



Estación Experimental de Aula Dei
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
(CSIC)

Tesis Doctoral

**Caracterización bioquímica, molecular y celular de las
 ω 3 desaturasas plastidiales de plantas y análisis de su
implicación en la síntesis de jasmonatos**

Memoria presentada por Dña. Vanesa Andreu Gargallo, Licenciada
en Bioquímica, para optar al grado de Doctor por la Universidad de
Zaragoza

Zaragoza, 2010.



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



Estación Experimental de Aula Dei

D. MIGUEL ALFONSO LOZANO, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), adscrito a la Estación Experimental de Aula Dei, Zaragoza

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada: "*Caracterización bioquímica, molecular y celular de las ω 3 desaturasas plastidiales de plantas y análisis de su implicación en la síntesis de jasmonatos*", ha sido realizada por Dña. VANESA ANDREU GARGALLO, licenciada en Bioquímica, en el Departamento de Nutrición Vegetal de la Estación Experimental de Aula Dei (CSIC) bajo mi dirección y que reúne, a mi juicio, las condiciones requeridas para optar al grado de Doctor.

Zaragoza, a 15 de Junio de 2010.

Fdo. Dr. Miguel ALFONSO LOZANO
Científico Titular CSIC

“Duda siempre de ti mismo, hasta que los datos no dejen lugar a dudas”

Louis Pasteur

Durante todos estos años he tenido la gran suerte de conocer personas que me han ayudado, no sólo a nivel científico y académico, sino también en lo personal. Por ello, es para mí un enorme placer utilizar estas primeras líneas para expresar mi agradecimiento a todas ellas. Me gustaría que estas palabras no se consideraran un simple formalismo sino un sentimiento de profundo reconocimiento.

Al Dr. Miguel Alfonso Lozano, mi director de Tesis, por su gran calidad científica y humana. Gracias por la confianza depositada en mí, por tu dedicación, por todo el apoyo y ayuda prestados durante estos años, por tu contribución a mi formación científica y por transmitirme la ilusión y el espíritu investigador en el trabajo desarrollado. Ha sido un honor trabajar contigo.

Al Dr. Rafael Picorel Castaño, por haberme permitido trabajar en su laboratorio y disponer de los medios necesarios para la realización de esta tesis doctoral.

A las Dras. M^a Carmen Risueño y Pilar Sánchez Testillano, del Centro de Investigaciones Biológicas, por haberme brindado la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Gracias por vuestra ayuda y plena disposición, por los conocimientos transmitidos y por vuestro cariño y hospitalidad, que hicieron que mi estancia fuera muy gratificante en todos los aspectos. Quería agradecer al resto de miembros del laboratorio, en especial a Eduardo, Maite y María José, su gran amabilidad y el trato recibido.

Al Gobierno de Aragón, por la concesión de la beca predoctoral que me ha permitido realizar este trabajo, y al programa Europa de Caja de Ahorros de la Inmaculada, por la ayuda recibida para realizar una estancia de investigación en el Centro de Investigaciones Biológicas.

A mis compañeros de laboratorio, Ángela, Beatriz, David, María, Marian, Maya, Miren, Patricia, Raquel, Sara S. y Sara L. Gracias por hacer del laboratorio una segunda casa, donde he compartido con todos vosotros momentos inolvidables. Gracias por saber escucharme, por las alegrías compartidas, por ayudarme cuando lo he necesitado, por vuestro compañerismo, por estar siempre dispuestos a dar buenos consejos, por vuestro cariño pero, sobre todo, por vuestra amistad.

A Ruth Sagardoy, porque gracias a ti hoy estoy escribiendo estas líneas. Nunca podré olvidar aquel día, de todo corazón muchas gracias.

A mis compañeras de despacho, Laura y M^a Carmen, por vuestro recibimiento, por brindarme vuestro apoyo y ayuda en uno de los momentos más difíciles de la tesis, por ser unas excelentes compañeras y amigas.

A mis compañeros de Aula Dei, Mariví López, Jorge R., Hamdi, Irene, Saúl, Rubén, Giuseppe, Ana Flor, Ana Álvarez, Ade, Aurora, Carmen L., Concha, M^a Ángeles, Tere, Víctor, Victoria, Azahara, Pilar, Joaquín, Jorge L., Loreto, María C., Carmen P., Manu, Alejandro, Javier, Ana, Marta, Juan, Nuria, Leticia G., Leticia, Celia, Cristina, M^a José, Sergio, Nines, Carmen, María M., Merche y Natalia, por todos los buenos momentos que hemos compartido y por hacerme más agradable el día a día.

A todo el personal de Aula Dei, en especial a Lola y David Camón, por su amabilidad y profesionalidad.

A mis amigos, los de antes, los de ahora y los de siempre, les agradezco la amistad, el cariño y el apoyo brindado a lo largo de todos estos años.

A toda mi familia, desde el primero hasta el último (sabéis que no os puedo nombrar a todos), estoy orgullosa de formar parte de una familia como la nuestra. Gracias por estar siempre a mi lado y confiar en mí.

A mis abuelos, por cuidarme, aconsejarme, protegerme, ayudarme y quererme sin condición.

A mis padres, José Luis y Carmen, por su apoyo, cariño, dedicación, comprensión y generosidad. Gracias por vuestro amor incondicional, por darme todo sin pedir nada a cambio, por la educación recibida y por los valores y principios que me habéis inculcado, por respetar mis decisiones y por animarme siempre a seguir adelante. Gracias porque sin vuestro esfuerzo y sacrificio nada de lo que he logrado hasta ahora hubiese sido posible.

A mi tato, Jesús, por soportarme, por ayudarme cuando lo he necesitado, por su cariño y por hacerme continuamente reír.

A Sergio, por quererme tal como soy, por estar siempre a mi lado, por mimarme y cuidarme, por apoyarme y creer en mí, por hacerme sentir especial y, sobre todo, por hacerme feliz.

Por último, quería dedicar esta tesis a la memoria de los que ya no están a mi lado. A mi abuela María, a mi tío Vicente y a mi prima Isabel.

A todos, MUCHAS GRACIAS.

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ACP	Proteína transportadora de acilos
ADP	Difosfato de adenosina
ANA	Ácido naftalénico
AOC	Óxido de aleno ciclasa
AOS	Óxido de aleno sintasa
APS	Persulfato amónico
ATP	Trifosfato de adenosina
BC	Biotina carboxilasa
BCCP	Proteína portadora de biotina
β -MeOH	β -mercaptoetanol
BSA	Albúmina sérica bovina
cDNA	DNA complementario
CDP	Difosfato de citosina
Chl	Clorofila
CL	Cloroplasto
CoA	Coenzima A
COI	Del inglés, <u>C</u> ORONATINE <u>I</u> NSENSITIVE
Ct	Ciclo umbral
CT	Biotina transcarboxilasa
CTP	Trifosfato de citosina
DAG	Diacilglicerol
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenilindol
DEPC	Diethylpirocarbonato
DGDG	Digalactosildiacilglicerol
DHA	Ácido docosahexaenoico
DIC	Contraste de interferencia diferencial
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa I
dnOPDA	Ácido dinor-12-oxo-fitodienoico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ERF	Factor de respuesta a etileno

ET	Etileno
FAD	Desaturasa de ácido graso
FAS	Ácido graso sintasa
Fd	Ferredoxina
FID	Detector de ionización de llama
G3P	Glicerol-3-fosfato
GPAT	Glicerol-3-fosfato aciltransferasa
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacinaetanosulfónico
HIK	Histidina quinasa
ICE1	Del Inglés, <u>I</u> nducer of <u>C</u> BF <u>E</u> xpression
JA	Ácido jasmónico
JAZ	Del inglés, Jasmonate Zim-Domain
KAS	β -cetoacil-ACP sintasa
LB	Medio Luria Bertani
LHCII	Complejo de antena mayoritaria del fotosistema II
LOX	Lipoxigenasa
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPAAT	Lisofosfatidil aciltransferasa
LTPs	Proteínas de transporte de lípidos
MCE	Del Inglés, <u>M</u> ycobacterial <u>C</u> ell <u>E</u> ntry
MeJA	Metil jasmonato
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
MGDG	Monogalactosildiacilglicerol
mRNA	RNA mensajero
MS	Medio Murashige-Skoog
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NADP ⁺	2'-Fosfodinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado
NADPH	2'-Fosfodinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
OPDA	Ácido 12-oxo-fitodienoico
ORF	Marco abierto de lectura
PA	Ácido fosfatídico
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAP	Fosfatidato fosfatasa
PC	Fosfatidilcolina
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PE	Fosfatidiletanolamina

PG	Fosfatidilglicerol
pl	Punto isoeléctrico
PI	Fosfatidilinositol
PS	Fosfatidilserina
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real
RACE	Del inglés, <u>R</u> ace <u>a</u> mplification of <u>c</u> DNA <u>e</u> nds
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa H	Ribonucleasa H
r.p.m	revoluciones por minuto
SA	Ácido salicílico
SCF	Del inglés, <u>S</u> KP- <u>C</u> ullin- <u>E</u> -box
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SL	Sulfolípido
SQDG	Sulfoquinovosildiacilglicerol
TAG	Triacilglicerol
TEMED	N, N, N', N'-tetrametil-etil-N-diamina
TGDG	Trigalactosildiacilglicerol
Tm	Temperatura de hibridación
Tricina	N-tris(hidroximetil) metil glicina
Tris	(tris)-hidroximetil-amino metano
UTR	Región del mRNA que no se traduce
UV	Ultravioleta

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Estructura y función de los lípidos	1
1.1.1. Lípidos de membrana	2
1.1.1.1. Ácidos Grasos	2
1.1.1.1.1 Composición de ácidos grasos de los aceites vegetales	4
1.1.1.2. Glicerofosfolípidos	5
1.1.1.3. Glucoglicerolípidos	8
1.1.1.3.1 Galactolípidos	8
1.1.1.3.2 Sulfolípidos	9
1.1.1.4. Esfingolípidos	9
1.2. Síntesis de lípidos en plantas	9
1.2.1. Síntesis de ácidos grasos	9
1.2.2. Síntesis de glicerolípidos	13
1.3. Mecanismos de transporte de lípidos	17
1.3.1. Transporte de ácidos grasos desde el cloroplasto	17
1.3.2. Transporte de lípidos desde el retículo endoplasmático hasta las membranas tilacoidales	18
1.4. Desaturasas de ácidos grasos	24
1.4.1. Características de las desaturasas de ácidos grasos de plantas	24
1.4.1.1. Desaturasas solubles	25
1.4.1.2. Desaturasas de membrana	27
1.4.2. Mecanismo de reacción de las desaturasas	31
1.4.3. Regulación de la actividad de las desaturasas	34
1.4.3.1. Desarrollo de la planta	34

1.4.3.2. Temperatura	37
1.4.3.3. Hormonas	47
1.4.3.4. Herida	48
1.5. El ácido graso linolénico como precursor de la síntesis de jasmonatos	49
2. OBJETIVOS	55
3. MATERIALES Y MÉTODOS	57
3.1. Material biológico y condiciones de cultivo	57
3.1.1. Cultivo de plantas de soja en medio hidropónico	57
3.1.2. Cultivo de suspensiones celulares de soja (<i>Glycine max</i>)	58
3.1.2.1. Cultivo en medio líquido	59
3.1.2.2. Cultivo en medio sólido	60
3.1.3. Cultivo de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	61
3.2. Tratamientos experimentales	62
3.2.1. Crecimiento de material vegetal a bajas temperaturas	62
3.2.1.1. Crecimiento de plantas de soja en frío	62
3.2.1.2. Crecimiento de suspensiones celulares de soja en frío	62
3.2.2. Experimentos de respuesta al estrés producido por herida	63
3.2.3. Tratamiento de hojas de soja con la hormona metiljasmonato	63
3.2.4. Tratamiento de plantas de soja con el inhibidor MG-132	63
3.3. Técnicas inmunocitoquímicas y de biología celular	64
3.3.1. Procesamiento de muestras	64
3.3.2. Tinciones generales para análisis estructural y tinciones citoquímicas preferenciales para almidón y DNA	65
3.3.3. Inmunofluorescencia y Microscopía Láser Confocal	65

3.3.3.1. Experimento control por pre-bloqueo del anticuerpo primario: experimento de inmunodepleción	67
3.4. Fraccionamiento subcelular	67
3.4.1. Preparación de extractos crudos celulares a partir de diferentes tejidos de plantas de soja	67
3.4.2. Aislamiento de cloroplastos a partir de hojas de soja	68
3.4.3. Aislamiento de cloroplastos a partir de suspensiones fotosintéticas de soja	69
3.4.4. Aislamiento de cloroplastos intactos a partir de hojas de soja	69
3.4.5. Aislamiento de fracciones subcloroplásticas a partir de cloroplastos intactos de hojas de soja	71
3.5. Técnicas analíticas	72
3.5.1. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	72
3.5.2. Determinación de la concentración de clorofila	73
3.5.3. Electroforesis SDS-PAGE	73
3.5.3.1. Preparación de los geles de poliacrilamida	74
3.5.3.2. Desarrollo de la electroforesis SDS-PAGE	75
3.5.3.3. Detección de proteínas en geles SDS-PAGE	76
3.5.4. Western blot y detección inmunológica de proteínas	77
3.5.5. Análisis de lípidos	78
3.5.5.1. Extracción de lípidos totales de material biológico vegetal	78
3.5.5.1.1 Extracción de lípidos de diferentes tejidos de plantas de soja (raíz, tallo, hoja y semilla)	78
3.5.5.1.2 Análisis de lípidos a partir de suspensiones celulares de soja	79
3.5.5.2. Análisis de la composición de ácidos grasos mediante cromatografía de gases	79

3.6. Técnicas de biología molecular	80
3.6.1. Extracción de RNA	80
3.6.2. Determinación de la concentración y pureza del RNA total	81
3.6.3. Extracción de DNA genómico	81
3.6.4. Técnicas de RT-PCR	83
3.6.4.1. RT-PCR semicuantitativa	83
3.6.4.1.1 Síntesis de cDNA	83
3.6.4.1.2 Amplificación del cDNA por PCR	84
3.6.4.1.3 Análisis de los productos de PCR	86
3.6.4.2. RT-PCR cuantitativa en tiempo real	87
3.6.4.2.1 Cálculo de la eficiencia	88
3.6.4.2.2 Curva de desnaturalización (curva de melting)	89
3.6.4.2.3 Cuantificación	89
3.6.4.3. PCR RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)	90
3.6.5. Clonación de los productos amplificados por RT-PCR	92
3.6.5.1. Extracción de los productos de PCR de gel de agarosa por el método de lana de vidrio	92
3.6.5.2. Ligación de los fragmentos de DNA en el vector pGEM [®] -T Easy	93
3.6.5.3. Transformación del plásmido recombinante en <i>E. Coli</i> JM109	93
3.6.5.4. Extracción de DNA plasmídico	94
3.7. Análisis transcriptómico	95
3.7.1. Material biológico y diseño experimental	95
3.7.2. Preparación de la muestra	95
3.7.3. Procesado experimental del chip	95
3.7.4. Análisis estadístico de los resultados	98

3.7.5. Validación de los resultados	99
4. RESULTADOS	101
4.1. Inmunolocalización de la proteína <i>GmFAD7</i>	101
4.1.1. Localización subcelular de la proteína <i>GmFAD7</i> por inmunofluorescencia	101
4.1.1.1. Análisis de la especificidad de la señal de inmunofluorescencia	105
4.1.2. Fraccionamiento bioquímico	105
4.2. Caracterización de la familia FAD7 de soja	108
4.2.1. Identificación de un nuevo gen <i>GmFAD7</i> en soja	108
4.2.2. Caracterización genómica de los genes <i>GmFAD7</i> de soja	115
4.3. Regulación de la expresión de las ω3 desaturasas de ácidos grasos en plantas de soja	119
4.3.1. Regulación de las ω 3 desaturasas de ácidos grasos en diferentes tejidos de plantas de soja	119
4.3.1.1. Análisis de la expresión de los genes de las ω 3 desaturasas en diferentes tejidos de plantas de soja	119
4.3.1.2. Análisis de la composición de ácidos grasos de los diferentes tejidos de plantas de soja	124
4.3.1.3. Análisis de los niveles de proteína <i>GmFAD7</i>	126
4.3.1.3.1 Análisis de los niveles de proteína <i>GmFAD7</i> en tejidos vegetativos	126
4.3.1.3.2 Análisis de los niveles de proteína <i>GmFAD7</i> en semillas en desarrollo	130
4.3.2. Regulación de la expresión de las desaturasas de ácidos grasos durante el desarrollo de la hoja	134

