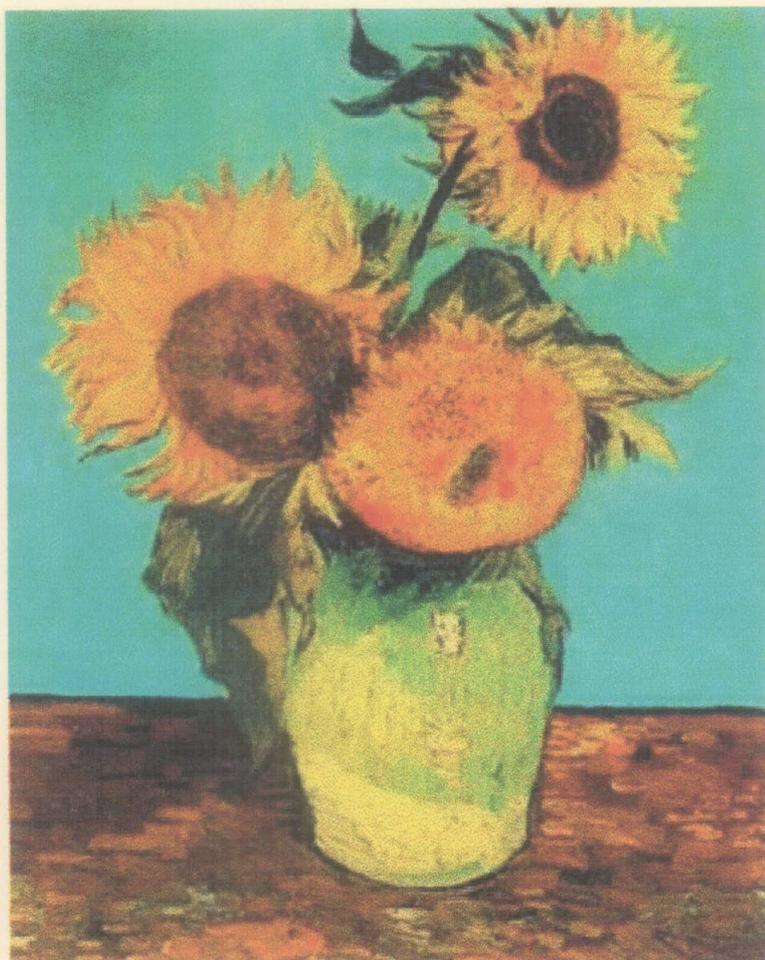


TESIS DOCTORAL

CARACTERIZACIÓN DE UN MUTANTE DE GIRASOL (*Helianthus annuus* L.) CON ALTO CONTENIDO DE ÁCIDO ESTEÁRICO EN SU ACEITE



Sara Cantisán Bohórquez

Sevilla, 1998

TD

207

TD-421



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral CARACTERIZACIÓN DE UN MUTANTE DE GIRASOL (HELICANTHUS ANNUUS L.) CON ALTO CONTENIDO DE ACIDO ESTERÓICO EN SU ACEITE sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

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

Firmado:

Sevilla, a 11 de JUNIO de 1999



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Biología

Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular

TESIS DOCTORAL

Caracterización de un mutante de girasol (*Helianthus annuus* L.) con alto contenido de ácido esteárico en su aceite

DIRECTOR:

Rafael Garcés Mancheño

TUTOR:

Fco. Javier Florencio Bellido

DOCTORANDO:

Sara Cantisán Bohórquez

Trabajo presentado por la licenciada Sara Cantisán Bohórquez
para optar al grado de Doctor en Biología



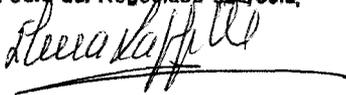
Fdo. Sara Cantisán Bohórquez

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 14 número 333 del libro
correspondiente.

Sevilla, 18 NOV. 1998

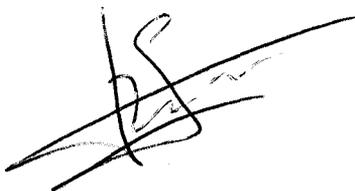
El Jefe del Negociado de Tesis,



Director:

Dr. Rafael Garcés Mancheño

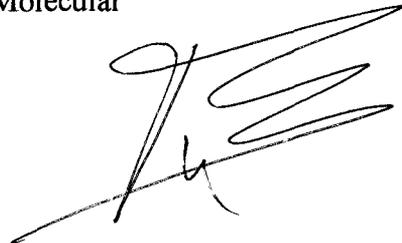
Colaborador Científico del
Instituto de la Grasa (CSIC)
Sevilla



Fdo. Rafael Garcés Mancheño

Tutor:

Dr. Fco. Javier Florencio Bellido
Profesor Titular del Dpto.
Bioquímica Vegetal y Biología
Molecular



Fdo. Fco. Javier Florencio Bellido

a mi familia

Deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes personas y organismos que de una forma u otra han hecho posible la realización de esta tesis:

Al doctor **Rafael Garcés** por la dirección de este trabajo, por su ayuda y orientación.

Al doctor **Fco. Javier Florencio** por acceder a la tutoría de esta tesis.

Al **Ministerio de Educación y Cultura** por la concesión de una beca del Plan Nacional de formación de Personal Investigador, así como a la empresa **Advanta** por el aporte económico durante el último año de la tesis.

Al doctor **Enrique Martínez** por su inestimable ayuda en el laboratorio y su imprescindible “mano” con los ordenadores, además de por sus consejos, buen humor y paciencia.

Al doctor **Manuel Mancha** por responder con amabilidad y prontitud a mis múltiples dudas.

A **M^a Carmen Ruíz** por su amabilidad y colaboración en todo momento.

A **Alberto Domínguez** por cuidar de mis girasoles con dedicación y eficacia.

A la **segunda planta del Instituto de la Grasa** por los ratitos tan buenos que me han hecho pasar, muy especialmente a mis compañeras **Rosario Álvarez, Tere García, Valle Fernández** y **Pepa Serrano** por su amistad, su apoyo en momentos que lo necesitaba, su ayuda y complicidad.

A **M^a Carmen Peláez** por los famosos güateques de Navidad.

A **Raquel Olías** y a la pequeña **Sofía** por su cariño y amistad.

Y en general a todo el **Instituto de la Grasa** por la amabilidad con la que me han tratado siempre.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
I. EL GIRASOL. ORIGEN Y DESARROLLO DEL CULTIVO.....	1
1. Origen e historia	1
2. Importancia económica y desarrollo del cultivo.....	1
2.1. Importancia económica.....	1
2.2. Desarrollo del cultivo del girasol.....	2
3. Mejora del cultivo de girasol.....	4
II. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y FISIOLÓGICAS.....	7
1. Morfología del girasol.....	7
2. Fisiología.....	9
2.1. Crecimiento y desarrollo.....	9
2.2. Reproducción.....	10
III. BIOQUÍMICA DE LÍPIDOS. CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA.....	13
1. Ácidos grasos.....	13
2. Principales glicerolípidos.....	16
2.1. Acilgliceroles ó glicéridos.....	16
2.2. Fosfolípidos.....	17
2.3. Glicosilglicéridos.....	18
3. Funciones de los lípidos.....	19
IV. BIOQUÍMICA DE LÍPIDOS. BIOSÍNTESIS.....	21
1. Síntesis <i>de novo</i> de los ácidos grasos.....	21
1.1. Síntesis intraplasmática de los ácidos grasos.....	21
1.1.1. Acetil-CoA carboxilasa.....	21
1.1.2. Complejo ácido graso sintetasa.....	25
a) Proteína transportadora de acilos.....	25
b) Reacciones de condensación de la FAS.....	26
1.1.3. Biosíntesis de ácido oleico.....	28
a) Propiedades de la estearil-ACP desaturasa.....	29
b) Especificidad de sustrato.....	30
c) Regulación temporal y específica de semilla de la expresión génica de la estearil-ACP desaturasa.....	31
d) Influencia de la temperatura sobre la estearil-ACP desaturasa.....	32
1.1.4. Terminación de la síntesis de los ácidos grasos. Acil-ACP tioesterasas.....	33



1.1.5. Transferencia de los ácidos grasos al citoplasma. Acil-CoA sintetetasas.....	36
1.2. Modificaciones extraplastidiales de los ácidos grasos.....	36
1.2.1.Desaturaciones.....	36
a) Biosíntesis de ácido linoleico.....	36
b) Biosíntesis de ácido linolénico.....	39
1.2.2.Elongación de los ácidos grasos. Biosíntesis de ácidos grasos muy largos.....	40
1.2.3.Otras modificaciones extraplastidiales.....	42
a) Hidroxilaciones.....	42
b) Epoxidaciones.....	42
2. Biosíntesis de glicerolípidos.....	42
2.1. Biosíntesis de triacilglicéridos por la ruta del glicerol-3 fosfato.....	43
2.1.1. Participación de la PC en la síntesis de TAG. Interconversión de DAG y PC.....	46
2.2. Biosíntesis de los glicerofosfolípidos.....	48
2.3. Biosíntesis de los galactolípidos.....	51
V. BIOSÍNTESIS DE LOS LÍPIDOS DE RESERVA DURANTE EL DESARROLLO DE LA SEMILLA.....	55
1. Síntesis activa de lípidos de reserva.....	55
2. Almacenamiento de lípidos de reserva en el interior de los oleosomas.....	56
2.1. Biogénesis de los oleosomas.....	57
3. Modificación de la composición de los lípidos durante la formación de la semilla.....	59
4. Efecto de la temperatura de cultivo sobre la composición de ácidos grasos de los lípidos de la semilla.....	59
VI. UTILIZACIÓN DE LA RESERVA LIPÍDICA DURANTE LA GERMINACIÓN DE LA SEMILLA. DEGRADACIÓN DE LOS OLEOSOMAS.....	61
1. Disminución de la reserva lipídica y síntesis de nuevos lípidos durante la germinación.....	61
2. Degradación de los oleosomas durante la germinación.....	62
2.1. Hidrólisis de los TAG de reserva.....	62
VII. MODIFICACIÓN DE LOS LÍPIDOS DE PLANTAS.....	65
1. Disponibilidad de aceites y grasas.....	65
1.2. Hidrogenación.....	66
1.3. Ácidos grasos <i>trans</i>	67
1.4. Algunas alternativas para evitar el consumo de los ácidos grasos <i>trans</i>	68
2. Modificación de la composición de ácidos grasos de los lípidos de la semilla por mutagénesis.....	69
2.1. Mutantes de girasol con alto contenido de ácidos grasos saturados en los lípidos de la semilla..	71
2.2. Obtención del mutante de girasol CAS-3 con alto contenido de ácido esteárico en el aceite de la semilla.....	72

2.3. Control genético del mutante de girasol CAS-3.....	73
3. Modificación de la composición de ácidos grasos de los lípidos de la semilla por ingeniería genética.....	75

MATERIALES Y MÉTODO

I. MATERIALES.....	79
1. Material	79
1.1. Tejidos biológicos analizados.....	79
2. Condiciones de cultivo.....	80

II. METODOLOGÍA GENERAL PARA ANALÍTICA DE LÍPIDOS.....	80
1. Extracción de lípidos totales.....	80
2. Técnica de separación de los diferentes tipos de lípidos. Cromatografía en capa fina.....	81
2.1. Placas de TLC utilizadas.....	81
2.2. Visualización e identificación de las bandas.....	82
3. Separación por TLC de los diferentes tipos de lípidos.....	83
3.1. Separación por TLC de los lípidos neutros.....	83
3.2. Separación de los lípidos polares.....	83
4. Análisis de los ácidos grasos.....	84
4.1. Formación de ésteres metílicos de los ácidos grasos.....	84
4.2. Separación y cuantificación de los ésteres metílicos.....	84
5. Determinación del contenido lipídico ó riqueza de grasa de una semilla.....	85
6. Análisis posicional de los ácidos grasos en los triacilglicéridos.....	85

III. METODOLOGÍA PARA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	87
1. Material biológico.....	87
2. Síntesis de sustratos radiactivos.....	87
2.1. Preparación de la sal sódica de los ácidos grasos.....	87
2.2. Síntesis de acil-ACP.....	87
2.3. Cuantificación de la radiactividad de los acil-ACP sintetizados.....	88
2.4. Determinación de la concentración de sustrato radiactivo de una muestra.....	88
3. Determinación de la actividad acil-ACP tioesterasa.....	88
3.1. Preparación del extracto crudo.....	88
3.2. Ensayo enzimático de la actividad acil-ACP tioesterasa.....	89
3.3. Cuantificación de los productos de la reacción.....	89
4. Determinación de la actividad de la enzima estearil-ACP desaturasa.....	89
4.1. Preparación del extracto crudo.....	89

4.2 Síntesis del [¹⁴ C]-estearil-ACP. Ensayo enzimático de la β-cetoacil-ACP sintetasa II.....	90
4.3. Ensayo enzimático de la estearil-ACP desaturasa.....	90
4.4. Separación de los productos de ambas reacciones enzimáticas.....	91
4.5. Detección e identificación de las bandas radiactivas.....	91
4.6. Cuantificación de los productos de la reacción.....	91

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS LÍPIDOS DE SEMILLA MADURA DE

GIRASOL	93
1. Análisis de la composición de ácidos grasos de lípidos totales, neutros y polares de la semilla.....	93
2. Análisis de la composición de ácidos grasos de los principales tipos de lípidos polares de la semilla	96
3. Análisis posicional de los ácidos grasos en los TAG.....	97

II. ANÁLISIS DE LOS LÍPIDOS DE LOS TEJIDOS VEGETATIVOS..... 101

1. Caracterización de los lípidos del cotiledón.....	101
1.1. Degradación de la reserva de lípidos durante la germinación.....	101
1.2. Cambios en la composición de ácidos grasos de los lípidos totales del cotiledón durante la germinación.....	102
1.2.1. Variación en el contenido de ácido palmítico.....	102
1.2.2. Variación en el contenido de ácido esteárico.....	103
1.2.3. Variación en los niveles de los ácidos oleico y linoleico.....	104
1.2.4. Variación en el contenido de ácido linolénico.....	105
2. Caracterización de los lípidos del hipocotilo.....	107
2.1. Variaciones en la composición de ácidos grasos de los lípidos totales durante la germinación y desarrollo de la plántula.....	107
3. Caracterización de los lípidos de la raíz.....	109
3.1. Variaciones en la composición de ácidos grasos de los lípidos totales durante la germinación y el desarrollo de la plántula.....	109
4. Caracterización de los lípidos de la hoja.....	111
4.1. Variación de la composición de ácidos grasos de los lípidos totales durante su desarrollo.....	111
4.2. Composición de ácidos grasos de los lípidos polares de hoja madura.....	112
4.2.1 Composición de ácidos grasos de los principales glicerofosfolípidos de la hoja.....	113
4.2.2. Composición de ácidos grasos de los galactolípidos de la hoja.....	114
5. Caracterización de los lípidos de otros tejidos.....	115
5.1. Composición de ácidos grasos de los lípidos totales de flores, lígulas y granos de polen.....	116

III. ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS LÍPIDOS DE SEMILLA EN FORMACIÓN	119
1. Análisis de los TAG de semilla en formación.....	119
1.1. Composición de ácidos grasos de los TAG de la semilla de la línea control RHA-274.....	119
1.1.1. Variación en el contenido de ácidos grasos saturados (ácidos palmítico y esteárico).....	119
1.1.2. Variación en el contenido de ácidos grasos insaturados (ácidos oleico y linoleico).....	120
1.2. Composición de ácidos grasos de los TAG de la semilla de la línea mutante CAS-3.....	121
1.2.1. Variación en el contenido de ácidos grasos saturados (ácidos palmítico y esteárico).....	121
1.2.2. Variación en el contenido de ácidos grasos insaturados (ácidos oleico y linoleico).....	122
2. Análisis de los LP de semilla en formación.....	123
2.1. Composición de ácidos grasos de los LP de la semilla de la línea control RHA-274.....	123
2.1.1. Variación en el contenido de ácidos grasos saturados (ácidos palmítico y esteárico).....	123
2.1.2. Variación en el contenido de ácidos grasos insaturados.....	124
a) Ácidos oleico y linoleico.....	124
b) Ácido linolénico.....	125
2.2. Composición de ácidos grasos de los LP de la semilla de la línea mutante CAS-3.....	126
2.2.1. Variación en el contenido de ácidos grasos saturados (ácidos palmítico y esteárico).....	126
2.2.2. Variación en el contenido de ácidos grasos insaturados.....	127
a) Ácidos oleico y linoleico.....	127
b) Ácido linolénico.....	127
III. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE LOS LÍPIDOS DE LA SEMILLA DE GIRASOL EN FORMACIÓN.....	129
1. Efecto de la temperatura sobre la composición de ácidos grasos de los TAG.....	129
1.1. Efecto de la temperatura sobre los niveles de ácidos grasos insaturados de los TAG.....	129
1.2. Efecto de la temperatura sobre los niveles de ácidos grasos saturados de los TAG.....	132
2. Efecto de la temperatura sobre la composición de ácidos grasos de los lípidos polares.....	133
2.1. Fosfatidilinositol.....	133
2.2. Fosfatidilcolina.....	134
2.3. Fosfatidiletanolamina.....	135
IV. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE LA SEMILLA.....	137
1. Determinación de la actividad de la enzima acil-ACP tioesterasa.....	137
1.1. Parámetros cinéticos de la actividad acil-ACP tioesterasa en semillas de la línea RHA-274.....	137
1.2. Parámetros cinéticos de la actividad acil-ACP tioesterasa en semillas de la línea CAS-3.....	138
2. Determinación de la actividad de la enzima estearil-ACP desaturasa.....	139
2.1. Determinación de la actividad de la β -cetoacil-ACP sintetasa II.....	139
2.2. Determinación de la actividad de la estearil-ACP desaturasa.....	140

CONCLUSIONES.....	143
BIBLIOGRAFÍA.....	147

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Inflorescencia ó capítulo
- Figura 2.** Sección longitudinal de un aquenio
- Figura 3.** Flores en varios estadios de desarrollo
- Figura 4.** Estructura de los ácidos estéarico, oleico y eláidico
- Figura 5.** Acilgliceroles
- Figura 6.** Fórmula general de los glicerofosfolípidos
- Figura 7.** Galactolípidos
- Figura 8.** Esquema general de la síntesis de ácidos grasos en plantas
- Figura 9.** Modelo tridimensional de la estearil-ACP desaturasa
- Figura 10.** Ruta del glicerol-3-fosfato para la biosíntesis de triacilglicéridos
- Figura 11.** Biosíntesis de glicerofosfolípidos
- Figura 12.** Esquema simplificado de la síntesis de galactolípidos por las rutas pro- y eucariótica
- Figura 13.** Modelo propuesto para la ontogenia de los oleosomas en plantas
- Figura 14.** Modelo de síntesis y degradación de oleosomas en embriones de maíz
- Figura 15.** Esquema de la síntesis de ácidos grasos redirigida por la introducción de una 12:0-ACP tioesterasa
- Figura 16.** Esquema de la síntesis de ácidos grasos redirigida mediante la represión antisentido de la $\Delta 9$ desaturasa
- Figura 17.** Hidrólisis de los TAG con lipasa pancreática
- Figura 18.** Disminución del porcentaje de TAG por miligramo de cotiledón durante la germinación de la semilla.
- Figura 19.** Variación del porcentaje de ácido palmítico durante la germinación de la semilla de la línea control RHA-274 y del mutante CAS-3.
- Figura 20.** Variación del porcentaje de ácido esteárico durante la germinación de la semilla de la línea control RHA-274 y del mutante CAS-3.
- Figura 21.** Variación de los porcentajes de los ácidos oleico y linoleico durante la germinación de la semilla del control RHA-274 y del mutante CAS-3.
- Figura 22.** Variaciones del porcentaje de ácido linolénico durante la germinación de la semilla de la línea control RHA-274 y del mutante CAS-3.
- Figura 23.** Variación de la composición de los ácidos grasos mayoritarios de lípidos totales de semilla de girasol en formación de la línea control RHA-274.
- Figura 24.** Variación de la composición de los ácidos grasos mayoritarios de lípidos totales de semilla de girasol en formación de la línea mutante CAS-3.
- Figura 25.** Variación de la composición de los ácidos grasos mayoritarios de los lípidos polares de semilla de girasol en formación de la línea control RHA-274.
- Figura 26.** Variación de la composición de los ácidos grasos mayoritarios de lípidos polares de semilla de girasol en formación de la línea mutante alto esteárico CAS-3.

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Superficie cultivada, rendimiento, producción de semillas y producción de aceite de girasol en el mundo y en España desde 1965 hasta 1997.
- Tabla 2.** Producción de aceite (miles de Tm) de los principales cultivos oleaginosos en el mundo y en Europa en 1997.
- Tabla 3.** Producción de aceite de girasol (miles de Tm) de los principales países productores.
- Tabla 4.** Principales ácidos grasos que aparecen en la naturaleza, tanto en animales, plantas superiores, algas o bacterias.
- Tabla 5.** Composición de ácidos grasos de algunos aceites y grasas comestibles.
- Tabla 6.** Mutantes de girasol con alto contenido en ácidos grasos saturados.
- Tabla 7.** Proceso de selección y fijación del mutante de girasol CAS-3 con alto contenido en ácido esteárico.
- Tabla 8.** Contenido medio de ácido esteárico de HA-89, RDF-1-532 y CAS-3, así como el rango de variación.
- Tabla 9.** Composición de ácidos grasos de los LT, TAG, DAG y LP de semillas de la línea control RHA-274 y de la línea alto esteárico CAS-3.
- Tabla 10.** Composición de ácidos grasos de los principales LP de semilla de girasol, incluyendo glicerofosfolípidos y galactolípidos, de la línea mutante CAS-3 y del control RHA-274.
- Tabla 11.** Distribución de ácidos grasos en los TAG de semilla madura de la línea control RHA-274 y del mutante CAS-3 tras la hidrólisis con lipasa pancreática.
- Tabla 12.** Variación de la composición de ácidos grasos de los LT del hipocotilo de la línea RHA-274 y de CAS-3 durante su desarrollo.
- Tabla 13.** Variación de la composición de ácidos grasos de LT de la raíz de la línea RHA-274 y de CAS-3 durante su desarrollo.
- Tabla 14.** Composición de ácidos grasos de LT de la hoja de la línea RHA-274 y de CAS-3 durante su desarrollo.
- Tabla 15.** Composición de ácidos grasos de los principales glicerofosfolípidos de hoja madura del mutante CAS-3 y de la línea control RHA-274.
- Tabla 16.** Composición de ácidos grasos de los galactolípidos de hoja madura de la línea control RHA-274 y del mutante CAS-3.
- Tabla 17.** Composición de ácidos grasos de los LT de las flores, lígulas y polen de la línea control RHA-274 y del mutante CAS-3.
- Tabla 18.** Efecto de la temperatura de cultivo sobre la composición de AG mayoritarios de TAG de semillas en formación de la línea mutante CAS-3 y del control RHA-274. Las temperaturas de cultivo fueron 30/20°C y 20/10°C (día/noche).
- Tabla 19.** Efecto de la temperatura de cultivo sobre la composición de AG mayoritarios del PI de la semilla, en la línea control RHA-274 y en el mutante CAS-3.
- Tabla 20.** Efecto de la temperatura sobre la composición de AG mayoritarios de la PC de la semilla, en la línea control RHA-274 y en el mutante CAS-3.

Tabla 21. Efecto de la temperatura sobre la composición de AG mayoritarios de la PE de la semilla, en la línea control RHA-274 y en CAS-3.

Tabla 22. Especificidad de sustrato de la acil-ACP tioesterasa.

Tabla 23. Actividad de la KAS II en semillas de girasol de 15 DDF de la línea control RHA-274 y del mutante alto esteárico CAS-3.

Tabla 24. Actividad EDS en semillas de girasol de 15 DDF en la línea control RHA-274 y en el mutante alto esteárico CAS-3.

ABREVIATURAS

8:0	Ácido caprílico
10:0	Ácido cáprico
12:0	Ácido laúrico
14:0	Ácido mirístico
16:0	Ácido palmítico
16:0-ACP	Palmitil-ACP
18:0	Ácido esteárico
18:0-ACP	Estearil-ACP
18:1	Ácido oleico
18:1-ACP	Oleil-ACP
18:1-CoA	Oleil-CoA
18:2	Ácido linoleico
18:2-PC	Linoleil fosfatidilcolina
18:3	Ácido linolénico
20:0	Ácido araquídico
22:0	Ácido behénico
22:1	Ácido erúcico
24:0	Ácido lignocérico
ACAT	Acetil CoA:ACP transacilasa
ACCasa	Acetil-CoA carboxilasa
ACP	Proteína transportadora de acilos
ADP	Adenosina difosfato
AG	Ácido graso
AGML	Ácidos grasos muy largos
Asp	Aspártico
ATP	Adenosina trifosfato
C	Carbono
CDP	Citidina difosfato
cms	Androesterilidad citoplásmica
CoA	Coenzima A
DAG	Diacilglicérido
DAGAT	Diacilglicerol aciltransferasa
DDF	Días después de la floración
DDS	Días después de la siembra
DE	Desviación estándar
DGDG	Digalactosildiglicérido
Dpm	desintegraciones por minuto

DTT	Ditiotreitol
EDS	Estearil-ACP desaturasa
EMS	Etilmetano sulfonato
FAS	Sintetasa de ácidos grasos
Fd	Ferredoxina
FF	Fosfatidato fosfatasa
GalP	Galactolípidos ó galactosilglicéridos
G-3-P	Glicerol-3-fosfato
GPAT	Glicerol-3-fosfato aciltransferasa
Glu	Glutámico
Ha	Hectáreas
HDL	Lipoproteína de alta densidad
KAS II	β -cetoacil-ACP sintetasa
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
LDL	Lipoproteína de baja densidad
Leu	Leucina
LN	Lípidos neutros
LP	Lípidos polares
LPAAT	Lisofosfatidil aciltransferasa
LT	Lípidos totales
MAG	Monoacilglicérido
MGDG	Monogalactosildiglicérido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducida
ODS	Oleil-PC desaturasa
OTE	Oleil-ACP tioesterasa
p	peso
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
PGP	Fosfatidilglicerol-3-fosfato
Phe	Fenilalanina
PI	Fosfatidilinositol
Pi	Fosfato inorgánico
PIPES	Ácido piperacín-1,4-bis(2-etanosulfónico)
Pro	Prolina
RE	Retículo endoplásmico
TAG	Triacilglicéridos
TE	Acil-ACP tioesterasa

INTRODUCCIÓN

I. EL GIRASOL. ORIGEN Y DESARROLLO DEL CULTIVO.

1. Origen e historia.

El girasol (*Helianthus annuus* L.) tiene su origen en Norteamérica, más concretamente en la parte oeste, incluyendo también el norte de México. Existen evidencias arqueológicas que apuntan a la utilización del girasol en el primer milenio a.C. e incluso hay alguna referencia que sugiere la utilización del girasol en el año 3.000 a.C.. Una gran cantidad de obras históricas y etnográficas atestiguan la utilización de semillas de girasol silvestre por los indios norteamericanos como alimento y condimento, explicando la importancia de dicha planta para la vida de las tribus primitivas. También se le dieron usos medicinales utilizándose para curar ciertas enfermedades o incluso para picaduras de serpientes, además de emplearlo en ceremonias primitivas y en bailes rituales en las que se pintaban la cara con un machacado de lígulas de girasol (Vrânceanu, 1977).

Posteriormente los colonizadores españoles a mediados del siglo XVI introdujeron el girasol en Europa, principalmente en España y de aquí pasaría a Italia, Francia, Alemania y Este de Europa, aunque durante aproximadamente 200 años se cultivó solamente como planta ornamental. En los primeros decenios del siglo XIX el girasol se aclimató en Rusia y en 1830 comenzó la producción de aceite de girasol a escala industrial produciéndose un aumento rápido de la superficie cultivada de girasol pasando de 158.000 ha en 1881 a 980.000 en 1963 (Vrânceanu, 1977).

2. Importancia económica y desarrollo del cultivo.

2.1. Importancia económica.

El aceite de girasol es un excelente aceite comestible que se caracteriza por su alto contenido en ácidos grasos insaturados (85-90%), fundamentalmente ácidos oleico y linoleico, y por la casi total ausencia de ácido linolénico. El aceite de girasol, desde el punto de vista calórico y del grado de asimilación por el organismo, se sitúa entre los mejores aceites vegetales, con la ventaja sobre otros aceites que al no tener ácido linolénico tiene una mayor estabilidad oxidativa. El alto valor nutritivo del aceite de girasol se debe además a la presencia de vitaminas liposolubles, esteroides (α -tocoferol, β -tocoferol y γ -tocoferol), lecitinas, etc....(Gunstone et al., 1994).

El aceite de girasol de mayor calidad se utiliza para alimentación, fundamentalmente para la fabricación de margarinas o como aceite de mesa y para cocinar, en cuyo caso es necesario eliminar las ceras. Los de menor calidad se emplean en la industria para la fabricación de detergentes, pinturas y barnices, resinas, etc...

El girasol constituye también una importante fuente de proteínas para alimentación del ganado ya que una vez extraído el aceite se obtiene una torta rica en proteínas con una composición química similar a otras harinas (Vrânceanu, 1977).

2.2. Desarrollo del cultivo del girasol.

El cultivo del girasol ha experimentado un importante desarrollo en los últimos 30 años, triplicándose prácticamente la superficie mundial dedicada a su cultivo desde 1965 hasta 1997, pasando de 7,5 a 19,6 millones de Ha. En nuestro país el aumento ha sido mayor ya que en el mismo periodo de tiempo se ha multiplicado por cien el área cultivada de girasol, pasando de 11.000 a 1 millón de Ha (tabla 1).

Tabla 1. Superficie cultivada, rendimiento, producción de semillas y producción de aceite de girasol en el mundo y en España desde 1965 hasta 1997 (Faostat, 1997).

Año		Superficie (miles Ha)	Rendimiento (Kg/Ha)	Producción (miles Tm)	Aceite (miles Tm)
1965	Mundial	7.539	1.059	7.985	3.024
	España	11	780	9	4
1975	Mundial	9.238	1.068	9.868	4.172
	España	792	525	416	166
1985	Mundial	14.847	1.270	18.859	6.595
	España	989	926	915	355
1995	Mundial	21.080	1.253	26.406	9.160
	España	1.112	529	588	450
1997	Mundial	19.628	1.250	24.537	9.135
	España	1.051	1.294	1.359	622

En cuanto al rendimiento mundial del cultivo se ha mantenido más o menos alrededor de 1.000-1.300 Kg/Ha, sin embargo el rendimiento del cultivo en España ha oscilado desde 1965

aumentando y disminuyendo, experimentando una importante subida desde 1995 (529 Kg/Ha) hasta 1997 (1.294 Kg/Ha). La producción mundial de semillas ha aumentado de forma importante desde 1965 a 1995 pasando de 8 a 26 millones de Tm. En España el mayor aumento en la producción de semillas se produjo entre 1965 y 1975 pasando de 9 a 416 miles de Tm, en 1995 sufrió un descenso importante aumentando posteriormente hasta superar el millón de Tm. En cuanto a la producción de aceite en el mundo se ha triplicado desde 1965 hasta 1997, pasando de 3 a 9 millones de Tm, mientras que en España el aumento ha sido mucho mayor pasando de 4.000 a 622.000 Tm en el mismo periodo de tiempo.

El aceite de girasol, en relación con otros cultivos oleaginosos, ocupa actualmente el cuarto lugar en el mundo (tabla 2), tras el aceite de soja, palma y colza, con una producción mundial de 8,7 millones de Tm durante 1997, mientras que en Europa ocupa el segundo lugar tras el aceite de colza. No existe producción de aceite de palma en el continente europeo, sino que la mayor producción corresponde a Asia, concretamente a Malasia, que produce más de 8 millones de Tm. Con respecto al aceite de soja, Norteamérica es el mayor productor siendo los EEUU el principal país productor con 7,1 millones de Tm.

Tabla 2. Producción de aceite (miles de Tm) de los principales cultivos oleaginosos en el mundo y en Europa en 1997 (Faostat, 1997).

Cultivo	Mundial	Europa
Soja	20.147	2.644
Palma	18.205	
Colza	10.321	3.564
Girasol	8.722	2.957
Algodón	3.864	96
Oliva	2.260	1.742
Maíz	1.817	215

En cuanto a los países productores de aceite de girasol (tabla 3) en 1975 era la URSS el país con mayor producción, con más de 2 millones de Tm, seguida por Argentina (209.000 Tm) y España (166.000 Tm). En 1985 la URSS continuaba siendo el principal país productor con más de 1,5 millones de Tm, le seguía Argentina, que había aumentado mucho su producción de aceite de girasol, hasta llegar a superar el millón de Tm. España ocupaba el cuarto lugar,

con 355.000 Tm, detrás de China. En 1997, después de la desaparición de la URSS, Argentina pasó a ser el primer país productor, con más de 2 millones de Tm, seguida de Rusia, con 750.000 Tm y en tercer lugar España con 622.000 Tm (Faostat, 1997).

Tabla 3. Producción de aceite de girasol (miles de Tm) de los principales países productores.

País	1975	1985	1997
Argentina	209	1.163	2.056
Rusia			750
España	166	355	622
Ucrania			594
Francia	27	183	575
India	79	101	490
China	24	574	425
U.S.A.	77	219	365
URSS	2.471	1.629	

3. Mejora del cultivo del girasol.

El objetivo que el cultivo del girasol ha perseguido desde sus inicios ha sido obtener nuevas variedades con una serie de características deseables tales como una mayor producción de semilla por capítulo, aumento del contenido de aceite, resistencia a parásitos como el jopo (*Orobanche cumana*), la roya (*Puccinia helianthi*) o el mildiu (*Plasmopara helianthi*), resistencia a la sequía, etc... Para conseguir estos objetivos a lo largo de los años se han estado utilizando varias estrategias o mecanismos:

La estrategia clásica que se utilizó fue la mejora del cultivo aprovechando la *gran variabilidad genética natural* del girasol, que es una de las razones que hacen del girasol un cultivo ampliamente adaptado y con un gran potencial. Fue posible mejorar ciertos caracteres agronómicos y morfológicos así como la resistencia a enfermedades o a pesticidas. La mejora del cultivo de girasol comenzó en Rusia a finales del siglo pasado y se basó en la selección de ciertas características como eran la no ramificación y el mayor tamaño de las semillas, apareciendo ya en esa época variedades con notables propiedades de productividad. Posteriormente la selección se basó en la resistencia al jopo, apareciendo variedades que de

forma natural mostraban resistencia a este parásito (Vrânceanu, 1977), de manera que investigaciones efectuadas por Pustovoit a principios del siglo XX dieron como resultado la creación de líneas muy resistentes al jopo. Otro paso importante en la mejora fue la creación de variedades con alto contenido en aceite, pasando de un 30% a principio del siglo XX (1912-26) a un 43% en 1940 y a un 45-50% a principio de los años 60. Estas variedades con un alto contenido en aceite se extendieron a Rumania, Bulgaria, Yugoslavia y en general a Europa del Este (Röbbelen et al., 1989).

Un ejemplo de mejora vegetal de gran importancia aprovechando la variabilidad natural fue la obtención de una variedad de colza (*Brassica napus*) libre de ácido erúxico, normalmente con un 40% de este ácido graso (Stefansson et al., 1961). El ácido erúxico tiene efectos perjudiciales para la salud ya que puede producir ciertas cardiopatías. Se observó que en la población existía una gran variabilidad para el contenido de ácido erúxico en semilla, variando entre 6 y 50%, por lo que se seleccionaron las semillas de menor contenido en este ácido graso.

Posteriormente se desarrolló la mejora mediante la *obtención de híbridos*, aprovechando el fenómeno de la heterosis, es decir, la propiedad de los híbridos de la primera generación obtenido a partir de dos líneas puras de sobrepasar en ciertos caracteres al mejor de los parentales. La mejora mediante la heterosis se comenzó en Rusia a principios del siglo XX aunque, debido a los problemas que surgieron en la producción, se abandonó el estudio siendo posteriormente reiniciado en Canadá sobre 1945 donde el mejorador Putt obtuvo los primeros híbridos (Vrânceanu, 1977). Éstos se obtuvieron cruzando de forma natural dos variedades distintas pero dado que en el parental hembra ocurrían tanto autopolinización como polinización cruzada los porcentajes de hibridación fueron menores del 50% (Röbbelen et al., 1989). Para aumentar la eficacia de la hibridación se procedió a principios de los años 70 a la aplicación de la *androesterilidad genética*, asegurando de esta forma un 100% de semillas híbridas. Para la obtención de buenos híbridos es fundamental seleccionar de forma adecuada a los parentales de tal forma que produzcan una heterosis lo suficientemente alta para hacer eficiente el cultivo del girasol híbrido (Vrânceanu, 1977).

Sin embargo el método actual utilizado para la obtención de híbridos es la *androesterilidad citoplásmica* (cms) descubierta en 1969 por Leclerq en *Heliantus petiolaris* y que se viene utilizando desde principios de los años 70. Fue en EEUU en 1972 donde se introdujeron los primeros híbridos obtenidos por este sistema, mostrando un 25% más de producción sobre las

variedades obtenidas por polinización abierta. El carácter *cms* es un sistema que se transfiere de una generación a otra por vía materna. Tras analizar el genoma mitocondrial de *cms* y de una línea normal se observó que diferían en una inversión de 11 Kb y una inserción de 5 Kb producidas en el locus *atpA* (Köhler et al., 1991). Como consecuencia de la inversión y la inserción aparecía una nueva secuencia codificante de 522 nucleótidos que co-transcribía con el gen *atpA* apareciendo un nuevo transcrito más largo, de aproximadamente 2.500 nucleótidos, a partir del cual se sintetizaba un nuevo polipéptido mitocondrial que parecía ser el responsable del carácter *cms*. La línea *cms*, por tanto, será la línea hembra y es necesario que la línea macho además de ser fértil (que produzca polen) tenga los genes de restauración de la fertilidad, de manera que los híbridos de primera generación produzcan polen de forma normal. Debido a que todas las líneas hembras que se utilizan tienen este citoplasma, todos los híbridos cultivados en el mundo están estrechamente relacionados al menos en lo que se refiere a su citoplasma (Friedt, 1992).

Sin embargo dado que tanto la variabilidad genética natural del girasol como la conseguida mediante la hibridación son, en ocasiones, insuficientes para conseguir líneas con unas características determinadas es necesario recurrir a otras técnicas como la *mutagénesis*, que puede ser química o física, ó la *ingeniería genética* a fin de obtener variedades con una serie de caracteres deseables demandados por la industria y por tanto con un importante interés económico. Entre las características deseables se encuentran entre otras la obtención de aceite de girasol con características físicas y químicas diferentes como una mayor solidez, diferente composición química, variedades con resistencia al ataque por parásitos o plagas, resistencia a sequía, etc....Este último apartado será tratado posteriormente con más profundidad explicándose con más detalle algunos de los mutantes de girasol obtenidos hasta el momento haciendo especial hincapié en los mutantes con modificaciones en la síntesis de lípidos de semilla.

II. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y FISIOLÓGICAS

1. Morfología del girasol

El género *Helianthus* pertenece a la familia Compositae y comprende más de 100 especies diferentes que pueden ser perennes o anuales. El número básico de cromosomas del género *Helianthus* es $n=17$ y comprende especies diploides, tetraploides y hexaploides. El girasol cultivado pertenece a la especie *Helianthus annuus* L., es una planta dicotiledónea anual y diploide ($2n=34$).

Ciertos caracteres morfológicos de la planta influyen de alguna manera en la productividad y rendimiento del cultivo como ocurre por ejemplo con el *sistema radicular*. Su gran desarrollo en profundidad le permite extraer agua y nutrientes de capas no explotadas por otros cultivos. La profundidad a la que se desarrolla depende de las condiciones climáticas; si hay sequía se desarrolla a más profundidad, si hay humedad crece más cerca de la superficie del suelo (Gómez-Arnau, 1988).

El *tallo* es erecto y cilíndrico con el interior macizo, mientras que la superficie externa es vellosa. Tiene un diámetro entre 2-6 cm y una altura variable entre 60-220 cm. El tallo suele ser recto y solamente en la madurez se inclina la parte terminal por el peso del capítulo.

El tallo posee entre 20-30 *hojas* en función de las condiciones de cultivo, hojas que son alternas, grandes, trinervadas y con un peciolo largo. Debido a la gran superficie foliar el girasol presenta una gran eficiencia fotosintética que se ve incrementada además por el movimiento heliotrópico de las mismas (Vrânceanu, 1977).

El tallo termina en una única *inflorescencia* o *capítulo* apical también llamado coloquialmente “cabeza” (figura 1). También presenta movimiento heliotrópico aunque sólo al principio de la floración, permaneciendo fija posteriormente. Tiene un diámetro entre 15-30 cm dependiendo de la variedad y de las condiciones de crecimiento. Se compone de numerosas flores situadas en un receptáculo discoidal, siendo las flores de dos tipos, liguladas y tubulares:

- Las liguladas se sitúan en el borde del capítulo y se disponen radialmente en 1-2 filas. Tienen forma alargada y son de un color amarillo intenso. Son estériles y tienen estilos y estigmas vestigiales pero no tienen anteras.
- Las flores tubulares son las flores propiamente dichas y son hermafroditas. Se disponen en arcos espirales que parten desde el centro del disco y están separadas entre ellas por la pálea. Las flores que primero se abren son las de las filas externas y continúan abriendo

hacia el interior. El cáliz se compone de dos sépalos muy reducidos que se caen con facilidad. La corola tiene forma de tubo con cinco dientes y es de color amarillo. Tiene cinco estambres con los filamentos libres y las anteras unidas entre sí por una cutícula. El pistilo tiene dos carpelos y el ovario es ínfero con un solo óvulo. El estilo está oculto en el interior del tubo y el estigma está bifurcado.

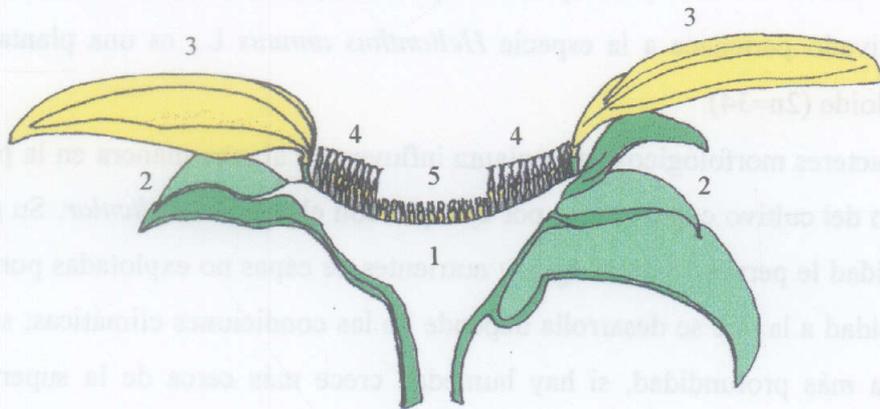


Figura 1. Inflorescencia o capítulo. 1. Receptáculo floral; 2. Brácteas; 3. Flores liguladas estériles; 4. Flores tubulares abiertas; 5. Flores tubulares antes de abrir (Alba y Llanos, 1990).

El *fruto* (figura 2) es un aquenio de 7-17 mm de largo compuesto por el pericarpio (cáscara), que es la envuelta externa dura y fibrosa normalmente muy pegada a la semilla excepto por las aristas; la membrana seminal, que forma una película fina que cubre a la semilla y asegura la adherencia entre ésta y el pericarpio; los cotiledones; que representan la reserva principal de aceite de la semilla y la gémula, situada entre los dos cotiledones y formada por unas células alargadas que darán lugar a la radícula (Vrânceanu, 1977).

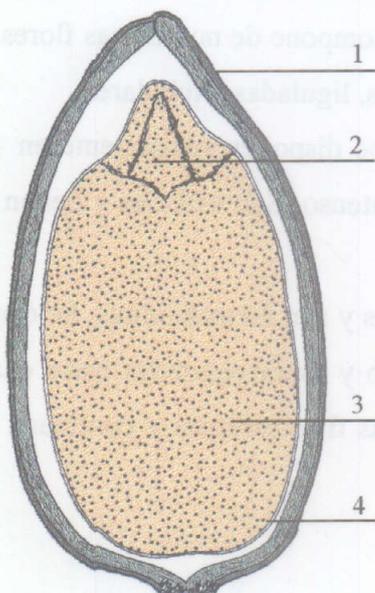


Figura 2. Sección longitudinal de un aquenio: 1. Pericarpio; 2. Gémula; 3. Cotiledón; 4. Membrana seminal (Vrânceanu, 1977).

2. Fisiología.

2.1. Crecimiento y desarrollo

La longitud del ciclo del girasol depende principalmente de dos factores: la variedad y el momento de la siembra, incluyendo este último factor la temperatura durante el desarrollo de la planta, número de horas de luz por día o la cantidad de agua del terreno. En términos generales varía entre 120-150 días para las variedades cultivadas actualmente en España. El ciclo del girasol se puede dividir en cinco etapas:

- 1- *Germinación de las semillas y emergencia.* Comprende desde la siembra hasta la aparición de los cotiledones y depende en gran medida de la temperatura del suelo, teniendo una duración de 5-7 días a 25°C. Si la temperatura es inferior a 4°C la semilla no germina. Las condiciones en que transcurre esta fase son muy importantes ya que de ellas depende la densidad del cultivo.
- 2- *Formación de las primeras hojas.* Desde la emergencia hasta que aparecen los primeros 4-5 pares de hojas. Tiene una duración de 12-20 días. La importancia de esta fase radica en que en ella se produce el enraizamiento de la planta que va a condicionar el posterior vigor de la plantación. Al final de este periodo se aprecian ya los esbozos foliares que se van a ver afectados por la disponibilidad de agua, de manera que la escasez de agua reduce el número de esbozos y por tanto el de hojas. Un exceso de agua hará que el sistema radicular no profundice.
- 3- *Crecimiento activo.* Desde que tiene 4-5 pares de hojas hasta el principio de la floración, con una duración de 50 a 60 días. Es el periodo de crecimiento más activo y el de mayor absorción de elementos minerales del suelo. La aparición del botón floral marca el comienzo del periodo de máxima sensibilidad de la planta a la falta de agua (estrés hídrico).
- 4- *Floración.* La floración del capítulo completo puede durar de 10-12 días. Comienza con la apertura de las primeras flores liguladas, sigue la de las flores verdaderas de los 2-3 anillos exteriores del capítulo y continúa en dirección hacia el centro a razón de 2-5 anillos diarios. Durante la floración el capítulo se convierte en el receptor principal de las sustancias asimiladas por la planta. En estos momentos la planta es muy sensible a la falta de agua por lo que un estrés hídrico puede afectar gravemente el rendimiento de la

cosecha, mientras que una temperatura elevada también afecta negativamente al rendimiento.

5- *Maduración*. Puede durar entre 35-50 días. Comienza con el final de la floración y llega hasta el estado de madurez fisiológica. Hay un escaso aumento de la materia seca de la planta, produciéndose una redistribución de las sustancias asimiladas por la planta en beneficio de las semillas y a expensas de los tallos y hojas. En este estado los aquenios tienen una humedad de un 30%. Es en esta fase cuando se produce la síntesis y acumulación de la materia grasa. La fase termina al finalizar el llenado de las semillas.

A partir de la madurez fisiológica la semilla pierde agua, momento que resulta óptimo para la recolección (Vrânceanu, 1977; Koipesol, 1987; Alba y Llanos, 1990).

2.2. Reproducción

El girasol es una planta alógama debido al sistema genético de autoincompatibilidad y a la discordancia de maduración de estambres y pistilos existiendo un desfase ya que madura en primer lugar la parte masculina (protandria). La maduración de una flor dura aproximadamente tres días: *primer día*, en las primeras horas de la mañana emergen los estambres y por la tarde salen los estilos; *segundo día*, por la mañana se despliegan los estigmas en forma de dos lengüetas curvadas receptoras al polen; y *tercer día*, tras la polinización y fecundación los estigmas se marchitan y esconden dentro del tubo de la corola (figura 3) (Alba y Llanos, 1990).

De forma general se considera que el girasol tiene polinización cruzada, en su mayor parte entomófila (por insectos) y sólo parcialmente anemófila (viento) debido a que el grano de polen es pesado y no está adaptado al transporte a través del viento. Fundamentalmente las abejas son los insectos polinizadores que se ven atraídos por el néctar segregado por las flores. Sin embargo la autoincompatibilidad no es absoluta sino que existe una gran variación entre las líneas de girasol y los híbridos en lo que se refiere al grado de autocompatibilidad lo cual supone una ventaja ya que muestran una menor dependencia de las abejas para la polinización. Por tanto los híbridos empleados actualmente se han seleccionado por tener un elevado grado de autocompatibilidad que asegura cierta producción incluso en ausencia de insectos polinizadores (Fick, 1983).

Teniendo en cuenta este grado de autocompatibilidad, si se quiere llevar a cabo un proceso de autofecundación, por ejemplo para la obtención de líneas puras o para fijar un determinado

carácter, es necesario cubrir los capítulos con bolsas antes de que ocurra la floración para evitar la polinización cruzada.

Para obtener híbridos artificiales se realiza la emasculación (castración) del parental femenino, que implica la eliminación de las anteras a primera hora de la mañana antes de la dehiscencia de las anteras y del despliegue de los estigmas evitando así que puedan dañarse al realizar la castración. Aunque los estigmas permanecen receptivos durante 4-5 días es mejor aplicar el polen al día siguiente de la emasculación (Röbbelen et al., 1989).

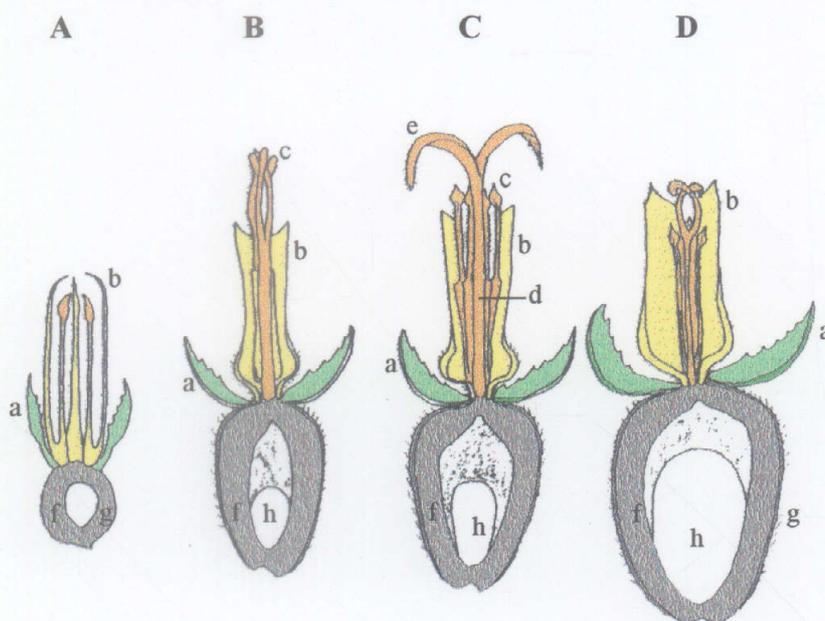


Figura 3. Flores en varios estadios de desarrollo. A) Antes de abrirse; B) Comienza a abrirse (emergencia de los estambres); C) Abierta; D) Después de fecundada; a) sépalos; b) pétalos; c) anteras; d) estilo; e) estigma; f) ovario; g) aquenio; h) óvulo (Alba y Llanos 1990).

