicha translocación podría ser uno de los factores que controla la velocidad de la síntesis de TAG en la célula.

IV.1.1.3. Acilación de los diacilglicéridos.

El último paso de la ruta de biosíntesis de TAG es la acilación de los 1,2-diacilglicéridos en la posición *sn*-3, catalizado por la enzima diacilglicerol aciltransferasa:



Al igual que las otras enzimas de esta ruta, la diacilglicerol aciltransferasa se ha encontrado en la fracción microsomal de tejidos vegetales (Barron y Stumpf, 1962; Stymne *et al.*, 1983). También parece estar presente en la envuelta de cloroplastos de hojas de espinaca (Martin y Wilson, 1984). La distribución estereoespecífica de los

ácidos grasos en los aceites vegetales indica que la acilación de la posición *sn*-3 del glicerol es poco específica.

IV.1.2. Papel de la fosfatidilcolina en la formación de los triacilglicéridos.

Como ya vimos con anterioridad, la formación del ácido linoleico ocurre fundamentalmente en el retículo endoplasmático por desaturación de la *sn*-2-oleil-fosfatidilcolina. También vimos que la entrada del ácido oleico en fosfatidilcolina ocurre principalmente gracias a un mecanismo de intercambio de acilos entre el conjunto de acil-CoAs citoplasmáticos y la posición *sn*-2 de la PC, catalizado por la acción reversible de la enzima acil-CoA:liso-PC aciltransferasa. Esta reacción de intercambio también juega un papel importante en la biosíntesis de TAG, ya que gracias a este mecanismo ocurre la liberación de los ácidos grasos poliinsaturados de PC, pasando así a formar parte del conjunto de acil-CoAs citoplasmático. Por tanto, debido a este mecanismo de intercambio el conjunto de acil-CoAs se va enriqueciendo en ácidos poliinsaturados, especialmente ácido linoleico, quedando éste disponible para ser incorporado en la formación de TAG (fig. 8).

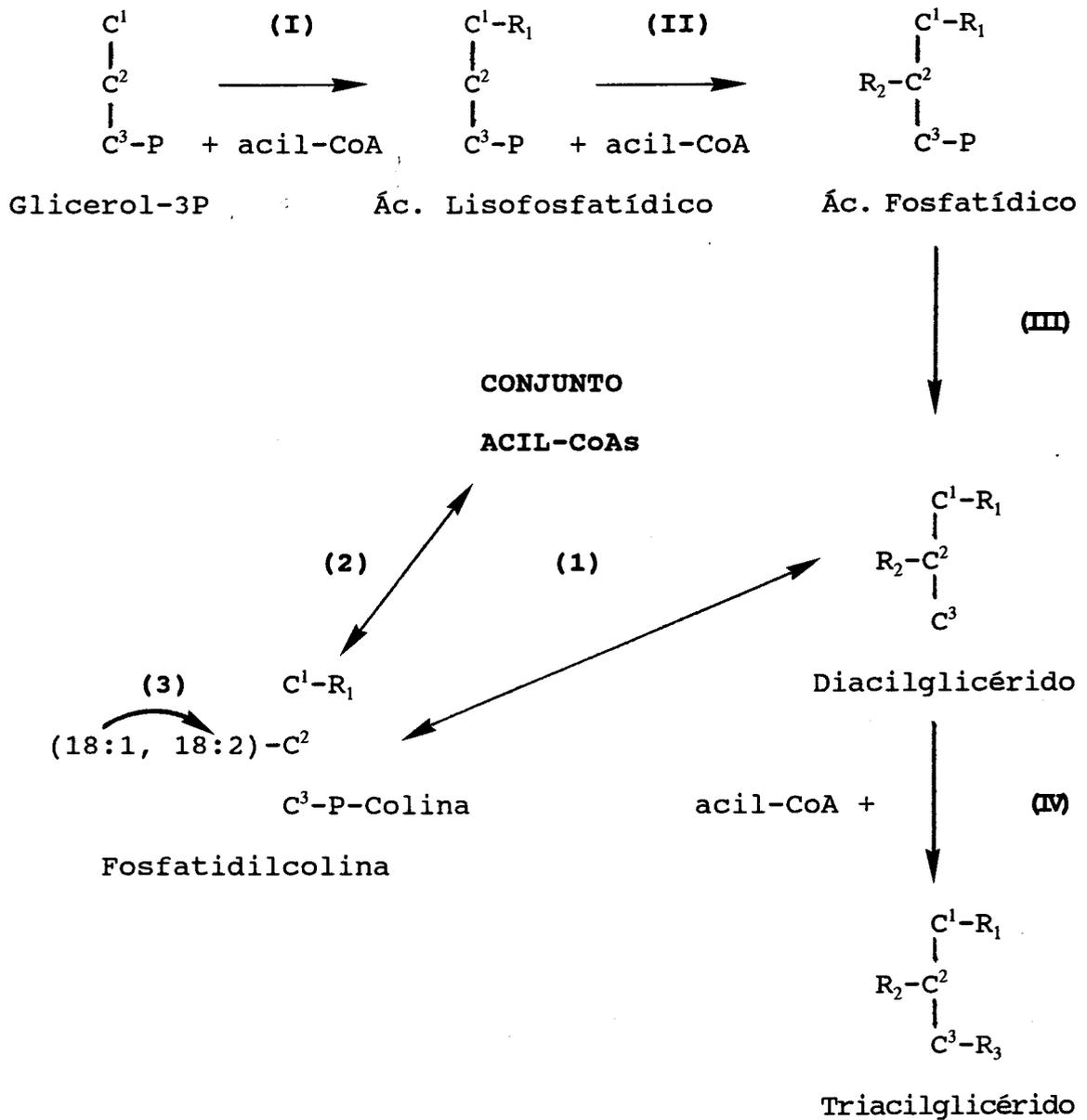


Figura 8. Ruta del glicerol-3P incluyendo el papel de la fosfatidilcolina en la formación de los TAG.

IV.1.3. Interconversión entre Diacilglicéridos y Fosfatidilcolina.

Experimentos "in vivo" con cotiledones de semillas oleaginosas en desarrollo (Slack et al., 1978) demostraron que el [³H]-glicerol de PC podía encontrarse en los TAG y que esta incorporación del esqueleto glicerídico de PC a TAG era muy rápida. Basándose en estas observaciones y también en que en semillas oleaginosas existe una gran similitud entre la composición de ácidos grasos de PC y DAG (Slack y Roughan, 1978), se sugirió la existencia de una interconversión reversible entre PC y DAG. Una enzima, la CDP-colina:1,2-diacilglicerol colinafosfotransferasa (colina transferasa), había sido previamente descrita en membranas microsomales de tejidos animales (Kano y Ohno, 1975) como catalizadora de la interconversión entre DAG y PC. Slack et al. (1985) demostraron que la colina fosfotransferasa de microsomas de cártamo, que se conocía como enzima implicada en la formación de PC a partir de DAG, podía actuar de forma reversible. Los cofactores necesarios para esta enzima, CMP y CDP-colina, no parecen ser limitantes en preparaciones microsomales de cártamo durante la formación de TAG (Stymne y Stobart, 1985b).

Resumiendo, la ruta básica de formación de TAG y su relación con las rutas de formación de ácidos grasos poliinsaturados en semillas ricas en TAG (figura 8) consta de las siguientes pasos:

- a) Los acil-CoAs, fundamentalmente oleil-CoA y algo de

estearil-CoA y palmitil-CoA, son liberados al citoplasma celular desde el plastidio formando el llamado conjunto de acil-CoAs citoplasmático.

b) Los ácidos grasos saturados se utilizan fundamentalmente en la acilación de la posición *sn*-1 del glicerol-3P, mediante la actividad glicerol-P 1-aciltransferasa (I), dando lugar al ácido lisofosfatídico.

c) El oleil-CoA es transferido a la posición *sn*-2 de la fosfatidilcolina para su desaturación (3) y el linoleato formado se transfiere posteriormente al conjunto de acil-CoAs citoplasmático, todo gracias a una reacción de intercambio catalizada por la *sn*-2-acil-CoA lisofosfatidilcolina aciltransferasa (2).

d) El oleil-CoA y el linoleil-CoA se usan para la acilación de la posición *sn*-2 del ácido lisofosfatídico, mediante la acción de la 1-acilglicerol-P 2-aciltransferasa (II), formando ácido fosfatídico.

e) El grupo fosfato del ácido fosfatídico es hidrolizado mediante la fosfatidato fosfatasa o fosfohidrolasa (III) produciéndose diacilglicéridos.

f) Los diacilglicéridos pueden interconvertirse con la fosfatidilcolina produciendo un enriquecimiento del esqueleto glicerídico con ácidos grasos poliinsaturados, mediante la acción reversible de la 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferasa (1).

g) Por último, los diacilglicéridos son acilados en la posición *sn*-3 con acil-CoAs citoplasmáticos dando lugar a los TAG, por la acción de la diacilglicerol aciltransferasa (IV).

Generalmente se considera que la composición de ácidos grasos de los TAG depende, por un lado, de la composición de ácidos grasos del conjunto de acil-CoAs citoplasmático, y por otro lado, de la selectividad por ciertos ácidos grasos de las aciltransferasas que acilan al glicerol-3-P. La selectividad de las glicerol aciltransferasas es distinta en distintas especies vegetales. Así, por ejemplo, la acilación inicial en posición *sn*-1 del glicerol-P es más específica hacia ácidos grasos monoinsaturados en semillas de cártamo que en las de nabo (*Brassica campestris*) (Bafor et al., 1990). Pero la DAG-aciltransferasa de cártamo no mostró ninguna selectividad cuando se le presentaron mezclas de distintos ácidos grasos.

IV.2. Biosíntesis de Fosfolípidos.

El ácido fosfatídico es el compuesto central del cual derivan todos los fosfolípidos (figura 9). Este ácido puede transformarse en DAG o en CDP-DAG. La formación de fosfatidilcolina, que es el fosfolípido mayoritario, y de fosfatidiletanolamina, ocurre a partir de DAG a través de la ruta conocida como CDP-Base. Esta ruta está formada por tres reacciones enzimáticas. En la primera reacción, la base, colina o etanolamina, es fosforilada por una kinasa. Las enzimas, colina kinasa (1) y etanolamina kinasa (1'), son enzimas solubles y han sido purificadas de distintos tejidos, entre ellos, las semillas de soja (Wharfe y Harwood, 1979).

El segundo enzima de la ruta es la citidil transferasa (2) que es parcialmente soluble y parcialmente asociada al RE (revisión en Moore, 1982). Esta enzima cataliza la transferencia de un grupo citidilo (CD) a la fosfocolina y fosfoetanolamina. Este es probablemente el paso limitante de la ruta (Price-Jones y Harwood, 1983). La reacción final de la ruta CDP-Base consiste en la transferencia de la fosfocolina y fosfoetanolamina a DAG. Las actividades colina y etanolamina fosfotransferasas (3,3') se localizan en el RE. Aunque se sugirió inicialmente que estas dos actividades se localizaban en la misma proteína, hoy parece cierto que se trata de dos proteínas diferentes (Harwood, 1979). La PC también puede ser sintetizada mediante la triple metilación de la base de la PE (4). Los grupos metilos serían transferidos desde la S-adenosil-L-metionina. Esta ruta se considera poco relevante en plantas (Moore, 1982).

El ácido fosfatídico, en vez de ser desfosforilado, puede ser convertido en CDP-DAG. Esta reacción está catalizada por la fosfatidato:CTP citidiltransferasa (5) y es importante para la síntesis del fosfatidilglicerol (PG), del difosfatidilglicerol (DPG) o cardiolipina y del fosfatidilinositol (PI). Los enzimas implicados en la síntesis de PG y DPG son predominantemente mitocondriales (Harwood, 1985). La fosfatidilglicerolfosfato (PGP) sintetasa (6) se encuentra en la membrana interna mitocondrial, pero la PGP fosfatasa (7) es probablemente soluble (Harwood, 1986).

El PI también se forma a partir de CDP-DAG pero en este caso solo está implicada una enzima, la fosfatidilinositol

sintetasa (8). Esta enzima está localizada exclusivamente en el retículo endoplasmático (Moore et al., 1973).

La fosfatidilserina (PS) no parece sintetizarse a partir del ácido fosfatídico, ni a través de ninguna reacción que implique el uso de CDP. La incorporación de serina en fosfolípidos parece ocurrir mediante una reacción de intercambio de base, principalmente con la PE (9).

Los fosfolípidos pueden, además, ser remodelados por reacciones de reacylación. De especial interés es la, ya mencionada con anterioridad, reacylación de la PC, que juega un papel importante en la biosíntesis de TAG en los tejidos vegetales.

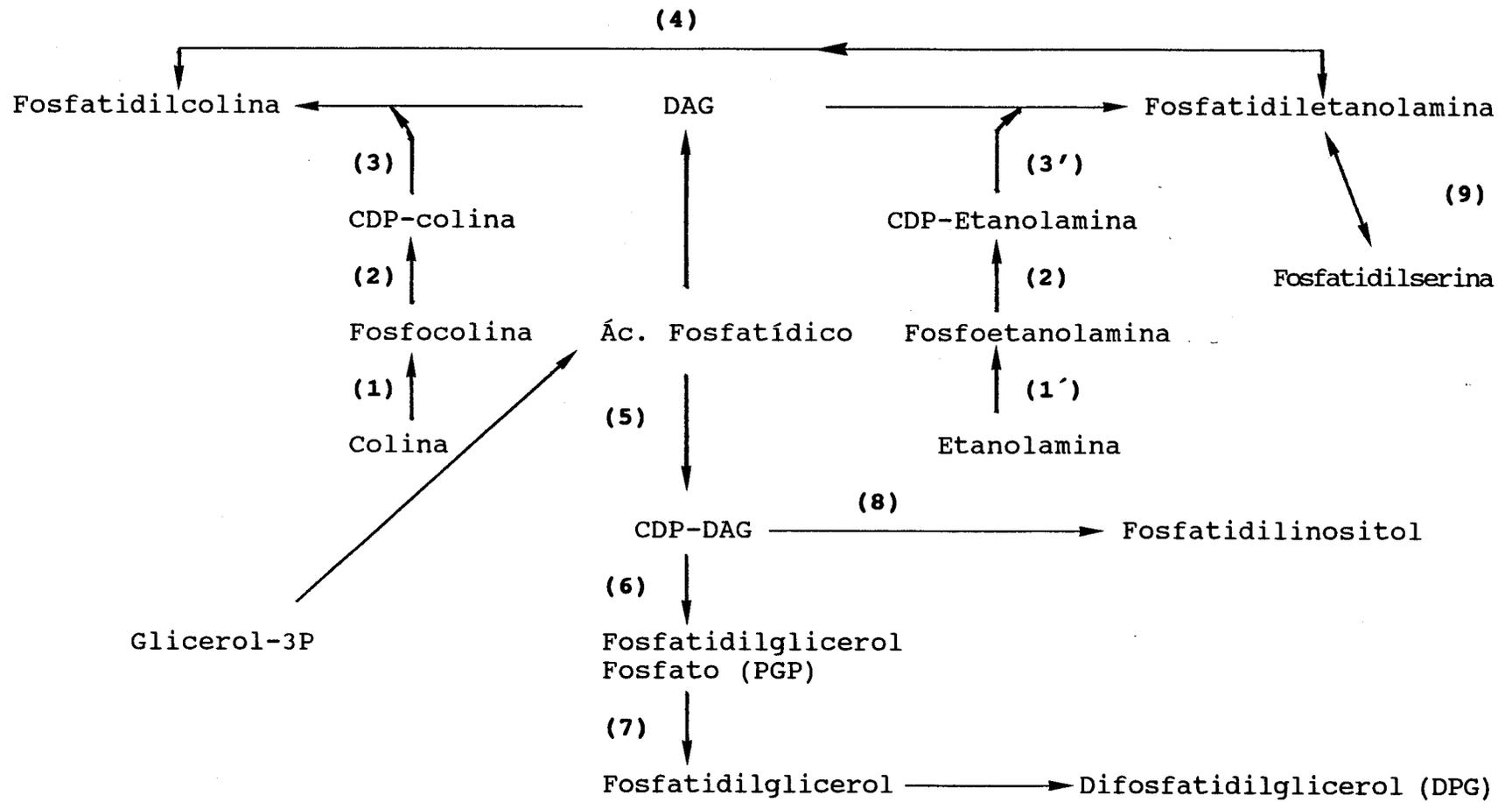


Figura 9. Biosíntesis de Fosfolípidos en Plantas.

IV.3. Biosíntesis de Galactolípidos.

Los dos principales galactolípidos, MGDG y DGDG son los componentes principales de las membranas fotosintéticas y, aunque en menor proporción, también se encuentran formando parte de las membranas de los tejidos de reserva.

La biosíntesis de galactolípidos está localizada en los cloroplastos y plastidios vegetales y ocurre según la ruta esquematizada en la figura 10.

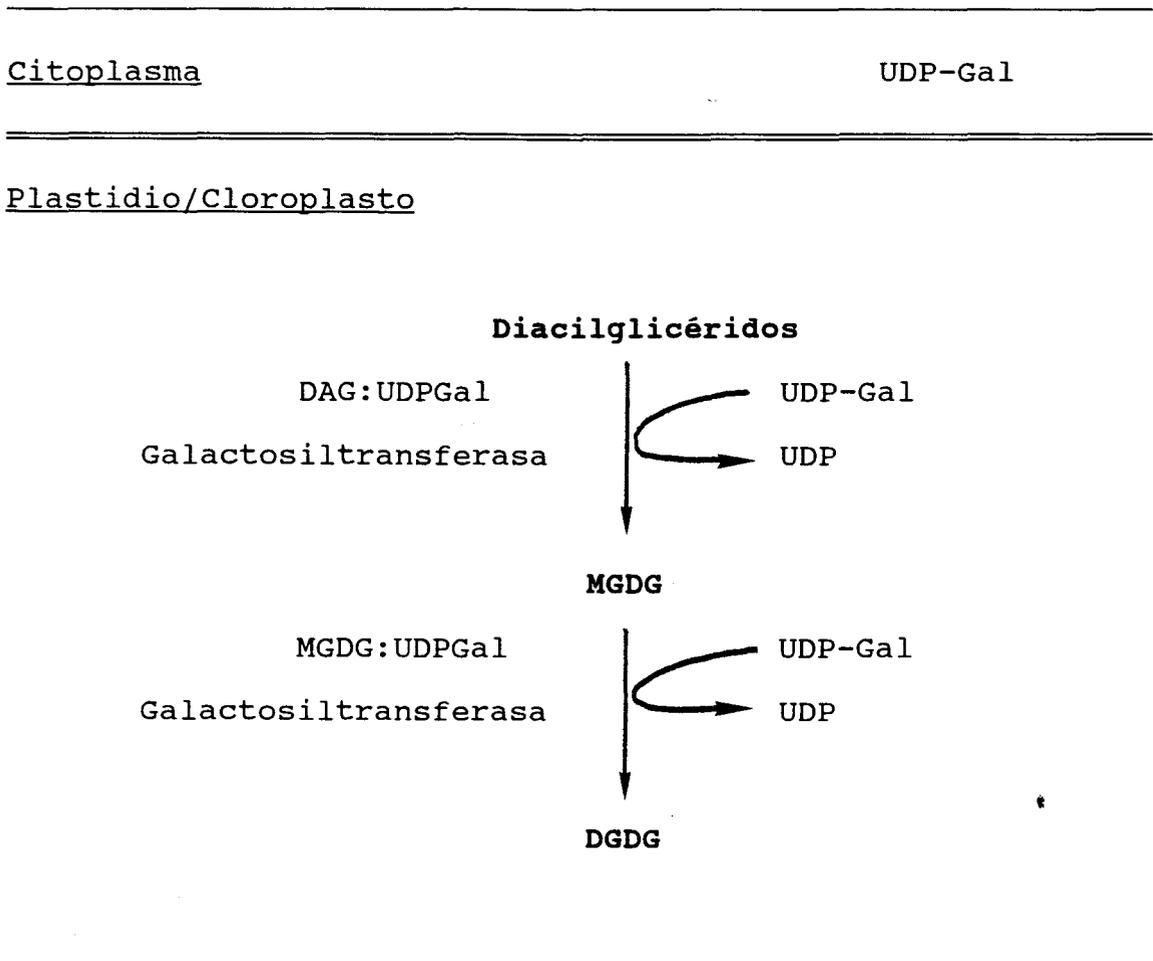


Figura 10. Biosíntesis de Galactolípidos en Plantas.

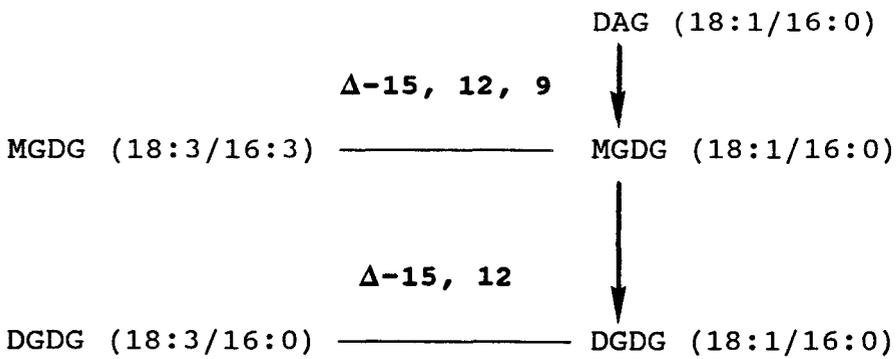
La UDP-Galactosa se genera en el citoplasma celular y es usada para transferir la galactosa al DAG mediante la acción de dos enzimas galactosil-transferasas localizadas en los cloroplastos y plastidios vegetales. La primera galactosiltransferasa es específica para la formación de un enlace β -glucosídico y la segunda forma un enlace α -glucosídico (Douce y Joyard, 1980).

Los galactolípidos contienen mayoritariamente ácido grasos poliinsaturados. El origen de estos ácidos grasos en los galactolípidos ha sido objeto de numerosos estudios y aún no está totalmente elucidado (revisiones en Heermsekerk y Wintermans, 1987; y Joyard y Douce, 1987). Parece ser que hay dos tipos de galactolípidos según la especie vegetal de que se trate. En las plantas llamadas "16:3" las especies moleculares predominantes son una mezcla de 18:3/18:3 y 18:3/16:3, estando el 16:3 presente exclusivamente en la posición *sn*-2 del glicerol. La síntesis de galactolípidos con 16:3 en posición *sn*-2 se la llama "ruta procariótica". En las plantas llamadas "18:3", no hay 16:3 presente y las especies moleculares predominantes son del tipo 18:3/18:3, que se sintetizan por la "ruta eucariótica" (fig. 11).

En la "ruta procariótica" las desaturaciones del ácido 18:1 hasta 18:3 ocurren en cloroplastos y plastidios usando sustratos unidos a galactolípidos, y también las desaturaciones que sufre el 16:0 hasta 16:3. Por el contrario, en la "ruta eucariótica" no hay incorporación de 16:0 ni sus derivados insaturados en galactolípidos, y la formación del 18:2 ocurre en el citoplasma, la única

desaturación que tiene lugar en plastidios y cloroplastos es la desaturación en Δ -15, que da origen al ácido α -linolénico.

Ruta Procariota



Ruta Eucariota

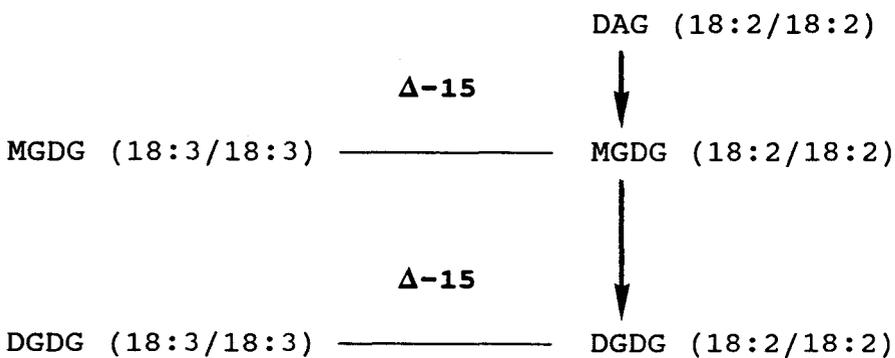


Figura 11. Esquema de las diferencias entre las rutas procariotas y eucariotas de síntesis de galactolípidos.

IV.4. Formación de los oleosomas.

El exámen microscópico de una semilla madura, en fase activa de acumulación de aceite, revela unas estructuras citoplasmáticas esféricas que reaccionan fuertemente con tinciones de lípidos y que son sin duda los sitios donde el aceite se acumula dentro de la célula. La morfología y la formación de estos orgánulos ricos en lípidos han sido objeto de gran controversia; incluso en el nombre de los mismos ha habido constantes desacuerdos.

Durante el desarrollo de las semillas, los oleosomas mantienen un tamaño homogéneo de aproximadamente 1 μm de diámetro medio (Slack *et al.*, 1980). Los oleosomas mantienen su integridad en la célula y sus superficies parecen ser estables. Esto llevó a pensar que debían estar delimitados por algún tipo de membrana que separase la fase lipídica interna del citosol. En distintos estudios microscópicos se llegó a distintas conclusiones sobre la naturaleza y origen de estas membranas. En estudios realizados con maíz (Frey-Wyssling *et al.*, 1963) se encontró que eran membranas bicapas, lo mismo que en estudios con semillas de judías y guisante (Mollenhauer y Totten, 1971). Otros estudios con semillas de cacahuete (Yatsu y Jacks, 1972), y de colza, girasol, y sandía (Wanner y Theimer, 1978) concluyeron que se trataba de una membrana monocapa. Por último, en otros estudios realizados con semillas de ricino (Harwood *et al.*, 1971) no se encontró ninguna estructura membranosa. Bergfeld *et al.* (1978), en un estudio llevado a cabo con cotiledones

de mostaza en desarrollo concluyeron que los oleosomas nacientes aparecían primero en el citoplasma, cerca de los plastidios, sin estar rodeados de membrana alguna y que en posteriores etapas de su desarrollo eran encapsulados por una membrana similar a las del retículo endoplasmático. Por microscopía electrónica se ha demostrado posteriormente que los oleosomas están delimitados por "algún tipo" de membrana que constituye la interfase lípido-proteína (Slack et al., 1980).

Wanner et al. (1981), tras la observación microscópica de oleosomas en formación en semillas de muy distintas especies vegetales, formularon una hipótesis para explicar la ontogenia de los oleosomas que consiste en que los TAG formados en el RE se acumulan en principio en la fase lipídica interna, entre las dos capas de fosfolípidos de algunos lugares del RE, o bien en medio de la membrana externa del plastidio. Conforme el acúmulo de TAG va siendo mayor, se va produciendo una vesiculación de la membrana monocapa externa del RE o del plastidio hasta que los oleosomas maduros terminan desconectándose de sus lugares de origen y quedándose rodeados de una membrana monocapa, aunque a veces puedan llevar asociados restos de las membranas de origen (fig. 12). Según este modelo, existiría un flujo continuo de TAG y de los fosfolípidos constituyentes de las membranas entre el retículo endoplasmático, los plastidios y los oleosomas.

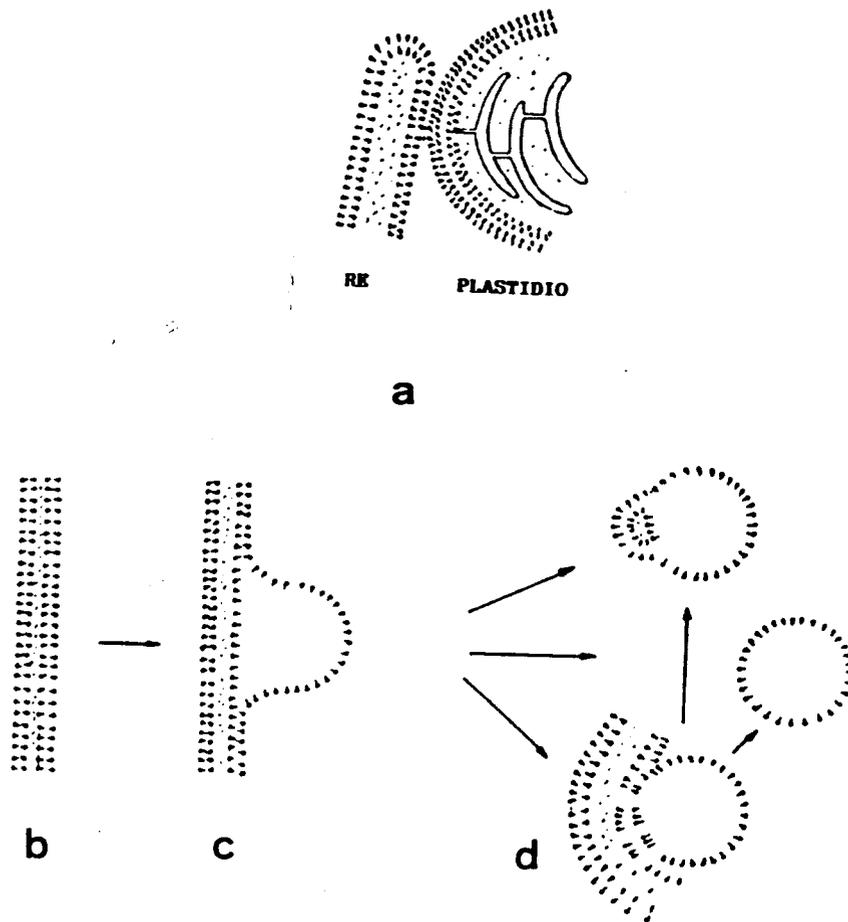


Figura 12. Modelo de Wanner et al. (1981) de la formación del oleosoma. (a) Zonas de contacto entre el plastidio y el RE; (b) Brazo del R.E. o membrana externa del plastidio; (c) Acumulación de lípidos en la interfase apolar de la membrana; (d) Diversos tipos de oleosomas maduros, asociados o no con restos del orgánulo progenitor. (Tomado de la Tesis Doctoral de D. J.M^a García Martos, 1988)

El análisis de oleosomas aislados de distintas plantas muestra que contienen, además de TAG, fosfolípidos y proteínas (Gurr et al., 1980). Preparaciones cuidadosamente purificadas de oleosomas de cártamo (Slack et al., 1980)

tenían una composición constante de 2.3% de proteínas, 0.7% de lípidos polares y 97% de lípidos neutros. En semillas de soja se ha visto que la composición varía durante el desarrollo de las mismas (García *et al.*, 1988). Este contenido en lípidos polares sería suficiente para constituir al menos una membrana monocapa. Las proteínas presentes en los oleosomas, llamadas oleosinas, no han sido encontradas en ninguna otra estructura subcelular. Las oleosinas han sido aisladas por electroforesis de distintas especies vegetales y se conocen las secuencias de aminoácidos de las de maíz (Vance y Huang, 1987), zanahoria (Hatzopoulos *et al.*, 1990), remolacha (Murphy *et al.*, 1991), colza (Murphy *et al.*, 1991), soja (Qu *et al.*, 1986) y girasol (Murphy *et al.*, 1989). Las oleosinas son proteínas de bajo peso molecular, alrededor de 20 kDa, y aunque sus secuencias difieren en distintas especies, e incluso hay varios tipos en el mismo tejido, parecen tener una estructura común formada por tres dominios principales. Un dominio central hidrofóbico con estructura en hoja β -plegada flanqueado por dos dominios hidrofílicos, en los extremos N- y C-terminales, con estructura fundamentalmente en α -hélice. El dominio central estaría incluido en la fase lipídica de las membranas de los oleosomas y los extremos estarían orientados hacia la interfase lípido-acuosa (Li *et al.*, 1992). Las oleosinas se sintetizan en ribosomas citoplasmáticos y no se insertan en las membranas de los oleosomas hasta que las semillas se encuentran en el periodo final de su formación (Vance y Huang, 1987).

V. REGULACIÓN DE LA DESATURACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POR TEMPERATURA.

Muchas funciones vitales dependen de las membranas celulares. Las membranas (1) constituyen barreras permeables entre los compartimentos celulares restringiendo la difusión libre de solutos y catalizando reacciones de intercambio de solutos e iones; (2) almacenan energía en forma de iones transmembrana y gradientes de solutos y regulan la disipación de la energía; (3) constituyen una matriz organizadora de las interacciones entre los componentes de rutas metabólicas y (4) controlan la transferencia de información entre los compartimentos que separan mediante receptores específicos. Los lípidos que forman las membranas tienen un papel central en el desarrollo de estas funciones al actuar como (i) barreras físicas a la difusión de electrolitos, (ii) solventes para los distintos constituyentes de las membranas y (iii) anclaje, activadores y estabilizadores de las proteínas de membrana.

Para llevar a cabo sus funciones las membranas deben tener un estado suficientemente estable para mantener la permeabilidad adecuada y suficientemente fluido para soportar los cambios de forma y volumen de la célula. Los lípidos que son los elementos estructurales básicos de las membranas, fundamentalmente fosfolípidos y glucolípidos, son polimórficos y poseen complejas propiedades físicas, sufriendo frecuentemente cambios de estado como consecuencia de variaciones del ambiente como la temperatura, presión, pH,

actividad hídrica, etc. Así pues, los cambios ambientales pueden producir perturbaciones en las estructuras de las membranas que pueden alterar sus funciones fisiológicas (revisión en Hazel y Williams, 1990).

El mantenimiento por parte de las membranas de un estado físico adecuado a las condiciones ambientales se ha denominado "adaptación homeoviscosa" (Sinensky, 1974), y se trata de un ejemplo de homeostasis a nivel celular. Aunque la fluidez de la membrana no es necesariamente el único parámetro a considerar, en general se cree que los cambios en la composición de los lípidos de las membranas, como respuestas a cambios de las condiciones ambientales, se producen para mantener una fluidez adecuada de las mismas. El término fluidez es de alguna manera ambiguo y sobre todo muy difícil de medir, puesto que las distintas técnicas empleadas para su medida consideran distintas zonas o microambientes de las membranas y distintos parámetros dinámicos o estructurales. Por ejemplo, las técnicas que emplean compuestos fluorescentes miden tiempos de relajación rotacional rápidos, pero rotaciones más lentas no son detectadas. En un sentido amplio, fluidez es lo inverso a viscosidad, pero al menos dos parámetros están implicados en la fluidez de las membranas: la velocidad de los distintos movimientos de las moléculas lipídicas y la estructura y ordenamiento de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos (revisión en Brenner, 1984).