4.3.2.1. Análisis de la composición de ácidos grasos de los lípidos totales en hojas de soja	135
4.3.2.2. Análisis de la expresión de los genes de las desaturasas en hojas de soja	137
4.3.2.3. Análisis de la proteína <i>GmFAD7</i> durante el desarrollo de la hoja	140
4.4. Regulación de las ω3 desaturasas de ácidos grasos bajo condiciones de estrés	140
4.4.1. Regulación de la expresión de los genes <i>GmFAD7</i> en respuesta a la herida	141
4.4.1.1. Análisis de la expresión de los genes <i>GmFAD7-1</i> y <i>GmFAD7-2</i> en respuesta a la herida	141
4.4.1.2. Análisis de los niveles de proteína <i>GmFAD7</i> en respuesta a la herida	143
4.4.2. Regulación de la expresión de los genes de las ω 3 desaturasas de ácidos grasos durante el proceso de aclimatación al frío	144
4.4.2.1. Composición de ácidos grasos de suspensiones celulares y plantas de soja crecidas a bajas temperaturas	144
4.4.2.2. Efecto de las bajas temperaturas en la expresión de los genes de las ω 3 desaturasas de ácidos grasos	147
4.5. Análisis transcriptómico de los mutantes <i>fad5</i> y <i>fad7/fad8/fad3</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	153
4.5.1. Análisis transcriptómico del triple mutante <i>fad3/fad7/fad8</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	155
4.5.1.1. Agrupamiento jerárquico de los genes con expresión diferencial en el mutante <i>fad3/fad7/fad8</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	159

4.5.2. Análisis transcriptómico del mutante <i>fad5</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	170
4.5.2.1. Agrupamiento jerárquico de los genes con expresión diferencial en el mutante <i>fad5</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	172
4.5.3. Análisis comparativo de los estudios transcriptómicos de los mutantes <i>fad5</i> y <i>fad3/fad7/fad8</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	182
4.5.4. Validación de los resultados de los análisis transcriptómicos de los mutantes <i>fad5</i> y <i>fad3/fad7/fad8</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	190
5. DISCUSIÓN	193
5.1. Identificación de un nuevo gen <i>GmFAD7</i> de soja	193
5.1.1. Análisis funcional de los genes <i>GmFAD7-1</i> y <i>GmFAD7-2</i>	195
5.1.1.1. Análisis espacio-temporal de la expresión de los genes <i>GmFAD7-1</i> y <i>GmFAD7-2</i>	195
5.1.1.2. Distribución de las proteínas <i>GmFAD7</i> en los diferentes tejidos de soja	198
5.1.1.3. Regulación de las ω 3 desaturasas bajo condiciones de estrés	202
5.2. Localización subcelular de la proteína <i>GmFAD7</i>	207
5.3. Análisis transcriptómico de los mutantes <i>fad5</i> y <i>fad7/fad8/fad3</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	212
5.3.1. Participación de COI1 en la ruta de señalización de dn-OPDA	217
5.3.2. Un número reducido de genes comunes están relacionados con el metabolismo lípidico	218
6. CONCLUSIONES	221
7. BIBLIOGRAFÍA	223

8. ANEXO: PUBLICACIONES	253
8.1. Publicaciones derivadas de esta tesis doctoral	253
8.2. Otras publicaciones	253



Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS LÍPIDOS

Los lípidos son constituyentes esenciales de todas las células vegetales. A diferencia de otros componentes principales de las plantas (proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos), los lípidos se definen, en términos generales, en base a sus propiedades físicas. Así, los lípidos biológicos constituyen un grupo químicamente diverso de compuestos cuya característica común y definitoria es su insolubilidad en agua (Ohlrogge y Browse, 1995).

Al igual que en el resto de los seres vivos, los lípidos presentan importantes y variadas funciones en las plantas (Somerville y col., 2000). En primer lugar, los lípidos desempeñan un papel estructural fundamental como componentes básicos de las membranas biológicas. Estas membranas biológicas son responsables de la compartimentalización intracelular y actúan como una barrera selectiva para el transporte de moléculas hacia el interior o el exterior de la célula. Asimismo, son estructuras esenciales para el mantenimiento de la integridad celular y para el correcto funcionamiento de procesos biológicos esenciales tales como la captación de la luz, las reacciones de transporte de electrones o la generación de ATP. Por otro lado, los lípidos forman parte de la cubierta protectora que recubre la pared celular de las células epidérmicas de los diferentes tejidos vegetales. Esta capa superficial, compuesta por ceras, cutina y suberina, actúa como una barrera hidrofóbica crucial que evita la pérdida excesiva de agua y protege a la planta de los potenciales daños causados por agresiones físicas, químicas y biológicas.

Además de esta función estructural, los lípidos representan una fuente energética importante proporcionando gran cantidad de energía libre. Las especies vegetales oleaginosas acumulan lípidos en la semilla o en el fruto, generalmente en forma de triacilgliceroles (TAG), como sustancia de reserva. Estos aceites vegetales son importantes a nivel nutricional pero, cada vez más, como materia prima para la

industria (Harwood, 1996). Por último, algunos lípidos y sus derivados metabólicos presentan actividad biológica desempeñando un papel central en ciertas rutas de transducción de señales. Derivados fosfoinositoles como fosfatidilinositol bifosfato, diacilglicerol, inositol trifosfato y hormonas como el ácido jasmónico, actúan como moléculas de señalización intracelular (Somerville y col., 2000; Lorenzo y Solano, 2005).

1.1.1. Lípidos de membrana

Las membranas biológicas de las células vivas están formadas por una bícapa de lípidos polares, mayoritariamente glicerolípidos, en la cual se encuentran embebidas algunas proteínas hidrofóbicas denominadas proteínas de membrana. En las membranas de células vegetales existen dos grupos de glicerolípidos estructuralmente distintos: los glicerofosfolípidos o fosfolípidos y los glucoglicerolípidos o glucolípidos. Además, las membranas de plantas contienen pequeñas cantidades de esfingolípidos y esteroides.

1.1.1.1. Ácidos Grasos

Desde un punto de vista estructural, los ácidos grasos son ácidos carboxílicos con cadenas hidrocarbonadas de 4 a 36 átomos de carbono que pueden presentar tanto sustituciones con otros grupos funcionales (hidroxi, epoxi) como ramificaciones. Los ácidos grasos pueden ser saturados, monoinsaturados o poliinsaturados dependiendo de la presencia o ausencia de uno o más dobles enlaces carbono-carbono dentro de la molécula. Los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados casi nunca son conjugados sino que están separados por un grupo metileno y, generalmente, su configuración es *cis* en casi todos los ácidos grasos naturales. Los ácidos grasos más abundantes en la naturaleza poseen un número par de átomos de carbono en una cadena sin ramificar de entre 12 y 24 carbonos. Este hecho es consecuencia de la forma de síntesis de estos compuestos mediante

condensación de unidades de acetato. Las propiedades físicas y fisiológicas de los ácidos grasos están determinadas por la longitud de su cadena y su grado de insaturación; así, por ejemplo, los puntos de fusión aumentan con la longitud de la cadena y disminuyen de acuerdo a la insaturación.

En la tabla 1.1., se enumeran los principales ácidos grasos encontrados en plantas. El ácido linoleico (18:2^{Δ9,12}) y el ácido linolénico (18:3^{Δ9,12,15}) son los ácidos grasos mayoritarios en los lípidos de membrana de plantas. Sólo algunas especies vegetales acumulan ácidos grasos inusuales que presentan dobles enlaces entre el grupo carboxilo y la posición Δ⁹, triples enlaces, sustituciones con otros grupos funcionales y ramificaciones, y se almacenan fundamentalmente en los lípidos de reserva (Somerville y col., 2000).

Nombre común	Estructura	Abreviatura
Ácido laúrico	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH	12:0
Ácido palmítico ^b	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CH ₂ CH ₂ COOH	16:0
Ácido esteárico ^b	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ COOH	18:0
Ácido araquidónico	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ COOH	20:0
Ácido behénico	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CH ₂ COOH	22:0
Ácido lignocérico	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CH ₂ COOH	24:0
Ácido oleico ^b	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	18:1 ^{Δ9}
Ácido petroselinico	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CH=CH(CH ₂) ₄ COOH	18:1 ^{Δ6}
Ácido linoleico ^b	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CH-CH ₂ -CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	18:2 ^{Δ9,12}
Ácido α-linolénico ^b	CH ₃ CH ₂ CH=CH-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	18:3 ^{Δ9,12,15}
Ácido γ-linolénico	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CH-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH(CH ₂) ₄ COOH	18:3 ^{Δ6,9,12}
Ácido rugánico	CH ₃ CH ₂ CH=CH-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH(CH ₂) ₅ COOH	16:3 ^{Δ7,10,13}
Ácido erúxico	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₁₁ COOH	22:1 ^{Δ13}

Tabla 1.1. Principales ácidos grasos saturados (sobre fondo amarillo) e insaturados (sobre fondo naranja) presentes en las plantas. ^bÁcidos grasos encontrados frecuentemente en los lípidos de membrana. Adaptada de Somerville y col., 2000.

En las células, los ácidos grasos no suelen encontrarse en forma libre sino formando parte de otros lípidos de estructura más compleja como glicerolípidos y esfingolípidos (figura 1.1).

1.1.1.1.1 Composición de ácidos grasos de los aceites vegetales

Los aceites vegetales constituyen una fuente importante de recursos renovables con innumerables aplicaciones industriales. Se utilizan fundamentalmente en la industria alimentaria aunque su uso como recurso renovable para la producción de biodiesel y como materia prima para la industria química está aumentando de forma rápida y considerable (Dyer y col., 2008; Zheng y col., 2008). Las propiedades funcionales de los aceites vegetales se definen, en gran parte, por las propiedades de los ácidos grasos que los componen, y una cierta composición es deseada para un uso final específico. Además, el grado de insaturación de los ácidos grasos constituyentes de los triglicéridos es un factor que determina el valor nutricional, sensorial y funcional de un determinado aceite vegetal (Kinney y col., 2002). En la tabla 1.2. se muestra la composición de ácidos grasos de los principales aceites vegetales.

	<i>Composición de ácidos grasos (%)</i>								
	8:0	10:0	12:0	14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
<i>Aceite de palma</i>				5	36	2	50	8	
<i>Aceite de soja</i>					11	4	23	54	8
<i>Aceite de canola</i>					4	2	60	21	10
<i>Aceite de girasol</i>					7	5	19	68	
<i>Aceite de lino</i>					6	2	19	24	47
<i>Aceite de coco</i>	7	7	48	18	9	3	6	2	
<i>Aceite de oliva</i>					8-20	<5	55-83	4-21	<1

Tabla 1.2. Composición de ácidos grasos de los principales aceites vegetales. Adaptada de Dyer y col., 2008.

La mayoría de ellos contienen diferentes proporciones de cinco ácidos grasos importantes desde el punto de vista nutricional, que son ácido palmítico (16:0), ácido

esteárico (18:0), ácido oleico (18:1^{Δ9}), ácido linoleico (18:2^{Δ9,12}) y ácido linolénico (18:3^{Δ9,12,15}).

El ácido oleico, el principal ácido graso monoinsaturado, es líquido a temperatura ambiente y estable frente a la oxidación. Actualmente, existe un consenso generalizado acerca de sus beneficios nutricionales y de sus ventajas culinarias. Los ácidos grasos linoleico y linolénico son ácidos grasos esenciales para los mamíferos ya que su organismo no puede sintetizarlos por sí mismo y deben ingerirlos a través de la dieta. El ácido linoleico es el ácido graso más abundante en los principales aceites de semillas, es poco resistente a la oxidación y puede convertirse en otros ácidos grasos poliinsaturados de la serie ω6, especialmente, en ácido araquidónico (20:4^{Δ5,8,11,14}). El ácido α-linolénico es un ácido graso poliinsaturado muy susceptible a la oxidación que se encuentra en baja proporción en la mayoría de los aceites vegetales. Este ácido graso esencial actúa como precursor de otros ácidos grasos poliinsaturados de la serie ω3, entre los que destacan el ácido eicosapentaenoico (20:5^{Δ5,8,11,14,17}; EPA) y el ácido docosahexaenoico (22:6^{Δ4,7,10,13,16,19}; DHA). El ácido linoleico se ha considerado tradicionalmente como un ácido graso esencial con amplios efectos fisiológicos positivos para la salud. Sin embargo, actualmente, en las dietas modernas existe una ingesta excesiva de este ácido graso por el consumo masivo de aceites de semilla. Como consecuencia de ello, se genera una descompensación en el balance de ácidos grasos ω6/ω3, que se ha asociado a un mayor riesgo de hipertensión, enfermedades cardiovasculares y cáncer. Por ello, se recomienda no sólo consumir cantidades suficientes de ambos ácidos grasos esenciales sino mantener un balance equilibrado de los mismos que sea beneficioso para la salud.

1.1.1.2. Glicerofosfolípidos

Los glicerofosfolípidos, llamados también fosfolípidos o fosfoglicéridos, son lípidos anfipáticos en los que dos ácidos grasos están unidos por enlace éster al

Introducción

glicerol en C-1 y C-2 y un grupo de cabeza polar (alcohol o aminoalcohol) está unido a C-3 mediante un enlace fosfodiéster. La naturaleza de este grupo polar permite distinguir los diferentes fosfolípidos celulares: fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol (figura 1.1).

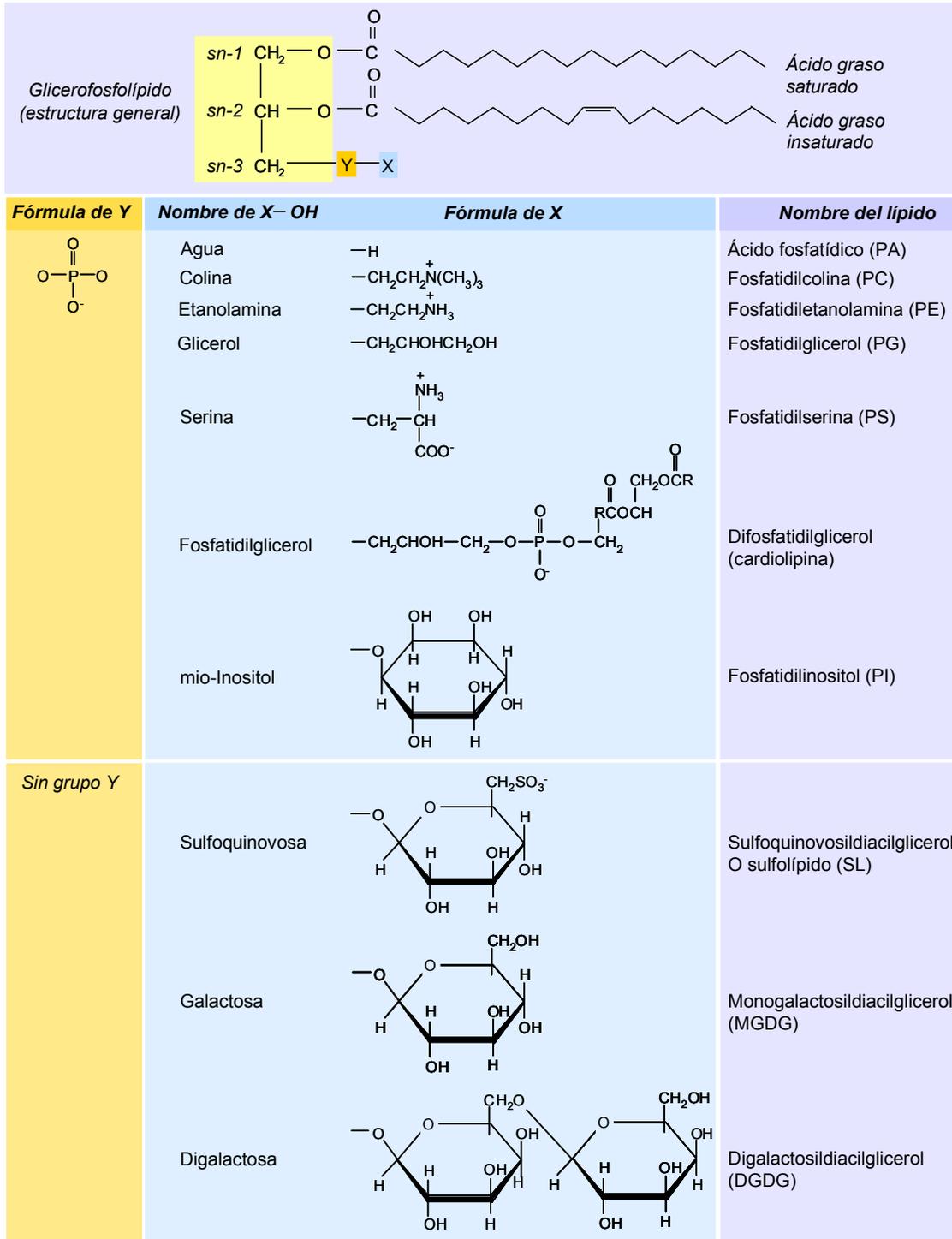


Figura 1.1. Estructura de las principales clases de glicerolípidos de membrana. Adaptada de Somerville y col., 2000.

El *ácido fosfatídico* es un compuesto orgánico constituido por una molécula de glicerol con sus tres grupos hidroxilo esterificados, dos de ellos por sendos ácidos grasos y el tercero por un grupo fosfato. El ácido fosfatídico, a pesar de encontrarse en pequeña proporción en las células vegetales, es un intermediario central importante en la biosíntesis de fosfolípidos y TAG (Dörmann, 2005).

El *fosfatidilglicerol* (PG), cuyo grupo de cabeza polar es una molécula de glicerol, es el único fosfolípido que se encuentra presente tanto en las membranas tilacoidales como en las membranas extraplastidiales. En la mayoría de las especies vegetales, el PG sintetizado en los plastidios contiene ácidos grasos en configuración *trans* que no se encuentran en ningún otro lípido (Dörmann, 2005). El difosfatidilglicerol o cardiolipina, el fosfolípido más complejo, está constituido por dos moléculas de ácido fosfatídico unidas por una molécula de glicerol mediante un enlace fosfodiéster. Su localización está restringida a las membranas internas mitocondriales.