III. BIOQUÍMICA DE LÍPIDOS. CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA.

La palabra “lípidos” designa un grupo heterogéneo de sustancias que tienen en común ciertas propiedades tales como la insolubilidad en agua y solubilidad en solventes no polares como el cloroformo, éter, hidrocarburos o alcoholes. Para definirlos es necesario recurrir a propiedades físicas ya que existe una gran diversidad en cuanto a la composición química de los diferentes compuestos que se incluyen en los lípidos.

1. Ácidos grasos

Los ácidos grasos son los constituyentes principales de las grasas y aceites, confiriéndoles sus propiedades físico-químicas. Son ácidos orgánicos formados por una larga cadena hidrocarbonada con un grupo carboxilo terminal y con un número par de átomos de carbono.

Se conocen cientos de ácidos grasos en la naturaleza aunque no todos tienen la misma importancia (Naudet, 1996):

- Ácidos grasos mayoritarios- Son muy comunes y están presentes en gran cantidad. Son pocos los que pertenecen a este grupo pero constituyen casi el 95% de los ácidos grasos.
- Ácidos grasos minoritarios- Suelen tener estructura similar a los anteriores pero están presentes como constituyentes secundarios.
- Ácidos grasos inusuales- Se encuentran en las semillas de pocas especies vegetales pero en ellas son los constituyentes principales.

Existen varias nomenclaturas para nombrar los ácidos grasos:

- Abreviada- Consiste en dos números separados por dos puntos (ej. 18:1 Δ 9c), indicando los primeros dígitos el número de átomos de carbono, y el segundo, tras los dos puntos, el número de dobles enlaces. También se indica a continuación la posición en la que se encuentra el doble enlace y la configuración *cis* (c) o *trans* (t).
- Sistemática- Sigue las reglas adoptadas por la IUPAC (ej. *cis*-9-octadecenoico)

Se puede contar el número de átomos de carbono a partir del grupo carboxilo (Δ) o a partir del grupo metilo terminal (n ó ω).

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

- Saturados- No presentan ningún doble enlace y son moléculas lineales. Su fórmula general es $C_nH_{2n}O_2$ y los más comunes tienen entre C_{12} - C_{22} . Según el número de átomos de carbono se clasifican en *ácidos grasos de cadena media* (ácido láurico, 12:0 y ácido mirístico, 14:0),

ácidos grasos de cadena larga (ácido palmítico, 16:0; ácido esteárico, 18:0) y ácidos grasos de cadena muy larga (ácido aráquico, 20:0; ácido behénico, 22:0 y ácido lignocérico, 24:0).

- **Insaturados**- Presentan uno ó más dobles enlaces, generalmente en configuración *cis*. Se dividen a su vez en *monoinsaturados*, con un solo doble enlace y *poliinsaturados*, con más de un doble enlace.

Monoinsaturados- Se han descrito aproximadamente una centena de ácidos grasos monoinsaturados que aparecen de forma natural aunque la mayoría son raros o inusuales. Los más usuales tienen entre C₁₆-C₂₂ y el doble enlace en configuración *cis*, normalmente en la posición $\Delta 9$ aunque los isómeros *trans* también existen. El más común de los monoinsaturados es el ácido oleico cuya abreviatura es 18:1 $\Delta 9c$ ó más comúnmente 18:1. La configuración *cis* introduce un codo o ángulo en la cadena hidrocarbonada mientras que la *trans* deja la molécula lineal por lo que estos isómeros van a tener propiedades más parecidas al saturado equivalente (figura 4). Debido a que la forma *cis* es termodinámicamente menos estable que la *trans* tendrá menor punto de fusión que este último y que su correspondiente saturado (Gurr y Harwood, 1991).

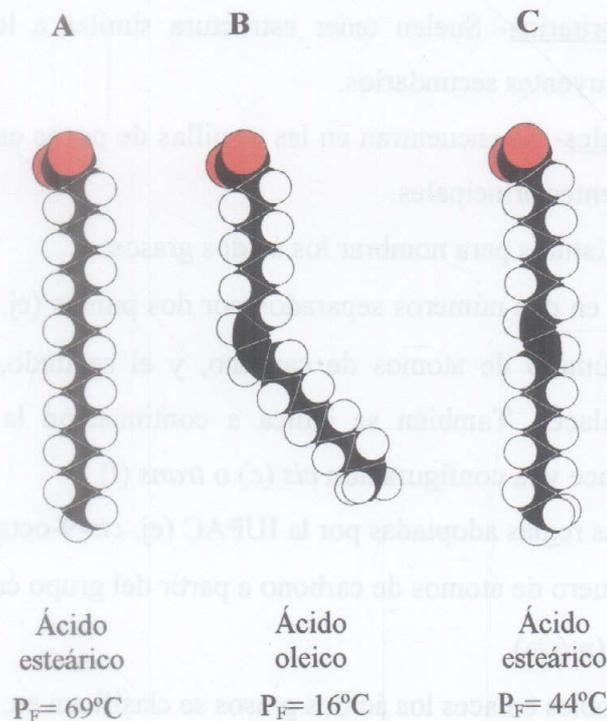


Figura 4. Estructura de los ácidos: A) esteárico (18:0), B) oleico (18:1 $\Delta 9c$) y C) eláidico (18:1 $\Delta 9t$). Se observa el “codo” que introduce el doble enlace *cis* en la molécula del ácido oleico, lo que hace que su punto de fusión baje desde 69°C del ácido esteárico hasta 16°C. El doble enlace *trans*, sin embargo, no distorsiona la molécula por lo que el punto de fusión se mantiene en 44°C.

Poliinsaturados- Derivan de los monoinsaturados y la posición del segundo y sucesivos dobles enlaces va a depender de los sistemas enzimáticos, aunque suelen estar separados entre sí al menos por un grupo metileno.

Tabla 4. Principales ácidos grasos que aparecen en la naturaleza, tanto en animales, plantas superiores, algas o bacterias. En negrita se marcan los AG mayoritarios de los lípidos de girasol, tanto de semilla como en los de tejidos fotosintéticos (Gurr y Harwood, 1991).

Nombre común	Nomenclatura abreviada	T _F (°C)
<i>Saturados</i>		
Cáprico	10:0	29
Laúrico	12:0	42
Mirístico	14:0	52
Palmítico	16:0	60
Estearico	18:0	69
Araquídico	20:0	75
Behénico	22:0	80
Lignocérico	24:0	84
<i>Monoinsaturados</i>		
Palmitoleico	16:1 Δ 9c	1
Oleico	18:1Δ9c	16
Elaídico	18:1 Δ 9t	44
Petroselénico	18:1 Δ 6c	33
Asclépico	18:1 Δ 11c	15
Erúcico	22:0 Δ 13c	24
<i>Trans</i>-hexadecenoico¹	16:1Δ3t	53
<i>Poliinsaturados</i>		
Linoleico	18:2Δ9c,12c	-5
γ -linolénico	18:3 Δ 6c,9c,12c	
α-linolénico	18:3Δ9c,12c,15c	-11
Araquidónico	20:4 Δ 5c,8c,11c,14c	-49

¹ No tiene nombre común

2. Principales glicerolípidos

Tanto los lípidos de reserva que se acumulan en la semilla como los lípidos estructurales que se encuentran en las membranas de las células vegetales tienen en común que son derivados del glicerol denominándose por tanto *glicerolípidos*. El glicerol (propano-1,2,3-triol) posee tres sitios de esterificación que son diferentes estereoquímicamente y que se denominan como *sn-1*, 2 y 3. Los lípidos de reserva están constituidos fundamentalmente por los acilgliceroles ó glicéridos, denominados más comúnmente *lípidos neutros* (LN) debido a que no poseen carga, mientras que los lípidos de membrana son principalmente fosfolípidos y glicosilglicéridos, englobándose dentro de los *lípidos polares* (LP) debido a que tienen carga neta, positiva ó negativa.

2.1. Acilgliceroles o glicéridos.

Son los principales componentes de las grasas y los aceites y están constituidos básicamente por ácidos grasos esterificados a una molécula de glicerol, de forma que según el número de ácidos grasos que se esterifiquen (figura 5) se denominarán *monoacilglicéridos* (MAG), con un solo ácido graso esterificado formando el 1-monoacilglicérido ó 2-monoacilglicérido, *diacilglicéridos* (DAG) que pueden ser 1,2-diacilglicerol ó 1,3-diacilglicerol y *triacilglicéridos* (TAG), siendo estos últimos, con diferencia, los más abundantes dentro de los lípidos neutros.

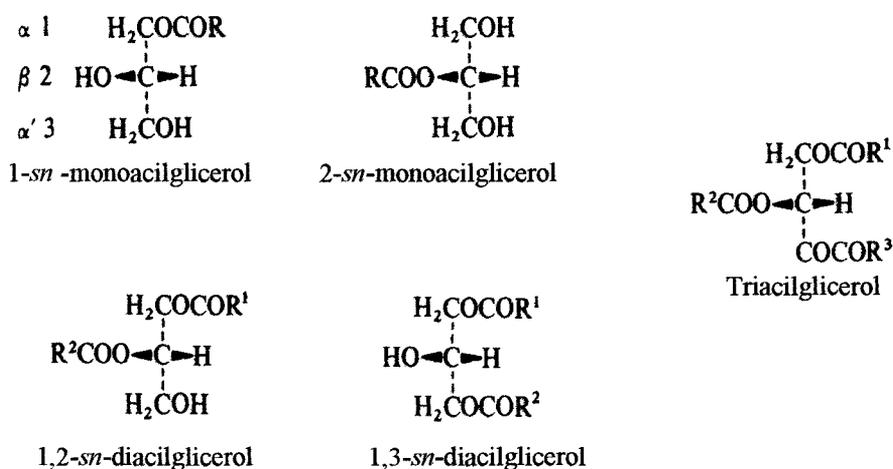


Figura 5. Acilgliceroles (Gunstone et al., 1994).

Los MAG y DAG debido a que son intermediarios metabólicos se encuentran en pequeñas cantidades. Los TAG, dado que no tienen ningún grupo hidroxilo libre, son moléculas poco reactivas y estables, por lo que son las moléculas utilizadas por las semillas oleaginosas como material de reserva y energía, así como por algunos frutos como aceitunas, palma ó aguacate para atraer a los animales y asegurar la dispersión de las semillas (Gurr y Harwood, 1991).

2.2. Fosfolípidos

Los fosfolípidos se dividen en dos clases dependiendo de si el esqueleto es una molécula de glicerol (*glicerofosfolípidos*) ó de esfingosina (*esfingolípidos*). Los *glicerofosfolípidos* son, sin duda, los lípidos más abundantes de las membranas celulares y están compuestos por dos ácidos grasos esterificados en las posiciones *sn-1* y *sn-2* del glicerol y un grupo fosfato unido a la posición *sn-3* por lo que son derivados del ácido fosfatídico (ácido *sn-3*-fosfatídico). El grupo "X" unido al grupo fosfato puede ser una base nitrogenada, un aminoácido ó un alcohol (figura 6). Dependiendo de la naturaleza de ese grupo X se denominan como:

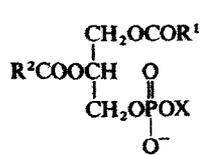
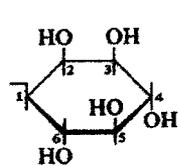
	Sustituyente (X)	Glicerofosfolípido
	H	Ácido fosfatídico
	$-\text{CH}_2\text{CH}(\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3)\text{COO}^-$	Fosfatidilserina
	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$	Fosfatidiletanolamina
	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3$	Fosfatidilcolina
	$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$	Fosfatidilglicerol
		Fosfatidilinositol

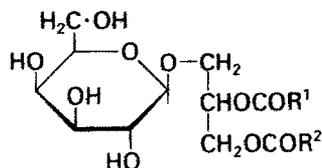
Figura 6. Fórmula general de los glicerofosfolípidos (a la izquierda) y naturaleza del sustituyente X de los más importantes (a la derecha) (Gunstone et al., 1994).

- Ácido fosfatídico (PA)- Es el más simple de los glicerofosfolípidos ya que no tiene ningún grupo unido al fosfato, por lo que es una molécula cargada negativamente. Es un importante intermediario metabólico y sólo se encuentra en cantidades trazas.
- Fosfatidilcolina (PC)- Tiene una colina unida al fosfato de la posición *sn-3* del glicerol. Tiene carga neta neutra y está presente en grandes cantidades en las plantas.
- Fosfatidiletanolamina (PE)- Una molécula de etanolamina está unida al grupo fosfato. Se encuentra en cantidades apreciables en plantas y algunos de sus derivados actúan como intermediarios metabólicos.
- Fosfatidilserina (PS)- El aminoácido serina está unido al fosfato. Tiene carga negativa y es un lípido minoritario.
- Fosfatidilinositol (PI)- Tiene una molécula de inositol unida al fosfato. Tiene carga negativa y también es un lípido minoritario aunque sus derivados fosforilados están presentes en todas las plantas.
- Fosfatidilglicerol (PG)- Presenta otra molécula de glicerol unida al fosfato. También está cargado negativamente y es muy abundante en tejidos fotosintéticos (Gunstone, 1994). El PG de plantas superiores se caracteriza por tener cantidades importantes de un ácido graso inusual, el *trans*- Δ^3 -hexadecenoico, esterificado en la posición *sn-2* (Webb y Green, 1991).

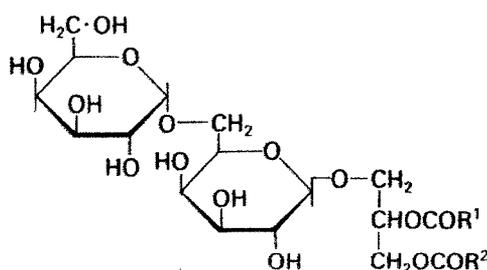
2.3. Glicosilglicéridos

Estos lípidos son también derivados del glicerol, con dos ácidos grasos esterificados en las posiciones *sn-1* y *sn-2*, con un azúcar esterificado en posición *sn-3* que puede ser la glucosa en los microorganismos, ó la galactosa en el caso de plantas superiores. Los más importantes son los *galactolípidos* (ó *galactosilglicéridos*) que incluyen el *monogalactosildiacilglicerol* (MGDG), con una sólo molécula de galactosa unida por un enlace $\beta(1-3)$ glicosídico al glicerol, y el *digalactosildiacilglicerol* (DGDG), con dos galactosas unidas a la posición *sn-3* del glicerol y unidas entre sí por un enlace $\alpha(1-6)$ (figura 7). Tanto MGDG como DGDG se encuentran en las membranas tilacoidales de las plantas superiores y en las algas marinas, representando un 75% de los lípidos totales del tilacoide (50% y 25% respectivamente), por lo que cuantitativamente son los lípidos de membrana más importantes en la naturaleza (Webb y Green 1991). Representan un 40% del peso seco de las membranas fotosintéticas de las plantas superiores. Existe otro grupo dentro de los

glicosilglicéridos, los *sulfolípidos* o *sulfoquinovosildiacylglicéridos* (SQDG) que tienen un grupo sulfónico en posición *sn*-3 del glicerol y también se encuentran formando parte de las membranas fotosintéticas (Gurr y Harwood, 1991).



1,2-diacyl- $[\beta$ -D-galactopiranosil-(1'→3)]-*sn*-glicerol
(monogalactosildiacylglicerol, MGDG)



1,2-diacyl- $[\alpha$ -D-galactopiranosil-(1'→6)- β -D-galactopiranosil-(1'→3)]-*sn*-glicerol (digalactosildiacylglicerol, DGDG)

Figura 7. Galactolípidos (Gunstone et al., 1994).

3. Funciones de los lípidos

La mayor parte de los lípidos tienen alguna de estas tres funciones: estructural, reserva ó metabólica:

-Estructural- Los lípidos juegan un papel importante como *barreras* o *protección* (piel, superficie de hojas, pared de microorganismos) y en *membranas biológicas* rodeando a todas las células.

-Reserva- La degradación de los lípidos aporta gran cantidad de energía por lo que se utilizan como sustancia de reserva, por ejemplo formando parte del *tejido adiposo* en animales o como *aceite* en las semillas.

-Metabólica- Regulan el funcionamiento de la membrana (ej. el *colesterol*), también existen *vitaminas* de origen lipídico, como las vitamina A y D, regulando esta última el metabolismo del calcio ó *hormonas esteroideas*, que son de naturaleza lipídica.

IV. BIOQUÍMICA DE LÍPIDOS. BIOSÍNTESIS.

En las plantas se pueden distinguir diferentes rutas de biosíntesis de lípidos según se trate de tejidos fotosintéticos como las hojas, o tejidos de reserva como la semilla (también el fruto en ciertas ocasiones puede actuar como tejido de reserva). En tejidos de reserva la síntesis *de novo* de ácidos grasos comienza en los plastidios donde se sintetizan la mayoría de los ácidos grasos, hasta el ácido oleico, continuando posteriormente en el retículo endoplásmico (RE) donde se sintetiza el ácido linoleico. También en el RE ocurre la síntesis de los TAG y de los LP (figura 8). En tejidos fotosintéticos la síntesis *de novo* de ácidos grasos comienza en otro compartimento celular, los cloroplastos, pero también requiere la participación del RE.

Por tanto entre los tejidos verdes y los de reserva existen diferencias en cuanto a los compartimentos celulares implicados en la biosíntesis de ácidos grasos, así como en ciertas reacciones enzimáticas específicas bien de tejidos fotosintéticos bien de tejidos de reserva.

Dado que el interés de este trabajo se centra en el análisis y caracterización del aceite de semilla de girasol, en este apartado se detalla la ruta biosintética de lípidos en tejidos de reserva, que en gran parte es común para todas las semillas oleaginosas (soja, colza, cártamo, girasol ...) aunque determinadas reacciones se llevan a cabo por enzimas diferentes o bien por la misma enzima pero con alguna modificación (especificidad, afinidad, regulación,...).

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

1.1. Síntesis intraplastidial de los ácidos grasos.

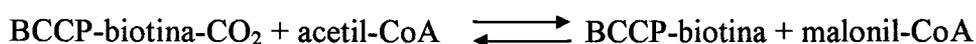
La síntesis *de novo* de los ácidos grasos en el interior de los plastidios (figura 8) requiere la acción concertada de dos complejos enzimáticos: la acetil-CoA carboxilasa y la ácido graso sintetasa.

1.1.1. Acetil-CoA carboxilasa

Aunque el dióxido de carbono fijado por la fotosíntesis es, en última instancia, la fuente de carbono para la síntesis de ácidos grasos, el acetil-CoA puede considerarse como el precursor más directo. Este acetil-CoA se sintetiza en el interior del plastidio ya que existe toda una batería de enzimas glicolíticas así como la piruvato deshidrogenasa.

La acetil-CoA carboxilasa (ACCase) cataliza de forma ATP-dependiente la formación de malonil-CoA a partir de acetil-CoA y bicarbonato. Se trata de una enzima “soluble” aunque *in vivo* puede estar asociada a la membrana plastidial. Pertenece a un grupo de enzimas que contienen biotina y cataliza la reacción en dos pasos principales:

- 1- La primera reacción parcial la cataliza la enzima *biotina carboxilasa*, que utiliza el ATP para carboxilar el grupo prostético de la biotina de la BCCP (proteína transportadora de biotina carboxilada).
- 2- La segunda reacción parcial la lleva a cabo la *carboxiltransferasa*, que transfiere el grupo carboxilo al acetil-CoA para formar malonil-CoA (Bishop y Stumpf, 1971).



La ACCasa puede existir como un complejo multienzimático o como una proteína multifuncional. La de *Escherichia coli*, por ejemplo, es un complejo multienzimático dissociable formado por cuatro proteínas separadas, denominando a este tipo de estructura “forma procariota” de la ACCasa. En cloroplastos de espinaca se encuentra esta forma así como en plantas dicotiledóneas en general donde la “forma procariota” se encuentra en el interior de los plastidios. En levaduras, animales y hongos la ACCasa consta de una sola cadena polipeptídica con tres dominios funcionales (proteína multifuncional), denominándose a este tipo “forma eucariótica”. También en cloroplastos de gramíneas (maíz, trigo y arroz) existe la proteína multifuncional, con un peso molecular de 240 KDa en el caso del trigo. En este tipo de ACCasa los sitios activos de la biotina carboxilasa y la carboxiltransferasa están separados físicamente (Harwood, 1988).

Sin embargo, en plantas el malonil-CoA se necesita no sólo en el interior de los plastidios sino también para elongaciones extraplastidiales, como ocurre en el citoplasma de células epidérmicas donde se necesita la actividad ACCasa para la producción de ácidos grasos de cadena muy larga precursores de las ceras y cutinas. Por tanto parece probable que muchas dicotiledóneas puedan tener una ACCasa tipo complejo multienzimático en los plastidios y otra tipo proteína multifuncional en el citosol, como se ha visto en guisante (Harwood, 1996).

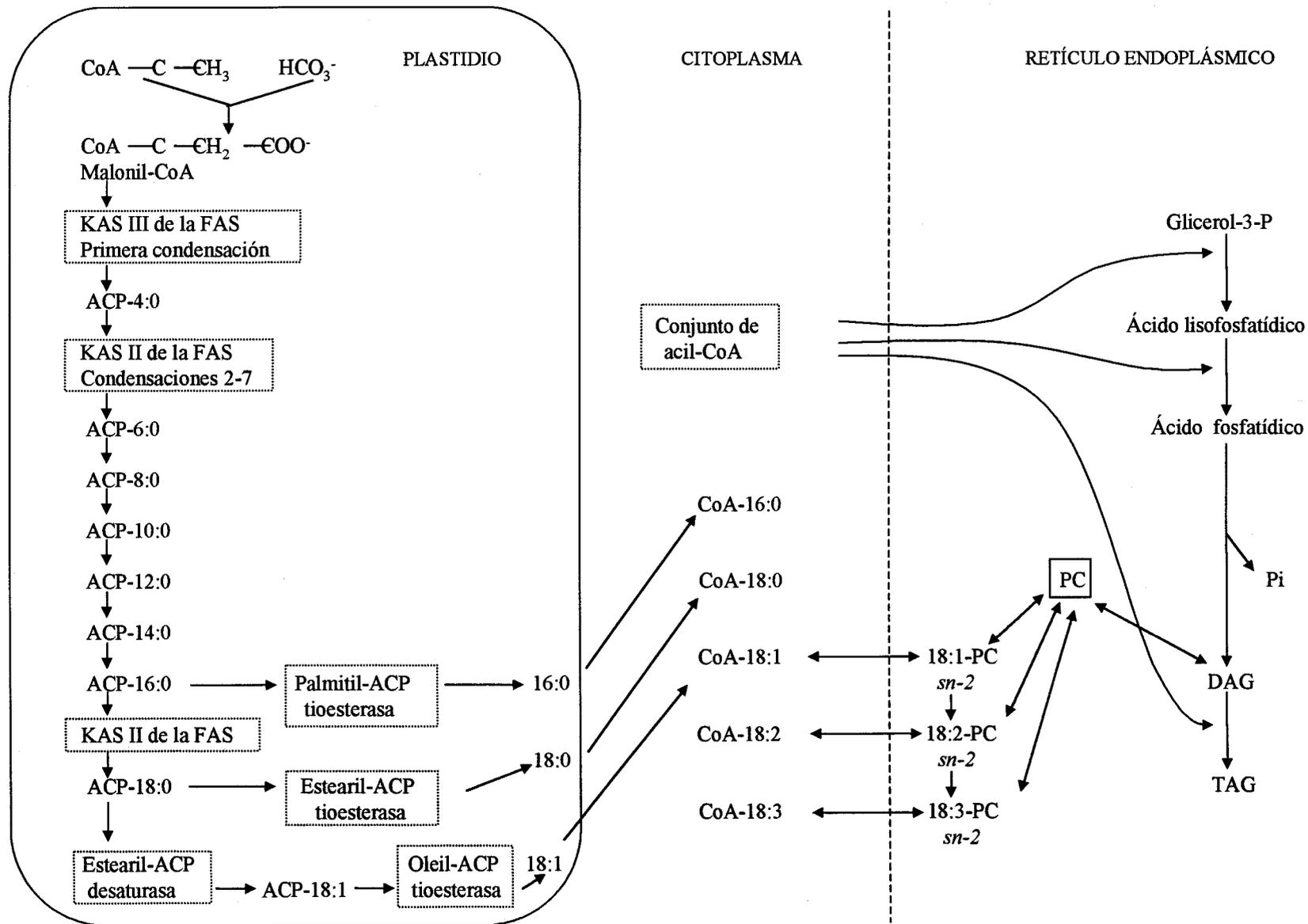


Figura 8. Esquema general de la síntesis de ácidos grasos en plantas (Budziszewski et al., 1996).

1.1.2. Complejo ácido graso sintetasa

La sintetasa de ácidos grasos (FAS) de plantas es un complejo multienzimático que lleva a cabo reacciones parciales individuales catalizadas por proteínas separadas: β -cetoacil sintetasas (KAS), β -cetoacil reductasa, β -hidroxiacil deshidratasa y enoil-ACP reductasa. Este complejo cataliza una serie de reacciones de condensación en las que moléculas de dos carbonos se van adicionando a otra, de manera que tras sucesivos ciclos de condensación se obtiene una cadena hidrocarbonada larga de un máximo de 18 átomos de carbono. Tanto las moléculas que se adicionan como la que se va elongando se encuentran unidas a una pequeña proteína denominada ACP (proteína transportadora de acilos) cuya naturaleza y características es necesario conocer previamente.

a) Proteína transportadora de acilos

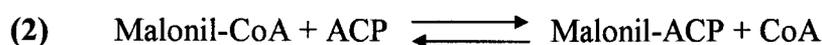
La proteína transportadora de acilos (ACP) tiene un papel crucial en la síntesis de ácidos grasos. Está constituida aproximadamente por 80 aminoácidos y un grupo prostético que es la panteteína, unida a un residuo de serina situado en la mitad de la proteína. El ACP se une al grupo carboxilo del ácido graso a través de un grupo sulfidrilo situado al final del grupo prostético formando un enlace tioéster, para lo cual requiere energía (en forma de ATP). Se purificó en primer lugar el ACP de *E. Coli*, tratándose de una pequeña proteína ácida, globular, con un peso molecular de 8847 Da y bien conservada durante la evolución (Rock y Cronan, 1981a). En *E. coli* existe sólo una isoforma sin embargo en plantas se han encontrado diversas isoformas, por ejemplo en espinaca se encontraron dos isoformas ACP I y ACP II, con una distribución específica de tejido. En cebada existían tres isoformas, ACP I, II y III, así como en *Arabidopsis* donde en todos los tejidos analizados (hojas, raíz y semilla) al menos se expresaban tres ACP (Harwood, 1996). En cuanto a la regulación de los niveles de ACP en la célula parece existir una estrecha correlación entre el nivel de ACP y la biosíntesis de lípidos *in vivo*, existiendo un incremento en los niveles de ACP por síntesis *de novo* que coincide con la fase de síntesis activa de lípidos (Ohlrogge y Kuo, 1984).

La expresión específica de tejido de las diferentes isoformas de ACP que se ha observado podría explicarse por la posible influencia de las isoformas de ACP sobre la canalización del carbono hacia distintas rutas. A esta suposición se llegó después de estudiar la competencia por el sustrato entre las actividades acil-ACP tioesterasa y acil-ACP-3-glicerol aciltransferasa,

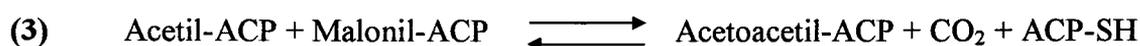
competencia que variaba según la isoforma de ACP que estuviera unida al sustrato (Guerra et al., 1986).

b) Reacciones de condensación de la FAS.

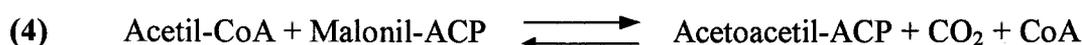
Las primeras reacciones de la síntesis de AG implican la formación de acetil-ACP y malonil-ACP por transacilación a partir de sus respectivos CoA tioesteres (reacciones (1) y (2)) por la acción de la acetil-CoA y malonil-CoA:ACP transacilasas.



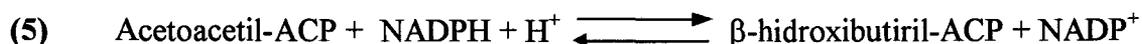
En un principio se pensó que la reacción que tenía lugar a continuación era la condensación del acetil-ACP y malonil-ACP (reacción (3)) catalizada por la β -cetoacil-ACP sintetasa I (KAS I) (Harwood, 1988):



Sin embargo en 1987, Jackowski y Rock descubrieron en *E. coli* una nueva enzima, la β -cetoacil-ACP sintetasa III (KAS III) que era capaz de condensar directamente acetil-CoA y malonil-ACP sin necesidad de la enzima acetil-CoA:ACP transacilasa (ACAT). Posteriormente la KAS III se encontró en plantas y dado que tenía mucha más actividad que la ACAT y que la tasa inicial de formación de acil-ACP no se afectaba por cerulenina (que inhibe a la KAS I), la primera reacción de condensación parecía estar catalizada por la KAS III, que además parecía tener actividad ACAT intrínseca. Este descubrimiento arrojaba dudas sobre la existencia real de una actividad ACAT. La KAS III se ha purificado de espinaca y aguacate, tiene un peso molecular de 63 y 69 KDa respectivamente y una estructura homodimérica. Muestra insensibilidad frente a la cerulenina (Harwood, 1996). La reacción catalizada por la KAS III es la siguiente:



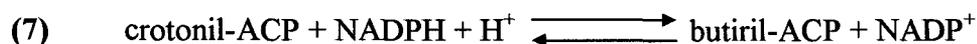
A continuación intervienen dos enzimas reductasas (β -cetoacil-ACP reductasa y enoil-ACP reductasa) y una deshidratasa (β -hidroxiacil-ACP deshidratasa). La β -cetoacil-ACP reductasa cataliza la primera reducción:



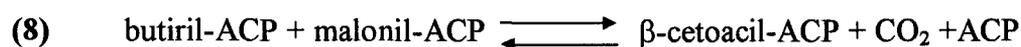
La β -hidroxiacil-ACP deshidratasa lleva a cabo la siguiente reacción de deshidratación:



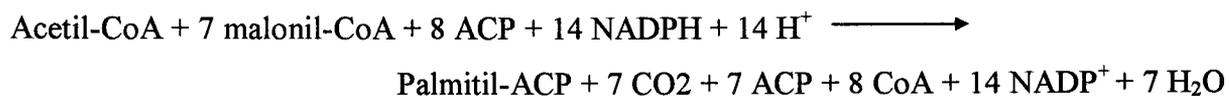
La enoil-ACP reductasa cataliza la segunda reducción:



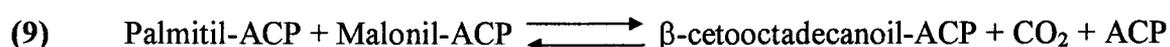
El resultado neto de esta primera condensación es una molécula de butiril-ACP (4C) y la regeneración de dióxido de carbono. El butiril-ACP (4C) formado se condensa a continuación con otra molécula de malonil-ACP (3C) por medio de una reacción similar a la (4) pero catalizada por la enzima KAS I en lugar de la KAS III. La KAS I se ha purificado de colza, tiene un peso molecular de 87 KDa y también se trata de un homodímero. Se diferencia de la KAS III en que muestra sensibilidad a la cerulenina. La reacción que cataliza la KAS I es la siguiente:



Tras esta segunda condensación se producen las dos reducciones y la deshidratación (reacciones (5)-(7)) formándose el hexanoil-ACP como producto final. A continuación se producen posteriores condensaciones de malonil-ACP de forma cíclica, de manera que tras la condensación de cada molécula de malonil-ACP, catalizada por la KAS I, se llevan a cabo las reacciones (5-7). La KAS I es la enzima que cataliza las condensaciones desde C₄-C₁₄. Después de siete ciclos el producto final es un ácido graso de 16 C, el 16:0-ACP, siendo la estequiometría de la reacción la siguiente:



El palmitil-ACP puede ser elongado por sistemas de elongación específicos que difieren de la FAS en que interviene la β -cetoacil-ACP sintetasa II (KAS II) en lugar de la KAS I. La KAS II sólo cataliza la elongación del palmitil-ACP (C_{16}) a estearil-ACP (C_{18}) por tanto va a tener un papel importante en determinar los niveles de C_{16} y C_{18} . La reacción de la KAS II es la siguiente:



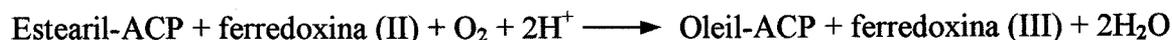
A continuación intervendrían de nuevo la β -cetoacil-ACP reductasa, β -hidroxiacil-ACP deshidratasa y enoil-ACP reductasa (reacciones (5)- (7)), dando como producto final el estearil-ACP (18:0-ACP).

1.1.3. Biosíntesis de ácido oleico.

Los AG insaturados más abundantes de plantas son los ácidos oleico, linoleico y α -linolénico, que constituyen más del 80% del total de ácidos grasos de plantas superiores. En tejidos no fotosintéticos como la semilla la síntesis plastidial de ácidos grasos termina en el ácido oleico, mientras que en los tejidos fotosintéticos el ácido graso mayoritario, el α -linolénico, se sintetiza también en el interior de los cloroplastos.

La *estearil-ACP desaturasa* (EDS) (EC 1. 14. 99. 6) es la enzima que cataliza la síntesis de ácido oleico utilizando como sustrato el 18:0-ACP introduciendo un doble enlace en configuración *cis* entre los carbonos 9 y 10, por lo que también se denomina $\Delta 9$ desaturasa. Es una enzima soluble que utiliza NADPH como donador de electrones, Fd como molécula transportadora y oxígeno molecular (Nagai y Bloch, 1968; McKeon y Stumpf, 1982). En cuanto a su requerimiento de Fd reducida la enzima muestra especificidad por la Fd de plantas ya que cuando se ensayaba la actividad EDS de cártamo con ferredoxina de *E. coli* sólo existía una actividad mínima por lo que no parecía ser un donador de electrones eficiente (Thompson et al., 1991). El poder reductor parece provenir de la ruta de las pentosas fosfato mientras que el oxígeno difunde a través del sistema vascular. También requiere Fd:NADPH oxidoreductasa y catalasa, ésta última estimulaba de 4 a 5 veces la actividad EDS.

La reacción catalizada por la EDS es la siguiente:



a) Propiedades de la estearil-ACP desaturasa.

La EDS es una enzima de gran actividad en relación a la KAS II por lo que el 18:0 rara vez se acumula en plantas. La enzima se ha purificado, entre otras, de semillas de cártamo (Mckee y Stumpf, 1982), soja (Cheesbrough y Cho, 1990) y ricino (Shanklin y Somerville, 1991). La EDS está codificada por un gen nuclear, sintetizándose como un precursor con un péptido de tránsito N-terminal para dirigir la enzima hasta el plastidio. En cártamo y ricino el péptido de tránsito, de 33 residuos, se elimina para dar un polipéptido de 363 aminoácidos con un peso molecular de 36 kDa por subunidad. La enzima se encuentra en forma dimérica con un peso molecular aproximado de 70 kDa (Shanklin y Somerville, 1991; Mckee y Stumpf, 1982; Thompson et al., 1991).

Existe una gran homología entre las secuencias nucleotídicas de las EDS de plantas superiores pero no hay tal homología cuando se comparan las secuencias de plantas con la de la enzima estearil-CoA de animales y hongos, lo cual era de esperar debido a que existen diferencias importantes entre ambas enzimas: mientras que la de plantas utiliza como sustrato el 18:0-ACP la de animales y hongos utiliza 18:0-CoA, la de plantas es soluble y la de animales y hongos es una proteína integral de membrana, la de plantas utiliza Fd como transportador de electrones y la de animales citocromo b5 (Shanklin y Somerville, 1991).

Estudios realizados sobre las propiedades físicas de la enzima han mostrado que contiene hierro y que se inhibe por agentes quelantes y por cianuro. Estudios espectroscópicos han demostrado que la EDS pertenece a un grupo de proteínas dependientes de oxígeno y que contienen interacciones hierro-oxígeno. Cada subunidad enzimática contiene dos átomos de hierro (figura 9) y se ha observado que este tipo de proteínas di-férricas se caracterizan por la existencia de un par de secuencias de aminoácidos conservadas, (Asp/Glu)-Glu-Xaa-Arg-His, separadas por unos 100 aminoácidos, análogas a sitios de unión de átomos de hierro de la ribonucleótido reductasa (Fox et al., 1993). Estudios mutagénicos y cristalográficos realizados sobre la EDS de *Thunbergia alata* parecen indicar la importancia de un dominio de 30 aminoácidos, 178-207, en la determinación del punto de inserción del doble enlace y la especificidad del tamaño de la cadena de la EDS de *T. alata* (Cahoon et al., 1997).

Se ha determinado la estructura tridimensional de la EDS de ricino por medio de estudios cristalográficos observándose que cada monómero de 363 aminoácidos está compuesto por un único dominio formado por 11 α -hélices. Se puede distinguir además una especie de canal que se extiende desde la superficie hasta el interior de la enzima que probablemente será el sitio de unión del ácido graso (Lindqvist et al., 1996).

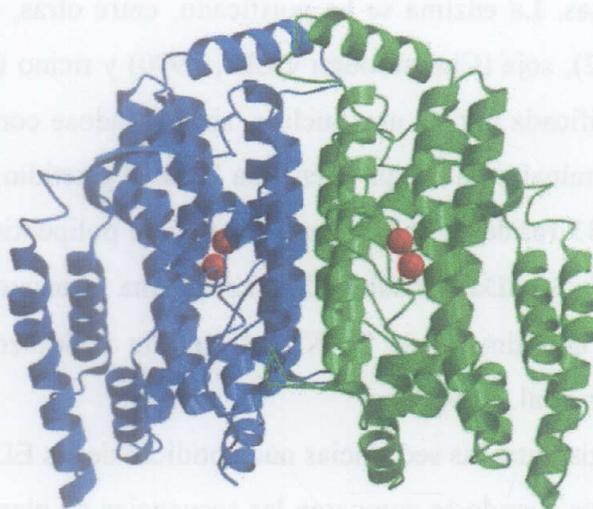


Figura 9. Modelo tridimensional de la estearil-ACP desaturasa (Lindqvist et al., 1996).

b) Especificidad de sustrato.

En cuanto a la especificidad de sustrato la EDS de cártamo tenía una gran especificidad para el 18:0-ACP presentando sólo un 1% de actividad frente al 16:0-ACP (McKeon y Stumpf, 1982). Mostraba una K_m muy similar para ambos sustratos pero una V_{max} 100 veces superior para el 18:0-ACP, luego parece ser que la enzima requería un tamaño de cadena de 18 carbonos para su actividad. En soja (Gibson, 1993) se hicieron ensayos de la actividad EDS de una enzima recombinante sobre el 16:0-ACP y se obtuvieron los mismos resultados que en cártamo, es decir, el factor de especificidad V_{max}/K_m era 100 veces superior con el 18:0-ACP que con el 16:0-ACP debido principalmente a la diferencia entre las V_{max} de los dos sustratos. Sin embargo, al ensayar la actividad desaturasa con 18:0-ACP y 18:0-CoA la enzima mostraba sólo un 5% de actividad frente el 18:0-CoA, con una V_{max} similar pero una K_m muy superior para el estearil-CoA, luego parece ser que la unión del acilo al ACP jugaba un papel importante (McKeon y Stumpf, 1982). La EDS de

cártamo tenía una K_m de $0,3 \mu\text{M}$ y un pH óptimo entre 6,0 y 7,5 (McKeon y Stumpf, 1981) mientras que la de soja (Cheesbrough y Cho, 1990) tenía una K_m diez veces superior que la de cártamo ($3 \mu\text{M}$) y un pH óptimo de 6,6.

Se han realizado diversos experimentos a fin de intentar determinar qué aminoácidos son los que están implicados en la especificidad de sustrato de la EDS. Mediante mutagénesis dirigida sobre la EDS de *Thunbergia alata* se pudo comprobar que la sustitución de dos aminoácidos, Leu118 Phe/Pro179 Ile, aumentaba la especificidad de la enzima por el 16:0-ACP respecto al 18:0-ACP (Tocher et al., 1998). Más recientemente, otros autores han estudiado una 16:0-ACP Δ^9 -desaturasa de *Doxantha unguis-cati* L., una planta que acumula un 80% de ácido palmitoleico (16:1 Δ^9) más ácido ascléptico (18:1 Δ^{11}), sintetizado por elongación del primero (Cahoon et al, 1998). Cuando expresaban dicha Δ^9 -desaturasa en *E. coli* mostraba una mayor preferencia por 16:0-ACP que por 18:0-ACP. Se analizó la secuencia de aminoácidos de esta enzima y se comparó con la de la 18:0-ACP Δ^9 -desaturasa de ricino lo que permitió identificar la existencia de una sola sustitución, Leu118 por Trp, localizada en la hendidura donde se unía el sustrato, como consecuencia de la cual se incrementaba drásticamente la especificidad de la enzima por el 16:0-ACP respecto al 18:0-ACP. Para confirmar esta hipótesis obtuvieron un mutante de ricino en el que la 18:0-ACP Δ^9 -desaturasa llevaba la sustitución Leu118 Trp, consiguiendo de esta forma que la actividad sobre el 16:0-ACP fuera un 115% superior respecto al 18:0-ACP, mientras que en el ricino normal la actividad sobre el 18:0-ACP era un 70% superior que sobre el 16:0-ACP. Sin embargo, a pesar de que con una sola sustitución (Leu118 Trp) se conseguía aumentar la especificidad por el 16:0-ACP, la relación de actividad 16:0-ACP/18:0-ACP era de 2,4 para el mutante Leu118 Phe/Pro179 Ile mientras que sólo de 1,1 para era el mutante Leu118 Trp. Por tanto, aunque el aminoácido Trp118 es el principal determinante de la especificidad de sustrato de la desaturasa de *Doxantha unguis-cati* L. otros residuos probablemente contribuirán también.

c) Regulación temporal y específica de semilla de la expresión génica de la estearil-ACP desaturasa.

En cuanto a la expresión del gen de la EDS durante el desarrollo de la semilla, no es constante y continua sino que existen picos de expresión en un periodo concreto lo que hace pensar que se trata de un gen de expresión temporal. En colza (*Brassica rapa*) el ARNm se podía detectar a los 19 días después de la floración (DDF), alcanzaba un máximo a los

25 DDF y posteriormente disminuía de manera que a los 35 DDF ya no se podía detectar (Knutzon et al., 1992b). En *Brassica napus* existían algunas diferencias ya que el ARNm de la desaturasa se detectaba a los 25 DDF y alcanzaba los niveles máximos a los 45 DDF, disminuyendo drásticamente más allá de este punto (Slocombe et al., 1992).

En cacao (*Theobroma cacao*), que acumula 18:0, se midió la cantidad de enzima entre 95 y 115 DDF y se vio que era 2,3 veces superior a 95 DDF que a 105 DDF (Patel et al., 1994). En sésamo (*Sesamum indicum*) se cuantificó el ARNm entre 28 y 70 DDF, existiendo un pico de ARNm a los 28 DDF y disminuyendo a continuación (Yukawa et al., 1996). En girasol (Kabbaj et al., 1996) se estudió la cantidad de ARNm de la enzima en semillas de 12, 16, 20 y 28 DDF, existiendo un máximo a los 12 DDF.

Para determinar si el gen de la EDS de *Brassica napus* mostraba expresión específica de tejido se hizo una hibridación con una sonda del ADNc completo de la EDS y se observó que no se detectaba ningún ARNm en hojas, por lo que se sugería que la expresión de este gen era específica de semilla. Probablemente la isoforma de la enzima que se expresa en hoja fuera suficientemente diferente como para que no hubiera hibridado con la sonda utilizada (Slocombe et al., 1992). El análisis más detallado del promotor del gen de la EDS de *Brassica napus* indicó que efectivamente en el promotor existían secuencias responsables de que la desaturasa se expresara específicamente en la semilla, concretamente en cotiledones y endospermo donde se acumulan los lípidos de reserva, así como de la regulación temporal de la expresión (Slocombe et al., 1994).

En ricino (*Ricinus communis*) también se hicieron ensayos de hibridación con una sonda de ARN del gen de la EDS utilizando ARN de raíz, hoja y semilla, observándose también, al igual que en colza, expresión específica de semilla (Shanklin y Somerville, 1991).

También en sésamo (*Sesamum indicum* L.), mediante el análisis del ARN total y su hibridación con una sonda se observó que no existía expresión del gen de la EDS ni en raíz, tallo ni hojas. Sólo se detectaba ARN en semilla, siendo mucho mayor la expresión en semillas inmaduras de 21 DDF que en las anteriores a los 14 DDF (Yukawa et al., 1996).

d) Influencia de la temperatura sobre la estearil-ACP desaturasa.

También la actividad de la EDS se ve afectada por factores ambientales como la temperatura, así por ejemplo, en soja (Cheesbrough, 1989; Cheesbrough, 1990) la actividad relativa es cinco veces superior en semillas cultivadas a 20°C que a 35°C, produciéndose un

aumento de la síntesis de la enzima al descender la temperatura. También en colza se observó una mayor actividad EDS a temperatura más baja (Lee y Guerra, 1994). En girasol (Kabbaj et al., 1996) sin embargo, se observó el efecto contrario de la temperatura sobre el nivel de acumulación del ARNm de la estearil-ACP desaturasa siendo en este caso la temperatura alta la que incrementaba la síntesis de ARNm.

1.1.4. Terminación de la síntesis de ácidos grasos. Tioesterasas de acil-ACP.

Los ácidos grasos procedentes de la síntesis intraplastidial, normalmente C₁₆ y C₁₈, se exportan al citoplasma para sufrir diversas modificaciones y posteriormente ser incorporados en TAG o en lípidos de membrana. Teniendo en cuenta que en el interior del plastidio los ácidos grasos se encuentran unidos al ACP, se requiere la acción de unas enzimas, las acil-ACP tioesterasas (EC 3. 1. 2. 14), que van a hidrolizar el enlace tioester existente entre el acilo y el ACP, liberando de esta forma el ácido graso. Las acil-ACP tioesterasas (TE) son enzimas intraplastidiales solubles, diméricas, con un peso molecular aproximado de 80 KDa (Mckeon y Stumpf, 1982).

Las primeras TE que se habían purificado tenían una mayor especificidad por el 18:1-ACP por lo que en un principio se denominaron 18:1-ACP tioesterasas (OTE). En cártamo (*Carthamus tinctorius*) (Mckeon y Stumpf, 1982; Knutzon et al., 1992a) se había purificado una TE con una gran especificidad por 18:1-ACP mientras que sólo mostraba un 10-20% actividad frente al 16:0-ACP y 18:0-ACP. En colza (*Brassica napus*) (Hellyer y Slabas, 1990) también se purificó una TE con una mayor actividad sobre el 18:1-ACP.

En *Coriandrum sativum* L., una Umbellifera que acumula ácido petroselinico (18:1Δ6c) en los TAG de semilla, se encontró una actividad petroselinil-ACP tioesterasa alta, que aunque en un principio se pensó que estaba asociada a la propia OTE, posteriormente se comprobó que se trataba de otra enzima, distinta de la OTE, específica del petroselinil-ACP (Dörmann et al., 1994).

En cacao (*Theobroma cacao*), una planta que acumula un 34% de 18:0 en la semilla, se ensayó la actividad TE (Griffiths et al., 1993) y se comprobó que la TE de cacao, aunque mostraba una mayor actividad sobre el 18:1-ACP era relativamente más activa sobre el 18:0-ACP en comparación con las TE encontradas en otras plantas. Por tanto la acumulación de 18:0 en cacao no era debida a la existencia de una TE específica de 18:0-ACP sino a un aumento de la especificidad de la OTE por el 18:0-ACP. Esto contrastaba con los resultados

obtenidos al ensayar la actividad TE en epidermis de puerro (*Allium porrum*) (Liu y Post-Beittenmiller, 1995) donde se requería una síntesis muy importante de ácidos grasos saturados de cadena larga para la producción de ceras. Se encontraron dos TE, una con un rango amplio de especificidades aunque con preferencia por 18:1-ACP, y otra específica de 18:0-ACP que sólo mostraba un 10% de actividad sobre 16:0-ACP y 18:1-ACP.

Sin embargo, algunas especies vegetales se caracterizan por acumular ácidos grasos de cadena más corta, como es el caso de *Umbellularia californica* que posee un 60% de 12:0 en su aceite. Voelker et al. en 1992 purificaron una TE con especificidad por ácidos grasos de cadena media (TECM) que mostraba una mayor actividad sobre el 12:0-ACP. Para confirmar la importancia de estas TECM en determinar la acumulación de ácidos grasos de cadena media en semilla se transformó *Arabidopsis thaliana*, que normalmente tiene actividad oleil-ACP tioesterasa predominante, con el gen de TECM de *Umbellularia californica*. Las plantas transformadas acumularon grandes cantidades de 12:0 en su aceite, luego parecía quedar claro el importante papel que desempeñaba las TECM en la acumulación de ácidos grasos de cadena media. Posteriormente transformaron plantas de colza (*Brassica napus*) con el gen de la 12:0-ACP tioesterasa de *Umbellularia californica* y también consiguieron que acumulara 12:0 (Eccleston et al., 1996).

Otras plantas que acumulan ácidos grasos de cadena media son las pertenecientes al género *Cuphea*, así por ejemplo *C. lanceolata* acumula 80% de 10:0 mientras que *C. wrightii* contiene 30% de 10:0 y 54% de 12:0. En *C. lanceolata* (Dörmann et al., 1993) se purificaron dos acil-ACP tioesterasas, una con mayor actividad sobre el 18:1-ACP y otra específica para ácidos grasos de cadena media.

Jones et al. en 1995 utilizaron los términos FatA y FatB para denominar a los dos tipos de genes de tioesterasas de plantas superiores, siendo FatA el gen que codifica la oleil-ACP tioesterasa y FatB el que codifica tioesterasas con preferencia por ácidos grasos saturados. Purificaron una tioesterasa tipo FatB de otra especie de *Cuphea*, *C. hookeriana*, que acumula un 60% de 8:0 y 25% de 10:0, sin embargo la FatB purificada mostraba una mayor actividad sobre el 16:0-ACP, algo inesperado ya que *C. hookeriana* no acumulaba 16:0. Además cuando transformaron *Brassica napus* con esta FatB de *C. hookeriana* el contenido de 16:0 en las plantas transformadas aumentaba de 7% a 34%. Por tanto esta FatB (denominada FatB1) no era la responsable de la acumulación de 8:0 y 10:0 en *C. hookeriana* sino que existía otra

tioesterasa, descubierta posteriormente, denominada FatB2. Por tanto dentro de las FatB parecían existir dos subgrupos, uno con más especificidad por C₈-C₁₄ y otro por C₁₄-C₁₈.