La temperatura es uno de los factores ambientales que más fuertemente afecta a la fluidez de las membranas

provocando cambios significativos en la composición de los lípidos de los organismos poiquiloterms. Además de adaptarse a ambientes con temperaturas extremas, muchos organismos deben soportar fluctuaciones térmicas estacionales y diurnas de su temperatura ambiente. Las respuestas de los distintos organismos a estos cambios son variadas, pero es común que se produzca una reestructuración de sus membranas mediante cambios en la relación lípido/proteína, cambios en las proporciones de las distintas clases de lípidos y/o cambios en la naturaleza de los ácidos grasos que forman parte de los lípidos. Esto último puede implicar alteraciones de la longitud, hidroxilaciones, cambios en la posición de acilación y/o en el grado de insaturación de los ácidos grasos.

Los cambios en el grado de insaturación son una de las formas más efectivas y comunes de adaptación de las membranas a los cambios de temperatura. En muchos microorganismos, animales y plantas se ha detectado un aumento de la proporción de ácidos grasos insaturados y una correspondiente reducción de los saturados como respuesta al frío. Las cadenas hidrocarbonadas con dobles enlaces *cis* tienen puntos de fusión más bajos que las cadenas saturadas y por tanto, producen un descenso del punto de fusión de los lípidos de los que forman parte. Además, gracias a los dobles enlaces, pueden adoptar una gran variedad de conformaciones moleculares que se encuentran en continuo cambio dinámico. Esto provoca una mayor separación de las cadenas en las posiciones *sn-1* y *sn-2* de los lípidos de membrana, lo que

disminuye el empaquetamiento de los mismos, haciendo que la membrana sea más fluida, y aumentando su superficie mientras que disminuye su grosor (revisión en Brenner, 1984).

Vamos a revisar los conocimientos actuales sobre el efecto de la temperatura sobre el grado de insaturación de los lípidos.

V.1. Efecto de la temperatura en la insaturación de los lípidos en microorganismos.

Los microorganismos han sido el principal objeto de estudio en relación a la adaptación a cambios de temperatura. Se han detectados distintos tipos de modificaciones que aumentan la fluidez de las membranas a bajas temperaturas, como la inserción de grupos hidroxilos en los ácidos grasos de *Pseudomona aeruginosa* (Kopinsky , 1987), o el aumento del porcentaje de ácidos grasos con cadena ramificada en *Thermomicrobium roseum* (Pond y Langworthy, 1987). Pero el mecanismo más comúnmente encontrado en muchos tipos de microorganismos es el aumento de las proporciones de ácidos grasos insaturados.

V.1.1. Microorganismos procariotas.

Los primeros estudios realizados en *E.coli* (Marr e Ingraham, 1962) mostraron que se producía un aumento en las

proporciones de los ácidos grasos insaturados, 16:1 y 18:1, a medida que bajaba la temperatura de crecimiento (Ng et al., 1962). Posteriores experimentos (Sinensky, 1971) indicaron que la temperatura afecta a las actividades de las enzimas implicadas en la síntesis de lípidos. Este mismo autor (Sinensky, 1974) determinó la fluidez de las membranas y los lípidos de *E.coli* crecidas a distintas temperaturas (de 15 a 43°C), observando que las distintas composiciones de los lípidos tenían idéntica viscosidad a las temperaturas de crecimiento a las que se producían. En este trabajo se postula que es el cambio en la propia fluidez de las membranas la que regula la actividad de las enzimas implicadas en la biosíntesis de los ácidos grasos insaturados, tratándose por tanto de un mecanismo de autorregulación a nivel de las membranas.

Por otro lado, estudios realizados con *Bacillus megaterium* (Fulco, 1970; Lombardi y Fulco, 1980) mostraron que se producía un aumento de la actividad Δ^5 -desaturasa, que sintetiza ácido 16:1 a partir de 16:0, en bacilos crecidos a baja temperatura (20°C) respecto a los crecidos a alta (35°C). Este aumento de actividad resultó inhibido por cloranfenicol, indicando que el aumento de actividad se debe a un mecanismo que implica una inducción de la síntesis de proteínas, posiblemente de la propia enzima. También se observó que la vida media de la enzima dependía de la temperatura de incubación, pareciendo que la alta temperatura producía una inactivación irreversible de la enzima. Por último, también encontraron un tercer mecanismo regulatorio

consistente en que el aumento de actividad producido por la bajada de temperatura fue reprimido inmediatamente cuando se volvió a aumentar la temperatura del cultivo, produciéndose un descenso rápido de la actividad cuya cinética parecía indicar la existencia de un modulador termolábil de la actividad desaturasa (Fuiji y Fulco, 1977).

La controversia en la existencia de estos dos tipos de mecanismos, por un lado control directo por fluidez de membranas y por otro lado, control a nivel de síntesis de proteínas se repetirá en otros tipos de organismos.

Un gran número de trabajos se han llevado a cabo con distintas especies de cianobacterias. Estudios realizados con *Anabaena variabilis* mostraron que cambios de la temperatura de cultivo producían variaciones en el grado de insaturación en los MGDG (Sato y Murata, 1980, 1981). En *Synechocystis* PCC6803 (Wada y Murata, 1990) una disminución de la temperatura de 38 a 22°C produjo un fuerte aumento en las proporciones de los ácidos α y γ -18:3 y 18:4 a expensas de las de 18:1 y 18:2. Este aumento en el grado de insaturación fue inhibido por cloranfenicol y rifampicina, indicando que, al igual que en los bacilos, se produce una inducción de la síntesis de las desaturasas tras el cambio de temperatura.

Wada y Murata (1989) aislaron dos mutantes de *Synechocystis* PCC6803 deficientes en la posición Δ^6 (Fad 6) y Δ^{12} (Fad 12) del ácido oleico en MGDG. A partir del mutante Fad 12 clonaron un gen, *desA*, que codifica para una Δ^{12} -desaturasa de galactolípidos. La introducción de este gen en *A. nidulans* hizo que aumentase la estabilidad de la actividad

fotosintética a bajas temperaturas (Wada et al., 1990). Estudio con los mutantes Fad 12 (Gombos et al., 1991) y Fad 6 de *Synechocystis* PCC6803 (Wada et al., 1992), mostraron que la falta de ácidos grasos poliinsaturados afectó al crecimiento de estas cianobacterias a 22°C pero no a 34°C e hizo a las bacterias sensibles a la fotoinhibición de la fotosíntesis a baja temperatura.

V.1.2. Microorganismos eucariotas.

En el ciliado *Tetrahymena pyriformis* se observó en cultivos isotérmicos que las proporciones de los ácidos grasos insaturados eran mayores en células crecidas a 15°C que en las crecidas a 39.5°C (Fukushima et al., 1976).

Posteriormente, se sometió a estos ciliados a cambios de temperatura de 39.5 a 15°C durante 48 horas a la vez que se les suministraba [¹⁴C]-palmítico. Se observó que, la velocidad de desaturación del ácido palmítico aumentó fuertemente tras solo una hora de incubación a 15°C. Este incremento de actividad fue inhibido por cicloheximida indicando que se ha producido una inducción en la síntesis de la palmitil-CoA desaturasa tras la bajada de temperatura (Nozawa y Kasai, 1978; Kasai y Nozawa, 1980). Esta es la primera descripción de un mecanismo de este tipo en células eucariotas.

También se estudió el efecto del cambio contrario de temperatura de 15°C a 34°C, encontrándose que las actividades palmitato, estearato y oleato desaturasas descendieron

fuertemente tras una hora a 34°C. Este descenso de las actividades no fue inhibido por cicloheximida ni actinomicina D, lo que indica que la adaptación al calor no requiere síntesis de proteínas, al contrario que la adaptación al frío. También se observó que el aumento de temperatura produjo una rápida pérdida del contenido de un componente terminal del sistema desaturasa sensible a cianuro (Umeki *et al.*, 1983). Además la represión de la actividad por subida de temperatura resultó ser rápidamente reversible mediante reenfriamiento (Kasai *et al.*, 1985). Estos datos sugieren que es probable que la inducción de la síntesis de la enzima, la estabilidad térmica de la misma y la fluidez de la membrana estén implicados en la regulación de la actividad palmitato desaturasa en *Tetrahymena pyriformis*.

En el hongo *Neurospora crassa* también se demostró que el aumento de la proporción de 18:3 en los fosfolípidos en células crecidas a 15°C respecto a las crecidas a 37°C era inhibido por cicloheximida, indicando que se requiere síntesis de proteínas, presumiblemente de la Δ^{15} -desaturasa (Martin *et al.*, 1981).

En el alga *Dunaliella salina* se han detectado aumentos en la proporción de 18:3 en PC y PG tras cambios de 30 a 12°C, pero estos aumentos sólo fueron significativos tras períodos de más de 60 horas a 12°C (Lynch y Thompson, 1984).

Recientemente se ha estudiado la adaptación a baja temperatura de la ameba *Acanthamoeba castellanii*, observándose fuertes aumentos del porcentaje de 18:2 tras bajar la temperatura de cultivo de 30 a 15°C. El mayor

aumento se observó en los lípidos del retículo endoplasmático, donde el % de 18:2 se duplicó en 4 horas. La PC fue el tipo de lípido que más rápidamente respondió, tras sólo una hora a 15°C (Jones et al., 1993).

Todos estos estudios muestran la existencia de incrementos en el grado de insaturación de los lípidos como respuesta al frío. Sin embargo, existen diferencias en el ácido graso cuya síntesis es estimulada y en la cinética y mecanismos de estos cambios.

V.2. Efecto de la temperatura en la insaturación de los lípidos en animales.

En animales se han realizado menos estudios que en microorganismos y plantas pero tanto en animales poiquiloterms como homeoterms se han detectado aumentos en el grado de insaturación de los lípidos a bajas temperaturas.

Los animales poiquiloterms más estudiados a este respecto son los peces. Estudios realizados con peces de distintos hábitats climáticos muestran que en climas fríos sus lípidos tienen un mayor grado de insaturación (Paton, 1975). En microsomas del hígado del pez *Pimodolus maculatus*, se observó que las actividades desaturadas y elongadas eran superiores cuando crecían a 15°C que a 30°C. También se observó que un descenso de la temperatura ambiente aumentó la velocidad de desaturación de 18:2 a 18:3 sin modificar la Km de la reacción. La actividad Δ^6 -desaturada de los microsomas

de peces crecidos a 30 y 15°C se inactivaba a igual velocidad y extensión a 40°C (De Torrenco y Brenner, 1976).

Por otro lado, en animales homeotermos (González *et al.*, 1986), parece ser que la regulación por temperatura del grado de insaturación se encuentra bajo control hormonal y está influenciada por la dieta.

V.3. Efecto de la temperatura en la insaturación de los lípidos en plantas.

Las altas y bajas temperaturas son un factor limitante para el crecimiento y distribución de los vegetales. Durante la aclimatación a temperaturas extremas ocurren muchos cambios bioquímicos. Como respuesta al frío se produce acumulación de carbohidratos, de aminoácidos, solutos y otras moléculas. También aparecen polipéptidos con propiedades crioprotectivas, mientras que otras proteínas disminuyen en su concentración. Estos fenómenos ocurren cuando se someten a las plantas a temperaturas cercanas a 0°C (revisión en Guy, 1990). Las altas temperaturas extremas también provocan estrés en las plantas, como respuesta al calor se sintetizan proteínas específicas, HSPs, cuya función no es aún muy conocida (revisión en Craig y Gross, 1991).

También las plantas que crecen en zonas templadas se deben a adaptar a variaciones de temperatura día/noche no tan extremas (revisión en Graham y Patterson, 1982; Alberdi y Corcuera, 1991). En este caso las principales respuestas

bioquímicas consisten en modificar la composición de las membranas celulares, generalmente aumentando su grado de insaturación. Esto ocurre en tejidos verdes, donde sobre todo se ha estudiado la relación entre el grado de insaturación de los lípidos cloroplásticos y el funcionamiento de la fotosíntesis; y en tejidos de reserva donde el cambio de la composición de los lípidos tiene además una importancia comercial. El mecanismo por el cual las plantas sienten los cambios de temperatura es aún desconocido.

V.3.1. Regulación por temperatura de la desaturación de los ácidos grasos en hojas.

Estudios sobre la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de las hojas de distintas especies vegetales, sensibles y resistentes al frío, mostraron una correlación entre las proporciones relativas de 16:0 y 16:1 en PG y la susceptibilidad a daños por frío de las plantas. No encontraron cambios en la composición de la PC y PE (Murata et al., 1982). Estos cambios de composición fueron explicados como resultantes de las distintas especificidades de la actividad glicerol-3P aciltransferasas en las plantas resistentes y sensibles al frío (Murata, 1983). Sin embargo, en posteriores estudios con 27 especies de plantas con distintos grados de sensibilidad al frío, no se encontró que la composición de ácidos grasos del PG estuviera relacionada con la resistencia al frío sino más bien con el origen

genético de la planta (Kenrick y Bishop, 1986). Posteriormente, se ha relacionado la resistencia al frío con el grado de insaturación del PG en hojas de tabaco transformadas con glicerol-3-P aciltransferasas de calabaza y *Arabidopsis* (Murata et al., 1992).

Estudios en hojas de plantas tan variadas como el helecho acuático *Azolla caroliniana* (Paoletti et al., 1987) y diversas coníferas chilenas (Latsague et al., 1992), muestran un significativo aumento en la insaturación de los lípidos durante el invierno respecto al verano.

Los cambios en la composición de los lípidos polares en relación con cambios de temperatura han sido estudiados en hojas de colza, encontrándose un aumento de las proporciones de 16:3 y 18:3 en MGDG y DGDG de plantas crecidas a bajas temperaturas (5 y 10°C) respecto a las crecidas a altas temperaturas (20 y 30°C) (Williams et al., 1988). Experimentos con sustratos radiactivos mostraron un aumento de la actividad de las cinco reacciones de desaturación de las hojas desarrolladas a baja temperatura (Johnson y Williams, 1989). Datos posteriores mostraron que el aumento de actividad ocurre principalmente en la oleato y linoleato desaturasas y en menor grado en la palmitato desaturasa de galactolípidos. También se observó un aumento en la oleato-PC desaturasa. Estos aumentos de actividad por frío resultaron ser inactivados cuando las hojas se colocaron a una temperatura de 30°C durante 4-8 horas (Williams et al., 1992a). Posteriormente se observó que la actividad desaturasa podía volver a aumentar si tras el tratamiento a 30°C, se

bajaba de nuevo la temperatura a 5°C. Pero la velocidad de reactivación fue muy lenta, tardándose de 4 a 8 días en encontrar aumentos de actividad significativos (Williams et al., 1992b).

Aunque se ha discutido mucho sobre el papel de los ácidos grasos poliinsaturados en el mantenimiento de la estructura y funcionamiento de las membranas cloroplásticas a bajas temperaturas, la primera evidencia de este mecanismo en plantas ha sido obtenida muy recientemente. Hugly y Sommerville (1992) encontraron que dos mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes en la formación de ácidos grasos poliinsaturados de los lípidos cloroplásticos, tenían una apariencia indistinguible del silvestre cuando crecían a 22°C, pero a 5°C, las hojas de los mutantes resultaron cloróticas mientras que las del silvestre eran normales. Los cloroplastos de estos mutantes crecidos a 5°C eran mucho más pequeños que los del silvestre y el contenido en membranas tilacoidales se redujo hasta un 70%. Esto implica que el alto nivel de ácidos grasos poliinsaturados de los cloroplastos influye en la adaptación a bajas temperaturas.

V.3.2. Regulación por temperatura de la desaturación de los ácidos grasos en tejidos de reserva.

Desde hace bastante tiempo se sabe que algunas semillas producen aceites más insaturados cuando crecen a bajas temperaturas. Esta conclusión se basa en el análisis de los

lípidos de semillas crecidas en distintas localizaciones geográficas (revisión en Hilditch y Williams, 1964).

Concretamente, los primeros estudios realizados con semillas de girasol sobre la influencia de la temperatura en la composición de ácidos grasos (Baker y Hilditch, 1950a; Baker y Hilditch, 1950b; Baker et al., 1950) sugerían que la gran variabilidad en las proporciones relativas de los ácidos oleico y linoleico en aceites de girasol cultivados en distintos países se debían a las diferentes condiciones ambientales más que a las diferentes variedades botánicas. Grindley (1952) encontró diferencias de un 11-12% en el porcentaje de ácido oleico en aceites de girasol de la misma variedad cultivados en la misma localidad durante el verano y el invierno y que estuvieron expuestos aproximadamente a los mismos períodos e intensidades luminosas.

En distintas semillas oleaginosas se encontraron aumentos en las proporciones de 18:2 y 18:3 a bajas temperaturas, pero estos cambios fueron variables según la especie (Canvin, 1965). Mientras que en girasol el aumento del porcentaje de 18:2 fue muy grande en semillas cuya maduración se produjo a 10°C respecto a 26.5°C, en semillas de lino el aumento se produjo en el porcentaje de 18:3 y las semillas de cártamo y ricino prácticamente no mostraron diferencias a las distintas temperaturas. Son varios los estudios llevados a cabo desde los años sesenta en los cuales se ha relacionado temperatura y composición de ácidos grasos en aceites o semillas de girasol (Earle et al., 1968; Roberston et al., 1971; Roberston et al., 1978; Harris et

al., 1978; Roberston y Green, 1981; Trémolieres et al., 1982; Seiler, 1983; Fernández-Martínez et al., 1986; Lájara et al., 1990). En estos estudios se utilizaron distintas variedades e híbridos de girasol cultivados en el campo y en cámaras de crecimiento a distintas temperaturas durante el desarrollo de las semillas. En todos los casos se observó que a mayor temperatura de crecimiento mayor es el porcentaje de ácido oleico y menor el de ácido linoleico en las semillas.

En cotiledones en desarrollo de soja y lino se ha estudiado el efecto del descenso de la temperatura ambiente durante un período de 24 horas, observándose que las proporciones de 18:2 (en soja) y de 18:3 (en lino) aumentaron significativamente en PC y DAG, mientras que en TAG y PE los cambios fueron pequeños (Slack y Roughan, 1978). En semillas de colza también aumenta el grado de insaturación a bajas temperaturas (Trémolieres et al., 1978, 1982). Igualmente en los lípidos de cacahuets se ha observado un aumento en la proporción de 18:2 al disminuir la temperatura de crecimiento (Sanders, 1982).

Aunque es lógico pensar que estos aumentos en las proporciones de ácidos grasos poliinsaturados se deban al aumento de las actividades desaturadas de las semillas, esto sólo ha sido demostrado hasta ahora en semillas de soja (Cheesbrough, 1989), donde se observó que las actividades oleato y linoleato desaturadas "in vitro" fueron 94 y 10 veces respectivamente más altas en semillas mantenidas durante 20 horas a 20°C que en las mantenidas a 25°C. A 35°C estas actividades fueron indetectables.

Se sabe poco sobre los mecanismos bioquímicos responsables de los cambios del grado de insaturación como respuesta a la temperatura en semillas. En general, se considera que el motivo de aumentar la insaturación a bajas temperaturas es mantener la adecuada fluidez de las membranas celulares. Pero no se sabe cómo sienten las semillas los cambios de temperatura ni qué mecanismos ponen en marcha para aumentar sus actividades desaturadas. En este sentido se han propuesto distintas hipótesis.

En primer lugar, Harris y James (1969), tras estudios realizados con distintas especies vegetales sugirieron que el aumento en el grado de insaturación a baja temperatura en tejidos no fotosintéticos se debía al aumento de la concentración de oxígeno en solución a temperaturas bajas, ya que el oxígeno es cosustrato de la reacción de desaturación. Sin embargo, estudios posteriores con cotiledones de cártamo (Browse y Slack, 1983) demostraron que los cambios en la concentración de oxígeno disuelto que ocurren entre 13 y 37°C no afectaban a la actividad oleato desaturasa "in vitro" ni "in vivo", puesto que a estas temperaturas la concentración de oxígeno es saturante. Igualmente se ha demostrado que la concentración de oxígeno no es reguladora de la estearato desaturasa de cártamo (McKeon y Stumpf, 1982).

Otra atractiva hipótesis es que la fluidez de las membranas puede afectar directamente a las actividades desaturadas. Al encontrarse estas enzimas localizadas en las membranas del RE, un cambio en la fluidez podría alterar su conformación haciéndolas más o menos activas. Este mecanismo

que había sido sugerido en *E.coli* (Sinensky, 1974), fue propuesto más tarde como un mecanismo general que podría actuar en animales, plantas y microorganismos (Brenner, 1984). Un intento de demostrar la existencia de este mecanismo en plantas se realizó hidrogenando parcialmente microsomas de patata (Demandre *et al.*, 1986). La hidrogenación catalítica aumentó el porcentaje de ácidos grasos saturados de las membranas haciéndolas menos fluidas, sin embargo, esto no produjo el esperado aumento de la actividad oleato desaturasa, sino que por el contrario la inhibió al 100%. Hay que tener en cuenta que la hidrogenación química ha podido dañar a la enzima. Otro estudio intentando verificar esta hipótesis fue realizado en semillas de cártamo, mediante la manipulación del contenido de 18:1 en microsomas por intercambio de acilos, también resultó infructuoso (Stymne y Stobart, 1986b). Se observó que las membranas con mayor contenido en 18:1, menos fluidas, tenían menor actividad oleato desaturasa que las que contenían más linoleico, más fluidas. Al contrario de lo esperado.

Browse y Slack (1983) sugirieron que las distintas respuestas a los cambios de temperatura de las actividades ácido graso sintetasa y oleato desaturasa eran suficientes para explicar los cambios observados en las proporciones relativas de 18:1 y 18:2 a bajas temperatura en semillas de cártamo. Encontraron que cuando la temperatura descendía ambas actividades descendían, pero la velocidad de desaturación respecto a la de síntesis de ácidos grasos aumentaba. Sin embargo, estos datos no concuerdan con los

datos de Cheesbrough (1989) en soja ni con los nuestros en girasol.

La última hipótesis, inducción de la actividad desaturasa regulada a nivel genético, fue propuesta por Trémolières *et al.* (1982) tras unos estudios realizados con semillas de colza y de girasol. Observaron que mientras que en girasol las proporción 18:1/18:2 variaba drásticamente como respuesta a temperatura, en colza no se producía prácticamente ningún cambio. Esto les llevo a sugerir que la regulación de la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados por temperatura no puede deberse simplemente a mecanismos físicos como la concentración de oxígeno o la fluidez de las membranas sino que esencialmente debe producirse gracias a una activación genéticamente programada de la enzima o de su biosíntesis, pero no llegaron a demostrarlo. En algunos microorganismos procariotas y eucariotas ha sido demostrada la inducción de síntesis de las desaturasas en frío, pero en plantas este tipo de mecanismo aún no se ha confirmado.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. MATERIALES

I.1. Material biológico.

En este trabajo hemos usado como material biológico de estudio el girasol (*Helianthus annuus* L.). Hemos utilizado cuatro líneas puras, parentales de híbridos, donadas por el Dr. J.M^a. Fernández-Martínez (Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Córdoba), de dos fenotipos distintos (tabla 3).

Tabla 3. Líneas de girasol usadas en esta tesis. F.C.M., fertilidad citoplasmática masculina; E.C.M., esterilidad citoplasmática masculina.

Línea	Fenotipo	
	Compos. Ác. Grasos	Otras Características
RHA-274	Normal	Restauradora F.C.M.
HA-89	Normal	Mantenedora E.C.M.
CAS-1	Alto Oleico	Restauradora F.C.M.
HA-OL9	Alto Oleico	Mantenedora E.C.M.

Las líneas de girasol RHA-274 y HA-89 son públicas y las CAS-1 y HA-OL9 fueron obtenidas por Fernández-Martínez *et al.* (1987) mediante cruces del mutante alto oleico "Pervenets" (Soldatov, 1976) con las líneas normales públicas. Las líneas HA-89 y HA-OL9 son isogénicas.

I.2. Condiciones de cultivo.

Las semillas de girasol fueron sembradas en pequeñas macetas con turba manteniéndolas húmedas en una bandeja. A las dos o tres semanas tras la germinación fueron trasplantadas a macetas mayores, cambiando el soporte por una mezcla mitad de turba y mitad de vermiculita.

El crecimiento se realizó en cámaras de cultivo con temperatura y fotoperiodo controlado. La iluminación se hizo con tubos fluorescentes que producen una densidad de flujo de fotones de $300 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ y se establece un fotoperiodo de 16 h día/8 h noche. La temperatura de crecimiento varió según el experimento.

El riego se realizó de forma automática con una frecuencia de tres riegos diarios de 2-3 minutos de duración. El abonado se llevó a cabo con un abono líquido completo, Bayfolan S (Bayer), tres veces por semana.

En el presente trabajo hemos usado plantas completas, inflorescencias seccionadas y semillas en formación de diferentes edades expresadas como días después de la floración (DDF), considerando el primer día de floración aquel en que se han abierto los tres primeros círculos de túbulos florales. Llamaremos semillas a las mismas desprovistas de su membrana seminal. En los experimentos de electroforesis bidimensional, hemos usado exclusivamente los cotiledones, seccionando y deshechando la gémula.

II. MÉTODOS

II.1. Métodos generales.

II.1.1. Extracción de lípidos totales.

La extracción de los lípidos totales de las muestras fue realizada según el método de Hara y Radin (1978) con modificaciones. Consiste en añadir a la muestra una mezcla de hexano : isopropanol (3:2, v/v) en una proporción aproximada de 2 ml por 100 mg de tejido. En el caso de muestras de tejidos intactos se requiere la trituration de los mismos en el disolvente con una varilla de vidrio y la ayuda de una pequeña cantidad de arena de mar lavada. En el caso de la extracción de lípidos de fracciones subcelulares basta con una buena agitación de la mezcla pues los tejidos ya están bien disgregados. Posteriormente se sonica la muestra en un baño sonicador durante 10 min. A continuación se le añade 1 ml (la mitad del volumen de disolvente inicial) de una solución de sulfato amónico al 6.7%, se agita bien y se centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos. De esta forma se separan dos fases, la superior contiene los lípidos extraídos en una mezcla de hexano-isopropanol y en la inferior, isopropanol-agua quedan las sustancias hidrófilas presentes en la muestra. Los restos de tejidos triturados permanecen en el fondo del tubo. La fase lipídica se pasa a otro tubo. La inferior se reextrae con hexano : isopropanol (7:2, v/v), agitando y centrifugando de nuevo para obtener una segunda

fase lipídica que se pone junto a la extraída anteriormente. El extracto lipídico total se puede conservar poniendo nitrógeno en el tubo bien cerrado a -20°C durante semanas. Todos los disolventes usados para la extracción, separación y análisis de lípidos llevan antioxidante, butilhidroxitolueno (BHT) al 0.01%, para evitar la oxidación de los lípidos, especialmente de los más insaturados.

II.1.2. Metilación de los lípidos.

Para determinar la composición de ácidos grasos de los lípidos se formaron los ésteres metílicos de los acilos mediante un proceso de transesterificación. La metilación de los ácidos grasos se llevó a cabo añadiendo a los lípidos 2 ml de metilato sódico al 0.5 % (p/v) y calentando, en un tubo herméticamente cerrado, a 80°C durante 10 min. Después de dejar enfriar la mezcla se acidifica con otros 2 ml de sulfúrico-metanol al 3.0 % (v/v) y se vuelve a calentar a 80°C otros 10 min. (revisión en Christie, W.W., 1989). Los ésteres metílicos así formados se extraen con 1 ml de hexano, para que se separen las fases orgánica y acuosa es necesario añadir algo de agua y centrifugar 5 min. a 2000 rpm.

Para algunos análisis se usó el método de extracción y metilación rápida de Garcés y Mancha (1993), usando como reactivo de extracción y metilación una mezcla que contiene metanol : heptano : tolueno : dimetoxipropano : ácido sulfúrico (39:48:10:2:1, por vol.).

II.1.3. Determinación del contenido en lípidos.

Para hacer determinaciones cuantitativas del contenido neto de lípidos de una muestra, se adicionó a la muestra ácido heptadecanoico (17:0) como patrón interno, ya que no está presente en ninguna grasa natural. Para ello se preparó una disolución de este ácido en metanol con una concentración conocida y exacta. Un volumen adecuado de esta disolución (calculando que aproximadamente el ácido 17:0 represente un 10% del total de ácidos grasos), se adicionó a la muestra previamente a la extracción de los lípidos para que así sufra el proceso de extracción junto con los restantes lípidos de la muestra. Posteriormente, se extrajeron los lípidos totales por el procedimiento ya descrito, se metilaron y se analizaron por cromatografía gaseosa en las condiciones que se describirán posteriormente. El ácido 17:0 se separó perfectamente de los otros ácidos grasos por cromatografía gaseosa (GC) presentando un tiempo de retención intermedio entre el ácido palmítico (16:0) y el ácido esteárico (18:0). A partir del porcentaje de 17:0 se puede calcular la cantidad de lípidos, expresados en ácidos grasos, que corresponde a los porcentajes de los restantes ácidos grasos. Así se puede calcular tanto la riqueza grasa (mg de lípidos /100 mg de muestra) como la cantidad neta de un determinado ácido graso presente en la muestra.

II.2. Métodos cromatográficos de separación de lípidos.

II.2.1. Cromatografía en capa fina (CCF).

Es una técnica muy usada para la separación e identificación tentativa de las distintas clases de lípidos y de ácidos grasos (revisión en Fried, B., 1991). Se basa en la distinta adsorción de los lípidos al soporte sólido y en la distinta solubilidad de los mismos en la fase líquida móvil.

II.2.1.1. Preparación de las placas.

Nosotros empleamos placas preparadas en el laboratorio de 20 x 20 cm y 0.25 o 0.5 mm de espesor según sean para fines analíticos o preparativos. La papilla de gel de sílice (Kiesegel-60, Merck) al 50% p/v en agua u otras soluciones, descritas a continuación, se extiende sobre placas de vidrio de forma uniforme. Se secan al aire y se activan quitando la humedad en estufa a 110°C durante 1 hora.

Se han usado tres tipos de placas:

- Con gel de sílice en agua al 50% (p/v).
- Con gel de sílice en solución acuosa de sulfato amónico 0.15 M al 50% (p/v).
- Con gel de sílice en solución acuosa al 3% (p/v) de nitrato de plata al 50 % (p/v).

II.2.1.2. Detección e identificación de las bandas.

La detección de las bandas separadas en las placas de cromatografía en capa fina se hizo por distintos métodos:

1. Método destructivo: Se pulveriza la placa con ácido sulfúrico al 50% en agua. Se calienta sobre placa calefactora hasta carbonización.

2. Método no destructivo: El revelado se hace de forma no destructiva colocando la placa en una cubeta cerrada con atmósfera de yodo, tapando la zona de la muestra con un cristal y dejando que se tiñan los patrones externos o bien parte de la muestra que se deja fuera del cristal.

3. Con detector lineal de radiactividad, cuando las muestras contienen productos radiactivos.

II.2.1.3. Separación de las principales clases de lípidos.

Los lípidos totales disueltos en un pequeño volumen de hexano : isopropanol (3:2, v/v) se colocaron en placa preparativa o analítica de gel de sílice y se separaron usando hexano : éter dietílico : ácido fórmico (75:25:1, v/v/v) como líquido de desarrollo (para revisión, Christie W.W., 1982). De esta forma se separan, en orden inverso a la polaridad las siguientes clases de lípidos, desde el origen, lípidos polares, diacilglicéridos, ácidos grasos libres y triacilglicéridos.

Se usan patrones externos para detectar las posiciones de las distintas bandas sin tener que teñir la propia muestra. El revelado se hace de forma no destructiva colocando la placa en una cubeta cerrada con atmósfera de yodo, tapando la zona de la muestra con un cristal y dejando que se tiñan los patrones. Cuando se usa con fines preparativos, las distintas bandas se raspan de la placa con una pequeña espátula y así obtenemos los lípidos correspondientes adsorbidos en la sílice. Estos lípidos se pueden eluir de la sílice colocándolos en una columna pequeña y haciendo pasar 4-5 ml de una mezcla de cloroformo : metanol (2:1, v/v), o bien se pueden metilar directamente con la sílice.

II.2.1.4. Separación de los distintos lípidos polares.

Los lípidos polares aislados a partir de la placa descrita anteriormente y eluidos de la sílice se concentraron en un pequeño volumen evaporando el disolvente con corriente de nitrógeno. A partir de ellos se separaron los distintos tipos de lípidos polares. La separación se llevó a cabo en una placa de sílice con sulfato amónico que se desarrolla con acetona: benceno:agua (90:30:10, v/v/v) (Khan y Williams, 1977).

Como patrón externo se usó un extracto de lípidos de espinaca que tiene una mezcla muy compensada de lípidos polares. El revelado con yodo se hace igual que

anteriormente.

De esta forma separámos los siguientes lípidos polares, desde el origen, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina, monogalactosildiglicéridos y digalactosildiglicéridos.