La *fosfatidilcolina* (PC), la *fosfatidiletanolamina* (PE) y la *fosfatidilserina* (PS), contienen en su grupo de cabeza polar un aminoalcohol y pueden convertirse entre sí mediante varias reacciones enzimáticas (Dörmann, 2005). PC y PE son los lípidos más abundantes en plantas y, juntos, representan más del 50% de los glicerolípidos en las membranas extraplastidiales, incluyendo el retículo endoplasmático, la mitocondria, la membrana plasmática, el tonoplasto y el aparato de Golgi. Sin embargo, PE no se encuentra en las membranas plastidiales, mientras que PC, aunque está ausente en las membranas tilacoidales se acumula en la envuelta externa del cloroplasto. PS es un lípido minoritario en plantas representando menos del 1% de los glicerolípidos y, al igual que PE, no se encuentra en las membranas cloroplásticas.

Por último, el *fosfatidilinositol* (PI) es un fosfolípido que se detecta en pequeñas cantidades en casi todas las membranas de las células vegetales. Aunque su presencia en las membranas extraplastidiales (particularmente en el retículo

endoplasmático y en la membrana plasmática) está comúnmente aceptada, la identificación de PI en las membranas tilacoidales todavía no ha sido confirmada (Dörmann, 2005). A pesar de ser un lípido minoritario en plantas, PI ejerce un importante papel en las rutas de transducción de señal ya que actúa como precursor de la síntesis de inositol trifosfato y diacilglicerol, que actúan como segundos mensajeros desencadenando diferentes respuestas celulares (Dörmann, 2005; Drobak, 2005).

1.1.1.3. Glucoglicerolípidos

1.1.1.3.1 Galactolípidos

Los galactolípidos son glicerolípidos que presentan uno o varios residuos de galactosa unidos al diacilglicerol mediante un enlace β -glucosídico (figura 1.1). Los galactolípidos no presentan carga a pH fisiológico y, por lo tanto, son la única clase de lípidos de membrana neutros presentes en los tilacoides. El monogalactosildiacilglicerol (MGDG) y el digalactosildiacilglicerol (DGDG) contienen elevadas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados y son los lípidos predominantes en las membranas fotosintéticas de plantas y cianobacterias (Block y col., 1983). Así, en plantas, el MGDG y el DGDG representan alrededor del 50% y del 20% de los lípidos cloroplásticos respectivamente (Dörmann y Benning, 2002). La envuelta interna del cloroplasto muestra una composición lípidica similar a la de las membranas tilacoidales, siendo el MGDG el galactolípido mayoritario, mientras que la envuelta externa del cloroplasto contiene más DGDG que MGDG.

Oligogalactolípidos que contienen tres o más unidades de galactosa como grupo de cabeza polar también se han detectado en plantas, pero en cantidades minoritarias (Benson y Mauro, 1958; Fujino y Miyazawa, 1979; Kojima y col., 1990).

1.1.1.3.2 Sulfolípidos

Los sulfolípidos (Sulfoquinovosildiacilglicerol, SQDG) presentes en plantas contienen una molécula de sulfoquinovopiranosil esterificada en la tercera posición de la molécula de glicerol. Los sulfolípidos de plantas son ricos en ácidos grasos saturados, fundamentalmente en ácido palmítico, y representan, aproximadamente, el 5% de los glicerolípidos de las membranas cloroplásticas. En los cloroplastos, los sulfolípidos se han encontrado tanto en las membranas tilacoidales como en las membranas interna y externa de la envuelta cloroplástica (Dörmann, 2005).

1.1.1.4. **Esfingolípidos**

Los esfingolípidos son lípidos de membrana constituidos por un aminoalcohol de cadena larga, esfingosina o uno de sus derivados, unido a un ácido graso de cadena larga mediante un enlace amida. Los esfingolípidos representan menos del 5 % de los lípidos vegetales y se acumulan en la membrana plasmática, donde constituyen hasta un 26 % de los lípidos (Somerville y col., 2000). La ruta de biosíntesis y la función que estos lípidos desempeñan en las plantas son poco conocidas y, en algunos estudios, *S.cerevisiae* ha servido como organismo modelo para el estudio del metabolismo de los esfingolípidos. Estudios recientes indican que los esfingolípidos podrían desempeñar un papel importante en la señalización celular, en la estabilidad de la membrana, en las respuestas de estrés, en la interacción huésped-patógeno y en la apoptosis (Sperling y Heinz, 2003).

1.2. **SÍNTESIS DE LÍPIDOS EN PLANTAS**

1.2.1. **Síntesis de ácidos grasos**

En plantas, la síntesis de novo de ácidos grasos tiene lugar fundamentalmente en los plastidios gracias a la acción de la enzima acetil-CoA carboxilasa y de un complejo multienzimático denominado ácido graso sintasa. La biosíntesis de ácidos grasos requiere un donador de átomos de carbono, el acetil-CoA, y el aporte de

energía química en dos formas: el potencial de transferencia del grupo ATP y el poder reductor del NADPH. Los átomos de carbono que forman parte de los ácidos grasos sintetizados provienen del reservorio de acetil-CoA presente en los plastidios. La concentración de acetil-CoA en los cloroplastos es 30-50 μM , concentración suficiente para suplir las necesidades de la síntesis de ácidos grasos en pocos segundos (Ohlrogge y Browse, 1995). Sin embargo, la fuente real de acetil-CoA en los plastidios y su relación con los productos inmediatos de la fijación de carbono ha sido una cuestión a debate durante un largo tiempo (Ohlrogge y Browse, 1995; Harwood, 1996; Bao y col., 2000). Existen evidencias considerables de que dos enzimas diferentes podrían estar implicadas en la síntesis de acetil-CoA en los plastidios: la acetil-CoA sintetasa y la piruvato deshidrogenasa plastidial (PDH). La ruta más directa de síntesis implicaría la producción de acetil-CoA por el complejo piruvato deshidrogenasa plastidial, que actuaría sobre el piruvato bien generado en la ruta glucolítica o quizás producido como reacción secundaria de la actividad de la ribulosa bisfosfato carboxilasa, en una reacción que también genera NADH (Ohlrogge y Browse, 1995; Bao y col., 2000; Rawsthorne, 2002; Schwender y Ohlrogge, 2002). Sin embargo, esta ruta ha sido cuestionada por algunos autores debido a que algunos cloroplastos con actividad piruvato deshidrogenasa pueden mantener *in vivo* los niveles de síntesis de ácidos grasos cuando se suministra acetato libre exógeno pero no cuando se proporciona piruvato exógeno (Somerville y col., 2000). Por ello, se ha sugerido otra ruta alternativa en la que el acetil-CoA necesario para la síntesis de ácidos grasos se forma vía descarboxilación oxidativa del piruvato en la mitocondria. Entonces, este acetil-CoA es hidrolizado por la enzima acetil-CoA hidrolasa en la matriz mitocondrial y el acetato libre generado es transportado al plastidio donde, finalmente, es activado por la acetil-CoA sintetasa en el estroma (Bao y col., 2000; Ke y col., 2000). Otras dos enzimas, la ATP-citrato liasa y la acetilcarnitina transferasa, se han implicado también en la formación de acetil-CoA, pero su contribución no está aceptada universalmente (Ke y col., 2000).

El NADH indispensable para la síntesis de ácidos grasos se obtiene mediante la fotosíntesis en los cloroplastos o mediante la ruta de las pentosas fosfato en los tejidos no fotosintéticos y en condiciones de oscuridad (Somerville y col., 2000).

Las reacciones implicadas en la biosíntesis de ácidos grasos se muestran en la figura 1.2 (Harwood, 2005). Inicialmente, el enzima acetil-CoA carboxilasa cataliza la formación irreversible de malonil-CoA en una reacción dependiente de ATP. Este proceso de carboxilación del acetil-CoA tiene lugar en dos etapas: en primer lugar, un grupo carboxilo se transfiere a la biotina (grupo prostético de la acetil-CoA carboxilasa) y, a continuación, el grupo biotinilo formado actúa como transportador temporal de CO₂ activado, transfiriéndolo al acetil-CoA para dar lugar a malonil-CoA.

La enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC) está formada por cuatro subunidades funcionales diferentes: proteína portadora de biotina (BCCP), biotina carboxilasa (BC) y las subunidades α y β de la biotina transcarboxilasa (CT). La mayoría de las plantas poseen dos isoformas distintas de la enzima acetil-CoA carboxilasa: una forma heteromérica, compuesta por cuatro subunidades polipeptídicas separadas, localizada en los cloroplastos y una forma homomérica, compuesta por un único polipéptido multifuncional que contiene las cuatro subunidades funcionales, localizada en el citosol. En los plastidios, el malonil-CoA es utilizado principalmente para la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos, mientras que, en el citosol, se utiliza en diferentes rutas tales como la síntesis de flavonoides y antocianinas, la elongación de ácidos grasos para la producción de lípidos cuticulares o la manonilación de D-aminoácidos (Somerville y col., 2000; Sasaki y Nagano, 2004). La actividad de la enzima acetil-CoA carboxilasa plastidial está estrechamente regulada y, su regulación determina, en gran parte, la velocidad total de síntesis de ácidos grasos (Somerville y col., 2000). Así, la luz modula indirectamente la actividad catalítica de esta enzima vía cambios en el pH y en la concentración de iones magnesio del estroma y, directamente modula un sitio regulador de la enzima a través de una ruta de

transducción de señal mediada por el estado redox del cloroplasto (Sasaki y Nagano, 2004).

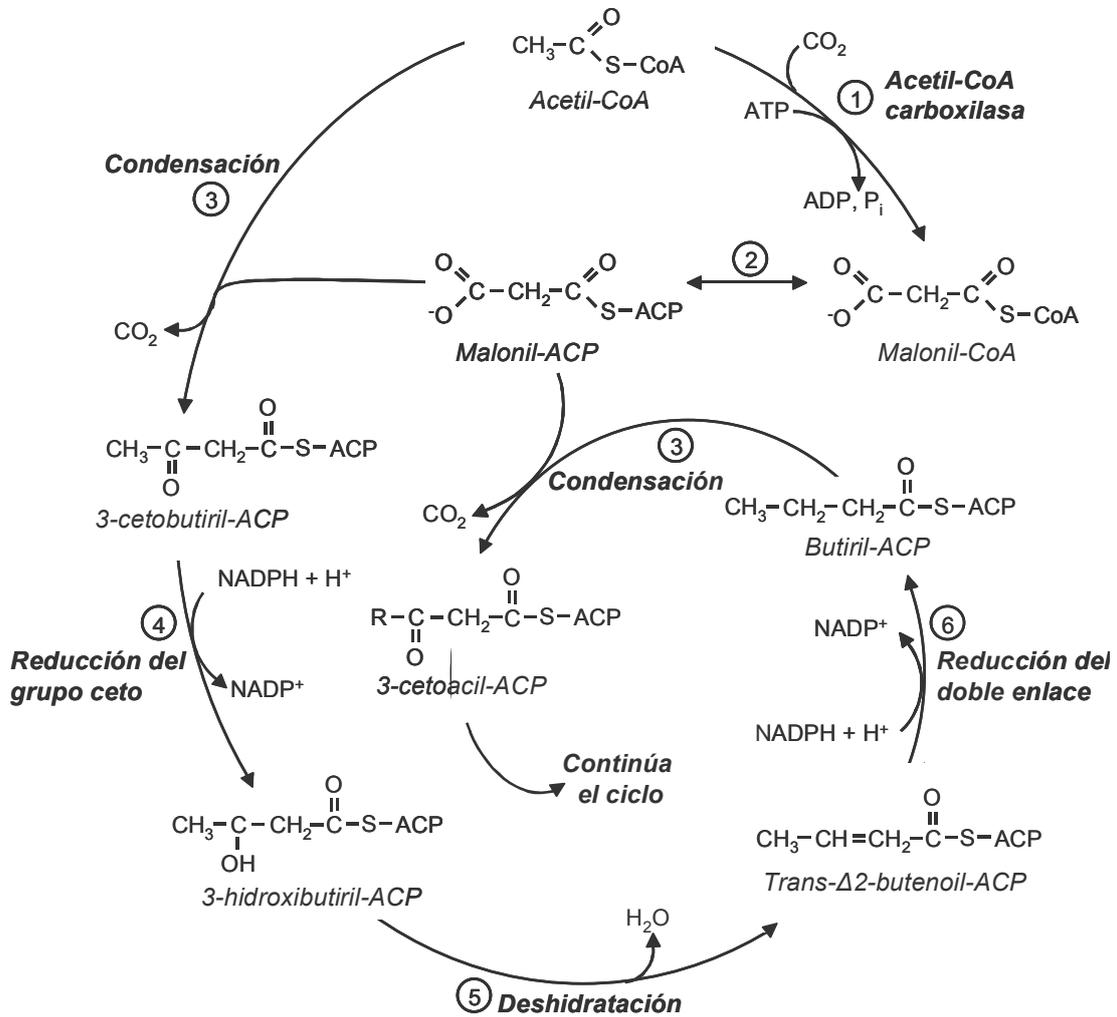


Figura 1.2. Ruta de síntesis de ácidos grasos en plantas. Adaptada de Ohlrogge y Browse, 1995.

La secuencia fundamental de reacciones mediante la que se construyen largas cadenas de ácidos grasos consta de cuatro etapas fundamentales: condensación, reducción del grupo carbonilo, deshidratación y reducción del doble enlace. Todas las reacciones del proceso sintético están catalizadas por un complejo multienzimático, denominado ácido graso sintasa (FAS), localizado en el estroma de los cloroplastos. En plantas, la enzima FAS es un complejo multienzimático tipo II, en el que las enzimas individuales son componentes solubles dissociables que pueden separarse

separarse fácilmente (Ohlrogge y Browse, 1995; Somerville y col., 2000). Antes de empezar las reacciones de condensación es necesario que tenga lugar la transferencia del grupo malonilo desde el malonil-CoA al grupo –SH de una pequeña proteína denominada “acil-carrier protein” (ACP) en una reacción catalizada por la enzima malonil:ACP transacilasa. El primer paso en la formación de la cadena de un ácido graso es la condensación del acetil-CoA y el malonil-ACP para formar un producto de cuatro átomos de carbono, reacción catalizada por la enzima 3-cetoacil-ACP sintasa III (KAS III). En plantas, existen otras dos 3-cetoacil-ACP sintasas, KAS I y KAS II, que se distinguen entre sí por la especificidad de sustrato. Así, KAS I es la responsable de la formación de ácidos grasos de 6 a 16 átomos de carbono y KAS II cataliza la condensación final sintetizando ácido esteárico. La molécula de 3-cetoacil-ACP formada se reduce seguidamente en el grupo carbonilo en posición 3 formando 3-hidroxiacil-ACP. Esta reacción catalizada por la enzima cetoacil-ACP reductasa utiliza NADPH como donador electrónico. La siguiente reacción es la deshidratación del 3-hidroxiacil-ACP para formar trans- Δ^2 -butenoil-ACP. Cada ciclo de la síntesis de ácidos grasos se completa por la acción de la enzima enoil-ACP reductasa, que utiliza NADH o NADPH para reducir el doble enlace y formar un ácido graso saturado. En cada paso a través del ciclo la cadena de ácido graso se alarga en dos átomos de carbono. Cuando la cadena alcanza la longitud de 16 o 18 átomos de carbono, el producto abandona el ciclo cuando alguna reacción para el proceso. Las reacciones más comunes son la hidrólisis del ácido graso del ACP por una tioesterasa, la transferencia del ácido graso a un glicerolípido por una aciltransferasa o la formación de un doble enlace mediante una acil-ACP desaturasa.

1.2.2. Síntesis de glicerolípidos

Tras su síntesis, los ácidos grasos pueden incorporarse a una de las dos rutas existentes en plantas para la producción de glicerolípidos: la ruta procariota y la ruta eucariota (figura 1.3). La *ruta procariota*, denominada así por su similitud con la ruta

de síntesis de ácidos grasos en bacterias, tiene lugar íntegramente en el plastidio. Sin embargo, la *ruta eucariota* incluye una secuencia de reacciones implicadas en la síntesis de lípidos en el retículo endoplasmático, transporte de algunos lípidos entre este orgánulo y el cloroplasto y, finalmente, modificación de los lípidos.

En la ruta procariota, los productos 16:0-, 18:0-, y 18:1-ACP procedentes de la ruta de síntesis de ácidos grasos se esterifican a las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 del glicerol-3-fosfato por la acción subsiguiente de dos aciltransferasas, la glicerol-3 fosfato aciltransferasa (GPAT) y la lisofosfatidilaciltransferasa (LPAAT), para formar finalmente ácido fosfatídico (PA). GPAT es una enzima soluble estrechamente asociada a la envuelta cloroplástica que proporciona el sustrato necesario a la enzima LPAAT, localizada en la envuelta cloroplástica (Joyard y col., 2010). Como consecuencia de la especificidad que las aciltransferasas cloroplásticas presentan por su sustrato, el ácido fosfatídico sintetizado por esta ruta tiene ácido palmítico (16:0) en la posición *sn*-2 y, en la mayoría de los casos, ácido oleico (18:1^{Δ9}) en posición *sn*-1. A continuación, el ácido fosfatídico generado es utilizado para la síntesis de PG, a través de la ruta CDP-diacilglicerol, o convertido a diacilglicerol por acción de una fosfatidato fosfatasa (PAP), localizada en la membrana interna de la envuelta del cloroplasto. El pool de diacilglicerol puede actuar, entonces, como precursor de otros lípidos cloroplásticos: galactolípidos tales como MGDG y DGDG, que son lípidos mayoritarios en las membranas cloroplásticas, y sulfolípidos (SL).