Existe otra *Cuphea*, *C. palustris*, que acumula un 64% de 14:0 y un 20% de 8:0. Se encontraron también dos tioesterasas FatB (Dehesh et al., 1996), una con una alta especificidad por 14:0-ACP aunque también mostraba una actividad significativa frente el 16:0-ACP, y otra con especificidad por 8:0-ACP aunque con una actividad importante sobre 10:0-ACP. Por tanto no se sabía por qué a pesar de la existencia de actividad tioesterasa sobre 10:0-ACP y 16:0-ACP ambos ácidos grasos no se acumulaban y sólo existían en cantidades muy pequeñas. Una posible explicación para este hecho sería que los productos de la biosíntesis de ácidos grasos estuvieran determinados no sólo por las especificidades de las tioesterasas sino también por otras actividades enzimáticas como las β-cetoacil-ACP sintetasas. Según esta hipótesis, la composición de ácidos grasos de un aceite estaría determinado tanto por la acción de las tioesterasas como por las sintetasas de ácidos grasos que competirían por los mismos sustratos (Chasan, 1995).

A esta misma conclusión llegaron Voelker et al. en 1997 tras estudiar las actividades tioesterasas en dos especies diferentes, *Ulmus americana*, que acumula 65% de 10:0 y 10% de 8:0 y que sin embargo tiene una FatB con preferencia por 16:0-ACP y 14:0-ACP, y *Myristica fragrans*, con un 80% de 14:0 y una FatB que hidroliza por igual sustratos C₁₄-C₁₈. Por tanto concluyeron igualmente que la tasa de producción de un ácido graso no sólo dependía de las tioesterasas respectivas sino también de la capacidad de elongación de las sintetasas. Así por ejemplo, en *Myristica fragrans*, el 80% de 14:0 se conseguiría por la existencia de una sintetasa de ácidos grasos con una alta capacidad de elongar ácidos grasos hasta 14:0 pero con poca capacidad para elongaciones posteriores. Por tanto ellos proponen que, además de una FatB especializada, el principal factor que determinaría la producción de ácidos grasos medios en *Myristica fragrans* sería la variación de la capacidad de elongación de las sintetasas de ácidos grasos.

Recientemente, sin embargo, se ha comprobado que las tioesterasas FatB, a pesar de tener preferencia por ácidos grasos saturados no siempre están implicadas en su acumulación. Así por ejemplo se han caracterizado las acil-ACP tioesterasas de *Garcinia mangostana*, un árbol tropical que acumula hasta un 50% de 18:0 y sólo un 25% de 18:1 en la semilla (Hawkins y Kridl, 1998). Cuando se medía la actividad tioesterasa del extracto crudo mostraba una mayor preferencia por 18:1-ACP, aunque también tenía una actividad relativamente alta sobre el

18:0-ACP respecto al 16:0-ACP. Se aislaron tres acil-ACP tioesterasas, dos del tipo FatA (FatA1 y FatA2) y una tipo FatB, esta última con una fuerte especificidad por el 16:0-ACP, al igual que la *Cuphea hookeriana*, descrita anteriormente. Una de las FatA (FatA1), aunque mostraba preferencia por el 18:1-ACP tenía una actividad baja sobre el 16:0-ACP con respecto a la que mostraba sobre el 18:0-ACP. Era esta baja actividad sobre el 16:0-ACP lo que distinguía esta enzima de las demás FatA. Cuando esta FatA1 se expresaba en canola el contenido de 18:0 aumentaba desde un 2% hasta un 22%, lo que sugería que FatA1 era responsable, al menos en parte, del alto contenido de 18:0 de *Garcinia mangostana*.

1.1.5. Transferencia de los ácidos grasos al citoplasma. Acil-CoA sintetetasas.

Una vez que las TE han hidrolizado los enlaces tioesteres de los acil-ACP y han liberado los ácidos grasos éstos tienen que ser exportados al citoplasma para ser incorporados en TAG. Sin embargo no se exportan al citoplasma como ácidos grasos libres sino que se esterifican a una molécula de coenzima A formándose los correspondientes acil-CoA. Esta reacción está catalizada por la acil-CoA sintetasa, una enzima que se encuentra en la membrana plastidial (Roughan y Slack, 1982). La reacción enzimática se llevaría a cabo en la misma membrana del plastidio, en la interfase estroma/citoplasma, de manera que la molécula de CoA accedería a la enzima por el lado citoplásmico de la membrana mientras que los ácidos grasos libres se unirían por el lado estromático de la membrana. (Sánchez y Mancha, 1981).

1.2. Modificaciones extraplastidiales de los ácidos grasos.

1.2.1. Desaturaciones

a) Biosíntesis de ácido linoleico.

El ácido linoleico (18:2 Δ 9 c ,12 c) es uno de los ácidos grasos mayoritarios en los aceites vegetales que además tiene gran importancia desde el punto de vista nutricional ya que es un ácido graso esencial para la dieta humana.

La síntesis del ácido linoleico ocurre por desaturación del ácido oleico (18:1 Δ 9 c), introduciendo un segundo doble enlace en configuración *cis* entre los carbonos 12 y 13 por la acción de la *oleil-PC desaturasa* (ODS) también denominada Δ 12 desaturasa, una enzima localizada en la fracción microsomal como se pudo determinar al estudiar la síntesis de este ácido graso en hojas de guisantes (Dubacq et al., 1976). También se

encontró en microsomas de semillas de girasol (Gray y Kekwick, 1996) asociada al retículo endoplásmico rugoso. A diferencia de la $\Delta 9$ desaturasa, que es una desaturasa de acil-ACP, la $\Delta 12$ es una desaturasa de acil-lípido, es decir, que desatura ácidos grasos que van unido a un lípido y no a una proteína como ocurría con la $\Delta 9$ -desaturasa (Murata y Wada, 1995).

En un principio se pensó, por similitud con la $\Delta 9$ -desaturasa, que el sustrato de la $\Delta 12$ -desaturasa era el 18:1-CoA. Sin embargo cuando se incubaban microsomas de semilla de cártamo con [^{14}C]18:1-CoA se observaba que el [^{14}C]18:2 aparecía en primer lugar en la PC, antes que en cualquier otro lípido analizado (Stymne y Appelqvist, 1978). Slack et al. en 1979 llegaron a la misma conclusión trabajando también con semillas de cártamo, ya que al incubar con [^{14}C]18:1-CoA no recuperaban [^{14}C]18:2-CoA sino [^{14}C]18:1-PC, luego parecía confirmarse los resultados que señalaban a la molécula de PC como el sustrato para la $\Delta 12$ desaturasa. Cuando se analizaron las especies moleculares de PC que estaban presentes en microsomas de hoja de guisante (Serghini-Caid et al., 1988) se observó que las que contenían residuos 18:2 eran muy abundantes y constituían aproximadamente un 70% del total, mientras que las que contenían residuos oleil eran escasas y representaban menos del 7%. Estos resultados indicaban que las moléculas de PC que contenían residuos oleil, tan pronto como se formaban eran canalizadas directamente hacia la $\Delta 12$ desaturasa que utilizaría estas 18:1-PC como sustrato. Se hicieron análisis moleculares para determinar con más exactitud en qué posición de la PC tenía lugar la desaturación, concluyéndose que el grupo oleil de los 18:1-CoA se transferían a la posición *sn*-2 de la PC por la acción de la 18:1-CoA lisofosfatidilcolina aciltransferasa, siendo el 1-palmitil(estearil)-2-oleil-PC el sustrato mayoritario (Murphy et al., 1985). Posteriormente esta molécula se convertía en 1-palmitil(estearil)-2-linoleil-PC por la acción de la $\Delta 12$ desaturasa, por lo que tanto la transferencia del oleil como su posterior desaturación ocurrían en la posición *sn*-2 de la PC, existiendo un acoplamiento funcional entre la aciltransferasa y la oleil-PC desaturasa. Además se comprobó que una vez que se producía la desaturación del oleil esterificado en la posición *sn*-2 de la PC, el linoleato formado, mediante un mecanismo de intercambio de acilos, pasaba al conjunto de acil-CoA celular para ser posteriormente utilizado de forma selectiva en la acilación del glicerol-3-fosfato y continuar en la ruta biosintética de los TAG. Según estos resultados, el intercambio de acilos entre los acil-CoA y la PC parece jugar un importante papel en

controlar los ácidos grasos insaturados C₁₈ que están disponibles para la síntesis de aceite durante el desarrollo de la semilla (Stobart et al., 1983).

Actividad ODS durante el desarrollo de semilla.

La síntesis del 18:2 en semillas oleaginosas no ocurre de forma constante durante la formación de una semilla sino que en una determinada etapa del desarrollo se produce un aumento de la síntesis de este ácido graso, debido a un aumento de la actividad ODS. Estudios sobre dicha actividad a lo largo del desarrollo de la semilla de girasol (Garcés y Mancha, 1991) indicaban que se producía un fuerte aumento de la actividad ODS durante el desarrollo de la semilla alcanzando un máximo entre 16-20 DDF y disminuyendo drásticamente a continuación.

Efecto de la temperatura sobre la actividad ODS.

El contenido de los 18:1 y 18:2 de un aceite se ve muy afectado por la temperatura de crecimiento de la planta, de manera que un descenso de la temperatura provoca un aumento en el contenido de 18:2. En semillas de soja y lino (Slack et al., 1978) y de girasol (Garcés et al., 1992) se estudió el efecto de la temperatura sobre el nivel de ambos ácidos grasos y se observó que cuando semillas de plantas cultivadas a una temperatura de 20°C se transferían durante 24 h a 10°C se producía un aumento en la relación 18:2/18:1 tanto en TAG como en PC.

Ensayos de la actividad ODS a diferentes temperaturas indicaron que la temperatura baja estimulaba dicha actividad bien por activación de la enzima o por inducción de la síntesis. Tras ensayar la actividad en presencia o ausencia de cicloheximida (un inhibidor de la síntesis de proteínas) se observó que la actividad ODS era mucho menor en presencia de cicloheximida luego estos resultados indicaban que la estimulación de la actividad ODS por la baja temperatura era una consecuencia de un aumento en la síntesis *de novo* de la enzima (Garcés et al., 1992).

También parecía existir una importante relación entre la actividad ODS y el mantenimiento de la fluidez de membrana relacionado a su vez con la aclimatación de las plantas a los cambios de temperatura ambiental. Aunque Stymne y Stobart en 1985 estudiando la actividad ODS en semillas de cártamo no encontraron ninguna evidencia de que dicha actividad estuviera regulada por un cambio en la fluidez de las membranas

microsomales, parece ser, sin embargo, que existe una relación entre estos dos hechos. En *Synechocystis* (Vigh et al., 1993) el gen *desA* codifica para una desaturasa de acil-lípidos (al igual que la ODS de plantas superiores) que introduce también un doble enlace entre C₁₂-C₁₃. Se observó que al producir un aumento “artificial” de la saturación de la membrana mediante hidrogenación, disminuyendo de esta manera la fluidez de membrana, se estimulaba la expresión del gen *desA*. Por tanto, según estos resultados parece ser que el cambio producido en el nivel de transcritos de la ODS al descender la temperatura está regulado por la fluidez de membrana.

b) Biosíntesis de ácido linolénico.

El ácido α -linolénico (18:3 $\Delta^9c,12c,15c$) es el ácido graso más abundante en la naturaleza ya que es el principal componente de las membranas tilacoidales de los cloroplastos, representando el 65% de los ácidos grasos de los lípidos de la hoja. Sin embargo, a pesar de su importancia se conoce poco sobre su biosíntesis debido a la dificultad para obtener fracciones subcelulares activas donde estudiar su formación.

La síntesis del 18:3 se lleva a cabo a partir del 18:2 mediante la introducción de un tercer doble enlace entre los carbonos 15-16 en configuración *cis* por la acción de otra desaturasa de acil-lípido, la Δ^{15} ó ω^3 -desaturasa, una enzima unida a membrana.

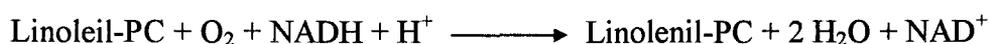
Existen dos posibles sustratos para la Δ^{15} desaturasa, la PC extracloroplástica o el MGDG cloroplástica (Lee y Guerra, 1994). Para llegar a esta afirmación se realizaron incubaciones de homogenados de semillas de soja con [¹⁴C]18:2 (Stymne y Appelqvist, 1980) y se observó que la acumulación de [¹⁴C]18:3 ocurría principalmente en la PC a la vez que disminuía el nivel de [¹⁴C]18:2. Además cuando incubaban hojas de cebada con [¹⁴C]oleil se encontró [¹⁴C]18:3 en la PC, aunque en cantidades muy pequeñas, antes que en el MGDG. Por tanto estos autores excluían cualquier papel del MGDG en la desaturación del ácido linoleico.

Sin embargo cuando las incubaciones de hojas se hacían con [¹⁴C]acetato, el linolenato marcado se acumulaba en los MGDG (Bolton y Harwood, 1978), indicando un importante papel de este glicolípido en la desaturación del 18:2. Incubaciones de hoja de *Vicia faba* con ¹⁴CO₂ (Lem y Williams, 1981) confirmaban el papel del MGDG en la desaturación del 18:2 aunque no excluían la desaturación en la PC. Utilizaron para sus ensayos un herbicida que inhibía la desaturación del 18:2-MGDG, sin embargo, observaban que dicha

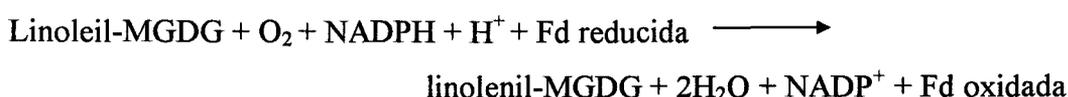
inhibición no era absoluta y que se encontraban pequeñas cantidades de 18:3 radiactivo, por lo que debían existir, al menos, dos sitios de síntesis de 18:3 de los que sólo uno se inhibía por el herbicida. Ellos proponían a la PC extracloroplástica como un segundo lugar de síntesis de 18:3 de manera que el 18:1 que se esterificaba a la PC podía sufrir dos desaturaciones secuenciales formando 18:2 y 18:3. Estos ácidos se transferirían desde la PC y en forma de DAG hasta la envuelta del cloroplasto donde mediante una reacción de galactosilación formaría MGDG. De esta forma, al existir dos rutas de síntesis de 18:3 se sintetizarían grandes cantidades de MGDG que se requieren para formar las membranas tilacoidales.

Por tanto las reacciones enzimáticas serían (Mazliak, 1994):

1) En las membranas del retículo endoplásmico:



2) En las envueltas cloroplásticas:



Además del α -linolénico ($\Delta 9,12,15$) existe otro isómero, el γ -linolénico ($\Delta 6,9,12$) al que se le atribuyen importantes beneficios para la salud. Este ácido graso poliinsaturado es muy abundante en animales mientras que sólo se encuentra en algunas especies vegetales como *Oenothera biennis* ó *Borago officinalis*. En esta última especie se estudió la síntesis del γ -linolénico utilizando sustratos radiactivos, comprobándose que la síntesis se lleva a cabo a partir del 2-18:2-PC sobre la que actúa una nueva desaturasa, la $\Delta 6$ -desaturasa, una enzima también microsomal que introduce un doble enlace entre los carbonos 6 y 7 (Stymne y Stobart, 1986).

1.2.2. Elongación de los ácidos grasos. Biosíntesis de ácidos grasos muy largos.

Se consideran ácidos grasos muy largos (AGML) aquellos que tienen 20 átomos de carbono o más. Normalmente se encuentran formando parte de las superficies protectoras de plantas tales como ceras, cutinas, suberinas, etc...aunque también hay algunas semillas oleaginosas que acumulan grandes cantidades de AGML, generalmente con menos de 24

carbonos, tanto saturados como insaturados normalmente con una sola insaturación. Los AGML entre 24-30 carbonos se suelen encontrar como ésteres de ceras (Gunstone, 1994).

Dentro de las especies que acumulan AGML saturados se encuentran *Nephelium lappaceum* y *Scheleichera trifuga* que acumulan ácido araquídico (20:0), 35% y 30% respectivamente. *Lophira alata* y *Lophira procera* acumulan ácido behénico (22:0), 30% y 20% respectivamente.

Son más abundantes las especies que acumulan AGML insaturados, como es el caso del ácido erúcico (22:1 Δ 13c) que se acumula en semillas de colza (*Brassica napus*) llegando a un 49%, la mostaza (*Brassica alba*) un 43% ó *Crambe abyssinica* un 56%. *Limnanthes alba* acumula hasta un 69% de AGML, incluyendo 20:1(Δ 11), 22:1 (Δ 13) y 22:2 (Δ 5,13); *Lunaria annua* acumula un 43% de 22:1 y un 25% de 24:1 ó el género *Tropaeolum*, que acumula 25% de 20:1 y un 65% de 22:1 (Gunstone et al., 1994).

Las enzimas que sintetizan estos AGML son la *elongasas*, unas enzimas presentes en la fracción microsomal que llevan a cabo la elongación de los ácidos grasos a partir de acil-CoA y malonil-CoA. Los AGML monoinsaturados se suelen sintetizar a partir del 18:1-CoA y malonil-CoA como ocurre en *Lunaria annua* (Fehling y Mukherjee, 1991) o *Tropaeolum majus* (Pollard y Stumpf, 1980a) aunque en otros casos la insaturación se introduce posteriormente, como es el caso de *Limnanthes alba* (*L. alba*) donde una vez que el ácido graso se exporta al citoplasma actuaría una Δ 5-desaturasa sobre el 22:0 (Pollard y Stumpf, 1980b).

Estas enzimas presentan cierta especificidad de sustrato, así por ejemplo en *Lunaria alba* (Fehling y Mukherjee, 1991) se observó que la acil-CoA elongasa a pesar de que elongaba tanto saturados (14:0 hasta 20:0) como monoinsaturados (14:1 hasta 22:1) la reacción transcurría más rápidamente sobre los sustratos C₁₈ y C₂₀. En puerro (*Allium porrum*) la elongasa no utilizaba 18:1-CoA pero sí 20:1 y 22:1, aunque se comprobó que no era una propiedad intrínseca de la enzima ya que cuando se purificarla elongaba C₁₂-C₂₄ (Harwood, 1996).

En cuanto a la localización subcelular se ha estudiado en *L. alba*, donde parece existir un sistema de elongación para acil-CoA saturados, situado en el precipitado de 100.000g y otro para insaturados en la fracción de 15.000g. También en guisante en germinación se han encontrado dos elongasas separadas, la 18:0-CoA y la 20:0-CoA elongasas, pero localizadas ambas en las membranas del retículo endoplásmico (Harwood, 1996).

1.2.3. Otras modificacionesoplastidiales.

Los ácidos grasos naturales con grupos funcionales diferentes al grupo carboxilo o a las insaturaciones son inusuales aunque dentro de estos grupos las hidroxilaciones y epoxidaciones son las más frecuentes.

a) Hidroxilaciones.

Dentro de los hidroxiácidos el ácido ricinoleico (18:1-OH) es el más conocido. Se trata de un ácido graso monoinsaturado con el doble enlace entre los carbonos 9 y 10 en configuración *cis*, al igual que el ácido oleico, pero con un grupo hidroxilo en el carbono 12 (12-hidroxi-octadec-9-enoato). El 18:1-OH es el componente mayoritario del aceite de semilla de *Ricinus communis*, llegando a un 90% del total de ácidos grasos. La enzima que produce la hidroxilación es la Δ -12 hidroxilasa, una enzima microsomal que en un principio se pensó que utilizaba como sustrato el 18:1-CoA ya que al hacer incubaciones con [¹⁴C]18:1-CoA aparecía abundante [¹⁴C]ricinoleil-CoA libre y 2-[¹⁴C]ricinoleil-PC aunque en menor cantidad. Posteriormente se comprobó que la 2-18:1-PC era su sustrato y que el ricinoleil-CoA libre era el resultado de la acción de una fosfolipasa que eliminaba el ricinoleico de los lípidos de membrana. La Δ -12 hidroxilasa requiere también NAD(P)H y utiliza el citocromo b₅ para llevar a cabo la reacción de hidroxilación (Bafor et al., 1991).

b) Epoxidaciones.

Los epoxiácidos se producen por oxidación de ciertos ácidos grasos insaturados, siendo el más conocido el ácido vernólico (ácido 12,13-epoxi-9-octadecanoico) que debe este nombre a que se descubrió en *Vernonia anthelmintica* donde representa un 72%, o en *Euphorbia lagascae* donde alcanza un 58% (Gunstone et al., 1994). Se ha estudiado su biosíntesis y se ha determinado que el ácido vernólico se forma por epoxidación del doble enlace Δ 12 del 18:2 esterificado en las posiciones *sn-1* y *sn-2* de la PC. La enzima se localiza en la fracción microsomal y requiere citocromo b₅ para su actividad.

2. Biosíntesis de glicerolípidos.

Las semillas oleaginosas durante su desarrollo acumulan lípidos de reserva que posteriormente les servirán como fuente de energía para la germinación. Estos lípidos de

reserva básicamente están formados por TAG, que representan alrededor de un 98% por lo que el estudio de su biosíntesis tiene un gran interés.

2.1. Biosíntesis de los triacilglicéridos por la ruta del glicerol-3-fosfato.

La biosíntesis de los TAG tiene lugar en el retículo endoplásmico a través de la *ruta del glicerol-3-fosfato*, también conocida como *ruta de Kennedy* (figura 10) en honor a su descubridor. Esta ruta biosintética se describió en primer lugar en animales y posteriormente se encontró también en plantas. La síntesis se realiza a partir del glicerol-3-fosfato (G-3-P) y los acil-CoA procedentes de la síntesis intraplasmática de ácidos grasos en varias etapas secuenciales en las que diferentes moléculas de acil-CoA se van distribuyendo de forma “no aleatoria” en las tres posiciones del G-3-P. Esta distribución no azarosa de los acil-CoA se debe a que las enzimas que intervienen muestran diferentes especificidades por los acil-CoA (Gurr y Harwood, 1991).

La ruta biosintética se puede dividir en varias fases o etapas:

a) Formación del ácido fosfatídico

La síntesis del ácido fosfatídico (PA) ocurre en dos pasos:

1. G-3-P + Acil-CoA \longrightarrow Ácido 1-acil-lisofosfatídico
2. Ácido 1-acil-lisofosfatídico + Acil-CoA \longrightarrow Ácido fosfatídico

Las enzimas que median estos dos pasos son dos aciltransferasas, la acil-CoA:*sn*-glicerol-3-P aciltransferasa (o glicerol-3-P aciltransferasa; GPAT), que realiza la primera acilación, transfiriendo un acil-CoA a la posición *sn-1* del G-3-P, y la acil-CoA:*sn-1*-acilglicerol-3-P aciltransferasa (ó lisofosfatidil aciltransferasa; LPAAT) que lleva a cabo la transferencia de un segundo acil-CoA a la posición *sn-2* del ácido lisofosfatídico (Stymne y Stobart, 1987).

La selección de los acil-CoA que se van a esterificar en estas posiciones no es al azar sino que las enzimas muestran cierta especificidad. En semillas de cártamo (Griffiths et al., 1985) y girasol (Stymne y Stobart, 1984) se había observado que la GPAT aunque utilizaba todos los sustratos mostraba preferencia por ácidos grasos saturados, especialmente por 16:0 y 18:0. La actividad LPAAT, sin embargo, sí mostró una fuerte preferencia por ácidos grasos insaturados, 18:1 y 18:2, y una total exclusión de los saturados (Griffiths et al., 1985).

En microsomas de *Cuphea lanceolata*, una planta que acumula cerca de un 80% de ácido cáprico (10:0) se observó que cuando se hacían incubaciones de microsomas con diferentes

[^{14}C]acil-CoA ($\text{C}_{10:0}$ -CoA hasta $\text{C}_{18:2}$ -CoA), tanto la GPAT como la LPAAT mostraban preferencia por el 10:0-CoA sobre el resto de los sustratos utilizados (Bafor et al., 1990). En semilla de palma, que acumula un 52% de 12:0 en los TAG, de los que el 62% está esterificado en la posición *sn*-2, la LPAAT mostraba una mayor selectividad hacia el 12:0-CoA que hacia otros sustratos (Oo y Huang, 1989). Por otro lado, en este

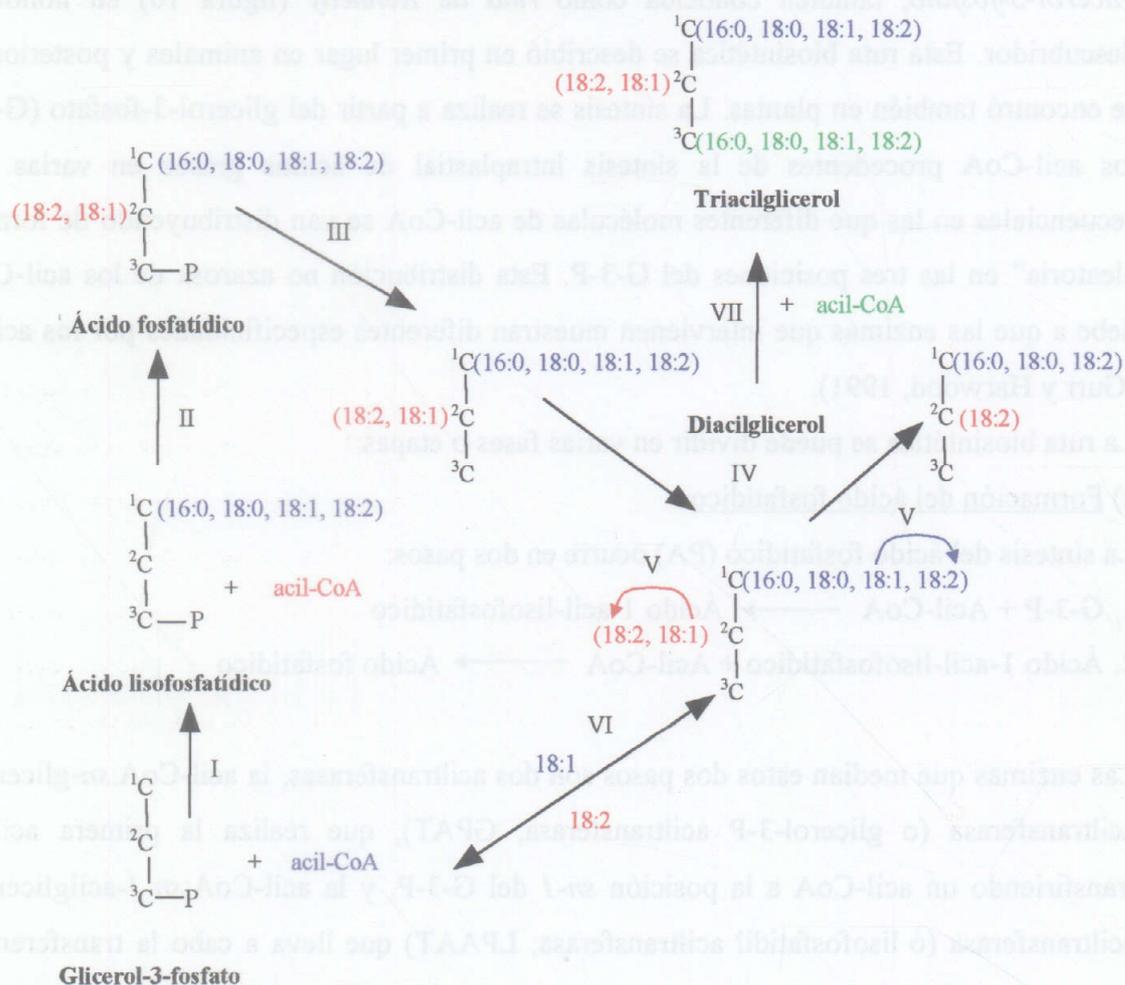


Figura 10. Ruta del glicerol-3-fosfato (o ruta de Kennedy) para la biosíntesis de triglicéridos. I) acil-CoA:sn-glicerol-3-P aciltransferasa; II) acil-CoA:sn-1-acilglicerol-3-P aciltransferasa; III) 3-sn-fosfatidato fosfohidrolasa; IV) colina fosfotransferasa; V) oleil-fosfatidilcolina aciltransferasa; VI) acil-CoA:lisofosfatidilcolina aciltransferasa; VII) diacilglicerol aciltransferasa (Stymne y Stobart, 1987).

mismo trabajo estudiaron la actividad LPAAT en semillas de colza, las cuales acumulan un 40% de ácido erúxico ($22:1\Delta^{13c}$) en su aceite. Observaron cómo la actividad LPAAT era incapaz de utilizar el 22:1-CoA cuando se le suministraba como sustrato. Sin embargo estos

resultados están de acuerdo con el hecho de que aunque las semillas de colza acumulen 40% de 22:1 sólo se esterifica en las posiciones *sn-1, 3* de los TAG.

b) Síntesis de diacilglicéridos.

La enzima *fosfatidato fosfatasa* (3-*sn*-fosfatidato fosfohidrolasa) es la responsable de la hidrólisis del enlace que une el fosfato a la posición *sn-3* del PA, liberando de esta forma fosfato inorgánico y sintetizando los diacilglicéridos.



En semillas de cártamo (Ichihara et al., 1989) se han encontrado dos fosfatidato fosfatasa (FF) diferentes, una soluble y otra unida a membrana, pero ambas dependientes de Mg^{2+} . Determinaron cuál era la velocidad con la que liberaba el DAG a fin de averiguar si esta enzima limitaba de alguna manera la tasa de acumulación de TAG, llegando a la conclusión de que el potencial de la enzima era suficiente para mantener dicha tasa de acumulación por lo que no parecía ser el paso limitante en la síntesis de TAG. También se estudió si la especificidad de la FF afectaba a la composición de ácidos grasos de los TAG. Tanto la FF microsomal de semilla de cártamo como la de cloroplastos de hoja de espinaca preferían los PA diinsaturados (tanto dioleil como dilinoleil) sobre las moléculas 1-palmitil-2-oleil. Las moléculas disaturadas, sin embargo, se defosforilan a una tasa muy baja por lo que la FF selecciona contra dichas especies disaturadas. Sin embargo a pesar de la especificidad mostrada *in vitro* hay que tener en cuenta que debido a las especificidades de GPAT y LPAAT los PA sintetizados *in vivo* son del tipo diinsaturados ó 1-saturado-2-insaturado pero nunca disaturados por lo que la selectividad de la FF contra las moléculas disaturadas probablemente no ocurra *in vivo*. Por tanto según estos resultados parece ser que la acción de la FF no afecta, o muy poco, a la composición de ácidos grasos de los TAG (Ichihara, 1991).

c) Síntesis de triacilglicéridos.

La *diacilglicerol aciltransferasa* (DAGAT) es la enzima que cataliza la última acilación, esterificando un tercer acilo en la posición *sn-3* de la molécula de DAG para sintetizar los TAG. Los DAG son los precursores comunes de la mayoría de los lípidos de membrana extracloroplásticos, PC y PE, así como de los TAG. Por tanto la DAGAT puede ser la enzima

clave para la canalización de los ácidos grasos hacia la síntesis de lípidos de membrana ó de reserva.

En cuanto al estudio de la especificidad de sustrato de esta enzima se hicieron ensayos en semillas de cártamo (Ichihara et al., 1988) utilizando una mezcla de diferentes acil-CoA y se observó que la enzima no mostraba preferencia por ninguno de los sustratos. Estos resultados sugerían que la composición de la posición *sn*-3 de los TAG de cártamo dependía exclusivamente de la composición de los acil-CoA de la célula. También observaron que esta enzima tenía una actividad baja en comparación con las otras dos aciltransferasas por lo que esta reacción parecía ser el paso limitante en la síntesis de TAG *in vivo*.

En semillas de girasol (Wiberg et al., 1994) se obtuvieron resultados diferentes ya que por un lado se observó que la DAGAT mostraba preferencia por el 16:0-CoA en detrimento del 18:0-CoA cuando se utilizaba una mezcla equimolar de 16:0-CoA, 18:0-CoA y 18:1-CoA, y además la actividad de la DAGAT era comparable a la de las otras dos aciltransferasas por lo que no parecía ser el paso limitante. En este mismo trabajo estudiaron la actividad DAGAT en semillas de especies vegetales que acumulaban ácidos grasos inusuales como *Cuphea procumbens* y *Ricinus communis* que acumulan grandes cantidades 10:0 y 18:1-OH respectivamente en sus TAG. La DAGAT de ambas plantas utilizaban selectivamente DAG y acil-CoA con 10:0 y 18:1-OH respectivamente, por lo que estos resultados apoyaban la idea de que la DAGAT jugaba un papel crucial en la canalización de ácidos grasos inusuales hacia los TAG y su exclusión de los lípidos de membrana.

En el caso de semillas que acumulan AGML la DAGAT desempeñaba también un importante papel. En *Lunaria annua*, una crucífera que acumula grandes cantidades de AGML monoinsaturados (22:1 y 24:1) en sus TAG se observó que al analizar las moléculas intermediarias en la síntesis de TAG, tales como PA y DAG, éstas contenían sólo cantidades pequeñas de AGML ya que éstos se esterificaban casi exclusivamente en la posición *sn*-3 de los TAG. Luego según estos resultados sería la DAGAT la enzima que selectivamente esterificaría los AGML a la posición *sn*-3 de los TAG (Fehling y Mukherjee, 1990).

2.1.1. Participación de la PC en la síntesis de TAG. Interconversión de DAG y PC.

La PC juega un papel muy importante en la síntesis de los TAG teniendo una doble participación: 1) por un lado existe un intercambio de acilos entre los acil-CoA y la posición *sn*-2 de la PC, ya explicado anteriormente, de manera que los 18:1-CoA se esterifican en esta

posición *sn*-2 vuelve al conjunto de acil-CoA celular mediante la acción de la acil-CoA:lisofosfatidilcolina aciltransferasa en sentido inverso (Stymne y Stobart 1984a). Con este mecanismo de intercambio de acilos los acil-CoA se van enriqueciendo en ácidos grasos poliinsaturados, especialmente en 18:2-CoA, por lo que existe una mayor disponibilidad de 18:2-CoA para la síntesis de TAG; y 2) se ha demostrado la existencia de una interconversión entre la PC y los DAG mediante ensayos *in vivo* con cotiledones de semillas oleaginosas en los que el [³H]glicerol de la PC aparecía en los TAG, sugiriendo un movimiento de glicerol desde la PC hasta los TAG (Slack et al., 1978).

Posteriormente en microsomas de cártamo (Stobart y Stymne, 1985) se observó que tanto el glicerol como los acilos unidos a la PC se intercambiaban con los DAG sintetizados a partir del PA. También se vio que la reacción de interconversión PC-DAG era reversible y de esta forma los DAG, que contenían 18:1, se transformaban en PC para desaturar el 18:1, produciéndose a continuación la reacción de interconversión pero en sentido inverso, con lo que habría una mayor disponibilidad de DAG poliinsaturados para la síntesis de TAG. Tras realizar ensayos enzimáticos en microsomas de cotiledones de cártamo (Slack et al., 1985) se observó que una enzima, la colinafosfotransferasa, podía catalizar la reacción de interconversión DAG-PC en ambos sentidos, es decir, que a partir de [¹⁴CDP]colina y DAG sintetizaba [¹⁴CDP]PC, sin mostrar preferencia por ninguna especie molecular de DAG en especial, y que al suministrarle PC doblemente marcada era capaz de producir DAG y CDP-colina.

Stymne y Stobart en 1985 habían observado que a partir de la PC se producía síntesis de TAG en ausencia de acil-CoA por lo que podía existir otra manera de sintetizar TAG además de la conocida. Teniendo en cuenta esta idea recientemente se ha propuesto una hipótesis para intentar explicar estos resultados. Según dicha hipótesis (Stobart et al., 1997) puede producirse una reacción de transacilación entre dos moléculas de DAG de manera que se obtendría una molécula de TAG y un MAG, siendo esta reacción reversible y pudiendo ocurrir en ambos sentidos. Dichas transacilaciones *in vivo* pudieran tener su importancia biológica si se considera que de esta forma los oleil esterificados en TAG podría tener una “última oportunidad” para desaturarse y así enriquecer aún más los TAG en ácidos grasos poliinsaturados. Así por ejemplo, una molécula de TAG podría reaccionar con un MAG para dar dos DAG que rápidamente se transformarían en PC sobre las que podrían actuar las desaturasas.

2.2. Biosíntesis de glicerofosfolípidos.

La molécula central a partir de la cual se produce la síntesis de los fosfolípidos es el ácido fosfatídico (PA) que se sintetiza por acilación del glicerol-3-fosfato. El PA sirve como intermediario para la síntesis de la mayoría de los glicerofosfolípidos (figura 11):

a) *Fosfatidilcolina*- La síntesis de la PC fue la primera que se clarificó debido a que es uno de los fosfolípidos más importantes. Se sintetiza a partir del DAG que se obtiene por la defosforilación del PA. La colina puede proceder de varias rutas pero todas relacionadas con el metabolismo de las proteínas. En primer lugar se produce la fosforilcolina por fosforilación de la colina con ATP por la acción de la enzima *colina kinasa*. A continuación intervienen otras dos enzimas, la *colinafosfato citidiltransferasa* y la *1,2-diacilglicerol:colina fosfotransferasa*. Mientras que la colina kinasa es soluble la citidiltransferasa se ha encontrado tanto en el citosol como en el retículo endoplásmico. La citidiltransferasa parece ser la enzima limitante en la síntesis de la PC por lo que su regulación es de gran importancia (Gurr y Harwood, 1991).

La PC se puede sintetizar por otra ruta diferente, a partir de la triple metilación de la PE usando S-adenosilmetionina como donador por medio de la actividad *fosfatidiletanolamina-N-metiltransferasa*.

b) *Fosfatidiletanolamina*- La síntesis de la PE ocurre de forma análoga a la de la PC, es decir, por una serie de reacciones sucesivas llevadas a cabo por la *etanolamina kinasa*, *etanolamina fosfato citidiltransferasa* y *etanolamina fosfotransferasa*. Al igual que en la síntesis de la PC la citidiltransferasa parece ser el paso limitante.

Este fosfolípido se puede formar también por la descarboxilación de la fosfatidilserina por la acción de la enzima *fosfatidilserina descarboxilasa* (Harwood, 1989).

c) *Fosfatidilserina*- Cuantitativamente se trata de un glicerofosfolípido minoritario. La principal ruta de biosíntesis es por sustitución de la colina ó etanolamina por la serina. Parecen ser dos las enzimas que intercambian los grupos: una enzima que cambiaría colina/etanolamina por serina, y una segunda enzima específica para la fosfatidiletanolamina como donador del grupo fosfatidil. Estas actividades que intercambian los grupos se encuentran en la fracción microsomal (Longmuir, 1993).

d) *Fosfatidilglicerol*- El fosfatidilglicerol es el fosfolípido mayoritario de las membranas tilacoidales del cloroplasto, sintetizándose a partir del CDP-DAG en dos etapas: 1)

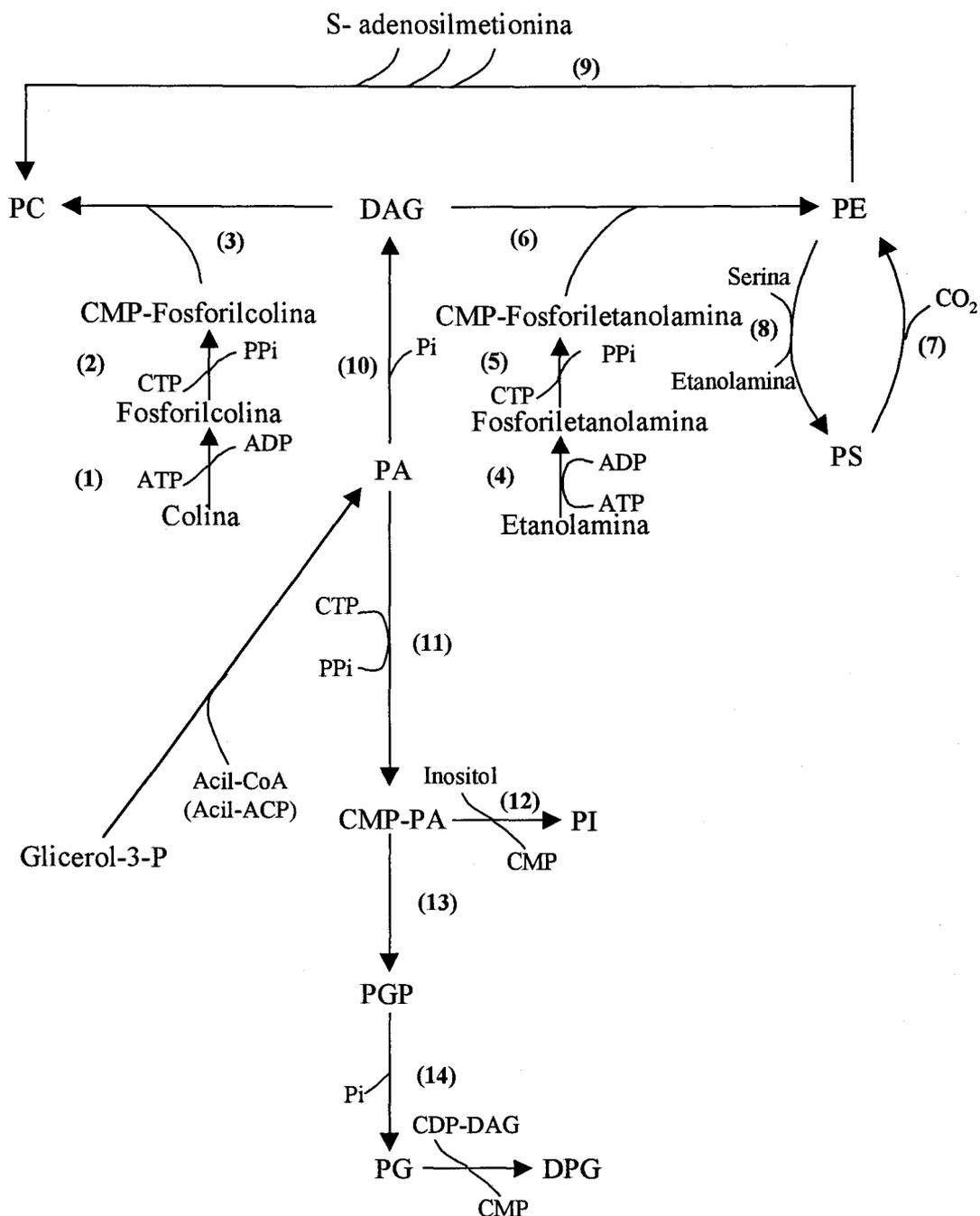
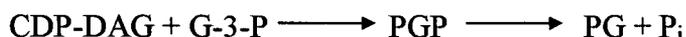


Figura 11. Biosíntesis de glicerofosfolípidos. (1) colina kinasa; (2) colinafosfato citidiltransferasa; (3) 1,2-diacilglicerol:colina fosfotransferasa; (4) etanolamina kinasa; (5) etanolaminafosfato citidiltransferasa; (6) etanolamina fosfotransferasa; (7) fosfatidilserina descarboxilasa; (8) fosfatidiletanolamina:serina fosfatidiltransferasa; (9) fosfatidiletanolamina-N-metiltransferasa; (10) fosfatidato fosfatasa; (11) fosfatidato:CDP-diacilglicerol citidiltransferasa; (12) fosfatidilinositol sintetasa; (13) fosfatidilglicerol fosfato sintetasa; (14) fosfatidilglicerol fosfato fosfatasa (Gurr y Harwood, 1991).

combinación del CDP-DAG con G-3-P para formar fosfatidilglicerol-3-fosfato (PGP); 2) hidrólisis del PGP para formar el fosfatidilglicerol (PG). El glicerol se une al fosfato en la posición *sn-1*. Esta ruta biosintética a partir del CDP-DAG se ha encontrado en procariontas, levaduras, células animales y plantas. La ruta de síntesis es la siguiente:

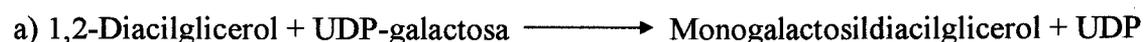


e) *Fosfatidilinositol*- La biosíntesis del PI se ha estudiado con detalle en levaduras y en células animales donde tiene un importante papel como precursor de mensajeros celulares. En plantas se encuentra formando parte de las membranas celulares pero es un lípido minoritario. Al igual que el PG, el PI se sintetiza a partir del CDP-DAG al que se le une una molécula de inositol por la acción de la *fosfatidilinositol sintetasa*, formándose el PI (Gurr y Harwood, 1991). En levaduras y animales el PI puede fosforilarse de forma secuencial al reaccionar con ATP formándose derivados fosforilados (PI-4-P y PI-4,5-BP), por la acción de dos enzimas kinasas asociadas a membrana. Posteriormente actuaría una fosfolipasa C específica que formaría 1,4,5-trifosfato y DAG, dos moléculas que actuarían como segundos mensajeros (Longmuir, 1993).

2.3. Biosíntesis de galactosilglicéridos.

Los galactosilglicéridos ó galactolípidos (GaLP), MGDG y DGDG, son los constituyentes mayoritarios de las membranas tilacoidales del cloroplasto representando un 75% del total de los lípidos tilacoidales (50% y 25% respectivamente). Dado que dichas membranas cloroplásticas contienen cerca del 70% de los lípidos de hojas, los galactolípidos son cuantitativamente los lípidos de membrana más importantes de la naturaleza.

Los GaLP se sintetizan en los cloroplastos, en el caso de tejidos fotosintéticos, ó en los plastidios, en los tejidos de reserva. La biosíntesis de los GaLP ocurre por la transferencia secuencial de dos moléculas de galactosas a partir de la UDP-galactosa por medio de dos galactosiltransferasas, sintetizándose primero el MGDG y posteriormente el DGDG. Las reacciones ocurren de la siguiente forma (Harwood, 1989):





Las dos galactosilaciltransferasas muestran ligeras diferencias en sus características enzimáticas ya que la primera forma enlaces α-glicosídicos y la segunda β-glicosídicos.

Los GaLP de hojas se caracterizan por tener un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados (16:3 ó 18:3), clasificándose las plantas como “plantas 16:3” ó “plantas 18:3”. Así por ejemplo, la espinaca (*Spinacia oleracea*) es una “planta 16:3” que posee en los GaLP de hojas ácidos grasos C₁₈ en posición *sn-1* y C₁₆ en *sn-2* y utiliza para la síntesis DAG cloroplástico.

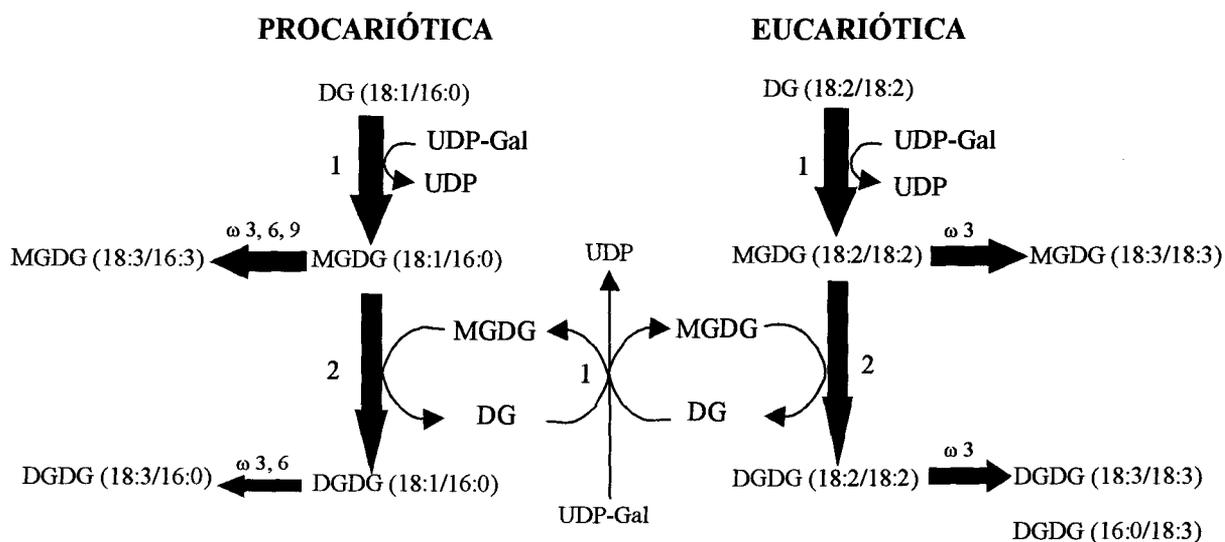


Figura 12. Esquema simplificado de la síntesis de galactolípidos por las rutas pro- y eucariótica. Abreviaturas para las enzimas: 1, UDP-Gal:diacilglicerol galactosiltransferasa; 2, galactolípido:galactolípido galactosiltransferasa; ω_{3,6,9}, ω₃, ω₆, ω₉ desaturasas (Heemskerk et al., 1991).

Esta es la única clase de GaLP que existe en cianobacterias por lo que se ha considerado como producto de una ruta procariótica residual de síntesis de glicerolípidos en plantas superiores por lo que se denomina “ruta procariótica” (Gardiner et al., 1984). Las especies moleculares predominantes son MGDG (18:3/16:3) y DGDG (18:3/16:0) (Heemskerk et al., 1991).

Las “plantas 18:3”, como el girasol, poseen ácidos grasos C₁₈ tanto en *sn-1* como en *sn-2*, y el DAG que utiliza en este caso es extracloroplástico y proviene directamente de la PC, denominándose por ello “ruta eucariótica”. Las especies moleculares predominantes tanto

para MGDG como DGDG son 18:3/18:3 aunque algunos DGDG son del tipo 16:0/18:3 y otras especies moleculares minoritarias poseen 18:2 (Heemskerk et al., 1991) (figura 12).

Mientras que ambas rutas operan simultáneamente en las “plantas 16:3” produciendo una mezcla de especies moleculares de GaLP, en las especies vegetales más avanzadas, pertenecientes al tipo “plantas 18:3”, la ruta procariótica parece estar abandonada por lo que los GaLP tendrán una composición más simplificada (Harwood, 1989).

V. BIOSÍNTESIS DE LOS LÍPIDOS DE RESERVA DURANTE EL DESARROLLO DE LA SEMILLA

1. Síntesis activa de lípidos de reserva.

La síntesis de TAG de reserva en semillas oleaginosas no ocurre de forma gradual y constante durante la formación de la semilla sino que hay una etapa específica de acumulación rápida de lípidos que se inicia sólo cuando ha transcurrido aproximadamente la cuarta parte del desarrollo de la semilla. Durante dicha etapa de síntesis activa de lípidos se produce un aumento drástico de la tasa de biosíntesis de AG debido a un incremento de determinadas actividades enzimáticas implicadas en la ruta de biosíntesis.

En semillas de cártamo (Hill y Knowles, 1968) se había observado un incremento muy rápido del contenido lipídico de la semilla entre 10-15 DDF alcanzando un máximo a los 25 DDF. Otros autores habían determinado, también en semillas de cártamo, que el contenido lipídico en semillas inmaduras (0-10 DDF) era menor del 2%, mientras que la mayor acumulación de TAG se producía entre los 14-18 DDF a una tasa de 1,5 μmol por semilla y por día. A los 20 DDF el contenido de TAG era de 10 μmoles por semilla manteniéndose constante en etapas posteriores aunque se observaba un aumento del porcentaje de TAG debido a la pérdida de humedad (Ichihara y Noda, 1980).