Las distintas bandas se asignaron mediante la visualización de las mismas con ácido sulfúrico al 50% y posterior calentamiento. De esta forma los glucolípidos (MGDG y DGDG), adquieren un característico color violeta y los fosfolípidos (PC, PE y PI) aparecen marrones. La banda que aparecía entre la PC y PE no estaba descrita en el estudio de Khan y Williams (1977) hecho en hojas de *Vicia faba*. Para su identificación nosotros raspamos por separado la PE y la banda desconocida, supuestamente fosfatidilinositol, y los sometimos a una nueva cromatografía usando como patrones la mezcla completa de lípidos polares de espinaca y de girasol previamente identificados. Desarrollamos la placa con cloroformo : metanol : acético : agua (85:15:10:3,6, v/v/v/v) (Mancha, M., 1974). Con este desarrollo el PI y la PE se separaron claramente y cada uno de ellos migró a su posición correspondiente respecto a los patrones conocidos, con lo cual concluimos que la banda desconocida correspondía al fosfatidilinositol. Posteriormente se comprobó que se trataba de PI por tinción con ninhidrina, que tiñe a todas las aminas, y por tanto a la PC y PE, pero no al inositol.

II.2.1.5. Separación de los distintos ácidos grasos ~~parafin.~~

Los ésteres metílicos, una vez concentrados por evaporación del disolvente con nitrógeno, se colocaron en placa de sílice impregnada con nitrato de plata (Morris, 1966). Como líquido de desarrollo usamos bien benceno o bien una mezcla de hexano : eter etílico (85:15, v/v) que permite una óptima separación de monoenos y dienos. De esta manera se separan los ácidos grasos en función de su grado de insaturación de la siguiente forma, desde el origen, trienos, dienos, monoenos y saturados.

Esta técnica la hemos usado únicamente con fines analíticos para separación de los ácidos oleico y linoleico marcados radiactivamente para la medida de la actividad oleato desaturasa.

II.2.1.6. Análisis posicional de los ácidos grasos en los triacilglicéridos.

Para hacer el análisis posicional de los ácidos grasos que forman parte de los triacilglicéridos se hizo una hidrólisis parcial con lipasa pancreática, que hidroliza específicamente los acilos de las posiciones *sn*-1 y 3, según el método de Luddy et al. (1964) modificado por Mancha (1975). El procedimiento consistió en añadir a 10 mg de TAG, 1 mg de lipasa pancreática, 1 ml de tampón TRIS (tris-hidroximetil-aminometano) 1 M pH 8, 0.1 ml de una disolución

Estos productos se separaron por cromatografía en capa fina en placas de sílice preparativas usando Hexano : Eter Etílico : Fórmico (75:25:1, v/v/v) como líquido de desarrollo. De esta forma se separan, desde el origen, las siguientes bandas, MAG, DAG, AG y TAG. Se rasparon las bandas de los 2-monoglicéridos, cuyos ácidos grasos son representativos de la posición sn-2 de los TAG, y de los ácidos grasos libres que son representativos de las posiciones sn-(1+3). A continuación, se realizó la metilación de los ácidos grasos de cada banda tal como se ha indicado anteriormente y los ésteres metílicos resultantes se analizaron por cromatografía gaseosa.

II.2.2. Cromatografía gaseosa (GC).

Es la técnica más usual de separación y cuantificación de los ácidos grasos presentes en una muestra. Los ácidos grasos unidos al glicerol en los glicerolípidos deben ser transformados previamente a la inyección en el cromatógrafo en ésteres metílicos.

Estos análisis se hicieron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890, con un detector de ionización de llama, conectado a un integrador Hewlett Packard HP 3396. Se usó una columna empaquetada de 2 metros de longitud, rellena con supelcoport 80/100 más etilenglicol-succinato al 5% (Supelco Inc.). Las condiciones del análisis fueron: temperatura del horno 165°C, temperatura del inyector y del detector 200°C,

el gas portador fue nitrógeno y el flujo de 20 ml/min. Para identificación de los picos se usaron patrones de composición conocida.

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

II.3.1. Obtención del extracto crudo.

Las muestras, 100-500 mg de semillas, se trituraron durante dos minutos en un mortero pre-enfriado y mantenido a 4°C en maceta con hielo, con 5-10 ml de tampón pH=7.2 de ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES) 50 mM, sorbitol 0.6 M, ascorbato sódico 40 mM, ácido etilendiamino tetracético (EDTA) 1 mM y sulfato magnésico heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 1 mM. A este tampón le denominamos tampón A. Todos los tampones se prepararon con agua destilada y desionizada tipo milli-Q. Los extractos así obtenidos se pueden congelar a -80°C durante semanas.

II.3.2. Obtención de oleosomas.

El extracto crudo se centrifuga a 10.000 g durante 5 minutos. Aparece un precipitado, el sobrenadante y una capa flotante. La capa flotante, que contiene los oleosomas, se recoge con ayuda de una espátula y se resuspende en 5 ml de

tampón A mediante sonicación. Esta suspensión se vuelve a centrifugar a 10.000 x g otros 5 minutos y vuelve a aparecer la capa flotante y un precipitado mucho menor. Se repite el proceso una tercera vez y ya no aparece ningún precipitado. Los oleosomas así lavados se resuspenden, bien en tampón A, o bien en 2 ml de hexano : isopropanol (3:2), se sonicán y se guardan con atmósfera de nitrógeno a -80°C para su posterior análisis. Todos los pasos se realizaron a 4°C.

II.3.3. Obtención de microsomas.

El extracto crudo se centrifuga a 10.000 g durante 5 minutos. Se retira la capa flotante de oleosomas y se recupera el sobrenadante, el cual se centrifuga a 100.000 g durante 30 minutos. Los microsomas son el precipitado obtenido tras esta segunda centrifugación. Estos se resuspenden o bien en tampón A, o bien en hexano : isopropanol (3:2). Se pueden congelar a -80°C para posterior análisis. Todos los pasos se realizaron a 4°C.

II.4. Determinación de la actividad oleato desaturasa.

II.4.1. Preparación de sustratos radiactivos.

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

Para medir la actividad oleato desaturasa "in vivo" se incubaron las semillas con una disolución acuosa de [¹⁴C] oleato. El ácido oleico, como la mayoría de ácidos grasos, es insoluble en agua. Por tanto, para poder solubilizarlo hay que convertirlo en su sal amónica. Para ello se toma la cantidad conveniente de solución de ácido oleico [¹⁴C] en etanol (3.7 MBq/ml, 2.1 GBq/mmol, New England Nuclear), se le añade la cantidad estequiométricamente suficiente de hidróxido amónico 7 N (la reacción ocurre mol a mol), se pone nitrógeno y se agita fuertemente la mezcla durante cinco minutos. Se evapora el disolvente hasta sequedad con nitrógeno y la sal amónica así formada se disuelve en la cantidad de agua necesaria para obtener la concentración final deseada. Esta concentración se comprueba midiendo la radiactividad en DPM por microlitro en contador líquido de centelleo y se transforma en Bq.

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

Para los ensayos de actividad "in vitro" se usó como sustrato radiactivo [¹⁴C] oleil-CoA que es suministrado

comercialmente disuelto en acetato sódico 0.01 N : etanol (1:1), (0.74 MBq/ml, 2.2 GBq/mmol, New England Nuclear). Esta solución se diluye con agua para obtener una concentración adecuada para nuestros ensayos, aproximadamente 150 Bq/ μ l. La concentración final se midió en un contador de centelleo.

II.4.2. Determinación de la radiactividad en lípidos.

II.4.2.1. Contador de centelleo líquido.

Para la medida de radiactividad presente en las muestras de extractos lipídicos y lípidos adsorbidos a sílice se usó un contador líquido de centelleo RackBeta II 1215 (LKB) calibrado para calcular las desintegraciones por minuto (DPM) de [14 C] con tripalmitato de glicerol con una radiactividad de 96600 DPM \pm 0.2%

Las muestras se colocaron en viales de polietileno de 5 ml de capacidad y se les añadió 3 ml de líquido centelleador Ready Safe Cocktail (Beckman). Tras agitar fuertemente se midió la radiactividad durante 240 segundos.

II.4.2.2. Analizador lineal de placas.

Los lípidos y ácidos grasos marcados radiactivamente y separados por CCF se cuantificaron mediante un analizador lineal de placas LB 2820-1 (Berthold) que usa gas PR (metano

al 10% en argón) como gas contador. Este aparato tiene una sensibilidad de 100 DPM [^{14}C] en 20 minutos y una resolución de 1-2 mm para el [^{14}C].

II.4.3. Determinación de la actividad ODS "in vivo"

II.4.3.1. Incubación de tejido intacto.

Un determinado peso de semillas se incubaron con solución acuosa de [^{14}C]-oleato en tubos de ensayo puestos en baños termostatizados y con agitación constante (60 rpm). El tiempo y la temperatura de incubación varían según el experimento, pero en cualquier caso es suficiente para permitir la incorporación del precursor radiactivo a los lípidos del tejido. Transcurrido el tiempo, se retira la solución radiactiva, se lavan un par de veces las semillas con agua destilada y éstas, o bien se trituran y congelan para posterior análisis de los lípidos, o bien se prosigue la incubación sin sustrato radiactivo (pulso y captura).

II.4.3.2. Análisis de los productos de la reacción.

Se midió la cantidad de [^{14}C]-linoleato formado a partir del [^{14}C] oleato bien en el extracto lipídico total, o bien en las distintas clases de lípidos, lípidos polares, diacilglicéridos o triacilglicéridos, separadas previamente

por CCF preparativa (fig. 14,A). El oleico y linoleico se separaron por CCF en placas analíticas de plata y los porcentajes de radiactividad de las distintas bandas se cuantificaron directamente, usando el analizador lineal de radiactividad. La actividad se expresa en nmoles de [^{14}C] linoleato formado por gramo de tejido y por hora de reacción (fig. 14,B).

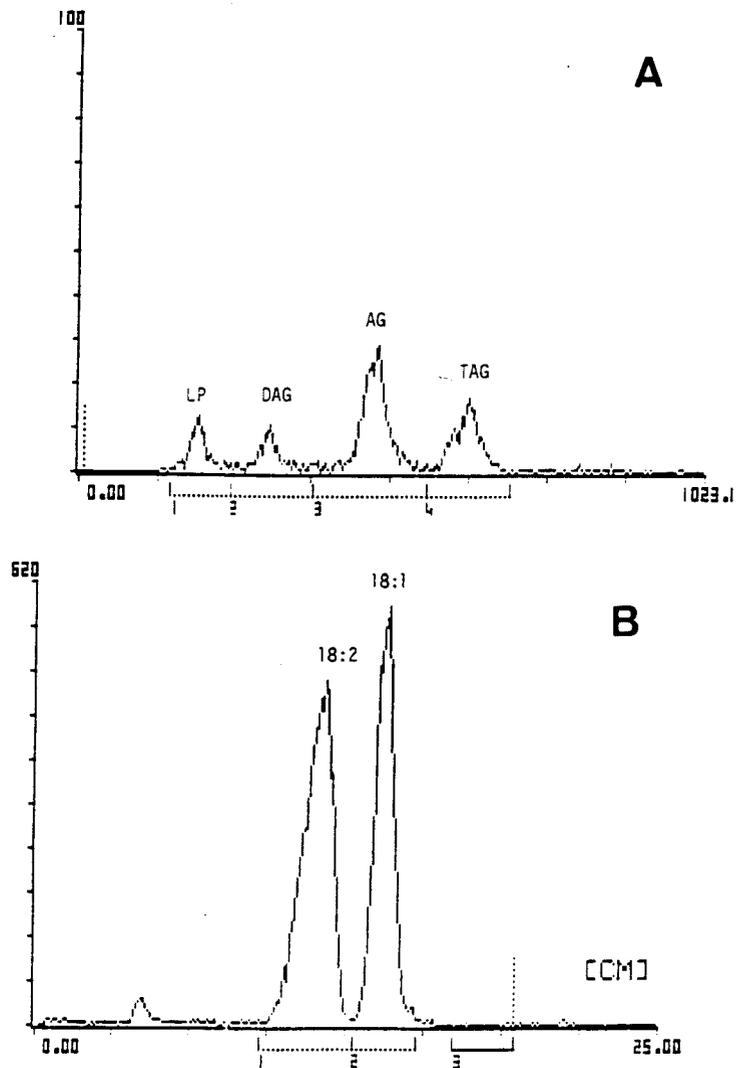


Figura 14. Cuantificación de la radiactividad mediante el analizador lineal de radiactividad. (A) en las distintas clases de lípidos y (B) en los ácidos grasos oleico y linoleico, separados por cromatografía en capa fina.

II.4.4. Determinación de la actividad ODS "in vitro".

II.4.4.1. Mezcla de reacción.

La actividad oleato desaturasa se midió en una mezcla de reacción de 100 μ l que contiene, HEPES sódico 100 mM (pH=7.2), ascorbato sódico 40 mM, palmitil-lisofosfatidilcolina 100 μ M, NADH 2mM y el sustrato [14 C] oleil-CoA, aproximadamente 3000 Bq/ensayo. A la que se le añade 100 μ l de suspensión de microsomas en tampón A (correspondientes a 20-25 mg de semillas). El volumen final de la mezcla es de 200 μ l.

II.4.4.2. Condiciones de la reacción.

La mezcla de reacción se mantuvo en un baño termostaticado durante 30 minutos con una agitación constante de 60 rpm, la temperatura de ensayo fue variable y se indica en cada experimento. Las condiciones de tiempo y temperatura estándar fueron fijadas tras estudios cinéticos (Garcés y Mancha, 1991). La reacción se paró añadiendo 2 ml de hexano : isopropanol (3:2) a -20°C.

II.4.4.3. Análisis del producto de la reacción.

Después de la extracción de los lípidos, se midió la

radiactividad incorporada a ellos en una alícuota del extracto total. Se separaron los lípidos polares por CCF, en las condiciones de la reacción alrededor del 90% de la radiactividad se encuentra en lípidos polares (fig. 15). Estos se metilan y se separan el oleico y linoleico presentes en ellos por CCF con plata. Los porcentajes de radiactividad en cada uno de ellos se cuantificaron mediante el analizador de radiactividad lineal sobre la misma placa igual que anteriormente (fig. 14,B).

La actividad se expresa en nmoles de [^{14}C]-linoleato en lípidos polares formado por hora y por gramo de semilla.

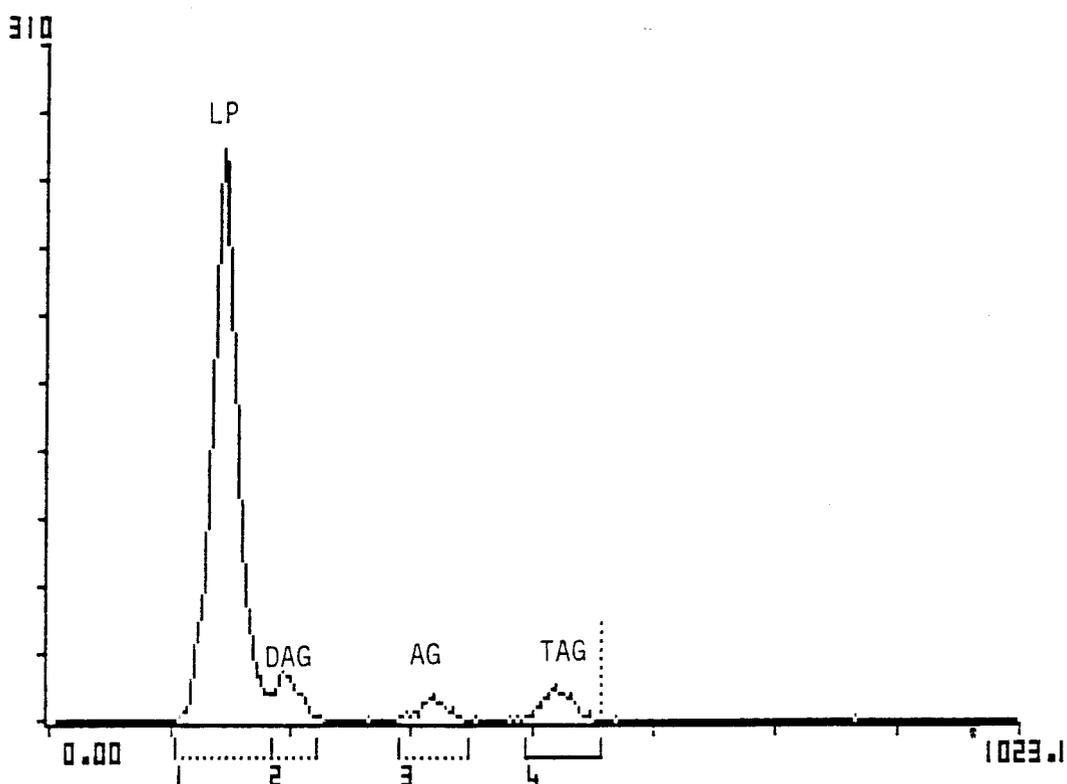


Figura 15. Cuantificación de la radiactividad incorporada a lípidos polares mediante el analizador de radiactividad lineal.

II.5. Determinación de la actividad aciltransferasa.

Se realizó "in vitro" en los mismas condiciones que para la medida de la oleato desaturasa. Para ello se siguió el mismo protocolo que para la medida de la actividad oleato desaturasa "in vitro", salvo en el análisis de los lípidos, puesto que en este caso sólo se mide la cantidad de radiactividad incorporada a lípidos polares durante 30 min. (fig. 15).

Se expresa en nmoles de [¹⁴C] ácidos grasos en lípidos polares por hora y por gramo de semilla.

II.6. Inducción y represión de la actividad oleato desaturasa por temperatura.

La inducción y represión de la actividad ODS por temperatura se ha realizado por tres métodos distintos:

1.- Poniendo 100-200 mg de semillas bien en tubo de cristal de 12 ml con 200 μ l de agua destilada, o bien en botes de centelleo de 20 ml con 500 μ l de agua destilada, en baño termostatzado a 10°C.

2.- Poniendo el capítulo de la planta completo o en porciones en un vaso de precipitado con aproximadamente 0.5 cm de agua destilada en el fondo, en baño termostatzado a 10°C.

3.- Poniendo la planta completa en cámara de cultivo con temperatura controlada a 10°C.

En todos los casos se usaron semillas en desarrollo (15-17 DDF) de plantas crecidas a alta (30/20°C) o baja (20/10°C) temperatura.

II.7. Incubaciones con antibioticos.

Se realizaron poniendo las semillas bien en tubos o en botes de cristal con un volumen determinado de la solución acuosa de la sustancia a ensayar, en baño termostatzado normalmente con agitación constante (60 rpm) y temperatura variable según el experimento.

II.8. Electroforesis Bidimensional en Geles de Poliacrilamida.

II.8.1. Preparación de extractos de proteínas microsomales.

II.8.1.1. Obtención y solubilización de los microsomas.

Cotiledones de semillas de girasol (aproximadamente 250 mg) se trituraron en mortero pre-enfriado con 10 ml de tampón B: HEPES sódico 50 mM (pH=7.2) que contiene sorbitol 0.6 M, ascorbato sódico 40 mM, EDTA 1mM, MgSO₄.7H₂O 1 mM, fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF) 0.1 mM y 2-mercaptoetanol 6 mM. El homogeneizado se centrifugó a 20.000 g durante 10 minutos. La capa grasa flotante se retira y el sobrenadante se

centrifuga a 100.000 x g durante 30 minutos. El precipitado resultante se resuspendió en otros 10 ml de tampón B y se centrifugó de nuevo a 100.000 g durante otros 30 minutos. Todos los pasos se realizaron a 4°C.

El precipitado de 100.000 x g que contenía la fracción microsomal se resuspendió en 1.5 ml de cloroformo : metanol (1:1, v/v) con 2-mercaptoetanol 10 mM para delipidar las membranas. Después de centrifugar a 12.000 rpm durante 10 minutos y de secar el precipitado con nitrógeno, éste se resuspendió en 0.5 ml de un tampón de extracción que contenía 4% (p/v) de SDS, 5% (p/v) de sacarosa y 5% (v/v) de 2-mercaptoetanol, y se incubó a 100°C durante 3 minutos. Tras enfriarlo 5 minutos en hielo, 0.5-1 mg de sulfato de protamina fueron añadidos para precipitar los ácidos nucleicos agitando durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 minutos. Si el sobrenadante aún contenía partículas, se centrifugaba de nuevo a 12.000 rpm durante 10 minutos. Al sobrenadante final se le añadió 1 ml de acetona fría (-18°C) con 10 mM de 2-mercaptoetanol y se mantuvo durante 1 hora a -18°C para que ocurriese la precipitación de proteínas. Las proteínas se obtuvieron por centrifugación a 12000 rpm durante 15 minutos. Este precipitado final se secó bien con nitrógeno y se resuspendió en el tampón de muestra que contiene urea 7.9 M, ditiotreitól (DTT) 80 mM, SDS 0.06 % (p/v), anfolitos 1.75% (v/v), Nonidet P-40 3.2% (p/v), 2-mercaptoetanol 0.12 M, tris-HCl 5.6 mM y tris-base 4.4 mM. Las muestras se congelaron a -80°C.

II.8.1.2. Medida de la concentración de proteínas.

La concentración proteica de las muestras se determinó según el método de Bradford (1976) modificado para considerar el efecto del tampón de muestra en el blanco. El procedimiento consistió en la adición de 1 ml del reactivo de Bradford a 1 μ l de la muestra diluida con 100 μ l de agua. Tras dejar desarrollar el color 10 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 595 nm.

La recta de calibrado se realizó con ovoalbúmina como proteína patrón y añadiendo a cada punto la misma cantidad de tampón de muestra correspondiente a 1 μ l de muestra. En la figura 1 se muestra dicha recta de calibrado para un rango de 0-10 μ g de proteína total. La concentración final de las muestras para electroforesis fue de 3-6 μ g de proteína/ μ l.

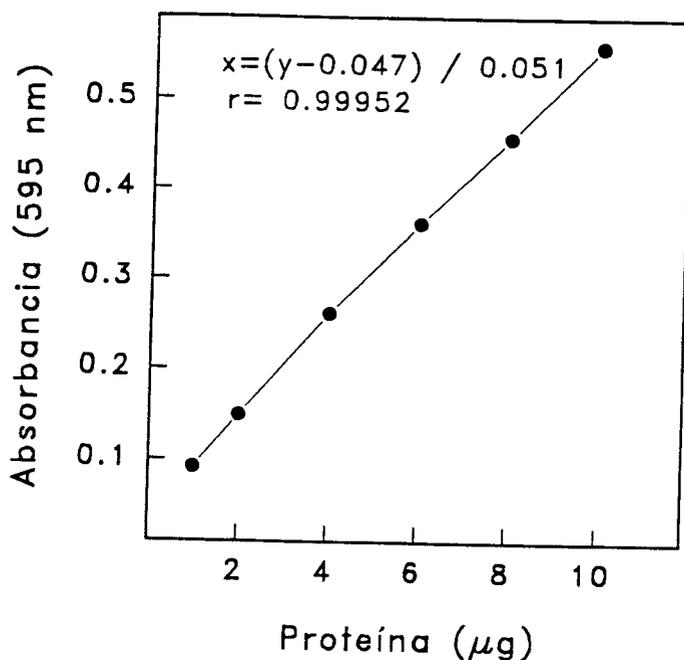


Figura 16. Recta de calibrado para la determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford en las muestras de la electroforesis. Los resultados son medias de dos determinaciones.

II.8.2. Electroforesis bidimensional.

La electroforesis bidimensional de alta resolución en geles de poliacrilimida fue realizada de acuerdo con el método de O'Farrell (1975) con modificaciones según López et al. (1991), usando el sistema de electroforesis 2D-Investigator (Millipore).

El isoelectroenfoque (IEF) se realizó en geles tubulares de poliacrilamida (18 cm de largo y 1 mm de diámetro interno) con 4% T, 2.6% C. El gel de isoelectroenfoque contenía además 9.5 M de urea, 2% (v/v) de Nonidet P-40 y 2.0% (v/v) de anfolitos para 2D de pH 3-10. Para mejorar la reproducibilidad del enfoque y prevenir roturas durante la transferencia a la segunda dimensión, los tubos llevan un hilo incorporado que se adhiere a todo lo largo del gel. Se hizo un pre-enfoque de los geles sin muestra, pero con un tampón de pre-enfoque que contenía 0.5 M de urea, 0.2% (v/v) de Nonidet P-40, 0.1% (v/v) de anfolitos, 5.0 mM de DTT y 0.7 M de 2-mercaptoetanol, a 1500 V durante 2 horas con corriente limitante de 110 μ A/gel. Una vez finalizado el pre-enfoque, se cargaron las muestras, aproximadamente un volumen correspondiente a 40-60 μ g de proteínas por gel, depositándolas sobre el extremo básico del gel en el tampón de pre-enfoque. El IEF se llevó a cabo por un total de 18.000 Vh (17 h a 1000 V, 30 minutos a 2000 V). Como tampón del cátodo se usó una solución desgasificada de NaOH 100 mM y como tampón del ánodo, ácido fosfórico 100 mM.

Una vez finalizado el isoelectroenfoque los geles se

extrayeron de los tubos y se equilibraron durante 2 minutos en un tampón de equilibrado que contenía Tris-base 0.3 M, Tris-HCl 0.075 M, SDS 3.0% (p/v), DTT 50 mM y azul de bromofenol 0.01%(p/v).

La segunda dimensión se realizó en geles de poliacrilamida con 14.4% T y 2.6% C que contenían además, Tris-base/Tris-HCl 0.375 M (pH=8.8) y un 0.1% (p/v) de SDS. El tampón de electroforesis contenía Tris-base 0.025 M, glicina 0.192 M y 0.1% (p/v) de SDS (Laemmli, 1970). Los geles (22 x 22 cm) sin gel apilador, se sometieron a electroforesis a potencia constante de 16 W por gel durante aproximadamente 5-6 horas hasta que el azul de bromofenol estaba alrededor de 1 cm del final del gel.

Todas las soluciones y tampones para la electroforesis se prepararon con agua desionizada (Milli-Q, Millipore) y fueron filtradas por filtros de membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ de tamaño de poro. La polimerización de los geles de IEF se llevó a cabo con persulfato amónico al 0.06% (p/v) y la de los geles de 2D con persulfato amónico al 0.03% (p/v) y N,N,N',N'- tetrametiletilendiamina (TEMED) al 0.07% (v/v).

El gradiente de pH formado en el IEF, medido cortando un gel en trozos de 1.5 cm y colocándolos un par de horas en agua desgasificada, resultó ser de 5 a 7 aproximadamente. Se usaron patrones de bajo peso molecular (Pharmacia) para la segunda dimensión.

Todos los reactivos usados fueron específicos para electroforesis y suministrados por Millipore, excepto la acrilamida y bis-acrilamida usadas para preparar el gel de

segunda dimensión, que fueron suministrados por Merck. La solución de acrilamida stock (30.8% T y 2.6% C) se preparó de la siguiente manera: Las cantidades adecuadas de acrilamida para síntesis (30.0%, p/v) y bis-acrilamida (0.8%, p/v) se disolvieron en agua y se les añadió resina intercambiadora (amberlita MB-1, Serva) en una proporción de 20 g/l. Se dejó una hora agitándose suavemente. Transcurrido este tiempo, la solución se filtró por papel Whatman nº1 y se guardó a 4°C no más de un mes. Se comprobó la calidad de la solución midiendo el pH de una dilución al 5%, que debe ser mayor de 5 y la absorbancia a 290 nm de una dilución al 1%, que debe ser menor de 0.15.

II.8.3. Tinción y secado de los geles.

Una vez finalizada la separación electroforética, los geles fueron fijados dejándolos una noche en una solución con 50% (v/v) de metanol y 10% (v/v) de ácido acético. Los geles fueron teñidos con nitrato de plata según el método de Morrisey (1981) con modificaciones como en López *et al.* (1991). Tras la fijación los geles son lavados tres veces durante 20 minutos con agua, y después se colocan con una solución de DTT 0.03 mM durante 30 minutos. La tinción se hace con nitrato de plata al 0.2% durante otros 30 minutos y el revelado con una solución de carbonato sódico al 3.5% (p/v) y formaldehído al 0.05% (v/v). El revelado se para aproximadamente a los 12 minutos con una solución de ácido

acético glacial al 3% (v/v). Tras un ligero enjuagado se incuban los geles en una solución con 40% (v/v) de etanol y 5% (v/v) de glicerol durante 15 minutos.

El secado de los geles se realizó mediante una modificación del método de Wallewik y Jensenius (1982), colocándolos entre dos hojas de papel de celofán extendidas sobre un cristal y plegadas sobre el mismo a una temperatura de 30°C durante varios días.

II.8.4. Análisis de los resultados.

Los geles fueron analizados usando un analizador de imagen asistido por ordenador "Bio-Image Visage 2000" (Millipore Corp.). También fueron analizados visualmente usando un transiluminador. Para el estudio de la diferencias entre el girasol normal y el alto oleico se compararon cinco geles por genotipo, cada uno de una planta distinta. Para el estudio de las diferencias entre girasol normal inducido y no-inducido se hicieron cuatro comparaciones de geles realizados con proteínas provenientes de cuatro plantas distintas, comparándose cada gel de proteínas de semillas inducidas con su control, no-inducido, obtenido de semillas del mismo capítulo. Sólo se consideraron las diferencias, cualitativas y cuantitativas, presentes en todas las comparaciones de cada grupo de plantas realizadas. Se determinaron los puntos isoeléctricos y los pesos moleculares con respecto a los de proteínas patrón.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE CULTIVO DE LAS PLANTAS EN EL GRADO DE INSATURACIÓN DE LOS LÍPIDOS DE LAS SEMILLAS DE GIRASOL.

I.1. Efecto de la temperatura de cultivo en la composición de ácidos grasos del girasol normal y alto oleico.

La temperatura ambiente es un factor de gran importancia para el desarrollo de la planta de girasol. El objetivo de este primer estudio es conocer la influencia de la temperatura en la composición de ácidos grasos tanto en lípidos totales como en lípidos polares de las semillas de girasol normal (RHA-274) y alto oleico (CAS-1) en distintas etapas de su desarrollo. Queremos así, profundizar en el conocimiento del control por temperatura de la desaturación del ácido oleico en girasol, especialmente en el menos estudiado mutante alto oleico, y a la vez, tener un estudio completo del comportamiento a distintas edades y temperaturas de las líneas de girasol que vamos a usar en posteriores experimentos.

I.1.1. Plantas crecidas a temperatura variable día/noche (30/20°C y 20/10°C).

Las condiciones de temperatura variable día/noche son las que más se asemejan a las condiciones reales de

crecimiento de las plantas en la naturaleza. Hemos escogido temperaturas suficientemente extremas para que los cambios sean claramente observables y hemos mantenido idénticas el resto de las condiciones de cultivo. A continuación se muestran los resultados del estudio comparativo entre girasol normal y alto oleico cultivados a alta (30/20°C) y baja (20/10°) temperatura.

I.1.1.1. Composición de ácidos grasos en lípidos totales.

En la tabla 4 (a y b), se muestra la composición de ácidos grasos de los lípidos totales de semillas de girasol normal y alto oleico en tres distintas etapas de su desarrollo y a distintas temperaturas de crecimiento desde la germinación.

En la etapa inicial de formación de las semillas (8 DDF), antes del inicio de la síntesis activa de lípidos, observamos que las proporciones de los ácidos grasos saturados, especialmente la de ácido palmítico, eran mayores que en las semillas maduras, tanto en el girasol normal como en el mutante alto oleico. La composición de ácidos grasos de ambos genotipos fue muy similar a esta edad. Tanto en girasol normal como en el alto oleico se observa una significativa influencia de la temperatura en esta etapa, siendo el porcentaje de ácido oleico mayor en las plantas crecidas a 30/20°C que a 20/10°C y ocurriendo lo inverso con el porcentaje de ácido linoleico.

Tabla 4. Composición de ácidos grasos en lípidos totales de semillas de girasol normal (RHA-274) y alto oleico (CAS-1) a distintas edades y a dos temperaturas de crecimiento. Los resultados son media del análisis de dos plantas \pm s.

(a) RHA-274

Temperatura	20°C / 10°C				30°C / 20°C			
EDAD	16:0	18:0	18:1	18:2	16:0	18:0	18:1	18:2
8 DDF	20.9 \pm 0.4	5.0 \pm 0.5	25.7 \pm 0.6	47.5 \pm 2.4	16.7 \pm 0.7	6.7 \pm 0.0	33.5 \pm 0.6	42.9 \pm 0.1
20 DDF	7.4 \pm 0.3	5.3 \pm 0.1	46.5 \pm 2.9	40.7 \pm 2.5	6.7 \pm 0.5	3.5 \pm 0.3	59.2 \pm 0.5	30.3 \pm 1.4
40 DDF	5.9 \pm 0.1	3.0 \pm 0.1	28.6 \pm 1.2	62.4 \pm 1.2	5.9 \pm 0.3	3.2 \pm 0.4	46.1 \pm 1.8	44.6 \pm 1.8

(b) CAS-1

Temperatura	20°C/10°C				30°C/20°C			
EDAD	16:0	18:0	18:1	18:2	16:0	18:0	18:1	18:2
8 DDF	21.1 \pm 0.2	8.8 \pm 0.4	27.6 \pm 3.2	41.8 \pm 3.6	17.7 \pm 1.0	10.2 \pm 3.4	38.5 \pm 0.6	33.5 \pm 5.2
20 DDF	4.6 \pm 0.1	8.4 \pm 1.2	82.7 \pm 2.8	3.7 \pm 1.0	4.3 \pm 0.1	6.0 \pm 1.7	88.5 \pm 1.5	1.0 \pm 0.1
40 DDF	2.6 \pm 0.1	4.8 \pm 0.5	89.8 \pm 0.0	2.6 \pm 0.2	3.6 \pm 0.3	3.6 \pm 0.7	92.0 \pm 0.5	0.7 \pm 0.1

En la segunda etapa, que coincide con el período de máxima síntesis y acumulación de lípidos, observamos que el porcentaje de ácido palmítico, tanto en el girasol normal como en el mutante alto oleico, disminuyó drásticamente desde un 16-21% hasta alcanzar un 4-7% hacia la mitad de esta etapa (20 DDF). El porcentaje de ácido esteárico (18:0) también fue disminuyendo. En el girasol normal, el porcentaje de ácido oleico aumentó rápidamente a las dos temperaturas de cultivo llegando a ser un 20-26% mayor a los 20 DDF que a los 8 DDF. Paralelamente, el porcentaje de ácido linoleico descendió a ambas temperaturas. En el mutante alto oleico, el porcentaje de ácido oleico aumentó muy fuertemente en este período y el porcentaje de ácido linoleico se redujo drásticamente. Podemos decir que el carácter alto oleico se manifestó en esta etapa puesto que mientras que en el período inicial (8 DDF) la composición de ácidos grasos del girasol normal y alto oleico fueron muy similares, en esta etapa de síntesis activa de lípidos el porcentaje de ácido oleico fue a ambas temperaturas del orden de un 30-35% mayor en el mutante alto oleico que en el girasol normal.