En la ruta eucariota, el ácido fosfatídico es sintetizado en el retículo endoplasmático a partir de los productos acil graso transportados desde el cloroplasto en forma de ésteres de CoA. Para ello, una tioesterasa hidroliza los productos 16:0-, 18:0-, y 18:1-ACP a ácidos grasos que ya en forma libre se desplazan a través de la envuelta cloroplástica para ser convertidos en tioésteres de CoA en la membrana externa de la envuelta por una acil-CoA sintetasa.

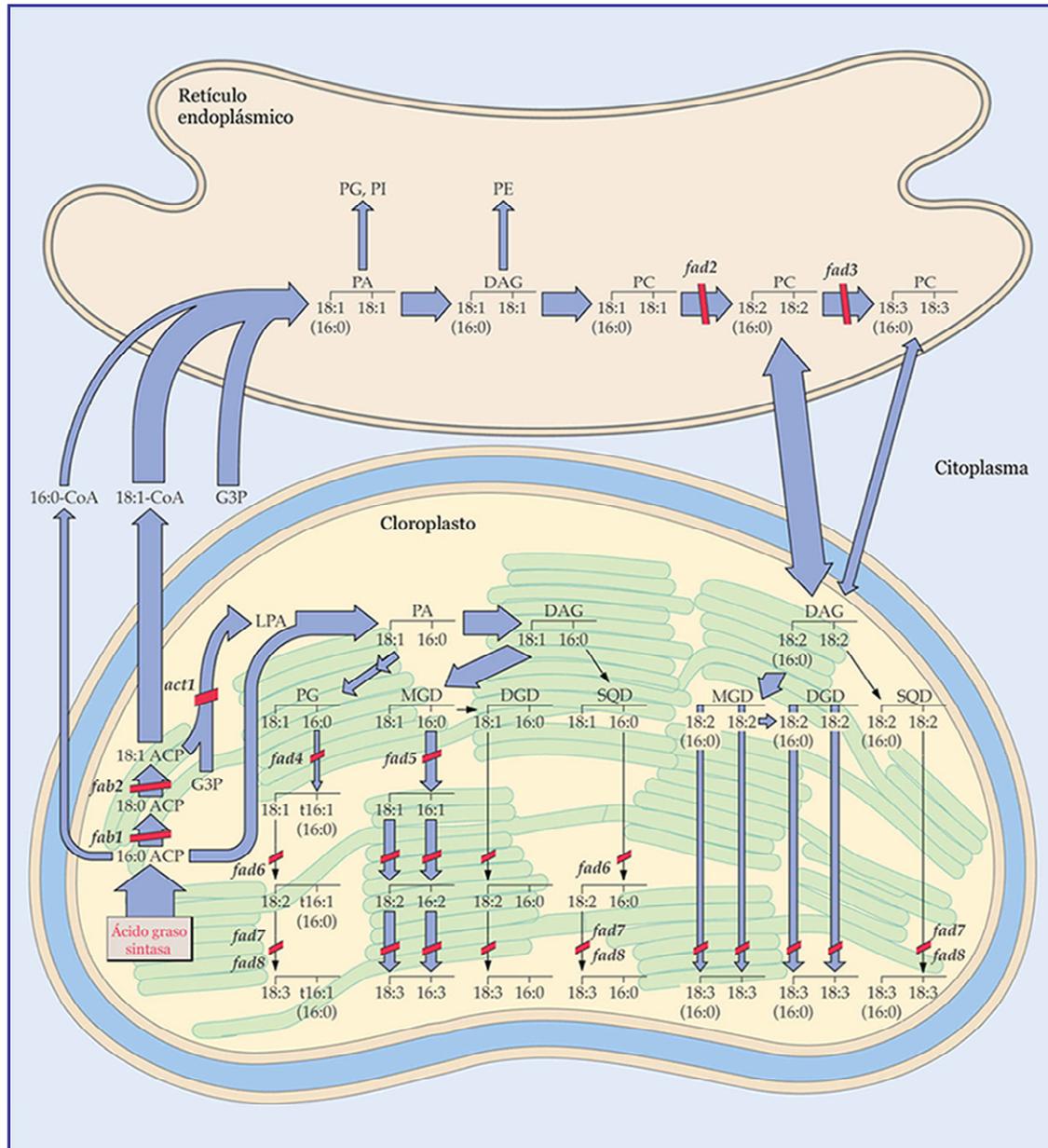


Figura 1.3. Esquema de la síntesis de lípidos en hojas de *Arabidopsis thaliana*. La anchura de las flechas representa el flujo relativo entre varias etapas de la ruta. Las líneas rojas indican algunos de los genes para los que se han aislado mutantes en *Arabidopsis*. Adaptada de Somerville y col., 2000.

Una vez en el retículo endoplásmico son utilizados para la síntesis de ácido fosfatídico por acilación del glicerol-3-fosfato. Al contrario que sus isoenzimas cloroplásticas, las aciltransferasas del retículo endoplásmico producen ácido fosfatídico altamente enriquecido en ácidos grasos de 18 átomos de carbono en las dos posiciones *sn*; el ácido palmítico (16:0), cuando está presente, se destina a la

posición *sn*-1. El ácido fosfatídico es convertido en diacilglicerol por una fosfatasa específica o activado por condensación con CTP formando CDP-diacilglicerol. Seguidamente, el diacilglicerol se utiliza principalmente para la síntesis de fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina y el CDP-diacilglicerol actúa como precursor de fosfatidilglicerol y fosfatidilinositol. Finalmente, la región DAG del PC puede ser devuelta a la envuelta del cloroplasto, donde se incorpora al pool de DAG y contribuye a la síntesis de lípidos cloroplásticos. Recientemente, esta ruta ha sido cuestionada por varios autores y se ha sugerido una ruta alternativa que implica la participación de un mecanismo de intercambio de grupos acil grasos como componente integral de la ruta eucariota (Williams y col., 2000; Bates y col., 2007). Así, los productos acil graso recién sintetizados no se utilizan para la síntesis inmediata de ácidos fosfatídico sino que se incorporan directamente a PC mediante un mecanismo de intercambio que actúa tanto en posición *sn*-1 como *sn*-2. Los grupos acil-graso liberados tras el intercambio se utilizan en gran parte para la biosíntesis *de novo* de ácido fosfatídico (figura 1.4).

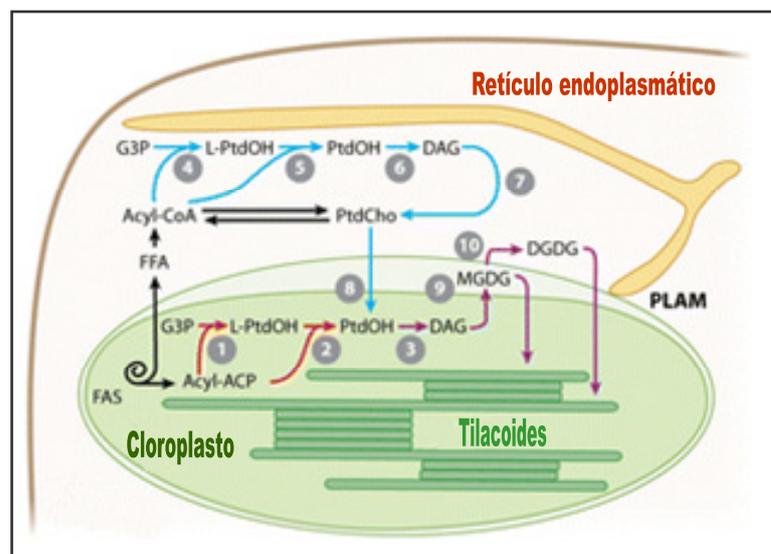


Figura 1.4. Rutas de la biosíntesis de lípidos tilacoidales. Adaptada de Benning, 2009.

La cantidad de glicerolípidos sintetizados por una u otra ruta puede variar en función de las distintas especies vegetales. Así, en algunas especies de plantas,

como *Arabidopsis* o espinaca, ambas rutas contribuyen igualmente a la síntesis de MGDG, DGDG y SL. Estas plantas, que se denominan *plantas 16:3*, se caracterizan porque contienen cantidades sustanciales de ácido hexadecatrienoico, 16:3^{Δ7,10,13}, esterificado en posición *sn*-2 del MGDG. En otras especies de plantas superiores, PG es el único producto sintetizado por la ruta procariota, y el resto de los lípidos cloroplásticos se sintetizan únicamente por la ruta eucariota. Estas plantas, que carecen de ácido graso 16:3, se denominan *plantas 18:3*. Además, la contribución de ambas rutas puede variar en diferentes tejidos y bajo distintas condiciones ambientales, siempre en una única especie vegetal.

1.3. MECANISMOS DE TRANSPORTE DE LÍPIDOS

1.3.1. Transporte de ácidos grasos desde el cloroplasto

A pesar de que probablemente el transporte de ácidos grasos desde el cloroplasto al retículo endoplasmático sea el flujo de especies lipídicas más importante que ocurre en las plantas, a día de hoy, se desconoce el mecanismo molecular y bioquímico que gobierna este proceso y todavía no se ha conseguido identificar ninguna proteína específica que participe en el mismo. Los coeficientes de permeabilidad de los ácidos grasos de cadena larga calculados recientemente en membranas lipídicas puras proporcionan una nueva perspectiva en su transporte a través de las membranas celulares (Hamilton, 2007). Los ácidos grasos de cadena larga presentan permeabilidades que son varios órdenes de magnitud más altas que las de otros nutrientes (glucosa, aminoácidos) y, por lo tanto, *a priori* ningún transportador proteico sería necesario para facilitar su movimiento transmembrana. Sin embargo, gran cantidad de datos descritos en la literatura acerca de este proceso de transferencia en bacterias, levaduras y células animales, concluyen que el transporte de ácidos grasos no puede definirse únicamente en términos de difusión libre a través de la membrana, aunque éste sea el componente central del proceso general, sino como un proceso mucho más eficiente facilitado por proteínas

implicadas en la translocación a través de la bicapa lipídica (Black y DiRusso, 2003). Así, los datos sugieren que el transporte tiene lugar a través de un mecanismo denominado acilación vectorial, en el que la transferencia de ácidos grasos está estrechamente acoplada al proceso de esterificación de los ácidos grasos libres por acción de las enzimas acil-CoA sintetasas. Probablemente, un mecanismo similar a la catálisis vectorial esté implicado en el movimiento de los ácidos grasos desde el cloroplasto hasta el retículo endoplasmático (Benning, 2008). En bacterias gram-negativas se han propuesto como componentes fundamentales del mecanismo de transporte de ácidos grasos una proteína transportadora de ácidos grasos y una acil-CoA sintetasa, denominadas FadL y FatD respectivamente. Teniendo en cuenta que los cloroplastos evolucionaron a partir de ancestros simbióticos de la cianobacterias, sería esperable que estos orgánulos tuvieran alguna proteína con función similar a la de las proteínas descritas anteriormente (Benning, 2008). Sin embargo, hasta la fecha, no se ha identificado ningún ortólogo de la proteína FadL en los genomas de plantas.

1.3.2. Transporte de lípidos desde el retículo endoplasmático hasta las membranas tilacoidales

La complejidad de la biosíntesis de los lípidos del tilacoide surge de la participación de cuatro sistemas de membrana diferentes: por un lado, el retículo endoplasmático y las membranas interna y externa de la envuelta cloroplástica, que actúan como membranas biogénicas ya que contienen la maquinaria de ensamblaje necesaria para la biosíntesis de los lípidos y, por el otro, las membranas tilacoidales que son el lugar receptor final de los lípidos polares recién sintetizados. Como consecuencia de esta implicación, los precursores y productos del metabolismo lipídico deben ser transportados a través de estos sistemas membranosos hasta llegar a su destino final (Benning, 2009).

El análisis de la composición de los ácidos grasos presentes en las especies lípidicas derivadas de las dos rutas de síntesis de glicerolípidos se utilizó inicialmente como herramienta para determinar la existencia de un flujo relativo de intermediarios lípidicos que coordinara la actividad de ambas rutas para la síntesis de los cuatro lípidos tilacoidales. Así, la ausencia de ácido hexadecatrienoico, 16:3^{Δ7,10,13}, en posición *sn*-2 del MGDG, DGDG y SQDG en “plantas 18:3” puso de manifiesto la presencia de un mecanismo de transporte de lípidos entre el retículo endoplasmático y el cloroplasto (Heinz y Roughan, 1983). Además, estos análisis permitieron establecer que la biosíntesis de PG constituía una excepción ya que, en todas las plantas analizadas, su síntesis tenía lugar exclusivamente a través de la ruta procariota. La explicación inicial propuesta fue que las “plantas 18:3” tenían actividad reducida de la PAP cloroplástica (Frentzen y col., 1983; Heinz y Roughan, 1983), enzima que no es necesaria para la biosíntesis de PG (Frentzen, 2004) pero sí para la biosíntesis de galactoglicerolípidos (Benning y Ohta, 2005). Sin embargo, el reciente descubrimiento de un supuesto transporte de ácido fosfatídido entre ambos orgánulos, que será discutido en detalle más adelante, contradice esta idea ya que en el modelo actual los lípidos transportados desde el RE deberían ser metabolizados por una PA fosfatasa plastidial. La existencia de estos mecanismos de intercambio de lípidos fue corroborada posteriormente por varios estudios realizados de forma independiente en una serie de mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes en la biosíntesis y modificación de los ácidos grasos (Browse y Somerville, 1991; Wallis y Browse, 2002). Así, el mutante *ats1*, formalmente denominado *act1*, que es deficiente en la actividad de la GPAT cloroplástica, presentaba una pérdida de la cantidad de galactolípidos sintetizados por la ruta procariota (Kunst y col., 1988). Sin embargo, esta deficiencia era compensada por un incremento de la síntesis de glicerolípidos cloroplásticos a través de la ruta eucariota minimizándose así el efecto de la mutación. Éste y otros resultados indican que ante una interrupción muy importante de una de las dos rutas de biosíntesis de glicerolípidos, existen mecanismos

reguladores para asegurar la síntesis y la transferencia suficiente de lípidos y mantener, de esta forma, niveles normales de biogénesis de membrana (Somerville y col., 2000). Además, estudios realizados con diferentes mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes en desaturasas específicas del retículo endoplasmático indican que la transferencia de lípidos entre el retículo endoplasmático y el cloroplasto es en cierto grado reversible (Miquel y Browse, 1992; Browse y col., 1993) ya que las membranas extracloroplásticas de dichos mutantes contienen ácidos grasos poliinsaturados derivados del cloroplasto.

Estos mecanismos subyacentes de transporte de lípidos entre el retículo endoplasmático y el cloroplasto son procesos dinámicos que implican una gran cantidad de reacciones de transferencia de especies lipídicas. De hecho, el entendimiento mecanístico de este transporte se ha complicado conceptualmente como consecuencia del descubrimiento de sitios de contacto entre ambos orgánulos que podrían actuar como canales para el intercambio de lípidos (Kjellberg y col., 2000). Estos sitios de contacto que dan lugar a regiones microsomales asociadas al cloroplasto (PLAM), han sido visualizados, y la fuerza de interacción entre los dos sistemas de membrana que los componen se ha calculado mediante la utilización de pinzas ópticas (Andersson y col., 2007).

Recientemente, diferentes evidencias bioquímicas, genéticas y de biología celular han permitido identificar algunos genes y proteínas implicadas en el proceso de transferencia lipídica. Además del mutante *act1* mencionado anteriormente, se han identificado una serie de mutantes de *Arabidopsis thaliana*, denominados *tgd1*, *tgd2* y *tgd3*, en los que el transporte de lípidos del RE al CL está interrumpido. Estos mutantes, que presentan una pérdida dramática de la cantidad de galactolípidos sintetizados a través de la ruta eucariota, acumulan además TAG y TGDG (trigalactosildiacilgliceroles) en sus tejidos (Xu y col., 2003; Awai y col., 2006; Lu y col., 2007; Xu y col., 2008). Sin embargo, la formación de estas especies parece ser un efecto secundario producido por la canalización de los intermedios lipídicos

almacenados, como consecuencia del defecto bioquímico primario, hacia otros nuevos productos finales (Benning, 2009). Estos tres mutantes *tgd* son deficientes en tres componentes de un posible transportador ABC, que se ha propuesto que podría estar implicado en el transporte de ácido fosfatídico a la membrana interna de la envuelta cloroplástica (Benning, 2008). Las proteínas TGD1, 2, 3 son similares a una permeasa, una proteína de unión a sustrato y una ATPasa, respectivamente, y están asociadas a la envuelta interna del cloroplasto (Xu y col., 2005; Awai y col., 2006; Lu y col., 2007). No obstante, no se puede descartar que el complejo transportador ABC esté localizado en sitios de contacto entre las dos membranas de la envuelta de manera que TGD1 estuviera asociado también a la membrana externa de la envuelta cloroplástica. Hasta la fecha no se ha logrado realizar una determinación directa del sustrato de este posible transportador cloroplástico (Benning, 2009). Sin embargo, la proteína TGD2, propuesta como posible proteína de unión a sustrato, une ácido fosfatídico de forma específica a través de su dominio MCE (Awai y col., 2006). Debido a que esta proteína parece estar anclada a través de un dominio intermembrana a la membrana interna del cloroplasto, el dominio de unión a ácido fosfatídico debería ser capaz de alcanzar la cara interna de la membrana externa de la envuelta cloroplástica, bien para fusionar localmente las dos membranas o para extraer el ácido fosfatídico sintetizado en el retículo endoplasmático (Awai y col., 2006). Recientemente, se ha descubierto una nueva proteína, denominada TGD4, que parece estar asociada a la membrana del retículo endoplasmático y que podría formar parte de la maquinaria de transporte de lípidos desde este último orgánulo a la membrana externa de la envuelta del cloroplasto (Xu y col., 2008).