En semillas de soja en desarrollo también había una etapa donde la síntesis de TAG era máxima, entre los 19-50 DDF, siendo la tasa de acumulación lipídica mucho más lenta en etapas posteriores (García et al., 1988; Privett et al., 1973).

En semillas de girasol entre los 14-18 DDF se producía una importante acumulación de lípidos, pasando de un 16% a un 50% de aceite /peso seco de semilla desde los 14 DDF hasta los 18 DDF. A partir de este momento y hasta que alcanza la madurez fisiológica (a los 35 DDF) el contenido de aceite se mantenía más o menos constante (Robertson et al., 1978). Otros autores habían descrito una etapa más amplia de acumulación de aceite, comenzando a los 10 DDF hasta los 20 DDF produciéndose sólo un pequeño incremento en el contenido de aceite en etapas posteriores (Monga et al., 1983; Luthra et al., 1991; Garcés et al., 1989). Por otro lado la síntesis de los diferentes componentes de los lípidos de semilla (TAG y LP) ocurre en etapas diferentes, ya que por ejemplo en semillas más jóvenes (menos de 8 DDF) los TAG sólo representaban un 50% de los LT, mientras que los LP llegaban a sobrepasar un 25%, sin embargo a partir de los 12 DDF aumentaba de forma importante la síntesis de TAG

los cuales representaban un 87% de los lípidos totales de la semilla mientras que los LP sólo eran el 10%. A medida que la semilla va madurando aumentaban aún más los TAG y disminuían los LP, llegando los TAG a representar hasta un 94% mientras que los LP sólo un 2,7% de los LT de la semilla madura (Garcés et al., 1989).

Ensayos de incorporación de $[1-C^{14}]$ acetato en semillas de girasol en formación realizadas por Monga et al. en 1983 habían obtenido similares resultados, de forma que en semillas muy jóvenes de menos de 10 DDF se producía una mayor incorporación de radiactividad en LP que en TAG, debido posiblemente a la síntesis de nuevas membranas, mientras que en semillas de hasta 20 DDF existía una incorporación muy importante de radiactividad en TAG coincidiendo con el periodo de síntesis masiva de TAG en la semilla.

2. Almacenamiento de lípidos de reserva en el interior de los oleosomas.

Al examinar al microscopio electrónico una semilla oleaginosa en fase activa de acumulación lipídica se pueden apreciar unas partículas esféricas que presentan una matriz opaca y una capa densa a los electrones rodeando a la matriz. Estas partículas contienen en su interior los lípidos de reserva que se han sintetizado durante el desarrollo de la semilla, por lo que se les ha denominado *cuerpos de aceite*, *oleosomas* ó *esferosomas*. Tienen forma esférica y un diámetro entre 0,2-2,5 μm dependiendo de la especie vegetal.

Se pueden obtener preparaciones de oleosomas relativamente puras a partir de homogenados de semillas los cuales contienen 92-98% de lípidos neutros, 1-4% de lípidos polares y 1-4% de proteínas. Los *lípidos neutros* se encuentran formando parte de la matriz, son básicamente TAG y como componentes minoritarios contiene DAG y ácidos grasos libres. Los *lípidos polares* se encuentran formando una monocapa de 2-6 nm de espesor que rodea la matriz de TAG, mayoritariamente están compuestos por PC y en cantidades menores por PS, PE y PI. Se disponen de forma que los grupos acilos hidrofóbicos interaccionan con la matriz de TAG y la parte hidrofílica está orientada al citosol. Las *proteínas* más abundantes son las *oleosinas*, unas proteínas exclusivas de los oleosomas, aunque también se encuentran citocromo c reductasas y algunas lipasas (Gurr y Harwood, 1991).

En cuanto a las *oleosinas* son proteínas alcalinas de bajo peso molecular habiéndose determinado su secuencia de aminoácidos en maíz, *Brassica* ó soja. Poseen tres dominios estructurales de los que el dominio central es hidrofóbico y muy conservado en todas las especies por lo que debe tener un papel importante (Huang, 1992). Las oleosinas parecen

tener diversas funciones, entre ellas la de estabilizar a los oleosomas ya que al estar embebidas en la monocapa de LP interaccionan con ellos y con la matriz de TAG formando así una barrera estable y cohesiva; además las oleosinas protegen la integridad de la monocapa impidiendo que las fosfolipasas degraden los fosfolípidos (Murphy, 1993).

2.1. Biogénesis de los oleosomas.

Existen diferentes modelos que intentan explicar cómo ocurre la formación de los oleosomas. Uno de los modelos que se propusieron después de analizar los oleosomas de semilla de ricino (Schwarzenbach, 1971), sugería que los TAG parecían sintetizarse entre la membrana interna y externa de una unidad de membrana, quedando “secuestrados” en el espacio entre dos monocapas de LP. Finalmente sería la membrana externa la que permanecería alrededor del oleosoma. A esta misma conclusión llegaron Moreau et al. en 1980 al estudiar también oleosomas de semillas de ricino, ya que observó que los niveles de varios de sus componentes - lípidos, lipasa, citocromo c reductasa y proteínas- aumentaban y disminuían de forma paralela durante la maduración de la semilla mostrando un patrón muy similar, por lo que se propuso que el oleosoma completo se sintetizaba como una sola unidad y que ningún componente se añadía ó eliminaba durante el desarrollo.

Un segundo modelo proponía que los oleosomas no se originaban ya rodeados por una membrana sino que cuando las semillas eran jóvenes aparecían como “gotas” lipídicas y posteriormente se rodeaban por una capa de retículo endoplásmico rugoso (figura 13) (Bergfeld et al., 1978).

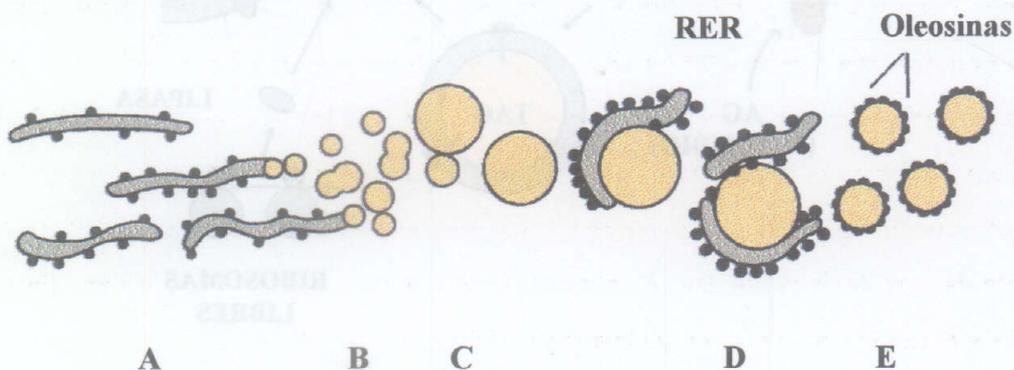


Figura 13. Modelo propuesto por Bergfeld et al. en 1978 para la ontogenia de oleosomas en plantas. (A) Síntesis de TAG en el retículo endoplásmico por la ruta de Kennedy; (B) acumulación de TAG en el espacio entre la bicapa lipídica; (C) eventualmente gotas de TAG rodeadas por una monocapa de fosfolípidos se separa del RE para formar oleosomas inmaduros; (D) los oleosomas inmaduros se rodean por RE rugoso y comienzan a recubrirse por oleosinas; (E) oleosomas maduros rodeados por una cubierta de oleosinas (Murphy 1993).

Otros modelos proponían que en primer lugar se formarían los oleosomas, constituidos solamente por la matriz de TAG y una monocapa de LP, y posteriormente se unirían las oleosinas. Este modelo se planteó después de aislar oleosomas de semillas inmaduras de ciertas crucíferas y observar que prácticamente no contenían proteínas, mientras que cuando los oleosomas se aislaban de semillas maduras, entre 10-12% del peso correspondía a proteínas, la mayor parte de las cuales eran oleosinas. Por tanto según este modelo los oleosomas se formaban inicialmente como una “gota” de TAG rodeados por una capa de fosfolípidos y posteriormente se unirían las oleosinas que se sintetizaban en el RE. Sin embargo este modelo no da explicación alguna sobre cómo las oleosinas pasan del RE a los oleosomas (Murphy, 1993).

Modelos más recientes, sin embargo, proponen que las oleosinas se sintetizaban en los ribosomas asociados al RE, aunque aparentemente no entrarían en el lumen del RE sino que a medida que se sintetizan se irían disponiendo entre ambas capas de LP (figura 14) (Huang, 1992).

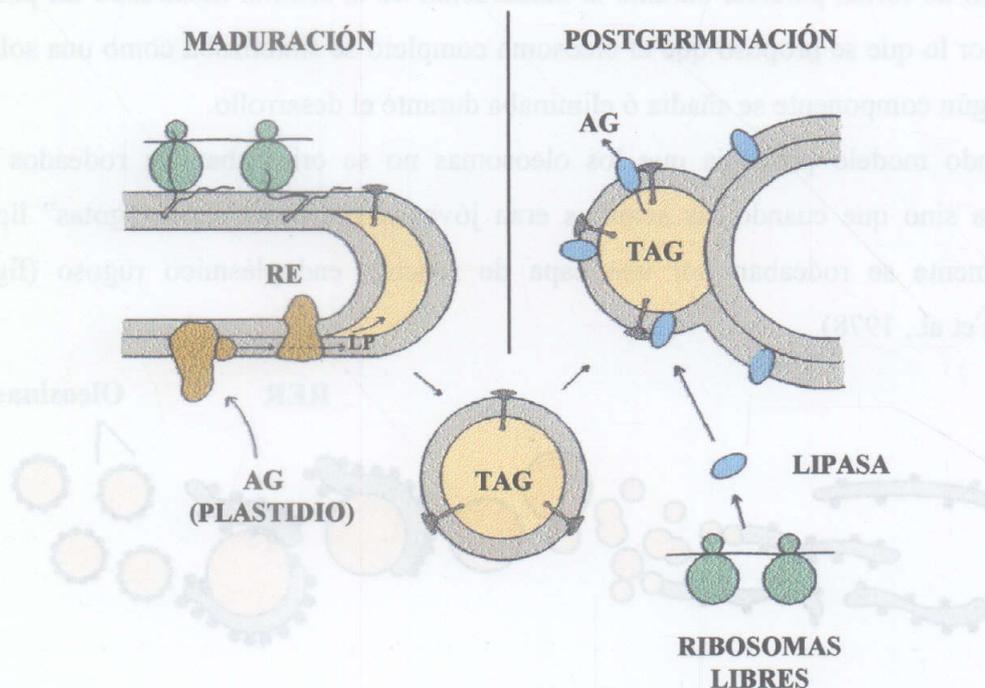


Figura 14. Modelo de síntesis y degradación de oleosomas en embriones de maíz durante la maduración de la semilla y la germinación (Huang 1992).

3. Modificación de la composición de los lípidos durante la formación de la semilla.

La composición de ácidos grasos de los lípidos de semilla, determinada principalmente por el genotipo de la planta, no se mantiene constante durante la formación de la semilla sino que a medida que la semilla va madurando los niveles de los diferentes ácidos grasos varían, debido a la expresión temporal específica de las enzimas que participan en la síntesis de los mismos. En este sentido se ha estudiado la variación de la composición de AG de los lípidos de numerosas semillas oleaginosas. En soja (Privett et al., 1973; Cherry et al., 1983) los porcentajes de 16:0 y 18:0 eran relativamente más altos en estadios tempranos del desarrollo, disminuyendo posteriormente, mientras que los porcentajes de 18:1 y 18:2 eran bajos inicialmente pero incrementan a medida que la semilla maduraba, mientras que el 18:3 aumentaba rápidamente al principio y después disminuía. En canola también se estudió la modificación de los porcentajes de los AG durante la maduración de la semilla (Rakow y McGregor, 1975), produciéndose también una disminución gradual de 16:0 y 18:0 durante la maduración. El 18:1 y 18:3 eran los ácidos grasos que más variaban, aumentando a partir de los 14 DDF, mientras que el 18:2 disminuía ligeramente. En cártamo (Hill y Knowles, 1968) también se observaba una disminución de los saturados (16:0 y 18:0) y un importante aumento de 18:2 a medida que la semilla avanza en su desarrollo. En girasol (Robertson et al., 1978; Garcés et al., 1989) las modificaciones que se observaron coincidían con las de cártamo, ya que los porcentajes de 16:0 y 18:0 disminuían gradualmente a medida que la semilla maduraba, produciéndose a la vez un aumento progresivo de 18:2. Por tanto, parece que la tendencia de las semillas oleaginosas durante su maduración es disminuir el contenido de saturados y aumentar el de insaturados, de ahí la consistencia líquida de los aceites vegetales.

4. Efecto de la temperatura de cultivo sobre la composición de ácidos grasos de los lípidos de semilla.

A pesar de que la composición de AG de los lípidos de semilla viene determinada principalmente por el genotipo, factores ambientales tales como la luz o la temperatura de cultivo modifican también, en cierta medida, la composición de un aceite. Dicho efecto se ha estudiado en soja (Rennie y Tanner, 1989) analizando los lípidos de semillas desarrolladas a 15/12°C y a 40/30°C (día/noche). A temperatura baja se observaba un ligero descenso del porcentaje de 16:0 mientras que el 18:0 se mantenía constante. Los niveles de 18:1 y 18:2

sufrían cambios más importantes, aumentando el 18:2 y disminuyendo el 18:1 cuando la temperatura era más baja. En colza (Trémolières et al., 1982) los cambios de temperatura sólo modificaban significativamente el porcentaje de 18:1, que aumentaba de forma importante al subir la temperatura de cultivo. A diferencia de lo que ocurría en soja el porcentaje de 18:2 en colza prácticamente no variaba con la temperatura. En cártamo y ricino (Canvin, 1965) la composición de ácidos grasos del aceite permanecía prácticamente constante y no se veía afectada por los cambios de temperatura, mientras que en lino los porcentajes de 18:2 y 18:3 aumentaban al bajar la temperatura, produciéndose a la vez una disminución de 18:1. También en girasol se había estudiado con anterioridad la modificación de la composición del aceite al variar la temperatura (Harris et al., 1978; Fernández-Martínez et al., 1986) observándose un marcado incremento de los niveles de 18:2 junto con una disminución de 18:1 al descender la temperatura de cultivo. Por tanto, el efecto de la temperatura es el mismo en todas estas semillas oleaginosas, es decir, prácticamente no se observan variaciones en los porcentajes de AG saturados, mientras que, de forma general, se produce un aumento del porcentaje de 18:2 al bajar la temperatura de cultivo.

VI. UTILIZACIÓN DE LA RESERVA LIPÍDICA DURANTE LA GERMINACIÓN DE LA SEMILLA. DEGRADACIÓN DE LOS OLEOSOMAS.

1. Disminución de la reserva lipídica y síntesis de nuevos lípidos durante la germinación.

Durante la germinación de las semillas oleaginosas se produce la degradación de los lípidos de reserva acumulados durante el desarrollo de la semilla así como la síntesis de nuevos lípidos, fundamentalmente glicerofosfolípidos, para las nuevas membranas celulares del tejido en desarrollo, y, en menor medida TAG.

En ricino, donde el proceso de germinación se ha estudiado en detalle, se producía un aumento importante del peso fresco del cotiledón entre 2-6 días después de la siembra (DDS), alcanzando un peso cuatro veces superior al de la semilla seca. Al mismo tiempo, el contenido lipídico de la semilla se mantenía constante durante los dos primeros días, disminuyendo posteriormente de forma progresiva hasta que a los 7 DDS se había consumido casi en su totalidad (Muto y Beevers, 1974). En cártamo (Ichiara y Noda, 1980) también se producía un fuerte incremento en el peso fresco del cotiledón, pasando de 17,5 mg/ semilla (a los 4 DDS) a 214 mg/ semilla (a los 8 DDS). El contenido de TAG permanecía sin variar durante los dos primeros días de germinación pero disminuía rápida y linealmente $1\mu\text{mol/ semilla}$ hasta los 6 DDS. A la vez que los TAG se iban degradando se sintetizaban nuevos LP, tanto fosfolípidos como galactolípidos. Respecto a los primeros el contenido total no variaba durante los dos primeros días aunque posteriormente aumentaban, sobre todo PC y PE, los cuales alcanzaban un máximo a los 4 DDS, mientras que PG continuaba aumentando hasta los 8 DDS. También había una síntesis importante de MGDG y DGDG ya que estos dos lípidos se encuentran formando parte de las membranas tilacoidales. También se ha estudiado la germinación en semillas de soja (Wilson y Kwanyuen, 1986) donde los lípidos totales disminuían desde 20,9 a $5,8\mu\text{mol/cotiledón}$ entre los 4 y 8 DDS. Durante ese periodo los TAG disminuían, pasando de un 82% a un 58% de los LT (desde los 4 a los 8 DDS), mientras que los LP aumentaban de forma importante debido a nueva síntesis pasando de un 17 a un 40% de los LT en el mismo periodo. A los 12 DDS el contenido de LT era de $3,1\mu\text{mol/ cotiledón}$, de los que un 24% eran TAG y un 71,8% LP. A pesar de que durante la germinación fundamentalmente se sintetizan fosfolípidos para las nuevas membranas también se produce síntesis de TAG como se comprobó tras realizar incubaciones con $[^{14}\text{C}]$ -acetato (Wilson y Kwanyuen, 1986; Harwood, 1990).

2. Degradación de los oleosomas durante la germinación.

Durante la germinación de la semilla se produce la degradación de los oleosomas y la hidrólisis de los TAG de reserva, liberándose los ácidos grasos que serán transformados en carbohidratos necesarios para el desarrollo de la plántula. Las *lipasas* son las enzimas que hidrolizan los TAG, posteriormente los ácidos grasos que se han liberado saldrán del oleosoma y entrarán en otro compartimento celular, los *glioxisomas*, donde se metabolizarán hasta acetil-CoA a través de un proceso oxidativo denominado *β -oxidación*. También en los glioxisomas este acetil-CoA, mediante el *ciclo del glioxilato*, se transformará en malato que servirá como fuente de oxalacetato para la *gluconeogénesis*. De esta forma las semillas en germinación son capaces de convertir el carbono de los lípidos almacenados en glucosa (Huang, 1992).

2.1. Hidrólisis de los TAG de reserva.

Las lipasas son las enzimas responsables de la degradación de los TAG que están almacenados en el interior de los oleosomas, aunque no se sabe con certeza cómo es el mecanismo de acción de estas enzimas.

La actividad lipasa se ha estudiado con gran detalle en semillas de ricino, las cuales acumulan un 85% de ácido ricinoleico (18:1-OH). En estas semillas se encontraron dos lipasas (Muto y Beevers, 1974), una con pH óptimo ácido que estaba presente en la semilla seca, con gran actividad durante los primeros días de germinación, y una segunda con pH óptimo alcalino particularmente activa en un estadio posterior. La lipasa alcalina se encontraba asociada a la membrana glioxisomal e hidrolizaba los MAG pero no los TAG mostrando cierta especificidad dependiendo del acilo que estuviera esterificado al glicerol. Aunque no quedaba resuelto cómo esta lipasa glioxisomal podía hidrolizar los lípidos situados en otro compartimento celular, se ha pensado en la posibilidad de un contacto físico entre los glioxisomas y los oleosomas (Huang, 1992). La lipasa ácida se localizaba en la membrana de los oleosomas y aunque hidrolizaba los MAG en mayor medida también hidrolizaba tanto DAG como TAG. Dado que la lipasa alcalina no actuaba sobre los TAG parecía que la actividad de esta enzima dependía de la actividad previa de la lipasa ácida. Además concluyeron que dado que no se acumulaban ácidos grasos libres parecía que la lipasa ácida no atacaba a los lípidos de reserva de los oleosomas antes del tercer día de germinación cuando la actividad de la lipasa alcalina era ya apreciable. Sin embargo Donaldson en 1977 sí

observó una acumulación de ácido ricinoleico en semillas de ricino en germinación llegando a alcanzar un 30% de los lípidos totales después del sexto día de germinación. La acumulación de este ácido graso parecía indicar que la actividad lipasa y la β -oxidación no estaban totalmente coordinadas en este tejido.

Ensayos de la actividad lipasa alcalina de semilla de ricino realizados posteriormente utilizando su sustrato nativo (es decir, la triricinoleína) (Maeshima y Beevers, 1985) indicaron que esta enzima sí podía hidrolizar los TAG nativos, en contra de lo publicado anteriormente. Estos autores también situaron la enzima asociada a la membrana del glioxisoma siendo accesible al sustrato por el lado externo del glioxisoma.

En cuanto a la lipasa ácida cuyo pH óptimo era de 4,5-5 y aparecía en la semilla seca (sólo existía en semilla seca de ricino pero en ninguna otra especie vegetal), no estaba claro cómo esta enzima no atacaba a los TAG durante la maduración de la semilla. Además, esta circunstancia unida al hecho de que el citoplasma celular está a un pH más cercano a la neutralidad y que la enzima se inactivaba a un pH superior a pH 6,0, hacía pensar en la posibilidad de que esta lipasa no desempeñara ningún papel en la lipólisis *in vivo*. En oleosomas de semillas de ricino en los primeros estadios de germinación se encontró una lipasa que era activa a pH neutro, que se correspondía con el pH citoplasmático, y además estaba ausente en la semilla seca. Esta lipasa podía hidrolizar directamente TAG. Además en otras semillas oleaginosas también se encontró una lipasa asociada a la membrana del oleosoma que era activa a pH neutro (Hills y Beevers, 1987).

Existe cierta controversia en cuanto a la hidrólisis de las diferentes especies moleculares de los TAG durante la germinación, ya que por un lado algunos autores piensan que dicha hidrólisis es al azar, sin que se observe ninguna variación en la composición de AG de los TAG (Harwood, 1975), mientras que otros autores piensan que hay ciertas especies moleculares que son preferentemente hidrolizadas debido a cierta especificidad de sustrato de las lipasas. En semillas de soja en germinación (Lin et al., 1982) se encontró una lipasa alcalina, ausente en semillas secas, que mostraba especificidad por sustrato ya que cuando se le suministraban diferentes especies moleculares de TAG fundamentalmente hidrolizaba monolinoleína, y en menor medida di- y trilinoleína, pero no podía hidrolizar trioleína, tristearina ni tripalmitina. Sin embargo, posteriormente analizando los TAG residuales durante la germinación de semillas de soja se comprobó que las especies moleculares con AG más cortos se metabolizaban preferentemente a aquellas con AG más largos, además de

observarse una mayor hidrólisis de los TAG con AG saturados con respecto a especies moleculares más insaturadas (Yoshida, 1984). También en semillas de canola en germinación se encontraron dos lipasas, una asociada a los oleosomas (pH óptimo 9.0) y otra microsomal (pH óptimo 7.5), ésta última con especificidad por sustrato ya que mostraba una actividad de 2-4 veces superior sobre los TAG que contenían ácidos grasos monoinsaturados (ácidos oleico y erúxico) que sobre los que contenían ácidos grasos saturados (Hills y Murphy, 1988). Una vez que las lipasas han hidrolizado los TAG, cuando el periodo de germinación ha terminado, se puede observar en el citoplasma de las células de los cotiledones los oleosomas vacíos también llamados oleosomas “fantasmas” que siguen manteniendo su integridad aunque no se conoce con exactitud cuál será su destino (Huang, 1992).

VII. MODIFICACIÓN DE LOS LÍPIDOS DE PLANTAS

1. Disponibilidad de aceites y grasas.

Los aceites y grasas juegan un importante papel en la nutrición humana debido a su alto contenido energético. Aproximadamente el 90% de los aceites vegetales que se producen se destinan al consumo humano, fundamentalmente a fabricación de margarinas, pastelería, aceites de fritura ó aceite de mesa, y sólo el 10% restante tiene aplicaciones industriales como lubricantes, pinturas, jabones ó detergentes. El hecho de que un aceite se destine o no al consumo humano depende de sus propiedades, que vienen determinadas, en parte, por su composición de ácidos grasos.

Los aceites vegetales destinados al consumo humano (soja, palma, colza, girasol, algodón, cártamo...) se componen básicamente de 16:0, 18:0, 18:1, 18:2 y 18:3, en unas proporciones determinadas que son características de cada aceite (tabla 5).

Tabla 5. Composición de ácidos grasos de algunos aceites y grasas comestibles.

Aceite	Composición de ácidos grasos (mol %)				
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
Algodón	22,2	2,5	17,8	55,2	-
Cacao	25,2	35,5	35,2	3,2	-
Cártamo	5,9	1,5	8,8	83,8	-
Canola	3,9	1,8	60,8	23,9	9,6
Girasol	5,9	4,1	21,5	67,5	-
Oliva	12,9	2,8	72,2	10,5	0,7
Palma	44,0	4,5	39,2	10,5	0,7
Soja	11,4	3,7	22,9	53,6	8,4

Como se observa en la tabla 5, a excepción del aceite de palma y la manteca de cacao, los aceites vegetales se caracterizan por su alto contenido en ácidos grasos insaturados (60-90%), fundamentalmente 18:1 y 18:2, y por tener un porcentaje de ácidos grasos saturados bastante inferior, oscilando entre un 24% del aceite de algodón y un 6% del aceite de colza. El aceite de palma y la manteca de cacao representan una excepción ya que tienen un contenido muy superior de saturados, entre 44-60%, siendo grasas sólidas o semisólidas a temperatura ambiente, a diferencia de los aceites vegetales que son líquidos.

Además de estos ácidos grasos existen en la naturaleza un gran número de ácidos grasos *inusuales*- con una longitud de cadena diferente, grupos funcionales epoxi ó hidroxí- que le confieren propiedades físicas y químicas de gran interés para la industria química. Sin embargo presentan la desventaja de que se acumulan en especies vegetales no cultivables por lo que carecen de importancia desde un punto de vista económico (Töpfer et al., 1995). Por tanto si se consigue modificar la composición de ácidos grasos de un aceite se podría incrementar su valor económico. El valor de un cultivo oleaginoso puede ser potenciado simplemente por eliminación de una característica indeseable de un aceite como puede ser la reducción de los niveles de 18:3 del aceite de soja, ya que este ácido graso reduce la estabilidad oxidativa del aceite, o aumentando el contenido de otro ácido graso considerado saludable y estable como es el 18:1 con la intención de conseguir un aceite ideal como aceite de fritura. Por otro lado, el aumento de los niveles de ácidos grasos saturados aumentaría la consistencia del aceite de manera que serían semisólidos a temperatura ambiente. Alternativamente un aceite se puede modificar haciendo que la planta acumule en sus lípidos de reserva un ácido graso inusual y novedoso que sea de interés para la industria farmacéutica, química o de otro tipo.

1.2. Hidrogenación

Uno de los principales usos a los que se destinan los aceites vegetales en alimentación es la fabricación de margarinas para lo cual se requieren grasas que a temperatura ambiente tengan una consistencia semisólida. Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, los aceites vegetales disponibles, debido a su alto contenido en ácidos grasos insaturados son líquidos a temperatura ambiente por lo que tradicionalmente se tenía que recurrir a procesos de hidrogenación parcial de los aceites vegetales, fundamentalmente aceite de soja, para obtener grasas más sólidas. El consumo de aceite de soja hidrogenado aumentó espectacularmente a mediados de la década de los ochenta debido entre otras causas a una importante campaña de mercado realizada por los EEUU consiguiendo desplazar al aceite de palma, una grasa sólida natural, en la preparación de muchas comidas precocinadas (Willet, 1994b).

La hidrogenación es un proceso químico que utiliza altas temperaturas, hidrógeno y ciertos catalizadores metálicos, normalmente níquel, para convertir un aceite vegetal líquido en una grasa sólida. El proceso de hidrogenación que se lleva a cabo sobre los aceites vegetales no es

completo ya que de esta forma se obtendrían grasas demasiado sólidas, sino que se trata de un proceso parcial a fin de conseguir grasas semisólidas con una textura adecuada. Este proceso químico produce un cambio en las propiedades físicas y químicas de los lípidos ya que parte de los ácidos grasos insaturados se transforman en saturados, con un punto de fusión más elevado, y por otro lado se producen isomerizaciones de los dobles enlaces (Patterson, 1983). Los isómeros artificiales pueden ser isómeros posicionales, en los que el doble enlace *cis* ha cambiado su posición a lo largo de la molécula desde $\Delta 5$ hasta $\Delta 16$, como geométricos, pasando de configuración *cis* a *trans*. Estos isómeros *trans*, a pesar de ser ácidos grasos insaturados, se comportan de forma más parecida a un saturado debido a que también poseen un punto de fusión más elevado por lo que contribuirían a darle consistencia y solidez a la grasa (tabla 4).

1.3. Ácidos grasos *trans*.

Los ácidos grasos *trans* son ácidos grasos insaturados que tienen el doble enlace en un plano espacial diferente al de la configuración *cis* lo que hace que la cadena hidrocarbonada del ácido graso no forme un “codo”, como ocurre en los isómeros *cis*, sino que mantenga una estructura más recta. Este cambio estructural provoca una modificación de sus propiedades físicas ya que aumenta el punto de fusión del ácido graso haciendo que se comporte más como un saturado que como un insaturado (Gunstone et al., 1994). Por ejemplo, mientras que el ácido oleico (18:1 $\Delta 9c$) tiene un punto de fusión de 16°C, el de su isómero *trans*, el ácido elaídico (18:1 $\Delta 9t$) es de 44°C y el del saturado correspondiente, el 18:0, de 69°C (tabla 4).

Algunos isómeros *trans* se encuentran de forma natural en la leche de los rumiantes como consecuencia de la fermentación bacteriana en el rumen, sin embargo el porcentaje de *trans* en derivados lácteos no sobrepasa el 5% del total de ácidos grasos. Sin embargo, los isómeros *trans* “artificiales” que aparecen durante el proceso de hidrogenación parcial al que se somete a los aceites vegetales pueden llegar a representar hasta un 40% y son isómeros diferentes a los que se encuentran de forma natural en los productos lácteos (Lawson, 1995).

Hasta hace pocos años no se sabía con certeza cual era el efecto que el consumo de estos isómeros *trans* “artificiales” tenía sobre la salud ya que ensayos con animales a los que se les había suministrado una dieta rica en *trans* no dieron resultados claros ni concluyentes (Kinsella et al., 1981). Se suponía que quizás dichos isómeros tuvieran efectos no demasiado beneficiosos ya que eran elementos “artificiales” que se desconocía cómo se metabolizaban y

cuales eran sus implicaciones en la salud. Posteriormente, sin embargo, se hicieron públicos determinados estudios metabólicos llevados a cabo en humanos donde se analizó el nivel de lipoproteínas en sangre además de estudios epidemiológicos que relacionaban el consumo de *trans* con el riesgo de enfermedades coronarias. Se demostró que los ácidos grasos *trans* aumentaban el nivel del colesterol de baja densidad (LDL) a la vez que disminuía el de alta densidad (HDL). Además se realizaron estudios post-mortem en pacientes que habían fallecido por infarto de miocardio y se encontraron mayores niveles de *trans* en el tejido adiposo que en personas fallecidas por otras causa (Willet, 1994b).

Actualmente en E.E.U.U. entre 90-95% de los *trans* consumidos procede de grasas vegetales hidrogenadas. El consumo de estos isómeros ha aumentado desde un 0% en 1900 hasta un 5% del total de la grasa en los años 60, existiendo un aumento paralelo de las enfermedades cardiovasculares. Además se observó que los *trans* no sólo disminuían el HDL y aumentaban el LDL sino que también provocaban un incremento en el nivel de lipoproteína (a), otro lípido asociado a enfermedades cardiovasculares (Willet, 1994a). Este último descubrimiento fue de gran importancia ya que recientemente se ha sabido que la concentración de lipoproteína (a) en el plasma, estrechamente relacionada con el desarrollo de infartos de miocardio en pacientes con niveles altos de colesterol en sangre, no está sólo determinada genéticamente sino que también se ve afectada por la cantidad de *trans* consumidos en la dieta (James, 1996). Aunque no se conoce con certeza cuantas muertes por enfermedades coronarias en EEUU se atribuyen a los *trans* se supone que más de 30.000 muertes al año pueden deberse al consumo de grasas vegetales parcialmente hidrogenadas (Willet, 1994b).

1.4. Algunas alternativas para el consumo de ácidos grasos *trans*.

Teniendo en cuenta estos resultados sería conveniente reducir o incluso eliminar el consumo de ácidos grasos *trans*, siendo necesario por tanto buscar otras alternativas que permitan conseguir grasas semisólidas, requeridas para la fabricación de margarinas, prescindiendo de los isómeros *trans*. Una posible solución sería conseguir aceites vegetales con un mayor contenido en *ciertos* ácidos grasos saturados, ya que a pesar de que los ácidos grasos saturados, en general, se han considerado durante mucho tiempo perjudiciales para la salud por aumentar el nivel de colesterol LDL en sangre (Willet, 1994a) recientemente se ha comprobado que no todos los ácidos grasos saturados tienen el mismo efecto sobre el nivel de colesterol. Los ácidos laúrico (12:0), mirístico (14:0) y palmítico (16:0) sí tienen un efecto

hipercolesterolémico, aumentando el nivel de colesterol LDL en el plasma, según parece como resultado de la inhibición que ejercen sobre la síntesis del ARNm de las proteínas receptoras que unen el colesterol LDL que circula por la sangre y lo introducen en el hígado. Al bajar el número de receptores el nivel de LDL en la sangre aumenta (James, 1996). Por el contrario los ácidos grasos saturados cortos (6:0, 8:0 y 10:0) y el 18:0 (18:0) no tienen efecto hipercolesterolémico y muestran un efecto neutro sobre el nivel de colesterol en sangre (James, 1996; Grundy, 1994).

A fin de evitar el proceso de hidrogenación y sus posibles consecuencias se desarrolló en España un programa de *mutagénesis* sobre ciertas variedades de girasol (*Helianthus annuus*) con el objetivo de conseguir nuevas líneas con un mayor contenido de ácidos grasos saturados en su aceite.

2. Modificación de la composición de ácidos grasos de los lípidos de semilla por mutagénesis.

Para mutagenizar semillas oleaginosas se emplean habitualmente mutágenos químicos sumergiendo las semillas en soluciones de estos productos previa hidratación de las mismas. No existe ningún criterio a la hora de elegir un mutágeno aunque hay algunas propiedades que hay que tener en cuenta como la estabilidad, toxicidad ó reactividad sobre el ADN, propiedades que van a variar dependiendo de la especie vegetal que se quiera mutagenizar. Entre los mutágenos químicos se encuentran los *agentes alquilantes*, que actúan donando un grupo alquilo a una zona nucleofílica del ADN con una alta densidad de electrones como puede ser los grupos fosfatos ó el nitrógeno en la posición 7 de la guanina y de la posición 3 de la adenina y citosina, provocando la rotura del ADN (rotura mono ó bicatenaria) ó el apareamiento con una base incorrecta. Entre los agentes alquilantes se encuentra el dimetilsulfato, el dietilsulfato ó el etilmetanosulfonato (EMS) que es el mutágeno más ampliamente utilizado debido a su baja toxicidad, buena efectividad y estabilidad. Otro potente agente mutagénico es la *azida sódica*, que aunque no es mutagénica en sí misma y no interacciona con el ADN, debe su mutagenicidad a la formación de un metabolito que sí tiene propiedades mutagénicas. La azida sódica provoca pocas aberraciones cromosómicas por lo que su toxicidad es mínima, es fácil de manipular y no se han detectado efectos mutagénicos ni carcinogénicos en mamíferos, pero tiene el inconveniente de que sólo es efectivo en algunas especies vegetales (McCourt y Somerville, 1987).

Los mutágenos físicos no se emplean normalmente para mutagenizar semillas oleaginosas aunque en ocasiones se utilizan radiaciones ionizantes como rayos-X ó rayos- γ . Ambos tipos de radiaciones provocan roturas en la doble cadena de ADN algunas de las cuales serán reparados por los mecanismos celulares de reparación.

Una de las plantas que con más frecuencia se ha sometido a procesos de mutagénesis es *Arabidopsis thaliana* por su fácil estudio y manipulación. Mediante mutagénesis química con EMS se han obtenido una serie de mutantes con variaciones en la composición de ácidos grasos de los lípidos de semilla (James y Dooner, 1990). Se ha conseguido un mutante con alto contenido en 18:0 (8% frente a un 3% del control), otro con alto contenido en 18:1 (63% frente a un 15%) y un tercero con bajo contenido en 18:3 (1% frente a un 19%). También en *Arabidopsis thaliana* se han obtenido mutantes con modificaciones en los lípidos de hojas, con bajo contenido de 16:3 y 18:3 en lípidos polares de hoja (Browse et al., 1986) ó con alto contenido en 18:0 tanto en TAG como en todos los lípidos polares de hojas (Lightner et al., 1994). Este último mutante presentaba una alteración en su morfología como consecuencia del alto contenido de 18:0 en sus membranas, mostrando un crecimiento en miniatura cuando se cultivaba en condiciones normales pero que podía revertir si se cultivaban a temperatura alta (Lightner et al., 1994b).

En soja (*Glycine max*) (Wilcox y Cavins, 1985) también mediante mutagénesis con EMS se había obtenido un mutante con un menor contenido en 18:3 en el aceite de semilla (3% frente a 7%). Además se han obtenido tres mutantes con alto contenido de 18:0 en el aceite de semilla (Graef et al., 1985), uno con azida sódica y dos con EMS. De los tres mutantes el obtenido con azida sódica es el que tenía un mayor contenido de 18:0 (30% frente a 5%). Posteriormente se aisló otro mutante “alto esteárico” pero obtenido mediante mutagénesis física con rayos-X (Rahman et al., 1995) con un contenido de 18:0 de 21% frente a un 3% en el control. A diferencia del mutante “alto esteárico” de *Arabidopsis*, este mutante mostraba fenotipo normal y buenas características agronómicas.

En colza (*Brassica sp.*) (Auld et al., 1992) se han obtenido mediante mutagénesis con EMS mutantes con bajo contenido en ácidos grasos poliinsaturados (<6% frente a un 20% en el control que tenían además alto nivel de 18:1 (más de un 87%). Posteriormente se obtuvo otro mutante de colza con alto contenido en 18:1 (80%) también mediante tratamiento químico con EMS (Rücker y Röbbelen, 1995).

En lino (*Linum usitatissimum*) (Green y Marshall, 1984) utilizando rayos- γ y EMS se han obtenido dos mutantes independientes con niveles reducidos de 18:3 en la semilla (29% frente un 43% en el control) y a la vez con un aumento del contenido de 18:2 (30% frente a 18%). Tras cruzar ambos mutantes entre sí se obtuvo un doble mutante con un contenido de 18:3 inferior al 2% y más de un 50% de 18:2 (Green, 1986).

En girasol (*Heliantus annuus*) se han obtenido varios mutantes con modificaciones en los lípidos de semilla. En Rusia se obtuvo el primer mutante de girasol, con alto contenido de 18:1 (80-90%) en lípidos de semilla, mediante mutagénesis con dimetilsulfato (Soldatov, 1976). Posteriormente se han obtenido varias líneas mutantes con niveles superiores de ácidos grasos saturados utilizando tanto mutagénesis química como física, así como un mutante con alto contenido en 16:0 en fondo alto oleico.

2.1. Mutantes de girasol con alto contenido de ácidos grasos saturados en los lípidos de semilla.

Se han conseguido obtener varias líneas de girasol con un mayor contenido de ácidos grasos saturados - 16:0 y 18:0 (Osorio et al., 1995) así como mutantes con alto contenido en 16:0 en fondo alto oleico (Fernández-Martínez et al., 1997). Los mutantes de girasol con alto contenido en saturados obtenidos por mutagénesis (química o física) son los que aparecen en la tabla 6.

Tabla 6. Mutantes de girasol con alto contenido en ácidos grasos saturados.

Línea mutante	Fenotipo	Mol (%)*	Línea original	Tratamiento mutagénico
CAS-3	Alto esteárico	25-30	RDF-1-532	EMS; 70 mM
CAS-4	Medio esteárico	10-14	RDF-1-532	Azida sódica; 2 mM
CAS-8	Medio esteárico	10-14	RDF-1-532	Azida sódica; 2 mM
CAS-5	Alto palmítico	25-30	BSD-2-691	Rayos-X; 160 Gy
CAS-12	Alto palmítico/Alto oleico	25-30	BSD-2-423	Rayos-X; 160 Gy

* Porcentaje (mol %) de 18:0 (para CAS-3, CAS-4 y CAS-8) y de 16:0 (para CAS-5 y CAS-12).

2.2. Obtención del mutante de girasol CAS-3 con alto contenido de 18:0 en el aceite de semilla.

La mutagénesis para la obtención de la línea de girasol “alto esteárico” se realizó a partir de lotes de 1000 semillas secas de la línea RDF-1-532 elegida por sus buenas aptitudes agronómicas. Las semillas se embebían en agua destilada durante 4 horas a 20°C y posteriormente se transferían a tubos de vidrio con una solución de EMS 70 mM en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,0 durante 2 horas con agitación (60 rpm). A continuación las semillas sometidas al proceso mutagénico (M₁) se lavaban en agua corriente durante 16 horas (Osorio et al., 1995).

El proceso seguido para la fijación y selección del mutante alto esteárico CAS-3 se resume en la tabla 7. Las semillas mutagenizadas M₁ se sembraron en campo en Abril de 1991 y cuando comenzó la floración los capítulos se embolsaron para obtener de esta forma semillas autofecundadas M₂, recolectándolos individualmente tras la maduración. Se tomaban tres semillas M₂ de cada capítulo y se determinaba su composición de ácidos grasos (Garcés y Mancha, 1993) analizando solamente un trozo de endospermo situado en el extremo opuesto al embrión, reservando éste intacto. Si al análisis de la porción mostraba un alto contenido de 18:0 se podía sembrar el trozo de semilla que se había guardado y que incluía el embrión.

Para establecer los *criterios de selección* de los mutantes “alto esteárico” se definió un rango de seis desviaciones típicas centrado en la media del contenido (mol %) de 18:0, englobando al 99,97% de la población. Se establecieron dos niveles de porcentajes (superior e inferior) definidos de la siguiente manera:

Nivel superior = media + 3 desviación típica

Nivel inferior = media – 3 desviación típica

Se consideraba como *presunto mutante* a cualquier individuo que tenía un porcentaje de 18:0 mayor o igual (\geq) que su nivel superior ó menor o igual (\leq) que su nivel inferior. Si en los análisis aparecía un presunto mutante se recuperaba el capítulo de origen y se analizaban 24 semillas más del mismo capítulo.

Una de la semillas analizadas tenía un 11% de 18:0, por lo que se recuperó el capítulo M₂ y se analizaron 48 semillas más estableciendo dos clases (alta y baja) según el contenido de 18:0. La clase alta tenía un rango de porcentajes de 9-17% que se consideró fuera de los límites de la población y portadora del carácter mutante. Se sembraron las medias semillas seleccionadas por tener más de 9% de 18:0 recuperándose cinco capítulos M₃ y analizándose 24 semillas de

cada uno. Dos de los cinco capítulos mostraban un nivel de 18:0 más alto, con un promedio de 20% (12-27%) seleccionándose las medias semillas M₃ con más alto nivel de 18:0. Las semillas seleccionadas se sembraron y se recuperaron tres capítulos M₄ analizándose 24 semillas de cada uno. Dos capítulos mostraban un promedio de 18:0 de 15% (9-23%) y el tercero de 20% (16-26%). Se seleccionaron las semillas M₄ con mayor contenido de 18:0 y se sembraron para obtener su descendencia. Se recuperaron siete capítulos M₅ y se analizaron 24 semillas de cada uno mostrando todas un contenido de 18:0 entre 22 y 29%. En base a estos resultados se concluía que en la generación M₅ el carácter alto esteárico estaba fijado en homocigosis (Osorio et al., 1995).

Tabla 7. Proceso de selección y fijación del mutante de girasol CAS-3 con alto contenido en 18:0.

Generación	Nivel de 18:0	Contenido medio 18:0 (mol %)	Rango (mol %)	Número de semillas
M ₂	Bajo	4,5± 1,4	2-7	40
	Alto	12,2±3,1	9-17	8
M ₃	Alto	20,4±3,5	12-27	24
M ₄	Alto	20,0±2,7	16-26	35
M ₅	Alto	25,0±5,5	22-29	24

2.3. Control genético del mutante de girasol CAS-3.

Para determinar el control genético del alto contenido de 18:0 en CAS-3 se llevaron a cabo cruzamientos de CAS-3 con la línea HA-89, una línea ampliamente utilizada en la producción de híbridos comerciales cuyo aceite posee una composición de ácidos grasos estándar, así como con su línea parental RDF-1-532. En la tabla 8 se muestra el contenido de 18:0 de las tres líneas utilizadas.

En primer lugar se realizaron cruces de la línea CAS-3 con la línea control HA-89 y se analizaron las semillas F₁ obtenidas. Dichas semillas mostraban un contenido de 18:0 comprendido entre el valor de ambos parentales aunque más cercano al parental bajo esteárico lo que sugería la existencia de dominancia parcial del bajo contenido de 18:0 sobre el alto. Además al hacer cruces recíprocos se observó que el nivel de 18:0 era más elevado cuando el parental femenino era CAS-3 lo que sugirió la existencia de efectos maternos sobre el contenido de 18:0.

Tabla 8. Contenido medio de 18:0 (mol%) de HA-89, RDF-1-532 y CAS-3, así como el rango de variación.

Línea	Contenido medio 18:0 (mol %)	Rango (mol %)
HA-89	4,6±0,3	3,9–5,2
RDF-1-532	8,0±0,9	6,3–9,6
CAS-3	25,4±1,6	21,8–29,2

Por autofecundación se obtuvo la generación F_2 que mostró un amplio rango de variación en el contenido de 18:0 aunque pudieron distinguirse dos clases: una “baja-media” (4-14%) y otra “alta” (>14%) que se ajustaban a una proporciones 3:1 lo que hizo pensar en un principio en una herencia monogénica. Sin embargo el intervalo de variación del contenido de 18:0 de la clase “alta” de la generación F_2 no coincidía con los valores del parental CAS-3 sino que mostraba un intervalo mayor lo que hizo pensar en una posible herencia digénica en lugar de monogénica. Estos dos supuestos genes se denominaron como $E1$ y $E2$ y se encontrarían en forma homocigótica recesiva en la línea CAS-3. Los alelos recesivos de dichos genes presentarían acción aditiva, si bien no contribuirían de igual forma al contenido de 18:0 sino que el efecto de $e1$ sería mayor mientras que $e2$ sólo modularía los efectos de $e1$. Para confirmar ó rechazar el modelo digénico se analizó la generación F_3 obtenida también por autofecundación. Se analizaron semillas F_3 de cada planta F_2 por separado observándose diferentes grupos de segregaciones y asignándole un genotipo a cada uno de los diferentes grupos. La existencia de diferentes grupos de segregación en la generación F_3 procedentes de distintos genotipos heterocigotos en la generación F_2 confirmó la existencia de dos genes cuyos alelos recesivos, actuando de forma aditiva, determinarían el control genético de los altos niveles de 18:0 en CAS-3.

Posteriormente la línea CAS-3 se cruzó con su línea parental RDF-1-532, obteniéndose semillas con niveles intermedios aunque más cercanos al parental bajo esteárico confirmándose la dominancia parcial observada en el cruce con HA-89, sin embargo en los cruces recíprocos no se observó ninguna diferencia lo que parecía indicar ausencia de efectos maternos. Se obtuvo la generación F_2 recuperándose dos clases, una “alto esteárico” con un contenido de 18:0 superior a 20% y otra “bajo-medio esteárico” con un contenido inferior a 18%. Debido a que el contenido medio de 18:0 del parental RDF-1-532 era de 8% y que el límite inferior de la clase “baja-media” F_2 no fue en ningún caso inferior a 6% (frente a 3-4%

de HA-89) se dedujo que el genotipo de dicho parental podría ser *EIEIe2e2*. Además la segregación de la generación F₂ se ajustaba a unas proporciones 3:1 lo cual indicó que se trataba de la segregación de un sólo gen. Se llegó a la conclusión de que el alelo recesivo *e2* se encontraba ya presente en el genotipo de la línea RDF-1-532 y que posiblemente el gen que se mutagenizó fue *EI* dando lugar al alelo recesivo *e1* y generando el genotipo *e1e1e2e2* determinante del alto contenido de 18:0.

La contribución de cada alelo al contenido de 18:0 se calculó mediante las diferencias en el contenido de este ácido graso en las líneas HA-89 (*EIEIE2E2* y 4-5% de 18:0), RDF-1-532 (*EIEIe2e2* y 7-8% de 18:0) y CAS-3 (*e1e1e2e2* y 25% de 18:0). Se concluyó que el alelo recesivo *e1* contribuiría de un 7-8% y *e2* de 1,5-2,5% (Pérez-Vich, 1998).

3. Modificación de la composición de ácidos grasos de los lípidos de semilla por ingeniería genética.

En los últimos años se ha desarrollado una nueva metodología, basada en la aplicación de la ingeniería genética, que permite modificar los lípidos de plantas redirigiendo la síntesis de ácidos grasos hacia otros de diferente tamaño o incluso modificando el grado de insaturación. Esto ha supuesto un avance importante ya que ha hecho posible que cultivos importantes de oleaginosas, con una alta productividad, adquieran la capacidad de sintetizar un nuevo ácido graso, inexistente en la planta original o bien una mayor acumulación de un ácido graso ya existente. De esta forma se ha conseguido que plantas transgénicas con buenas características agronómicas y alta productividad sintetizen ácidos grasos de interés, para uso industrial o en la alimentación, sintetizados originalmente por plantas no cultivables (Ohlrogge, 1994).

Dentro de los ácidos grasos destinados a uso industrial está el 12:0 empleado para la fabricación de jabones y detergentes. Este ácido graso se acumula en grandes cantidades (70%) en las semillas de *Umbellularia californica* donde se ha encontrado una enzima acil-ACP tioesterasa específica de 12:0-ACP (Pollard et al., 1991) que es la responsable de que la síntesis de ácidos grasos termine en este ácido graso C₁₂ y no continúe elongando hasta C₁₆ y C₁₈. Cuando se transfirió el ADNc de la 12:0-ACP tioesterasa de *Umbellularia californica* a *Arabidopsis thaliana*, que no acumula 12:0, la planta transgénica acumuló hasta un 25% de este ácido graso (figura 15).

También se introdujo el gen de la 12:0-ACP tioesterasa en colza (*Brassica napus*) hasta conseguir un 40% de 12:0, sin embargo debido a la ausencia de una LPAAT en colza que introdujera 12:0 en posición *sn*-2 del glicerol, la acumulación máxima que se conseguía de este ácido graso era de un 60%. Para aumentar la producción de 12:0 en colza se le introdujo el gen de la LPAAT de coco (que acumula 47% de 12:0) consiguiéndose plantas transgénicas de colza que habían aumentado significativamente la incorporación de 12:0 en la posición *sn*-2 de los TAG (Budziszewski et al., 1996).