En la etapa final de formación de las semillas, en la que prácticamente no se produce síntesis de lípidos y la semilla se va desecando, observamos que los porcentajes de los ácidos palmítico y esteárico siguieron disminuyendo en ambos genotipos de girasol aunque en menor grado que en el período anterior. En girasol normal, el porcentaje de ácido oleico disminuyó durante esta etapa final y el de ácido linoleico aumentó. Parece ser que en el comienzo de la etapa

de síntesis activa de lípidos se sintetizó más ácido oleico del que se desaturó en ese momento por lo que se fue acumulando, posteriormente este ácido oleico se fue desaturando para dar lugar a la formación de ácido linoleico. En el girasol alto oleico, la evolución en los contenidos de ácidos oleico y linoleico es distinta. El porcentaje de ácido oleico siguió aumentando en este período y el de ácido linoleico siguió disminuyendo, a ambas temperaturas de crecimiento.

I.1.1.2. Composición de ácidos grasos en lípidos polares.

La importancia fisiológica de los lípidos polares como constituyentes mayoritarios de las membranas y su papel en la reacción de desaturación del oleico justifican el estudio de su composición de ácidos grasos respecto a la edad y la temperatura, en girasol normal y alto oleico.

En la tabla 5a, se muestra la evolución durante el desarrollo de la composición de ácidos grasos de los lípidos polares de semillas de girasol normal a distintas temperaturas de crecimiento. Se observa que, al igual que ocurrió en los lípidos totales, a todas las edades, el porcentaje de ácido oleico fue mayor en las semillas de plantas crecidas a alta temperatura (30/20°C) que en las de baja temperatura (20/10°C), ocurriendo lo contrario con el porcentaje de ácido linoleico. Además, se aprecia que los

Tabla 5. Composición de ácidos grasos en lípidos polares de semillas de girasol normal (RHA-274) y alto oleico (CAS-1) a distintas edades y a dos temperaturas de crecimiento. Los resultados son media del análisis de dos plantas \pm s.

(a) RHA-274

Temperatura	20°C / 10°C				30°C / 20°C			
EDAD	16:0	18:0	18:1	18:2	16:0	18:0	18:1	18:2
8 DDF	21.8 \pm 0.1	6.4 \pm 1.2	26.1 \pm 0.1	45.5 \pm 1.0	18.1 \pm 2.3	11.4 \pm 5.2	37.2 \pm 1.2	32.8 \pm 1.4
20 DDF	10.3 \pm 0.6	3.9 \pm 1.1	44.6 \pm 2.2	41.2 \pm 0.5	10.0 \pm 0.3	3.5 \pm 0.1	57.9 \pm 0.1	28.2 \pm 0.4
40 DDF	14.9 \pm 0.8	4.8 \pm 0.5	15.7 \pm 0.6	64.3 \pm 0.8	16.2 \pm 3.8	9.6 \pm 2.4	24.9 \pm 2.2	49.2 \pm 0.8

(b) CAS-1

Temperatura	20°C / 10°C				30°C / 20°C			
EDAD	16:0	18:0	18:1	18:2	16:0	18:0	18:1	18:2
8 DDF	20.6 \pm 1.9	11.9 \pm 0.0	29.2 \pm 1.0	38.3 \pm 2.9	19.3 \pm 1.2	7.6 \pm 0.8	35.0 \pm 2.1	37.6 \pm 1.3
20 DDF	11.6 \pm 3.4	10.0 \pm 3.7	61.9 \pm 6.0	16.5 \pm 1.0	10.4 \pm 0.2	8.8 \pm 0.5	68.1 \pm 0.1	12.5 \pm 0.1
40 DDF	13.5 \pm 3.6	11.4 \pm 1.1	68.6 \pm 1.4	6.4 \pm 0.9	13.4 \pm 1.6	10.4 \pm 4.5	70.8 \pm 4.5	5.4 \pm 1.6

lípidos polares contenían una mayor proporción de ácidos grasos saturados que los lípidos totales a ambas temperaturas y que estas proporciones, especialmente las de ácido palmítico, se mantuvieron altas en las distintas etapas del desarrollo de las semillas. La evolución en los contenidos relativos de los ácidos oleico y linoleico durante el desarrollo fue similar a la encontrada en lípidos totales, aumentando en un principio el porcentaje de ácido oleico para luego disminuir dando paso a un aumento en el porcentaje de ácido linoleico.

En el mutante alto oleico (tabla 5b), se observa una disminución continuada del porcentaje de ácido linoleico y un aumento paralelo y continuado del porcentaje de ácido oleico a partir del momento en que comienza la síntesis activa de lípidos, igual que ocurría en los lípidos totales. En las semillas muy jóvenes no se manifestó el carácter alto oleico. Al igual que en los lípidos totales en el mutante alto oleico no se observó una influencia significativa de la temperatura en el grado de insaturación cuando ya se ha manifestado el carácter alto oleico.

De los resultados de ambos estudios podemos concluir que en el girasol normal se observa un claro efecto de la temperatura de crecimiento en las proporciones relativas de los ácidos oleico y linoleico durante todos los períodos de formación de las semillas. Siendo las diferencias en la composición de ácidos grasos a distintas temperaturas, mayores en los lípidos polares que en los totales. En ambos

tipos de lípidos el porcentaje de ácido oleico fue aumentando al principio del desarrollo de las semillas, y posteriormente, comenzó a disminuir. Lo contrario ocurrió con el porcentaje de ácido linoleico, lo cual se explica por la relación substrato-producto existente entre ambos. Un reciente estudio (Perry y Harwood, 1993) sobre la evolución de la composición de ácidos grasos en lípidos neutros y lípidos polares en semillas de colza, muestra una evolución similar de los contenidos relativos de los ácidos oleico y linoleico durante la maduración. En semillas de colza, al igual que en el girasol normal, se produjo una acumulación transitoria de ácido oleico en el período de máxima síntesis de lípidos.

En el girasol alto oleico, solo se observó una significativa influencia de la temperatura en las semillas muy jóvenes. El carácter alto oleico se manifestó en la fase de síntesis activa de lípidos, a partir de los 12-14 DDF, y desde ese momento la influencia de la temperatura en las proporciones de los ácidos oleico y linoleico fue bastante débil. La evolución en los contenidos de los ácidos oleico y linoleico fue diferente a la del girasol normal. Tanto en los lípidos totales como polares se produjo un aumento continuado del porcentaje de ácido oleico y una reducción simultánea del de ácido linoleico. El hecho de que tanto los lípidos de membrana (lípidos polares) como los de reserva (lípidos totales) muestren el carácter alto oleico en el mismo período es consistente con que ambos provengan de un conjunto común de ácidos grasos.

I.1.2. Plantas crecidas a temperatura constante día/noche.

También hemos estudiado la composición de los lípidos de semillas de girasol normal y alto oleico crecidas a temperatura constante día/noche (24°C y 12°C) a distintas edades. Pensamos que sería interesante cultivar el girasol a temperatura constante para, al evitar cambios de temperatura durante el crecimiento de las plantas, poder conseguir semillas con composición y actividades desaturadas más constantes u homogéneas durante el desarrollo, a la par que producirles respuestas más fuertes a temperaturas más extremas.

I.1.2.1. Plantas crecidas a 24°C constante.

Las plantas de girasol, tanto normal como alto oleico, cuya floración y fecundación ocurrió a la temperatura constante de 24°C se desarrollaron adecuadamente. Se llevó a cabo un seguimiento de la composición de ácidos grasos de lípidos totales desde los 14 DDF hasta los 30 DDF, coincidiendo con el período de máxima síntesis de lípidos y crecimiento de la semilla. Los resultados se muestran en la tabla 6.

En la composición de ácidos grasos del girasol normal sorprenden los altos niveles de ácido oleico a lo largo de todo el período estudiado, alcanzándose valores muy superiores a los existentes en el girasol normal crecido a

30/20°C (tabla 4a). Se produjo un lento decrecimiento del porcentaje de ácido oleico al final del período estudiado, de 20 a 30 DDF. Por el contrario, el porcentaje de ácido linoleico fue aumentando paulatinamente a lo largo de todo este período. Los ácidos grasos saturados, palmítico y esteárico, mostraron un decrecimiento constante y paulatino de sus porcentajes.

Tabla 6. Composición de ácidos grasos (mol %) en lípidos totales de semillas de girasol normal (RHA-274) y alto oleico (CAS-1) crecidas a 24°C constante. Los resultados son media de dos plantas \pm s.

Planta	Edad (DDF)	Composición Ácidos Grasos (mol %)			
		16:0	18:0	18:1	18:2
RHA-274	14	6.3 \pm 0.4	5.4 \pm 0.8	77.4 \pm 0.5	10.6 \pm 0.8
	17	5.4 \pm 0.7	4.5 \pm 0.6	77.5 \pm 0.5	12.8 \pm 0.5
	20	4.7 \pm 0.1	3.1 \pm 0.2	76.0 \pm 2.1	16.2 \pm 0.4
	25	4.5 \pm 0.3	3.4 \pm 0.4	74.6 \pm 0.7	17.4 \pm 0.9
	30	4.6 \pm 0.2	3.0 \pm 0.2	68.7 \pm 3.6	23.6 \pm 3.2
CAS-1	14	6.2 \pm 0.2	9.7 \pm 3.0	78.8 \pm 4.0	2.3 \pm 2.0
	17	4.8 \pm 0.2	9.2 \pm 1.2	83.6 \pm 2.3	2.1 \pm 1.5
	20	3.8 \pm 0.9	6.9 \pm 1.2	87.2 \pm 1.2	2.0 \pm 3.5
	25	3.6 \pm 0.6	5.5 \pm 1.1	89.5 \pm 3.6	1.7 \pm 1.5
	30	3.3 \pm 0.4	4.8 \pm 1.4	91.3 \pm 2.6	1.1 \pm 2.0

En el girasol alto oleico, los porcentajes de ácidos

grasos saturados también fueron disminuyendo. El porcentaje de ácido oleico con la edad, al contrario de lo que ocurrió en el girasol normal, fue aumentando con la edad, aunque los valores iniciales eran bastante elevados (78.8% a los 14 DDF). También se produjo una consecuente disminución del porcentaje de ácido linoleico.

Podemos concluir que en estas condiciones la diferencias en la composición de ácidos grasos entre estos dos genotipos de girasol fueron mucho menores que las que se encontraron cuando fueron cultivadas a temperatura variable 30/20°C o 20/10°C.

I.1.2.2. Plantas crecidas a 12°C constante.

Sobre el crecimiento de las plantas de girasol a 12°C constante es importante destacar el enorme retraso en la floración y polinización que sufrieron en comparación con las plantas crecidas a 24°C o en condiciones de temperatura variable. Tanto es así, que no se obtuvieron semillas medianamente formadas antes de 26 DDF. En la tabla 7 se muestra la composición de ácidos grasos de semillas de girasol normal crecidas a 12°C constante y en dos estados de su desarrollo. Las edades cronológicas (DDF) y fisiológicas tienen un gran desfase en estas condiciones, correspondiendo las semillas de 26 DDF, por su aspecto y peso, a unas semillas de aproximadamente 14-16 DDF (crecidas a 24°C) y las de 56 DDF a unas de 30-35 DDF (crecidas a 24°C).

Se observó que a ambas edades el porcentaje de ácido linoleico fue superior al de ácido oleico, hecho que sólo ocurrió a esta temperatura de crecimiento. Si comparamos el porcentaje de ácido linoleico final (56 DDF) con el de semillas igualmente maduras (30 DDF) crecidas a 24°C constante (tabla 6) se puede observar cómo las proporciones relativas de oleico y linoleico se invirtieron casi completamente, mientras que los porcentajes de los ácidos palmítico y esteárico fueron muy similares.

Tabla 7. Composición de ácidos grasos en lípidos totales de semillas de girasol normal crecidas a 12°C constante. Los resultados son media de dos plantas \pm s.

Planta	Edad (DDF)	Composición Ácidos Grasos (mol %)			
		16:0	18:0	18:1	18:2
RHA-274	26	9.0 \pm 0.7	1.2 \pm 0.4	25.5 \pm 5.6	63.2 \pm 6.3
	56	6.0 \pm 0.3	2.3 \pm 1.2	21.1 \pm 3.2	69.7 \pm 4.0

En cuanto al estudio del girasol alto oleico a 12°C constante, hay que mencionar que en estas condiciones las plantas florecieron muy mal, no llegando a producirse polinización en ninguna de las tres plantas crecidas a esta temperatura. No podemos concluir que este hecho se deba a una mayor sensibilidad del genotipo alto oleico a la baja temperatura, puesto que otras plantas de girasol silvestres de distinto genotipo crecidos paralelamente tampoco llegaron a polinizarse.

Los resultados de estos estudios aportan la información necesaria para conocer, en nuestras líneas de estudio, los aspectos básicos de la síntesis de ácidos grasos insaturados, y su regulación por temperatura, tanto en girasol normal y como en girasol alto oleico. Basándonos en estos estudios se eligieron como las condiciones óptimas de crecimiento de las plantas para posteriores experimentos, la temperatura variable día/noche, bien 30/20°C ó 20/10°C, puesto que con estas condiciones se consiguió un mejor desarrollo paralelo de plantas de ambos genotipos y mayores diferencias en la composición de ácidos grasos a distintas temperaturas. Además, en estas condiciones las plantas están sometidas a un menor estrés y por tanto, se consigue un mejor desarrollo de las mismas y una mejor fecundación y desarrollo de las semillas.

I.2. Efecto de la temperatura de crecimiento en la actividad oleato desaturasa.

Mostraremos aquí, que la temperatura de crecimiento y maduración de las semillas influye en los valores de actividad enzimática de la oleato desaturasa microsomal medida "in vitro" y en el efecto de la temperatura de ensayo sobre estas medidas de actividad.

I.2.1. Efecto de la temperatura de ensayo en la actividad oleato desaturasa de plantas crecidas a baja y a alta temperatura.

En estudios previos (Garcés y Mancha, 1989) se observó que la temperatura óptima de incubación de la reacción de desaturación del ácido oleico "in vitro" era 20°C, en nuestras condiciones de ensayo. El objetivo de los experimentos que se describen a continuación fue averiguar si la temperatura óptima de ensayo de la oleato desaturasa dependía o no de la temperatura a la que se desarrollan las semillas; de manera que la enzima obtenida de plantas crecidas a baja temperatura, que como ya hemos visto tienen mayor proporción de ácido linoleico, estuviera preparada para funcionar mejor a temperaturas bajas y viceversa. Para ello, se determinó la actividad oleato desaturasa microsomal "in vitro" de semillas de plantas crecidas a 20/10°C y a 30/20°C a distintas temperaturas de ensayo (figura 17).

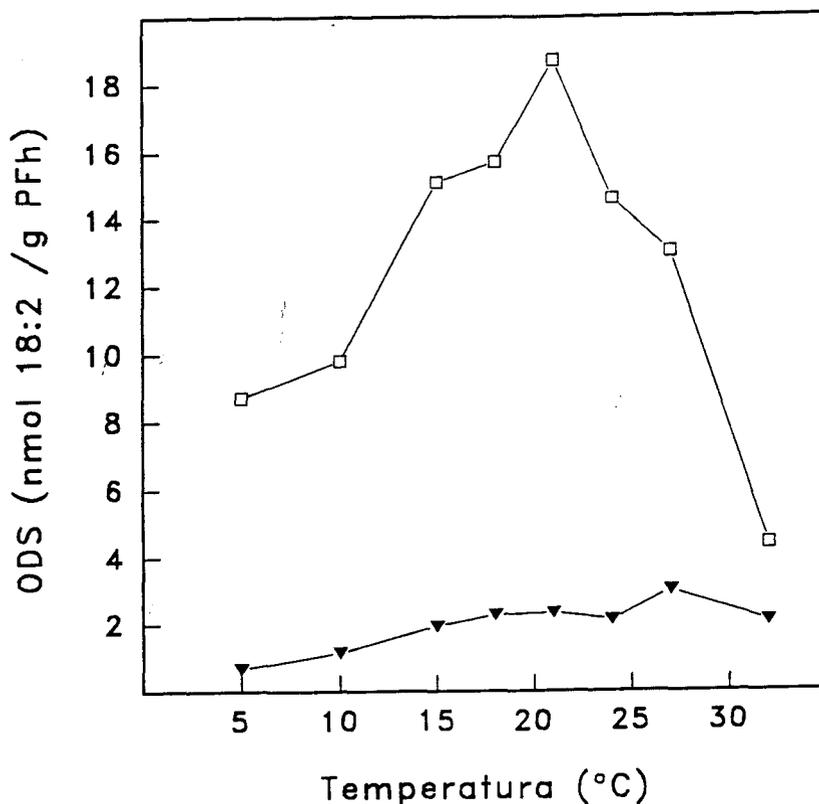


Figura 17. Efecto de la temperatura de ensayo (5-32°C) en la actividad oleato desaturasa (ODS) microsomal de semillas de girasol en desarrollo de plantas crecidas a 20/10°C (□) y 30/20°C (▼). Los resultados son de tres replicados, la desviación estandar fue menor del 10%.

El resultado fue que las actividad oleato desaturasa de las semillas crecidas a 20/10°C fue significativamente mayor que las de las crecidas a 30/20°C a cualquier temperatura de ensayo, lo que indica que se produjo un gran aumento de la actividad enzimática en las semillas desarrolladas a baja temperatura. Además se constató otro hecho interesante, que la medida de la actividad oleato desaturasa microsomal de las

semillas formadas a 20/10°C resultó ser muy sensible a la temperatura de ensayo y mostró un máximo a 20°C, resultados que concuerdan con los de Garcés y Mancha (1989). La actividad de las semillas formadas a 30/20°C fue prácticamente insensible a la temperatura de ensayo, mostrando valores muy similares en un intervalo de 15 a 30°C.

Estos resultados y otros que se mostrarán posteriormente, sugieren que la regulación por temperatura de la desaturación del ácido oleico en semillas de girasol ocurre a través de un mecanismo que provoca un fuerte aumento en la actividad oleato desaturasa microsomal de dichas semillas cuando éstas se forman a bajas temperaturas. No se trata, por tanto, de una alteración en la selectividad de los ácidos grasos incorporados a lípidos, como ocurre en *E. coli* donde al disminuir la temperatura aumenta la proporción de oleato/palmitato incorporada a fosfolípidos (Sinensky, 1971), sino que se produce un efecto directo en las cantidades relativas de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados producidas. Así pues, a bajas temperaturas se dispone de mayor cantidad de ácidos grasos insaturados para la síntesis de lípidos de membranas y de reserva.

I.2.2. Efecto de la temperatura de crecimiento y de preincubación en la actividad oleato desaturasa.

Para averiguar si existen diferencias en la estabilidad a altas temperaturas de la oleato desaturasa de plantas

crecidas a alta y baja temperatura se diseñó un experimento en el que la fracción microsomal obtenida de semillas crecidas a baja y alta temperatura se preincubó, en la mezcla de reacción sin sustrato, durante 60 minutos a 20 y 30°C. Los resultados del experimento (tabla 8) muestran que cuando la actividad oleato desaturasa se ensayó a 30°C sin preincubación se obtuvo un valor del 38% respecto al control ensayado a 20°C en las semillas crecidas a 20/10°C y un valor del 95% respecto a su control en las semillas crecidas a 30/20°C. Esto concuerda con datos anteriores que mostraban que la actividad existente en las plantas crecidas a baja temperatura es mucho más sensible a la temperatura de ensayo que la de las plantas crecidas a alta temperatura. La preincubación a 20°C tuvo un efecto similar en las actividades de las semillas tanto de plantas crecidas a 30/20°C como a 20/10°C produciéndose aproximadamente un 50% de inhibición. La preincubación de los microsomas a 30°C causó una severa inhibición también similar en ambos casos, siendo las actividades de las semillas crecidas a baja y alta temperatura un 4% y un 9% de sus controles respectivamente. Tanto en la preincubación a 20°C como a 30°C no se observaron grandes diferencias en el comportamiento de las actividades oleato desaturasa de las plantas crecidas a baja y a alta temperatura.

Tabla 8. Efecto de la temperatura de preincubación en la actividad oleato desaturasa (ODS) microsomal de semillas de girasol en formación. Las fracciones microsomales fueron preincubadas a la temperatura indicada durante 60 minutos y después fueron incubadas con [¹⁴C]-oleil-CoA durante 30 minutos a la temperatura de ensayo indicada. Los resultados son media de tres replicados ± s.

Temperat. Preincub. (°C)	Temperat. Ensayo (°C)	Actividad ODS de plantas crecidas a:			
		20/10°C		30/20°C	
		nmol 18:2·g FW ⁻¹ ·h ⁻¹	% control	nmol 18:2·g FW ⁻¹ ·h ⁻¹	% control
-	20	22.2±0.6	100	4.4±0.3	100
-	30	8.4±0.4	38	4.2±0.1	95
20	20	11.3±1.6	51	2.3±0.2	53
30	20	0.9±0.2	4	0.4±0.1	9
30	30	0.9±0.1	4	0.3±0.1	7

Estos resultados indican que no parece existir una distinta termolabilidad de la actividad oleato desaturasa, apreciable en experimentos "in vitro", de las enzimas formadas en distintas condiciones térmicas. Este mismo hecho se aprecia aún más si comparamos las actividades enzimáticas de semillas preincubadas a 30°C durante 60 minutos y ensayadas a 20°C y 30°C durante 30 minutos. Se observó que

tanto en las plantas crecidas a baja como a alta temperatura, el período de preincubación a 30°C afectó por igual a sus actividades, produciéndose fuertes inhibiciones tanto si el ensayo se realizó a 20°C como a 30°C.

En conjunto, los resultados mostrados nos permiten concluir que la actividad oleato desaturasa microsomal de semillas de plantas crecidas a baja temperatura fue mayor que la de plantas crecidas a alta temperatura, y además parece ser más sensible a la temperatura de ensayo. Asimismo, podemos concluir que las actividad oleato desaturasa de plantas crecidas a alta y baja temperatura son igualmente termolábiles "in vitro" a altas temperaturas.

II. INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD OLEATO DESATURASA POR FRÍO.

En el capítulo anterior se ha mostrado la variación en los contenidos relativos de los ácidos oleico y linoleico en las semillas de girasol normal, en función de la temperatura de cultivo. También se ha mostrado que en el mutante alto oleico dichos contenidos se ven poco afectados por la temperatura. Tanto los lípidos de reserva como los lípidos de membrana de semillas de girasol normal crecidas a baja temperatura se enriquecen en ácido linoleico, estando el grado de insaturación inversamente relacionado con la temperatura de cultivo. Hasta ahora el mecanismo por el cual la temperatura regula la actividad oleato desaturasa en tejidos vegetales no ha sido elucidado.

En este capítulo mostraremos experimentos en los cuales semillas, capítulos y plantas de girasol fueron incubados a 10°C durante períodos menores o iguales a 24 horas, y veremos como se produce un aumento de la actividad oleato desaturasa de las semillas tras estos períodos en frío y que este aumento parece deberse a una inducción de la síntesis de la enzima.

II.1. Inducción de la actividad oleato desaturasa en semillas incubadas a cinco temperaturas.

En el siguiente experimento estudiaremos la inducción de la desaturación del ácido oleico en semillas peladas a

distintas temperaturas, determinando los cambios en la composición de ácidos grasos y en la actividad oleato desaturasa "in vivo". Para ello, se incubaron las semillas peladas, procedentes de una planta de girasol normal RHA-274 crecida a baja temperatura (20/10°C) y con 17 DDF, con 200 μ l de una solución acuosa de [14 C]-oleato amónico (21 KBq/muestra; actividad específica 1924 Bq/nmol) durante 16 horas a distintas temperaturas. Pasado ese tiempo se extrajeron los lípidos totales y se realizaron las siguientes determinaciones.

II.1.1. Composición de ácidos grasos de los lípidos totales.

La composición de los lípidos totales de las semillas se muestra en la tabla 9. Los resultados mostraron que el porcentaje de ácido linoleico presente en las semillas se correlacionó negativamente con la temperatura de incubación de las mismas, mientras que el porcentaje de ácido oleico presentó una correlación positiva con la temperatura. La relación ácido linoleico/ácido oleico pasó de 0.82 en las semillas incubadas a 30°C a 1.30 en las que fueron incubadas a 10°C. Se observa claramente que la temperatura de incubación no influye en los porcentajes de los ácidos grasos saturados.

Tabla 9. Composición de ácidos grasos de semillas de girasol normal incubadas durante 16 horas a distintas temperaturas con oleato amónico radiactivo. Los resultados son media de tres replicados \pm s.

Tempe- ratura (°C)	Composición de ácidos grasos (mol%)				
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:2/18:1
10	8.7 \pm 0.1	5.6 \pm 0.2	37.0\pm0.4	48.4\pm0.6	1.30
15	8.7 \pm 0.2	5.4 \pm 0.4	40.0\pm1.2	45.3\pm1.1	1.13
20	8.6 \pm 0.1	5.7 \pm 0.4	43.6\pm1.8	41.8\pm1.3	0.95
25	8.8 \pm 0.3	5.6 \pm 0.4	45.7\pm1.0	39.6\pm0.9	0.86
30	8.7 \pm 0.2	5.5 \pm 0.1	47.0\pm0.6	38.6\pm0.9	0.82

II.1.2. Actividad oleato desaturasa "in vivo".

Se determinó el porcentaje de ácido linoleico radiactivo incorporado en los lípidos totales. Los resultados (fig. 18) muestran una clara correlación entre temperatura de incubación y actividad oleato desaturasa "in vivo". Asimismo muestran que considerando la incubación a 20°C como control, la variación más fuerte se produjo en las semillas incubadas en frío cuya actividad aumentó de 4.9 \pm 0.8 nmoles de [¹⁴C]-18:2/g a 20°C hasta 14.2 nmoles de [¹⁴C]-18:2/g a 10°C. Mientras que el efecto del aumento de temperatura, también respecto al control a 20°C, fue menos acusado, disminuyendo

la actividad hasta 2.7 ± 0.9 nmoles de $[^{14}\text{C}]-18:2 \text{ g}^{-1}$.

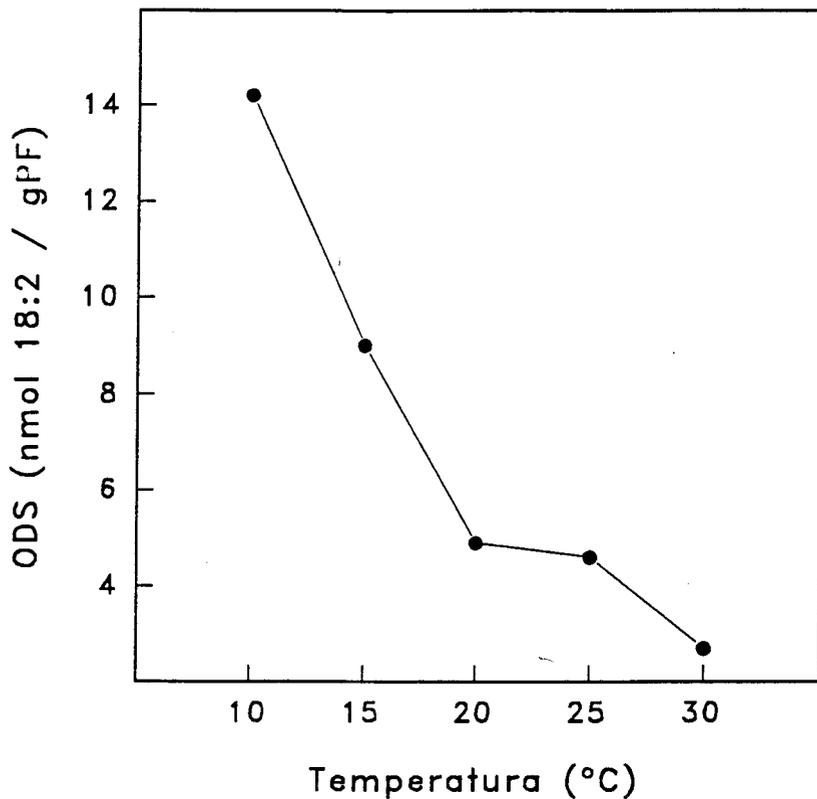


Figura 18. Efecto de la temperatura en la desaturación del oleato "in vivo" en semillas de girasol en desarrollo crecidas a 20/10°C e incubadas con (^{14}C) oleato a las temperaturas indicadas durante 16 horas. Los resultados son medias de tres replicados.

II.1.3. Incorporación del ácido oleico radiactivo en los distintos tipos de lípidos.

Estudiamos la distribución de la radiactividad incorporada en los distintos tipos de lípidos separados por cromatografía en capa fina. Los porcentajes medidos se expresaron en nmoles de $[^{14}\text{C}]$ ácido graso por gramo de

semilla. Los resultados (figura 19) muestran que la temperatura no afectó a la incorporación del ácido graso en los distintos lípidos. Es decir, no parece que la biosíntesis de lípidos (ruta de Kennedy) se vea afectada por la temperatura ambiente.

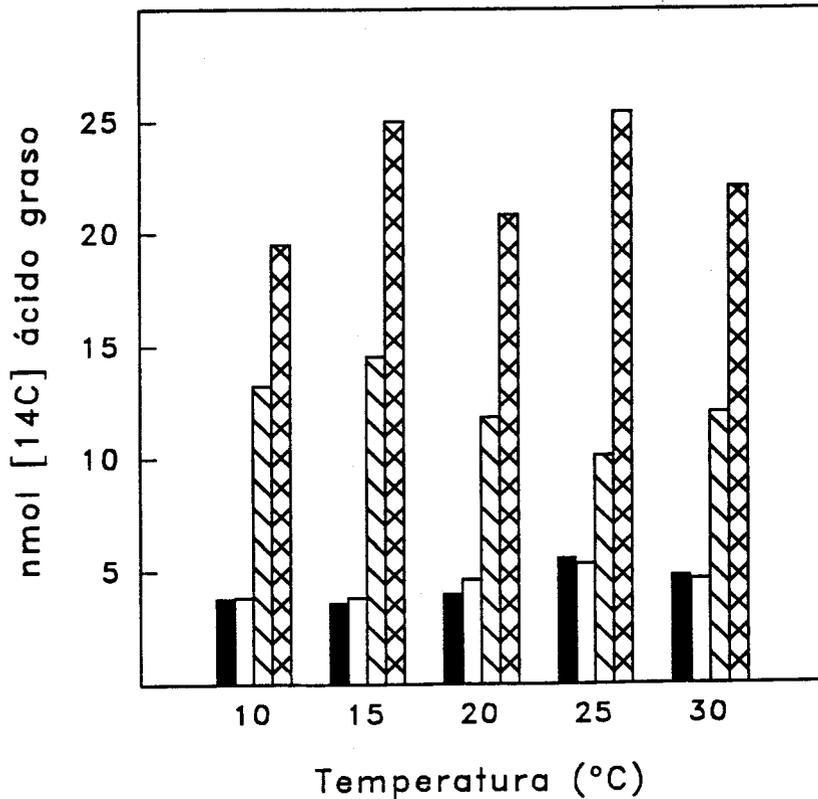
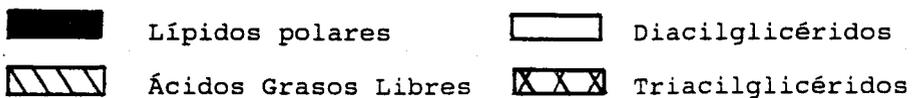


Figura 19. Incorporación de [^{14}C] ácidos grasos en los distintos tipos de lípidos durante la incubación a distintas temperaturas durante 16 horas.

Los resultados son media de tres experimentos.



II.2. Inducción de la desaturación del ácido oleico por frío y determinación de la actividad "in vitro".

En el siguiente experimento se estudió la inducción de la desaturación del oleico en semillas incubadas a baja temperatura unidas al capítulo de la planta. Para ello tomamos porciones del capítulo con semillas en desarrollo, de una planta de girasol normal, RHA-274, crecida a baja temperatura y las incubamos a 10°, 20° y 30°C. Tras 8 horas de incubación se tomaron semillas de cada porción y temperatura, se pelaron y se incubaron en tubos con [¹⁴C]-oleato a las mismas temperaturas durante 16 horas más. Posteriormente se determinó la actividad oleato desaturasa "in vivo". Las porciones de capítulos se dejaron incubándose durante 24 horas. Pasado este tiempo se trituraron las semillas, se analizó la composición de ácidos grasos y se determinó la actividad oleato desaturasa "in vitro".

Estas distintas medidas reflejan el efecto de la temperatura en la desaturación del ácido oleico a distintos niveles. Los cambios en los porcentajes de los ácidos oleico y linoleico en la composición de ácidos grasos, nos indican el aumento relativo en la síntesis de ácido linoleico producido en frío respecto al que había previamente y tienen en cuenta la historia previa de la planta. Las medidas de actividad "in vivo" reflejan los cambios de actividad producidos durante todo el período de incubación con el sustrato radiactivo. Por último, las medidas de actividad "in vitro" nos proporcionan el valor puntual de dicha actividad

en el momento de la medida de la misma, bien antes o al final de la incubación en frío.

II.2.1. Composición de ácidos grasos de los lípidos totales, los triacilglicéridos y la fosfatidilcolina.