La hipótesis actual para el transporte de lípidos desde el retículo endoplasmático al cloroplasto en *Arabidopsis thaliana* se resume en la figura 1.5: inicialmente, la proteína TGD4 media, de forma directa o indirecta, la transferencia de PC desde el retículo endoplasmático a la envuelta externa del cloroplasto. Allí, PC es

convertido en ácido fosfatídico gracias a la acción de una fosfolipasa D inespecífica que, a día de hoy, todavía no ha sido identificada.

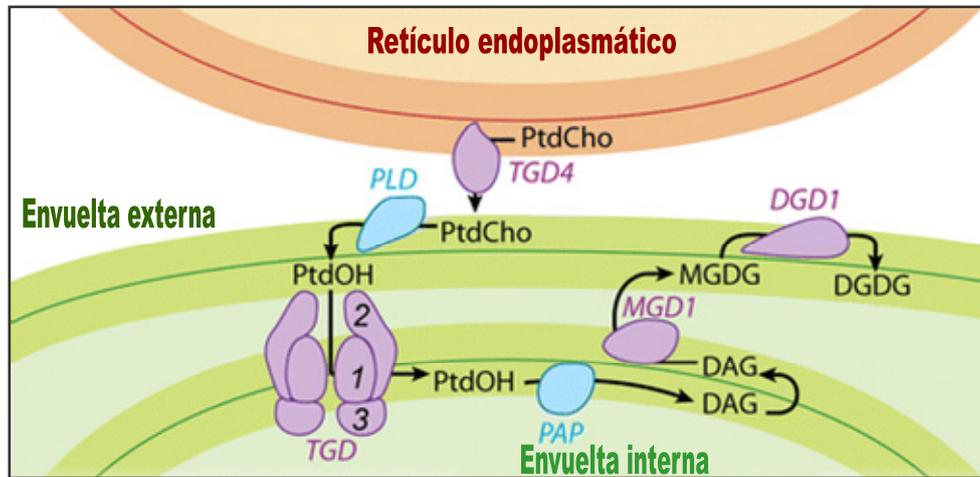


Figura 1.5. Interacción de los componentes implicados en el transporte de lípidos desde el retículo endoplasmático al cloroplasto y en el ensamblaje de galactoglicerolípidos en *Arabidopsis thaliana*. Adaptada de Benning, 2009.

Entonces, el complejo transportador TGD 1,2,3 transfiere esta molécula de ácido fosfatídico a la envuelta interna del cloroplasto, donde es convertido en DAG por la enzima plastidial PA fosfatasa. Seguidamente, DAG actúa como sustrato para la biosíntesis de MGDG por la enzima MGD1, que está localizada en la cara de la envuelta interna del cloroplasto orientada hacia el espacio intermembrana. Esta última enzima proporciona MGDG a la DGDG sintasa, que supuestamente transfiere un segundo residuo de galactosa para formar DGDG. La enzima DGD1 se localiza en la cara citosólica de la membrana externa de la envuelta cloroplástica (Benning, 2009).

Una observación contradictoria, ya mencionada, a la hipótesis actual es la baja actividad de la enzima fosfatidato fosfatasa observada en “plantas 18:3” (Frentzen y col., 1983; Heinz y Roughan, 1983) debido a que estas plantas dependen totalmente de la ruta eucariota para la biosíntesis de galactoglicerolípidos. Además, en guisante, que es una planta 18:3, se ha descrito actividad MGDG sintasa asociada a la membrana externa de la envuelta del cloroplasto mediante ensayos con fracciones

cloroplásticas (Cline y Keegstra, 1983). Si esta actividad descrita *in vitro* representa la situación *in vivo* en guisante, el complejo TGD1, 2, 3 no sería necesario para la biosíntesis de galactoglicerolípidos en “plantas 18:3”. Sin embargo, en guisante, la proteína TGD2 se ha identificado por proteómica en preparaciones de envuelta cloroplástica (Bräutigam y col., 2008) y, en arroz, otra planta 18:3, se ha predicho la existencia de un serie de ortólogos de las proteínas TGD 1, 2, 3, 4 (Benning, 2009). La determinación de la localización y de la topología de membrana de las proteínas implicadas en este proceso en una planta modelo 18:3 y su comparación con la planta modelo 16:3, *Arabidopsis thaliana*, debería proporcionar las claves que expliquen las diferencias de la utilización de las rutas procariota y eucariota para la biosíntesis de los lípidos tilacoidales en estos grupos de plantas.

Finalmente, los lípidos sintetizados por cualquiera de las dos rutas biosintéticas existentes deben ser, en última instancia, transportados al tilacoide. Además, también es estrictamente necesario que este transporte de lípidos se coordine completamente con el desarrollo global del cloroplasto. A día de hoy, se han encontrado múltiples evidencias que sugieren la existencia de un transporte vesicular para la transferencia de lípidos desde la envuelta interna a las membranas tilacoidales (von Wettstein, 2001; Westphal y col., 2001b). Recientemente, un estudio en un mutante de *Arabidopsis thaliana* que carece de membranas tilacoidales ha permitido identificar una nueva proteína, denominada VIPP1, que podría estar implicada en la formación de vesículas en el cloroplasto. Esta nueva proteína también está presente en bacterias, y su inactivación en cianobacterias afecta a la formación de los tilacoides (Westphal y col., 2001a). Por lo tanto, las evidencias actuales sugieren que la proteína VIPP1 podría ser un componente de un complejo potencialmente requerido para la transferencia vesicular hacia el cloroplasto. Asimismo, se han propuesto otros componentes adicionales que podrían participar en este sistema de transporte vesicular (Benning, 2008). No obstante, la implicación de estos componentes en la

formación de las membranas tilacoidales tendrá que ser demostrada mediante análisis bioquímicos y genéticos (Benning, 2008).

1.4. DESATURASAS DE ÁCIDOS GRASOS

1.4.1. Características de las desaturasas de ácidos grasos de plantas

Las desaturasas son las enzimas responsables de introducir dobles enlaces en las cadenas alquílicas de los ácidos grasos. Estas enzimas se encuentran en microorganismos, plantas y animales, donde juegan un papel clave en numerosos procesos biológicos. Principalmente, las desaturasas regulan la fluidez de las membranas celulares y, por lo tanto, influyen en la interfase entre las células y su ambiente exterior. Además, participan en la biosíntesis de una amplia gama de moléculas implicadas en la señalización celular y determinan, en gran medida, las propiedades físicas y el valor nutricional de las grasas animales y de los aceites vegetales (Murphy y Piffanelli, 1998).

Gen	Nombre antiguo	Sustrato	Localización	Sustrato	Producto	Donador de electrones
Fab2		Acil-ACP	CP	18:0	18:1 Δ^9	Fd
Fad2		Fosfolípido	ER	18:1 Δ^9	18:2 $\Delta^9, 12$	b_5
Fad3		Fosfolípido	ER	18:2 $\Delta^9, 12$	18:3 $\Delta^9, 12, 15$	b_5
Fad4	FadA	PG	CP	16:0	16:1 Δ^7	Fd
Fad5	FadB	GL, SL	CP	16:0	16:1 Δ^7	Fd
Fad6	FadC	GL, SL, PG	CP	16:1 Δ^7 18:1 Δ^9	16:2 $\Delta^7, 10$ 18:2 $\Delta^9, 12$	Fd
Fad7	FadD	GL, SL, PG	CP	16:2 $\Delta^7, 10$ 18:2 $\Delta^9, 12$	16:3 $\Delta^7, 10, 13$ 18:3 $\Delta^9, 12, 15$	Fd
Fad8		GL, SL, PG	CP	16:2 $\Delta^7, 10$ 18:2 $\Delta^9, 12$	16:3 $\Delta^7, 10, 13$ 18:3 $\Delta^9, 12, 15$	Fd

Tabla 1.3. Principales características de las desaturasas de ácidos grasos de plantas. Sobre fondo naranja se muestra la desaturasa soluble y sobre fondo amarillo las desaturasas de membrana. CP, cloroplasto; ER, retículo endoplásmico; Fd, ferredoxina; b_5 , citocromo b_5 ; GL, galactolípido; PG, fosfatidilglicerol; SL, sulfolípido. Adaptada de Miquel y Browse, (1998).

Atendiendo a su solubilidad, las desaturasas de plantas se clasifican en dos grupos: *desaturasas solubles* y *desaturasas de membrana*. Las principales características de algunas de estas enzimas se resumen en la tabla 1.3. Independientemente de su solubilidad, todas las desaturasas de plantas están codificadas por genes nucleares y difieren en su localización celular, en la especificidad por su sustrato y en el donador de electrones utilizado.

1.4.1.1. Desaturasas solubles

Las desaturasas solubles de plantas se sitúan en el estroma del cloroplasto y tienden a ser específicas para sustratos acil-ACP saturados. Dentro de esta familia de desaturasas cabe destacar la Δ^9 estearoil-ACP desaturasa (FAB2), enzima que es esencial para la biosíntesis de ácidos grasos insaturados ya que cataliza la incorporación del primer doble enlace en el ácido esteárico (18:0) para producir ácido oleico (18:1 Δ^9).

El estudio y la comprensión del funcionamiento de estas desaturasas y de otras enzimas relacionadas avanzaron considerablemente con la resolución de la estructura cristalina de una forma recombinante de la Δ^9 estearoil-ACP desaturasa de *Ricinus communis* (Lindqvist y col., 1996). Tal y como muestra la figura 1.6., cada subunidad de esta proteína homodimérica está constituida por once α -hélices, de las cuales nueve forman un fardo de α -hélices antiparalelo, y un centro dihierro (Fe-O-Fe) que actúa como sitio activo de la enzima.

El hecho de que el centro dihierro esté alejado de la superficie de la desaturasa elimina la posibilidad de una transferencia directa de electrones desde la ferredoxina hasta el sitio activo. La estructura cristalina reveló la existencia de dos posibles rutas de movimiento de electrones a través de las cadenas laterales de los residuos aromáticos y cargados de la desaturasa. Además, en la estructura cristalina también se identificó una cavidad hidrofóbica que podía unir el sustrato de la enzima en la orientación correcta respecto al sitio activo (Shanklin y Cahoon, 1998). Estudios de

modelado con el ácido esteárico han revelado que, en este modelo, la parte ACP del sustrato podría interactuar con los residuos de la superficie de la proteína y, entonces, la cadena de ácido graso se extendería por el canal hidrofóbico hacia el interior de la misma. Esta disposición favorecería una conformación plegada del sustrato entorno al carbono en posición Δ^9 que quedaría situado en la inmediaciones del centro dihierro de la proteína, facilitándose así la formación de un doble enlace en configuración cis en dicha posición. Estudios de regioespecificidad demuestran que todas las acil-ACP desaturasas sitúan el doble enlace en relación al extremo carboxilo terminal del ácido correspondiente. Este hecho sugiere que existe una distancia fija entre los átomos de hierro catalíticos del sitio activo y la parte ACP de los sustratos enlazados en cada subunidad (Shanklin y Cahoon, 1998).



Figura 1.6. Estructura de la subunidad monomérica constituyente de la proteína homodimérica Δ^9 estearoil-ACP desaturasa de *Ricinus communis*. Los dos átomos de hierro del centro dihierro se muestran en rojo.

Además de la Δ^9 estearoil-ACP desaturasa, se han descrito otras desaturasas solubles que se encuentran en tejidos ricos en contenido lípido como la Δ^6 palmitoil-ACP desaturasa de *Thunbergia alata* (Cahoon y col., 1994) y la Δ^4 palmitoil-ACP

desaturasa de *Coriandrum sativum* (Cahoon y col., 1992), ambas localizadas en el estroma de semillas en desarrollo, y la Δ^6 miristoil-ACP desaturasa de *Pelargonium hortorum*, requerida para la formación de ácidos grasos monoinsaturados en tricomas (Schultz y col., 1996).

Estudios de mutagénesis dirigida con las enzimas estearoil-ACP desaturasas sugieren que el reconocimiento de la longitud de la cadena del ácido graso está determinada principalmente por las propiedades de los residuos aminoacídicos localizados en la parte inferior de la cavidad que acomoda el sustrato acil-ACP. Así, por ejemplo, la sustitución de los aminoácidos alanina-188 y triptófano-189 por glicina y alanina, respectivamente, en la enzima Δ^6 palmitoil-ACP desaturasa alarga la cavidad de unión del sustrato, y la enzima resultante puede acomodar dos grupos metilo adicionales. Entonces, la enzima es capaz de desaturar ácidos grasos de 16 y 18 átomos de carbono con la misma eficiencia (Cahoon y col., 1997).

1.4.1.2. Desaturasas de membrana

La mayoría de las desaturasas de plantas son proteínas integrales de membrana y se encuentran localizadas en dos compartimentos subcelulares diferentes, el retículo endoplasmático y el cloroplasto. El hecho de ser proteínas de membrana ha dificultado el desarrollo de métodos para su purificación y caracterización y, por tanto, ha limitado su investigación por técnicas bioquímicas tradicionales. Los recientes avances en transformación y manipulación genética de plantas han permitido profundizar en el conocimiento de estas enzimas. Así, el análisis de una colección de mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes en la actividad de las diferentes desaturasas ha permitido estudiar sus secuencias genómicas y definir su número, localización celular y función dentro de la maquinaria lípidica.

Las desaturasas de membrana utilizan una gran variedad de lípidos complejos como sustratos, entre los que se encuentran PC, PG y MGDG, y necesitan un

donador de electrones para realizar su función. Así, las desaturasas localizadas en el retículo endoplasmático actúan sobre fosfatidilcolina, y posiblemente sobre otros fosfolípidos, y utilizan citocromo b_5 como donador de electrones, mientras que las enzimas localizadas en el cloroplasto actúan sobre ácidos grasos esterificados a galactolípidos, sulfolípidos y fosfatidilglicerol, y usan ferredoxina como donador de electrones (tabla 1.3).

Las desaturasas reticulares están codificadas por los genes *FAD2* y *FAD3* y actúan sobre los ácidos grasos de 18 átomos de carbono esterificados a las posiciones *sn-1* y *sn-2* de los fosfolípidos. *FAD2* es la enzima encargada de producir ácido linoleico ($18:2^{\Delta 9,12}$) por incorporación de un doble enlace en la posición Δ^{12} del ácido oleico ($18:1^{\Delta 9}$). En soja, uno de los recursos más importantes de aceite vegetal, se han descrito cuatro genes que codifican esta enzima: *FAD2-1A* y *FAD2-1B*, que se expresan específicamente en semillas en desarrollo y *FAD2-2* y *FAD2-3*, que se expresan de forma constitutiva tanto en tejidos vegetativos como en semillas (Heppard y col., 1996; Tang y col., 2005; Li y col., 2007). El ácido linolénico es el producto de la $\omega 3$ desaturasa reticular *FAD3*, que introduce un doble enlace en la posición Δ^{15} del ácido linoleico ($18:2^{\Delta 9,12}$). En el caso de esta desaturasa, se ha propuesto la existencia de tres isoformas diferentes que contribuyen a los niveles de linolénico en soja: *FAD3A*, *FAD3B* y *FAD3C* (Bilyeu y col., 2003). Según estos autores, *FAD3A* se expresa predominantemente en semillas en desarrollo mientras que *FAD3B* y *FAD3C* se expresan a niveles muy bajos, prácticamente indetectables (Bilyeu y col., 2003). Además, Anai y col. (2005) identificaron cuatro genes, denominados *GmFAD3-1a*, *GmFAD3-1b*, *GmFAD3-2a* y *GmFAD3-2b*, en semillas de soja del cultivar Bay (Anai y col., 2005).

Dos de las cinco desaturasas plastidiales, *FAD4* y *FAD5*, presentan alta especificidad por su sustrato. Así, el producto del gen *FAD4* inserta un doble enlace en configuración *trans* en el ácido graso 16:0 esterificado en la posición *sn-2* del fosfatidilglicerol, mientras que el producto del gen *FAD5* es el responsable de la

síntesis de Δ^7 16:1 en monogalactosilglicerol y, posiblemente, en digalactosilglicerol (Wallis y Browse, 2002). Por el contrario, el resto de las desaturasas cloroplásticas no muestran especificidad aparente por la longitud de la cadena de ácido graso (16 o 18 átomos de carbono), la posición y la clase de lípido sobre la que actúan. FAD6 sintetiza 16:2/18:2 a partir de 16:1/18:1, respectivamente, mientras que FAD7 y, la ω 3 desaturasa plastidial inducible por frío FAD8 (McConn y col., 1994), son las enzimas encargadas de la síntesis de 16:3 y 18:3 a partir de 16:2 y 18:2.