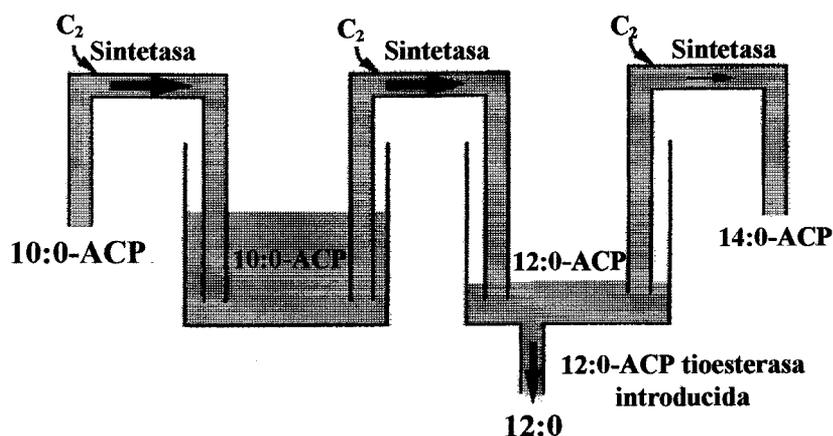


Figura 15. Esquema de la síntesis de ácidos grasos redirigida por la introducción de una 12:0-ACP tioesterasa (Voelker, 1996).

El ácido erúxico (22:1 Δ 13) es otro ácido graso de interés para la industria pudiéndose utilizar para la fabricación de lubricantes ó también como precursor del nylon. Este ácido graso es el principal componente del aceite de semilla de *Brassica napus* (50%), sin embargo debido a la especificidad de la LPAAT de colza este ácido graso se excluye de la posición *sn*-2 de los TAG por lo que el contenido máximo de 22:1 en colza será de un 60% (en las líneas de colza “alto erúxico”). Recientemente se ha clonado el ADNc de la LPAAT específica de 22:1-CoA de *Limnanthes douglasii* y se ha introducido en una variedad de colza “alto erúxico” para incrementar aún más el nivel de este ácido graso (Budziszewski et al., 1996).

También se han obtenido plantas transgénicas de colza (*Brassica napus* y *rapa*) a las que se les ha transferido el gen de la EDS en orientación opuesta (antisentido) (Knutzon et al., 1992). Esta enzima es la responsable de la síntesis de 18:1 por desaturación del 18:0 en posición Δ 9. El ARNm “antisentido” que se sintetizaba hibridaba con el ARNm “normal” formando un

ARNm de doble cadena que no podía ser traducido a proteína por lo que se producía un importante descenso en el nivel de la enzima y un consiguiente aumento del contenido de 18:0 llegando a un 40% (figura 16).

Así mismo se consiguieron plantas transgénicas con el ADN “antisentido” de ODS consiguiendo semillas con un 83% de 18:1, en comparación con el 63% del control (Budziszewski et al., 1996).

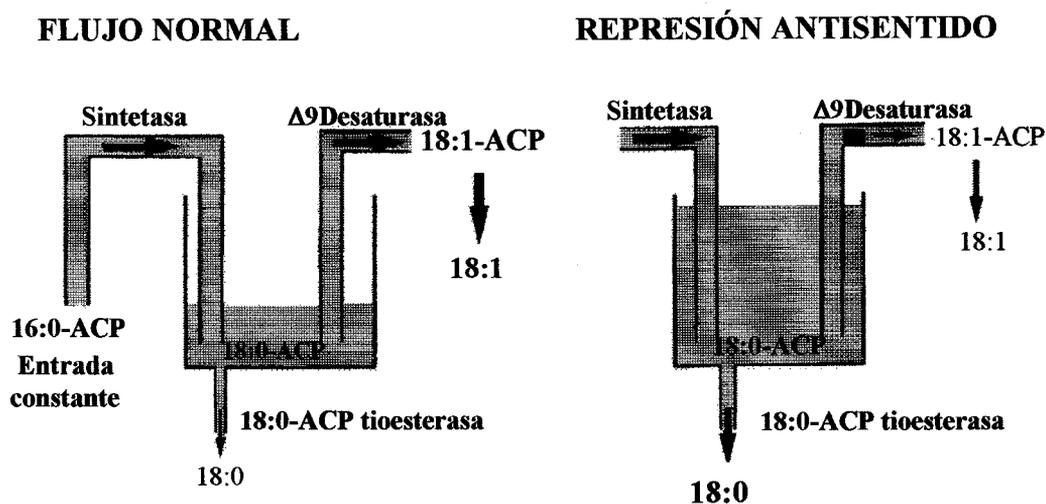


Figura 16. Esquema de la síntesis de ácidos grasos redirigida mediante la represión antisentido de la Δ^9 desaturasa; (A) Estado normal; (B) Represión de la estearil-ACP desaturasa (Voelker, 1996).

En soja (*Glycine max*) se ha conseguido reducir el nivel de ácidos grasos saturados por el fenómeno de la co-supresión al introducir un gen adicional de una acil-ACP tioesterasa exógena. Como consecuencia de la adición de esta nueva copia se produce una disminución de la expresión del gen de la tioesterasa endógena así como de la copia introducida, observándose además una correlación entre el descenso de la actividad tioesterasa y una disminución en el contenido de ácidos grasos saturados. Sin embargo dicha correlación desaparecía cuando la actividad tioesterasa disminuía por debajo de 0,6 nmoles $\text{min}^{-1} \text{mg}$ proteína $^{-1}$ (Yadav et al., 1993). También se consiguieron plantas transgénicas de soja con un 78% de 18:1 frente a un 22% del control por transferencia de ADN “antisentido” de la ODS (Budziszewski et al., 1996).

Dentro de los ácidos grasos inusuales el ácido petroselínico tiene un gran interés debido a sus posibles aplicaciones. El ácido petroselínico (18:1 Δ^6) es un ácido graso monoinsaturado, al igual que el 18:1, pero con el doble enlace en posición Δ^6 (en lugar de Δ^9) lo que provoca un

aumento del punto de fusión hasta 33°C en lugar de los 16°C del 18:1 (Ohlrogge, 1994). Este alto punto de fusión hace que sea sólido a temperatura ambiente por lo que tiene un importante uso potencial en la fabricación de margarinas, aunque también posee usos industriales ya que por escisión de la molécula se forma 12:0, que se usa para fabricación de detergentes, y ácido adípico, para la producción de nylon. El ácido petroselínico se acumula en las especies del género *Umbelliferae* llegando a un 80%. Tres enzimas intervienen en su síntesis: una palmitil-ACP desaturasa que introduce el doble enlace en posición $\Delta 4$, una elongasa específica para 16:1 $\Delta 4$ y por último una tioesterasa. La palmitil-ACP desaturasa de una *Umbelliferae*, *Coriandrum sativum*, se ha clonado en tabaco obteniéndose una planta transgénica que acumula ácido petroselínico cuando en condiciones normales no lo hace (Cahoon et al., 1992).

La obtención de plantas transgénicas no sólo se limita a la transferencia de genes pertenecientes al reino vegetal sino que también se han conseguido plantas viables con genes de bacterias, animales, levaduras con lo que las posibilidades son aún mayores (Grayburn et al., 1992).

MATERIALES Y MÉTODO

I. MATERIALES

1. Material biológico.

Como material de trabajo se han empleado dos líneas de girasol (*Helianthus annuus* L.) no isogénicas, la línea pura RHA-274, donada por el Dr. J.M^a: Fernández-Martínez (Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Córdoba), una línea restauradora de la fertilidad, con un perfil estándar en cuanto a su composición de ácidos grasos y con buenas características agronómicas; y la línea mutante CAS-3, obtenida por mutágenesis química con EMS sobre la línea RDF-1-532 (Osorio et al., 1995), una línea restauradora, fértil pero con citoplasma estéril, con buenas características agronómicas y con una composición de ácidos grasos estándar. La línea mutante CAS-3 se seleccionó por tener un mayor contenido de 18:0 en los lípidos de semilla que la línea RHA-274 utilizada como control, aunque únicamente se ha empleado como control en lo que se refiere a la composición de ácidos grasos, ya que al no ser RHA-274 y CAS-3 líneas isogénicas pueden manifestar otras muchas diferencias que se deban al genotipo de cada línea y no a la mutación.

1.1. Tejidos biológicos analizados.

Para caracterizar la línea mutante alto esteárico CAS-3 se han analizado tanto *semillas*, para estudiar cómo la mutación había afectado a la composición de ácidos grasos del aceite, como *tejidos vegetativos*, para determinar si la mutación había afectado sólo a los lípidos de la semilla o había otros tejidos que también habían modificado sus lípidos. Dependiendo del tejido que se iba a analizar la metodología seguida variaba ligeramente:

- Análisis de semillas- Para los ensayos de análisis de lípidos de *semillas* se han utilizado siempre semillas peladas y, según el tipo de analítica que se iba a realizar, se recolectaban semillas maduras ó de diferentes edades, expresando la edad como días después de floración (DDF), y tomando como primer día de floración aquel en que los tres círculos exteriores de flores del capítulo habían abierto y los estigmas eran perfectamente visibles. Para la analítica de lípidos de *semilla madura* se han empleado semillas recolectadas 35 DDF, mientras que para la de *semillas en formación* se han recolectado a 8, 12, 16, 20, 24, 28 y 32 DDF. No ha sido posible recoger semillas más jóvenes debido a que no estaban suficientemente formadas, mientras que no era necesario recoger semillas de más de 32 DDF ya que a partir de esa edad

se considera que la semilla de girasol ha llegado a la madurez fisiológica y la composición de los lípidos no va a variar significativamente.

- Análisis de tejidos vegetativos- Para los ensayos analíticos de lípidos de *tejidos vegetativos* se han recogido muestras de tejidos durante la germinación de la semilla (cotiledón, raíz e hipocotilo) así como durante el crecimiento y desarrollo de la planta (hojas, flores, lígulas y polen). Como punto de partida (punto cero) se tomó la semilla madura no germinada, recogiendo muestras de los diferentes tejidos a los 2, 4, 7, 10, 15 y 30 días después de siembra (DDS).

Todos los análisis se han realizado por triplicado, recogiendo el material biológico (semillas o tejidos vegetativos) de tres plantas diferentes.

2. Condiciones de cultivo.

Las semillas de girasol se han germinado siempre en placas de petri con perlita expandida donde permanecían tres días en oscuridad en una estufa a 25 °C para facilitar la germinación. A continuación se pasaban a macetas pequeñas con turba húmeda donde continuaba el crecimiento durante dos semanas aproximadamente y seguidamente se pasaban a macetas mayores en una mezcla de turba y vermiculita.

El crecimiento de las plantas se hizo en cámaras de cultivo, normalmente a una temperatura 25/15°C (día/noche), aunque en ocasiones y dependiendo del estudio que se quisiera hacer (ej. determinar el efecto de la temperatura en la composición de ácidos grasos) se necesitaba disponer de cámaras a 20/10°C o 30/20°C (día/noche). Las cámaras tenían un fotoperiodo de 16 horas y una intensidad de luz de 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

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

II. METODOLOGÍA GENERAL PARA LA ANALÍTICA DE LÍPIDOS

1. Extracción de lípidos totales.

La extracción de los lípidos totales se ha llevado a cabo según el método de Hara y Radin (1978) con algunas modificaciones, partiendo aproximadamente de 200 mg de tejido a los que

se les han añadido 5 ml de una mezcla de hexano/isopropanol (3:2, v/v) (25 ml/g tejido) con 0,01% de butilhidroxitolueno (BHT), utilizado como antioxidante. La extracción se ha realizado en tubos de cristal (100 x 13 mm) utilizando una varilla de vidrio y arena de mar para facilitar la homogeneización del tejido. A continuación se sonicaban las muestras durante 15 minutos y se añadía la mitad de volumen de una solución al 6,7% de SO_4Na_2 . Se agitaba vigorosamente para facilitar la extracción de los lípidos y se centrifugaba 10 minutos a 3000 rpm. Se formaban dos fases, la inferior acuosa y la superior con hexano, isopropanol y los lípidos. Se retiraba con una pipeta pasteur la fase superior de hexano pasándola a otro tubo de cristal. Se hacía una reextracción añadiendo 2 ml de una mezcla de hexano/isopropanol (7:2, v/v) con BHT, agitando vigorosamente y se volvía a centrifugar 10 minutos a 3000 rpm. La fase superior se retiraba de nuevo añadiéndola a la anterior. Se evaporaba el disolvente con una corriente de nitrógeno, obteniendo de esta forma los lípidos totales.

2. Técnica de separación de los diferentes tipos de lípidos. Cromatografía en capa fina.

Una vez extraídos los lípidos totales se procedía a separar los diferentes componentes, ya fueran los lípidos neutros o los lípidos polares, mediante cromatografía en capa fina (TLC). La cromatografía en capa fina es una técnica de separación que se basa en el equilibrio existente entre la *adsorción* de las moléculas sobre una fase fija de polaridad variable y la *solubilidad* de las mismas en una fase móvil. Se utiliza como soporte o fase fija gel de sílice y como fase móvil disolventes orgánicos mezclados en diferente proporción según la polaridad requerida para separar los lípidos. Se han utilizado cubetas de vidrio para desarrollar las placas.

2.1. Placas de TLC utilizadas.

Para los diferentes análisis de los lípidos se han utilizado placas de gel de sílice (Kiesegel-60) con un tamaño de 20 x 20 cm y de 10 x 20 cm, de 0,25 mm de grosor activándolas previamente durante 30 minutos a 110°C para eliminarles la humedad. Dependiendo de qué tipo de lípidos se quisieran separar se utilizaban las placas tal cual o impregnadas con distintas soluciones:

- Nitrato de plata al 10 % en acetonitrilo (p/v). Se vertía directamente la solución sobre las placas (10 ml para placas de 20x 20 cm). El líquido de desarrollo empleado era una mezcla de hexano/éter dietílico (85:15; v/v). El nitrato de plata se une a los dobles enlaces por lo

que un ácido graso con una insaturación va a quedar retenido en la sílice mientras que uno saturado no. Por tanto, las placas de nitrato de plata se han empleado para separar ácidos grasos que difieren en el número de insaturaciones, de tal forma que mientras mayor sea el número de insaturaciones de un ácido graso más retenido quedará en la sílice, situándose los trienos (ej. 18:3) más cercanos al origen, posteriormente, un poco más arriba los dienos (ej. 18:2), los monoenos (ej. 18:1) y por último los saturados.

- Sulfato amónico al 2% en una mezcla acetona:agua (1:1, v/v). Se vertía directamente la solución sobre las placas (10 ml para placas de 20x 20 cm). Estas placas se desarrollaban con una mezcla de acetona/benceno/agua (90:30:10; v/v/v).
- Aceite de vaselina al 2,5% en hexano (p/v). Se vertía la solución en una cubeta de vidrio y se dejaba que impregnara la sílice de la placa. El líquido de desarrollo utilizado era una mezcla polar compuesta por acetonitrilo/hexano (90:10; v/v). Este tipo de placa se denomina de *fase reversa* ya que el aceite de vaselina modifica la polaridad de la placa convirtiéndola en un soporte apolar por lo que las sustancias más polares son las que van a mostrar una mayor movilidad debido a su mayor afinidad por el solvente polar. Estas placas se emplean para separar los ácidos grasos según el tamaño de la cadena de manera que los ácidos grasos largos se retienen más que los de menor tamaño de cadena por lo que éstos van a tener una mayor movilidad.

2.2. Visualización e identificación de las bandas.

Una vez que se han separado los lípidos por TLC era necesario proceder a la detección e identificación de las bandas correspondientes a cada tipo de lípido. Se han empleado para ello dos tipos de métodos:

- *Método no destructivo*- Se situaba la placa en una cubeta de cristal cerrada con atmósfera de yodo tapando la muestra con un cristal de tal forma que sólo quedase al descubierto la zona de los patrones o la parte externa de muestra. El yodo tiñe la muestra debido a que se une de forma específica a los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados.
- *Método destructivo*- Se pulverizaba la placa con ácido sulfúrico al 50% en agua y posteriormente se situaba en una placa calefactora hasta la carbonización. Este método se utilizaba básicamente para los diferentes LP separados en placa, facilitando la identificación el hecho de que los glicerofosfolípidos se teñían de marrón mientras que los galactolípidos lo hacían de rosa.

3. Separación por TLC de los diferentes tipos de lípidos.

3.1. Separación por TLC de los lípidos neutros.

Los lípidos totales que se habían extraído se resuspendían en un pequeño volumen de hexano/isopropanol (7:2, v/v) y se colocaban sobre el extremo inferior de la placa de sílice aproximadamente a dos centímetros del borde inferior. En uno de los lados de la placa (izquierdo o derecho) se situaban los patrones para poder identificar las bandas. A continuación se desarrollaba en una cubeta de vidrio utilizando como líquido de desarrollo hexano/éter dietílico/fórmico (75:25:1, v/v/v), mezcla empleada normalmente para separar lípidos neutros. Para visualizar los diferentes lípidos se cubría parcialmente la placa con un cristal dejando al descubierto la fracción de la placa donde se habían colocado los patrones y se introducía en una cubeta con atmósfera de yodo. Se identificaban los diferentes tipos de lípidos comparándolos con patrones conocidos, quedando la distribución de los lípidos desde el origen como sigue: los *lípidos polares* (LP), que permanecían en el origen, los *diacilglicéridos* (DAG), que al tener un grupo hidroxilo libre que le confería polaridad quedaba más retenido, los *ácidos grasos libres* (AGL), que debido a la polaridad del grupo carboxilo se retenían un poco más en la sílice y por último los *triacilglicéridos* (TAG) que es la fracción más apolar y por tanto la que menos se retenía por la sílice. Las bandas correspondientes a los LP, DAG, AGL y TAG se raspaban de la placa con una espátula y se eluían de la sílice con 4-5 ml de cloroformo/metanol (2:1, v/v).

3.2. Separación por TLC de los lípidos polares.

Una vez eluidos los LP de las placas anteriores se evaporaba el disolvente con una corriente de nitrógeno y se resuspendían en un pequeño volumen de la misma mezcla anterior. Para separar entre sí los diferentes tipos de LP se desarrollaban sobre placas de TLC utilizando como líquido de desarrollo cloroformo/metanol/ácido acético/agua (85:15:10:3,5, v/v/v/v). En uno de los extremos de la placa se ponía una muestra de lípidos de espinaca que se utilizaban como patrón debido a que poseen una mezcla de lípidos polares muy compensada. Una vez desarrollada la placa se cubría parcialmente con un cristal dejando al descubierto únicamente la fracción del patrón y se introducía en una cubeta con vapores de yodo para visualizar las bandas, identificando los lípidos polares individuales comparándolos con el patrón. El orden en el que los diferentes lípidos polares quedaban en las placas desde el origen era el siguiente: fosfatidlinositol (PI), fosfatidilcolina (PC), digalactosildiacilglicéridos

(DGDG), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidiletanolamina (PE) y monogalactosildiacilglicéridos (MGDG). Con este desarrollo la PC y los DGDG aparecían con bastante frecuencia solapados, no siendo posible separarlos totalmente. Se utilizaba además otro método que consistía en una modificación del método de Khan y Williams (1977) empleando placas de TLC impregnadas con una solución de sulfato amónico desarrollándolas con acetona/benceno/agua (90:30:10, v/v/v). Con estas placas la PC y DGDG sí se separaban perfectamente, aunque PI y PE quedaban solapados, por lo que en ocasiones eran necesarios los dos desarrollos para conseguir separar todos los lípidos polares que se querían analizar. Una vez identificados los lípidos polares se raspaban de la placa por separado con una pequeña espátula en tubos de vidrio individuales.

4. Análisis de los ácidos grasos.

4.1. Formación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.

Una vez que se han raspado de las placas tanto los lípidos neutros como los lípidos polares se procedía a la determinación de la composición de ácidos grasos de cada fracción, para lo cual era necesario sintetizar sus ésteres metílicos. Para ello se ha utilizado un método de metilación rápida (Garcés y Mancha, 1993) que consistía en añadir 3 ml de la solución metanol/tolueno/H₂SO₄ (88:10:2, v/v/v) y calentar en un baño a 80°C durante 1 hora. Una vez enfriada se añadía 1 ml de heptano con 0,01% de BHT, y se agitaba vigorosamente formándose dos fases inmediatamente. Se recuperaba la fase superior de heptano con los ésteres metílicos y se pasaba a otro tubo de vidrio. Se evaporaba el disolvente con una corriente de nitrógeno y se resuspendía en un pequeño volumen de heptano.

4.2. Separación y cuantificación de los ésteres metílicos.

Una vez que se han obtenido los ésteres metílicos se separaban mediante cromatografía gas-líquido utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890A con una columna capilar Supelco SP-2380 (30 m de longitud, 0,32 mm de luz interna y 0,20 µm de grosor de fase) de sílice fundida. Se ha utilizado un detector de ionización de llama e hidrógeno como gas portador. La temperatura inicial del horno era de 160°C y un gradiente de temperatura de 1°C/min, llegando a una temperatura final de 175°C en la que permanecía durante 5 minutos, por lo que el tiempo requerido para cada análisis individual era de 20 minutos. La temperatura

del inyector y del detector era de 200°C. Los picos correspondientes a los diferentes ácidos grasos se identificaban comparándolos con patrones conocidos.

5. Determinación del contenido lipídico o riqueza de grasa de semillas de girasol.

Para hacer determinaciones cuantitativas del contenido lipídico total de las semillas de girasol o de algún componente lipídico (TAG, LP, etc...) se añadía una cantidad conocida de ácido heptadecanoico (17:0), un ácido graso saturado de 17 átomos de carbono que no se encuentra en ninguna grasa ni aceite natural y que se utiliza como patrón interno. Se preparaban disoluciones de este ácido graso en una mezcla de metanol:tolueno (1:1, v/v) a unas concentraciones de 0,2 y 1 mg 17:0/ml. Se añadía un volumen adecuado de estas disoluciones de tal forma que el 17:0 representara aproximadamente un 10% del total de ácidos grasos de la muestra. El momento en que se añadía el patrón interno variaba según si se quería determinar el contenido total (miligramos) de lípidos de la semilla, en cuyo caso el 17:0 se añadía antes de triturar las semillas, ó la cantidad (miligramos) de algún componente lipídico (TAG, LP, etc...) en cuyo caso se añadía previamente a la metilación de dicho componente.

Una vez extraídos los lípidos totales o separados sus componentes por TLC, como se ha descrito anteriormente, se metilaban las muestras y se analizaban por cromatografía gaseosa. El 17:0 se separaba perfectamente por esta técnica cromatográfica, presentando un tiempo de retención intermedio entre los ácidos palmítico y esteárico. A partir del porcentaje de 17:0 obtenido en el cromatograma y conociendo exactamente la cantidad añadida de patrón interno así como el porcentaje restante de ácidos grasos, se podía calcular la cantidad total de lípidos de la semilla o de cualquier componente lipídico.

6. Análisis posicional de los ácidos grasos en los triacilglicéridos.

Para determinar si la distribución de los ácidos grasos en la molécula de TAG era al azar o si por el contrario existía una cierta preferencia de determinados AG por alguna posición del glicerol se ha llevado a cabo la hidrólisis parcial de los TAG con lipasa pancreática, una enzima que hidroliza específicamente los acilos de las posiciones *sn-1* y *sn-3* de la molécula de TAG dejando la posición *sn-2* intacta (figura 17) (Luddy et al., 1964).

Se purificaban 10 mg de TAG a los que se les añadían 2 mg de lipasa pancreática de cerdo, 1 ml de tampón Tris-HCl 1 M pH 8, 1 ml de una solución de CaCl₂ al 22% y 0,25 ml de

deoxicolato al 0,1% (Mancha et al., 1970). Se agitaba vigorosamente en un vortex durante 1-2 minutos y a continuación se detenía la reacción con 0,5 ml de HCl 6 N de tal forma que la reacción de hidrólisis no era completa sino que dejaba un cierto porcentaje de TAG sin hidrolizar. Se extraían los lípidos con 1,5 ml de éter dietílico, se evaporaba el disolvente con nitrógeno y se resuspendían en un pequeño volumen.

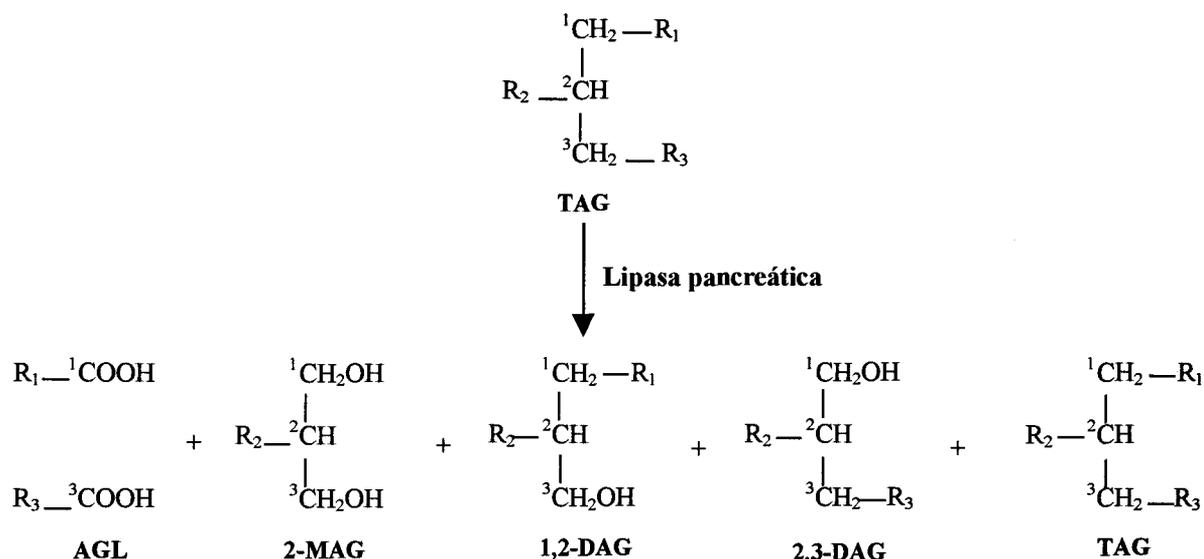


Figura 17. Hidrólisis de los TAG con lipasa pancreática. AGL, ácidos grasos libres; 2-MAG, 2-*sn*-monoacilglicerol; 1,2-DAG, 1,2-*sn*-diacilglicerol, 1,3-DAG, 1,3-*sn*-diacilglicerol; TAG, triacilglicerol (Gunstone 1994).

Los productos de la reacción se separaban por TLC y se desarrollaba con hexano/éter dietílico/fórmico (75:25:1, v/v/v). A continuación se raspaban las siguientes bandas: la de los MAG, la más cercana al origen, con el acilo esterificado en posición *sn*-2, la de los AGL, que incluía los acilos de las posiciones *sn*-1 y *sn*-3, y la banda de los TAG que no se habían hidrolizado para determinar si su composición de ácidos grasos coincidía con la de los TAG iniciales, confirmando de esta forma que la hidrólisis había ocurrido al azar. Seguidamente se metilaban y se determinaba la composición de AG de cada fracción por cromatografía de gases.

III. METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS

1. Material biológico.

Para la determinación de las diferentes actividades enzimáticas en semillas de girasol se han recolectado capítulos completos de la línea control RHA-274 y del mutante alto esteárico CAS-3 de 15 DDF, edad en la que las semillas se encuentran en fase activa de síntesis lipídica. Una vez recolectados los capítulos se guardaban a -80°C hasta su posterior utilización.

2. Síntesis de sustratos radiactivos.

2.1. Preparación de la sal sódica de los ácidos grasos.

Los ensayos para determinar actividades enzimáticas se han realizado en medio acuoso donde los ácidos grasos son insolubles, por lo que ha sido necesario sintetizar previamente la sal sódica de los ácidos grasos para hacerlos solubles en tampón. Los ácidos $[1-^{14}\text{C}]$ palmítico, $[1-^{14}\text{C}]18:0$ y $[1-^{14}\text{C}]$ oleico (2,0 GBq/mmol) se han comprado a American Radiolabeled Chemicals Inc. (St.Louis, Miss., USA). Para sintetizar la sal sódica de los diferentes ácidos grasos se cogía un volumen determinado de cada ácido graso, se evaporaba el disolvente con corriente de nitrógeno y el residuo se disolvía en 10% Tritón X-100 en 0,6 mM de NaOH. Se calentaba a 55°C durante una hora para asegurar la homogeneización (Rock y Cronan, 1981).

2.2. Síntesis de los acil-ACP.

Los acil-ACP se sintetizaban usando una modificación del método de Rock et al. (1981). Cada ensayo contenía 0,1 M de Tris-HCl, 0,4 M LiCl, 5 mM ATP, 10 mM MgCl_2 , 2 mM DTT, 133 μM de la sal sódica de los ácidos grasos, 70 μM de ACP de *E. Coli* y 1,8 mU de acil-ACP sintetasa de *E.coli* (ambos productos comprados en Sigma-Aldrich Química S. A. Madrid, España) en un volumen final de 120 μl . Las reacciones se incubaban a 37°C durante toda la noche y transcurrido este tiempo el pH se acidificaba hasta pH 6,0-6,5 añadiendo 3 μl de HCl 3,6 M ya que los acil-ACP son más estables a ese pH. A continuación se eliminaban los ácidos grasos libres que no se habían unido al ACP usando una modificación del método descrito por Mancha et al. (1975), que consistía en añadir el mismo

volumen de isopropanol y lavar tres veces con 0,5 ml de hexano saturado en agua/isopropanol (1:1, v/v).

2.3. Cuantificación de radiactividad en los acil-ACP sintetizados.

Para medir la radiactividad presente en los acil-ACP sintetizados se ha utilizado un contador de centelleo líquido (Rackbeta II; LKB, Sweden) previamente calibrado. Para cuantificar la radiactividad de las muestras se han utilizado viales de centelleo de polietileno de 5 ml de capacidad a los que se les añadía 3 ml de líquido de centelleo (comprado a National diagnostics, Hessle, England). Después de agitar fuertemente se cuantificaba la radiactividad durante 240 segundos.

2.4. Determinación de la concentración de sustrato radiactivo de una muestra.

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

$$(\text{DPM} / (60 \times \text{A.E.} \times \mu\text{l})) = \text{concentración (mM)} \times 1000 = (\mu\text{M})$$

3. Determinación de la actividad acil-ACP tioesterasa.

3.1. Preparación del extracto crudo.

Para la obtención del extracto crudo se cogían semillas de tres capítulos diferentes de la línea control RHA-274 y del mutante CAS-3 guardados a -80°C y se trituraban en un mortero en tampón Tris-HCl 20 mM (pH 8,5), 2 mM de ditioneitol (DTT) y 5% de glicerol (v/v) (Dörmann et al., 1994) en una proporción de 10 ml de tampón/g de semilla. Todo el proceso de obtención del extracto crudo se llevaba a cabo a 4°C .

Las concentraciones de proteínas de los extractos crudos se determinaban utilizando un Kit para ensayo de proteínas (BioRad) utilizando BSA como estándar.

3.2. Ensayo enzimático de la actividad acil-ACP tioesterasa.

Para el ensayo enzimático se ha seguido el método descrito por Dörmann et al. en 1994 con algunas modificaciones. Para los ensayos de la actividad acil-ACP tioesterasa se mezclaban 130 μ l del extracto crudo con diferentes volúmenes (2, 5, 7, 10, 20 y 40 μ l) de [$1\text{-}^{14}\text{C}$]16:0-ACP, [$1\text{-}^{14}\text{C}$]18:0-ACP ó [$1\text{-}^{14}\text{C}$]18:1-ACP a una concentración inicial de 4 μ M en un volumen final de 170 μ l. Las concentraciones finales de sustratos oscilaban entre 0,05-1 μ M. Cuando era necesario se completó hasta el volumen final de 170 μ l añadiendo el mismo tampón que se había utilizado para obtener el extracto crudo. La reacción se incubaba a temperatura ambiente durante 20 minutos y transcurrido este tiempo se detenía añadiendo 170 μ l de ácido acético 1 M en isopropanol, conteniendo 1 mM de ácido oleico frío. A continuación la mezcla de reacción se lavaba tres veces con 500 μ l de hexano saturado en agua/isopropanol (1:1, v/v) para eliminar los ácidos grasos liberados por la acción de la enzima.

3.3. Cuantificación de los productos de la reacción.

La actividad acil-ACP tioesterasa en los ensayos se ha determinado midiendo la radiactividad en la fase acuosa donde se encontraban los acil-ACP que no se habían hidrolizado por la acción de la acil-ACP tioesterasa. La fase acuosa se pasaba a viales de centelleo, se añadían 3 ml de líquido de centelleo y se cuantificaba la radioactividad en el contador de centelleo líquido.

Una vez determinada la radiactividad (DPM) se calculaba la concentración de sustrato como ya se ha explicado anteriormente. La actividad acil-ACP tioesterasa se expresaba como pmoles de acil-ACP hidrolizados por minuto por miligramo de proteína.

4. Determinación de la actividad de la estearil-ACP desaturasa.

4.1. Preparación del extracto crudo.

Para la obtención del extracto crudo se cogían semillas de tres capítulos diferentes de la línea control RHA-274 y del mutante CAS-3 guardados a -80°C y se trituraban en un mortero

en tampón PIPES 0,1 M pH 6.5 y 1 mM dietilpircarbonato (DEPC) en una proporción de 125 µl de tampón por cada semilla. Se mantenía 1 hora en hielo para que el DEPC inactivara a las acil-ACP tioesterasas endógenas las cuales compiten con la EDS por el sustrato (Knutzon et al., 1992).

4.2. Síntesis del sustrato ($[^{14}\text{C}]$ -estearil-ACP). Ensayo enzimático de la β -cetoacil-ACP sintetasa II.

La síntesis de 18:0-ACP, el sustrato de la EDS, se ha llevado a cabo utilizando la maquinaria enzimática existente en la semilla, es decir, mediante la reacción catalizada por la enzima β -cetoacil-ACP sintetasa II (KAS II) endógena, localizada en el plastidio. La actividad KAS II se ha ensayado en un volumen final de 200 µl usando 150 µl de extracto crudo obtenido de igual forma que el utilizado en el ensayo de la actividad acil-ACP tioesterasa. La mezcla de reacción contenía Tris-HCl 20 mM, 17 µM de ACP, 5 µM de malonil-ACP, 10 µM de cerulenina y 0,5 µM de $[1-^{14}\text{C}]$ 16:0-ACP. La reacción se incubaba a 26°C durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo y antes de parar la reacción se retiraban 45 µl que serían utilizados como sustrato para la reacción catalizada por la EDS. Este volumen (45 µl) incluía tanto 18:0-ACP como 16:0-ACP ya que la reacción había sido parcial. Para cuantificar el 18:0-ACP sintetizado por la KAS II una vez retirado el volumen indicado se paraba la reacción con 125 µl de NaOH 8M, añadiendo además 50 µl de ácidos grasos fríos (1mg de 18:0 y 18:1/ml acetona) y manteniendo la mezcla 15 minutos a 80°C. A continuación se acidificaba la mezcla añadiendo 125 µl de HCl 8M para liberar los ácidos grasos. Se metilaba la muestra y se añadían 2 ml de heptano agitando vigorosamente para extraer los ácidos grasos. Se retiraba la fase superior de heptano y se pasaba a otro tubo, evaporando el disolvente con corriente de nitrógeno y resuspendiendo de nuevo en 50 µl de heptano.

4.3. Ensayo enzimático de la estearil-ACP desaturasa.

El ensayo de la actividad EDS se basaba en la cuantificación del $[^{14}\text{C}]$ 18:1-ACP formado por la desaturación del $[^{14}\text{C}]$ 18:0-ACP (Mckeon y Stumpf, 1981). En un eppendorf se mezclaban 15 µl de DTT 100 mM, 10 µl de BSA 10 mg/ml, 7,5 µl NADPH 25 mM en Tricine 0,1 M pH 8,2, 2,5 µl de ferredoxina de espinaca 10 mg/ml, 1,5 µl de ferredoxin-NADP⁺ reductasa 2,5 U/ml, 7,5 µl de catalasa 800.000 U/ml. Se mantenía la mezcla 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se pasaba la mezcla a un tubo de ensayo de

13×100 mm que contenía 125 µl de PIPES 0,1 M pH 6,5 y agua para completar los volúmenes. Se añadían 35 µl del extracto crudo y se comenzaba la reacción añadiendo 45 µl de la reacción anterior, catalizada por la KAS II, añadiendo de esta forma el sustrato radiactivo, [¹⁴C]18:0-ACP. Sin embargo, como la reacción de la KAS II sólo se dejaba transcurrir durante 15 minutos no todo el [¹⁴C]16:0-ACP se convertía en [¹⁴C]18:0-ACP. Por tanto, en el volumen (45 µl) que se añadía a la reacción además del sustrato de la enzima, el [¹⁴C]18:0-ACP, se estaba añadiendo también [¹⁴C]16:0-ACP. La concentración inicial de [¹⁴C]18:0-ACP, procedente de la reacción de la KAS II, oscilaba entre 0,2-0,4 µM, llegando a unas concentraciones finales entre 45-75 nM. El volumen final de ensayo era de 250 µl. La reacción se incubaba a 23°C durante 10 minutos con agitación suave y se detenía con 125 µl de NaOH 8 M y 50 µl de ácidos grasos fríos (1mg de 18:0 y 18:1/ml acetona). Se mantenía durante 15 minutos en un baño a 80°C para hidrolizar los acil-ACP y a continuación se acidificaba la mezcla con 125 µl de HCl 8 M y se metilaba para obtener los ésteres metílicos.

4.4. Separación de los productos de ambas reacciones enzimáticas.

La separación de los productos de la reacción catalizada por la KAS II (16:0 y 18:0) se hacía mediante placas de sílice de TLC de *fase reversa*, mientras que la separación de los productos de la reacción de la EDS (18:0 y 18:1) se hacía en placa de TLC impregnadas con solución de *nitrato de plata*.

4.5. Detección e identificación de las bandas radiactivas.

Para visualizar las bandas y cuantificar la radioactividad del ¹⁴C se ha utilizado un Packard InstantImager, que mediante un sistema de autorradiografía electrónica permite cuantificar en pocos minutos las emisiones tipo β que son emitidas por una muestra. El detector tiene un área de detección de 20×24 cm y una resolución de 0,5 mm. Casi de forma inmediata aparecía en la pantalla del monitor la imagen de la placa con las bandas radiactivas y en pocos minutos te permitía cuantificar la radiactividad presente en la muestra.

4.6. Cuantificación de los productos de la reacción

Las bandas de los diferentes ácidos grasos se raspaban por separado de la placa y se eluían en viales de centelleo con 4 ml de éter dietílico, se evaporaba el disolvente y se

resuspendían en 200 µl de heptano. Después de añadir 3 ml de líquido de centelleo se cuantificaba la radiactividad en el contador de centelleo.

Tanto la actividad KAS II como la EDS se daban como actividades relativas, expresándolas como pmoles mg prot⁻¹ min⁻¹. Así pues, para la actividad KAS II una vez cuantificada la radiactividad en las bandas de 16:0 y de 18:0, se calculaba el porcentaje de 18:0 que se había formado:

$$\% \text{ 18:0} = [\text{DPM 18:0} / (\text{DPM 18:0} + \text{DPM 16:0})] \times 100$$

Una vez conocido dicho porcentaje y dado que se conocían los µmoles de [¹⁴C]16:0-ACP que se habían añadido como sustrato de la reacción catalizada por la KAS II se podía determinar cuantos µmoles de [¹⁴C]18:0-ACP se habían sintetizado.

Para la actividad EDS el procedimiento era similar, cuantificando la radiactividad de la banda de 18:1 así como de la de ácidos grasos saturados (16:0 + 18:0) calculando de esta forma el porcentaje de 18:1 sintetizado:

$$\% \text{ 18:1} = [\text{DPM 18:1} / (\text{DPM Saturados} + \text{DPM 18:1})] \times 100$$

Al igual que en el caso anterior, dado que se conocían los µmoles de [¹⁴C]18:0-ACP que se habían añadido se podían determinar los µmoles de [¹⁴C]18:1-ACP formados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS LÍPIDOS DE SEMILLA MADURA DEL GIRASOL

La semilla es el lugar de síntesis y almacenamiento de los lípidos en el girasol, siendo utilizado como fuente de energía para la germinación de la semilla y el desarrollo inicial de la planta. La semilla de girasol tiene un alto contenido de aceite, aproximadamente entre 35-40%. Para caracterizar el mutante de girasol alto esteárico CAS-3 se ha comenzado analizando los lípidos totales (aceite) así como varios de sus componentes lipídicos para determinar si el alto contenido de 18:0 se encontraba en todos los lípidos de la semilla o sólo en algunos.

1. Análisis de la composición de ácidos grasos de los lípidos totales, lípidos neutros y lípidos polares totales de la semilla madura de girasol.

En primer lugar se han analizado tanto los lípidos totales (LT) como sus componentes más importantes de los lípidos de semilla, es decir, los TAG, componentes mayoritarios que representan alrededor de un 95% de los lípidos de la semilla, los DAG, componentes minoritarios e intermediarios metabólicos, y los LP, igualmente minoritarios en semilla madura y que se encuentran formando parte de las membranas celulares. Según puede observarse en la tabla 9, existían diferencias interesantes entre el mutante alto esteárico CAS-3 y el control RHA-274 en lo que se refiere a la composición de ácidos grasos de los LT de semilla madura. Los niveles de 16:0 y 18:2 en el mutante CAS-3 eran similares a los de la línea control RHA-274, permaneciendo el 16:0 entre 5-6% en ambas líneas, mientras que el 18:2 varía algo más, siendo mayor su porcentaje en RHA-274 (56%) que en CAS-3 (51%). Las mayores variaciones se observaban en los 18:0 y 18:1. El 18:0 de la línea mutante experimentaba un aumento de más de cinco veces con respecto a la línea control, pasando de un 4,9% en el control a un 26,1% en el mutante. Este aumento en el contenido de 18:0 se hacía a expensas del 18:1 que disminuía su contenido desde 30,8% en el control hasta un 14,2% en el mutante. Este mismo efecto se había observado en mutantes de soja con un alto contenido de 18:0 en semilla (Graef et al., 1985; Rahman et al., 1995) y en *Arabidopsis thaliana* (James y Dooner, 1990). El resto de los ácidos grasos eran minoritarios y no experimentaban cambios importantes.

Tabla 9. Composición de ácidos grasos de los LT, TAG, DAG y LP de semillas de la línea control RHA-274 y de la línea alto esteárico CAS-3.

Lípido Línea		Composición de ácidos grasos (mol %)						
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	22:0
LT	RHA-274	6,4±0,1	4,9±0,4	30,8±2,3	56,2±2,5	tr	tr	1,0±0,1
	CAS-3	5,4±0,3	26,1±1,1	14,2±2,1	51,3±2,8	tr	1,4±0,1	1,3±0,1
TAG	RHA-274	6,8±0,2	5,0±0,4	31,4±2,2	55,4±2,3	tr	tr	0,9±0,1
	CAS-3	5,3±0,3	27,0±1,6	14,2±2,6	50,6±2,6	tr	1,4±0,1	1,4±0,1
AG	RHA-274	7,1±1,0	3,8±0,7	25,9±1,5	62,3±0,9	tr	0,5±0,2	tr
	CAS-3	6,4±0,5	16,4±0,7	16,4±2,9	59,5±2,2	tr	0,6±0,1	tr
P	RHA-274	12,8±0,8	5,3±0,3	17,7±0,8	61,9±0,3	tr	0,9±0,8	1,3±0,3
	AS-3	9,6±0,1	18,5±0,5	11,5±3,2	57,8±4,2	tr	1,0±0,2	0,8±0,1

tr < 0,5%

Unas variaciones muy similares se observaban en los TAG, los componentes mayoritarios de los LT, variando el contenido de los ácidos grasos en el mismo rango. El 16:0 variaba entre 5-6% en ambas líneas, al igual que ocurría en los LT, y también en TAG el porcentaje de 18:2 era mayor que en el control (55% en RHA-274 y 50% en CAS-3). Los porcentajes de 18:0 y 18:1 eran los que más variaban también en TAG, siendo el contenido de 18:0 de CAS-3 más de cinco veces el de RHA-274 (27% y 5% respectivamente) con un descenso paralelo del contenido de 18:1 (14% y 31% en CAS-3 y RHA-274 respectivamente)

En los DAG los contenidos de 16:0 y 18:2 en ambas líneas eran similares a los de LT y TAG, observándose también las mayores variaciones en el par 18:0-18:1. El contenido de 18:1 era de un 25,9% en el control y 16,4 % en el mutante, mientras que el de 18:0 era de 3,8% en el control y 16,4% en el mutante. El menor contenido de este AG en los DAG con respecto a los TAG se debe a que el 18:0 solamente se esterifica en las posiciones externas del glicerol (*sn-1* y *sn-3*) de las que sólo *sn-1* está disponible en los DAG (Stymne y Stobart, 1987).

En los LP el contenido de 16:0 era superior al del resto de los lípidos, aunque se mantenía en unos valores parecidos en ambas líneas, variando entre un 9-13%. El 18:0 es el que experimentaba también una mayor variación, pasando de un 5,3% en el control a un 18,5% en

el mutante. El porcentaje de 18:2 era similar en ambas líneas, con un 62% en RHA-274 y un 59% en CAS-3.

Tampoco se observaban variaciones significativas en los niveles de ácidos grasos saturados largos, como 20:0 y 22:0, como consecuencia del aumento del contenido de 18:0.

Por tanto, en el mutante CAS-3 el aumento en el contenido de 18:0 no provocaba variaciones significativas en los niveles de otros ácidos grasos, a excepción del 18:1. En otros cultivos el método empleado para aumentar o disminuir el contenido de un ácido graso en concreto tenía efectos impredecibles y no deseados sobre el nivel de otros ácidos grasos, como había ocurrido en líneas mutantes de soja con alto contenido en 18:0 ó 16:0 (Mounts et al., 1996) que también aumentaban el nivel de 18:3 lo cual reducía la estabilidad del aceite. También en colza (Knutzon et al., 1992) los mutantes alto esteárico mostraban un aumento en el contenido de AG saturados largos como ácidos araquídico (20:0), behénico (22:0) y lignocérico (24:0), supuestamente debido a la acción de la β -cetoacil-ACP sintetasa II sobre el 18:0-ACP.

Según estos resultados se puede afirmar que el aceite extraído de semillas de CAS-3 es un aceite con un alto contenido en ácidos grasos saturados y por tanto con un mayor punto de fusión que un aceite de girasol normal por lo que presenta una mayor solidez y consistencia a temperatura ambiente. Estas propiedades lo convierten en un aceite ideal para sustituir a las grasas semisólidas utilizadas actualmente para la fabricación de margarinas, pastelería y productos relacionados obtenidas por hidrogenación parcial de aceite de soja fundamentalmente (Norris, 1991). De esta forma se evitaría el consumo de ácidos grasos *trans*, isómeros formados durante el proceso de hidrogenación, los cuales parecen no ser recomendables para la salud por sus posibles implicaciones en el aumento del nivel de colesterol-LDL y del riesgo de enfermedades coronarias (Willett, 1994; Willett et al., 1994; James, 1996; Grundy, 1994). Además el aceite de CAS-3 tiene otro valor añadido ya que aunque tiene un alto contenido en ácidos grasos saturados, a los cuales se les atribuye también un importante papel hipercolesterolémico y en el desarrollo de enfermedades coronarias, se ha observado que no todos los ácidos grasos saturados tienen el mismo efecto sino que el 12:0, 14:0 y 16:0 tienen un mayor poder hipercolesterolémico que el 18:0, el cual parece tener un efecto neutro sobre el nivel de colesterol LDL y HDL en sangre (James, 1996; Grundy, 1994; Pearson, 1994).

2. Análisis de la composición de ácidos grasos de los principales tipos de lípidos polares de semilla madura.

Dado que los primeros análisis indicaban que en los principales componentes del aceite de semilla, TAG, DAG y LP, del mutante CAS-3 existía un mayor contenido de 18:0 que en el control, se han seguido realizando posteriores análisis de los diferentes LP, tanto de los glicerofosfolípidos como glicosilglicéridos, para determinar si mostraban también un mayor contenido de 18:0. Se han analizado los glicerofosfolípidos mayoritarios en la semilla, PI, PC y PE, así como los galactolípidos, MGDG y DGDG (tabla 10).

Tanto PC como PE presentaban una composición de ácidos grasos similar en el control y en el mutante, con un contenido de 18:2 alrededor de un 60% y un contenido de 16:0 también similar, entre 5-12%.

Tabla 10. Composición de ácidos grasos de los principales LP de semilla de girasol, incluyendo glicerofosfolípidos y galactolípidos, de la línea mutante CAS-3 y del control RHA-274.

Lípido	Línea	Composición de ácidos grasos (mol %)						
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	22:0
PC	RHA-274	10,7±2,0	4,3±0,5	25,3±1,1	59,2±2,6	tr	tr	tr
	CAS-3	8,8±1,7	18,4±3,7	11,3±0,8	59,4±2,5	tr	0,6±0,1	0,9±0,3
PE	RHA-274	13,1±4,9	3,1±0,4	17,2±4,0	66,2±1,7	tr	tr	tr
	CAS-3	11,2±2,5	18,4±1,5	7,8±0,3	59,6±2,3	tr	0,8±0,1	1,7±0,5
PI	RHA-274	33,8±0,6	14,0±2,1	14,2±3,0	37,3±3,6	tr	tr	tr
	CAS-3	16,0±1,2	41,4±2,1	4,9±2,5	36,9±2,9	tr	tr	tr
DGDG	RHA-274	6,9±3,5	5,2±0,5	24,3±0,7	60,2±3,9	2,8±1,0	0,5±0,5	tr
	CAS-3	5,2±1,8	20,4±4,2	5,6±3,3	61,9±3,4	5,2±1,1	tr	1,2±1,3
MGDG	RHA-274	11,8±1,5	3,1±0,2	18,0±3,8	66,0±3,9	1,4±0,1	tr	-
	CAS-3	8,7±0,8	16,3±3,3	12,5±3,4	55,5±1,9	4,6±1,2	0,6±0,1	1,5±0,7

tr < 0,5%

Sin embargo todos los glicerofosfolípidos del mutante presentaban un contenido de 18:0 entre 4-6 veces superior que en el control. Este aumento del contenido de 18:0 lo hacía a expensas del 18:1 que bajaba su contenido en todos los glicerofosfolípidos.

El PI era el único lípido que presentaba en ambas líneas un comportamiento diferente. Su contenido de 18:2 era bastante inferior, alrededor de un 36% en ambas líneas, mientras que el contenido en 18:0 aumentaba desde un 14% en el control a un 41% en el mutante. A pesar de este aumento importante en el contenido de 18:0 el mutante mantenía un contenido total de saturados (16:0 + 18:0) similar al del control, alrededor de un 50%, debido al alto porcentaje de 16:0 en el control y al importante descenso que sufre el contenido de este AG en el mutante llegando casi a la mitad que en el control. El contenido de 18:1 en el mutante también disminuía para contrarrestar el importante aumento del 18:0. El hecho de que el contenido de PI en el mutante sea de un 57% de saturados implica que al menos un 7% de los saturados debe estar esterificado en posición *sn-2*, en contra de la tendencia habitual en los glicerolípidos que es excluir los saturados de esta posición intermedia y esterificar solamente ácidos grasos insaturados.