Se extrajeron los lípidos totales y tras separar los diferentes tipos de lípidos por cromatografía en capa fina, se analizó la composición de ácidos grasos por cromatografía gaseosa. Los resultados (tabla 10) muestran que se produjo un aumento en la proporción de ácido linoleico en las semillas de capítulos incubados a 10°C con respecto a las incubadas a 20 y 30°C. Este efecto se observó tanto en lípidos totales como en triacilglicéridos y en fosfatidilcolina, produciéndose el aumento del porcentaje de ácido linoleico a expensas de un descenso del de ácido oleico. Tomando 20°C como temperatura de referencia, la relación 18:2/18:1 aumentó a 10°C y descendió a 30°C significativamente en fosfatidilcolina. En los lípidos totales y triacilglicéridos esta relación aumentó a 10°C pero sólo se produjo un pequeño descenso a 30°C. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en soja y lino (Slack y Roughan, 1978), pero en esas semillas no se observaron cambios en la composición de ácidos grasos de los triacilglicéridos. En girasol los cambios producidos en la relación oleico/linoleico fueron mucho mayores que en lino y soja.

Tabla 10. Composición de ácidos grasos de lípidos totales, triacilglicéridos y fosfatidilcolina de semillas de girasol incubadas a distintas temperaturas durante 24 horas. Los resultados son media de tres replicados \pm s.

Tipo Lípido	Tempera tura (°C)	Composición de Ácidos Grasos (mol %)		
		18:1	18:2	18:2/18:1
Totales	10	29.5 \pm 0.8	55.3 \pm 1.1	1.87
	20	41.2 \pm 1.8	43.0 \pm 1.9	1.04
	30	40.9 \pm 1.0	41.6 \pm 0.9	1.02
TAG	10	30.2 \pm 1.0	54.3 \pm 1.0	1.80
	20	42.5 \pm 1.5	42.2 \pm 1.7	0.99
	30	42.3 \pm 0.5	40.8 \pm 0.9	0.96
PC	10	17.8 \pm 3.2	64.9 \pm 1.9	3.65
	20	40.2 \pm 2.9	41.5 \pm 2.7	1.03
	30	41.1 \pm 3.9	34.3 \pm 3.6	0.84

II.2.2. Actividad oleato desaturasa "in vivo" e incorporación de linoleato en distintos tipos de lípidos.

La desaturación del ácido oleico "in vivo" y la incorporación del linoleato sintetizado en distintas clases de lípidos en semillas de capítulos incubados a distintas

aumento de la temperatura produciéndose una variación mayor respecto al control (20°C) con la bajada de temperatura que con el aumento de la misma. Las proporciones relativas de incorporación de ácido linoleico en los principales tipos de lípidos se mantuvieron similares a las distintas temperaturas. Por otro lado, la cantidad de linoleato incorporado en todos los tipos de lípidos es mayor a baja temperatura que en el control debido obviamente a la mayor disponibilidad del mismo, ocurriendo lo contrario a alta temperatura.

Tabla 11. Actividad oleato desaturasa "in vivo" e incorporación del [¹⁴C] linoleato recién sintetizado en distintos tipos de lípidos de semillas incubadas a distintas temperaturas durante 24 horas. Los resultados son media de tres replicados ± s.

Temperatura (°C)	ODS (nmol 18:2 gPF ⁻¹)	Incorporación de 18:2 (% radiactividad)	
		TAG	PC
10	17.7±2.5	43.5±3.0	55.2±4.9
20	9.1±1.3	18.7±3.3	24.6±0.9
30	6.2±0.2	13.6±0.8	13.6±3.2

II.2.3. Actividad oleato desaturasa "in vitro".

La actividad oleato desaturasa microsomal "in vitro" también varió con la temperatura de incubación. Los resultados de estas medidas (tabla 12) muestran cómo las semillas de capítulos incubados a 10°C tuvieron una actividad tres veces superior a las de los incubados a 20°C. La actividad oleato desaturasa "in vitro" de las semillas incubadas a 30°C prácticamente no varió con respecto a las incubadas a 20°C en este experimento. Este resultado no concuerda con la composición de ácidos grasos a 30°C donde se aprecia menor proporción de ácido linoleico, ni con la actividad oleato desaturasa "in vivo" que a 30°C es también significativamente menor que a 20°C. Esto se puede explicar con los resultados de experimentos posteriores en los que veremos como la actividad oleato desaturasa "in vitro" muestra oscilaciones no achacables directamente a los cambios de temperatura.

Tabla 12. Actividad oleato desaturasa microsomal medida "in vitro" en semillas de girasol incubadas a distintas temperaturas durante 24 horas. Los resultados son media de tres replicados \pm s.

Temperatura (°C)	ODS (nmoles 18:2·gPF ⁻¹ ·h ⁻¹)
10	58.0 \pm 1.6
20	20.7 \pm 0.5
30	23.7 \pm 0.7

II.3. Inducción de la actividad oleato desaturasa por frío a tiempos más cortos en plantas de girasol.

En el siguiente experimento estudiamos la inducción de la actividad oleato desaturasa de las semillas cambiando de temperatura a plantas completas de girasol normal RHA-274 con semillas en desarrollo, que crecieron a baja temperatura. Para ello trasladamos dos plantas, que se encontraban a 20°C, a una cámara a 10°C durante 9 horas y tomamos muestras de semillas a tiempo cero (justo antes de cambiarlas de temperatura) y a las 3, 6 y 9 horas de estar a 10°C. Se unieron las muestras procedentes de las dos plantas y se determinó la composición de ácidos grasos en lípidos totales y microsomales, así como la actividad oleato desaturasa microsomal "in vitro". Los resultados (tabla 13) muestran que, al igual que ocurrió en semillas peladas y en porciones de capítulos, se produjo una estimulación de la actividad oleato desaturasa microsomal tras la incubación a 10°C incluso a tiempos muy cortos. Después de tres horas la actividad se duplicó, al mismo tiempo que se produjo un aumento en el porcentaje de ácido linoleico tanto en lípidos totales como en microsomales. Después de 6 y 9 horas a 10°C el aumento de la actividad oleato desaturasa fue de tres y seis veces respectivamente, y el porcentaje de ácido linoleico siguió aumentando consecuentemente tanto en lípidos totales como en microsomales. A cualquier tiempo se observó un mayor incremento del porcentaje del ácido linoleico en los lípidos microsomales que en los totales. Esto concuerda con

la localización de la enzima oleato desaturasa en esta fracción celular (Stymne y Appleqvist, 1978).

Tabla 13. Actividad oleato desaturasa microsomal "in vitro" y composición de ácidos grasos tanto de lípidos totales como microsomales de semillas de plantas de girasol crecidas a 20/10°C e incubadas a 10°C durante 9 horas. Los resultados de la actividad ODS son media de dos experimentos \pm s.

Tiempo (horas)	ODS (nmol 18:2 gPF ⁻¹ ·h ⁻¹)	Ácidos Grasos (mol %)			
		Lípidos Totales		Lípidos Microsomales	
		18:1	18:2	18:1	18:2
0	4.1±0.1	53.9	25.9	52.6	31.5
3	8.0±0.3	54.7	26.6	44.6	38.9
6	13.7±0.1	50.3	29.5	43.6	41.0
9	23.2±1.2	45.6	31.8	37.3	46.7

Es interesante destacar que el fenómeno de la activación de la desaturación del ácido oleico por frío ocurre tanto en la planta completa, como en porciones de capítulos, como en semillas peladas. Esto implica que el mecanismo sensor del cambio de temperatura se encuentra en la propia semilla no necesitando de la presencia de hojas u otras partes de la planta para que se produzca la respuesta al descenso de temperatura. Sin embargo, esta inducción no ocurre cuando, lo

que se cambia de temperatura es la fracción microsomal, datos no mostrados, por lo que podemos deducir que el mecanismo necesita la estructura celular.

II.4. Factores que afectan a la inducción de la actividad oleato desaturasa por frío.

Durante la realización de distintos experimentos de inducción por frío de las semillas de girasol, nos dimos cuenta que pequeños cambios en las condiciones de incubación causaban fallos en la inducción o variaciones no esperadas en el grado de la misma. Decidimos hacer varios estudios metodológicos para ver cuales eran las condiciones óptimas de incubación y qué factores podían afectar a la inducción de la oleato desaturasa.

II.4.1. Efecto del volumen de agua durante la incubación en frío.

Para evitar la desecación de las semillas peladas y los capítulos cortados durante el tiempo que se mantienen a baja temperatura decidimos añadir agua al tubo donde se disponen las semillas para su incubación a 10°C. Tras varios experimentos en los que no se producía inducción o el grado de la misma era menor del esperado, decidimos estudiar el posible efecto del volumen de agua añadido a las semillas

sobre la inducción de la actividad oleato desaturasa por frío. Para ello, tomamos semillas en desarrollo de una planta de girasol normal (RHA-274) crecida a baja temperatura, y las colocamos en tubos de ensayo con distintos volúmenes de agua destilada. Posteriormente se colocaron en un baño termostático a 10°C durante 24 horas sin agitación. Pasado este tiempo se analizó la composición de ácidos grasos de los lípidos totales y se midió "in vitro" la actividad oleato desaturasa microsomal. Los resultados (tabla 14) muestran que existió una relación inversa entre el volumen de agua y el grado de inducción de la actividad ODS.

Tabla 14. Efecto del volumen de agua en la incubación a 10°C sobre la inducción de la desaturación del ácido oleico. Los resultados son la media de tres replicados \pm s.

Muestra	ODS (nmol 18:2 g PF ⁻¹ ·h ⁻¹)	Composición de Ácidos Grasos (mol %)		
		18:1	18:2	Δ % 18:2
Control*	14.9 \pm 8.5	38.2 \pm 1.7	45.5 \pm 1.5	
100 μ l	62.7 \pm 11.7	27.1 \pm 2.2	56.4 \pm 1.5	10.9
200 μ l	44.2 \pm 14.2	32.7 \pm 0.3	51.7 \pm 1.6	6.2
500 μ l	25.9 \pm 16.1	36.3 \pm 2.6	44.7 \pm 3.5	-
1000 μ l	4.7 \pm 2.0	39.6 \pm 1.5	45.1 \pm 2.2	-

* Muestra de semillas antes de la incubación a 10°C durante 24 horas.

La mayor inducción se produjo en las semillas que se incubaron con 100 μ l de agua. Por el contrario la inducción fue nula, tanto si se observa el incremento del porcentaje de ácido linoleico (0 %) o el valor de la medida de la actividad "in vitro", en las semillas que fueron incubadas con 1 ml de agua. Este hecho podría ser debido a una falta de oxígeno (cofactor necesario para la desaturación) en la semilla, puesto que la disponibilidad de oxígeno podría ser menor si las semillas no tienen contacto con el aire como ocurre cuando añadimos 1 ml de agua al tubo. Así pues, a mayor volumen de agua, menor contacto de las semillas con el aire y menor inducción de la actividad oleato desaturasa.

II.4.2. Efecto del oxígeno en la inducción de la oleato desaturasa por frío.

Para comprobar hasta que punto la disponibilidad de oxígeno influye en la inducción de la oleato desaturasa por frío se diseñó un experimento realizado junto con el anterior, en el que se incubaron semillas de girasol normal, RHA-274 crecida a baja temperatura, con 200 μ l de agua; con 200 μ l de agua sin oxígeno, para ello, se burbujeó nitrógeno en el agua y se cerró bien el tubo; y por último, con 5 ml de agua y burbujeando aire continuamente durante la incubación. Se incubaron las muestras a 10°C durante 24 horas. Se midió la actividad oleato desaturasa "in vitro" y la composición de ácidos grasos de las muestras. Los resultados (tabla 15)

muestran que en las semillas que fueron incubadas con 200 μ l de agua la actividad oleato desaturasa se indujo, pasando de 14.9 nmoles 18:2 $\text{gPF}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ a 44.2, y el porcentaje de ácido linoleico aumentó un 6%. Por el contrario, en las semillas que se incubaron con 200 μ l de agua pero a las que se les quitó el aire sustituyéndolo por nitrógeno, no sólo no se produjo inducción de la actividad respecto al control sino que ésta descendió hasta un valor de 3.6 nmoles 18:2 $\text{gPF}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ y el porcentaje de ácido linoleico no aumentó respecto al control inicial. Esto indica que el oxígeno es totalmente necesario para que se produzca la inducción de la actividad oleato desaturasa en las semillas de girasol.

Tabla 15. Efecto del oxígeno durante la incubación a 10°C sobre la inducción de la desaturación del ácido oleico. Los resultados son la media de tres replicados \pm s.

Muestra	ODS (nmol 18:2 g $\text{PF}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	Composición de ácidos grasos (mol %)		
		18:1	18:2	Δ %18:2
Control*	14.9 \pm 8.5	38.2 \pm 1.7	45.5 \pm 1.5	
200 μ l	44.2 \pm 14.2	32.7 \pm 0.3	51.7 \pm 1.6	6.2 ₆
200 μ l+N ₂	3.6 \pm 1.7	39.8 \pm 1.0	44.6 \pm 2.4	-
5000 μ l+O ₂	32.4 \pm 10.3	38.0 \pm 2.5	44.8 \pm 2.9	-

* Muestra de semillas antes de la incubación a 10°C durante 24 horas.

Cuando las semillas se incubaron con 5 ml de agua y burbujeando oxígeno continuamente, se produjo inducción de la actividad oleato desaturasa pasando de 14.9 a 32.4 nmoles 18:2 $\text{gPF}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, pero no se produjo el correlativo aumento en el porcentaje de ácido linoleico, que prácticamente no varió respecto al control. Es posible que la cantidad de oxígeno burbujeado en tan alto volumen de agua, 5 ml, sea suficiente para que se produzca la inducción de la actividad (inducción que no ocurrió en semillas incubadas con 1 ml de agua pero sin burbujear aire, tabla 14), pero no para que la enzima desature al ácido oleico a su velocidad normal. Otra posibilidad es que la inducción haya tardado más tiempo en producirse en estas semillas y por tanto, la cantidad de ácido oleico desaturado aún no sea apreciable en la composición de ácidos grasos. En cualquier caso, lo importante es destacar que no se produjo inducción de la actividad oleato desaturasa por frío en ausencia de oxígeno en el medio de incubación.

II.4.3. Efecto de la agitación durante la incubación sobre la inducción de la desaturación del ácido oleico por frío.

Dado que la presencia de oxígeno resultó ser determinante para la inducción de la actividad oleato desaturasa, consideramos que la agitación de los tubos durante la incubación, al aumentar el intercambio de oxígeno entre el agua y el aire, podría favorecer la inducción de la

actividad. Para comprobarlo se llevó a cabo el siguiente experimento. Se tomaron semillas de una planta de girasol normal, RHA-274, y se incubaron en tubos de ensayo (de 16 mm de diámetro y 100 mm de altura) con 200 μ l de agua y en viales de cristal (de 27 mm de diámetro y 60 mm de altura) con 800 μ l de agua. En ambos casos, las muestras se colocaron con y sin agitación (a 60 rpm) en un baño termostatzado a 10°C durante 6 horas. Pasado este tiempo se extrajeron los lípidos y se analizó la composición de ácidos grasos de los lípidos totales y de los lípidos polares. Los resultados (tabla 16) muestran que en todos los casos la inducción, expresada como el incremento en el porcentaje de ácido linoleico, fue mayor cuando la incubación se hizo con agitación que cuando se hizo sin ella.

Tabla 16. Efecto de la agitación durante la incubación a 10°C sobre la inducción de la desaturación del ácido oleico por frío. Los resultados son media de tres replicados \pm s.

Tipo	Envases	Agitación	Ácidos grasos (mol %)		
			18:1	18:2	$\Delta\%$ 18:2
Totales	Control*		61.8 \pm 0.3	24.7 \pm 1.2	
	Botes	-	53.8 \pm 2.6	31.9 \pm 0.4	7.2
	(800 μ l)	+	53.4 \pm 4.4	33.6 \pm 3.9	8.7
	Tubos	-	57.6 \pm 1.6	29.7 \pm 1.1	5.0
	(200 μ l)	+	55.0 \pm 3.2	31.8 \pm 2.4	7.1

Polares	Control*		55.3±1.1	29.1±1.4	
	Botes	-	32.3±1.1	52.2±3.0	23.1
	(800 µl)	+	28.9±2.9	59.0±2.6	29.9
	Tubos	-	37.1±2.7	48.1±3.1	19.0
	(200 µl)	+	33.8±1.5	54.0±2.2	24.9

* Muestra de semillas antes de la incubación a 10°C durante 6 horas.

Estos resultados concuerdan con los del experimento anterior en que la disponibilidad de oxígeno favorece la inducción de la actividad. Se observó que también en las muestras incubadas en tubos y botes sin agitación se produjo un importante aumento en el porcentaje de ácido linoleico tras una incubación de sólo 6 horas a 10°C. También hay que destacar que el incremento en el porcentaje de ácido linoleico fue mucho mayor en los lípidos polares (del orden de un 20%) que en los lípidos totales (del orden de un 8%). Esto es explicable por el hecho de que, la enzima oleato desaturasa usa como substrato lípidos polares, específicamente la oleil-fosfatidilcolina.

II.4.4. Efecto del troceamiento de las semillas en la inducción de la actividad oleato desaturasa por frío.

Para la realización de algunos experimentos en los que se añadirán distintas sustancias (antibióticos, ácidos

grasos, etc) a las semillas durante la incubación en frío, era interesante saber si el troceamiento de las semillas, que facilitaría la incorporación de dichas sustancias a las mismas, afectaba o no a la inducción de la actividad oleato desaturasa por frío. Para ello se llevó a cabo un experimento en el que se tomaron semillas en desarrollo de una planta de girasol normal crecida a alta temperatura (30/20°C) y tras tomar un control inicial, se incubaron con 200 µl a 10°C durante 4 horas. El primer grupo de muestras consistía en semillas enteras y en el segundo las semillas estaban troceadas. Se midió la actividad oleato desaturasa "in vitro". Los resultados (tabla 17) muestran que las semillas enteras incubadas a 10°C durante 4 horas alcanzaron una actividad dos veces mayor que el control. Por el contrario, las semillas troceadas no presentaron inducción de la actividad. Las actividades son menores que en experimentos anteriores por tratarse de semillas formadas a alta temperatura.

Tabla 17. Efecto del troceamiento de las semillas en la inducción de la desaturación del ácido oleico por frío. Los resultados son media de dos replicados ± s.

Muestra	ODS (nmol 18:2·g PF ⁻¹ ·h ⁻¹)
Control*	3.6 ± 0.7
Enteras	8.1 ± 0.4
Troceadas	4.1 ± 0.2

*Muestra de semillas antes de la incubación a 10°C durante 4 horas.

La dificultad para desaturar ácido oleico debido a daños físicos (troceamiento) también ha sido detectada en cotiledones de calabaza (Murphy y Stumpf, 1980).

II.4.5. Inducción de la actividad oleato desaturasa a 5°C.

Con objeto de conocer si a una temperatura menor que 10°C se producía una inducción de la actividad oleato desaturasa mayor que a 10°C, se llevó a cabo un experimento en el que se tomaron semillas en desarrollo de una planta RHA-274 crecida a alta temperatura y se incubaron a 5 y a 10°C durante 24 horas. Se analizó la composición de ácidos grasos de los lípidos totales. Los resultados (tabla 18) muestran que, al contrario de lo esperado, la inducción fue mayor a 10°C que a 5°C, aunque también a esta temperatura se produce un importante aumento en el porcentaje de ácido linoleico.

Tabla 18. Inducción de la desaturación del ácido oleico a 5°C y a 10°C. Los resultados son media de dos replicados \pm s.

Temperatura	Composición de ácidos grasos (mol %)		
	18:1	18:2	Δ %18:2
Inducción			
Control*	32.7 \pm 0.2	48.0 \pm 1.6	
10°C	21.6 \pm 0.6	61.2 \pm 0.7	13.2
5°C	25.1 \pm 0.1	57.3 \pm 0.1	9.3

* Muestra de semillas antes de la incubación en frío durante 24 horas.

Es posible que a temperaturas tan bajas entren en juego otros factores en la respuesta al estrés.

II.4.6. Inducción de la actividad oleato desaturasa por frío a distintas edades de las semillas.

Para averiguar a qué edad las semillas respondían de forma más acusada a los cambios de temperatura se diseñó un experimento en el que tomamos muestras de semillas de una planta de girasol normal (RHA-274) crecida a alta temperatura con distintas edades. De cada muestra se tomó una parte como control y se incubó la otra parte a 10°C durante 24 horas. Se analizó la composición de ácidos grasos y la riqueza grasa.

Los resultados (figura 20) muestran que a cualquier edad se produjo un aumento en el porcentaje de ácido linoleico en las semillas mantenidas a 10°C durante 24 horas respecto a sus respectivos controles, excepto en las semillas ya maduras (30 DDF). El incremento del porcentaje de 18:2 dependió de la edad, produciéndose los mayores incrementos en las semillas más jóvenes (14 DDF) y obteniéndose incremento nulo en las más maduras (30 DDF). También se observa que aunque el Δ % 18:2 es mayor a los 14 DDF que a los 17 DDF (18.0% frente a 9.9%), la riqueza grasa es mayor a los 17 DDF que a los 14 DDF (19.8% frente a 11.2%). Por ello, se seleccionó una edad de 16-18 DDF para posteriores experimentos. Además las semillas de esta edad, al estar más formadas, son más fáciles de manipular.

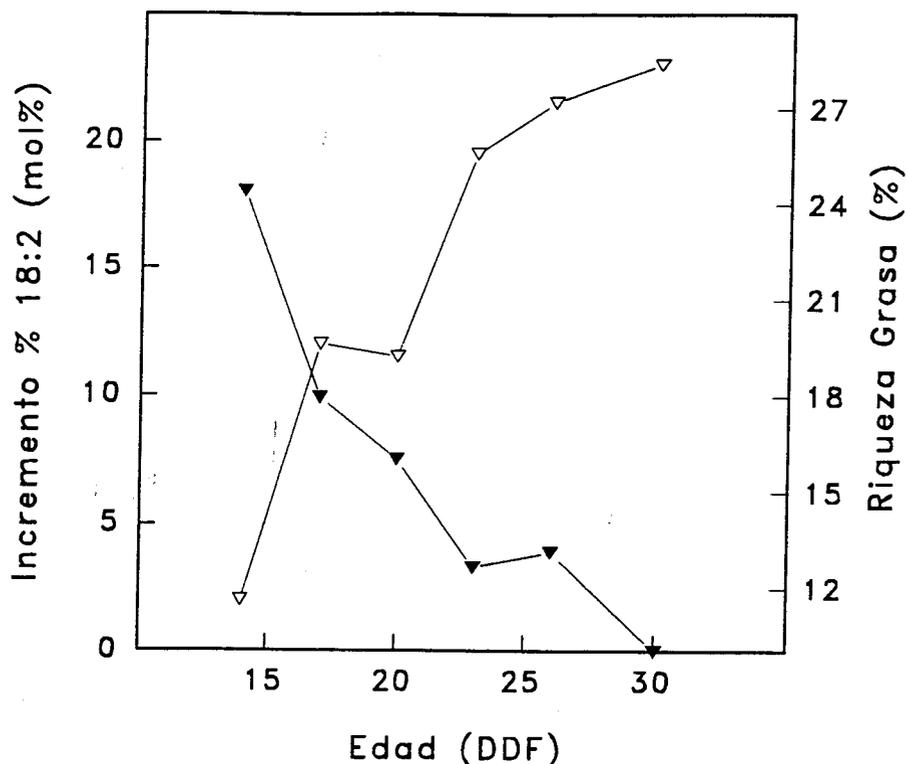


Figura 20. Efecto de la edad de la semilla en la inducción de la desaturación del ácido oleico por frío en semillas de girasol en desarrollo. Riqueza grasa (▲) e incremento del porcentaje de ácido linoleico (18:2) (▼) de semillas en formación a distintas edades (DDF) mantenidas a 10°C durante 24 horas. Los resultados son media de tres experimentos.

A partir de estos estudios se seleccionaron las condiciones óptimas para el estudio de la inducción de la actividad oleato desaturasa por frío en semillas de girasol, que son las siguientes: 1) Volúmenes pequeños de agua: en tubos menor o igual a 200 μ l, en botes menor o igual a 800 μ l. 2) Con agitación durante la incubación. 3) Estado físico: Peladas y enteras. 4) Temperatura óptima: 10°C. 5) Edad óptima 16-18 DDF.

II.5. Efecto de la cicloheximida en la inducción de la actividad oleato desaturasa por frío en semillas de girasol.

Como ya se ha comentado aún no se conoce el mecanismo por el cual la actividad oleato desaturasa en plantas es regulada por temperatura. Resumiendo, se han propuesto fundamentalmente cuatro hipótesis: 1) Regulación por aumento de la solubilidad del oxígeno en agua a baja temperatura. 2) Regulación por cambio de la conformación de la enzima producido por el cambio de la fluidez de la membrana en la que se encuentra englobada. 3) Regulación a nivel cinético por ajuste de las actividades ácido graso sintetasa y oleato desaturasa a alta temperatura. La primera aumentaría y la segunda disminuiría produciéndose como consecuencia un aumento en el porcentaje de ácido oleico y una disminución del de linoleico, y 4) Regulación por mecanismos a nivel de síntesis de proteínas y ácidos nucleicos que provoquen un aumento en la síntesis de la enzima u otras proteínas reguladoras.

En general, todas estos posibles mecanismos se pueden agrupar en dos tipos. Por un lado, aquellos que suponen una regulación de la actividad a nivel de la enzima presente y por otro, los que implican una inducción de la síntesis de la proteína enzimática u otras proteínas reguladoras, bien a nivel de síntesis de ácidos nucleicos o de proteínas.

Para tratar de dilucidar qué tipo de mecanismo actúa en las semillas de girasol, se estudió el efecto de la cicloheximida, antibiótico inhibidor de la síntesis proteica

en eucariotas, sobre la inducción de la actividad oleato desaturasa por frío en semillas de girasol.

II.5.1. Efecto de la cicloheximida en la inducción de la actividad oleato desaturasa en semillas incubadas 24 horas a 10°C.

Como se ha mostrado en resultados anteriores, la actividad oleato desaturasa microsomal aumenta cuando semillas, capítulos o plantas de girasol se mantienen a 10°C durante períodos de 24 horas. En el siguiente experimento tomamos semillas de girasol normal de una planta crecida a 20/10°C. Preincubamos estas semillas con el antibiótico cicloheximida a las concentraciones indicadas (tabla 19) durante 4 horas a 20°C para favorecer la incorporación del antibiótico previa al cambio de temperatura. Después se cambió la temperatura a 10°C y se continuó la incubación durante 18 horas más. Pasado este tiempo se obtuvieron los microsomas y se determinó la actividad oleato desaturasa microsomal "in vitro". También se midió la actividad en semillas que habían permanecido en la planta 24 h desde la toma de muestra.

Los resultados muestran que la actividad oleato desaturasa de las semillas incubadas con cicloheximida a 10°C, fue tres veces inferior a la de las semillas control. Estos resultados indican que la cicloheximida bloquea la inducción de la oleato desaturasa por frío. Se mantiene una

actividad residual que puede ser debida a la enzima que estaba presente antes de la inducción. Esto indica que el mecanismo de estimulación de la oleato desaturasa por frío requiere síntesis de proteínas.

Tabla 19. Efecto de la cicloheximida en la inducción de la actividad oleato desaturasa en semillas de girasol normal crecido a 20/10°C e incubadas a 10°C durante 24 horas. Los resultados son media de tres replicados \pm s.

Cicloheximida (μ M)	Actividad ODS (nmol 18:2·gPF ⁻¹ ·h ⁻¹)	% Control
Control*	33.2 \pm 0.2	
-	64.7 \pm 11.2	100
100	24.1 \pm 5.0	37
500	22.0 \pm 4.7	34

* Muestra de semillas en la planta 24 horas después de la toma de muestra.

II.5.2. Efecto de la cicloheximida en la inducción de la actividad oleato desaturasa en semillas incubadas 4 horas a 10°C.

Como vimos anteriormante (tabla 13), ya en las primeras tres horas de incubación a 10°C las semillas de girasol

normal mostraron una fuerte activación de la desaturación del ácido oleico. El objetivo del siguiente experimento es comprobar si esta inducción a tiempos cortos es también sensible a cicloheximida. Para ello, semillas en desarrollo de girasol normal procedentes de una planta crecida a temperatura alta, se preincubaron con y sin cicloheximida durante 8 horas a 24°C y luego se transfirieron a 10°C durante 4 horas. En este experimento además del control de inducción sin cicloheximida se tomó un control inicial para conocer la actividad de las semillas en el momento de la toma de muestra. Los resultados se muestran en la tabla 20.

Tabla 20. Efecto de la cicloheximida en la inducción de la actividad oleato desaturasa en semillas de girasol normal crecido a 24°C constante e incubadas a 10°C durante 4 horas. Los resultados son media de tres replicados \pm s.

Cicloheximida (μ M)	Actividad ODS (nmol 18:2·gPF ⁻¹ ·h ⁻¹)	% Control
Control*	3.2 \pm 0.6	
-	27.5 \pm 1.6	100
500	11.4 \pm 1.4	41
500 (Troc.)	6.9 \pm 0.5	26

* Muestra de semillas antes de la preincubación e inducción en frío.

Se observa que la actividad alcanzada sin cicloheximida tras el tratamiento de frío fue menor que en el experimento anterior hecho a tiempos más largos (tabla 19) pero también hay que tener en cuenta que la actividad inicial en la planta, por haber crecido a temperatura alta, era muy baja. Las semillas que fueron incubadas con cicloheximida (500 μ l) mostraron una actividad del 41% de las que se incubaron sin cicloheximida. Por tanto, la cicloheximida produjo una fuerte inhibición de la inducción en las semillas enteras y mayor aún en las troceadas. Es importante recordar que el troceamiento, por sí solo, puede afectar a la actividad (tabla 17).

En cualquier caso, podemos concluir que la cicloheximida inhibió gran parte del incremento de la actividad oleato desaturasa microsomal debido al frío, también a tiempos cortos. Por tanto, estos resultados indican, que la estimulación de la actividad oleato desaturasa en semillas de girasol por frío se debe en gran parte a una inducción de la síntesis "de novo" de la proteína enzimática o de alguna otra proteína activadora de la desaturación. Este tipo de mecanismo ya había sido detectado en microorganismos procariotas y eucariotas, pero esta es la primera vez que se muestra en plantas.

II.6. Metabolismo de los triacilglicéridos en la inducción de la desaturación del ácido oleico por frío.

Resultados anteriores mostraron que tras incubar semillas de girasol en desarrollo a 10°C, el porcentaje de ácido linoleico aumenta tanto en los lípidos de reserva (TAG) como en los lípidos de membrana (PC). Los incrementos del porcentaje de ácido linoleico fueron de alrededor del 5-15% del total de ácidos grasos según la duración de la incubación a 10°C y según el tipo de lípido analizado. Incrementos de tal magnitud implican la existencia de una cantidad apreciable de ácido oleico disponible para ser desaturado en cortos espacios de tiempo. El ácido oleico necesario como sustrato de la oleato desaturasa en condiciones de estrés por frío podría provenir, en principio, bien del producido en los plastidios por síntesis "de novo", o bien del que se encuentra formando parte de los lípidos polares. Sin embargo, surge la duda de si estas cantidades son suficientes para nutrir a la oleato desaturasa cuando ésta se encuentra fuertemente estimulada y tiene que producir grandes cantidades de ácido linoleico en tiempos cortos.

II.6.1. Determinación de los contenidos netos de ácidos oleico y linoleico en lípidos de reserva antes y después de la incubación en frío de semillas de girasol.

Así pues, para comprobar si durante la inducción a baja

temperatura se produce o no una cantidad apreciable de ácido oleico por síntesis "de novo", se decidió cuantificar los contenidos netos de lípidos totales y de triacilglicéridos, y los contenidos netos de los ácidos oleico y linoleico en los mismos, antes y después de la estimulación de la oleato desaturasa por frío. Para ello se tomaron grupos iguales de semillas en desarrollo de una planta de girasol normal crecida a alta temperatura. Tres grupos se congelaron directamente a -80°C y otros tres se incubaron a 10°C durante 24 horas. Se extrajeron los lípidos totales, se separaron los triacilglicéridos por cromatografía en capa fina y se cuantificaron las cantidades de lípidos totales y de TAG. Se determinaron también los porcentajes de ácido oleico y linoleico en lípidos totales y triacilglicéridos. De estos dos análisis se puede calcular el contenido neto de oleico y linoleico en lípidos polares y TAG.

La riqueza grasa, mg de lípidos totales por 100 mg de semillas, no varió tras las 24 horas a 10°C (tabla 21 A) por lo que se puede deducir que no ocurrió síntesis de ácidos grasos "de novo" durante ese tiempo. El contenido en TAG también permaneció constante representando los TAG casi el 90% de los lípidos totales. La composición de ácidos grasos tanto de los lípidos totales como de los triacilglicéridos sí cambió drásticamente como consecuencia de la inducción de la desaturación del ácido oleico por frío (tabla 21 B). Los aumentos en los porcentajes de ácido linoleico fueron del 12.1% en los lípidos totales y del 11.0% en los triacilglicéridos y al mismo tiempo los porcentajes de ácido

oleico disminuyeron en proporciones similares.

Tabla 21. Cuantificación de la desaturación de ácido oleico a ácido linoleico en lípidos totales y triacilglicéridos (TAG) de semillas de girasol inducidas por frío. Los resultados son media de tres replicados \pm s.