A pesar de las diferencias mostradas por las desaturasas de membrana respecto a la especificidad de sustrato, al donador de electrones e incluso respecto a la posición en la que introducen el doble enlace, todas ellas contienen motivos estructurales conservados, como la presencia de ocho histidinas en tres clusters separados con la siguiente secuencia consenso (Murphy y Piffanelli, 1998):

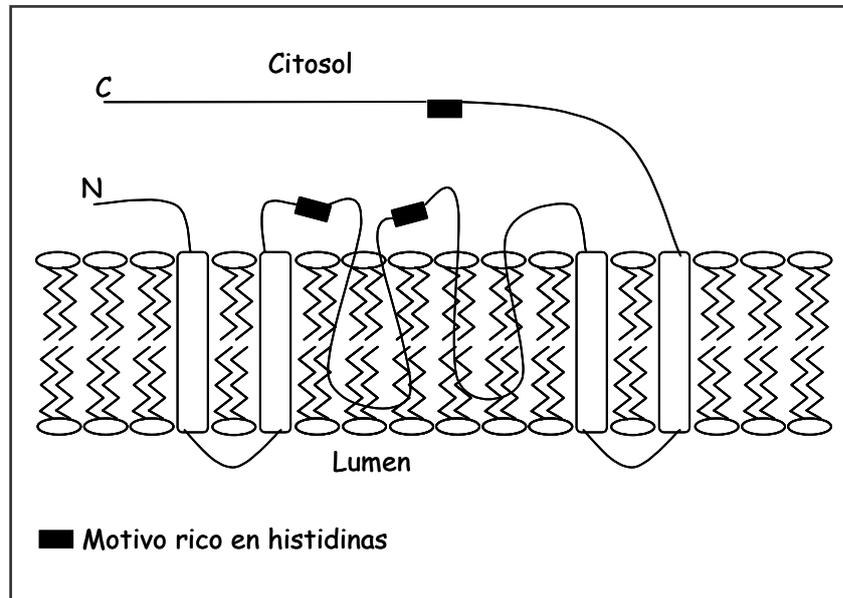
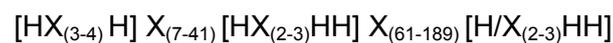


Figura 1.7. Representación de la topología de FAD2 y FAD3 en las membranas del retículo endoplásmico. Adaptada de Dyer y col., 2001 y Tang y col., 2005.

Cada uno de los ocho residuos de histidina son esenciales para la actividad catalítica de estas enzimas ya que actúan como ligandos de unión para los átomos

de hierro presentes en el sitio activo de las desaturasas (Shanklin y col., 1994). Además, estas regiones ricas en histidina están situadas en posiciones equivalentes respecto a las regiones hidrofóbicas conservadas. En la figura 1.7, se muestra un modelo topológico de una desaturasa de membrana.

Algunas desaturasas presentan secuencias ricas en histidinas que no se corresponden con la secuencia consenso. Una primera excepción la constituyen todas las Δ^6 desaturasas funcionalmente caracterizadas hasta el momento. En estas enzimas, el primer residuo de histidina del tercer elemento ha sido sustituido por un residuo de glutamina. Estas desaturasas pertenecen al grupo de la denominadas “front-end” y se caracterizan por presentar en su extremo N-terminal un dominio citocromo b_5 . Recientemente, se ha descrito que el tercer cluster de histidinas presente en la desaturasa FAD4 tiene una secuencia diferente (QGHH) a la descrita para el resto de las desaturasas de membrana (Jinpeng y col., 2009). Aunque anteriormente se había descrito en la bibliografía que un residuo de glutamina podía sustituir a un residuo de histidina en este motivo, todas las desaturasas de membrana caracterizadas presentaban tres o cuatro residuos aminoacídicos entre la glutamina y las histidinas posteriores. Otra característica diferencial que presenta esta desaturasa está relacionada con la situación de las tres regiones ricas en histidina en la secuencia de la proteína. En las desaturasas de membrana, con excepción de FAD4, dos de las regiones ricas en histidina se localizan entre el segundo y el tercer dominio transmembrana, mientras que el tercero se encuentra situado en el extremo C-terminal. Sin embargo, en FAD4, sólo una región rica en histidina está localizada entre los dominios transmembrana 2 y 3, mientras que los dos restantes se localizan en el extremo carboxilo terminal (Jinpeng y col., 2009).

En cuanto a la regioespecificidad, a diferencia de las desaturasas solubles, las desaturasas de membrana utilizan tres mecanismos diferentes para ubicar los dobles enlaces en las cadenas alquílicas de los ácidos grasos: algunas enzimas como las Δ^6 desaturasa introducen el doble enlace entre el extremo carboxilo terminal y una

insaturación preexistente, otras como la Δ^{15} desaturasa de cianobacterias incorporan el doble enlace en relación al extremo metilo del ácido graso y finalmente, un tercer grupo de enzimas, generalmente denominadas $\omega 6$ desaturasas, sitúan el doble enlace contando tres carbonos hacia el extremo metilo del ácido graso desde un doble enlace ya existente.

1.4.2. Mecanismo de reacción de las desaturasas

Las desaturasas son enzimas que catalizan la incorporación de un doble enlace en la cadena alquílica de un ácido graso en una reacción que requiere oxígeno molecular y un sistema donador de electrones. En cada reacción de desaturación, se transfieren dos electrones y una molécula de oxígeno se reduce completamente a agua.

En función de su localización celular, las desaturasas de plantas utilizan dos sistemas donadores de electrones diferentes. Así, las desaturasas cloroplásticas, tanto solubles como de membrana, utilizan el sistema ferredoxina-NAD(P)H/ferredoxina oxidoreductasa en tejidos no fotosintéticos o en tejidos fotosintéticos en oscuridad. En este sistema, los equivalentes de reducción aportados por el NAD(P)H son transferidos de forma simultánea a la flavoproteína ferredoxina-NADP⁺ oxidoreductasa, que los cede de forma secuencial a dos moléculas de ferredoxina. Entonces, dos moléculas de ferredoxina reducida suministran a la desaturasa los electrones necesarios para la catálisis. Sin embargo, en tejidos fotosintéticos en luz, la ferredoxina es reducida directamente por acción del fotosistema I (Shanklin y Cahoon, 1998). En el caso de las desaturasas reticulares, el sistema de transporte electrónico utilizado es el citocromo b_5 -NADH/citocromo b_5 oxidoreductasa (Murphy y Piffanelli, 1998).

La disponibilidad de la estructura cristalina de una forma recombinante purificada de la Δ^9 estearoil-ACP desaturasa ha permitido caracterizar de forma más detallada el mecanismo químico de inserción de un doble enlace. Hasta el momento,

se han obtenido escasos datos cinéticos detallados para las desaturasas de ácidos grasos y, como consecuencia de ello, las diferentes hipótesis acerca de su mecanismo catalítico se han realizado fundamentalmente en base a su analogía con otras enzimas relacionadas, principalmente con la enzima metano monooxigenasa hidroxilasa y su mecanismo de acción propuesto (Murphy y Piffanelli, 1998).

El mecanismo catalítico propuesto para la desaturación de ácidos grasos se detalla en la figura 1.8. En el estado basal, el centro dihierro de la enzima se encuentra en su forma oxidada, $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O-Fe}^{\text{III}}$. La reducción de los dos átomos de hierro por transferencia electrónica desde el sistema donador de electrones correspondiente resulta en la formación de un estado reducido del centro dihierro, $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Fe}^{\text{II}}$. A continuación, el oxígeno molecular se une al centro activo de la enzima generando un intermedio peroxo 2Fe-2O (estado "P"). La ruptura del enlace O-O da lugar a una forma activada del centro dihierro (estado "Q"), que actúa como compuesto oxidante clave capaz de abstraer un átomo de hidrógeno del grupo metileno de un ácido graso inactivado para formar un intermedio radical alquilo. La pérdida de un segundo átomo de hidrógeno origina una especie transitoria que contiene dos electrones desapareados y que podría recombinarse de forma espontánea para formar un doble enlace. Esta reacción va acompañada de la pérdida de una molécula de agua y de la regeneración de la forma oxidada del sitio activo de la enzima (Shanklin y Cahoon, 1998; Somerville y col., 2000). El mecanismo basado en la abstracción de hidrógenos desde el sustrato principal representa sólo uno de los posibles esquemas de desaturación. Alternativamente, podrían existir otros mecanismos diferentes que explicarían el funcionamiento de las desaturasas. Así, el mecanismo de incorporación del doble enlace en anaerobiosis implica una deshidratación seguida de una isomerización *trans-cis* y un mecanismo similar se ha propuesto para la desaturación de ácidos grasos en condiciones aeróbicas (Nagai y Bloch, 1968). Según esta hipótesis, en primer lugar se produciría la hidroxilación del ácido graso correspondiente, que seguidamente, se deshidrataría y, por último, el doble enlace se

isomerizaría. Sin embargo, no se ha observado la conversión del ácido graso hidroxilado a ácido graso insaturado, lo que sugiere que probablemente este sustrato hidroxilado no es un intermedio de la reacción de desaturación (Nagai y Bloch, 1968). No obstante, todavía no se han descrito evidencias concluyentes que apoyen cualquiera de estos mecanismos de desaturación (Shanklin y Cahoon, 1998).

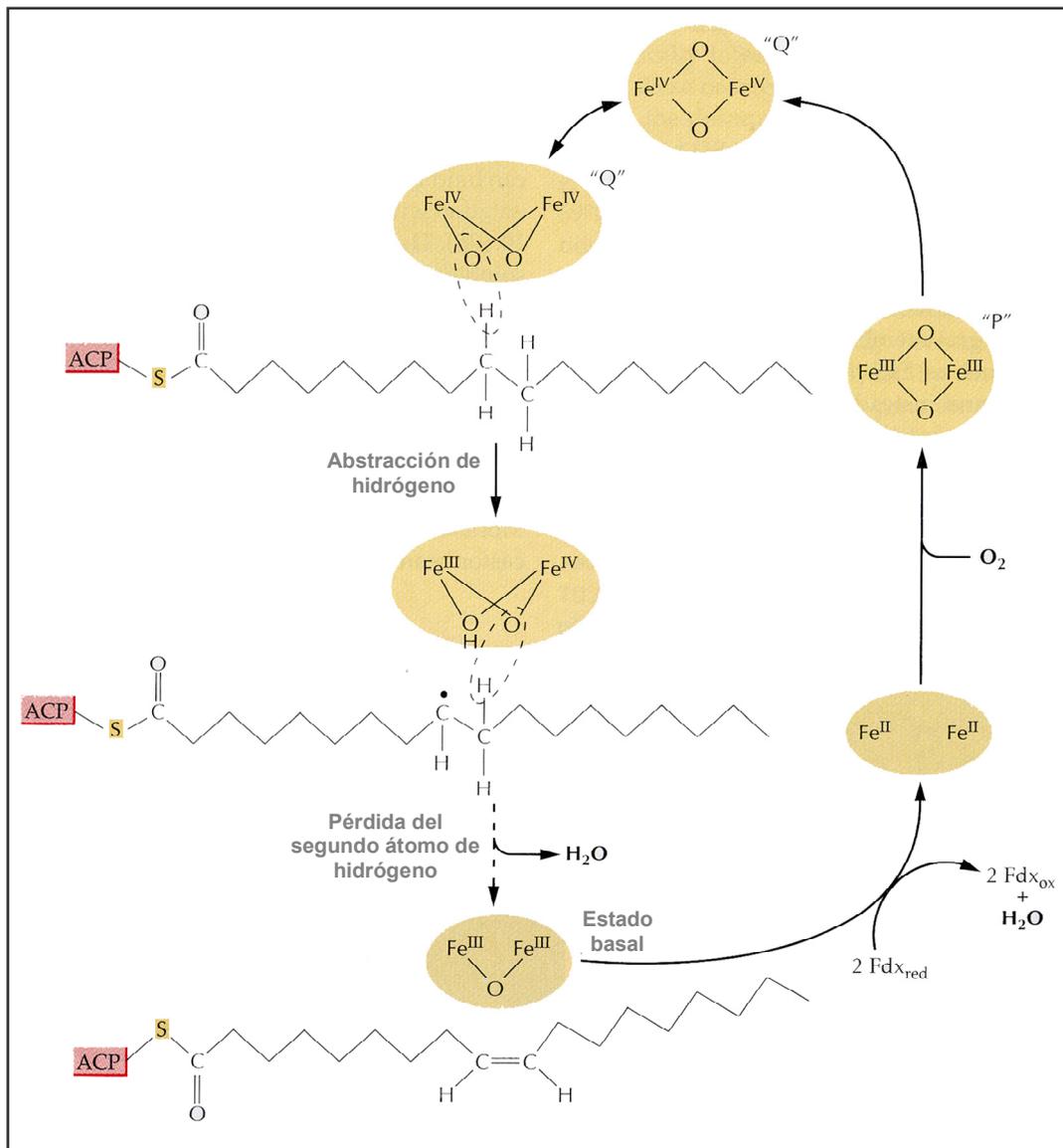


Figura 1.8. Mecanismo catalítico propuesto para la reacción de desaturación. Adaptada de Somerville y col., 2000.

1.4.3. Regulación de la actividad de las desaturasas

En todos los organismos, las desaturasas de ácidos grasos están sujetas a diferentes tipos de regulación dependiendo de su localización y de su función en la célula. Aunque, a día de hoy, todavía se desconocen los mecanismos que controlan la desaturación de ácidos grasos, varias evidencias indican que diversos y numerosos factores como el desarrollo de la planta, las hormonas, la disponibilidad de sustrato, la herida, el ataque por patógenos, el estrés hídrico y la temperatura regulan la actividad de estas enzimas.

1.4.3.1. Desarrollo de la planta

En determinados estadios del desarrollo vegetal, existe una necesidad adicional de actividad desaturasa que se puede suplir mediante el aumento de la expresión de los genes de las desaturasas que se expresan de forma constitutiva, o bien mediante la inducción de genes de desaturasas específicas de un estadio particular del desarrollo. Uno de los ejemplos mejor caracterizados de genes de desaturasas que se expresan tanto de forma constitutiva como en función del desarrollo es el gen *FAB2*, que codifica la enzima esteroil-ACP desaturasa. Así, esta enzima además de encontrarse implicada en la biosíntesis de lípidos de membrana, también interviene en la síntesis de lípidos de reserva en semillas y polen, en la síntesis de lípidos estructurales en el *tapetum* y en la síntesis de membranas tilacoidales (Slocombe y col., 1994; Piffanelli y col., 1997). Tanto en los tejidos fotosintéticos como en los tejidos de almacenamiento de lípidos, la regulación de este gen se ejerce principalmente a nivel transcripcional. Sin embargo, el análisis de los niveles de mRNA *FAB2* y de proteína *FAB2* en el mutante *chs1* de *Arabidopsis thaliana* sugiere que esta clase de genes también podría regularse a nivel post-transcripcional (Schneider y col., 1995).

El análisis fenotípico de varios mutantes de *Arabidopsis thaliana*, tales como *act1*, *fad7*, *fad3* y *fad7/fad8*, ha revelado que la expresión de los genes de las

desaturasas se coordina durante el desarrollo de la planta con el objetivo de mantener un intercambio bidireccional continuo de lípidos entre el retículo endoplasmático y el cloroplasto (Kunst y col., 1988; Browse y col., 1993; McConn y col., 1994).

Durante la maduración de la hoja, se produce un incremento significativo de la cantidad de ácidos grasos trienoicos tanto en plantas 16:3 como en plantas 18:3 que se ha asociado con cambios en la expresión de los genes de las ω 3 desaturasas. El descenso marcado de los niveles de mRNA *FAD3* durante el desarrollo de la hoja sugiere que las ω 3 desaturasas cloroplásticas, *FAD7* y *FAD8*, deben desempeñar una función importante en el aumento de los niveles de estos ácidos grasos (Horiguchi y col., 1996a; Horiguchi y col., 1996b). Además, en trigo, se ha descrito que los niveles de transcrito *FAD7* permanecen constantes independientemente del estado de maduración de la hoja (Horiguchi y col., 1996a; Horiguchi y col., 1996b), lo que permite concluir que el incremento de los niveles de ácidos grasos trienoicos debe estar regulado bien por una activación post-transcripcional de la ω 3 desaturasa *FAD7* o por una acumulación continua de ácidos trienoicos como consecuencia de su baja degradación.