3. Análisis posicional de los ácidos grasos en los TAG.

La calidad nutricional de un aceite viene determinada, en parte, por su composición de AG así como por la distribución de éstos en los TAG. Como ya se ha explicado anteriormente, los ácidos grasos saturados normalmente se excluyen de la posición intermedia de los TAG (*sn-2*), esterificándose en las posiciones extremas (*sn-1* y *sn-3*).

Dado que CAS-3 tiene entre 4-6 veces más 18:0 que el control, había que determinar si en el mutante se había producido un aumento en la cantidad de 18:0 esterificado en la posición *sn-2* de los TAG o, si por el contrario, se mantenía la exclusión de los saturados de dicha posición. Para ello se llevó a cabo la hidrólisis enzimática de los TAG de semilla madura con lipasa pancreática, obteniéndose por un lado *sn-2* MAG y por otro los ácidos grasos libres que estaban esterificados en *sn-1* y *sn-3*, determinándose la composición de ácidos grasos de ambos componentes.

Según se observa en la tabla 11 el porcentaje de 16:0 esterificado en la posición *sn-2* de los TAG era muy bajo en ambas líneas apareciendo un 0,5% y 0,4% en RHA-274 y CAS-3 respectivamente, mientras que la mayor parte del 16:0 estaba esterificado en las posiciones *sn-1* y *sn-3*, un 9,2% en RHA-274 y un 8,3% en CAS-3. El 18:0 presentaba una distribución

similar a la del 16:0 esterificándose en *sn-2* sólo un 0,4% en RHA-274 y un 1,4% en CAS-3, mientras que en posiciones *sn-1* y *sn-3* se esterificaría el resto de 18:0, es decir, un 6,1% en RHA-274 y un 37,6% en CAS-3.

Tabla 11. Distribución de ácidos grasos en los TAG de semilla madura de la línea control RHA-274 y del mutante CAS-3 tras la hidrólisis con lipasa pancreática.

Línea	Pos.	Composición de ácidos grasos (mol %)						
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	22:0
RHA-274	1+3	9,2±0,1	6,1±0,1	34,0±2,4	50,7±2,7	tr	tr	0,9±0,1
	2	0,5±0,1	0,4±0,1	34,7±0,6	64,2±0,9	tr	tr	tr
CAS-3	1+3	8,3±0,1	37,6±3,2	10,9±1,6	43,1±3,9	tr	1,8±0,2	1,5±0,1
	2	0,4±0,1	1,4±0,2	22,4±3,7	75,7±3,7	tr	tr	tr

tr < 0,5%

Luego en las semillas mutantes CAS-3, a pesar de tener un contenido de 18:0 más de cinco veces superior al del control, se seguía excluyendo de la posición intermedia de los TAG, confirmando la especificidad de la LPAAT mencionada anteriormente. La posición intermedia estaba ocupada casi exclusivamente por ácidos grasos insaturados, 18:1 y 18:2, aunque existe cierta diferencia entre ambas líneas ya que mientras que en RHA-274 el 18:1 se esterificaba indistintamente (34 %) en posición *sn-2* o en *sn-1+ sn-3*, en CAS-3 el 18:1 prefería la posición *sn-2*. Con respecto al 18:2 en ambas líneas se esterificaba preferentemente en posición intermedia.

Por tanto en el aceite de girasol, como en la mayoría de los aceites vegetales, los AG saturados se excluían prácticamente de la posición central de los TAG, lo cual tiene unas importantes implicaciones desde el punto de vista nutricional, ya que son precisamente los ácidos grasos esterificados en la posición intermedia de los TAG los que se absorben preferentemente a través de la pared intestinal (Small, 1991). Los que se esterifican en las posiciones *sn-1,3*, si son ácidos grasos saturados, se absorben sólo parcialmente ya que la mayor parte se excretará en las heces mediante la formación de sales de calcio o magnesio (Mattson et al., 1979; Jandacek, 1991). Según algunos autores es precisamente esta menor absorción del 18:0 una de las causas por las que dicho ácido graso tiene un efecto neutro sobre el nivel de colesterol. Parece ser que cuando el 18:0 se encuentra esterificado en la

posición *sn-2* de los TAG la 2-monoestearina que resulta tras la acción de las lipasas se absorbe bien, sin embargo si el 18:0 se esterifica en las posiciones *sn-1* ó *sn-3* se van a liberar quedando como 18:0 libres, que en presencia de calcio ó magnesio formará jabones que serán sólo parcialmente absorbidos (Mattson et al., 1979). Otros autores han sugerido que la diferencia entre el 18:0, no hipercolesterolémico, y el 16:0, hipercolesterolémico, estriba no en la diferente absorción de ambos AG sino a diferencias en su metabolismo, sugiriendo una rápida conversión de 18:0 a 18:1 en el hígado, mientras que la conversión del 16:0 a 18:1 sería más lenta, teniendo así más tiempo para ejercer su efecto sobre el nivel de colesterol (Bonanome y Grundy, 1988; Denke y Grundy, 1991). También existe otra evidencia, y es que los ácidos grasos saturados C_{12:0}-C_{16:0} aumentan el nivel de LDL debido a que inhiben la síntesis de los ARNm de los receptores del colesterol LDL, mientras que C_{18:0} no tiene efecto sobre dichos receptores (James, 1996). En resumen, actualmente existen diferentes evidencias *a favor* del papel *no aterogénico* del 18:0: 1) el 18:0 no actúa sobre los receptores-LDL por lo que no ejerce ningún efecto sobre la tasa de producción o de eliminación del colesterol LDL; 2) presenta una menor absorción en el intestino debido a la posición que ocupa en los TAG (*sn-1* y *sn-3*); 3) se desatura rápidamente a 18:1 en el hígado (Pearson, 1994). Sin embargo, parece ser que ninguna de estas evidencias podrían explicar, por separado, el menor efecto hipercolesterolémico del 18:0 con respecto a otros ácidos grasos, sino que se requiere un efecto acumulativo de todas estas diferencias metabólicas (Emken, 1994).

Este hecho tiene gran importancia dada la controversia que existe actualmente sobre los efectos de las grasas saturadas en el nivel de colesterol en sangre y en la formación de placas de ateromas en las arterias (James, 1996). Sin embargo parece ser que no es el contenido total de saturados de una grasa lo que determina su efecto sobre el nivel de colesterol en sangre, sino el porcentaje de saturados esterificados en posición *sn-2* de TAG que es la que será absorbida por el epitelio intestinal (Renaud et al., 1994). Existen grasas muy saturadas de origen vegetal como la manteca de cacao con altos niveles de 18:0 (35%) y 16:0 (25%) pero que están esterificados casi exclusivamente en posición *sn-1* y *sn-3* y no muestran ningún efecto sobre el nivel de colesterol en sangre (Bracco, 1994), mientras que grasas saturadas de origen animal como la manteca de cerdo, con un notable efecto sobre el nivel de colesterol ya que aumentan el colesterol LDL en sangre y favorecen la formación de ateromas (Kritchevsky, 1996), tienen un alto contenido en 16:0 (25%), similar a la manteca de cacao,

pero con la diferencia de que más de un 95% de ese 16:0 se encuentra esterificado en posición *sn-2*.

Para confirmar la relación entre la posición de un AG saturado en la molécula de TAG y su capacidad aterogénica se han realizado procesos de interesterificación en la manteca de cerdo y se ha observado cómo disminuía el porcentaje de 16:0 en posición *sn-2* (7,6%) así como también su capacidad aterogénica (Kritchevsky, 1996). Por tanto, dado que el aceite del mutante de girasol alto esteárico CAS-3, a pesar de tener cerca de un 30% de 18:0 en los TAG se encuentra casi exclusivamente esterificados en posición *sn-1+3*, al igual que ocurría en la manteca de cacao, cabe suponer que tampoco tendrá ningún efecto hipercolesterolémico ni aterogénico por lo se trata de un aceite “saturado” saludable y de un gran valor añadido.

II. ANÁLISIS DE LOS LÍPIDOS DE ALGUNOS TEJIDOS VEGETATIVOS DEL GIRASOL.

Como ya se ha visto en el apartado anterior el mutante CAS-3 tiene un alto contenido de 18:0 en la semilla, reflejándose en todos los lípidos de la semilla madura, tanto en TAG, DAG y LP, como en los distintos tipos de lípidos polares, PI, PC, PE, MGDG y DGDG. Sin embargo también interesaba determinar cual era el contenido de 18:0 en otros tejidos de la planta para conocer si también manifestaban el fenotipo mutante, e intentar determinar si el carácter alto esteárico era de expresión específica de semilla o por el contrario ocurría como en el mutante alto esteárico de *Arabidopsis* (Lightner et al., 1994) donde se había encontrado un mayor contenido de este ácido graso no sólo en la semilla sino en otros tejidos de la planta.

1. Caracterización de los lípidos del cotiledón

Durante la germinación de la semilla se produce la movilización y degradación de los lípidos de reserva, constituidos en más de un 95% por TAG, así como la síntesis de nuevos lípidos, fundamentalmente lípidos de membrana (lípidos polares). Dado que el análisis de los TAG de la semilla había dado como resultado un importante aumento en el contenido de 18:0 de los TAG del mutante CAS-3 en comparación con los del control, pudiera ocurrir que en CAS-3 la degradación de los TAG ricos en 18:0 estuviera de alguna forma modificada. Por otro lado el catabolismo de los TAG es el mecanismo que emplea la semilla para obtener la energía necesaria para la germinación, por tanto, un cambio en la composición de AG de los TAG podría afectar de alguna manera al proceso germinativo de la semilla, como ocurría en *Brassica*, donde mutantes con alto contenido de 18:0 en la semilla presentaban serias dificultades para germinar (Knutzon et al., 1992).

1.1. Degradación de la reserva de lípidos durante la germinación.

Semillas de girasol de ambas líneas se pusieron a germinar y se analizó el contenido lipídico de los cotiledones en diferentes etapas de la germinación, desde 0-15 DDS. En la figura 18 se ha representado el porcentaje (%) de TAG por miligramo de semillas, pero sólo hasta los 11 DDS ya que en ese momento la reserva lipídica ha sido utilizada casi en su totalidad. Como puede observarse la disminución de la reserva lipídica es similar en ambas líneas, produciéndose una disminución drástica de los TAG de reserva durante los siete primeros días después de la siembra, hidrolizándose más de un 95% de los TAG en este

periodo. Un comportamiento similar en cuanto a la utilización de los lípidos de reserva se había observado en otras semillas oleaginosas tales como ricino (*Ricinus communis* L.) donde el proceso de germinación se ha estudiado con detalle (Muto y Beevers, 1974).

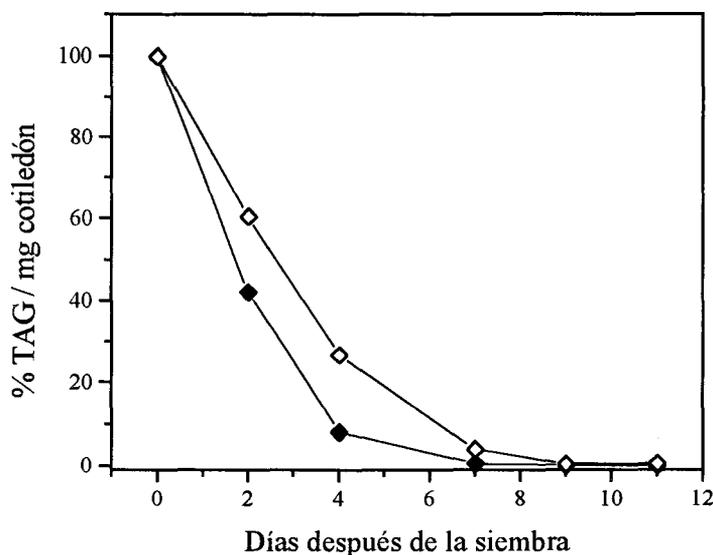


Figura 18. Disminución del porcentaje de TAG (%) por miligramo de cotiledón durante la germinación de la semilla RHA-274 (◆) y CAS-3 (◇).

1.2. Cambios en la composición de AG de los lípidos totales del cotiledón.

Durante la germinación también se analizó la composición de AG de los lípidos aún sin hidrolizar en el cotiledón. Con este análisis se pretendía conocer si los TAG de CAS-3, por ser más saturados, se hidrolizaban de manera diferente a los del control RHA-274, es decir, si sobre los TAG ricos en 18:0 de CAS-3 existía una selección *en contra* a la hora de su degradación. Los resultados de estos análisis se muestran a continuación.

1.2.1. Variación en el contenido de ácido palmítico durante la germinación.

El contenido de 16:0 en la semilla madura, como ya se ha visto anteriormente, era similar en CAS-3 y en RHA-274, oscilando entre 5-7%, sin embargo, durante la germinación sí se observaban diferencias significativas en el contenido de 16:0 del cotiledón de ambas líneas, fundamentalmente en la última etapa de la germinación (figura 19). Durante los siete primeros días después de la siembra el nivel de 16:0 del cotiledón de ambas líneas no experimentaba grandes cambios, manteniéndose entre un 5-7% tanto en el control RHA-274 como en el mutante CAS-3. A partir de este momento el contenido de este ácido graso

experimentaba un aumento en ambas líneas aunque mayor en RHA-274, llegando a un 12% mientras que sólo alcanzaba un 8,7% en CAS-3. Este aumento en el porcentaje de 16:0 en ambas líneas se debía, probablemente, a síntesis *de novo* de ácidos grasos destinado fundamentalmente a la síntesis de lípidos de membrana, como se observó en semillas de soja tras analizar la síntesis de lípidos durante la germinación (Harwood, 1975). Por tanto, debido a esta síntesis *de novo* de ácidos grasos el porcentaje de un determinado AG en el cotiledón va a estar determinado tanto por los TAG de reserva de la semilla aún no hidrolizados como por la síntesis *de novo*.

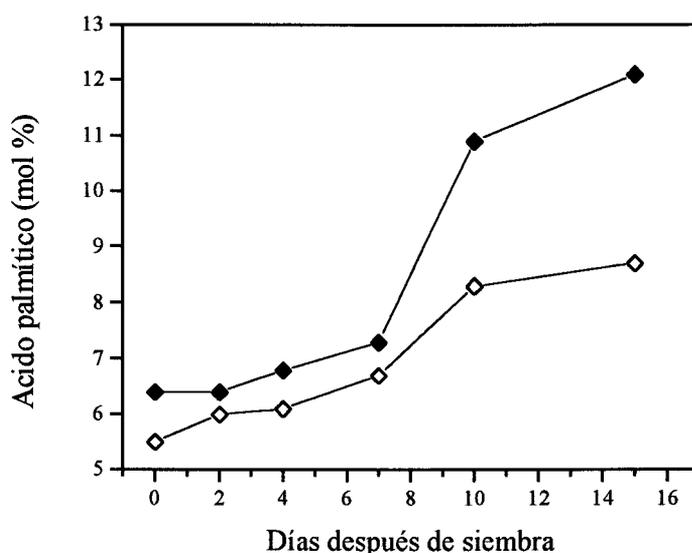


Figura 19. Variación del porcentaje (mol %) de 16:0 durante la germinación de la semilla de la línea control RHA-274 (◆) y del mutante CAS-3 (◇).

1.2.2. Variación en el contenido de ácido esteárico durante la germinación de la semilla de girasol.

El contenido de 18:0 en el cotiledón durante la germinación presentaba importantes diferencias entre ambas líneas, siendo el porcentaje de este AG mayor en el cotiledón de CAS-3 que en el control RHA-274 durante toda la germinación (figura 20). Durante los 7 primeros días de la germinación el contenido de 18:0 se mantenía constante, en un 27% aproximadamente, en comparación con el contenido de 18:0 de la línea control que permanecía en 5-6%. A partir del 7 DDS el contenido de 18:0 en el cotiledón del mutante disminuía hasta un 17% manteniendo este nivel durante todo su desarrollo (hasta los 15 DDS momento en que se considera que el cotiledón ya ha perdido su función de suministrar energía

al embrión en los primeros estadios de su desarrollo. En la línea control el nivel de 18:0 en el cotiledón de más de 7 DDS se mantenía alrededor de un 5% durante todo el desarrollo. El hecho de que el mutante CAS-3 mantuviera en el cotiledón de 10-15 DDS un nivel de 18:0 cuatro veces superior al del control podría deberse a varias razones, entre ellas, a que una cierta cantidad de los lípidos de reserva de la semilla, con un 30% de 18:0, no se hubieran catabolizado durante la germinación o bien que algunos de los genes modificados en la semilla CAS-3 responsable en parte del fenotipo mutante estuviera expresándose también en el cotiledón.

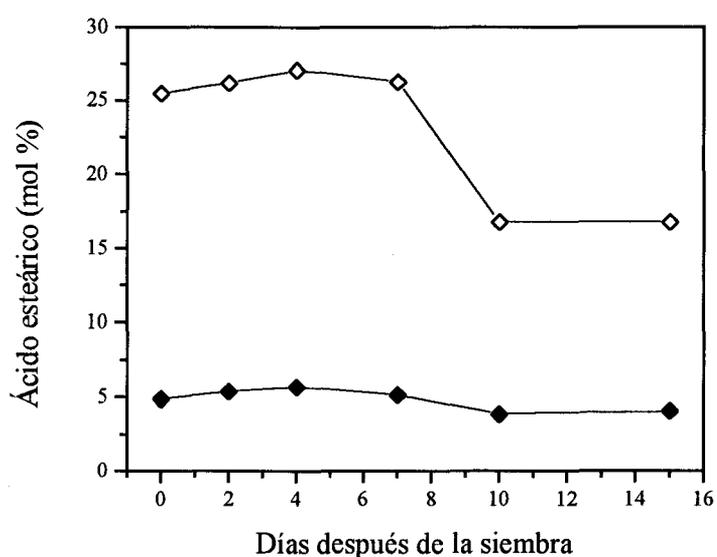


Figura 20. Variación del porcentaje (mol %) de 18:0 durante la germinación de la semilla de la línea control RHA-274 (◆) y del mutante CAS-3 (◇).

1.2.3. Variación en el contenido de ácido oleico y linoleico.

Ambos ácidos grasos tienen un comportamiento similar durante el desarrollo del cotiledón. En el caso del 18:1 durante los 4 primeros días de germinación el nivel se mantiene más o menos constante en ambas líneas (figura 21), aunque el control tenía el doble de 18:1 que el mutante. A partir del 4 DDS y hasta el 10 DDS el porcentaje de 18:1 disminuía en ambas líneas aunque dicha disminución era mucho más pronunciada en el control (de 28% a los 4 DDS a 1,65 a los 10 DDS) que en CAS-3 (de 17,7% a 5,8% en el mismo periodo) de tal forma que a los 10 DDS el cotiledón de CAS-3 tenía más 18:1 que el de RHA-274. Ambas líneas mantenían estos mismos niveles hasta los 15 DDS.

El 18:2 tenía un comportamiento similar, de manera que durante los 7 primeros días el cotiledón de RHA-274 tenía un contenido de 18:2 superior al de CAS-3 (figura 21), aunque cada línea mantenía sus niveles durante esta primera etapa.

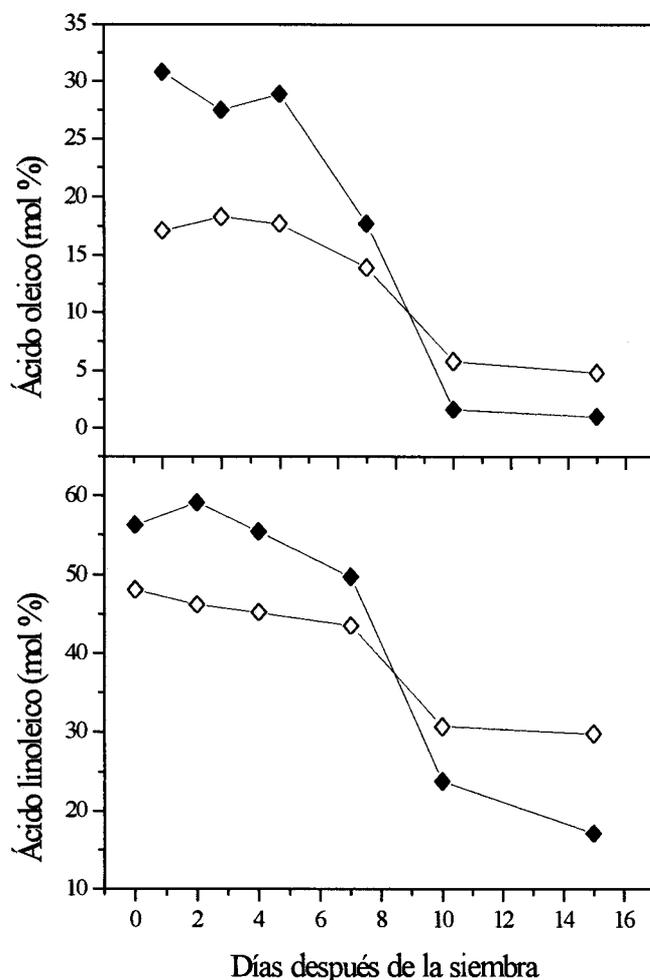


Figura 21. Variación de los porcentajes (mol %) de los ácidos oleico y linoleico durante la germinación de la semilla de la línea control RHA-274 (◆) y del mutante CAS-3 (◇).

Durante el periodo comprendido entre 7-10 DDS el nivel de 18:2 sufría variaciones importantes, disminuyendo hasta alcanzar un 23,8% en RHA-274 y un 30,7 % en CAS-3. A partir de este momento estos niveles no experimentaban variaciones significativas, manteniendo CAS-3 un mayor nivel de 18:2 que RHA-274 en el cotiledón de 15 DDS.

1.2.4. Variación en el contenido de ácido linolénico durante la germinación de la semilla de girasol.

El 18:3 es el AG más abundante de los tejidos verdes, encontrándose esterificado en los lípidos de las membranas tilacoidales (MGDG, DGDG y PG) (Webb y Green, 1991).

Tanto en la línea control como en el mutante el contenido de 18:3 en el cotiledón aumentaba a partir de los 4 DDS aunque la subida era mucho mayor en el control, ya que mientras RHA-274 pasaba de 1,3% (4 DDS) a 18% (7 DDS) CAS-3 lo hacía de 0,5% a 5,2% en el mismo intervalo de tiempo (figura 22). Desde los 7 a los 10 DDS era cuando se producía la mayor subida, aunque también mucho más importante en RHA-274, aumentando hasta 57% mientras que CAS-3 sólo llegaba a un 35%. A partir de este momento y hasta los 30 DDS (datos no mostrados) el cotiledón mantenía el nivel de 18:3 que tenía a los 10 DDS tanto en el control como en el mutante CAS-3.

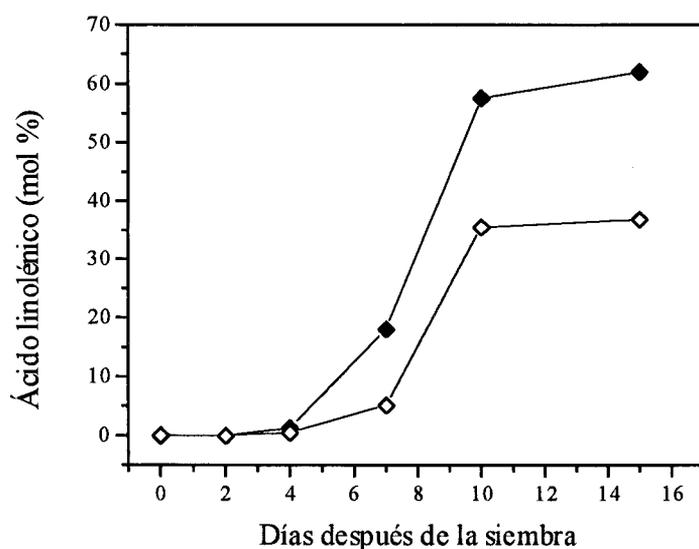


Figura 22. Variaciones del porcentaje (mol %) de 18:3 durante la germinación de la semilla de la línea control RHA-274 (◆) y del mutante CAS-3 (◇).

Por tanto, durante la primera etapa del desarrollo, desde 0-7 DDS, el cotiledón de cada línea, tanto control como mutante, mantenía una composición de AG similar, sin grandes variaciones. Entre los 7-10 DDS los niveles de los AG experimentaban los mayores cambios aumentando los niveles de 16:0 y 18:3 y disminuyendo los de 18:0, 18:1 y 18:2, observándose este comportamiento en ambas líneas. A partir de 10 DDS y hasta los 15 DDS los niveles de AG volvían a mantenerse más o menos constante, sin sufrir cambios significativos. Sin embargo, las variaciones en los porcentajes AG durante la germinación de las semillas mutantes eran menos pronunciadas que las del control, excepto el 18:0 cuya variación era más importante en CAS-3.

2. Caracterización de los lípidos del hipocotilo

Otro de los tejidos analizados en el control y en el mutante fue el hipocotilo, designando con este nombre el fragmento situado entre la raíz y los cotiledones. Se sembraron semillas de ambas líneas y se fueron recogiendo muestras de hipocotilo en distintos estados de desarrollo (7, 10, 15 y 30 DDS), analizando posteriormente su composición de ácidos grasos. De esta manera se quería determinar si los lípidos del hipocotilo del mutante CAS-3 tenían un mayor contenido de 18:0 que los del control RHA-274, es decir, mostraban fenotipo mutante, o si, por el contrario los niveles de este ácido graso eran similares a los del control, indicando que este tejido no manifestaba el carácter alto esteárico.

2.1. Variaciones en la composición de AG de los lípidos totales del hipocotilo durante la germinación de la semilla y el desarrollo de la plántula.

De este tejido solamente se determinó la composición de ácidos grasos de los LT. Con respecto a los ácidos grasos insaturados (18:1, 18:2 y 18:3) el porcentaje de cada uno de ellos no variaba significativamente entre el control y el mutante (tabla 12). El nivel de 18:1 se mantenía entre 3-6% en ambas líneas durante todo el desarrollo del hipocotilo, mientras que el porcentaje de 18:2, tanto en el control como en el mutante, era mayor en el tejido de 7 DDS, alrededor de 50%, disminuyendo posteriormente. Con respecto al 18:3 su contenido era menor en el hipocotilo joven aunque después a los 30 DDS aumentaba hasta un 22% tanto en el control como en el mutante.

Los porcentajes de ácidos grasos saturados tampoco experimentaban, en general, variaciones importantes aunque había algunas diferencias a destacar. El contenido de 16:0 era entre 2-3% superior en RHA-274 que en CAS-3 durante todo el desarrollo del hipocotilo, pudiéndose apreciar en ambas líneas un aumento en el porcentaje de 16:0 a medida que el tejido se iba desarrollando, alcanzando los niveles más altos a los 15 DDS (23% en RHA-274 y 20% en CAS-3). Con respecto al 18:0 las mayores diferencias se observaban en el hipocotilo más joven, de 7 DDS, donde el contenido de este AG era muy superior en CAS-3 (14,9%) que en RHA-274 (3,7%). Posteriormente, a medida que el tejido iba creciendo el nivel de 18:0 en el mutante iba disminuyendo, de forma que a los 10 DDS CAS-3 (6,9%) tenía el doble de 18:0 que RHA-274 (3,4%) y a los 30 DDS ambas líneas tenían porcentajes similares, alrededor de un 3%.

Tabla 12. Variación de la composición de ácidos grasos de los LT del hipocotilo de la línea RHA-274 y de CAS-3 durante su desarrollo.

DDS	Línea	Composición de ácidos grasos (mol %)						
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	22:0
7	RHA-274	15,9±0,7	3,7±0,2	5,4±0,6	52,5±2,8	15,7±0,7	1,6±1,1	5,0±0,8
	CAS-3	9,8±0,8	14,9±1,6	5,6±0,3	50,7±1,4	11,2±1,8	3,1±0,2	4,5±0,4
10	RHA-274	19,5±1,6	3,4±0,8	3,3±0,4	40,7±1,2	19,6±0,3	2,5±0,6	10,7±2,6
	CAS-3	16,7±1,6	6,9±0,9	4,7±0,8	41,2±1,6	18,1±0,9	2,6±0,5	9,6±0,7
15	RHA-274	23,7±1,6	3,4±0,4	4,5±1,1	41,8±3,0	16,4±0,8	2,2±0,5	7,8±1,8
	CAS-3	20,2±0,6	4,9±0,6	4,9±0,6	40,4±2,9	15,0±2,1	2,0±0,1	12,4±0,3
30	RHA-274	22,6±0,4	2,6±0,1	3,0±0,1	46,6±0,6	22,7±0,4	tr	2,4±0,8
	CAS-3	18,8±1,5	3,8±0,5	6,1±0,6	41,6±1,1	22,1±1,5	0,5±0,3	6,9±0,8

tr < 0,5%

Con respecto al porcentaje de AGML (20:0 y 22:0) se observaba que el contenido de 20:0 se mantenía entre 2-3% durante todo el desarrollo del tejido, mientras que el porcentaje de 22:0 era superior al de 20:0 en todo momento. A los 7 DDS ambas líneas tenían el mismo porcentaje de 22:0, aumentando hasta alcanzar alrededor de un 10% a los 10 DDS. A partir de este momento disminuía hasta un 7,8% en RHA-274 mientras que seguía aumentando en CAS-3 llegando a un 12,4%. A los 30 DDS en ambas líneas había disminuido su porcentaje de 22:0 aunque CAS-3 seguía manteniendo un mayor porcentaje de este ácido graso que RHA-274. La presencia en los LT del hipocotilo de AGML (20:0 y 22:0), dos ácidos grasos ausentes tanto en semilla como en otros tejidos, se debía a que ambos AG se encuentran formando parte de las ceras (Harwood y Stumpf, 1971). La síntesis de los AGML se podía producir por una doble vía, tanto por síntesis *de novo* como por sucesivas elongaciones de un ácido graso ya existente, principalmente 18:0 (Bolton y Harwood, 1977; Walker y Harwood, 1986). Por tanto, el mayor contenido de 22:0 en el hipocotilo de 15 y 30 DDS de CAS-3 respecto al de RHA-274 podría deberse a que, 1) parte del 18:0 que se estuviera elongando a 22:0 proviniera de la reserva lipídica de la semilla CAS-3, rica en 18:0, o bien 2) alguna de las

actividades enzimáticas modificadas en la semilla CAS-3 estuviera aún presente en el hipocotilo, de manera que habría una mayor cantidad de 18:0, procedente de síntesis *de novo*, que saldría del plastidio y sería posteriormente elongado.

3. Caracterización de los lípidos de raíz

Otro de los tejidos de la planta que se quería analizar era la raíz, para determinar si, al igual que la semilla manifestaba el fenotipo alto esteárico, o si, por el contrario, el contenido era similar al de la línea control RHA-274 como ocurría con el hipocotilo adulto (30 DDS). Para tomar las muestras se sembraron semillas de ambas líneas y se recogieron raíces en distintos estadios de desarrollo, desde los 4 a 30 DDS. Se extrajeron los lípidos totales de todas las muestras y se determinó la composición de ácidos grasos.

3.1. Variaciones en la composición de AG de los lípidos totales de la raíz durante la germinación de la semilla y el desarrollo de la plántula.

Al igual que en el cotiledón, en la raíz sólo se determinó la composición de AG de los LT, debido al bajo contenido lipídico de este tejido. No se observaban grandes diferencias en la composición de AG de los lípidos de raíz entre el mutante y el control. Con respecto al porcentaje de ácidos grasos insaturados (18:1, 18:2 y 18:3), el AG mayoritario era 18:2, en torno al 50% en ambas líneas durante todo el desarrollo del tejido. El porcentaje de 18:1 tampoco mostraba diferencias entre el mutante y el control, oscilando entre 3-6%, mientras que el 18:3 era más abundante que el 18:1, manteniéndose alrededor de 10-15% en ambas líneas (tabla 13).

Respecto a los AG saturados, el 16:0 era el AG más abundante después del 18:2, con unos valores parecidos en ambas líneas y relativamente constantes durante el desarrollo del tejido, oscilando entre 20-26%. El contenido de 18:0 de la raíz de CAS-3 era algo mayor que la de RHA-274 desde los 4 hasta 30 DDS, aunque las diferencias eran más importantes a los 4 DDS, cuando CAS-3 tenía más del doble de 18:0 (8,3%) que el control (3,6%). Posteriormente el nivel de 18:0 disminuía ligeramente en ambas líneas aunque CAS-3 seguía manteniendo un nivel de 18:0 ligeramente superior que el control. En la raíz de 15 DDS ambas líneas alcanzaban un contenido máximo de 18:0 siendo de un 5% en el control y de 8,7% en el mutante. A partir de los 15 DDS disminuía el contenido de 18:0 en ambas líneas

de manera que en la planta adulta de 30 DDS las raíces del control y del mutante poseían prácticamente el mismo contenido de 18:0.

El aumento de 18:0 que se producía en ambas líneas a los 15 DDS pudiera deberse a síntesis *de novo* de ácidos grasos en la raíz, de manera que el 18:0 serviría como precursor de la síntesis de AGML precursores a su vez de las ceras que van a formar parte de las paredes celulares (Harwood y Stumpf, 1971), si bien no se producía un aumento paralelo del contenido de AGML (20:0+22:0) como ocurría en el hipocotilo.

Tabla 13. Variación de la composición de ácidos grasos de LT de la raíz de la línea RHA-274 y de CAS-3 durante su desarrollo.

DDS	Línea	Composición de ácidos grasos (mol%)						
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	22:0
4	RHA-274	21,7±0,8	3,6±0,8	6,3±1,3	51,6±0,7	14,5±0,4	tr	1,8±0,5
	CAS-3	20,8±1,7	8,3±1,0	5,8±1,3	50,2±0,6	11,7±1,6	1,1±0,8	1,9±0,5
7	RHA-274	25,5±0,7	2,4±0,7	3,3±1,0	51,9±0,4	15,4±0,8	tr	1,2±0,3
	CAS-3	22,6±0,4	4,7±1,0	4,1±1,3	51,3±1,2	14,6±0,8	1,0±0,2	1,5±0,4
10	RHA-274	26,6±2,9	2,7±0,6	3,6±0,6	50,9±2,5	13,9±1,3	tr	1,9±0,3
	CAS-3	26,8±3,8	5,1±1,8	3,9±1,2	50,3±4,2	11,4±3,2	tr	1,8±0,3
15	RHA-274	25,7±0,1	5,0±1,6	4,6±0,5	50,0±1,8	10,8±0,1	1,0±0,4	2,6±0,1
	CAS-3	26,0±1,1	8,7±1,5	5,1±2,3	48,3±2,9	8,6±0,5	1,1±0,1	1,9±0,6
30	RHA-274	25,5±0,6	2,2±0,2	5,0±0,1	53,6±0,8	12,8±0,3	tr	0,9±0,1
	CAS-3	22,4±0,8	2,7±0,1	3,9±0,5	55,9±0,4	11,9±0,6	tr	2,6±0,3

tr < 0,5%

4. Caracterización de los lípidos de la hoja

De los tejidos hasta ahora analizados, cotiledón, raíz e hipocotilo, sólo la raíz es un tejido vegetativo propiamente dicho ya que tanto el cotiledón como el hipocotilo son tejidos tienen importancia durante la germinación de la semilla pero no continúan su desarrollo. La raíz sólo mostraba un nivel de 18:0 ligeramente superior en CAS-3 que en RHA-274 en los primeros estadios de formación del tejido, hasta los 15 DDS, llegando a un porcentaje similar cuando se convertían en tejidos adultos (30 DDS). Sin embargo, en una planta el tejido fundamental para su buen desarrollo es la hoja ya que es en la superficie foliar donde tiene lugar la fotosíntesis, concretamente en las membranas tilacoidales de los cloroplastos, donde va a residir específicamente la actividad fotosintética. Dichas membranas están compuestas fundamentalmente por lípidos polares, siendo un glicerofosfolípido, el PG, y galactolípidos, MGDG y DGDG (Webb y Green, 1991). Además, las envueltas cloroplásticas se componen de glicerofosfolípidos, PI, PC y PE. Por tanto sería de gran interés analizar los lípidos de la hoja y su composición de AG para determinar si en el mutante CAS-3 dichos lípidos tienen un mayor contenido de 18:0 que los del control, afectando de alguna forma al desarrollo de las hojas, o si las hojas de ambas líneas tienen el mismo porcentaje de este AG.

4.1. Composición de ácidos grasos de lípidos totales de hojas durante su formación.

El primer par de hojas emergían aproximadamente a los 10 DDS, cogiendo en este momento la primera muestra del tejido. Las siguientes se recogieron a los 15 y 30 DDS, se extrajeron los LT de todas las muestras y se determinó la composición de AG.

Respecto a los AG saturados, el porcentaje de 16:0 se mantenía en los mismos niveles en ambas líneas, observándose un ligero descenso a medida que la hoja va madurando, teniendo de un 15-16% a los 10 DDS y bajando a 12% a los 30 DDS (tabla 14). El 18:0 se mantenía en unos valores muy bajos tanto en el control como en el mutante durante todo el desarrollo de la hoja. A diferencia de lo que ocurría en raíz y en hipocotilo, el porcentaje de 18:0 era muy bajo desde el momento en que aparecían las primeras hojas, si bien siempre había un 1% más de 18:0 en los lípidos de hoja de CAS-3 que en los de RHA-274. El porcentaje de AG muy largos (20:0 y 22:0) era muy bajo en ambas líneas, sólo existiendo en cantidades trazas.

Respecto a los AG insaturados, el 18:3 era el ácido graso mayoritario en ambas líneas, con un 55-70%, aumentando su porcentaje a medida que el tejido iba madurando, pasando de 56% a 68% en RHA-274, y de 55% a 65% en CAS-3. El 18:2 era el segundo AG más abundante

después del 18:3, con un contenido entre 16-22% en ambas líneas, observándose un ligero descenso en el porcentaje durante el desarrollo de la hoja. Por último, el 18:1 era el AG insaturado menos abundante, con un porcentaje similar al de 18:0, entre 1-3% tanto en el control como en el mutante.

Por tanto, aunque básicamente el mutante CAS-3 tenía un porcentaje de 18:0 en los LT de hoja similar al del control RHA-274 sin que se apreciaran diferencias importantes, sin embargo el contenido de este AG en CAS-3 era ligeramente superior al de RHA-274.

Tabla 14. Composición de ácidos grasos de LT de la hoja de la línea RHA-274 y de CAS-3 durante su desarrollo.

DDS	Línea	Composición de ácidos grasos (mol %)						
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	22:0
10	RHA-274	16,6±1,4	2,1±0,5	2,1±0,5	21,8±0,9	56,0±1,6	tr	0,9±0,2
	CAS-3	15,1±0,1	3,1±0,2	2,9±0,3	22,1±1,3	55,5±1,2	tr	0,8±0,1
15	RHA-274	13,2±0,1	1,6±0,1	1,8±0,1	16,7±0,3	66,1±0,4	tr	0,5±0,1
	CAS-3	12,2±0,1	2,3±0,1	1,7±0,1	17,6±0,5	65,5±1,6	tr	0,5±0,1
30	RHA-274	12,3±0,3	0,9±0,1	1,1±0,1	16,2±0,2	68,7±0,2	tr	0,5±0,1
	CAS-3	12,5±0,1	1,8±0,1	1,1±0,1	17,2±0,1	65,8±0,4	tr	0,8±0,1

tr < 0,5%

4.2. Composición de ácidos grasos de diferentes lípidos polares de hoja.

Los lípidos polares de hoja constituyen el componente más importante desde un punto de vista cuantitativo dentro de los lípidos totales de hoja (Weeb y Green, 1991), compuestos a su vez por glicerofosfolípidos (PI, PC, PG y PE) y glicosilglicéridos (DGDG y MGDG). Estos últimos son los principales componentes lipídicos de las membranas tilacoidales (75% de los lípidos tilacoidales) junto con el PG.

Una vez que se había determinado que no existían diferencias importantes en la composición de AG de los LT de hoja entre ambas líneas, podía ocurrir, sin embargo, que dichas diferencias se observaran en algún tipo de lípido en concreto, por lo que se procedió a separar los LT en sus diferentes componentes y a analizar su composición de AG.

4.2.1. Composición de ácidos grasos de los principales glicerofosfolípidos de hoja.

En primer lugar se analizaron los distintos glicerofosfolípidos (PI, PC, PE y PG) de hoja madura (30 DDS) y se determinó su composición de AG (tabla 15). Con respecto al PG, el más abundante, se observaban ciertas diferencias entre ambas líneas en lo que se refiere a los AG saturados. La línea CAS-3 tenía un mayor porcentaje de 16:0 que RHA-274 (15,8% frente a un 10,9%) así como también un contenido más alto de 18:0 (3,7% frente a un 1,7%). Respecto a los insaturados, CAS-3 tenía menos 18:2 y más 18:3 que RHA-274. Este lípido de hoja se caracteriza por su alto contenido en 16:1- Δ^3 -*trans* (Webb y Green, 1991), un AG insaturado pero que geoméricamente es más parecido a un saturado debido a que el doble enlace está situado muy cerca del extremo carboxilo y a que tiene configuración *trans*. El porcentaje de este AG era ligeramente inferior en CAS-3 que en RHA-274 (29% frente a 35%).

Los demás glicerofosfolípidos (PC, PI y PE) son minoritarios en hoja y no forman parte de las membranas tilacoidales sino que se encuentran tanto en las membranas cloroplásticas como las celulares.

Tabla 15. Composición de ácidos grasos de los principales glicerofosfolípidos de hoja madura del mutante CAS-3 y de la línea control RHA-274.

Lípido	Línea	Composición de ácidos grasos (mol %)					
		16:0	16:1 ^a	18:0	18:1	18:2	18:3
PI	RHA-274	43,5±0,1	-	3,9±0,6	0,6±0,1	32,4±1,1	18,8±1,4
	CAS-3	38,0±3,9	-	3,9±0,4	0,8±0,1	39,1±0,3	17,3±4,1
PC	RHA-274	32,0±0,1	-	2,7±0,4	1,1±0,1	24,9±0,1	38,4±0,8
	CAS-3	20,9±0,1	-	2,6±0,1	0,8±0,1	16,3±0,8	58,4±0,7
PG	RHA-274	10,9±0,7	34,9±2,7	1,7±0,5	1,9±1,0	15,2±3,9	34,9±1,7
	CAS-3	15,8±1,7	29,2±4,4	3,7±0,5	2,7±0,1	10,7±0,1	37,2±3,0
PE	RHA-274	25,7±4,5	-	2,4±0,7	1,2±0,9	37,9±3,4	30,7±1,8
	CAS-3	21,9±2,7	0,7±0,2	2,5±0,5	1,0±0,3	20,2±0,1	52,7±4,0

^a 16:1- Δ^3 -*trans*

Algo general en todos ellos era que el porcentaje de 18:0 era muy bajo (por debajo del 4%) en ambas líneas. Tanto en PC como en PE el mutante CAS-3 tenía menos 16:0 y 18:2 que la

línea control pero más 18:3. Por otro lado, el PI de hoja, al igual que el de semilla, tenía un contenido de AG saturados superior al del resto de los glicerofosfolípidos (47% RHA-274 y 42% CAS-3). Su porcentaje de 18:3 era similar en ambas líneas aunque sí se observaban diferencias en el contenido de 18:2.

Por tanto, en ninguno de los glicerofosfolípidos se han encontrado elevados niveles de 18:0, sino que el porcentaje de este AG en el mutante era similar al del control. No ha sido posible determinar las causas de las diferencias observadas en los porcentajes de los demás AG.

4.2.2. Composición de ácidos grasos de los galactolípidos de hoja.

Una vez analizados la fracción de los glicerofosfolípidos se procedió a separar los diferentes tipos de galactolípidos (MGDG y DGDG) y a determinar su composición de AG. Tanto MGDG como DGDG se componen casi en un 90% por 18:3 (tabla 16) no observándose diferencias entre ambas líneas. Esto coincide con lo descrito previamente como algo general para las plantas superiores (Webb y Green, 1991). En el caso de DGDG además del 18:3, tanto 16:0 como 18:2 eran relativamente importantes, teniendo una composición muy similar tanto en el control como en el mutante. El contenido de 18:0 era muy bajo y similar en ambas líneas, si bien en CAS-3 había un 1% más de 18:0 que en RHA-274, al igual que ocurría en los LT. En cuanto al MGDG, que representa casi el 50% de los lípidos tilacoidales, su contenido de 18:3 era superior al de DGDG (93-94%) en ambas líneas, y en segundo lugar por 18:2. En este caso el 18:0 sólo se encontraba en cantidades trazas tanto en CAS-3 como en RHA-274.

Tabla 16. Composición de ácidos grasos de los galactolípidos de hoja madura de la línea control RHA-274 y del mutante CAS-3.

Lípido	Línea	Composición de ácidos grasos (mol %)				
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
DGDG	RHA-274	9,5±2,9	1,2±0,2	0,8±0,1	5,7±1,7	82,3±1,7
	CAS-3	4,8±0,7	2,3±0,1	tr	5,2±0,4	86,6±0,4
MGDG	RHA-274	1,1±0,2	tr	tr	4,3±3,2	93,9±3,6
	CAS-3	0,8±0,3	tr	tr	4,6±0,1	94,1±0,6

tr < 0,5%

Según los resultados que se han obtenido, el mutante de girasol CAS-3 no mostraba niveles elevados de 18:0 en ninguno de los lípidos de hoja que se analizaron por lo que se parece ser que el mutante CAS-3 no manifestaba el fenotipo mutante en la hoja. Sin embargo, en CAS-3, tanto DGDG como PG, dos de los lípidos mayoritarios en hoja, tenían un porcentaje de 18:0 algo mayor que RHA-274 por lo que aunque la hoja no manifiesta de forma total el carácter alto esteárico sí lo hacía parcialmente. Algo similar ocurría en un mutante de lino con bajo contenido de 18:3 en todos los lípidos de semilla pero que mostraba niveles normales de 18:3 en los lípidos de hoja (Tonnet y Green, 1987) ó también con un mutante de soja con menor porcentaje de 18:3 en semilla pero que tampoco manifestaba la mutación en la hoja (Wang et al. 1989). Sin embargo no siempre ocurre así sino que en otras semillas oleaginosas las mutaciones que modificaban la composición de ácidos grasos de la semilla provocaban también cambios en los ácidos grasos de hoja, como en *Arabidopsis* (Lemieux et al., 1990) donde mutantes con deficiencias en la desaturación del 18:1 de semilla y por tanto que acumulaban dicho ácido graso, mostraban también mayores niveles de este ácido graso en hojas. Otro mutante de *Arabidopsis*, con mayor contenido de 18:0 en semilla (James y Dooner, 1990), presentaba además niveles superiores de este ácido graso en otros tejidos como hojas, raíz, tallo ó pétalos cuando se comparaban con una planta normal.

5. Caracterización de los lípidos de otros tejidos

Según los análisis realizados hasta ahora ninguno de los tejidos de una planta CAS-3 adulta (raíz, hipocotilo y hojas) presentaba un contenido de 18:0 tan alto como el de la semilla (5 veces más que el control), por lo que, a partir de una semilla mutante se desarrollaba una planta cuyos tejidos tenían una composición de AG muy similar a la RHA-274. Ahora bien, dado que la semilla es el único tejido donde el fenotipo mutante parece manifestarse *totalmente* era importante determinar en qué momento aparecía el carácter alto esteárico en la semilla, es decir, si ya alguno de los gametos (polen y/o óvulo) mostraba el fenotipo mutante, o si, por el contrario, aparecía durante el desarrollo de la semilla. Se recogieron muestras de polen (el mismo día que aparecía), flores (recogidas antes de abrir) y lígulas.

5.1. Composición de ácidos grasos de los lípidos totales de flores, lígulas y granos de polen.

Una vez recogidas las muestras se extrajeron los LT y se determinó la composición de AG para ver si existían diferencias entre el mutante y el control (tabla 17). En las *flores*, la composición de ácidos grasos era similar en ambas líneas, siendo los AG mayoritarios 16:0, 18:2 y 18:3, con un 25-30% de cada uno de ellos. Se observaban, sin embargo, ciertas diferencias en el contenido de 16:0 y 18:2. El porcentaje de 18:0 era similar en ambas líneas, alrededor de un 10%. En el caso de las *lígulas* tampoco se observaban diferencias importantes en los niveles de los diferentes AG entre la línea control y el mutante, sin embargo, al igual que ocurría en los lípidos de hipocotilo, raíz y hoja el porcentaje de 18:0 era ligeramente superior en CAS-3 que en RHA-274 (10,8% frente a un 7,8%). Como en las flores, 16:0, 18:2 y 18:3 eran los AG mayoritarios en ambas líneas, con un 25-30% de cada uno de ellos. En cuanto a los *granos de polen*, su composición de ácidos grasos variaba algo entre ambas líneas, fundamentalmente en el porcentaje de 18:1 (14,4% en RHA-274 y 7,5% en CAS-3). El contenido de 18:0 era también algo mayor en CAS-3 (11,4%) que en RHA-274 (9,7%), al igual que ocurría en las lígulas.

Tabla 17. Composición de ácidos grasos de los LT de las flores, lígulas y polen de la línea control RHA-274 y del mutante CAS-3.

Tejido	Línea	Composición de ácidos grasos (mol %)						
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	22:0
Flores	RHA-274	24,6±0,7	10,0±0,3	4,9±0,7	29,6±0,7	26,9±0,9	2,3±0,1	1,6±0,1
	CAS-3	31,5±0,7	10,3±0,8	3,1±0,9	21,3±0,1	27,9±3,3	3,9±0,8	1,8±0,1
Lígulas	RHA-274	29,1±0,8	7,8±0,1	0,9±0,1	30,1±1,9	27,7±0,5	1,8±0,1	2,4±0,4
	CAS-3	27,7±0,9	10,8±0,3	0,7±0,1	28,8±1,2	28,4±2,4	1,9±0,1	1,5±0,1
Polen	RHA-274	27,4±1,3	9,7±1,3	14,5±0,6	10,5±1,1	35,6±1,9	1,9±0,3	tr
	CAS-3	28,8±0,3	11,4±0,3	7,5±1,8	11,7±2,8	38,1±4,2	2,4±0,5	tr

tr < 0,5%

Por tanto, después de analizar los lípidos de distintos tejidos de CAS-3 y al compararlos con los de RHA-274 podría decirse que el mutante de girasol CAS-3 sólo presentaba niveles altos de 18:0 en los lípidos de semilla (4-6 veces más que el control). De los demás tejidos

analizados (cotiledón, hipocotilo, raíz, flores, hoja, lígulas y polen) sólo el hipocotilo y la raíz en su fase inicial de desarrollo mostraban niveles de 18:0 *relativamente* altos en comparación con el control aunque dicho porcentaje disminuía a medida que el tejido iba desarrollándose alcanzando valores similares a los del control. El resto de los tejidos- hojas, flores, lígulas y polen- así como el hipocotilo y la raíz de la planta adulta tenían un porcentaje de 18:0 sólo *ligeramente* superior en CAS-3 que en RHA-274, entre 2-3% superior.