(A)

Tiempo 10°C	Peso (mg)	Lípidos Totales		TAG	
		(%)	(mg)	(%)	(mg)
0	176.7 \pm 3.8	15.7 \pm 0.3	27.7 \pm 0.9	89.4 \pm 1.0	24.8 \pm 0.3
24	175.3 \pm 6.6	15.8 \pm 0.9	27.7 \pm 1.2	88.3 \pm 2.4	24.5 \pm 0.7

(B)

Tipo Lípido	Tiempo a 10°C (h)	Composición de ácidos grasos (mol %)		
		18:1	18:2	Δ 18:2
Totales	0	51.7 \pm 2.4	36.1 \pm 2.5	-
	24	39.5 \pm 2.9	48.2 \pm 2.5	12.1
TAG	0	50.6 \pm 0.2	34.6 \pm 1.7	-
	24	41.0 \pm 2.9	45.6 \pm 2.3	11.0

Estos resultados indican que ocurrió un aumento neto en el contenido de ácido linoleico en lípidos totales y en TAG, y que éste se produjo a costa de una disminución en el contenido neto de ácido oleico principalmente de los TAG (tabla 21 C), sin que durante este período de 24 horas a 10°C se estuviera sintetizando ácidos grasos "de novo".

(C)

Tipo	Tiempo a 10°C (h)	Contenido en Ácidos Grasos (mg)		
		18:1	18:2	Δ 18:2
L.Totales	0	14.3±1.1	10.0±0.4	-
	24	11.1±1.2	13.3±0.2	3.3
TAG	0	12.5±0.2	8.6±0.4	-
	24	10.1±0.9	11.2±0.3	2.6

Además, se observa que la mayoría del nuevo ácido linoleico sintetizado tras la bajada de temperatura se encuentra también en los TAG. Esto sólo puede ser explicado aceptando que, bien el ácido oleico presente en los TAG es transferido a PC para su desaturación, o bien, el ácido oleico es directamente desaturado en los TAG. Cualquiera de estas dos hipótesis son totalmente novedosas pues hasta ahora, se pensaba que los TAG son únicamente los productos finales de la síntesis de lípidos en semillas, siendo su función la de actuar como reserva energética para la posterior germinación de las semillas. Estos resultados contradicen esa idea mostrando que, al menos en condiciones de estrés por frío, las cuales ocurren en la naturaleza con los cambios de temperatura día/noche, los TAG fueron metabólicamente activos actuando como donadores de ácidos grasos necesarios para mantener el grado óptimo de insaturación de los lípidos de las semillas. También parecen actuar como aceptores del ácido linoleico sobrante de los

lípidos de membrana, puesto que como hemos visto la proporción de ácido linoleico aumentó en los TAG que no parecen necesitar adaptar su fluidez a la temperatura.

II.6.2. Estudio "in vivo" del metabolismo de los TAG durante la inducción de la desaturación del ácido oleico por frío.

Para intentar profundizar en el estudio del papel de los TAG como fuente del ácido oleico necesario para la formación del ácido linoleico durante la inducción de la actividad oleato desaturasa por frío se realizó un experimento de marcaje radiactivo. Para ello tomamos semillas de una planta de girasol normal crecida a temperatura alta y las incubamos durante 4 horas con 80 KBq de [¹⁴C]-oleato a 24°C. Pasado ese tiempo, y para formar muestras lo más idénticas posible, se tomó uno de los cotiledones de cada semilla, formando el grupo control. El otro grupo de cotiledones, se transfirió, tras haberles quitado la solución radiactiva y lavado bien con agua, a 10°C durante 20 horas. Se extrajeron los lípidos totales y se separaron los TAG por cromatografía en capa fina. Después medimos la radiactividad incorporada en ácidos oleico y linoleico, antes y después de la inducción por frío. Los TAG fueron parcialmente hidrolizados con lipasa pancreática y se determinó su distribución de ácidos grasos en las posiciones *sn*-2 y *sn*-1+3.

Los resultados (tabla 22 A) muestran que el oleato radiactivo se incorporó en TAG durante el período de

preincubación a 24°C, y que la cantidad de radiactividad incorporada en los TAG aumentó ligeramente durante las siguientes 20 horas a 10°C. Después del período de preincubación se encontró algo de [¹⁴C]-linoleato en TAG como resultado de la actividad oleato desaturasa preexistente en las semillas antes de la inducción por frío. Durante la incubación a 10°C, la cantidad de [¹⁴C]-linoleato aumentó en los TAG a expensas del [¹⁴C]-oleato. El descenso neto de ácido oleico radiactivo durante este período en TAG sólo puede explicarse si este oleato se usó como sustrato de la oleato desaturasa para producir ácido linoleico radiactivo.

Tabla 22. Metabolismo del [¹⁴C]-oleato en triacilglicéridos de semillas de girasol inducidas por frío. Los resultados son media de tres replicados ± s.

(A) Análisis del contenido en TAG y ácidos grasos radiactivos.

Tiempo a 10°C (h)	Contenido en lípidos radiactivos (pmol [¹⁴ C]-Ácido Graso)			
	TAG	18:1	18:2	Δ18:1
0	6.5±0.3	5.0±0.2	1.5±0.0	-
20	7.0±0.3	4.4±0.1	2.7±0.3	-0.6

La composición de ácidos grasos en los TAG después de la hidrólisis parcial con lipasa pancreática (tabla 22 B) mostró que el porcentaje de 18:2 aumentó preferentemente en la posición *sn*-2 y en menor grado en las posiciones *sn*-1+3.

Tabla 22.

(B) Análisis posicional de ácidos grasos en TAG.

Tiempo a 10°C (h)	Posición (sn)	Composición de ácidos grasos (mol %)				
		16:0	18:0	18:1	18:2	Δ 18:2
0	1+3	8.4±0.3	8.4±0.0	70.7±0.2	12.4±0.4	-
20	1+3	8.9±0.1	8.8±0.1	64.9±0.6	17.2±0.7	4.8
0	2	tr.	tr.	82.7±0.4	16.7±0.4	-
20	2	tr.	tr.	67.3±1.2	31.8±0.8	15.1

tr. < 0.5%

El aumento de 18:2 se produjo a costa del 18:1 cuyo porcentaje disminuyó en ambas posiciones tras la inducción por frío de la actividad oleato desaturasa.

Esto sugiere que el posible intercambio de ácidos grasos entre TAG y el conjunto de acil-CoAs o entre TAG y DAG puede estar favorecido en la posición *sn*-2, como ocurre en la reacción de intercambio existente entre PC y el conjunto citoplasmático de acil-CoAs (Stymne et al., 1983).

Estos resultados junto con los anteriores muestran claramente que el ácido oleico de los TAG es desaturado y que el linoleato resultante también se encuentra principalmente en los TAG. Con los datos que tenemos hasta ahora no es suficiente para elucidar el mecanismo bioquímico por el que se produce este intercambio pero se podrían considerar varias hipótesis incluyendo: (1) la desaturación directa del ácido oleico en los triacilglicéridos, lo que implicaría que los triacilglicéridos fuesen también sustratos de la oleato desaturasa, la misma o distinta de la que actúa sobre la PC, (2) la reversibilidad de la actividad DAG aciltransferasa, que hasta el presente solo se ha detectado en el sentido de la formación de los TAG y (3) la existencia de una lipasa actuando durante el desarrollo de las semillas asociada con una actividad acil-CoA sintetasa. Los dos últimos mecanismos producirían DAG y acil-CoAs los cuales se podrían intercambiar con PC, donde se produciría la desaturación del ácido oleico, volviendo el ácido linoleico formado a los TAG por acción de la DAG aciltransferasa.

En cualquier caso, podemos afirmar que estos resultados

requieren para su explicación la existencia de un nuevo mecanismo por el cual los ácidos grasos de los TAG se equilibren con el conjunto de acil-CoAs citoplasmático y con los ácidos grasos de DAG y PC. El que este mecanismo esté limitado al intercambio entre oleato y linoleato durante la adaptación a los cambios de temperatura, si por el contrario, sea un mecanismo general por el cual los TAG actúen como reserva de ácidos grasos para diferentes fines, no se puede saber con los datos actuales y necesitará posterior investigación.

III. DETECCIÓN POR ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DE POLIPEPTIDOS RELACIONADOS CON LA DESATURACIÓN DEL ÁCIDO OLEICO Y SU REGULACIÓN POR TEMPERATURA.

La electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE) de proteínas desnaturalizadas (O'Farrell, 1975) es una herramienta muy poderosa para separar y detectar numerosas proteínas y se ha usado mucho para detectar cambios en los patrones proteicos de distintos tejidos donde se han producido mutaciones (Giometti, 1991). Las respuestas de distintas plantas a bajas temperaturas ha sido estudiada por diferentes autores mediante electroforesis bidimensional, pero hay muy poca información disponible en cuanto a la identidad o función de las proteínas preferentemente sintetizadas a baja temperatura.

Nosotros nos propusimos detectar mediante 2D-PAGE los polipeptidos asociados a la actividad oleato desaturasa microsomal de semillas de girasol y a la regulación por temperatura, comparando por un lado, los patrones de proteínas microsomales de semillas de girasol normal y alto oleico; y por otro lado, los de semillas de girasol normal antes y después de la inducción por frío de la actividad oleato desaturasa. Para ello, tomamos semillas de girasol normal y alto oleico de dos líneas isogénicas, HA-89 y HA-OL9, crecidas a 20/10°C y con 18-19 DDF que se congelaron a -80°C. Para la inducción de la actividad ODS la mitad de los capítulos se tomaban como control y se congelaban a -80°C mientras que las otras mitades se colocaban en un baño a 10°C

durante 24 horas y posteriormente se congelaban también a -80°C.

Se analizó la composición de ácidos grasos de cada muestra. Los resultados (tabla 23) muestran que las semillas de las dos líneas isogénicas de girasol, normal (HA-89) y alto oleico (HA-OL9), tenían diferencias significativas en los contenidos de 18:1 y 18:2. En el girasol normal el principal ácido graso fué el ácido linoleico (47.4%) seguido por el ácido oleico (37.3%). Al contrario, el girasol alto oleico contenía principalmente ácido oleico (81.1%). En cuanto a las semillas inducidas por frío durante 24 horas a 10°C, el porcentaje de ácido linoleico aumentó en un 13% comparado al de las semillas no inducidas.

Tabla 23. Composición de ácidos grasos de las semillas de girasol normal, HA-89, y alto oleico, HA-OL9, usadas para las electroforesis. Los resultados son media de cuatro experimentos \pm s. NO, normal; HO, alto oleico; CI, normal inducidas por frío.

Planta	Composición de ácidos grasos (mol %)			
	16:0	18:0	18:1	18:2
NO	8.0 \pm 1.3	6.2 \pm 1.3	37.3 \pm 2.7	47.4 \pm 2.6
HO	5.0 \pm 0.5	2.2 \pm 0.3	81.1 \pm 4.6	11.1 \pm 4.1
CI	8.0 \pm 1.2	6.0 \pm 0.8	25.1 \pm 2.1	60.8 \pm 1.6

También se midieron las actividades oleato desaturasa y aciltransferasa en los microsomas de las muestras que se iban a someter a la 2D-PAGE (tabla 24). Observándose que la composición de ácidos grasos se correlacionó con la actividad oleato desaturasa "in vitro" de esas mismas semillas. Mientras que las semillas de girasol normal tuvieron una actividad de 22 nmoles de [¹⁴C]-18:2 por gramo de peso fresco y por hora, la actividad en el mutante alto oleico no fue detectable. En las semillas inducidas por frío la actividad aumentó 2-3 veces en comparación con las semillas no inducidas. Se midió la actividad aciltransferasa microsomal expresada en nmoles de [¹⁴C]-18:1 incorporados en lípidos polares por gramo de peso fresco y por hora, no encontrándose ninguna diferencia significativa entre los tres tipos de semillas.

Tabla 24. Actividades oleato desaturasa y aciltransferasa de las semillas de girasol usadas para la electroforesis. Los resultados son media de cuatro experimentos \pm SD. NO, normal; HO, alto oleico; CI, normal inducidas por frío.

Planta	Oleato desaturasa (nmol 18:2·gPF ⁻¹ ·g ⁻¹)	Aciltransferasa (nmol 18:1·gPF ⁻¹ ·h ⁻¹)
NO	22.1 \pm 4.5	98.8 \pm 4.8
HO	< 1.0	110.9 \pm 5.6
CI	51.8 \pm 10.6	106.7 \pm 5.8

Posteriormente se solubilizaron las proteínas microsomales de los cotiledones de las semillas y se llevaron a cabo las electroforesis bidimensionales siguiendo el método de O'Farrell (1975) con modificaciones. Los geles, teñidos con nitrato de plata y secados al aire, se analizaron usando un analizador de imagen.

En los geles bidimensionales alrededor de 700 polipeptidos microsomales fueron repetitivamente separados y detectados. Los puntos isoeléctricos (P.I.) de los polipéptidos variaron entre 4.8 y 7.2 unidades de pH y sus pesos moleculares estuvieron entre 10 y 100 kDa. La delipidación de los microsomas previa a la solubilización de las proteínas mejoró la resolución y reproducibilidad de los patrones polipeptídicos obtenidos.

III.1. Comparación de polipéptidos microsomales de girasol normal y alto oleico.

Tras la comparación de los patrones polipeptídicos del girasol normal y el alto oleico, varias diferencias fueron repetitivamente observadas (tabla 25, figura 21). Hubo seis polipéptidos que cambiaron de posición por variación de sus puntos isoeléctricos. Cuatro polipéptidos (1-4) de 33 y 32 kD y P.I. alrededor de 5.6 se movieron juntos hacia un P.I. más bajo en el mutante alto oleico. Esto sugiere que pueden estar relacionados y que es probable que hayan sufrido la misma alteración molecular en el mutante alto oleico. En el mismo

grupo, un polipéptido (5) apareció en el mutante alto oleico aunque podría estar presente también en el girasol normal y haber aparecido simplemente por el movimiento del que estaba encima. Los otros cambios de posición aparecieron en dos polipéptidos muy abundantes (6,7) de similar peso molecular (32 kD) y P.I. aproximado de 5.8, los cuales también se movieron hacia un punto isoeléctrico más bajo, incluso más marcadamente de lo que lo hicieron las manchas 1-4, sugiriendo también que pueden tener alguna relación entre ellos. Por otro lado, un polipéptido (8) de 49 kD y P.I. aproximado de 6.4 apareció en el mutante alto oleico que no estaba presente en el girasol normal. No se encontraron cambios cuantitativos repetitivos en esta comparación.

Tabla 25. Diferencias entre los patrones de proteínas microsomales de semillas de girasol normal (NO) y alto oleico (HO).

Mancha(nº)	Peso Molecular (kDa)	Punto Isoeléctrico (pH)	Tipo de cambio
1,3	33	5.6	Valor de P.I.
2,4	32	5.6	Valor de P.I.
5	32	5.6	Apareció en HO
6,7	32	5.8	Valor de P.I.
8	49	6.4	Apareció en HO

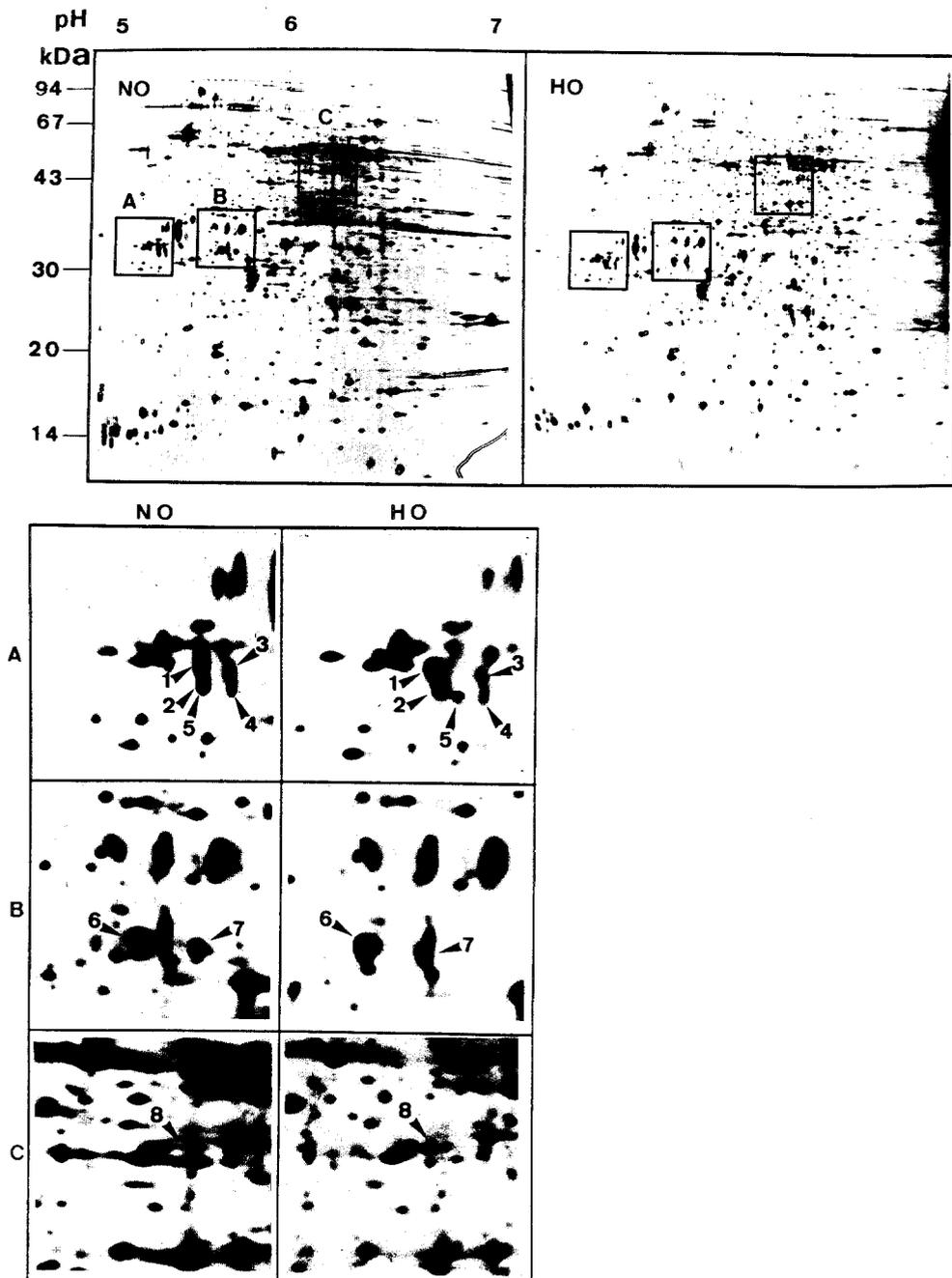


Figura 21. Patrones de proteínas microsomales, en geles bidimensionales de poliacrilamida teñidos con plata, de semillas de girasol normal (NO) y alto oleico (HO). Las áreas marcadas están ampliadas abajo para mostrar los detalles. Las manchas que mostraron cambios en cinco experimentos están indicadas por flechas y un número.

Las variantes isoeléctricas de proteínas han sido descritas en algunos estudios de mutantes por 2D-PAGE como mutaciones causadas por agentes alquilantes (Giometti, 1991). Un agente mutagénico de este tipo, el dimetil sulfato, fue el usado por Soldatov (1976) para obtener el mutante alto oleico de girasol. La dominancia de la herencia del carácter alto oleico sugiere que el gen/es que codifica/n para la enzima oleato desaturasa no está/n mutado/s, puesto en ese caso una herencia recesiva hubiera sido encontrada. Además el hecho de que la actividad oleato desaturasa está presente en todos los tejidos del girasol alto oleico, excepto en las semillas en período de síntesis activa de lípidos sugiere que las diferencias encontradas entre el girasol normal y el mutante alto oleico podrían ser debidas preferentemente a alteraciones en proteínas reguladoras de la expresión espacial, en tejidos, y temporal, durante distintas etapas del desarrollo, de la actividad oleato desaturasa más que debidas a alteraciones de la propia enzima (Ohlrogge *et al.*, 1991).

III.2. Comparación de polipéptidos microsomales de girasol normal no inducido e inducido por frío.

En cuanto al estudio de la inducción de la ODS por baja temperatura, se encontraron tres diferencias cuantitativas (tabla 26, figura 22). El polipéptido (1), de 43 kD y P.I. aproximado de 5.7, disminuyó en intensidad en los microsomas inducidos por frío. Otras dos proteínas, de 30 kD y P.I. alrededor de 5.7 (2), y de 32 kD y P.I. de 6.5 (3), aumentaron de intensidad significativamente en las semillas inducidas por frío. No se encontraron cambios cualitativos en estas comparaciones.

Tabla 26. Diferencias entre los patrones de proteínas microsomales de semillas de girasol normal inducidas (CI) y no inducidas (NI).

Mancha (nº)	Peso Molecular (kDa)	Punto Isoeléctrico (pH)	Tipo de cambio
1	43	5.7	Disminuyó en CI
2	30	5.7	Aumentó en CI
3	32	6.5	Aumentó en CI

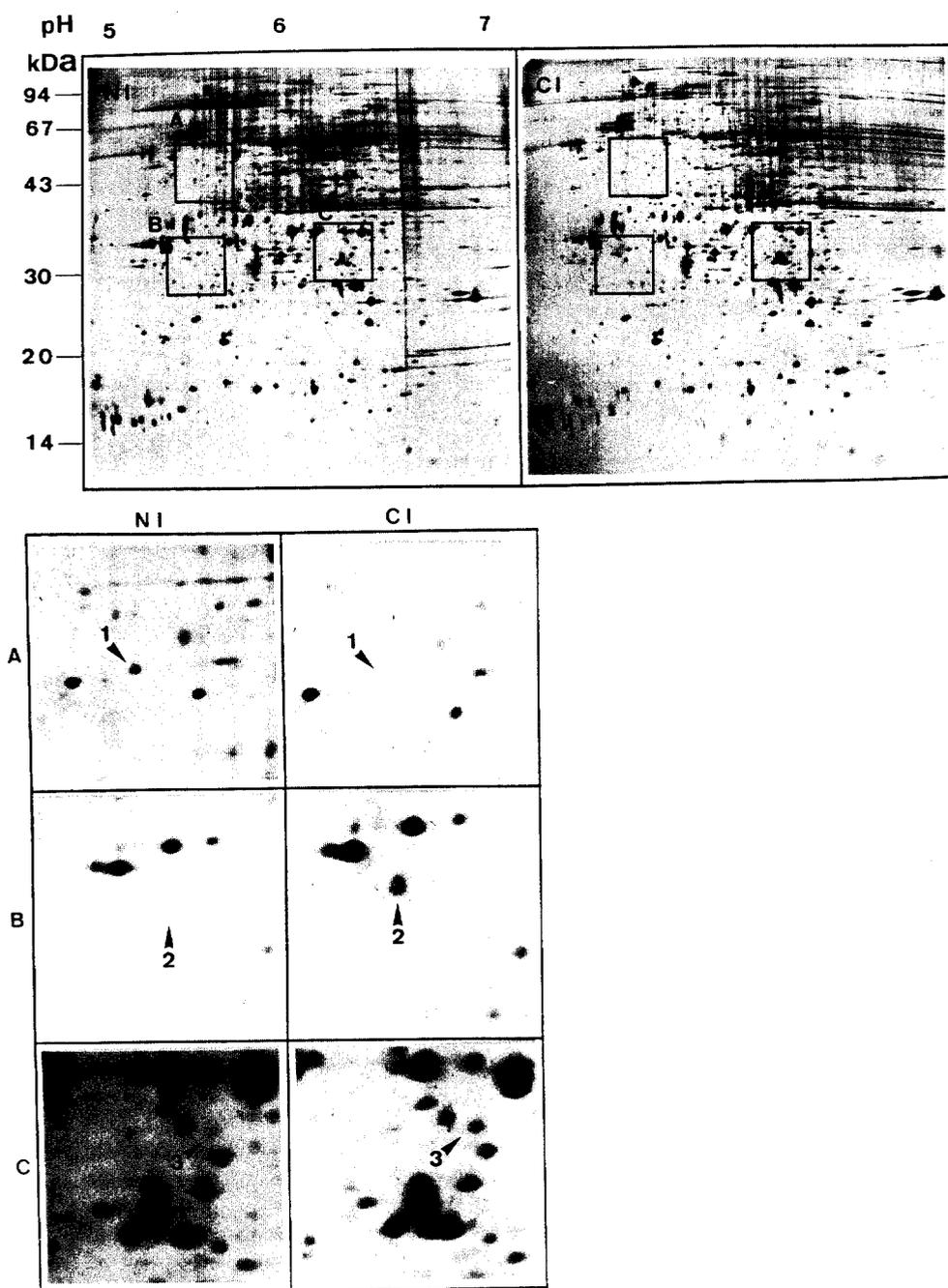


Figura 22. Patrones de proteínas microsomales, en geles bidimensionales de poliacrilamida teñidos con plata, de semillas de girasol normal inducido por frío (CI) y no inducido (NI). Las áreas marcadas están ampliadas abajo para mostrar los detalles. Las manchas que mostraron cambios en cuatro experimentos están indicadas por flechas y un número.

El considerable aumento en intensidad de dos proteínas en los geles de las semillas inducidas por frío se correlacionó bien con el aumento de la actividad oleato desaturasa microsomal en estas mismas semillas y concuerda con resultados previos que mostraron que la inducción de la oleato desaturasa requería síntesis "de novo" de proteínas. Sería posible que el polipéptido 2 o el 3, cuya síntesis aumentó por frío correspondiesen a la proteína enzimática oleato desaturasa microsomal, no purificada hasta ahora. Es interesante mencionar que estos polipéptidos están en el rango de peso molecular de una proteína codificada por un gen *desA* clonado en cianobacterias, que ha sido informado como correspondiente a una Δ^{12} -desaturasa del tipo de las de plantas, o a un cofactor de la misma (Wada et al, 1990).

La desaturación del ácido oleico en semillas de girasol parece ser un sistema muy complejo y altamente regulado. El posible papel de las proteínas encontradas en este estudio en el sistema oleato desaturasa microsomal y en su regulación por temperatura necesitará posterior investigación. La identificación las proteínas detectadas en este estudio, podría abrir las puertas para la purificación o aislamiento de la oleato desaturasa microsomal y de las proteínas implicadas en su regulación por temperatura. Así como de proteínas relacionadas con mecanismos de regulación espacial y temporal de la expresión de enzimas en semillas.

IV. INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD OLEATO DESATURASA POR FRÍO. REPRESIÓN Y REINDUCCIÓN POR CAMBIOS DE TEMPERATURA.

Anteriormente hemos mostrado que la desaturación del ácido oleico en semillas de girasol aumenta a baja temperatura. También, hemos visto que el aumento en el porcentaje de ácido linoleico a baja temperatura tanto en lípidos de reserva como de membrana se debe a un aumento en la actividad oleato desaturasa microsomal. Además hemos mostrado que este aumento de actividad se produce gracias a un mecanismo que requiere síntesis "de novo" de proteínas, posiblemente de la propia enzima. Por otro lado, otros experimentos han sugerido que el ácido oleico necesario como sustrato para la formación de ácido linoleico, en condiciones de estrés por frío, proviene fundamentalmente de los TAG.

En este capítulo estudiaremos la probable existencia de otros mecanismos reguladores de la desaturación del ácido oleico relacionados con la temperatura. Veremos que el aumento de la actividad oleato desaturasa producido por el frío no ocurre indefinidamente sino que se producen descensos y aumentos no provocados directamente por cambios de temperatura. También veremos que la inducción de la oleato desaturasa por frío se inactiva por altas temperaturas (30°C), y que esta inactivación es rápidamente reversible cuando la temperatura ambiente vuelve a disminuir.

IV.1. Inducción y represión de la actividad oleato desaturasa a 10°C durante 48 horas.

En este experimento se transfirió una planta de girasol normal, RHA-274, crecida a alta temperatura, a una cámara a 10°C. Se fueron tomando semillas a distintos tiempos hasta 48 horas después del cambio de temperatura. Se analizó la composición de ácidos grasos tanto del extracto total como de la fracción microsomal, así como la actividad oleato desaturasa "in vitro".

Los resultados (tabla 27) muestran que se produjo una estimulación de la actividad oleato desaturasa en las cinco primeras horas tras el cambio a 10°C correlativa con un aumento en los porcentajes de ácido linoleico en los lípidos totales (6.7%) y en los microsomales (14.8%). Sin embargo, durante las siguientes cinco horas a 10°C la actividad disminuyó a un tercio de su valor previo aunque manteniéndose por encima de su valor a tiempo cero. En este período el porcentaje de ácido linoleico en lípidos totales siguió aumentando (un 7.6%) pero disminuyó en los lípidos microsomales (un 5.3%). Esto indica que los lípidos microsomales reflejan con mayor rapidez los cambios producidos en la actividad oleato desaturasa, lo que es lógico al ser ellos el sustrato de la enzima, y por tener una rápida tasa de intercambio de acilos. Durante las siguientes seis horas (t=16 h) la actividad volvió a estimularse alcanzando un máximo de 30 nmoles de 18:2 por hora y gramo de semillas, pero esta nueva activación no se reflejó en los

porcentajes de ácido linoleico ni total ni microsomal que se mantuvieron prácticamente constantes respecto a sus valores anteriores. Tras 24 horas de permanencia a 10°C la actividad oleato desaturasa microsomal sufrió una nueva caída de su valor, sin embargo los porcentajes de ácido linoleico aumentaron probablemente como consecuencia del aumento de actividad producido con anterioridad. Por último, tras 48 horas a 10°C se encontró un valor nuevamente estimulado de la actividad oleato desaturasa, esta vez correlativo con un fuerte aumento en los porcentajes de ácido linoleico. No sabemos si a tiempos intermedios se produjeron otras subidas y bajadas de la actividad pero es posible que así ocurriera.

Tabla 27. Inducción de la actividad oleato desaturasa microsomal en semillas de girasol durante 48 horas a 10°C. Los resultados son media de dos replicados \pm s.

Tiempo a 10°C (h)	ODS (nmol 18:2 g PF ⁻¹ ·h ⁻¹)	Porcentaje de 18:2 (mol%)	
		Total	Microsomal
0	3.0 \pm 0.2	35.4	34.9
5	21.5 \pm 0.1	42.1	49.7
10	6.3 \pm 0.5	49.7	44.3
16	30.2 \pm 0.5	49.1	45.8
24	6.3 \pm 0.3	50.0	52.3
48	17.5 \pm 0.1	62.2	61.3

Estos resultados indican que la inducción de la actividad enzimática por frío no se mantiene constantemente elevada durante todo el tiempo que dura la exposición a baja temperatura sino que existen otro(s) mecanismo(s) que producen inducciones y represiones consecutivas de la actividad sin que se produzca un cambio en la temperatura ambiente. También indican que los cambios en la composición de los lípidos de las semillas requieren un cierto tiempo para reflejar los cambios de la actividad, reflejándose más rápida y pronunciadamente en los lípidos microsomales, donde se observan aumentos y disminuciones del porcentaje de ácido linoleico, que en los totales donde dicho porcentaje aumenta constantemente. A pesar de las subidas y bajadas, tanto la actividad como el porcentaje de ácido linoleico medios tienden a ir aumentando durante todo el período en el que la planta estuvo a 10°C. Es interesante mencionar que estas subidas y bajadas de la actividad y los porcentajes de ácido linoleico no siguen un patrón temporal constante en distintas plantas, es decir, en otros experimentos similares a este se encontró que los tiempos a los que ocurrían los aumentos y descensos de la actividad oleato desaturasa eran distintos. Por ejemplo, en un experimento similar al descrito se encontró que la actividad estuvo aumentando durante las 9 horas de estar a 10°C. Su valor disminuyó a la mitad a las 24 horas, a las 50 horas se volvió a medir una actividad alta y a las 100 horas se produjo otra caída de la actividad. Nunca hemos detectado descensos de la actividad oleato desaturasa a 10°C a tiempos de inducción inferiores a 8 horas.

Estos aumentos y disminuciones de la actividad en semillas mantenidas a 10°C durante tiempos largos, indican que debe existir algún otro mecanismo regulador, además de la inducción de la síntesis de proteína por frío, que controla más finamente la desaturación del ácido oleico.

IV.2. Represión de la actividad oleato desaturasa por alta temperatura y reinducción por frío.

Seguidamente nos preguntamos si estos descensos de la actividad podrían ser debidos a algún proceso de retrocontrol y si podían ser provocados aumentando la temperatura ambiente en semillas previamente inducidas. Para averiguarlo, tomamos un capítulo de una planta de girasol normal, crecida a alta temperatura con semillas de en desarrollo de 16 DDF de edad, y lo pusimos a 10°C durante 4 horas. Pasado ese tiempo, lo transferimos a 30°C durante tres horas, tomando dos muestras, una después de una hora, y otra al cabo de tres horas. Posteriormente volvimos a ponerlo a 10°C también durante tres horas, con una toma de muestra tras una hora y otra a las tres horas. Se analizó la composición de ácidos grasos de los lípidos totales y microsomales, y se midió la actividad oleato desaturasa "in vitro".

Los resultados (figura 23) muestran que se produjo un fuerte aumento de la actividad oleato desaturasa y del porcentaje de ácido linoleico total y microsomal tras las 4 horas de incubación a 10°C. Esta inducción por frío fue

claramente reprimida tras la subida de la temperatura ambiente a 30°C, la actividad cayó hasta aproximadamente la mitad de su valor en solo una hora y continuó bajando en la hora siguiente a 30°C. Correlativamente bajaron los porcentajes de ácido linoleico, en mayor grado en los lípidos microsomales que en los totales. Tras volver a bajar la temperatura ambiente a 10°C, se produjo una rápida reinducción de la actividad oleato desaturasa microsomal que alcanzó en una hora el mismo valor que había alcanzado tras las 4 primeras horas a 10°C. Este nuevo aumento fue seguido por un fuerte aumento del porcentaje de ácido linoleico microsomal y en menor grado del total. Sin embargo, tras dos horas de incubación a 10°C se produjo una significativa y no esperada caída de la actividad oleato desaturasa no correspondiendo a ningún cambio de temperatura, que no llegó a afectar al porcentaje de ácido linoleico, el cual siguió aumentando, posiblemente por que el descenso de la actividad aún no ha tenido tiempo para reflejarse en la composición de ácidos grasos. Posiblemente este último descenso de la actividad es del mismo tipo de los que se detectaron tras largos tiempos de incubación a baja temperatura (tab. 27).