Por otro lado, en trigo, se ha detectado la existencia de una distribución espacial de los transcritos *TaFAD3* y *TaFAD7* claramente diferenciada (Horiguchi y col., 1996a; Horiguchi y col., 1998). Así, mientras que el gen *FAD3* se expresa a altos niveles en células con gran capacidad de proliferación, la acumulación del mRNA *FAD7* está asociada con el desarrollo del cloroplasto. Esta acumulación de los mRNAs *FAD3* y *FAD7* se ha relacionado con la activa biogénesis de membrana requerida para la división celular y con la formación de las membranas tilacoidales, respectivamente (Horiguchi y col., 1998). Los datos obtenidos por Matsuda y col. (2001) en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* son comparables a la distribución espacial de los transcritos de los genes *FAD7* y *FAD3* descrita en plántulas de trigo y, por lo tanto, son consistentes con la hipótesis anteriormente

descrita. Asimismo, el análisis de la expresión transcripcional en diferentes tejidos de olivo demostró que el gen *OeFAD3* se expresa preferentemente en tejidos vegetativos activos mitóticamente mientras que el gen *OeFAD7* muestra un patrón de expresión de tipo constitutivo. Estos resultados están de acuerdo con la hipótesis de que las desaturasas reticulares están implicadas en la biogénesis de membrana y en el ciclo de división celular mientras que las desaturasas cloroplásticas están implicadas en la formación de los tilacoides. Además, se ha descrito que la expresión del gen *FAD3* en la drupa del olivo es específica de tejido y está regulada por el desarrollo y, por ello, los autores han postulado que este gen posee un papel clave en los tejidos reproductivos del olivo, especialmente durante el desarrollo del gametofito femenino (Banilas y col., 2007). En este mismo sentido, varios estudios han detectado la presencia del transcrito *FAD7* en múltiples tipos de células que forman el carpelo del olivo, indicando que probablemente el principal papel de la actividad de la desaturasa *FAD7* en los tejidos reproductivos sea suministrar ácido linolénico para la biosíntesis de oxilipinas, hormonas con función esencial en la reproducción (Poghosyan y col., 1999; Banilas y col., 2007).

Por el contrario, un ejemplo característico de un gen de desaturasa que se induce específicamente por el desarrollo es el gen *FAD2-1*, específico de semillas oleaginosas. Este gen, a diferencia del gen *FAD2-2* que presenta expresión constitutiva, se induce a lo largo del desarrollo de la semilla con un máximo de expresión que coincide con el momento de mayor tasa de biosíntesis de ácidos grasos y de acumulación de aceite (Heppard y col., 1996; Martínez-Rivas y col., 2001; Tang y col., 2005). Otro modelo de regulación específica por desarrollo vía expresión de un gen de desaturasa adicional tiene lugar durante la senescencia de pétalos de rosa. Normalmente, la fase de senescencia se asocia con un proceso de degradación de lípidos. Existen evidencias que indican que los ácidos grasos poliinsaturados son más susceptibles al catabolismo que los ácidos grasos saturados (Brown y col., 1991). Por lo tanto, puede haber una necesidad de actividad desaturasa transitoria al

inicio de la senescencia para incrementar el reservorio de ácidos grasos poliinsaturados disponibles para reciclar vía catabolismo. Uno de los genes principales que se inducen específicamente durante la senescencia del pétalo de rosa codifica una proteína que se parece a las enzimas de membrana Δ^9 stearoil-CoA desaturasas descritas en animales y hongos (Fukuchi-Mizutani y col., 1995). Esta enzima es muy diferente a las estearato desaturasas de plantas descritas, que son enzimas cloroplásticas solubles que utilizan sustratos acil-ACP. La existencia de una clase diferente de estearato desaturasas podría ser debida a su función especializada en un proceso de desarrollo específico (Murphy y Piffanelli, 1998).

1.4.3.2. Temperatura

La temperatura es uno de los factores medioambientales que tiene mayor impacto sobre el desarrollo y la supervivencia de las plantas, ya que condiciona el crecimiento y el rango de distribución geográfica de las diferentes especies vegetales. El primer efecto que se produce como consecuencia del estrés por frío es una grave pérdida de la integridad de las membranas debida a una transición desde un estado líquido cristalino a un estado sólido denominado *fase de gel*. Este cambio de estado, que produce un aumento de la rigidez de las membranas, causa cambios en el metabolismo provocando daño celular e, incluso, la muerte de la planta (Somerville y col., 2000). Diversos factores, tales como el grado de insaturación de los ácidos grasos constituyentes de los lípidos y la configuración de los dobles enlaces existentes, pueden afectar este estado de transición y, por lo tanto, influir en el grado de fluidez/rigidez de las membranas celulares. Como regla general se ha establecido que un aumento de la cantidad de ácidos grasos saturados favorece la rigidez de las membranas, mientras que el incremento del número de dobles enlaces en configuración *cis* conduce al aumento de la fluidez de las mismas. Según este razonamiento, se esperaría que la presencia de ácidos grasos saturados fuera particularmente importante a altas temperaturas y que los ácidos grasos insaturados

fueran cruciales para la supervivencia a bajas temperaturas. Sin embargo, el impacto del grado de insaturación de los lípidos en el proceso de adaptación de las plantas a los cambios de temperatura parece ser más complejo. El estudio de varios mutantes de *Arabidopsis thaliana* y de plantas transgénicas que presentan alteraciones en la desaturación de ácidos grasos ha ayudado a profundizar en el entendimiento del papel que desempeña la insaturación de ácidos grasos en la tolerancia a la temperatura (Wallis y Browse, 2002).

Puesto que la desaturación de los lípidos de membrana favorece la fluidez de la misma, los investigadores han intentado definir, durante años, la relación existente entre la composición de la membrana y la adaptabilidad de las plantas a las bajas temperaturas. En este sentido, en los años 80, se propuso que el PG cloroplástico que contenía una combinación de ácidos grasos saturados (16:0 y 18:0) esterificados en posición *sn*-1 del glicerol y un ácido graso saturado o el ácido graso t16:1 esterificados en posición *sn*-2 podía conferir sensibilidad al frío en plantas (Murata y col., 1982). Como el doble enlace en configuración *trans* hace que el ácido graso *trans*-16:1^{A3} tenga una estructura muy similar a la del ácido graso 16:0, estas moléculas lipídicas se denominaron PG saturado. Así, la naturaleza del grupo acilgraso unido en la posición *sn*-1 del PG cloroplástico es crucial para determinar el punto de fusión de dicho lípido y, por tanto, la sensibilidad al frío de las diferentes especies vegetales. En plantas resistentes al frío, un ácido graso de 18 átomos de carbono insaturado se une en posición *sn*-1 del PG, mientras que en las plantas sensibles al frío, un ácido graso saturado, el ácido palmítico, tiende a unirse en esa misma posición. Por consiguiente, la especificidad de sustrato de la enzima glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) está directamente relacionada con el grado de tolerancia al frío (Murata y col., 1992; Moon y col., 1995). Con el fin de aclarar la relación entre la sensibilidad al frío y las especies moleculares de PG, se obtuvieron plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresaban la enzima glicerol-3-fosfato aciltransferasa de plantas resistentes al frío como *Arabidopsis thaliana* y de plantas

sensibles al frío como calabaza. La sobreexpresión de estas enzimas, así como la de la glicerol-3-fosfato aciltransferasa de *Escherichia coli* (Wolter y col., 1992), produjo variaciones en el contenido de PG saturado de las plantas transgénicas y, por lo tanto, en su sensibilidad al frío. Todos estos resultados indican que el PG es uno de los factores determinantes de la sensibilidad al frío en plantas. Sin embargo, varios estudios en el mutante *fab1* de *Arabidopsis thaliana*, que aunque presenta alto contenido de PG saturado no exhibe daño por frío cuando se crece a bajas temperaturas, sugieren que el nivel de PG saturado no es el único determinante de la capacidad para tolerar las bajas temperaturas sino que debe haber también otros factores implicados (Wu y Browse, 1995).

PC y PE son los principales fosfolípidos presentes en las membranas extraplastidiales, y su síntesis depende, en gran parte, de la ruta eucariota. Además, la disponibilidad de los precursores de los grupos de cabeza polar característicos de estos fosfolípidos es crucial para el control de la síntesis de los mismos. La cantidad de PC aumenta durante el crecimiento a bajas temperaturas y se ha sugerido que este incremento debe ser crítico para el desarrollo de la tolerancia al frío (Yoshida, 1984). Además, en plantas, la expresión de dos genes implicados en la biosíntesis de PC se induce durante la aclimatación al frío. La expresión de la enzima fosfoetanolamina metiltransferasa se indujo en trigo y espinaca por frío y la actividad de la enzima CDP-colina sintasa se incrementó fuertemente durante la exposición de *Arabidopsis thaliana* a bajas temperaturas. Ambos estudios sugieren que la regulación de la relación PC/PE en las membranas extracloroplásticas debe estar relacionada de forma causal con la adaptación al crecimiento a bajas temperaturas.

Los ácidos grasos poliinsaturados son los ácidos grasos mayoritarios en plantas y durante mucho tiempo se ha especulado que son cruciales para la fotosíntesis y el crecimiento de la planta, en particular a bajas temperaturas. El análisis bioquímico y fisiológico de los mutantes *fad5* y *fad6* de *Arabidopsis thaliana* (Kunst y col., 1989; Hugly y Somerville, 1992), muestra que los ácidos grasos

poliinsaturados de las membranas cloroplásticas influyen en el tamaño del cloroplasto y en la formación de sus membranas a bajas temperaturas (5 °C). Por otro lado, el mutante *fad2* de *Arabidopsis thaliana*, que tiene niveles reducidos de ácidos grasos poliinsaturados en los lípidos de membrana extracloroplásticos, presenta un ritmo de crecimiento reducido a bajas temperaturas y, eventualmente, las plantas mutantes se marchitan y mueren tras un tiempo prolongado de exposición a bajas temperaturas (Miquel y col., 1993). Por lo tanto, todas estas observaciones sugieren que los ácidos grasos poliinsaturados son esenciales para el mantenimiento de la función celular y para la supervivencia de la planta a bajas temperaturas y que, bajo estrés por frío, los ácidos grasos poliinsaturados que forman parte de los lípidos cloroplásticos contribuyen significativamente a regular la formación de las membranas plastidiales más que al mantenimiento de su estabilidad cuando maduran (Iba, 2002). Para examinar la capacidad de las plantas para sobrevivir sin ácidos grasos poliinsaturados en sus lípidos de membrana, se generó un doble mutante *fad2/fad6* de *Arabidopsis thaliana* (McConn y Browse, 1998), que es deficiente en la desaturación de ácidos grasos monoinsaturados tanto en el cloroplasto como en el retículo endoplasmático. Los experimentos demostraron que la reducción de los niveles de ácidos grasos poliinsaturados resultaba en una pérdida de la capacidad de crecimiento fotoautótrofo en condiciones normales de crecimiento. Aunque existen otras posibilidades, la explicación más simple a este hecho es que el desarrollo normal de las membranas de la envuelta cloroplástica y de los tilacoides se ha interrumpido de forma suficiente, de manera que estos orgánulos son incapaces de llevar a cabo la fijación de carbono necesaria para mantener viva la planta (Wallis y Browse, 2002). El hecho de que los niveles de ácidos grasos 16:3^{Δ7,10,13} y 18:3^{Δ9,12,15} aumenten durante el crecimiento a bajas temperaturas, apoya la hipótesis de que los ácidos grasos trienoicos desempeñan un papel fundamental en la tolerancia al frío. Sin embargo, el análisis del triple mutante *fad3/fad7/fad8* de *Arabidopsis thaliana* (McConn y Browse, 1996) sugiere que el descenso de los niveles de ácidos grasos

trienoicos tiene efectos mínimos en la fotosíntesis y en el crecimiento de la planta a temperaturas normales y bajas. Además, los estudios realizados con plantas transgénicas de tabaco en las que se han sobreexpresado los genes *FAD3* y *FAD7* (Kodama y col., 1994; Hamada y col., 1998), sugieren que el efecto de los ácidos grasos trienoicos en el aumento de la tolerancia a las bajas temperaturas es relativamente leve, y que debe estar limitado a especies vegetales específicas. Por el contrario, tanto plantas transgénicas de tabaco que poseen actividad desaturasa reducida por co-supresión del gen *FAD7* como el mutante *fad7/fad8* de *Arabidopsis thaliana* muestran un aumento fuerte del crecimiento y una actividad fotosintética elevada a temperaturas altas (Murakami y col., 2000), indicando que la disminución de la cantidad de ácidos grasos trienoicos parece tener un efecto estabilizante en la membranas a temperaturas altas y, por lo tanto, confiere a las plantas tolerancia a las altas temperaturas. Posteriormente, Alfonso y col. (2001) observaron que el mutante STR7 de soja mostraba una tolerancia inusual a las altas temperaturas como consecuencia de que sus membranas fotosintéticas presentaban un alto contenido de ácido graso 16:0 y niveles reducidos de los ácidos grasos 18:3 y 16:1, confirmando así la hipótesis anterior.

El motivo general para el incremento de la actividad desaturasa en organismos sometidos a bajas temperaturas está relacionado probablemente con la necesidad de mantener la fluidez de la membrana, que se ve directamente afectada por la extensión de la insaturación de los componentes lípidicos que forman las membranas biológicas. No obstante, a día de hoy, el mecanismo molecular mediante el cual la temperatura controla la actividad de las desaturasas todavía es desconocido (Murphy y Piffanelli, 1998). Diversos estudios indican que las cianobacterias responden al descenso de la temperatura de crecimiento introduciendo insaturaciones en los ácidos grasos constituyentes de los lípidos de membrana. En este caso, la regulación de la expresión de los genes de las desaturasas de ácidos grasos (*desA*, *desB* y *desC*) en respuesta a este estímulo medioambiental se ejerce a nivel transcripcional

a través del aumento de la cantidad y la estabilidad de los RNA mensajeros correspondientes (Los y col., 1993; Sakamoto y Bryant, 1997; Sakamoto y Murata, 2002). Sin embargo, la mayoría de las investigaciones llevadas a cabo en plantas sugieren que la regulación enzimática de las desaturasas no se controla únicamente a nivel transcripcional sino que hay implicados otros mecanismos reguladores que actúan a niveles diferentes de la expresión génica. En diversas especies de plantas superiores, la temperatura parece controlar la expresión de los genes *FAD7* y *FAD8* a nivel transcripcional modulando la cantidad de mRNA. El hecho de que la disminución de la cantidad de ácidos grasos trienoicos fuera menos pronunciada en el mutante *fad7* de *Arabidopsis thaliana* cuando se crecía a bajas temperaturas, permitió identificar *FAD8* como una ω 3 desaturasa inducible por frío (McConn y col., 1994). Esta observación fue consistente con los datos obtenidos por Gibson y col. (1994), que mostraban que los niveles del mRNA de *FAD8* eran considerablemente superiores en plantas de *Arabidopsis thaliana* crecidas a bajas temperaturas que en plantas crecidas a temperaturas superiores a los 20 °C. Por otro lado, en maíz, se ha demostrado la existencia de un patrón de expresión diferencial de los genes *ZmFAD7* y *ZmFAD8* en respuesta a la temperatura (Berberich y col., 1998). Así, a 25 °C únicamente se detecta mRNA de *FAD7*, a 15 °C se detectan ambos transcritos y a 5 °C sólo se detecta mRNA de *FAD8*. Sin embargo, todavía no está claro si la expresión de los genes *ZmFAD7* y *ZmFAD8* se regula a nivel transcripcional, a través del aumento de la síntesis del mRNA, o a nivel post-transcripcional, mediante el aumento de la estabilidad de los transcritos correspondientes. En este sentido, existen ciertas evidencias que sugieren que la estabilidad de estos dos mRNA es diferente a cada temperatura (Berberich y col., 1998). En el caso de la ω 3 desaturasa reticular, se han descrito dos mecanismos diferentes que modulan la expresión del gen *FAD3* en respuesta al frío. Así, en raíces de arroz, los niveles de transcrito *OsFAD3* decaían considerablemente durante el crecimiento en frío, confirmando la regulación transcripcional de este gen en respuesta a la temperatura (Kodama y col.,

1997). Sin embargo, en raíces de trigo, el incremento de ácidos grasos trienoicos que se produce al descender la temperatura se consigue directamente incrementando la cantidad de proteína FAD3 (Horiguchi y col., 2000). Adicionalmente, la estabilidad de la proteína FAD3 también podría ser modulada por la temperatura; sin embargo, la determinación de su *turnover* a diferentes temperaturas no dio ningún resultado fructífero (Horiguchi y col., 2000). Además, los autores de este trabajo observaron que los niveles de mRNA *FAD3* permanecían constantes independientemente de la temperatura de crecimiento en raíces de *Arabidopsis thaliana*, sugiriendo que en plantas *Arabidopsis* y trigo, probablemente exista un proceso regulador común dependiente de la temperatura que module la eficiencia de la traducción de la proteína FAD3 (Horiguchi y col., 2000). Finalmente, se ha demostrado que las bajas temperaturas aumentan los niveles de los mRNA *GmFAD3A*, *GmFAD3B* y *GmFAD3C* durante el llenado de la vaina de soja, y que la expresión elevada de los genes que codifican las distintas isoformas de la proteína FAD3 está asociada positivamente con el aumento del contenido de ácido linolénico en las semillas de esta planta de cultivo (Byfield y Upchurch, 2007). Por último, en diversas especies vegetales, se ha comprobado que el aumento de la composición de ácidos grasos di-insaturados bajo estrés por frío no se debe a una regulación transcripcional de los genes que codifican $\omega 6$ desaturasas (Okuley y col., 1994; Heppard y col., 1996; De Palma y col., 2008). Por el contrario, en algodón, la expresión de los genes *FAD2-3* y *FAD2-4* se induce en respuesta a las bajas temperaturas, siendo los niveles de mRNA de *FAD2-4* significativamente más altos que los de *FAD2-3* (Kargiotidou y col., 2008).