Resultados similares a estos se habían obtenido al analizar los lípidos de varios tejidos de un mutante de *Arabidopsis* con alto contenido de 18:0 en la semilla con un mayor porcentaje de este AG también en cotiledón, raíz, hojas, pétalos y sépalos de flores (Lightner et al., 1994b). Otro mutante de *Arabidopsis*, deficiente en la desaturación del 18:1, mostraba niveles mostraba niveles reducidos de 18:2 tanto en semilla como en hojas y raíz (Lemieux et al., 1990). También en soja (*Glycine max* L.) se había obtenido un mutante con niveles reducidos de 18:3 tanto en semilla como en raíz, aunque otros tejidos como el tallo y las hojas no habían modificado su porcentaje de 18:3 (Wang et al., 1989).

Las diferencias en el porcentaje de 18:0 de los tejidos vegetativos entre CAS-3 y RHA-274 no parecían ser suficientemente significativas como para afirmar que en ellos pudiera existir manifestación propiamente dicha del carácter mutante, aunque existen varias razones que podrían explicar el porqué de esta pequeña diferencia: 1) tanto el hipocotilo como la raíz, en sus primeros estadios, provienen de células de la semilla cuyos lípidos tenían alrededor de un 30% de 18:0 por lo que los porcentajes de 18:0 *relativamente* altos en sus inicios (14,9% frente a 3,7% en el hipocotilo y 8,3% frente a 3,6% en la raíz) podrían deberse a la mezcla de lípidos antiguos, procedentes de células de la semilla con un 30% de 18:0 y de lípidos nuevos con un porcentaje de 18:0 entre 3-5%; 2) otra posibilidad sería que en los primeros estadios de desarrollo del hipocotilo y la raíz aún estuvieran presentes la/s enzima/s modificadas que existían en semilla que eran las responsables del fenotipo mutante y que posteriormente como consecuencia de la síntesis *de novo* en estos tejidos el contenido de 18:0 de CAS-3 se igualase al de RHA-274; 3) sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, en todos los tejidos vegetativos analizados había un porcentaje de 18:0 *ligeramente* superior en CAS-3 que en RHA-274 por lo que otra posibilidad podría ser que alguno de los genes modificados en la semilla de CAS-3, responsable en parte del fenotipo alto esteárico (Fernández-Martínez et al., 1998), estuviera expresándose en todos los tejidos de la planta.

A pesar del mayor contenido de 18:0 en el hipocotilo y la raíz de CAS-3 en la fase inicial del desarrollo con respecto a RHA-274 y del ligero aumento de 18:0 en el resto de los tejidos vegetativos tanto la germinación de la semilla como el crecimiento y desarrollo de la planta en las cámaras de cultivo ocurrían con normalidad. Además la planta que se desarrollaba a partir de una semilla CAS-3 tenía el mismo vigor y tamaño que una planta control, a diferencia de lo observado en los mutantes de *Arabidopsis thaliana* con alto contenido de 18:0 en semilla, mencionados anteriormente, que presentaban un mayor contenido de este ácido graso en otros tejidos de la planta lo que provocaba una ralentización del crecimiento de la planta, desarrollándose plantas miniaturas (Lightner et al., 1994b). También se había observado un efecto similar en un mutante de canola el cual tenía un mayor contenido en 18:0 en la semilla pero que presentaba igualmente problemas de germinación, e incluso aquellas semilla que tenían los niveles más altos de 18:0 ni siquiera llegaban a germinar (Knutzon et al., 1992b; Thompson y Li, 1997).

III. ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS LÍPIDOS DE LA SEMILLA EN FORMACIÓN.

Según los resultados obtenidos cuando se analizaba la composición de AG de los lípidos de flores y polen, parece ser que en los gametos aún no se estaba manifestando el carácter *alto* esteárico ya que el porcentaje de este AG era similar al de la línea control, sólo ligeramente superior. Luego, el fenotipo mutante propiamente dicho (25-30% de 18:0) debería empezar a manifestarse durante el desarrollo de la semilla, una vez que se había producido la fecundación del óvulo. Para intentar determinar con más exactitud en qué momento del proceso de formación de la semilla aparecía un 25-30% de 18:0 en sus lípidos se recogieron semillas de ambas líneas en varios estadios de desarrollo (8-32 DDF). Se extrajeron los LT, se separaron las fracciones de TAG y LP y se determinó la composición de AG de las tres fracciones.

1. Análisis de los TAG de semilla de girasol en formación.

1.1. Composición de ácidos grasos de TAG de semillas de la línea control RHA-274 en formación.

Dado que los TAG son el componente mayoritario de los LT de semilla, representando, a partir de los 12 DDF, más del 85% de los LT (Garcés et al., 1989), la composición de ácidos grasos de los LT de semilla va a ser un reflejo de la composición de los TAG. En la figura 23 sólo se representan los ácidos grasos mayoritarios, ya que el 18:3, 20:0 y 22:0 son minoritarios y se encuentran en los TAG como trazas. Como se observa, el perfil de AG de los TAG no permanecía constante a lo largo de la formación de la semilla sino que variaba conforme la semilla iba madurando.

1.1.1. Variación en el contenido de ácidos grasos saturados (ácidos palmítico y esteárico) durante el desarrollo de la semilla de la línea control RHA-274.

Con respecto al contenido del 16:0 durante el desarrollo de la semilla se observaba que las mayores variaciones en los niveles de este AG se producían en los primeros estadios del desarrollo de la semilla, aproximadamente hasta los 16 DDF (figura 23). A los 8 DDF las semillas tenían alrededor de un 15% de 16:0 disminuyendo hasta un 8,8% a los 16 DDF. A partir de este momento el contenido de 16:0 continuaba bajando pero más suavemente manteniéndose en un 6% aproximadamente. Estos resultados coincidían con los obtenidos

anteriormente en semillas de girasol en formación (Robertson et al., 1978; Garcés et al., 1989) donde también se había observado un mayor contenido de 16:0 en semillas jóvenes y su disminución durante el desarrollo de la semilla.

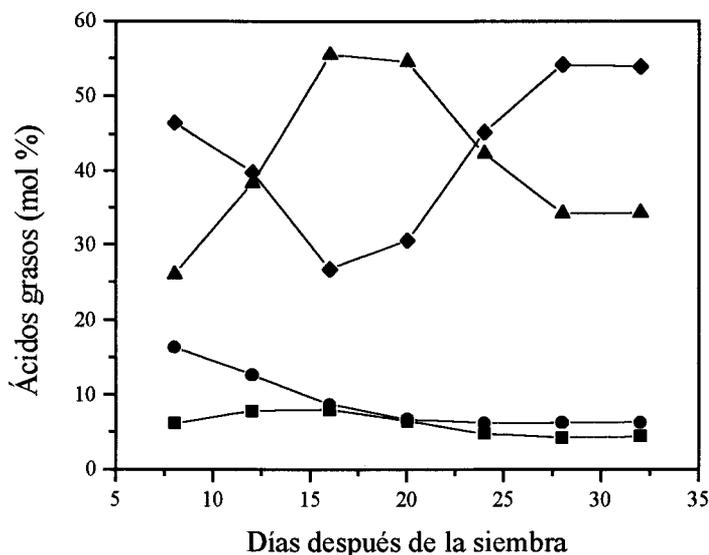


Figura 23. Variación de la composición de los ácidos grasos mayoritarios (16:0, ●; 18:0, ■; 18:1, ▲ y 18:2, ◆) de lípidos totales de semilla de girasol en formación de la línea control RHA-274.

El 18:0 es el AG que se encontraba en menor proporción en los TAG desde el principio de la formación de la semilla, con un contenido de 7,8% a los 8 DDF aunque aumentaba ligeramente a los 12 DDF llegando a un 9,8%. A partir de este momento disminuía el porcentaje hasta un 6% a los 20 DDF y posteriormente a 4% a los 24 DDF, manteniendo este valor hasta completar su desarrollo.

1.1.2. Variación en el contenido de ácidos grasos insaturados (ácidos oleico y linoleico) durante el desarrollo de la semilla de la línea control RHA-274.

Según se muestra en la figura 23 los niveles de ambos ácidos grasos sufrían importantes variaciones durante el desarrollo de las semillas, en comparación a los cambios experimentados por los ácidos grasos saturados. Las semillas de 8 DDF tenían un mayor contenido de 18:2 (46%) que de 18:1 (26%), sin embargo a partir de este momento y hasta los 16 DDF el contenido de 18:2 disminuía hasta un 27% mientras que el de 18:1 aumentaba

alcanzando un 56%. Durante un cierto periodo, que iba desde los 16 hasta los 20 DDF las semillas tenían más 18:1 que 18:2, sin embargo a partir de los 20 DDF los niveles de ambos ácidos grasos volvían a experimentar importantes cambios, disminuyendo el 18:1 y aumentando el 18:2. A los 28 DDF las semillas tenían una composición de ácidos grasos insaturados similar a la que tenían a los 8 DDF, es decir, un mayor contenido de 18:2 (52%) que de 18:1 (35%). A partir de este momento los niveles de ambos ácidos grasos se mantenían en estos valores, sin experimentar variaciones significativas. Por tanto los contenidos de ambos AG mostraban en la línea control un patrón alternante, como ya se había descrito previamente para semillas de girasol en desarrollo (Robertson et al., 1978). La acumulación de 18:1 que comenzaba a los 8 DDF posiblemente se debiera a la inducción de la enzima plastidial EDS, la cual presentaba el mayor nivel de ARNm a los 12 DDF (Kabbaj et al., 1997), mientras que el aumento de 18:2 a partir de 20 DDF pudiera deberse a la inducción de la enzima ODS (Garcés y Mancha, 1991).

1.2. Composición de ácidos grasos de TAG de semillas de la línea mutante CAS-3 en formación.

La composición de ácidos grasos de los lípidos de semilla de la línea mutante alto esteárico variaban también durante su desarrollo aunque en menor medida que lo hacían los AG de RHA-274 (figura 24).

1.2.1. Variación en el contenido de los ácidos grasos saturados (ácidos palmítico y esteárico) de semilla en formación de CAS-3.

El contenido de 18:0 de CAS-3 era muy superior al de la línea control RHA-274 ya desde los primeros estadios del desarrollo, entre 4-7 veces más que RHA-274 (figura 24). En semillas muy jóvenes, de 8 DDF, el 18:0 representaba un 24% del total de ácidos grasos, a continuación aumentaba hasta llegar a 29% a los 16 DDF y a 31% a los 24 DDF. A partir de este momento descendía sólo ligeramente manteniéndose entre 28-29% hasta que la semilla llegaba a su madurez a los 32 DDF.

El contenido de 16:0, al igual que ocurría en RHA-274, era mayor en semillas jóvenes (8,2% a los 8 DDF) aunque menor que el de semillas de 8 DDF del control (15%), disminuyendo lentamente hasta alcanzar un 6% a los 20 DDF. A partir de este momento y hasta que la semilla llegaba a su madurez el contenido de 16:0 se mantenía entorno a un 5-6%.

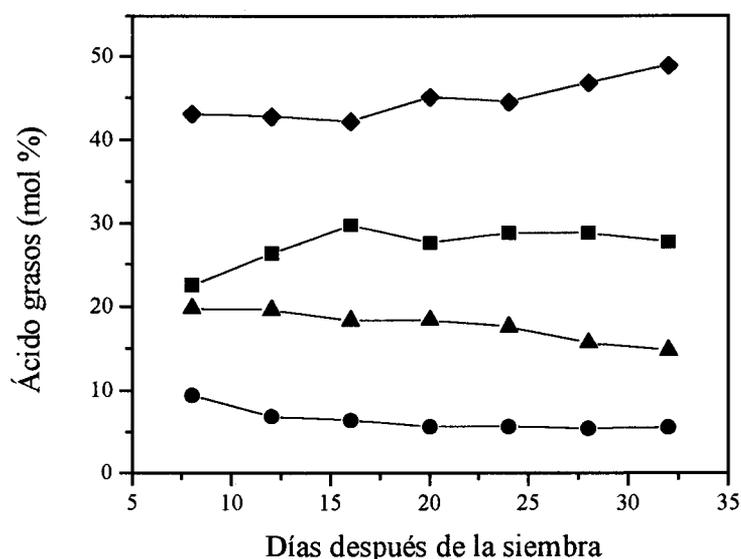


Figura 24. Variación de la composición de los ácidos grasos mayoritarios (16:0, ●; 18:0, ■; 18:1, ▲ y 18:2, ◆) de lípidos totales de semilla de girasol en formación de la línea mutante CAS-3.

Por tanto, el carácter mutante alto esteárico (25-30% de 18:0) de CAS-3 se manifestaba en la semilla desde estadios muy tempranos del desarrollo, al menos desde los 8 DDF. No ha sido posible analizar semillas más jóvenes debido a que no estaban lo suficientemente formadas para recolectarlas y manipularlas.

1.2.2. Variación en el contenido de ácidos grasos insaturados (ácidos oleico y linoleico) durante el desarrollo de la semilla de la línea mutante alto esteárico CAS-3.

En el mutante CAS-3 el perfil de 18:1 y 18:2 era diferente al del control, ya que tanto el 18:1 como 18:2 mantenían unos niveles más constantes que el control durante el desarrollo de la semilla, variando el primero entre 23,6% a los 8 DDF y 14,7% a los 32 DDF y entre 40,1% a los 8 DDF y 47,7% a los 32 DDF el segundo. Por tanto a lo largo de todo el desarrollo de la semilla mutante el contenido de 18:2 era muy superior al de 18:1 y en ningún momento el porcentaje de éste último era superior al de 18:2. La ausencia del aumento del

porcentaje de 18:1 a partir de los 8 DDF observado en el control podría deberse a una modificación de la actividad EDS, responsable de la síntesis de 18:1 a partir de 18:0. Además, el hecho de que la semilla madura de CAS-3 alcanzara un 30% de 18:0 a expensas del 18:1, cuyo porcentaje disminuía mientras mantenía constante el de 18:2 señalaba una vez más a la EDS como una de las enzimas que pudiera estar modificada en el mutante CAS-3. Tampoco en CAS-3 se observaba el aumento de 18:2 que se veía en la línea control a partir de los 20 DDF, sino que mantenía durante todo el desarrollo un nivel de 18:2 similar al de la semilla madura de la línea control, de manera que a los 32 DDF ambas semillas tenían el mismo porcentaje de 18:2 (47-49%). Por tanto, en CAS-3 pudiera existir una “inducción constante” de la ODS, la enzima que sintetiza el 18:2, debido al mayor nivel de saturados en las membranas celulares para mantener la fluidez de las membranas.

2. Análisis de los LP de semilla de girasol en formación.

2.1. Composición de ácidos grasos de LP de semillas de girasol de la línea control RHA-274 durante su formación .

Como ya se ha visto en el apartado anterior, los TAG, los principales componentes de los lípidos de reserva de la semilla, mostraban ya en la semilla de CAS-3 de 8 DDF un alto contenido de 18:0. Por el contrario, los LP son lípidos minoritarios en la semilla que se encuentran formando parte de las membranas celulares, por lo que el interés de analizar su composición de AG era determinar si también los lípidos de membrana de la semilla CAS-3 en formación tenían un alto contenido de 18:0, al igual que los TAG, o si el porcentaje era similar al de la línea control, indicando en este caso que el “exceso” de 18:0 en los lípidos de CAS-3 estaría almacenado en los TAG, evitando de esta forma la “saturación” de las membranas celulares de la semilla CAS-3.

Una vez purificados los LP de las semillas en formación se determinó su composición de AG. En este caso en las figuras 25 y 26 también se muestra el 18:3.

2.1.1. Variación en el contenido de ácidos grasos saturados (ácidos palmítico y esteárico) en LP en la línea control RHA-274.

El contenido de 16:0 en LP era superior al de TAG durante todo el desarrollo de la semilla, con un contenido más alto a los 8 DDF (20,9%) y disminuyendo progresivamente hasta un 10,3% a los 32 DDF (figura 25). Con respecto al 18:0, su porcentaje era siempre algo

inferior al de TAG, manteniéndose siempre por debajo de un 6%. Se observaba, al igual que ocurría en TAG, un ligero aumento en el contenido de 18:0 desde los 8 DDF (4,6%) hasta los 16 DDF (5,9%). A partir de este momento y hasta los 32 DDF (semilla madura) se mantenía alrededor de un 4%. El contenido total de saturados (16:0+18:0) era siempre superior en los LP que en los TAG, variando entre 14-25% los primeros y entre 10-23% los segundos. Este mayor contenido de saturados lo conseguía a pesar de que los LP sólo tienen una posición para esterificar AG saturados (*sn-1*) mientras que los TAG tienen dos (*sn-1* y *sn-3*) debido a la exclusión de los AG saturados de la posición intermedia, como ya se ha mencionado con anterioridad.

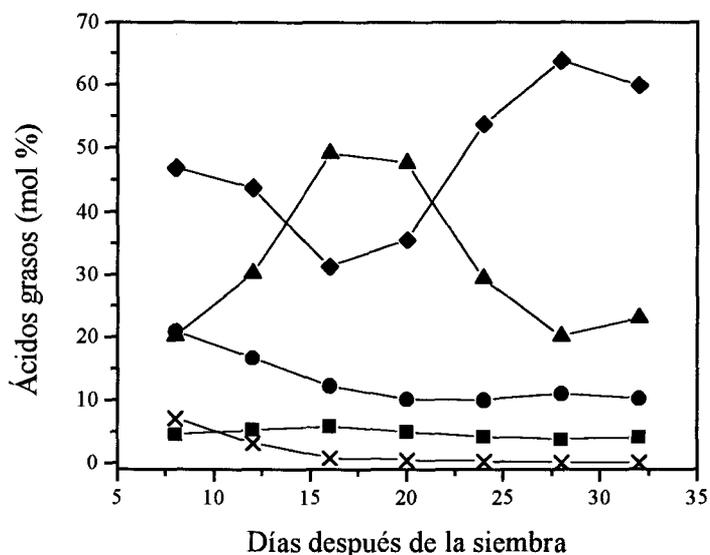


Figura 25. Variación de la composición de los ácidos grasos mayoritarios (16:0, ●; 18:0, ■; 18:1, ▲; 18:2, ◆ y 18:3, ×) de lípidos polares de semilla de girasol en formación de la línea control RHA-274.

2.1.2. Variación en el contenido de ácidos grasos insaturados en LP en la línea control RHA-274.

a) Ácidos oleico y linoleico.

Con respecto a los TAG los LP tenían un contenido inferior de 18:1 pero superior de 18:2, aunque también mostraban el mismo perfil que en TAG, es decir, a los 8 DDF las semillas tenían más 18:2 (46%) que 18:1 (20,1%). Posteriormente, a medida que las semillas

iban madurando aumentaba el contenido de 18:1 y disminuía el de 18:2, si bien los valores alcanzados a los 16 DDF eran algo diferentes que los de TAG, ya que los LP no superaban un 49% de 18:1 frente al 56% de TAG, mientras que el 18:2 no disminuía por debajo de un 31,4% frente al 27% de TAG (figura 25). Ente los 16-20 DDF el porcentaje de AG insaturados permanecía en los mismos niveles, al igual que ocurría en TAG. A partir de este momento los porcentajes volvían a variar, aumentando el 18:2 y disminuyendo el 18:1. A partir de los 24 DDF el 18:2 era el ácido graso mayoritario en LP, al igual que en TAG, sin embargo los niveles alcanzados eran diferentes ya que a los 28 DDF el 18:2 llegaba a un 63,8% (mientras que en TAG no superaba un 52%) y el 18:1 alcanzaba un mínimo de 20,1% (un 35,9% en TAG). Por tanto, aunque ambos ácidos grasos en LP mostraban perfiles similares a los de TAG, sin embargo los valores alcanzados eran más extremos que los conseguidos en TAG.

La tendencia observada en TAG y LP de semillas de la línea control en formación en cuanto a la disminución de los porcentajes de 16:0 y 18:1 y al aumento del 18:2 a lo largo del desarrollo de la semilla coincidía con los resultados obtenidos anteriormente en semillas de girasol (Garcés et al., 1989; Robertson et al., 1978). Dicha modificación de la composición de ácidos grasos durante la maduración de la semilla se había analizado en otras semillas oleaginosas como el cártamo (Hill y Knowles, 1968; Ichiara y Noda, 1980), soja (Cherry et al., 1984; Privett et al., 1973), canola (Rakow y McGregor, 1975) o cacao (Patel et al., 1994).

b) Acido linolénico

El 18:3 es un ácido graso minoritario en la semilla de girasol que únicamente tenía una cierta importancia en LP de semillas jóvenes de 8 DDF (7,2%), ya que a medida que la semilla iba madurando el contenido de 18:3 disminuía llegando a los 35 DDF a cantidades trazas (figura 25). Este mayor contenido de 18:3 en semillas jóvenes también se había observado en semillas inmaduras de cártamo (Ichihara y Noda, 1980) y soja (Cherry et al., 1984).

2.2. Composición de ácidos grasos de LP de semillas de girasol de la línea mutante CAS-3 durante su formación.

El perfil de AG en LP de semillas en formación era similar al observado en TAG aunque con algunas variaciones (figura 26).

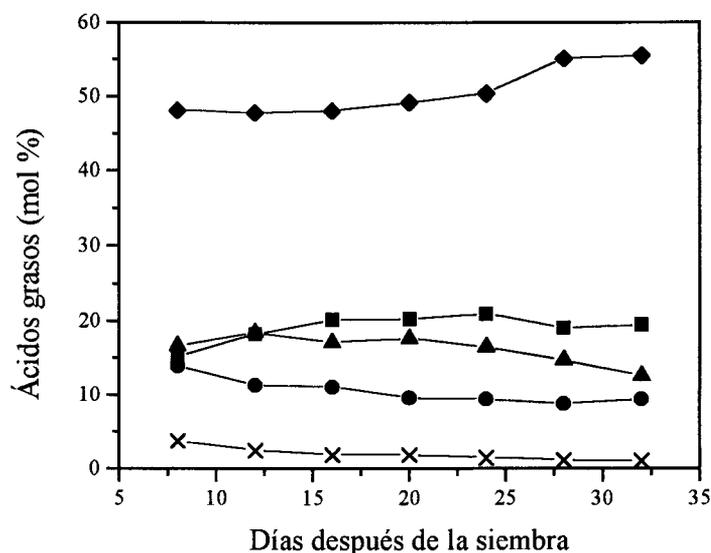


Figura 26. Variación de la composición de los ácidos grasos mayoritarios (16:0, ●; 18:0, ■; 18:1, ▲; 18:2, ◆ y 18:3, ×) de lípidos polares de semilla de girasol en formación de la línea mutante alto esteárico CAS-3.

2.2.1. Variación en el contenido de ácidos grasos saturados (ácidos palmítico y esteárico) en LP en la línea mutante alto esteárico CAS-3.

El porcentaje de 16:0 en LP era superior al de TAG, como ocurría en RHA-274, variando entre un 13,9% a los 8 DDF (8,2% en TAG) y un 9,4% a los 32 DDF (5,6% en TAG), sin embargo era inferior al porcentaje de 16:0 de LP de RHA-274 durante todo el desarrollo de la semilla, siendo las diferencias superiores en semillas jóvenes (figura 26). Por otro lado, el contenido de 18:0 de LP también era inferior al de TAG, al igual que ocurría en RHA-274, con un 15,2% a los 8 DDF (23,9% en TAG), un máximo de 20,9% a los 24 DDF (31,2% en TAG) y un 19,4% en semilla madura de 32 DDF (28,9% en TAG). A pesar de este menor contenido en LP que en TAG el porcentaje de 18:0 estaba muy por encima del existente en LP de RHA-274, variando entre 15-21% el primero y entre 3,5-6% el segundo. El contenido global de saturados (16:0+18:0) en LP era menor que en TAG, a diferencia de lo que ocurría en RHA-274, variando entre 27-31% los LP mientras que los TAG los hacían

entre 32-37%. Cabe suponer que en los LP, dado que sólo esterifican AG saturados en la posición *sn-1*, prácticamente todos los saturados (alrededor de un 30%) van a estar unidos a la posición *sn-1*.

2.2.2. Variación en el contenido de ácidos grasos insaturados en LP en la línea mutante alto esteárico CAS-3.

a) Ácidos oleico y linoleico.

El contenido de 18:1 en LP era similar al encontrado en TAG (aunque un 2-3% inferior), manteniéndose más o menos constante durante el desarrollo de la semilla aunque disminuía ligeramente durante la maduración de la semilla, pasando de un 16,6% a los 8 DDF a un 12,6% a los 32 DDF (figura 26). Durante la formación de la semilla el porcentaje de 18:1 en LP de CAS-3 (12-19%) estaba muy por debajo del encontrado en LP de RHA-274, que oscilaba entre 20-50%. Con respecto al 18:2, su porcentaje en LP de CAS-3 era superior al de TAG, igual que en RHA-274, aumentando ligeramente a medida que la semilla maduraba pasando de un 48,2% a los 8 DDF (40,1% en TAG) a un 55,5% a los 32 DDF (47,7% en TAG). Por tanto, al igual que ocurría en TAG de CAS-3, tampoco se observaba un perfil alternante de estos dos ácidos grasos como existía tanto en TAG como en LP de RHA-274, sino que los porcentajes de 18:1 y 18:2 se mantenían en unos valores similares a lo largo de la maduración de la semilla.

b) Ácido linolénico

Al igual que en RHA-274, el contenido de 18:3 en CAS-3 sólo tenía cierta importancia en semillas jóvenes, con un 3,8% a los 8 DDF, disminuyendo paulatinamente a medida que la semilla iba madurando (1% a los 32 DDF) (figura 26).

De forma general se observaba que, al comparar la composición de AG de LP y TAG para cada línea, los LP estaban enriquecidos en 16:0 y 18:2 con respecto a los TAG de la misma línea. Además se observaba que en cada punto analizado los TAG tenían una composición de ácidos grasos similar a los LT, debido a que desde los 12 DDF aproximadamente los TAG representaban ya un 87% de los lípidos totales de la semilla. Los LP, sin embargo, sólo tenían cierta importancia desde el punto de vista cuantitativo en semillas jóvenes (25% de los lípidos totales), disminuyendo en semillas maduras donde representaban apenas un 3% de los lípidos

totales (Garcés et al. 1989). Además la composición de ácidos grasos de LP mostraba algunas diferencias con respecto a la de TAG que se explicaban por el hecho de que mientras que TAG tienen tres posiciones para esterificar ácidos grasos, los LP sólo tienen dos. Además, el hecho de que los ácidos grasos saturados se excluyan de la posición *sn-2* del glicerol sólo deja un sitio de esterificación de saturados (*sn-1*) en los LP (Stymne y Stobart, 1987).

IV. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE LÍPIDOS DE SEMILLAS DE GIRASOL EN FORMACIÓN.

La composición de AG de los lípidos de semilla viene determinada fundamentalmente por el genotipo de la planta, variando a medida que la semilla madura, sin embargo factores ambientales tales como la temperatura o la luz también afectan a la composición de ácidos grasos de un aceite. Para determinar si el efecto de la temperatura de cultivo sobre la composición de AG del mutante CAS-3 era diferente respecto al control debido a su mayor contenido de 18:0, se pusieron a crecer plantas de ambas líneas a diferentes temperaturas, recogiendo semillas en varios estadios de desarrollo y analizando posteriormente sus lípidos. Una vez extraídos los LT de las semillas desarrolladas a diferente temperatura se purificaron TAG y LP.

1. Efecto de la temperatura sobre la composición de ácidos grasos de TAG.

Cuando se hubieron purificados los TAG de las semillas en formación de CAS-3 y RHA-274 se determinó su composición de AG.

1.1. Efecto de la temperatura sobre los niveles de ácidos grasos insaturados de TAG.

En la línea control RHA-274 las mayores variaciones se observaban en los AG insaturados produciéndose una disminución en el contenido de 18:1 y un aumento en el de 18:2 al descender la temperatura a la que se desarrollaban las semillas (tabla 18). Este efecto de la temperatura se observaba en semillas de todas las edades aunque era en semillas de 20 DDF, con una mayor actividad metabólica, donde se observaban las variaciones en el contenido de insaturados más importantes. La relación 18:2/18:1 nos da idea del grado de insaturación de un lípido y de esta forma se veía que en las semillas crecidas a 30/20°C dicha relación era menor de uno, es decir, siempre había más 18:1 que 18:2, siendo, por tanto, el AG mayoritario. En semillas cultivadas a 20/10°C, sin embargo, la relación 18:2/18:1 pasaba a ser mayor o muy próxima a uno, alcanzando un valor máximo de 1,5 en semillas de 35 DDF. Por tanto a temperatura más baja se producía un aumento en la tasa de desaturación, incrementándose el contenido de 18:2 llegando a superar al de 18:1.

Estos resultados coincidían con los resultados obtenidos previamente en girasol (Harris et al., 1978; Trémolières et al., 1982; Fernández-Martínez et al., 1986; Garcés et al., 1992), así como en otras semillas oleaginosas tales como colza (Trémolières et al., 1978), lino (Green,

1986) o soja (Wolf et al., 1982; Rennie y Tanner, 1989) donde también se había observado dicho incremento en el contenido de 18:2 al descender la temperatura.

Tabla 18. Efecto de la temperatura de cultivo sobre la composición de AG mayoritarios de TAG de semillas en formación de la línea mutante CAS-3 y del control RHA-274. Las temperaturas de cultivo fueron 30/20°C y 20/10°C (día/noche).

DDF Línea	Composición de ácidos grasos (mol%)				
	16:0	18:0	18:1	18:2	Otros ^a
20/10°C					
10 RHA-274	13,9±2,1	9,7±0,3	38,0±1,1	35,4±3,4	2,9
CAS-3	7,4±0,2	28,7±2,2	21,7±0,8	37,2±1,2	4,8
20 RHA-274	8,1±0,5	7,2±1,1	35,2±3,8	48,3±3,6	1,1
CAS-3	5,9±0,5	30,8±1,9	21,1±1,1	38,8±2,4	3,2
35 RHA-274	5,5±0,3	5,7±0,5	34,2±1,5	53,4±1,3	1,1
CAS-3	5,9±0,7	27,0±1,4	14,2±0,4	50,3±2,5	2,5
30/20°C					
10 RHA-274	10,1±0,3	8,9±0,8	57,1±2,8	21,0±3,1	2,8
CAS-3	7,4±0,3	38,2±0,6	33,2±1,7	19,4±1,3	1,7
20 RHA-274	5,1±0,2	4,9±0,1	74,8±0,8	14,0±1,2	1,1
CAS-3	6,1±0,1	27,9±0,1	33,9±2,5	29,2±2,8	2,8
35 RHA-274	4,9±0,1	3,6±0,4	57,7±1,2	32,5±1,7	1,2
CAS-3	6,5±0,1	27,2±0,1	34,1±0,5	30,3±0,3	1,8

^a %18:3 + %20:0 + %22:0

Por el contrario, en cártamo o ricino (Canvin, 1964) no se habían observado modificaciones de los niveles de ácidos grasos por variaciones de la temperatura sino que básicamente permanecían en los mismos niveles.

En la línea mutante alto esteárico CAS-3, al igual que ocurría con la línea control, la disminución de la temperatura provocaba un descenso del contenido de 18:1 y un aumento en el de 18:2 en los TAG, independientemente de la edad de las semillas. También la relación

18:2/18:1 era inferior a la unidad en semillas cultivadas a 30/20°C, mientras que a 20/10°C dicha relación era siempre mayor que uno, alcanzando un valor máximo de 3,5 en semillas de 35 DDF.

Al comparar ambas líneas entre sí se observaba que los niveles de AG insaturados en los TAG de semilla respondían de la misma manera a los cambios de temperatura, disminuyendo el nivel 18:1 y aumentando el de 18:2 al bajar la temperatura, aunque en todos los casos el porcentaje de 18:1 en CAS-3 era inferior a su correspondiente en el control. Aunque las variaciones en los niveles de insaturados ocurrían en el mismo sentido en ambas líneas eran mayores en la línea control que en la mutante. Dado que la relación 18:2/18:1 nos daba una idea de *tasa de desaturación* existente en cada momento, en semillas jóvenes de 10 DDF de ambas líneas cultivadas a 30/20°C la relación 18:2/18:1 era de 0,4 en RHA-274 y 0,6 en CAS-3, por lo que el porcentaje de 18:1 a esa temperatura era superior al de 18:2. Cuando las semillas de 10 DDF se habían cultivado a 20/10°C la relación 18:2/18:1 aumentaba a 0,9 para RHA-274 y 1,7 para CAS-3. Es decir, en la línea control el descenso de temperatura de cultivo provocaba un aumento del porcentaje de 18:2 pero sin llegar a sobrepasar el de 18:1, mientras que en CAS-3 el nivel de 18:2 había aumentado mucho superando el contenido de 18:1. En semillas de 20 DDF, con un metabolismo lipídico muy activo, se observaban diferencias importantes entre ambas temperaturas, ya que en RHA-274 la relación 18:2/18:1 era de 1,4 a 20/10°C y de 0,2 a 30/20°C, es decir, a temperatura alta el contenido de 18:1 era cinco veces mayor que el de 18:2, mientras que a temperatura baja el contenido de 18:2 había aumentado superando al de 18:1. Por el contrario, en el mutante CAS-3 la relación 18:2/18:1 era de 1,8 a 20/10°C y de 0,8 a 30/20°C, es decir, a temperatura alta tenía un contenido de 18:1 superior al de 18:2 aunque no había tanta diferencia como en RHA-274, mientras que a temperatura baja el porcentaje de 18:2 había aumentado hasta situarse por encima del de 18:1, como ocurría también en RHA-274. Este aumento del porcentaje de 18:2 a 20/10°C indicaba un importante incremento de la tasa de desaturación en el control a temperatura baja, posiblemente debido a una inducción de la enzima ODS, responsable de la síntesis de 18:2 (Garcés et al., 1992), aumento que no se observaba en el mutante. También se observaban diferencias en la relación 18:2/18:1 en semillas de 35 DDF cultivadas a diferentes temperaturas aunque menores que en las de 20 DDF. En RHA-274 dicha relación era de 0,6 a 30/20°C y de 1,5 a 20/10°C, por lo que a temperatura alta el contenido de 18:1 era casi el doble que el de 18:2, mientras que a temperatura baja el porcentaje de 18:2 había aumentado

hasta superar el porcentaje de 18:1. En CAS-3 la relación 18:2/18:1 era de 0,9 a 30/20°C y de 3,5 a 20/10°C, es decir, a temperatura alta había un porcentaje similar de 18:1 y de 18:2, sin embargo a temperatura baja el porcentaje de 18:2 aumentaba hasta triplicar al de 18:1.

1.2. Efecto de la temperatura sobre los niveles de ácidos grasos saturados de TAG.

En la línea control RHA-274 la temperatura sólo modificaba ligeramente el porcentaje de AG saturados, aumentando algo los niveles de 16:0 y 18:0 al disminuir la temperatura de cultivo. Este ligero aumento del porcentaje de 16:0 y 18:0 al bajar la temperatura se observaba tanto en semillas jóvenes como en maduras, coincidiendo, al menos en parte, con lo descrito previamente en semilla madura de girasol (Lajara et al., 1990) donde también se había observado un ligero incremento de 18:0 al disminuir la temperatura. Sin embargo, en soja (Rennie y Tanner, 1989) se observó el efecto contrario, es decir, la disminución de la temperatura de cultivo provocaba un ligero descenso del porcentaje de 16:0 y 18:0.

En la línea mutante CAS-3 se observaban ciertas diferencias con respecto a la línea control, ya que el nivel de 16:0 prácticamente no se veía afectado por los cambios de temperatura, manteniendo un contenido similar a 20/10°C y a 30/20°C. Si se compara con el control, a 20/10°C la semilla inmadura tenía menos 16:0 que semillas de la misma edad del control aunque en semilla madura el porcentaje se igualaba. A 30/20°C las semillas de 10 DDF tenían también menos 16:0 que el control, aunque a partir de los 20 DDF la semilla de CAS-3 llegaba a un contenido superior de 16:0 que el control. Con respecto al porcentaje de 18:0, a diferencia de lo que ocurría en el control, sólo en semillas de 20 DDF se observaba un ligero aumento al descender la temperatura (de 28% a 30%) ya que en semillas de 10 DDF la variación era en sentido contrario, disminuyendo de 38% a 28% al bajar la temperatura. Las semillas maduras de 35 DDF no modificaban el contenido de 18:0 por la temperatura sino que se mantenía alrededor de un 27%. Estos resultados coincidían parcialmente con los obtenidos a partir del mutante A6 de soja, con alto contenido en 18:0, ya que este mutante tampoco modificaba el contenido de 16:0 al descender la temperatura. Sin embargo el porcentaje de 18:0 de este mutante de soja aunque se mantenía alto a temperatura alta y media (18% a 40/30°C y 22% a 28/22°C) a temperatura baja (15/12°C) disminuía drásticamente llegando a un 2%. Por tanto el mutante A6 no manifestaba el fenotipo alto esteárico a temperatura baja (Rennie y Tanner, 1989).

Cuando se comparaba el contenido de 18:0 entre semillas de CAS-3 y RHA-274 cultivadas a diferentes temperaturas se observaba que era en semillas cultivadas a 30/20°C donde existían mayores diferencias entre el control y el mutante, oscilando entre 4-8 veces más 18:0 en el mutante, mientras que era entre 3-5 veces en semillas cultivadas a 20/10°C. Comparando el contenido total de saturados (16:0 + 18:0) en ambas líneas se observaba que era superior en el mutante que en el control a ambas temperaturas, observándose unas diferencias mayores a temperatura alta.

En los LT de semilla se observaba un efecto de la temperatura muy parecido al observado en TAG debido a que a partir de los 12 DDF los TAG representaban cerca del 90% de los LT de semilla (Garcés et al., 1989), de ahí que los cambios que se producían en la composición de AG de los LT debido a las variaciones de la temperatura de cultivo fueran un reflejo de los producidos en los TAG.

2. Efecto de la temperatura sobre la composición de ácidos grasos de los lípidos polares de semillas en formación.

Según lo observado en el apartado anterior, la temperatura de cultivo tiene un importante efecto sobre la composición de los TAG de semilla en formación, fundamentalmente sobre los ácidos grasos insaturados. Sin embargo, el efecto de la temperatura se ha estudiado no sólo en TAG, componente mayoritario de los lípidos de semilla, sino también en los LP, constituyentes de las membranas celulares. Una vez que los LP de semillas de ambas líneas cultivadas a diferentes temperaturas se habían purificado se separaron PI, PC y PE mediante TLC y se analizó su composición de AG para determinar si las variaciones de la temperatura tenían algún efecto sobre ella. En la tabla 19 se muestran sólo la composición de AG de PI, PC y PE de semillas de 20 DDF que se encuentran en fase activa de síntesis de lípidos.

Fosfatidilinositol

En la línea control RHA-274 aumentaba el porcentaje de saturados al descender la temperatura, pasando el 16:0 de 19,9% a 26,1% y el 18:0 de 9,2% a 14,3%. Con respecto a los insaturados el porcentaje de 18:2 en semillas cultivadas a 20/10°C era el doble que el de las cultivadas a 30/20°C, con la consiguiente disminución del porcentaje de 18:1 que pasaba de 43,2% a 13,3%.

En la línea mutante CAS-3 el nivel de saturados era superior al de RHA-274, alrededor de un 50%, y variaba poco con la temperatura, aumentando sólo ligeramente el contenido de 18:0 al descender la temperatura. Al igual que en el control, el porcentaje de 18:2 aumentaba a temperatura baja aunque no tanto como en el control. El aumento de 18:2 iba acompañado también de la disminución del porcentaje de 18:1.

Tabla 19. Efecto de la temperatura de cultivo sobre la composición de AG mayoritarios del PI, PC y PE de semillas de 20 DDF de la línea control RHA-274 y del mutante CAS-3.

Lípido	Línea	Composición de ácidos grasos (mol %)				
		16:0	18:0	18:1	18:2	Otros
20/10°C						
PI	RHA-274	26,1±2,6	14,3±2,2	13,3±1,4	46,3±1,7	tr
	CAS-3	14,5±0,5	34,7±2,5	14,9±0,3	34,8±2,3	0,9
PC	RHA-274	13,4±0,1	8,8±2,9	39,5±0,4	37,2±3,3	0,9
	CAS-3	8,5±1,3	28,4±1,2	26,0±0,8	36,3±0,8	0,7
PE	RHA-274	14,2±1,3	3,5±0,6	19,2±1,3	61,9±0,5	1,0
	CAS-3	6,7±2,7	18,8±2,7	20,0±4,0	53,2±2,7	0,3
PI	RHA-274	19,9±0,2	9,2±0,4	43,2±3,5	27,5±3,2	tr
	CAS-3	15,7±2,3	32,8±4,2	22,6±3,0	28,7±4,0	tr
30/20°C						
PC	RHA-274	6,7±1,1	3,9±0,7	71,5±0,1	17,4±1,4	tr
	CAS-3	6,6±1,4	20,3±1,7	40,2±3,0	32,3±3,3	0,5
PE	RHA-274	15,9±1,4	2,3±0,3	52,0±3,7	29,4±2,5	tr
	CAS-3	13,1±1,7	12,2±0,4	24,5±4,7	49,6±3,9	0,5

tr < 0,5%

^a %18:3 + %20:0 + %22:0

Fosfatidilcolina

En la línea RHA-274, al igual que ocurría en el PI, los porcentajes de AG saturados eran superiores a 20/10°C que a 30/20°C, duplicándose el contenido de 16:0 (de 6,7% a 13,4%) y el de 18:0 (de 3,9% a 8,8%). El nivel de 18:2 aumentaba a temperatura baja, al igual

que ocurría con el PI, pasando de 17,4% a 30/20°C a 37,2% a 20/10°C. El 18:1 experimentaba una disminución importante al descender la temperatura, de 71,5% a 39,5%.

El mutante CAS-3, al igual que el control, también aumentaba los porcentajes de 16:0 y 18:0 al bajar la temperatura, fundamentalmente el de 18:0. Con respecto a los insaturados, el contenido de 18:2 era mayor a 20/10°C que a 30/20°C, aunque el aumento no era tan pronunciado como el de la línea control, pasando de 32,3% a 36,3%. El aumento de 18:2 iba acompañado de un descenso importante del contenido de 18:1, de 40,2% a 26,0%.

Fosfatidiletanolamina

La línea control RHA-274 prácticamente mantenía los mismos niveles de saturados a ambas temperaturas, aunque experimentaban pequeños cambios, disminuyendo el 16:0 y aumentando el 18:0. Al igual que en PI y PC el contenido de 18:2 aumentaba a temperatura baja aunque dicho aumento era más pronunciado, pasando de 29,4% a 61,9%, a la vez que se producía una disminución del porcentaje de 18:1, desde 52,0% a 19,2%.

El mutante CAS-3, al igual que el control, disminuía el contenido de 16:0 a temperatura baja aunque era un descenso mayor, a la vez que aumentaba el de 18:0 que pasaba de 12,2% a 18,8%. Respecto a los insaturados, al igual que la línea control, el porcentaje de 18:2 a 20/10°C era superior al que tenía a 30/20°C aunque la diferencia era menor que en el control, pasando de 49,6% a 52,1%. A la vez que aumentaba el porcentaje de 18:2 disminuía, también ligeramente, el de 18:1 desde 24,5% a 22,8%.

Por tanto, en los lípidos de membrana de semillas metabólicamente activas (20 DDF) también se producían modificaciones en la composición de AG debido al efecto de la temperatura de cultivo, similares a las producidas en los TAG, observándose de forma general un aumento del contenido de 18:2 al descender la temperatura acompañado de una disminución del contenido de 18:1. También se observaba un aumento del porcentaje de 18:0 al bajar la temperatura de cultivo.

V. DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE LA SEMILLA.

1. Determinación de la actividad acil-ACP tioesterasa.

Las acil-ACP tioesterasas (TE) son las enzimas que hidrolizan los acil-ACP sintetizados en el plastidio, liberando los ácidos grasos que pasarán posteriormente al citoplasma donde se esterificarán a moléculas de CoA. Los acil-CoA citoplásmicos serán los sustratos para la síntesis tanto de TAG como de lípidos de membrana, por lo que dado que tanto los TAG como los LP de CAS-3 tenían un alto contenido de 18:0 el conjunto de acil-CoA del citoplasma debe estar necesariamente enriquecido en este AG. Por tanto, la naturaleza de los acil-CoA va a estar controlada, en parte, por la especificidad de sustrato de las TE, de manera que cualquier modificación de la actividad TE, ya sea a nivel de especificidad de unión al sustrato o de velocidad de reacción, producirá una variación cuantitativa y/o cualitativa de los sustratos que son hidrolizados y exportados posteriormente al citoplasma. Así pues, con el objetivo de determinar si existía alguna modificación de dicha actividad en las semillas del mutante CAS-3 que pudiera ser la causa del fenotipo alto esteárico se ensayó la actividad TE en las semillas de girasol de la línea control y del mutante CAS-3. Se determinó la actividad TE frente a los diferentes sustratos utilizados, es decir, frente al 16:0-ACP, 18:0-ACP y 18:1-ACP, calculándose los parámetros cinéticos, Km y Vmax a partir de cuatro repeticiones de cada ensayo (tabla 22).

Tabla 22. Actividad relativa de la acil-ACP tioesterasa.

Sustrato	RHA-274		CAS-3	
	Km <i>μM</i>	Vmax <i>pmoles/ mg/ min</i>	Km <i>μM</i>	Vmax <i>pmoles/ mg/ min</i>
16:0-ACP	0,28	3,10	0,95	10,48
18:0-ACP	0,42	3,04	1,29	9,86
18:1-ACP	9,26	69,74	11,26	86,19

1.1. Parámetros cinéticos de la actividad acil-ACP tioesterasa en semillas de RHA-274.

En la línea control RHA-274 la actividad TE total exhibía una Km sobre el 18:1-ACP de un orden de magnitud superior a la que presentaba sobre el 16:0-ACP y 18:0-ACP. Esos resultados contrastaban con los obtenidos en semillas de cártamo (McKeon y Stumpf, 1982)

donde la actividad TE tenía una Km similar para los tres sustratos, indicando que era la unión del ácido graso al ACP lo que determinaba la especificidad de unión del enzima. La diferencia entre las Km observadas en semillas de girasol pudiera ser debida a la existencia de dos TE como ya había sido descrito por un gran número de autores, una con una fuerte preferencia por 18:1-ACP y una segunda con mayor actividad por acil-ACP saturados (Jones et al., 1995). En epidermis de puerro (Liu et al., 1995) se habían encontrado dos TE, una con mayor actividad por 18:1-ACP y una segunda con una gran especificidad por 18:0-ACP. La supuesta acil-ACP tioesterasa de saturados (TES) de semillas de girasol tendría muy poca afinidad por el 18:1-ACP y por tanto una Km alta para este sustrato, lo que haría que la Km total, resultado de la mezcla de las dos actividades, fuera mayor para el 18:1-ACP. La existencia de una TE con una Km muy alta para algún sustrato en concreto se había descrito en semillas de *Cuphea* (Dörmann et al., 1993) donde se habían encontrado dos TE, una con mayor actividad sobre acil-ACP de cadena media (C_{10:0}-C_{18:0}) pero con una Km muy superior (10 veces) sobre el 8:0, y una segunda TE específica de 18:1-ACP con una Vmax mucho mayor sobre 18:1-ACP que sobre los acil-ACP de cadena media.

Con respecto a la Vmax también se observaban diferencias según el sustrato, siendo la Vmax sobre el 18:1-ACP al menos 20 veces superior que la observada sobre 16:0-ACP y 18:0-ACP. Estos resultados son parecidos a los que se habían obtenido en cártamo (Mckeon y Stumpf, 1982) donde la Vmax sobre el 18:1-ACP era 5-10 veces superior a la obtenida frente a 16:0-ACP y 18:0-ACP. En este caso, y suponiendo la existencia de dos TE, la Vmax observada (actividad TE total) sobre el 18:1-ACP sería resultado de la actividad de la TE específica de 18:1-ACP. La Vmax de la actividad tioesterasa específica de saturados sería muy baja y no modificaría a la Vmax de la 18:1-ACP tioesterasa.

1.2. Parámetros cinéticos de la actividad acil-ACP tioesterasa en semillas de CAS-3.

En las semillas de la línea mutante CAS-3 se observaban diferencias similares en cuanto a la especificidad de sustrato de la TE. La Km de la actividad TE total sobre el 18:1-ACP era mayor que la observada frente a 16:0-ACP y 18:0-ACP en un orden de magnitud, al igual que ocurría en RHA-274. Sin embargo las diferencias más importantes con respecto a la línea control se observaban en la Vmax frente al 16:0-ACP y 18:0-ACP, que era tres veces superior en el mutante que en la línea control. Este aumento de la Vmax provocaría un aumento en la velocidad de hidrólisis de 16:0-ACP y 18:0-ACP, por lo que habría una

mayor cantidad de ácidos grasos saturados libres por unidad de tiempo que saldrían del plastidio y pasarían a formar parte de los acil-CoA del citoplasma. Por tanto, la TES de CAS-3 presentaba una mayor actividad sobre ambos acil-ACP saturados que su homóloga de RHA-274, sin embargo, si dicho aumento de actividad se producía tanto sobre el 16:0-ACP como sobre el 18:0-ACP, ¿porqué en el aceite de la semilla de CAS-3, además de un alto contenido de ácido esteárico, no existe un mayor contenido de ácido palmítico?. La respuesta podría ser que debería existir además un segundo factor que, junto con la actividad TE modificada, fueran los responsable de que en la semilla de CAS-3 se acumule ácido esteárico pero no ácido palmítico. Algunos autores habían apuntado hacia la idea de que las TE no son las únicas enzimas implicadas en la determinación de la tasa de producción de un ácido graso, sino que el resto de las enzimas que participan en la ruta de biosíntesis de ácidos grasos, tanto β -cetoacil-ACP sintetasas como las desaturasas, pudieran interceptar de alguna forma la acción de las TE e intervenir igualmente en el control de la terminación de la síntesis de ácidos grasos (Dehes et al., 1996; Voelker et al., 1997). Además, a esta idea habría que añadir que, dado que los estudios genéticos previos realizados en CAS-3 para determinar el número de genes responsables del fenotipo alto esteárico habían demostrado que eran dos los genes que estaban modificados en CAS-3 con respecto a la línea RHA-274 (Fernández-Martínez et al., 1998), debía existir en CAS-3 una segunda enzima modificada de manera que el resultado de ambas daría el fenotipo alto esteárico de CAS-3.

2. Determinación de la actividad estearil-ACP desaturasa.

Para determinar la actividad de la EDS, enzima responsable de la síntesis de 18:1-ACP a partir de 18:0-ACP, era necesario acoplar dicha reacción con la que llevaba a cabo la enzima β -cetoacil-ACP sintetasa II la cual elongaba el 16:0-ACP hasta 18:0-ACP, sustrato de la EDS. Ambas actividades enzimáticas se determinaron en semillas de 15 DDF tomadas de dos capítulos diferentes tanto de CAS-3 como de RHA-274. En cada capítulo los ensayos se repitieron cuatro veces.