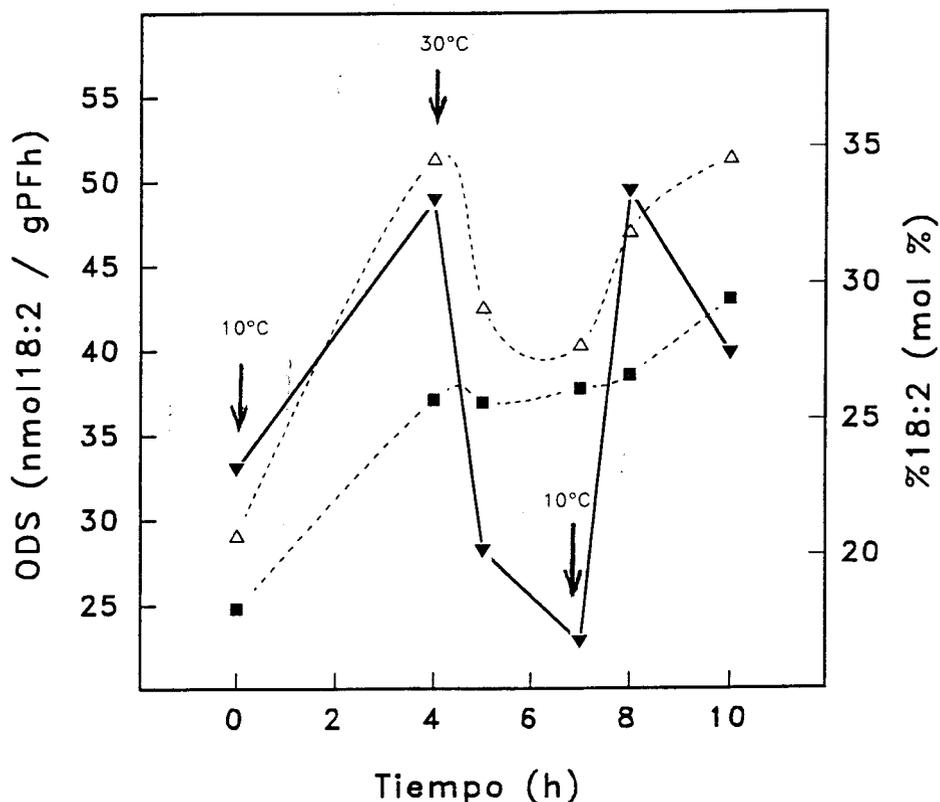


Figura 23. Represión y reinducción por cambio de temperatura en la actividad oleato desaturasa microsomal (▼) y el porcentaje de ácido linoleico en lípidos totales (■) y microsomales (△) de semillas de girasol crecidas a alta temperatura y sometidas a cambios de temperatura a las 0, 4, y 7 horas.

Estos resultados corroboran los del experimento anterior, en el sentido de que la temperatura no solo regula la actividad oleato desaturasa mediante la inducción de la misma por frío. La subida de temperatura tiene un marcado efecto regulador reprimiendo la actividad de la oleato desaturasa. Además estos resultados muestran que la represión de la actividad por calor no causa una pérdida total de la misma sino que una cierta capacidad de desaturación permanece. Asimismo esta represión a alta temperatura resultó

ser rápidamente reversible. Estos datos indican que la represión por alta temperatura no se debe a la termolabilidad del enzima como en *E.coli* (Fuiji y Fulco, 1977) o a la existencia de un regulador termolábil como en *Bacillus* (Cronan y Rock, 1987) sino que más bien parece tratarse de un mecanismo de modulación del nivel de actividad de la enzima presente para ajustarla a las condiciones de temperatura existentes en el medio, siendo un mecanismo que responde con mucha rapidez a los cambios de temperatura. Recientes estudios realizados con hojas de colza (Williams et al., 1992 a,b) coinciden con nuestros resultados tanto en la existencia de inducción de la actividad desaturasa por baja temperatura como en la represión de la misma por alta temperatura. Asimismo también detectaron que la represión era reversible pero mucho más lentamente que en girasol. Las hojas de colza tardaron unos 8 días en recuperar la actividad tras el segunda descenso de temperatura. Es posible que el mecanismo molecular que controle las subidas y bajadas de actividad tanto por cambios de temperatura como a baja temperatura constante durante largo tiempo estén relacionados con el mantenimiento de la fluidez de las membranas en cada condición ambiental. Los tiempos largos a baja temperatura constante podrían producir una excesiva inducción del nivel de actividad desaturasa que sería necesario controlar con un ajuste más fino de la misma en cada momento, probablemente por algún tipo de retrocontrol, bien por fluidez o bien por producto final. En un estudio realizado con levaduras (Bossie y Martin, 1989) se encontró que la adición de ácidos grasos

insaturados exógenos a los cultivos produjo una pérdida de actividad desaturasa indicando la existencia de un retrocontrol por producto.

IV.3. Estudio de la represión y reinducción de la desaturación del ácido oleico en distintas fracciones subcelulares.

Hemos querido profundizar en el conocimiento de la inducción, represión y reinducción de la actividad oleato desaturasa por temperatura, determinando en cual de las fracciones subcelulares implicadas en el metabolismo lipídico y en qué tipos de lípidos de las mismas se producen más acusadamente los cambios en las proporciones relativas de los ácidos oleico y linoleico a distintas temperaturas.

Para ello, tomamos un capítulo de una planta de girasol normal crecida a alta temperatura con semillas en desarrollo, y lo pusimos a 10°C durante 4 horas, después lo cambiamos a un baño a 30°C durante tres horas y por último lo volvimos a colocar a 10°C durante dos horas más. Tomamos muestras de semillas por duplicado después de cada cambio de temperatura y las trituramos para obtener los correspondientes extractos crudos. Posteriormente obtuvimos los oleosomas y los microsomas y extrajimos los lípidos totales de cada fracción subcelular, purificándose a continuación los lípidos mayoritarios, triacilglicéridos (TAG), diacilglicéridos (DAG) y fosfatidilcolina (PC) por cromatografía en capa fina. Se

determinó la composición de ácidos grasos de los mismos por cromatografía gaseosa. También determinamos las cantidades de lípidos en las distintas fracciones obtenidas usando patrón interno.

Resultó que el 86.2% de los lípidos se encontraron en los oleosomas, mientras que sólo el 6.4% de los mismos se localizaron en la fracción microsomal. Los lípidos restantes se encontraron en el precipitado de la primera centrifugación a 10.000 g (un 6.6%) y en el sobrenadante de la centrifugación final a 100.000 g (un 0.7%).

Los resultados de los análisis de la composición de ácidos grasos se muestran en la tabla 28. En ellos se observa que en los microsomas las proporciones relativas de los ácidos oleico y linoleico siguen la tendencia esperada, es decir, aumento del porcentaje de linoleico a expensas del de oleico al bajar la temperatura y viceversa, en todos los tipos de lípidos estudiados. Los mayores cambios de estas proporciones se produjeron en la PC, seguida por los DAG. Este resultado concuerda con el hecho de que la PC es el sustrato principal de la reacción de desaturación del ácido oleico (Stymne y Applegvist, 1978) y con la existencia postulada por Slack *et al.* (1978) en semillas de lino, soja y cártamo, de una reacción de interconversión entre PC y DAG. Esta reacción de interconversión parece ser muy activa en las semillas de girasol a juzgar por la alta similitud en la composición de ácidos grasos que ambos tipos de lípidos muestran en todas las condiciones a las que se someten las semillas en este experimento.

En los oleosomas, se observó que al igual que en la fracción microsomal los cambios más drásticos en la proporciones de oleico y linoleico ocurrieron en la PC, seguida por los DAG. Los TAG constituyen un 80-95% de los lípidos totales de las semillas de girasol en desarrollo (Roberston *et al.*, 1978) y la mayoría de ellos se encuentran en los oleosomas, por ello, la composición de ácidos grasos de los TAG de oleosomas prácticamente coincidió con la de los lípidos totales de los mismos. Tanto en los lípidos totales como en los TAG de oleosomas se observó que la inducción y reinducción a 10°C provocaron un pequeño pero significativo aumento del porcentaje de ácido linoleico. Es muy interesante, que, sin embargo, el porcentaje de ácido linoleico aumentó tras las dos horas de incubación a 30°C, en vez de disminuir como en los otros tipos de lípidos. El porcentaje de ácido linoleico aumentó en los lípidos totales un 0.8% y en los triacilglicéridos un 1% cuando lo esperado era que disminuyese.

Tabla 28. Inducción, represión y reinducción de la desaturación del ácido oleico por cambios de temperatura en distintas fracciones subcelulares. Los resultados son media de dos replicados \pm s.

Tipo de Lípido	Composición de ácidos grasos (mol %)			
	Microsomas		Oleosomas	
	18:1	18:2	18:1	18:2
TOTALES				
Control	64.4 \pm 1.3	17.1 \pm 0.6	72.0 \pm 0.7	12.3 \pm 1.1
+4h a 10°C	53.4 \pm 1.3	29.3 \pm 0.5	67.0 \pm 0.1	17.9 \pm 0.5
+2h a 30°C	58.1 \pm 0.1	25.3 \pm 1.0	65.9 \pm 0.1	18.7 \pm 0.2
+2h a 10°C	52.3 \pm 0.9	30.4 \pm 0.6	65.2 \pm 0.4	20.1 \pm 0.4
TAG				
Control	68.2 \pm 0.4	12.4 \pm 0.9	71.8 \pm 1.0	12.1 \pm 1.1
+4h a 10°C	62.5 \pm 1.9	21.7 \pm 1.0	67.6 \pm 0.8	17.3 \pm 0.4
+2h a 30°C	63.8 \pm 0.4	19.8 \pm 0.1	66.4 \pm 0.3	18.3 \pm 0.0
+2h a 10°C	58.8 \pm 3.5	25.7 \pm 3.5	65.9 \pm 0.3	19.3 \pm 0.3
DAG				
Control	64.1 \pm 3.9	18.4 \pm 0.8	71.2 \pm 0.2	15.3 \pm 0.9
+4h a 10°C	51.7 \pm 0.8	32.4 \pm 2.1	58.8 \pm 0.4	32.8 \pm 1.0
+2h a 30°C	58.0 \pm 2.4	25.9 \pm 0.3	66.1 \pm 0.4	24.6 \pm 0.3
+2h a 10°C	51.4 \pm 1.5	31.8 \pm 1.0	55.3 \pm 0.3	34.7 \pm 2.7
PC				
Control	66.3 \pm 1.7	18.8 \pm 1.0	68.7 \pm 1.2	16.6 \pm 0.8
+4h a 10°C	48.8 \pm 0.8	36.3 \pm 1.3	47.5 \pm 0.6	41.6 \pm 2.3
+2h a 30°C	58.8 \pm 0.1	25.7 \pm 0.3	61.4 \pm 1.5	25.5 \pm 0.1
+2h a 10°C	47.3 \pm 0.5	36.9 \pm 1.3	45.1 \pm 2.4	43.3 \pm 2.4

Así pues, debido al aumento de temperatura, los lípidos de membrana, mayoritariamente la PC, y también los DAG, con los que la PC se encuentra en equilibrio, necesitan aumentar su porcentaje de ácido oleico. Como la reacción de desaturación del ácido oleico es irreversible, es posible que un descenso de la actividad desaturasa no sea suficiente para a tiempos cortos modificar la composición de estos lípidos. Por ello, estos resultados sugieren que las moléculas de ácido linoleico que les sobran son transferidas a TAG.

La existencia de un mecanismo de intercambio de acilos entre TAG y PC o TAG y DAG, explicaría el aumento del porcentaje de ácido linoleico en TAG durante la incubación a 30°C. Aunque los cambios en estos porcentajes son pequeños porcentualmente hay que considerar que como ya dijimos el 86.2% de los lípidos de las semillas se encuentran en los oleosomas y que de ellos un 90-95% son triacilglicéridos, por lo que un pequeño cambio en el porcentaje de ácidos grasos en estos lípidos supone, cuantitativamente, una gran cambio de los ácidos grasos de los otros tipos de lípidos. Este intercambio de acilos podría funcionar entre los TAG de los oleosomas y los lípidos polares microsomales, permitiendo enviar de forma rápida a los TAG de reserva el ácido linoleico sobrante de los lípidos de membrana que necesitan disminuir su grado de insaturación a altas temperaturas para mantener una fluidez adecuada. Los triacilglicéridos de reserva cuya composición de ácidos grasos no necesita estar tan estrictamente adaptada a la temperatura ambiente actuarían, por tanto, como lípidos aceptores y donadores de

los acilos que otros tipos de lípidos necesiten o no en cada momento.

Este mecanismo de intercambio de acilos entre los TAG y los acil-CoAs citoplásmaticos o entre TAG y PC o DAG, ya fue sugerida por los resultados de los experimentos realizados sobre el papel de los TAG en la inducción por frío de la oleato desaturasa. La necesidad del tal intercambio se confirma con estos datos que apoyan claramente la necesidad de replantear el papel de los TAG en el metabolismo de lípidos de las semillas, no debiendo ser considerados únicamente como el resultado final y acúmulo no modificable de la síntesis de lípidos de las semillas en desarrollo.

IV.4. Estudio de la represión y reinducción de la desaturación del ácido oleico en distintos tipos de lípidos polares.

Con el fin de profundizar en el conocimiento del control de la desaturación del ácido oleico por temperatura, y de los posibles flujos de ácidos grasos entre distintos tipos de lípidos, se analizaron las variaciones en la composición de ácidos grasos de los lípidos polares mayoritarios de las semillas de girasol.

Para determinar cuales de los lípidos polares pudieran ser más susceptibles a sufrir cambios en su composición de ácidos grasos a tiempos cortos hicimos un análisis de los lípidos polares marcados radiactivamente en un experimento

previo de marcaje radiactivo en el que se incubaron semillas de girasol normal con 50 KBq de [¹⁴C]-oleato durante 4 horas a 24°C. Los lípidos polares obtenidos de estas semillas marcadas se separaron por cromatografía en capa fina. Se determinó la radiactividad incorporada en cada tipo de lípido raspando las bandas detectadas y midiendo las DPM presentes en las mismas, en un contador de centelleo líquido. Como se esperaba la PC es el lípido más activo metabólicamente, seguida por los otros fosfolípidos, PE y PI. Los galactolípidos, MGDG y DGDG, resultaron mucho menos marcados. Recordemos que como se explicó en la introducción, el girasol es una planta tipo "18:3" por lo que el ácido linoleico de sus galactolípidos se sintetiza en el retículo endoplasmático en la PC. Se seleccionaron estos cinco tipos de lípidos polares para estudiar los cambios que sufren en su composición de ácidos grasos en respuesta a cambios de temperatura. Así pues, se tomó el capítulo de una planta de girasol normal crecida a alta temperatura con semillas en desarrollo. Se mantuvo a 10°C durante 4 horas, después se transfirió a 30°C durante dos horas, y por último se volvió a colocar a 10°C otras dos horas. Tomamos muestras en cada cambio de temperatura, extraímos los lípidos totales, separamos las distintas clases de lípidos por CCF y analizamos la composición de ácidos grasos, incluyendo el porcentaje de ácido linolénico por ser significativo en los galactolípidos.

En la tabla 29, se muestran los cambios en la composición de ácidos grasos de los lípidos totales, TAG, DAG

y lípidos polares del extracto lipídico total de las semillas incubadas a distintas temperaturas. Se observa que los cambios más drásticos en el porcentaje de ácido linoleico tras los cambios de temperatura se produjeron en los lípidos polares seguidos por los diacilglicéridos igual que ocurrió en el experimento anterior, lo que refleja de nuevo que la reacción de interconversión $PC \rightleftharpoons DAG$ es muy activa en semillas de girasol. En los triacilglicéridos se vuelve a observar que tras la incubación a 30°C el porcentaje de ácido linoleico no disminuye como en los otros tipos de lípidos sino que aumenta aunque sea mínimamente, como ocurrió en los TAG de los oleosomas (tabla 28). En este experimento la composición de ácidos grasos de los lípidos totales, sin fraccionamiento subcelular, revela que los porcentaje de 18:1 y 18:2 totales no varían durante la represión de la ODS por calor, lo cual es lógico puesto que la reacción no es reversible. Esto indica, que lo que ocurre es una translocación del ácido oleico desde TAG a otros tipos de lípidos y del ácido linoleico sobrante de otros tipos de lípidos hacia TAG. Apoyando, aún más, la existencia de un intercambio de acilos entre los TAG y o bien, la PC y DAG, o bien, directamente con el conjunto de acil-CoAs citoplasmático.

Tabla 29. Cambios en la composición de ácidos grasos, especialmente en la relación oleico/linoleico de los lípidos totales, triacilglicéridos (TAG), diacilglicéridos (DAG) y lípidos polares como respuesta al frío y al calor en semillas de girasol incubadas a 10° y 30°C sucesivamente. Los resultados son media de dos replicados \pm s.

Tipo	Tiempo (h)	Composición de ácidos grasos (mol %)					
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	Δ 18:2
TOTALES	Control	7.6 \pm 0.1	7.3 \pm 0.1	74.0\pm0.2	10.4\pm0.2	0.6 \pm 0.5	-
	+4h a 10°C	7.1 \pm 0.3	7.0 \pm 0.6	68.6\pm0.5	16.8\pm0.7	0.3 \pm 0.0	6.4
	+2h a 30°C	7.0 \pm 0.3	7.1 \pm 0.1	68.8\pm0.5	16.8\pm0.4	0.4 \pm 0.1	0.0
	+2h a 10°C	6.8 \pm 0.1	7.1 \pm 0.2	66.2\pm0.4	19.2\pm0.4	0.3 \pm 0.0	2.4
TAG	Control	7.5 \pm 0.1	7.2 \pm 0.4	74.5\pm0.3	10.3\pm0.6	0.4 \pm 0.1	-
	+4h a 10°C	7.1 \pm 0.5	7.3 \pm 0.6	70.7\pm1.0	14.6\pm1.3	0.3 \pm 0.0	4.3
	+2h a 30°C	6.8 \pm 0.1	7.2 \pm 0.1	70.4\pm0.1	15.0\pm0.1	0.3 \pm 0.0	0.4
	+2h a 10°C	6.8 \pm 0.1	7.5 \pm 0.3	68.4\pm0.5	16.4\pm0.2	0.2 \pm 0.1	1.4

Tipo	Tiempo (h)	Composición de ácidos grasos (mol %)					
Lípido	Temp (°C)	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	Δ 18:2
DAG	Control	6.5±0.1	5.1±0.6	75.8±0.4	12.1±0.3	0.2±0.1	-
	+4h a 10°C	6.6±0.8	4.9±0.5	54.4±1.3	31.5±0.4	0.4±0.4	19.4
	+2h a 30°C	5.7±0.5	4.3±0.3	66.5±0.4	23.2±1.3	0.1±0.1	-8.3
	+2h a 10°C	5.6±0.4	4.1±0.3	54.5±0.0	35.8±1.0	0.1±0.0	12.6
POLARES	Control	11.1±1.0	8.8±0.8	63.0±1.2	16.0±0.8	0.8±0.4	-
	+4h a 10°C	9.5±0.0	6.5±0.7	44.9±1.7	38.3±2.5	0.5±0.1	22.3
	+2h a 30°C	10.0±0.4	7.1±1.8	56.3±1.1	25.8±2.2	0.7±0.3	-12.5
	+2h a 10°C	10.0±0.3	6.3±1.5	42.5±0.0	40.1±2.0	0.5±0.1	14.3

Posteriormente estudiamos las variaciones en la composición de ácidos grasos de los tipos de lípidos polares mayoritarios y más activos metabólicamente de las semillas de girasol como respuesta a los cambios de temperatura. Conviene recordar que según estudios previos sobre composición de fosfolípidos (Chapman, 1980) y sobre composición de lípidos polares (Grewal et al., 1978) en girasol, el fosfolípido mayoritario es la fosfatidilcolina que constituye aproximadamente un 50% del total de fosfolípidos de las semillas de girasol, los cuales a su vez son aproximadamente un 75% de los lípidos polares totales, correspondiendo el 25% restante a los galactolípidos y los esterolglucósidos. Igualmente es interesante recordar que como se explicó en la introducción, la PC, la PE y el PI, se sintetizan en el retículo endoplasmático a partir de los diacilglicéridos. La fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina provienen del mismo conjunto de DAG por adición primero de un grupo fosfato y posteriormente de la correspondiente amina. El fosfatidilinositol sin embargo, proviene de un conjunto distinto de CDP-DAG. Por el contrario, los galactolípidos se sintetizan en cloroplastos y plastidios.

Así pues, en la tabla 30, se observa cómo los fosfolípidos, PC y PE sintetizados a partir de los DAG fueron los que respondieron más acusadamente a los cambios de temperatura, siendo la PC la que sufrió los mayores cambios en sus porcentajes de ácidos oleico y linoleico. Esto es lógico considerando que como se ha dicho repetidamente, la PC es el sustrato de la enzima oleato desaturasa microsomal. La

PE también respondió fuertemente a los cambios de temperatura, sobre todo a la inducción por frío. Esto podría indicar la existencia de un mecanismo de conversión rápida de PC a PE o bien que la PE pudiera ser también sustrato de la oleato desaturasa microsomal en semillas de girasol. Esta segunda posibilidad ya ha sido sugerida con anterioridad en semillas de cártamo (Sanchez y Stumpf, 1984). El fosfatidilinositol respondió a la inducción por frío aumentando su porcentaje de ácido linoleico tras las primeras cuatro horas a 10°C, sin embargo, dicho porcentaje no disminuyó al subir a 30°C la temperatura, sino que por el contrario continuó aumentando levemente y tampoco respondió prácticamente a la reinducción por frío. Este comportamiento parece indicar que la ruta de síntesis de fosfatidilinositol es menos sensible a los cambios de temperatura tardando más en notarse las variaciones en el grado de insaturación, probablemente el PI tiene una velocidad de recambio menor que los otros fosfolípidos.

Tabla 30. Cambios en la composición de ácidos grasos, especialmente en la relación oleico/linoleico de los galactolípidos (MGDG y DGDG) y en los fosfolípidos (PC, PE y PI) como respuesta al frío y al calor en semillas de girasol incubadas a 10° y 30°C sucesivamente. Los resultados son media de dos replicados \pm s.

Tipo	Tiempo (h)	Composición de ácidos grasos (mol %)					
Lípido	Temp (°C)	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	Δ 18:2
PC	Control	6.5 \pm 0.6	4.4 \pm 1.5	76.2 \pm 0.7	12.6 \pm 1.4	0.1 \pm 0.1	-
	+4h a 10°C	6.5 \pm 0.0	4.7 \pm 0.5	46.4 \pm 1.9	41.8 \pm 2.6	0.2 \pm 0.0	29.2
	+2h a 30°C	6.2 \pm 0.2	5.0 \pm 0.0	66.7 \pm 0.0	21.6 \pm 0.3	0.2 \pm 0.0	-20.2
	+2h a 10°C	6.9 \pm 0.4	5.0 \pm 0.0	46.7 \pm 1.5	41.1 \pm 1.8	0.1 \pm 0.0	19.5
PE	Control	11.4 \pm 1.9	2.8 \pm 0.5	61.8 \pm 0.1	23.2 \pm 1.6	0.1 \pm 0.0	-
	+4h a 10°C	14.1 \pm 1.6	3.5 \pm 0.2	40.1 \pm 1.0	41.9 \pm 3.1	-	18.8
	+2h a 30°C	11.2 \pm 1.7	3.6 \pm 0.1	45.8 \pm 1.1	38.8 \pm 0.6	0.1 \pm 0.0	-3.1
	+2h a 10°C	14.8 \pm 0.0	3.7 \pm 0.2	36.7 \pm 0.3	43.8 \pm 0.3	0.4 \pm 0.4	5.0

Tipo	Tiempo (h)	Composición de ácidos grasos (mol %)					
Lípido	Temp (°C)	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	Δ18:2+18:3
PI	Control	21.2±3.0	10.1±0.5	51.4±0.4	17.2±1.8	0.1±0.1	-
	+4h a 10°C	20.5±0.4	9.9±0.7	44.5±0.9	24.6±0.1	0.2±0.1	7.4
	+2h a 30°C	20.1±1.2	8.8±2.0	43.1±0.1	26.4±1.8	0.3±0.3	1.8
	+2h a 10°C	21.4±0.2	10.6±0.8	41.1±0.4	26.5±0.4	0.1±0.1	0.1
MGDG	Control	6.0±0.6	5.2±0.7	51.7±2.2	27.3±0.8	9.2±0.6	-
	+4h a 10°C	4.6±0.1	4.5±0.5	51.4±3.0	30.6±1.1	8.4±1.5	2.5
	+2h a 30°C	3.2±1.4	3.6±1.1	52.3±2.5	33.4±0.3	7.3±1.8	1.7
	+2h a 10°C	3.8±1.1	3.7±0.7	48.8±1.5	34.0±1.5	9.2±3.1	2.5
DGDG	Control	12.1±1.7	13.2±2.0	41.9±0.3	25.8±3.5	7.0±1.4	-
	+4h a 10°C	11.3±1.1	9.6±0.9	31.4±0.4	33.4±2.8	7.8±0.5	8.4
	+2h a 30°C	6.2±3.9	10.5±2.7	40.7±3.4	32.9±0.8	9.1±1.3	0.5
	+2h a 10°C	9.0±1.4	9.2±1.1	37.0±2.1	36.4±2.4	8.1±2.5	2.5

En cuanto a los galactolípidos, se determinó la presencia en cantidades apreciables de ácido linolénico (18:3) que estaba prácticamente ausente en los restantes tipos de lípidos. Los galactolípidos respondieron a la temperatura en mucho menor grado que los otros lípidos polares analizados. En el caso de los DGDG el porcentaje de ácido linoleico cambió siguiendo la tendencia general, aumentó tras las incubaciones a baja temperatura y disminuyó tras el período a 30°C. Sin embargo, en los MGDG los cambios fueron algo menores y la permanencia a alta temperatura no redujo el porcentaje de ácido linoleico aunque sí redujo el de ácido linolénico. Si consideramos la suma de linoleico y linolénico, los dos ácidos grasos poliinsaturados presentes en los galactolípidos, se observa como en ambos galactolípidos, MGDG y DGDG, se produjeron aumentos en el grado de insaturación respecto al frío, pero no hubo disminución como respuesta al calor.

IV.5. Estudio de la inducción por frío y represión por calor de la desaturación del ácido oleico en hojas de girasol.

En general, las hojas de distintas plantas presentan una composición lipídica y de ácidos grasos bastante similar aún en muy distintas especies vegetales, y se suelen encontrar poco afectadas por factores externos y por los distintos períodos de su desarrollo (Hilchcock & Nicols, 1971). La proporción de lípidos en el tejido foliar es mucho menor que

en las semillas pudiendo constituir hasta un 7% del peso seco. Los galactolípidos (MGDG y DGDG) son los lípidos mayoritarios de las hojas, constituyendo alrededor del 60-75% de los lípidos totales (Harwood, 1980). También se encuentra con frecuencia la presencia de diacilsulfoquinovosilglicerol, un sulfolípidos que puede representar alrededor de un 5% de los lípidos presentes. El resto corresponde a fosfolípidos, principalmente PC, PE y PG y en cantidades menores PI y DPG. La composición de los lípidos de las hojas refleja el alto contenido en cloroplastos de las mismas, el ácido α -linolénico (18:3) es el ácido graso mayoritario especialmente en los galactolípidos, aunque también pueden encontrarse cantidades apreciables de otros ácidos grasos saturados e insaturados. El ácido palmítico es el principal componente del sulfolípidos. En general, no aparecen ácidos grasos inusuales en los lípidos de membranas aunque éstos estén presentes en otros orgánulos celulares de la planta.

En el siguiente experimento quisimos averiguar si la temperatura regula también de algún modo la desaturación de los ácidos grasos de las hojas de girasol. Para ello, se tomaron cuatro plantas jóvenes de girasol crecidas a 20/10°C y se traspararon a una cámara a 10°C constante durante 24 horas, seguidamente se cambiaron las plantas a otra cámara de cultivo a 30°C durante 8 horas. Tras cada cambio se cortaron muestras de las hojas más jóvenes de cada planta por duplicado y se analizó la composición de ácidos grasos de sus lípidos totales.

Los resultados (tabla 31) muestran que los ácidos grasos

mayoritarios fueron el ácido linolénico que constituyó más del 50% de los mismos, seguido por el ácido palmítico cuyo porcentaje rondó el 25%. Los ácidos oleico y linoleico, que en las semillas son los mayoritarios, no constituyeron más del 20% del total de los ácidos grasos presentes en las hojas. Por tanto, aunque su proporción varió algo respecto a la temperatura, esta variación no fue significativa con respecto al grado de insaturación total de las hojas.

Tabla 31. Composición de ácidos grasos de los lípidos totales de hojas de girasol jóvenes incubadas a 10 y 30°C. Los resultados son media de dos replicados \pm s.

HOJAS	Composición de ácidos grasos (mol %)						
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	18:2+18:3
Control	24.1 \pm 1.0	0.1 \pm 0.0	1.6 \pm 0.3	1.2 \pm 0.1	15.3 \pm 8.1	57.5 \pm 6.5	72.8
+24h a 10°C	24.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0	1.4 \pm 0.1	1.7 \pm 0.2	16.4 \pm 2.6	56.0 \pm 2.8	72.4
+ 8h a 30°C	24.4 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0	1.5 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	15.0 \pm 0.3	57.8 \pm 0.4	72.8

Por consiguiente, podemos concluir que los lípidos de las membranas cloroplásticas de girasol, que son la mayoría de los lípidos de hojas, no parecen estar regulados en cuanto a su desaturación, por la temperatura ambiente. Al contrario de lo detectado en otros organismos, como en hojas de colza donde fuertes cambios del grado de insaturación de los galactolípidos ocurren como respuesta a variaciones de la temperatura ambiente (Williams et al., 1992 a,b).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1) El porcentaje de ácido linoleico aumenta a costa del de oleico a bajas temperaturas en semillas de girasol normal en cualquier período de su desarrollo. Este efecto se observa tanto en los lípidos totales como en los lípidos polares. Por el contrario en semillas de girasol alto oleico sólo se observa cierta influencia de la temperatura en el período inicial de su formación, antes de que se produzca la expresión del carácter alto oleico.

2) En las semillas de girasol normal formadas a bajas temperaturas (20/10°C) existe una mayor actividad oleato desaturasa que en las formadas a alta temperatura (30/20°C). Además en el primer caso, la actividad muestra una mayor sensibilidad a cambios en la temperatura de ensayo que en el segundo caso. Sin embargo, ambas actividades muestran una inactivación similar por altas temperaturas "in vitro".

3) La incubación a baja temperatura (10°C) de plantas, capítulos y semillas peladas de girasol, provoca un fuerte aumento de la actividad oleato desaturasa microsomal que se refleja en un aumento del porcentaje de ácido linoleico tanto en los lípidos totales como en los microsomales, pero más rápida y drásticamente en los segundos.

4) Este aumento de la actividad ODS por frío se ve influido por la presencia de abundante oxígeno en el medio, por el estado físico de las semillas, y fundamentalmente por la edad de las mismas. La mayor respuesta de la actividad al frío se encuentra en semillas al comienzo del período de máxima síntesis de lípidos (14-18 DDF).

5) La cicloheximida inhibe el aumento de la actividad oleato desaturasa por frío, indicando que la estimulación de la actividad se debe en gran parte a una inducción de la síntesis proteica "de novo" de la propia enzima o de alguna proteína activadora de la misma.

6) Los triacilglicéridos están implicados en la biosíntesis del ácido linoleico, actuando como donadores del ácido oleico necesario, al menos en condiciones de estrés por frío. Este intercambio de acilos entre los TAG y otros tipos de lípidos y/o con el conjunto de acil-CoAs citoplasmáticos se produce preferentemente en la posición *sn*-2 de los TAG.

7) Se han detectado cambios en el punto isoelectrico de algunas proteínas microsomales de semillas de girasol alto oleico respecto a las de girasol normal. También se ha detectado la aparición de un polipéptido de 32 kDa en dicho mutante. Estas variaciones en el patrón polipeptídico podrían estar relacionadas con la expresión temporal y espacial de la actividad oleato desaturasa microsomal.

8) Se ha detectado un aumento en la intensidad relativa de tres polipéptidos microsomales, con 30, 32 y 43 kDa respectivamente, de semillas de girasol cuya actividad ODS fue inducida por frío. Es posible que alguno de ellos sea la propia enzima, o bien, podría tratarse de alguna proteína activadora de la desaturación por frío.

9) La inducción de la actividad ODS por frío puede ser drásticamente reprimida aumentando la temperatura ambiente. Esta represión no parece ser debida a destrucción de la enzima, puesto que la actividad se recupera rápidamente si se vuelve a disminuir la temperatura. Esto sugiere que, además de la inducción inicial de la actividad ODS por frío, existe algún tipo de mecanismo de retrocontrol sobre la enzima.

10) La inducción y la represión de la actividad ODS provocan cambios significativos de la composición de ácidos grasos de los lípidos totales y preferentemente de los lípidos de membrana, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. En ambos procesos los TAG juegan un papel fundamental como donadores y aceptores de acilos permitiendo que los cambios de composición de los lípidos de membrana ocurran rápidamente. Esto obliga a replantearse el papel de los TAG en los tejidos de reserva, que hasta ahora eran considerados metabólicamente inactivos desde su formación hasta que comienza su catabolismo.

11) Existe un flujo de acilos entre oleosomas y microsomas de semillas de girasol en desarrollo. Este hecho apoya la hipótesis de la formación de los primeros a partir de los segundos.

12) Al contrario que en las semillas, la composición de los lípidos de las hojas de girasol no se ve afectada por cambios de temperatura ambiente.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Karim, T., Lessire, R. y Cassagne, C. (1982) *Physiol. Vég.*, 20: 679.
- Alberdi, M. y Corcuera, L.J. (1991) *Phytochemistry*, 30: 3177.
- Agrawal, V.P., Lessire, R. y Stumpf, P.K. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.*, 230: 580.
- Agrawal, V.P. y Stumpf, P.K. (1985) *Lipids*, 20: 361.
- Anuario de Estadística Agraria (1991) Ed. Serfvicio Técnico del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, pp. 26.
- Arondel, V., Lemieux, B., Hwang, I., Gibson, S., Goodman, H.M. y Sommerville, C.R. (1992) *Science*, 258: 1353.
- Badami, R.C. y Patil, K.B. (1981) *Prog. Lipid Res.*, 19: 119.
- Bafor, M., Stobart, A.K. y Stymne, S. (1990) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67: 217.
- Bafor, M., Smith, M.A., Jonsson, L., Stobart, A.K. y Stymne, S. (1991) *Biochem. J.*, 280: 507.
- Bafor, M., Smith, M.A., Jonsson, L., Stobart, A.K. y Stymne, S. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.*, 303: 145.
- Baker, C., Crossley, A. y Hilditch, T.P. (1950) *J. Soc. Chem. Ind.*, 69: 16.
- Baker, C. y Hilditch, T.P. (1950a) *J. Sci. Food Agric.*, 1: 118.

- Baker, C. y Hilditch, T.P. (1950b) *J. Sci. Food Agric.*, 1: 140.
- Barron, E.J. y Stumpf, P.K. (1962) *Biochem. Biophys. Acta*, 60: 329.
- Bell, R.M. y Coleman, R.A. (1980) *Annu. Rev. Biochem.*, 49: 459.
- Ben Abdelkader, A., Cherif, C., Demandre, C y Mazliak, P. (1973) *Eur. J. Biochem.*, 32: 155.
- Bereman, P.D., Hannapel, D.J., Guerra, D.J., Kuhn, D.N. y Ohlrogge, J.B. (1987) *Arch. Biochim. Biophys.*, 256: 90.
- Bergfeld, R., Hong, Y-N., Kühnl, T. y Schopfer, P. (1978) *Planta*, 143: 297.
- Bertrams, M. y Heinz, E. (1981) *Plant Physiol.*, 68: 653.
- Bossie, M.A. y Martin, C.E. (1989) *J. Bacteriol.*, 171: 6409.
- Block, M.A.Dorne, J.A., Joyard, J. y Douce, R. (1983) *FEBS Lett.*, 164: 111.
- Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.*, 72: 245.
- Brenner, R.R. (1976) *Adv. Exp. Med. Biol.*, 83: 85.
- Brenner, R.R. (1984) *Prog. Lipid Res.*, 23: 69.
- Brindley, O.N. (1978) *Int. J. Obes.*, 2: 7.
- Brockman, J.A., Norman, H.A. y Hildebrand, D.F. (1990) *Phytochemistry*, 29: 1447.

- Browse, J. y Slack, C.R. (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, 753:145.
- Browse, J., Roughan, G. y Slack, C.R. (1981) *Biochem. J.*, 196: 347.
- Campbell, E.J. (1983) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60: 339.
- Canvin, D.T. (1965) *Canadian Journal Of Botany*, 43: 63.
- Cassagne, C., Lessire, R., Bessoule, J.J. y Moreau, P. (1987) en "The Metabolism, Structure & Function of Plant Lipids" (ed. Stumpf, P.K., Mudd, J.B. y Nes, W.D.), pp. 481, Plenum Press, New York.
- Chapman, G.W.Jr. (1980) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 59: 299.
- Cheesbrough, T.M. (1989) *Plant Physiol.*, 90: 760.
- Christie, W.W. (1982) en "Lipid Analysis" (ed. Christie, W.W.) pp. 1, Pergamon Int., Oxford.
- Christie, W.W. (1989) en "Gas Chromatography and Lipids", pp. 64, The Oil Press, Scotland.
- Craig, E.A. y Gross, C.A. (1991) *TIBS*, 16: 135.
- Cronan, J.E. y Rock, C.O. (1987) en "*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology" (ed. Neidhardt, F.C.), pp. 474, American Society for Microbiology, Washington.
- De Torrenco, M.P. y Brenner, R.R. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, 424: 36.
- Demandre, C., Vigh,, L., Justin, A.M., Jolliot, A., Wolf, C. y Mazliak, P. (1986) *Plant Science*, 44: 13.

- Dobarganes, M.C., Márquez-Ruíz, G. y Pérez-Camino, M.C. (1993) *J. Agric. Food Chem.*, 41: 678.
- Douce, R. y Joyard, J. (1980) en "The Biochemistry of Plants", 4 (ed. Stumpf, P.K. y Conn, E.E.), pp. 321, Academic Press, New York.
- Earle, F.R., Vanetten, C.H., Clark, T.F. y Wolff, I.A. (1968) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 45: 876.
- Eastwell, K.C. y Stumpf, P.K. (1983) *Plant Physiol.*, 72: 50.
- Egin-Buhler, B., Loyal, R. y Ebel, J. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.*, 203: 90.
- Enoch, H.G., Catala, A. y Strittmatter, P. (1976) *J. Biol. Chem.*, 251: 5095.
- Fernández-Martínez, J.M., Jiménez, A., Domínguez, J., García, J.M., Garcés, R. y Mancha, M. (1989) *Euphytica*, 41: 39.
- Fernández-Martínez, J.M., Jiménez-Ramírez, A., Domínguez-Giménez, J. y Alcántara, M. (1986) *Grasas y Aceites*, 37: 326.
- Fernández-Martínez, J.M., Domínguez-Giménez, J. y Jiménez-Ramírez, A. (1987) *Comunicaciones Agrarias*, nº 4, Junta de Andalucía, Sevilla.
- Fernández-Martínez, J., Jiménez, A., Domínguez, J., García, J.M., Garcés, R. y Mancha, M. (1989) *Euphytica*, 41: 39.
- Fick, G.N. (1983) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60: 1252.
- Fick, G.N. (1984) en "Proc. of Sunflower Research Workshop" (ed. Bismarck, N.D.), pp.9.

- Fick, G.N. (1989) en "Oil Crops of the World" (ed. Röbbelen, G., Downey, R.K. y Ashri, A.), pp. 301, McGraw-Hill, New York.
- Frentzen, M., Hares, W. y Schiburr, A. (1984) en "Structure, Function and Metabolism of Plant Lipids" (ed. Siegenthaler, P.A. y Eichenberger, W.) pp. 105, Elsevier, Amsterdam.
- Frey-Wyssling, A., Grieshaber, E. y Mühlethaler, K. (1963) J. Ultrastruct. Res., 8: 506.
- Fried, B. (1991) en "Handbook of Thin-Layer Chromatography" (ed. Sherma, J y Fried, B.), Chromatographic Science Series, 55: 593, Marcel Dekker, New York.
- Fuiji, D.K. y Fulco, A.J. (1977) J. Biol. Chem., 252: 3660.
- Fukushima, H., Martin, C.E., Iida, H., Kitajima, Y. y Thompson, Jr., G.A. (1976) Biochim. Biophys. Acta., 431: 165.
- Fulco, A.J. (1970) Biochim. Biophys. Acta, 218: 558.
- Fulco, A.J. (1972) J. Biol. Chem., 247: 3511.
- Garcés, R. y Mancha, M. (1989) Phytochemistry, 28: 2593.
- Garcés, R., García, J.M. y Mancha, M. (1989) Phytochemistry, 28: 2597.
- Garcés, R. y Mancha, M. (1991) Phytochemistry, 30: 2127.
- Garcés, R. y Mancha, M. (1993) Anal. Biochem., 211: 139.

- Garcia Martos, J.M. (1988) en "Biosíntesis y Acumulación de Lípidos de Reserva en Plantas Oleaginosas", Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.
- García, J.M., Qunitero, L.C. y Mancha, M. (1988) *Phytochemistry*, 27: 3083.
- Gennity, J.M. y Stumpf, P.K. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.*, 239: 444.
- Giometti, C.S. y Taylor, J. (1991) en *Advances in Electrophoresis*, 4 (ed. Chrambach, A., Dunn, M.J. y Radola, B.J.), pp. 359, VCH, Alemania.
- Gombos, Z., Wada, H, y Murata, N. (1991) *Plant Cell Physiol.*, 32: 205.
- Gonzalez, S., Nervi, A.M. y Peluffo, R.O. (1986) *Lipids*, 21: 440.
- Graham, D. y Patterson, B.D. (1982) *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 33: 347.
- Grewal, S.S., Sukhija, P.S. y Bhatia, I.S. (1978) *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, 173: 11.
- Griffiths, G., Stobart, A.K. y Stymne, S. (1985) *Biochem. J.*, 230: 379.
- Griffiths, G. (1986) en "Aspects of Triacilglicerol Biosynthesis in developing oilseeds". Ph.D. Thesis, University of Bristol, Bristol, Gran Bretaña. *
- Griffiths, G., Stobart, A.K. y Stymne, S. (1988) *Biochem. J.*, 252: 641.
- Grindley, D.N. (1952) *J. Sci. Food Agric.*, 3: 82.

- Gunstone, F.D., Harwood, J.L. y Padley, F.B. (1986) en "The Lipid Handbook", Chapman & Hall, London.
- Gurr, M.I., Robinson, M.P. y James, A.T. (1969) Eur. J. Biochem., 9: 70.
- Gurr, M.I., Blades, J., Appleby, R.S., Smith, C.G., Robinson, M.P. y Nichols, B.W. (1974) Eur. J. Biochem., 43: 281.
- Gurr, M.I. (1980) en "The Biochemistry of Plants" (ed. Stumpf, P.K. y Conn, E.E.), 4, pp. 205, Academic Press, New York.
- Guy, C.L. (1990) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 41: 187.
- Hadje, G. (1989) en "Oil Crops of the World" (ed. Röbbelen, G., Downey, R.K. y Ashri, A.), pp. 1, McGraw-Hill, New York.
- Hara, A. y Radin, S. (1978) Anal. Biochem., 90: 420.
- Harris, R.V. y James, A.T. (1964) Biochim. Biophys. Acta, 106: 456.
- Harris, P. y James, T. (1969) Biochem. J., 112: 525.
- Harris, H.C., Mcwilliam, J.R. y Mason, W.K. (1978) Aust. J. Agric. Res., 29: 1203.
- Harwood, J.L., Sodja, A. y Stumpf, P.K. (1971), Lipids, 6: 851.
- Harwood, J.L. (1979) Prog. Lipid Res., 18: 55.
- Harwood, J.L. (1980) en "The Biochemistry of Plants", 4 (ed. Stumpf, P.K.), pp. 1, Academic Press, London.

- Harwood, J.L. (1985) en "Encyclopedia of Plant Physiology", 9, (ed. Day, D. y Douce, R.), pp. 37, Springer-Verlag, Berlin.
- Harwood, J.L. (1986) en "The Lipid Handbook" (ed. Gunstone, F.D., Harwood, J.L. y Padley, F.B.), pp. 485, Chapman & Hall, New York.
- Harwood, J.L. (1988) Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 39: 101.
- Hatzopoulos, P., Franz, G., Choy, L. y Sung, R.Z. (1990) Plant Cell, 2: 457.
- Hauman, B.F., Baldwin, A.R., Seiffert, A., Berger, K.G. y Gavin, A.M. (1988) J. Am. Oil Chem. Soc., 65: 702.
- Hazel, J.R. y Williams, E.E. (1990) Prog. Lipid Res., 29: 167.
- Heemskerk, J.W.M. y Wintermans, J.F.G.M. (1987) Physiol. Plantarum, 70: 558.
- Heemskerk, J.W.M., Schmidt, H., Hammer, U. y Heinz, E.E. (1991) Plant Physiol., 96: 144.
- Heinstein, P.F. y Stumpf, P.K. (1969) J. Biol. Chem., 244: 5374.
- Heinz, E. y Harwood, J.L. (1977) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 38: 897.
- Heinz, E., Bertrams, M., Joyard, J. y Douce, R. (1978) Z. Pflanzenphysiol., 87: 325.
- Heinz, E. y Roughan, P.G. (1983) Plant Physiol., 72: 273.

- Herbert, R.A. (1981) en "Effect of Low Temperature on Biological Membranes" (ed. G.J. Morris y A. Clarke), pp. 41, Academic Press, New York.
- Hilchcock, C. y Nichols, B.W. (1971) en "Plant Lipid Biochemistry", Academic Press, New York.
- Hilditch, T.P. y Williams, P.N. (1964) en "The Chemical Constitution of Natural Fats", pp. 207, Chapman & Hall, London.
- Hirsunger, F. (1985) J. Am. Oil Chem. Soc., 62: 76.
- Hugly, S. y Sommerville, C. (1992) Plant Physiol., 99: 197.
- Ichiara, K. (1984) Arch. Biochem. Biophys., 232: 685.
- Ichiara, K., Murota, N. y Fuiji, S. (1990) Biochim. Biophys. Acta, 1043: 227.
- Ivanov, P., Petakov, D., Nikolova, V. y Pentchev, E. (1988) en "Proc. 12th International Sunflower Conference", Novi Sad, pp. 463, International Sunflower Association, Toowoomba, Australia.
- Jaworsky, J.G. (1987) en "The Biochemistry of Plants", 9 (ed. Stumpf, P.K. y Conn, E.E.), pp. 159, Academic Press, New York.
- Jaworsky, J.G., Clough, R.C. y Barnum, S.R. (1989) Plant Physiol., 90: 41.
- Johnsson, G. y Williams, J.P. (1989) Plant Physiol., 91: 924.
- Jones, A.L., Hann, A.C., Harwood, J.L. y Lloyd, D. (1993) Biochem. J., 290: 273.

- Joyard, J. y Douce, R. (1976) *Physiol. Vég.*, 14: 31.
- Joyard, J. Y Douce, R. (1987) en "The Biochemistry of Plants", 9 (ed. Stumpf, P.K. y Conn, E.E.), pp. 215, Academic Press, New York.
- Kader, J.C., Julienne, M., Verganelle, C. (1984) *Eur. J. Biochem.*, 139: 411.
- Kanoh, H. Y ohno, K. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, 380: 199.
- Kasai, R. y Nozawa, Y. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, 617: 161.
- Kasai, R., Yamada, T., Hasegawa, I., Muto, Y., Yoshioka, S., Nakamaru, T. y Nozawa, Y. (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, 836: 397.
- Kennedy, E.P. (1961) *Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol.*, 20: 934.
- Kenrick, J.R. y Bishop, D.G. (1986) *Plant Physiol.*, 81: 946.
- Khan, M.U. y Williams, J.P. (1977) *Journal of Chromatography*, 140: 179.
- Kolattukudy, P.E. (1970) *Lipids*, 5: 259.
- Kopinski, A.M.B., Lewis, V. y Berry, D. (1987) *J. Bacteriol.*, 169: 1960.
- Laemmlí, U.K. (1970) *Nature*, 227: 680.
- Lájara, J.R., Diaz, U. y Diaz-Quidiello, R. (1990) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67: 618.
- Landers, R.E. y Rathmann, D.M. (1981) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 58: 255.

- Latsague, M., Acevedo, H., Fernández, J., Romero, M., Cristi, R. y Alberdi, M. (1992) *Phytochemistry*, 31: 3419.
- Lent, B. y Kim, K.H. (1980) *J. Biol. Chem.*, 227: 1897.
- Lessire, R., Juguelin, H., Moreau, P. y Cassagne, C. (1985a) *Arch. Biochem. Biophys.*, 239: 260.
- Lessire, R., Bessoule, J.J. y Cassagne, C. (1987) en "The Metabolism, Structure & Function of Plant Lipids" (ed. Stumpf, P.K., Mudd, W.D. y Ness, W.D.), pp. 525, Plenum Press, New York.
- Lessire, R., Juguelin, H., Moreau, P. y Cassagne, C. (1985b) *Phytochemistry*, 24: 1187.
- Li, M., Smith, L.J., Clark, D.C., Wilson, R. y Murphy, D.J. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267: 8245.
- Lin, E.C.C. (1977) *Annu. Rev. Biochem.*, 46: 765.
- Lombardi, F.J. y Fulco, A.J. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, 618: 359.
- López, M.F., Patton, W.F., Utterbach, B.L., Chung-Welch, N., Berry, P., Skea, W.M. y Cambria, R.P. (1991) *Anal. Biochem.*, 199: 35.
- Luddy, F.E., Barford, A., Herb, S., Magidman, P. y Riemenschneider, R.W. (1964) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 41: 693.
- Lynch, D.V. y Thompson, Jr. G.A. (1984) *Plant Physiol.*, 74: 198.
- Mancha, M. (1974) *Grasas y Aceites*, 25: 159.

- Mancha, M. (1975) *Grasas y Aceites*, 26: 347.
- Marr, A.G. e Ingraham, J.L. (1962) *J. Bacteriol.*, 84: 1260.
- Martin, C.E., Siegel, D. y Aaronson, L.R. (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, 665: 399.
- Martin, B.A. y Wilson, R.F. (1984) *Lipids*, 19: 117.
- Martin, B.A. y Rinne, R.W. (1986) *Plant Physiol.*, 81: 41.
- Marzouk, B., Zarrouk, M., Cherif, A. y Mazliak, P. (1987) en "The Metabolism, Structure & Function of Plant Lipids" (ed. Stumpf, P.K., Mudd, J.B. y Nes, W.D.), pp. 317, Plenum Press, New York.
- McKeon, T.A. y Stumpf, P.K. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257: 12141.
- McKillican, M.E. y Sims, R.P.A. (1963) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 40: 108.
- McNamara, D.J. (1992) *Advances in Food and Nutrition*, 36: 253.
- Miller, J.F., Zimmerman, D.C. y Vick, B.A. (1987) *Crop Science*, 27: 923.
- Mollenhauer, H.H. y Totten, C. (1971) *J. Cell Biol.*, 48: 395.
- Moore, T.M. (1982) *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 33: 235.
- Moore, T.S., Lord, J.M., Kagawa, T. y Beevers, H. (1973) *Plant Physiol.*, 52: 50.
- Moreau, R.A. y Stumpf, P.K. (1981) *Plant Physiol.*, 67: 672.

- Morris, L.J. (1966) *Journal of Lipid Research*, 7: 717.
- Morrisey, J. H. (1981) *Anal. Biochem.*, 117: 307.
- Moss, J. y Lane, M.D. (1971) *Adv. Enzymol.*, 35: 321.
- Mudd, J.B., McManus, T.T., Ongun, A. y McCulloch, T.E. (1971) *Plant Physiol.*, 48: 335.
- Mudd, J.B. (1980) en "The Biochemistry of Plants", 4 (ed. Stumpf, P.K. y Conn, E.E.), pp. 250, Academic Press, New York.
- Murata, N., Sato, N., Takahashi, N. y Hamazaki, Y. (1982) *Plant Cell Physiol.*, 23: 1071.
- Murata, N. (1983) *Plant Cell Physiol.*, 24: 81.
- Murata, N., Ishizaki-Nishizawa, O., Higashi, S., Hayashi, H., Tasaka, Y. y Nishida, I. (1992) *Nature*, 356: 710.
- Murphy, D.J. y Stumpf, P.K. (1979) *Plant Physiol.*, 63: 328.
- Murphy, D.J. y Stumpf, P.K. (1980) *Plant Physiol.*, 66: 660.
- Murphy, D.J., Mukherjee, K.D. y Woodrow, I.E. (1984a) *Eur. J. Biochem.*, 159: 373.
- Murphy, D.J., Mukherjee, K.D. y Latzko, E. (1984b) *Planta*, 161: 249-254.
- Murphy, D.J., Woodrow, I.E. y Mukherjee, K.D. (1985) *Biochem. J.*, 225: 267.
- Murphy, D.J. , Cummins, I. y Kang, A.S. (1989) *J. Sci. Food Agric.*, 48: 209.

- Murphy, D.J., Keen, J.N., O'Sullivan, J.N., Au, D.M.Y.,
Edwards, E.-W., Jackson, P.J., Cummins, I., Gibbons, T.,
Shaw, C.H. y Ryan, A.J. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*,
1088: 86.
- Müller-Mulot, W. (1976) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 53: 732.
- Nagao, A. y Yamazaki, M. (1983) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60:
1554.
- Ng, H., Ingraham, J.L. y Marr, A.G. (1962) *J. Bacteriol.*,
84: 331.
- Nichols, B.W., James, A.T. y Brenner, J. (1967) *Biochem. J.*,
104: 486.
- Nikolau, B.J. y Hawke, J.C. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.*,
228: 86.
- Niwaka, J., Tanabe, T., Ogiwara, H., Shiba, T. y Numa, S.
(1979) *FEBS Lett.*, 102: 223.
- Nozawa, Y. y Kasai, R. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, 617:
161.
- O'Farrell, P.H. (1975) *J. Biol.Chem.*, 250: 4007.
- Ohlrogge, J.B., Shine, W.E. y Stumpf, P.K. (1978) *Arch.
Biochem. Biophys.*, 189: 382.
- Ohlrogge, J.B., Browse, J. y Sommerville, C.R. (1991)
Biochim. Biophys. Acta, 1082: 1.
- Ohnishi, J. y Yamada, M. (1983) *Plant & Cell Physiol.*, 24:
1553.
- Overath, P. y Stumpf, P.K. (1964) *J. Biol. Chem.*, 239: 4103.

- Padley, F.B., Gunstone, F.D. y Harwood, J.L. (1986) en "The Lipid Handbook" (ed. Gunstone, F.D., Padley, F.B. y Harwood, J.L.) pp. 49, New York.
- Paoletti, C., Bocci, F., Lercker, G., Capella, P. y Materassi, R. (1987) *Phytochemistry*, 26: 1045.
- Patton, J.S. (1975) *Comp. Biochem. Physiol.*, 52: 105.
- Pham Thi, A., Borrel-Flood, C., Vieira da Silva, J., Justin, A.M. y Mazliak, P. (1985) *Phytochemistry*, 24: 723.
- Pham Thi, A., Borrel-Flood, C., Vieira da Silva, J., Justin, A.M. y Mazliak, P. (1987) *Physiol. Plantarum*, 69: 147.
- Pond, J.L. y Langworthy, T.A. (1987) *J. Bacteriol.*, 84: 1260.
- Porra, R.J. (1979) *Phytochemistry*, 18: 1651.
- Pollard, M.R. y Stumpf, P.K. (1980a) *Plant Physiol.*, 66: 641.
- Pollard, M.R. y Stumpf, P.K. (1980b) *Plant Physiol.*, 66: 649.
- Pollard, M.R., Anderson, L., Fan, C., Hawkins, D.J., Evans, H.M. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.*, 284: 306.
- Post-Beittenmiller, D., Roughan, G. y Ohlrogge, J.B. (1992) *Plant Physiol.*, 100: 923.
- Price-Jones, M.J. y Harwood, J.L. (1983) *Biochem. J.*, 216: 627.
- Purdy, R.H. (1986) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 63: 1062.
- Producción Mundial de Aceites y Grasas (1992) *Dossier Oleo*, 32: 32.

- Qu, R., Wang, S., Lin, Y., Vance, V.B. y Huang, A.H.C. (1986) Biochem. J., 235: 57.
- Qu, R. y Huang, A.H. (1990) J. Biol. Chem., 265: 2238.
- Quinn, P.J. (1981) Prog. Biophys. Mol. Biol., 38: 1.
- Reddy, A.S., Nuccio, M.L., Gross, L.M., y Thomas, T.L. (1993) Plant Molecular Biology, 22: 293.
- Roberston, J.A., Thomas, J.K. y Burdick, D. (1971) Journal of Food Science, 36: 873.
- Roberston, J.A., Chapman, Jr. G.W. y Wilson, Jr. R.L. (1978) J. Am. Oil Chem. Soc., 55: 266.
- Roberston, J.A. y Green, Jr.V.E. (1981) J. Am. Oil Chem. Soc., 58: 698.
- Roughan, P.G. (1970) Biochem. J., 117:1.
- Roughan, P.G. y Slack, C.R. (1977) Biochem. J., 162: 457.
- Roughan, P.G., Mudd, J.B., McManus, T.T. y Slack, C.R. (1979) Biochem. J., 18: 571.
- Roughan, P.G. y Slack, C.R. (1982) Annu. Rev. Plant Physiol., 33: 97.
- Sanchez, J, Jordan, B.R., Kay, J. y Harwood, J.L. (1982) Biochem. J., 204: 463.
- Sanchez, J. y Stumpf, P.K. (1984) Arch. Biochem. Biophys., 228: 185.
- Sanders, T.H. (1982) J. Am. Oil Chem. Soc., 59: 349.

- Sato, N. y Murata, N. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, 619: 353.
- Sato, N. y Murata, N. (1981) *Plant Cell Physiol.*, 22: 1043.
- Seiler, G.J. (1983) *Crop Science*, 23: 1063.
- Semelczi-Kovacs, A. (1975) *Acta Ethnogr. Acad. Sci. Hung.*, 24: 47.
- Shanklin, J. y Sommerville, C. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 2510.
- Shikimata, T. y Stumpf, P.K. (1982a) *Plant Physiol.*, 69: 1257.
- Shikimata, T. y Stumpf, P.K. (1982b) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 5808.
- Shikimata, T. y Stumpf, P.K. (1983a) *J. Biol. Chem.*, 258: 3592.
- Shikimata, T. y Stumpf, P.K. (1983b) *Arch. Biochem. Biophys.*, 220: 39.
- Shine, W.E., Mancha, M. y Stumpf, P.K. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.*, 172: 110.
- Sinensky, M. (1971) *J. Bacteriol.*, 106: 449.
- Sinensky, M. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71: 522.
- Slabas, A.R. y Heyller, A. (1985) *Plant Science*, 39: 177.
- Slabas, A.R. y Fawcett, T. (1992) *Plant Mol. Biol.*, 19: 169.

- Slack, C.R., Roughan, P.G. y Holland, R. (1976) *Biochem. J.*, 158: 593.
- Slack, C.R. y Roughan, P.G. (1978) *Biochem. J.*, 170: 437.
- Slack, C.R., Roughan, P.G. y Balasingham, N. (1978) *Biochem. J.*, 170: 421.
- Slack, C.R., Bertrands, W.S., Shaw, B.P., Holland, R., Browse, J. y Wright, H. (1980) *Biochem. J.*, 190: 551.
- Slack, C.R. y Browse, J.A. (1984) en "Seed Physiology", 1 (ed. Murray, D.R.), pp. 209, Academic Press, Australia.
- Slack, C.R., Roughan, P.G., Browse, J.A. y Gardiner, S.E. (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, 833: 438.
- Slocombe. S.P., Cummins, I., Jarvis, R.P. y Murphy, D.J. (1992) *Plant Molecular Biology*, 20: 151.
- Smith, M.A., Cross, A.R., Jones, O.T.G., Griffiths, T., Stymne, S. y Stobart, A.K. (1990) *Biochem. J.*, 272: 23.
- Smith, S. y Libertini, C.J. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.*, 196: 92.
- Smichdt, M.A. y Heinz, E. (1990) *Plant Physiol.*, 94: 214.
- Smichdt, M.A. y Heinz, E. (1993) *Biochem. J.*, 289: 777.
- Soldatov, K.I. (1976) en "Proc. 7th International Sunflower Conference", Krasnodar, 1, pp. 352, International Sunflower Association, Vlaardingen, Holanda.
- Sommerville, C. y Browse, J. (1991) *Science*, 252: 80.

- Sonntag, N.O.V. (1979) en "Bayley's Industrial Oil and Fatas Products" (ed. Swern, D.) 1, pp. 289, New York.
- Sperling, P., Hammer, U., Friedt, W. y Heinz, E. (1990) Z. Naturforsch, 45c: 166.
- Stobart, A.K., Stymne, S. y Glad, G. (1983) Biochim. Biophys. Acta, 754: 292.
- Stobart, P.K. y Stymne, S. (1985a) Planta, 163: 119.
- Stobart, P.K. y Stymne, S. (1985b) Biochem. J., 232: 217.
- Stumpf, P.K. (1986) en "Proc. of the World Conference on Emerging Technologies in the Fats and Oils Industry", Am. Oil Chem. Soc., pp 312.
- Stumpf, P.K. (1989) en "Oil Crops of the World" (ed. Röbbelen, G., Downey, R.K. y Ashri, A.), pp. 38, McGraw-Hill, New York.
- Sturton, R.G. y Brindley, D.N. (1980) Biochim. Biophys. Acta, 619: 494.
- Stymne, S. y Applegqvist, L-A. (1978) Eur. J. Biochem., 90: 223.
- Stymne, S. (1980) en "The Biochemistry of Linoleic and Linolenic Acids in Plants", Ph.D. Thesis, Swedish University of Agriculture, Uppsala, Suecia.
- Stymne, S. y Glad, D. (1981) Lipids, 16: 298.
- Stymne, S., Stobart, A.K. y Glad, G. (1983) Biochim. Biophys. Acta, 752: 198.
- Stymne, S. y Stobart, A.K. (1984a) Biochem. J., 220: 481.

- Stymne, S. y Stobart, A.K. (1984b) *Biochem. J.*, 223: 305.
- Stymne, S. y Stobart, A.K. (1985a) *Planta*, 164: 101.
- Stymne, S. y Stobart, A.K. (1985b) *Biochim. Biophys. Acta*, 837: 239.
- Stymne, S. y Stobart, A.K. (1986a) *Biochem. J.*, 240: 385.
- Stymne, S. y Stobart, P.K. (1986b) *Physiol. Vég.* 24: 45.
- Stymne, S. y Stobart, A.K. (1987) en "The Biochemistry of Plants" (ed. Stumpf, P.K. y Conn, E.E.), 9, pp. 175, Academic Press, New York.
- Sumper, M. y Riepertinger, C. (1972) *Eur. J. Biochem.*, 29: 223.
- Tamai, Y. Y Lands, W.E.M. (1974) *J. Biochem.*, 76: 847.
- Tchang, F., Robert, D. y Mazliak, P. (1981) *Physiol. Vég.*, 19: 9.
- Tchang, F., Connan, A., Robert, D. y Trémolières, A. (1985) *Physiol. Vég.*, 23: 361.
- Thomas, D.R., Jalil, M.N.H., Ariffin, A., Cooke, R.J., McLaren, I., Young, B.C.S. y Wood, C. (1983) *Planta*, 158: 259.
- Thompson, C.A., Scherer, D.E., Foxwall-Van Aken, S., Kenny, J.W., Young, H.L., Shintani, D.K., Kridl, J.C. y Knauf, V.C. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 2578.
- Trémolières, A. y Mazliak, P. (1974) *Plant Sci. Lett.*, 2: 193.

- Trémolières, H., Trémolières, A. y Mazliak, P. (1978) *Phytochemistry*, 17: 685.
- Trémolières, A., Dubacq, J.P. y Drapier, D. (1982) *Phytochemistry*, 21: 41.
- Umeki, S., Maruyama, H. y Nozawa, Y. (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, 752: 30.
- Van den Bosch, H., Van Golden, L.M.G. y Van Deenen, L.L.M. (1972) *Ergeb. Physiol. Biol. Exp. Pharmacol.*, 66: 13.
- Vance, V.B. y Huang, A.H. (1987) *J. Biol. Chem.*, 262: 11275.
- Vick, B. y Beevers, H. (1977) *Plant Physiol.*, 59: 459.
- Vijay, I.K. y Stumpf, P.K. (1971) *J. Biol. Chem.*, 246: 2910.
- Vijay, I.K. y Stumpf, P.K. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247: 360.
- Volpe, J.J. y Vagelos, P.R. (1976) *Physiol. Rev.*, 56: 339.
- Vrânceanu, A.V. (1977) en "El Girasol", pp. 13, Mundi-Prensa, Madrid.
- Wada, H. y Murata, N. (1989) *Plant Cell Physiol.*, 30: 971.
- Wada, H. y Murata, N. (1990) *Plant Physiol.*, 92: 1062.
- Wada, H., Gombos, Z. y Murata, N. (1990) *Nature*, 347: 200.
- Wada, H., Gombos, Z., Sakamoto, T. y Murata, N. (1992) *Plant Cell Physiol.*, 33: 535.
- Wallevik, K. y Jensenius, J.C. (1982) *Journal of Biochem. & Biophys. Methods*, 6: 17.

- Wakil, S.J., Stoops, J.K. y Joshi, V.C. (1983) *Annu. Rev. Biochem.*, 52: 537.
- Waner, K., Frankel, E.N. y Mounts, T.L. (1989) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 66: 558.
- Wanner, G. y Theimer, R.R. (1978) *Planta*, 140: 163.
- Wanner, G., Formanek, H. y Theimer, R.R. (1981) *Planta*, 151: 109.
- Wharfe, J. y Harwood, J.L. (1978) *Biochem. J.*, 174: 163.
- Wharfe, J. y Harwood, J.L. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, 575: 102.
- White, P.J. (1992) en "Fatty Acids in Food and their Health Implications" (ed. Chow, C.K.), pp. 237, Marcel-Dekker, New York.
- Williams, J.P., Khan, M.U., Mitchell, K. y Johnsson, G. (1988) *Plant Physiol.*, 87: 904.
- Williams, J.P., Williams, K. y Khan, M.U. (1992a) *Biochim. Biophys. Acta*, 1125: 62.
- Williams, J.P., Khan, M.U. y Wong, D. (1992b) *Biochim. Biophys. Acta*, 1128: 275.
- Wolff, I.A. (1966) *Science*, 154: 1140.
- Yamada, M. (1992) *Plant Cell Physiol.*, 33: 1.
- Yatsu, L.Y. y Jacks, T.J. (1972) *Plant Physiol.*, 49: 937.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal Integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar el Tesis Doctoral de Dña. Cristina Mercedes Sarmiento Gas titulada Regulación de la actividad oleata desaturada en el girasol

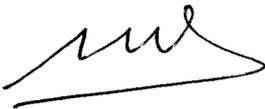
acordó otorgarle la calificación de apto con laude

Sevilla, 26 de Noviembre 19 93

El Vocal,



El Presidente



El Vocal,



El Secretario,



El Vocal,



El Doctorado,





500599939

FBI E TD-304

599939