2.1. Determinación de la actividad de la β -cetoacil-ACP sintetasa II.

Los resultados obtenidos tras realizar los ensayos de la actividad β -cetoacil-ACP sintetasa II (KAS II) en semillas de 15 DDF de la línea mutante y en el control se muestran en la tabla 23. Como puede observarse las actividades KAS II de las semillas de ambas eran muy

similares, variando los valores medios entre 2,6-3,2 pmoles mg prot⁻¹ min⁻¹. El hecho de que no existieran diferencias en la actividad KAS II entre el mutante y el control implicaba que la cantidad de sustrato de partida ([¹⁴C]18:0-ACP) para el ensayo de la actividad de la EDS iba a ser básicamente la misma en ambas líneas. Teniendo en cuenta estos resultados, la KAS II del mutante CAS-3 no parecía estar modificada en modo alguno, presentando una actividad similar a la KAS II de la línea control.

Por otro lado, si se tiene en cuenta que en las semillas maduras de CAS-3 el mayor contenido de ácido esteárico con respecto al control conllevaba una disminución del contenido total de ácidos grasos insaturados (65% CAS-3 y 87% RHA-274), parecía lógico pensar que la segunda enzima que pudiera estar modificada en CAS-3 fuera la EDS, responsable de la desaturación del [¹⁴C]18:0-ACP a [¹⁴C]18:1-ACP.

Tabla 23. Actividad de la KAS II en semillas de girasol de 15 DDF de la línea control RHA-274 y del mutante alto esteárico CAS-3. La actividad viene expresada como pmoles de [¹⁴C]18:0-ACP mg prot⁻¹ min⁻¹.

Línea	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.4	Media	DE ¹
RHA-274	2,20	3,18	3,31	2,98	2,92	0,43
	2,05	3,23	2,87	2,58	2,68	0,45
CAS-3	3,30	3,52	2,92	2,14	2,97	0,52
	3,16	3,62	3,61	2,32	3,18	0,53

¹DE = desviación estándar

2.2. Determinación de la actividad de la estearil-ACP desaturasa.

Dado que para determinar la actividad de la EDS era necesario acoplar dicha reacción con la que llevaba a cabo la enzima KAS II, y como no se habían encontrado diferencias en la actividad KAS II entre las semillas de CAS-3 y del control RHA-274, las variaciones observadas en la cantidad de [¹⁴C]18:1-ACP sintetizado se deberían exclusivamente a diferencias en la actividad EDS entre ambas líneas. Como puede observarse en la tabla 24 la actividad EDS en semillas de CAS-3 se había reducido con respecto a la que existía en el control RHA-274 en todos los experimentos realizados. Al analizar los valores medios se observaba que la actividad EDS de CAS-3 había disminuido a más de la mitad los pmoles de

[¹⁴C]18:1-ACP sintetizados por miligramo de proteína y por minuto con respecto a la línea RHA-274.

Tabla 24. Actividad EDS en semillas de girasol de 15 DDF en la línea control RHA-274 y en el mutante alto esteárico CAS-3. La actividad viene expresada como pmoles de [¹⁴C]18:1-ACP mg prot⁻¹ min⁻¹.

Línea	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.4	Media	DE ¹
RHA-274	0,87	0,73	0,79	0,78	0,79	0,05
	0,62	0,59	0,71	0,75	0,67	0,06
CAS-3	0,49	0,33	0,38	0,18	0,35	0,11
	0,49	0,34	0,23	0,20	0,31	0,12

¹DE = desviación estándar

Por tanto, en vista de los resultados obtenidos parece ser que en el mutante de girasol CAS-3 la actividad EDS, responsable de la conversión de 18:0-ACP a 18:1-ACP, estaba modificada con respecto a la misma actividad en la línea control, observándose una reducción de dicha actividad. Dicha disminución produciría en CAS-3 una ralentización del flujo de AG a través de la ruta biosintética. Por otro lado, la TES es una enzima que en condiciones normales compete con la EDS por el 18:0-ACP, sin embargo, en una semilla de RHA-274 es la EDS la enzima que está favorecida en la “captura” del 18:0-ACP ya que el flujo de ácidos grasos está desviado fundamentalmente a la síntesis de 18:1-ACP (90%) y su posterior desaturación en un 50-60% a ácido linoleico. Por tanto, parecería lógico pensar que la disminución de la actividad EDS, por sí sola, daría una posibilidad a la TES para unirse con más facilidad al 18:0-ACP y sacar más ácido esteárico del plastidio. En otras semillas oleaginosas se habían obtenido mutantes con alto contenido en ácido esteárico sólo con modificar la EDS, como era el caso de la colza (*Brassica*) donde se habían obtenido mutantes con alto contenido de ácido esteárico al impedir la expresión del gen de la EDS (Knutzon et al., 1992). También en *Arabidopsis* se había obtenido un mutante con alto contenido en ácido esteárico en todos los tejidos de la planta, resultado de una mutación en un solo gen, probablemente la EDS (Lightner et al., 1994). En soja (*Glycine max*) se había obtenido también un mutante con un alto contenido de ácido esteárico en los lípidos de la semilla (30% frente a un 4%) como resultado de un proceso de mutágenesis sobre un único locus (Gref et al., 1985).

Sin embargo, en las semillas de CAS-3 existe además un segundo factor que contribuye a que salga del plastidio una mayor cantidad de ácido esteárico, que es la presencia de una TES con una actividad sobre el 18:0-ACP tres veces superior a la de la enzima de la línea control. Por tanto, la unión de estas dos modificaciones, por un lado menor actividad EDS y por otro la mayor actividad TES, haría que en la semilla de CAS-3 la TES compitiera con más fuerza con la EDS y no estuviera en desventaja como en la semilla control, por lo que conseguiría hidrolizar una mayor cantidad de 18:0-ACP por unidad de tiempo.

Por otro lado, el alto contenido de ácido esteárico en CAS-3 sólo se observaba en la semilla, mientras que el resto de los tejidos de la planta adulta, tallo, hojas y raíz, mostraban un porcentaje de este AG similar al de la planta control aunque ligeramente superior (2-3%). Por tanto, esto haría pensar que una de las enzimas que se había modificado en CAS-3 (probablemente TE ó EDS), debería ser una enzima de expresión específica de semilla, como ocurría en *Brassica*, donde una de las isoformas de EDS descrita tenía una expresión específica de semilla, aunque los autores habían sugerido la existencia de otras isoformas de la enzima que se expresarían en otros tejidos (Slocombe et al., 1992). Dado que los demás tejidos de CAS-3, aunque tenían un porcentaje de ácido esteárico similar al control exhibían un 2-3% más de este AG, pudiera ser que uno de los genes modificados, responsable en menor grado del alto contenido de ácido esteárico, se estuviera expresando también en estos tejidos. Algo similar se había descrito en el mutante alto esteárico de *Arabidopsis*, mencionado anteriormente (Lightner et al., 1994), donde en todos los tejidos de la planta se había encontrado un mayor contenido de ácido esteárico, por lo que los autores habían señalado que la mutación debería haber ocurrido en una isoforma de la EDS de expresión inespecífica.

CONCLUSIONES

El trabajo de esta tesis ha consistido en la caracterización bioquímica de un mutante de girasol (*Helianthus annuus* L.), denominado CAS-3, con un alto contenido de ácido esteárico en su aceite, y su comparación con la línea RHA-274 utilizada como control. Como resumen del trabajo realizado se pueden sacar las siguientes conclusiones:

1. El aceite de la semilla de la línea CAS-3 tiene un contenido de ácido esteárico entre cinco y seis veces superior al de la línea control RHA-274. Dicho aumento conlleva principalmente la disminución del contenido de ácido oleico con respecto al de RHA-274, mientras que los ácidos palmítico y linoleico se mantienen en unos niveles similares a los de la línea control.
2. El mayor contenido de ácido esteárico de las semillas CAS-3 afecta a los principales constituyentes lipídicos del aceite, triacilglicéridos y lípidos polares, aunque en estos últimos el contenido de ácido esteárico es menor que en los primeros debido a que sólo poseen dos sitios de esterificación de ácidos grasos.
3. A pesar del alto contenido de ácido esteárico de la línea CAS-3, éste se esterifica casi exclusivamente en las posiciones externas de los triacilglicéridos mientras que la intermedia está ocupada por ácidos grasos insaturados, al igual que en la línea control RHA-274. Esta exclusión del ácido esteárico de la posición intermedia en la línea CAS-3 confirma la especificidad de sustrato de la acil-CoA:*sn*-1-acilglicerol-3-P aciltransferasa.
4. El menor contenido de ácido esteárico de los lípidos polares de la semilla CAS-3 con respecto a los triacilglicéridos se explica por la exclusión de los ácidos grasos saturados de la posición *sn*-2 del glicerol, dejando solamente la *sn*-1 disponible para su esterificación.
5. La degradación de la reserva lipídica durante la germinación de la semilla es similar en la línea mutante CAS-3 que en el control RHA-274. Las pequeñas variaciones observadas no pueden atribuirse al mayor contenido de ácido esteárico de CAS-3 ya que pudiera deberse a que ambas líneas *no* son isogénicas.

6. Durante el desarrollo del cotiledón de la línea CAS-3 el contenido de ácido esteárico va disminuyendo aunque no llega a los niveles de la línea control, manteniéndose en un 17% frente al 4% de la línea control.
7. El contenido de ácido esteárico de los lípidos del hipocotilo de la línea CAS-3 es casi cuatro veces superior al de RHA-274 en los estadios iniciales de formación del tejido. A medida que el tejido se va desarrollando el porcentaje de ácido esteárico va disminuyendo llegando a valores similares a los de la línea control.
8. El contenido de ácido esteárico de los lípidos de la raíz en los primeros estadios de desarrollo en la línea CAS-3 es superior al de RHA-274, aunque va disminuyendo a medida que el tejido va madurando llegando a valores similares a los de la línea control.
9. En los lípidos de la hoja el contenido de ácido esteárico en la línea mutante CAS-3 es similar al del control tanto en hojas jóvenes como en maduras, siendo su porcentaje en ambas líneas inferior al 3% durante todo el desarrollo de la hoja.
10. Respecto a los lípidos de las flores, lígulas y granos de polen, el contenido de ácido esteárico en la línea CAS-3 se encuentra en los mismos niveles que en el control, existiendo sólo un 2% más este ácido graso en lígulas y polen.
11. Por tanto, parece ser que el fenotipo *alto esteárico* de la línea CAS-3 se manifiesta sólo en la semilla. Los tejidos vegetativos de una planta adulta de la línea CAS-3 tienen un porcentaje de ácido esteárico similar al de una planta de la línea control en el mismo estado de desarrollo, aunque con 2-3% más de este ácido graso.
12. El análisis de la composición de ácidos grasos de los lípidos de la semilla durante la maduración indica que las semillas más jóvenes que se pudieron recolectar, de 8 DDF, tienen ya un contenido de ácido esteárico cerca de cuatro veces superior en CAS-3 que en RHA-274. No ha sido posible determinar si existe un momento en el desarrollo de la semilla de CAS-3 a partir del cual empieza a aumentar el contenido de ácido esteárico o si

ocurre desde el momento de la fecundación ya que no se pudieron recolectar semillas más jóvenes.

13. Las variaciones de la temperatura de cultivo tienen un mayor efecto sobre los niveles de ácidos grasos insaturados que sobre los saturados tanto en la línea CAS-3 como en el control, siendo el efecto más destacado el aumento del contenido de ácido linoleico al descender la temperatura de cultivo.
14. En semillas de 20 DDF, en fase activa de acumulación de lípidos, el efecto de las variaciones de la temperatura sobre el contenido de ácido esteárico de los triacilglicéridos es similar en RHA-274 y CAS-3, produciéndose un ligero aumento en el porcentaje de este ácido graso al descender la temperatura.
15. El efecto de la temperatura sobre la composición de ácidos grasos de los diferentes lípidos polares (fosfatidilinositol, fosfatidilcoilna y fosfatidiletanolamina) de semillas de 20 DDF es similar al observado en los triacilglicéridos.
16. Las semillas de 15 DDF de la línea CAS-3 exhiben una actividad acil-ACP tioesterasa relativa con una V_{max} tres veces superior que la de RHA-274.
17. Las semillas de 15 DDF de la línea CAS-3 exhiben una actividad estearil-ACP desaturasa relativa tres veces inferior a la de las semillas de RHA-274, por lo que se va a producir un bloqueo parcial en ese punto de la ruta.
18. El hecho de que las semillas de CAS-3 de 15 DDF tengan tres veces menos actividad estearil-ACP y una actividad acil-ACP tioesterasa con una V_{max} tres veces mayor que las semillas de RHA-274 *parece* ser la causa de que las primeras tengan un 30% de ácido esteárico en lugar del 5% de la línea control RHA-274.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Alba, A. y Llanos, M. 1990. El cultivo del girasol. Colección agroguías mundi-prensa.

Auld, D. L., Heikkinen, M. K., Erickson, D. A., Sernyk, J. L. y Romero, J. E. 1992. Rapeseed mutants with reduced levels of polyunsaturated fatty acids and increased levels of oleic acid. *Crop Science* 32: 657-662.

Bafor, M., Jonsson, L., Stobart, A. K. y Stymne, S. 1990. Regulation of triacylglycerol biosynthesis in embryos and microsomal preparations from the developing seeds of *Cuphea lanceolata*. *Biochem. J.* 272: 31-38.

Bafor, M., Smith, M. A., Jonsson, L., Stobart, K. y Stymne, S. 1991. Ricinoleic acid biosynthesis and triacylglycerol assembly in microsomal preparations from developing castor-bean (*Ricinus communis*) endosperm. *Biochem. J.* 280: 507-514.

Bergfeld, R., Hong, Y. N., Kühnl, T. y Schopfer, P. 1978. Formation of oleosomes (storage lipid bodies) during embryogenesis and their breakdown during development in cotyledons of *Sinapsis alba* L. *Planta* 143: 297-307.

Bishop, D. G. y Stumpf, P. K. 1971. Fatty acid metabolism. En: *Biochemistry and Methodology of Lipids*. A. R. Johnson & J. B. Davenport (eds). pp. 362-388.

Bolton, P. y Harwood, J. L. 1977. Fatty acid biosynthesis by a particulate preparation from germinating pea. *Biochem. J.* 168: 261-269.

Bolton, P. y Harwood, J. L. 1978. Fatty acid synthesis by slices from developing leaves. *Planta* 138: 223-229.

Bonanome, A. y Grundy, S. M. 1989. Intestinal absorption of stearic acid after consumption of high fat meals in humans. *J. Nutr.* 119: 1556-1560.

Bracco, U. 1994. Effect of triglyceride structure on fat absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* 60(suppl): 1002S-9S.

Browse, J., Mccourt, P. y Somerville, C. 1986. A mutant of *Arabidopsis* deficient in C_{18:3} and C_{16:3} leaf lipids. *Plant Physiol.* 81: 859-864.

Budziszewski, G. J., Croft, K. P. y Hildebrand, D. F. 1996. Uses of biotechnology in modifying plant lipids. *Lipids*, 31(6): 557-569.

Cahoon, E. B., Shanklin, J. y Ohlrogge, J. B. 1992. Expression of a coriander desaturase results in petroselinic acid production in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 11184-11188.

Cahoon, E. B., Lindqvist, Y., Schneider, G. y Shanklin, J. 1997. Redesign of soluble fatty acid desaturases from plants for altered substrate specificity and double bond position. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4872-4877.

Cahoon, E. B., Shah, S., Shanklin, J. y Browse, J. 1998. A determinant of substrate specificity predicted from the acyl-acyl carrier protein desaturase of developing cat's claw seed. *Plant Physiol.* 117: 593-598.

Canvin, D. T. 1965. The effect of temperature on the oil content and fatty acid composition of the oils from several oil seed crops. *Can. J. Bot.* 43: 63-69.

Chasan, R. 1995. Engineering fatty acids- the long and short of it. *The Plant Cell* 7: 235-237.

Cheesbrough, T. M. 1989. Changes in the enzymes for fatty acid synthesis and desaturation during acclimation of developing soybean seeds to altered growth temperature. *Plant Physiol.* 90: 760-764.

Cheesbrough, T. M. 1990. Decreased growth temperature increases soybean stearyl-acyl carrier protein desaturase activity. *Plant Physiol.* 1993: 555-559.

Cheesbrough, T. M. y Cho, S. H. 1990. Purification and characterisation of soybean stearoyl-ACP desaturase. En: Plant Lipid Biochemistry, structure and utilization. P. J. Quinn y J. L. Harwood (eds). Pp. 129-130.

Cherry, J. H., Bishop, L., Leopold, N., Pikaard, C. y Hasegawa, P. 1984. Patterns of fatty acid deposition during development of soybean seed. *Phytochemistry* 23(10): 2183-2186.

Dehesh, K., Edwards, P., Hayes, T., Cranmer, A. M. y Fillatti, J. 1996. Two novel thioesterases are key determinants of the bimodal distribution of acyl chain length of *Cuphea palustris* seed oil. *Plant Physiol.* 110: 203-210.

Denke, M. A. y Grundy, S. M. 1991. Effects of fats high in stearic acid on lipid and lipoprotein concentrations in men. *Am. J. Clin. Nutr.* 54: 1036-1040.

Donaldson, R. P. 1977. Accumulation of free ricinoleic acid in germinating castor bean endosperm. *Plant Physiol.* 59: 1064-1066.

Dörmann, P., Frentzen, M. y Ohlrogge, J. B. 1994. Specificities of the acyl-acyl carrier protein (ACP) thioesterase and glycerol-3-phosphate acyltransferase for octadecenoyl-ACP isomers. *Plant Physiol.* 104: 839-844.

Dörmann, P., Spener, F. y Ohlrogge, J. B. 1993. Characterization of two acyl-acyl carrier protein thioesterases from developing *Cuphea* seeds specific for medium-chain- and oleoyl-acyl carrier protein. *Planta* 189: 425-432.

Dubacq, J. P., Mazliak, P. y Tremolieres, A. 1976. Sub-cellular localization of the oleoyl-CoA desaturase activity in pea leaves. *FEBS Letters* 66(2): 183-186.

Eccleston, V. S., Cranmer, A. M., Voelker, T. A. y Ohlrogge, J. B. 1996. Medium-chain fatty acid biosynthesis and utilization in *Brassica napus* plants expressing lauroyl-acyl carrier protein thioesterase. *Planta* 198: 46-53.



Emken, E. A. 1994. Metabolism of dietary stearic acid relative to other fatty acids in human subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 60(supl): 1023S-8S.

Faostat statistics database. <http://apps.fao.org/>. Food and agricultural organization of the United Nations.

Fehling, E. y Mukherjee, K. D. 1990. Biosynthesis of triacylglycerols containing very long chain mono-unsaturated fatty acids in seeds of *Lunaria annua*. *Phytochemistry* 29(5): 1525-1527.

Fehling, E. y Mukherjee, K. D. 1991. Acyl-CoA elongase from a higher plant (*Lunaria annua*): metabolic intermediates of very-long-chain acyl-CoA products and substrate specificity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1082: 239-246.

Fernández-Marrtínez, J., Jiménez, A., Domínguez, J. y Alcántara, M. 1986. Influencia de la temperatura en el contenido de ácido oleico y linoleico del aceite de tres genotipos de girasol. *Grasas y aceites* 37(6): 326-331.

Fernández-Martínez, J. M., Mancha, M., Osorio, J. y Garcés, R. 1997. Sunflower mutant containing high levels of palmitic acid in high oleic background. *Euphytica* 97: 113-116.

Fernández-Martínez, J. M., Pérez-Vich, B. y Garcés, R. 1998. Inheritance of high stearic acid content in the seed oil of sunflower. 13th International Symposium on Plant Lipids, 5-10 Julio, Sevilla (España).

Fick, G. N. 1983. Genetics and breeding of sunflower. En: Symposium on Sunflower Seeds and Products, 73rd AOCS Annual Meeting. Toronto, Canadá, 2-6 Mayo 1982.

Fox, B. G., Shanklin, J., Somerville, C. y Münck, E. 1993. Stearoyl-acyl carrier protein Δ^9 desaturase from *Ricinus communis* is a diiron-oxo protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 2486-2490.

- Fried, B.** 1991. Handbook of Thin-Layer chromatography. En: Chromatographic Science Series. J. Sherma y B. Fried (eds). Marcel Dekker, New York. 55: 593-600.
- Friedt, W.** 1992. Present state and future prospects of biotechnology in sunflower breeding. Field Crops Research. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam. 30: 425-442.
- Garcés, R. y Mancha, M.** 1991. In vitro oleate desaturase in developing sunflower seeds. Phytochemistry 30(7): 2127-2130.
- Garcés, R. y Mancha, M.** 1993. One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. Anal. Biochem. 211:139-143.
- Garcés, R., García, J. M. y Mancha, M.** 1989. Lipid characterization in seeds of a high oleic acid sunflower mutant. Phytochemistry 28(10): 2597-2600.
- Garcés, R., Sarmiento, C. y Mancha, M.** 1992. Temperature regulation of oleate desaturase in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds.
- García, J. M., Quintero, L. C. y Mancha, M.** 1988. Oil bodies and lipid synthesis in developing soybean seeds. Phytochemistry 27(10): 3083-3087.
- Gardiner, S. E., Heinz, E. y Roughan, P. G.** 1984. Rates and products of long-chain fatty acid synthesis from [1-¹⁴C]acetate in chloroplasts isolated from leaves of 16:3 and 18:3 plants. Plant Physiol. 74: 890-896.
- Gibson, K. J.** 1993. Palmitoleate formation by soybean stearyl-acyl carrier protein desaturase. Biochimica et Biophysica Acta. 1169: 231-235.
- Gómez-Arnau, J.** 1988. El cultivo del girasol. Hoja divulgadora número 20/28 HD. Servicio de extensión agraria de la dirección general de investigación y capacitación agrarias. Ministerio de agricultura, pesca y alimentación.

- Graef, G. L., Fehr, W. R. y Hammond, E. G.** 1985. Inheritance of three stearic acid mutants of soybean. *Crop Science* 25: 1076-1079.
- Gray, D. A. y Kekwick, R. G. O.** 1996. Intracellular location of oleate desaturase and associated constituents in developing sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *Plant Science* 119: 11-21.
- Grayburn, W. S., Collins, G. B. y Hildebrand, D. F.** 1992. Fatty acid alteration by a $\Delta 9$ desaturase in transgenic tobacco tissue. *Bio/technology* 10: 675-678.
- Green, A. G.** 1986. A mutant genotype of flax (*Linum usitatissimum* L.) containing very low levels of linolenic acid in its seed oil. *Can. J. Plant Sci.* 66: 499-503.
- Green, A. G. y Marshall, D. R.** 1984. Isolation of induced mutants in linseed (*Linum usitatissimum*) having reduced linolenic acid content. *Euphytica* 33: 321-328.
- Griffiths, G., Stobart, A. K. y Stymne, S.** 1985. The acylation of *sn*-glycerol 3-phosphate and the metabolism of phosphatidate in microsomal preparations from the developing cotyledons of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed. *Biochem. J.* 230: 379-388.
- Griffiths, G., Walsh, M. C. y Harwood, J. L.** 1993. Acyl-thioesterase activity in developing seeds of cocoa. *Phytochemistry*, 32: 1403-1405.
- Grundy, S. M.** 1994. Influence of stearic acid on cholesterol metabolism relative to other long-chain fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.* 60(suppl): 986S-90S.
- Guerra, D. J., Ohlrogge, J. B. y Frentzen, M.** 1986. Activity of acyl carrier protein isoforms in reactions of plant fatty acid metabolism. *Plant Physiol.* 82: 448-453.
- Gunstone, F. D., Harwood, J. L. y Padley, F. B.** 1994. *The lipid handbook*. Chapman & Hall (London).

Gurr, M. I. y Harwood, J. L. 1991. *Lipid Biochemistry*. Chapman & Hall (Great Britain).

Hara, A. y Radin, N. S. 1978. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal. Biochem.* 90: 420-426.

Harris, H. C., McWilliam, J. R. y Mason, W. K. 1978. Influence of temperature on oil content and composition of sunflower seed. *Aust. J. Agric. Res.* 29: 1203-1212.

Harwood, J. L. 1975. Lipid synthesis by germinating soya bean. *Phytochemistry* 14: 1985-1990.

Harwood, J. L. 1988. Fatty acid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 101-38.

Harwood, J. L. 1989. Lipid metabolism in plants. En: *Critical Reviews in Plant Sciences*. 8(1): 1-43.

Harwood, J. L. 1996. Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1301: 7-56.

Harwood, J. L. y Stumpf, P. K. 1971. Fat metabolism in higher plants XLIII. Control of fatty acid synthesis in germinating seeds. *Arch. Biochem. Biophys.* 142: 281-291.

Hawkins, D. y Kridl, J. C. 1998. Characterization of acyl-ACP thioesterases of mangosteen (*Garcinia mangostana*) seed and high levels of stearate production in transgenic canola. *The Plant Journal* 13(6): 743-752.

Heemskerk, J. W. M., Schmidt, H, Hammer, U. y Heinz, E. 1991. Biosynthesis and desaturation of prokaryotic galactolipids in leaves and isolated chloroplasts from spinach. *Plant Physiol.* 96: 144-152.

- Hellyer, A. y Slabas, A. R.** 1990. Acyl-[acyl-carrier protein] thioesterase from oil seed rape. Purification and characterisation. En: Plant Lipid Biochemistry, Structure y Utilisation. P. J. Quinn y J. L. Harwood (eds). Portland Press (London) pp: 157-159.
- Hill, A. B. y Knowles, P. F.** 1968. Fatty acid composition of the oil of developing seeds of different varieties of safflower. *Crop Science* 8: 275-277.
- Hills, M. J. y Beevers, H.** 1987. Ca^{2+} stimulated neutral lipase activity in castor bean lipid bodies. *Plant Physiol.* 84: 272-276.
- Hills, M. J. y Murphy, D. J.** 1988. Characterization of lipases from the lipid bodies and microsomal membranes of erucic acid-free oilseed-rape (*Brassica napus*) cotyledons. *Biochem. J.* 249: 687-693.
- Huang, A. H. C.** 1992. Oil bodies and oleosins in seeds. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 177-200.
- Ichihara, K.** 1991. The action of phosphatidate phosphatase on the fatty-acid composition of safflower triacylglycerol and spinach glycerolipids. *Planta* 183: 353-358.
- Ichihara, K., Norikura, S. y Fujii, S.** 1989. Microsomal phosphatidate phosphatase in maturing safflower seeds. *Plant Physiol.* 90: 413-419.
- Ichihara, K., Takahashi, T. y Fujii, S.** 1988. Diacylglycerol acyltransferase in maturing safflower seeds: its influences on the fatty acid composition of triacylglycerol and on the rate of triacylglycerol synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 958: 125-129.
- Ichihara, K. y Noda, M.** 1980. Lipid synthesis in germinating safflower seeds and protoplasts. *Phytochemistry* 20(5): 1023-1030.
- Ichihara, K. y Noda, M.** 1981. Fatty acid composition and lipid synthesis in developing safflower seeds. *Phytochemistry* 19: 49-54.

James W. P. T. 1996. Nutricional disorders affecting the heart. En: Diseases of the heart. Julian, Camm, Fox, Hall, Poole-Wilson (eds). W. B. Saunders Company Ltd (London). pp 1442- 1458.

James, D.W. y Dooner, H. K. 1990. Isolation of EMS-induced mutants in *Arabidopsis* altered in seed fatty acid composition. Theor. Appl. Genet. 80: 241-245.

Jandacek, R. J. 1991. The solubilization of calcium soaps by fatty acids. Lipids 26(3): 250-253.

Jones, A., Davies, H. M. y Voelker, T. A. 1995. Palmitoyl-acyl carrier protein (ACP) thioesterase and the evolutionary origin of plant acyl-ACP thioesterases. The plant cell 7: 359-371.

Kabbaj, A., Vervoort, V., Abbot, A. G., Tersac, M. y Bervillé, A. 1996. Expression d'une stéarate et d'une oléate désaturases chez le tournesol normal et à haute teneur en acide oléique, clonage de fragments génomiques et variabilité chez quelques *Helianthus*. OCL 3(6): 452-458.

Kinsella, J. E., Bruckner, G., Mai, J. y Shimp, J. 1981. Metabolism of trans fatty acids with emphasis on the effects of trans, trans-octadecadienoate on lipid composition, essential fatty acid, and prostaglandins: an overview. Am. J. Clin. Nutr. 34: 2307-2318.

Khan, M. y Williams, J. P 1977. Improved thin-layer chromatographic method for the separation of major phospholipids and glycolipids from plant lipid extracts and phosphatidylglycerol and bis(monoacylglycerol) phosphate from animal lipid extracts. Journal of Chromatography, 140: 179-185.

Knutzon, D. S., Bleibaum, J. L., Nelsen, J., Kridl, J. C. y Thompson, G. A. 1992a. Isolation and characterization of two safflower oleoyl-acyl carrier protein thioesterase cDNA clones. Plant Physiol. 100: 1751-1758.

Knutzon, D. S., Thompson, G. A., Radke, S. E., Johnson, W. B., Knauf, V. C. y Kridl, J. C. 1992b. Modification of Brassica seed oil antisense expression of a stearyl-acyl carrier protein desaturase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 59: 2624-2628.

Köhler, R. H., Horn, R., Lössl, A. y Zetsche, K. 1991. Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the co-transcription of a new open reading frame with the *atpA* gene. *Mol. Gen. Genet.* 227: 369-376.

Koipesol, 1987. El cultivo del girasol. Lunwerg Editores S. A, Barcelona.

Kritchevsky, D. 1996. Food lipids and atherosclerosis. En: *Foods lipids and health.* R. E. McDonald y D. B. Min (eds), New York (USA) pp. 19-34.

Lajara, J. R., Díaz, U. y Díaz-Quidiello, R. 1990. Definite influence of location and climatic conditions on the fatty acid composition of sunflower seed oil. *JAOCS* 67: 618-623.

Lardans, A. y Trémolières, A. 1991. Accumulation of C₂₀ and C₂₂ unsaturated fatty acids in triacylglycerols from developing seeds of *Limnanthes alba*. *Phytochemistry* 30(12): 3955-3961.

Lawson, H. 1995. Nutricional aspects of oils and fats. En: *Food oils and fats.* Chapman & Hall, USA, pp. 203-280.

Lee, M. S. y Guerra, D. J. 1994. Biochemical characterization of temperature-induced changes in lipid metabolism in a high oleic acid mutant of *Brassica rapa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 315(1): 203-211.

Lem, N. W. y Williams, J. 1981. Desaturation of fatty acids associated with monogalactosyldiacylglycerol: the effects of San 6706 and San 9785. *Plant Physiol.* 68: 944-949.

- Lemieux, B., Miquel, M., Somerville, C. y Browse, J.** 1990. Mutants of *Arabidopsis* with alterations in seed lipid fatty acid composition. *Theor. Appl. Genet.* 80: 234-240.
- Lightner, J., Wu, J. y Browse, J.** 1994a. A mutant of *Arabidopsis* with increased levels of stearic acid. *Plant Physiol.* 106: 1443-1451.
- Lightner, J., James, D. J. Jr., Dooner, H. K. y Browse, J.** 1994b. Altered body morphology is caused by increased stearate levels in a mutant of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 6(3): 401-412.
- Lin, Y., Moreau, R. A. y Huang, A. H. C.** 1982. Involvement of glyoxysomal lipase in the hydrolysis of storage triacylglycerols in the cotyledons of soybean seedlings. *Plant Physiol.* 70: 0118-0112.
- Lindqvist, Y., Huang, W., Schneider, G. y Shanklin, J.** 1996. Crystal structure of Δ^9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed its relationship to other di-iron proteins. *The EMBO Journal*, 15(16): 4081-4092.
- Liu, D. y Post-Beittenmiller, D.** 1995. Discovery of an epidermal stearoyl-acyl carrier protein thioesterase. *The Journal of Biological Chemistry.* 270(28): 16962-16969.
- Longmuir, K. J.** 1993. Phospholipid biosynthesis. En: *Phospholipids Handbook*. G. Cevc (ed). Marcel Dekker, Inc, New York (USA) pp. 65-95.
- Luddy, F. E., Barford, R. A., Herb, S. F., Magidman, P. y Riemenschneider, R. W.** 1964. Pancreatic lipase hydrolysis of triglycerides by a semimicro technique. *JAOCS* 41: 693-696.
- Luthra, R., Munshi, S. K. y Sukhija, P. S.** 1991. Relationship of carbohydrate metabolism with lipid biosynthesis in developing sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *J. Plant Physiol.* 137: 312-318.

Maeshima, M. y Beevers, H. 1985. Purification and properties of glyoxysomal lipase from castor bean. *Plant Physiol.* 79: 489-493.

Mancha, M. y Vázquez, A. 1970. Transformaciones de los diglicéridos durante la maduración de la aceituna. III. Distribución de los ácidos grasos en los triglicéridos. *Grasas y Aceites*, 21(3): 127-131.

Mancha, M., Stokes, G. B. y Stumpf, P. K. 1975. Fat metabolism in higher plants. The determination of acyl-acyl carrier protein and acyl coenzyme A in a complex lipid mixture. *Ana. Biochem.* 68: 600-608.

Mattson, F. H., Nolen, G. A. y Webb, M. R. 1979. The absorbability by rats of various triglycerides of stearic and oleic acid and the effect of dietary calcium and magnesium. *J. Nutr.* 109: 1682-1687.

Mazliak, P. 1994. Desaturation processes in fatty acid and acyl lipid biosynthesis. *J. Plant Physiol.* 143: 399-406.

Mccourt, P. y Somerville, C. R. 1987. The use of mutants for the study of plant metabolism. En: *The Biochemistry of Plants*, P. K. Stumpf and E. E. Conn (eds) Academic Press, Inc. Vol. 13 pp.33-63.

Mckeeon, T. A. y Stumpf, P. K. 1981. Stearoyl-acyl carrier protein desaturase from safflower seeds. *Methods in enzymology.* 71: 275-281.

Mckeeon, T. A. y Stumpf, P. K. 1982. Purification and characterization of the stearyl-acyl carrier protein desaturase and the acyl-acyl carrier protein thioesterase from maturing seeds of safflower. *The journal of biological chemistry.* 257(20): 12141-12147.

Monga, P. K., Munshi, S. K. y Sukhija, P. S. 1983. Lipid biosynthesis in the developing sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *Plant Science* 31: 311-321.

- Moreau, R. A., Liu, K. D. F. y Huang, A. H. C.** 1980. Spherosomes of castor bean endosperm. *Plant Physiol.* 65: 1176-1180.
- Mounts, T. L., Albini, S.L. y Rennick, K. A.** 1996. Effect of genetic modification on the content and composition of bioactive constituents in soybean oil. *JAOCS* 73(5): 581-586.
- Murata, N. y Wada, H.** 1995. Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. *Biochem. J.* 308: 1-8.
- Murphy, D. J.** 1993. Structure, function and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants. *Prog. Lipid Res.* 32(3): 247-280.
- Murphy, D. J., Woodrow, I. E. y Mukherjee, K. D.** 1985. Substrate specificities of the enzymes of the oleate desaturase system from photosynthetic tissue. *Biochem. J.* 225: 267-270.
- Muto, S. y Beevers, H.** 1974. Lipase activities in castor bean endosperm during germination. *Plant Physiol.* 54: 23-28.
- Nagai, J. y Bloch, K.** 1968. Enzymatic desaturation of stearyl acyl carrier protein. *The Journal of Biological Chemistry.* 243(17): 4626-4633.
- Naudet, M.** 1996. Main Chemical Constituents of Fats. En: *Oils & Fats Manual*. Vol. 1. A. Karleskind, (ed). Paris (France).
- Norris, M. E.** 1991. Oil substitution in food formulation, *INFORM* 1: 388-392.
- Ohlrogge, J. B.** 1994. Design of new plant products: engineering of fatty acid metabolism. *Plant Physiol.* 104: 821-826.
- Ohlrogge, J. B. y Kuo, T.** 1984. Acyl carrier protein: central cofactor for plant fatty acid metabolism. *What's New in Plant Physiol.* 15: 41-44.

- Oo, K. y Huang, A. H. C.** 1989. Lysophosphatidate acyltransferase activities in the microsomes from palm endosperm, maize scutellum, and rapeseed cotyledon of maturing seeds. *Plant Physiol.* 91: 1288-1295.
- Osorio, J., Fernández-Martínez, J., Mancha, M. y Garcés, R.** 1995. Mutant sunflowers with high concentration of saturated fatty acids in the oil. *Crop Science* 35(3): 739-742.
- Patel, V., Shanklin, J. y Furtek, D. B.** 1994. Changes in fatty-acid composition and steroacyl-acyl carrier protein desaturase expression in developing *Theobroma cacao* L. embryos. *Planta.* 193: 83-88.
- Patterson, H. B. W.** 1983. Hydrogenation of fats and oils. Applied science publishers LTD. Inglaterra.
- Pearson, T. A.** 1994. Stearic acid and cardiovascular disease-answers and questions. *Am. J. Clin. Nutr.* 60(supl): 1071S.
- Pérez-Vich, B.** 1998. Control genético de la síntesis de ácidos grasos saturados en semillas de girasol (*Helianthus annuus* L.). Tesis doctoral, Universidad de Sevilla (España).
- Pollard, M. R. y Stumpf, P. K.** 1980a. Long chain (C₂₀ and C₂₂) fatty acid biosynthesis in developing seeds of *Tropaeolum majus*. *Plant Physiol.* 66: 641-648.
- Pollard, M. R. y Stumpf, P. K.** 1980b. Biosynthesis of C₂₀ and C₂₂ fatty acids by developing seeds of *Limnanthes alba*. *Plant Physiol.* 66: 649-655.
- Pollard, M. R., Anderson, L., Fan, C., Hawkins, D. J. y Davies, H. M.** 1991. A specific acyl-ACP thioesterase implicated in medium-chain fatty acid production in immature cotyledons of *Umbellularia californica*. *Arch. Biochem. Biophys.* 284: 306-312.
- Privett, O. S., Dougherty, K. A., Erdahl, W. L. y Stolyhwo, A.** 1973. Studies on the lipid composition of developing soybeans. *JAOCS* 50: 516-520.

- Rahman, S. M., Takagi, Y., Miyamoto, K. y Kawakita, T.** 1995. High stearic acid soybean mutant induced by X-ray irradiation. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59(5): 922-923.
- Rakow, G y McGregor, D. I.** 1975. Oil, fatty acid and chlorophyll accumulation in developing seeds of two "linolenic acid lines" of low erucic acid rapeseed. *Can. J. Plant Sci.* 55: 197-203.
- Renaud, S. C., Ruf, J. C. y Petithory, D.** 1994. The positional distribution of fatty acids in palm oil and lard influences their biologic effects in rats. *J. Nutr.* 125: 229-237.
- Rennie, B. D. y Tanner, J. W.** 1989. Fatty acid composition of oil from soybean seeds grown at extreme temperatures. *JAOCS* 66(11): 1622-1624.
- Röbbelen, G., Downey, R. K. y Ashri, A.** 1989. Sunflower. En: *Oil crops of the world*. McGraw-Hill, Inc. (E.E.U.U.). pp. 301-318.
- Robertson, J. A., Chapman, G. W. Jr. y Wilson, R. L. Jr.** 1978. Relation of days after flowering to chemical composition and physiological maturity of sunflower seed. *JAOCS* 55: 266-269.
- Rock, C. O. y Cronan, J. E. Jr.** 1981a. Acyl carrier protein from *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology* 71: 341-351.
- Rock, C.O. y Cronan, J. E. Jr.** 1981b. Acyl-acyl carrier protein synthetase from *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology*, 71: 163-169.
- Rock, C., Garwin, J. L. y Cronan, J. E. Jr** 1981. Preparative enzymatic synthesis of acyl-acyl carrier protein. *Methods in enzymology* 72: 397-403.
- Roughan, P. G. y Slack, C. R.** 1982. Cellular organization of glycerolipid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33: 97-132.

- Rücker, B. y Röbbelen, G.** 1995. Development of high oleic acid rapeseed. Proceeding 9th Intern. Rapeseed Congress, Cambridge, UK, 4-7 julio. pp.389-391.
- Salisbury, F. B.** 1991. Système Internationale: The use of SI units in plant physiology. *J. Plant Physiol.* 139: 1-7.
- Sánchez, J. y Mancha, M.** 1981. Synthesis of acyl-CoAs by isolated spinach chloroplasts in relation to added CoA and ATP. *Planta* 153: 519-523.
- Schwarzenbach, A. M.** 1971. Observations on spherosomal membranes. *Cytobiologie* 4(1): 145-147.
- Serghini-Caid, H., Demandre, C., Justin, A. y Mazliak, P.** 1988. Oleoyl-phosphatidylcholine molecular species desaturated in pea leaf microsomes-possible substrates of oleate-desaturase in other green leaves. *Plant Sciences* 54: 93-101.
- Shanklin, J. y Somerville, C.** 1991. Stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase from higher plants is structurally unrelated to the animal fungal homologs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 2510-2514.
- Slack, C. R., Roughan, P. G. y Browse, J.** 1979. Evidence for an oleoyl phosphatidylcholine desaturase in microsomal preparations from cotyledons of safflower (*Carthamus tinctorius*) seed. *Biochem. J.* 179: 649-656.
- Slack, C. R., Roughan, P. G., Browse, J. A. y Gardiner, S. E.** 1985. Some properties of cholinephosphotransferase from developing safflower cotyledons. *Biochimica et Biophysica Acta* 833: 438-448.
- Slack, R. y Roughan, P. G.** 1978. Rapid temperature-induced changes in the fatty acid composition of certain lipids in developing linseed and soya-bean cotyledons. *Biochem. J.* 170: 437-439.

- Slocombe, S. P., Cummins, I., Jarvis, R. P. y Murphy, D. J.** 1992. Nucleotide sequence and temporal regulation of a seed-specific *Brassica napus* cDNA encoding a stearyl-acyl carrier protein (ACP) desaturase. *Plant Mol. Biol.* 20: 151-155.
- Slocombe, S. P., Piffanelli, P., Fairbairn, D., Bowra, S., Hatzopoulos, P., Tsiantis, M. y Murphy, D. J.** 1994. Temporal and tissue-specific regulation of a *Brassica napus* stearyl-acyl carrier protein desaturase gene. *Plant Physiol.* 104: 1167-1176.
- Small, D. M.** 1991. The effects of glyceride structure on absorption and metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 11: 413-34.
- Soldatov, K. I.** 1976. Chemical mutagenesis in sunflower breeding. En: *Proc. 7th Int. Sunflower Conf.*, Krasnodar, URSS, 27 junio-3 julio. pp. 352-357.
- Stefansson, B. R., Hougen, F. W. y Downey, R. K.** 1961. Note on the isolation of rape plants with seed oil free from erucic acid. *Canadian Journal of Plant Science* 41: 218-219.
- Stymne, S. y Appelqvist, L.** 1978. The biosynthesis of linoleate from oleoyl-CoA via oleoyl-phosphatidylcholine in microsomes of developing safflower seeds. *Eur. J. Biochem.* 90: 223-229.
- Stobart, A. K. y Stymne, S.** 1985. The interconversion of diacylglycerol and phosphatidylcholine during triacylglycerol production in microsomal preparations of developing cotyledons of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Biochem. J.* 232: 217-221.
- Stobart, A. K., Mancha, M., Lenman, M., Dahlqvist, A. y Stymne, S.** 1997. Triacylglycerols are synthesised and utilized by transacylation reactions in microsomal preparations of developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds. *Planta* 203: 58-66.
- Stobart, A., Stymne, S. y Glad, G.** 1983. The synthesis of linoleate and phosphatidic acid and its relationship to oil production in the microsomes of developing seeds of safflower (*Carthamus tinctorius* L. var. Gila). *Biochimica et Biophysica Acta* 754: 292-297.

Stymne, S. y Appelqvist, L. 1978. The biosynthesis of linoleate from oleoyl-CoA via oleoyl-phosphatidylcholine in microsomes of developing safflower seeds. *Eur. J. Biochem.* 90: 223-229.

Stymne, S. y Appelqvist, L. 1980. The biosynthesis of linoleate and α -linolenate in homogenates from developing soya bean cotyledons. *Plant Sciences Letters*, 17: 287-294.

Stymne, S. y Stobart, A. K. 1984a. Evidence for the reversibility of the acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase in microsomal preparations from developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cotyledons and rat liver. *Biochem. J.* 223: 305-314.

Stymne, S. y Stobart, A. K. 1984b. The biosynthesis of triacylglycerols in microsomal preparations of developing cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Biochem. J.* 220: 481-488.

Stymne, S. y Stobart, A. K. 1985. The effect of temperature on the activity of 2-oleoyl-sn-phosphatidylcholine desaturase in modified microsomal membranes from the cotyledons of maturing safflower seed. *Physiologie Végétale* 24: 45-51.

Stymne, S. y Stobart, A. K. 1986. Biosynthesis of γ -linolenic acid in cotyledons and microsomal preparations of the developing seeds of common borage (*Borago officinalis*). *Biochem. J.* 240: 385-393.

Stymne, S. y Stobart, A. K. 1987. Triacylglycerol Biosynthesis. En: *The Biochemistry of Plants*, Vol. 9 pp. 175-214.

Thompson, G. A y Li, C. 1997. Altered fatty acid composition of membrane lipids in seeds and seedling tissues of high-stearate canola. En: *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Plant Lipids*. J. P. Williams, M. U. Khan y N. W. Lem (eds), Kluwer, Dordrecht. pp. 313-315

Thompson, G. A., Scherer, D. E., Foxall-Van Aken, S., Kenny, J. W., Young, H. L., Shintani, D. K., Kridl, J. C. y Knauf, V. C. 1991. Primary structures of the precursor and mature forms of stearoyl-acyl carrier protein desaturase from safflower embryos and requirement of ferredoxin for enzyme activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:2578-2582.

Tocher, D. R., Leaver, M. J. y Hodgson, P. A. 1998. Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases. *Prog. Lip. Res.* 37(2,3): 73-117.

Tonnet, M. L. y Green, A. 1987. Characterization of the seed and leaf lipids of high and low linolenic acid flax genotypes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 252(2): 646-654.

Töpfer, R., Martini, N. y Schell, J. 1995. Modification of plant lipid synthesis. *Science* 268: 681-686.

Trémolières, A., Dubacq, J. P. y Drapier, D. 1982. Unsaturated fatty acids in maturing seeds of sunflower and rape: regulation by temperature and light intensity. *Phytochemistry* 21(1): 41-45.

Trémolières, H., Trémolières, A. y Mazliak, P. 1978. Effects of light and temperature on fatty acid desaturation during the maturation of rapeseed. *Phytochemistry* 17: 685-687.

Vigh, L., Dmitry, A., Horváth, I. y Murata, N. 1993. The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the *desA* gene in *Synechocystis* PCC6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9090-9094.

Voelker, T. A., Jones, A., Cranmer, A. M., Davies, H. M. y Knutzon, D. S. 1997. Broad-range and binary-range acyl-acyl-carrier-protein thioesters suggest an alternative mechanism for medium-chain production in seeds. *Plant Physiol.* 114: 669-677.

- Voelker, T. A., Worrell, A. C., Anderson, L., Bleibaum, J., Fan, C., Hawkins, D., Radke, S. y Davies, H. M.** 1992. Fatty acid biosynthesis redirected to medium chains in transgenic oilseed plants. *Science* 257: 72-74.
- Vrânceanu, A. V.** 1977. El girasol. Ediciones mundi-prensa. Madrid.
- Walker, K. A y Harwood, J. L.** 1986. Evidence for separate elongation enzymes for very-long-chain-fatty-acid synthesis in potato (*Solanum tuberosus*). *Biochem. J.* 237: 41-46.
- Wang, X. M., Norman, H. A., John, J. B., Yin, T. y Hildebrand, D. F.** 1989. Comparison of fatty acid composition in tissues of low linolenate mutants of soybean. *Phytochemistry* 28(2): 411-414.
- Webb, M. S. y Green, B. R.** 1991. Biochemical and biophysical properties of thylakoid acyl lipids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1060: 133-158.
- Wiberg, E., Tillberg, E. y Stymne, S.** 1994. Substrates of diacylglycerol acyltransferase in microsomes from developing oil seeds. *Phytochemistry* 36(3): 573-577.
- Wilcox, J. R. y Cavins, J. F.** 1985. Inheritance of low linolenic acid content of the seed oil of a mutant in *Glycine max*. *Theor. Appl. Genet.* 71:74-78.
- Wilson, R. F. y Kwanyuen, P.** 1986. Triacylglycerol synthesis and metabolism in germinating soybean cotyledons. *Biochimica et Biophysica Acta* 877: 231-237.
- Willet, W. C.** 1994a. Diet and health: what should we eat?. *Science* 264: 532-537.
- Willet, W. C. y Ascherio, A.** 1994b. *Trans* fatty acids: are the effects only marginal?. *American Journal of Public Health* 84(5): 722-724.

Wolf, R. B., Cavins, J. F., Kleiman, R. y Black, L. T. 1982. Effect of temperature on soybean seed constituents: oil, protein, moisture, fatty acids, amino acids and sugars. *JAOCS* 59(5): 230-232.

Yadav, N., Wierzbicki, A., Knowlton, S., Pierce, J., Ripp, K., Hitz, W., Aegerter, M. y Browśe, J. 1993. Genetic manipulation to alter fatty acid profiles of oilseed crops. En: *Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants*. N. Murata y C. R. Somerville (eds). The American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp 60-66.

Yoshida, H. 1984. Molecular species and fatty acid distribution of triacylglycerols from germinating soybean cotyledons. *Lipids*, 19(12): 936-941.

Yukawa, Y., Takaiwa, F., Shoji, K., Masuda, K. y Yamada, K. 1996. Structure and expression of two seed-specific cDNA clones encoding stearoyl-acyl carrier protein desaturase from sésamo, *Sesamun indicum* L.. *Plant Cell Physiol.* 37(2): 201-205.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Ciencias Exactas y Físicas

Examinó el Excmo. Sr. Rector de la Universidad Nacional Autónoma de México el día de 10 de Mayo de 1999, el Excmo. Sr. Director de la Facultad de Ciencias Exactas y Físicas

Dr. SARA CANTISAN BOHORQUEZ

por su CARACTERIZACIÓN DE UN MUTANTE DE

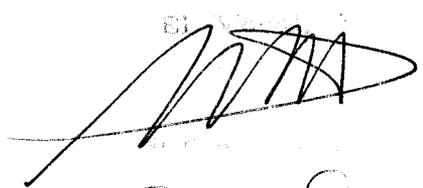
GIRASOL (HELIANTHUS ANNUUS L.) CON ALTO

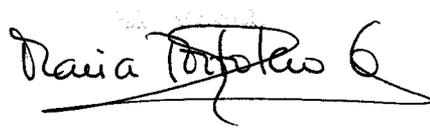
CONTENIDO DE ACIDO ESTEARICO EN SU ACEITE

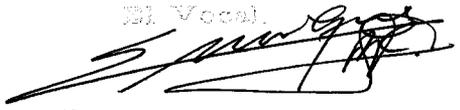
con un promedio de 20.5% de ácido estearico. SOBRESALIENTE CUM LAUDE

(POR UNANIMIDAD)

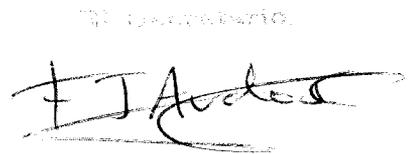
En el día 8 de ABRIL de 1999

El Director de la Facultad


Dr. Sara Bohorquez


El Vocal


El Secretario


El Excmo. Sr. Rector


El Doctorado




FBI ETD / 421

4468484