Estudios recientes en plantas de *Arabidopsis thaliana* apuntan la existencia de un mecanismo de regulación post-traducciona en el que la región C-terminal de la desaturasa FAD8 actuaría de manera autorreguladora desestabilizando la proteína a altas temperaturas, provocando así una reducción de la cantidad de esta enzima en ausencia de un descenso simultáneo de los niveles de mRNA *FAD8* (Matsuda y col.,

2005). En esta línea, se ha comprobado que las altas temperaturas también disminuyen la estabilidad de la proteína FAD2-1 en semillas de soja (Tang y col., 2005). Asimismo, en semillas de girasol, se ha demostrado que la temperatura regula la actividad de FAD2 por dos mecanismos diferentes (García-Díaz y col., 2002): un efecto directo lento de la temperatura, debido principalmente a la baja estabilidad térmica de la isoforma específica de semillas en desarrollo FAD2-1 (Martínez-Rivas y col., 2003; Sánchez-García y col., 2004), y un efecto indirecto rápido por el cual la temperatura afecta a la disponibilidad de oxígeno, que es sustrato del enzima (Rolletschek y col., 2007).

Aunque se ha demostrado claramente que tanto la composición de ácidos grasos de los lípidos de membrana como la expresión de los genes de las desaturasas se modifican en respuesta a variaciones de la temperatura ambiental, la forma en que las células perciben estos cambios de temperatura y los mecanismos implicados en la transducción de esta señal son prácticamente desconocidos. Diversos estudios sugieren que, en cianobacterias, el estado físico de la membrana celular podría desempeñar un papel fundamental en la percepción del frío (Murata y Los, 1997; Los y Murata, 2000). Así, Vigh y col. (1993) demostraron que la expresión del gen *desA* de *Synechocystis* PCC 6803, un gen inducible por frío que codifica una Δ^{12} desaturasa, aumentaba con la rigidez que la membrana plasmática presentaba como resultado de la hidrogenación catalítica de los lípidos de membrana. Además, dos proteínas histidina quininas, denominadas Hik33 y Hik19, y un regulador de respuesta, denominado Rer, se han identificado como componentes principales de la ruta de percepción y transducción de la señal producida por frío en estos mismos organismos (Suzuki y col., 2000). En el año 2000, Suzuki y col. propusieron un esquema hipotético para la ruta de transducción de la señal desencadenada por bajas temperaturas (figura 1.9).

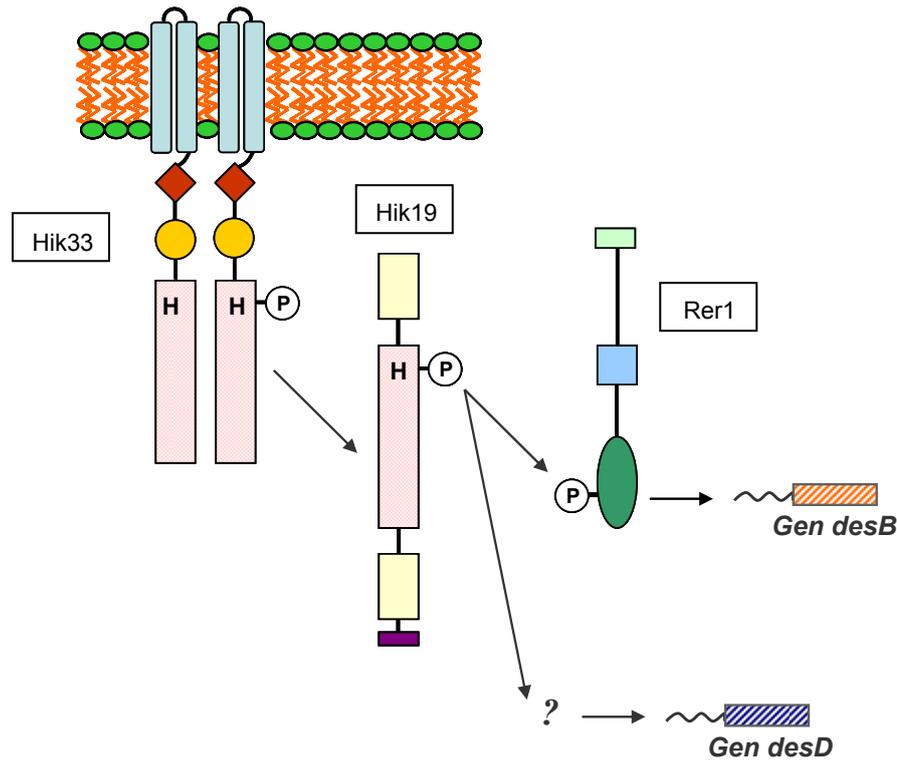


Figura 1.9. Esquema hipotético de la ruta de transducción de señal desencadenada por bajas temperaturas en *Synechocystis sp. PCC 6803*.

Así, una disminución de la fluidez de la membrana celular originada por el descenso de la temperatura podría alterar la estructura de la proteína Hik33, provocando su activación vía dimerización (Murata y Los, 2006). En estas mismas condiciones, el residuo de histidina del dominio histidina quinasa de Hik33 podría ser fosforilado. Tras la activación de Hik33, el grupo fosfato se transferiría a la proteína Hik19, cuya activación desencadenaría la fosforilación del regulador de respuesta Rer, que a su vez regula el gen *desB*. Aunque la inactivación de los genes *hik33* y *hik19* reduce la acumulación de los transcritos *desB* y *desD*, la inactivación del gen *rer* origina un descenso del nivel de mRNA *desB*, que no se observa en el caso de los mRNA *desA* y *desD*. Por lo tanto, Hik33 y Hik19 podrían estar también implicados en la regulación de la expresión de otros genes pero, a día de hoy, todavía no se han detectado los reguladores transcripcionales correspondientes.

A pesar de que en plantas el sensor de frío todavía no ha sido identificado, ciertas evidencias sugieren que las bajas temperaturas pueden ser percibidas por las

células vegetales a través de cambios en la fluidez de la membrana plasmática. Asimismo, el estrés por frío desencadena una entrada transitoria de calcio desde el espacio extracelular al citósol que es necesaria para la expresión de genes inducibles por baja temperatura y para el desarrollo de la tolerancia al frío (Monroy y Dhindsa, 1995; Viswanathan y col., 2006). Sin embargo, la naturaleza y la secuencia temporal de los eventos que provocan esta entrada de calcio a la célula son, a día de hoy, ampliamente desconocidos. Datos obtenidos en suspensiones celulares de alfalfa apuntan que la reorganización del citoesqueleto es un componente integral de la cascada de señalización desencadenada por frío, sirviendo como conexión entre el aumento de la rigidez de la membrana y la entrada de calcio al citosol (Örvar y col., 2000). Además, diversos estudios han demostrado que el proceso de aclimatación al frío está mediado por una compleja red de vías de señalización. Hasta el momento, el descubrimiento de la ruta CBF/DREB ha permitido progresar en la caracterización de la transducción de la señal desencadenada por frío (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005; Murata y Los, 2006). El análisis del control transcripcional de dos genes inducibles por frío (*cor15a* y *rd29A*) en *Arabidopsis thaliana* ha permitido identificar elementos de respuesta a frío (CRT/DRE) en los promotores de estos genes (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000). Los factores de transcripción tipo AP2, DREB1 y CBF, interaccionan con los elementos CRT/DRE y activan la transcripción de numerosos genes que se inducen en respuesta al frío. Los factores de transcripción CBF no sólo regulan la expresión de genes inducibles por frío sino también de genes cuya expresión se induce por otro tipo de señales. Por el contrario, algunos genes inducibles por frío no parecen ser controlados por la ruta CBF. Por lo tanto, deben existir otros sistemas reguladores que induzcan la expresión de estos genes (Fowler y Thomashow, 2002). A su vez, los genes CBF/DREB1 se inducen en respuesta a las bajas temperaturas. Esta inducción es transitoria y precede la inducción de genes que contienen en sus promotores elementos *cis* tipo CRT/DRE (Thomashow, 1999). En este sentido, se ha identificado una proteína bHLH tipo MYC,

denominada ICE1, que se localiza en el núcleo y que actúa como regulador positivo del gen *CBF3*, desempeñando un papel clave en la aclimatación a las bajas temperaturas (Gilmour y col., 1998; Chinnusamy y col., 2003). ICE1 se expresa de forma constitutiva en todos los tejidos y se activa ligeramente por frío. Por ello, se ha especulado que la activación de los genes CBF por frío podría requerir una modificación de la proteína ICE1 o de un cofactor transcripcional (Chinnusamy y col., 2003).

1.4.3.3. Hormonas

Diversas hormonas vegetales tales como las auxinas, las citoquininas o el ácido abscísico están implicadas en la regulación de las desaturasas. En concreto, el ácido abscísico induce la expresión de *FAB2* en semillas de colza (Slocombe y col., 1994) y de olivo (Haralampidis y col., 1998), de *FAD2* en semillas de sésamo (Kim y col., 2006) y de *FAD3* en semillas de colza (Zou y col., 1995). Sin embargo, la aplicación exógena de ácido abscísico no modificaba los niveles generales de mRNA *FAD7* y *FAD8* en maíz (Berberich y col., 1998). Por otro lado, las auxinas parecen estar implicadas en el aumento de mRNA *FAD3* en hipocotilos de *Vigna radiata* (Yamamoto, 1994).

La regulación hormonal parece estar íntimamente asociada a las distintas fases del desarrollo de la planta. Así, se ha descrito que, en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, la expresión del gen *FAD3* se regula de forma compleja de acuerdo al estado de desarrollo y en respuesta a las hormonas vegetales. Una interacción sinérgica entre las rutas de señalización de auxinas y citoquininas inducía específicamente la expresión del gen *FAD3* en raíces a través de la activación de su promotor. Sin embargo, la expresión de este gen sólo se inducía si las hormonas se aplicaban durante la fase vegetativa del crecimiento pero no si se aplicaban durante la germinación o la fase reproductiva del crecimiento. Además, esta inducción mediada por auxinas y citoquininas se anulaba cuando el ácido abscísico estaba

presente en el medio, sugiriendo que esta hormona ejerce un efecto antagónico para suprimir la expresión de *FAD3* específica de tejido (Matsuda y col., 2001).

1.4.3.4. Herida

Diversos estudios indican que la expresión del gen *FAD7* se induce por herida en varias especies de plantas y distintos órganos vegetales. Así, en hojas de tabaco, la herida produce una inducción transitoria de la expresión del gen *FAD7*, que va acompañada de un aumento de los niveles de ácidos grasos trienoicos en los principales lípidos polares (Hamada y col., 1996). Asimismo, en *Arabidopsis thaliana*, se produce un incremento significativo de los niveles de mRNA *FAD7* en diferentes tejidos vegetales en respuesta a la herida (Nishiuchi y col., 1997). Esta inducción de la linoleato desaturasa cloroplástica también se ha descrito en tubérculos de patata (Todoroki y col., 1998) y en pimiento (Kwon y col., 2000). Los datos obtenidos en plantas transgénicas de tabaco indicaron que la activación del promotor del gen *FAD7* era más sustancial en raíces y tallos que en hojas, sugiriendo que el patrón de expresión espacial del gen *FAD7* se modifica en respuesta al daño local (Nishiuchi y col., 1997). Además, experimentos de suplementación con ácido jasmónico e inhibidores de su ruta biosintética apuntaron también que la inducción del gen *FAD7* en respuesta a la herida tenía lugar a través de mecanismos de señalización dependientes e independientes de jasmonato, en tejidos subterráneos y aéreos de la planta, respectivamente (Nishiuchi y col., 1997). Sin embargo, estudios recientes en *Arabidopsis thaliana*, contradicen estos resultados y señalan que la expresión del gen *FAD7* en raíces y hojas parece estar regulada por mecanismos de señalización dependientes e independientes de ácido jásmonico (Matsuda y col., 2009). La inducción del gen *FAD7* probablemente sea necesaria para reponer el reservorio de ácido linolénico en los lípidos de las membranas cloroplásticas, asegurando así la acumulación de este ácido graso después del consumo inicial de ácido 18:3^{Δ9,12,15} esterificado en los lípidos de hojas dañadas (Farmer, 1994; Matsuda y col., 2009).

Por otro lado, existen resultados contradictorios acerca de cómo se modifica la expresión del gen *FAD3* en respuesta a la herida. Mientras que los niveles de mRNA *FAD3* permanecían constantes en hojas de tabaco dañadas (Hamada y col., 1996), la herida producía una inducción de dicho gen en hipocotilos de *Vigna radiata* (Yamamoto y col., 1992). Esta contradicción podría ser consecuencia de las diferencias en el estadio del desarrollo vegetal de la planta en la que se ha realizado el estudio (Nishiuchi y Iba, 1998).

1.5. EL ÁCIDO GRASO LINOLÉNICO COMO PRECURSOR DE LA SÍNTESIS DE JASMONATOS

El ácido linolénico liberado de las membranas cloroplásticas por la acción de fosfolipasas cloroplásticas actúa como precursor de numerosos componentes oxigenados llamados colectivamente jasmonatos, entre los que destacan el ácido jasmónico (JA) y su éster metílico metiljasmonato (MeJA), OPDA y dn-OPDA. Los jasmonatos son fitohormonas lipídicas esenciales que actúan como moléculas señalizadoras capaces de regular la respuesta de plantas a numerosas situaciones de estrés y participar en procesos del desarrollo vegetal. Entre las situaciones de estrés que regulan están las heridas, la exposición a ozono, la sequía y el ataque por patógenos y plagas. Entre los procesos de desarrollo en los que participan los jasmonatos están el crecimiento de la raíz, la tuberización, la maduración de los frutos, la senescencia y el desarrollo del polen (Lorenzo y Solano, 2005). La ruta de biosíntesis de los jasmonatos (figura 1.10), también denominada ruta de los octadecanoides, ha sido estudiada de forma detallada y se dispone de gran cantidad de información acerca del tipo de enzimas implicados en cada paso así como de la localización subcelular de los mismos (Turner y col., 2002; Schaller y Stintzi, 2009).

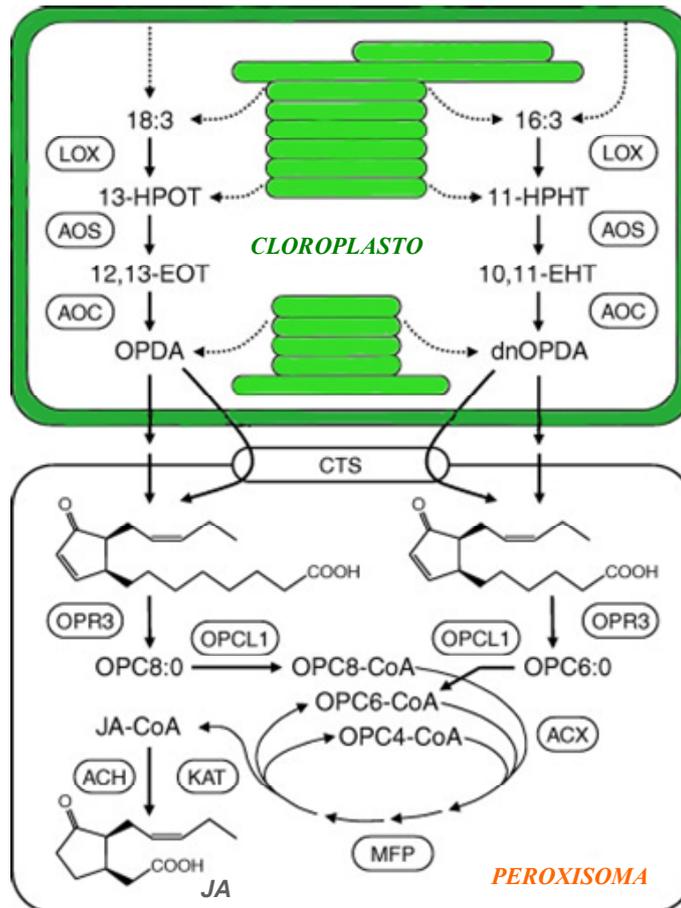


Figura 1.10. Ruta de biosíntesis de jasmonatos. Adaptada Schaller, A. y Stintzi, A., 2009.

La síntesis de ácido jasmónico (JA) comienza en el cloroplasto con la oxigenación del ácido linolénico ($18:3^{\Delta 9,12,15}$) por una lipoxigenasa (13-LOX) dando lugar a la formación del correspondiente hidroperóxido. Existen evidencias de que tanto los ácidos grasos libres como los ácidos grasos esterificados a lípidos neutros pueden ser sustratos de la lipoxigenasa (Fuller y col., 2001; Feussner y Wasternack, 2002). En esta ruta metabólica, el hidroperóxido sintetizado es convertido por la acción consecutiva de dos enzimas, óxido de aleno sintasa (AOS) y óxido de aleno ciclasa (AOC), en un precursor cíclico biológicamente activo denominado OPDA (Vick y Zimmermann, 1979). En las “plantas 16:3” existe una ruta paralela, denominada ruta de los hexadecanoides, en la que el ácido graso $16:3^{\Delta 7,10,13}$ es convertido en dn-OPDA por acción secuencial de las enzimas LOX, AOS y AOC (Weber y col., 1997). Finalmente, la conversión de OPDA (o dn-OPDA) en ácido jasmónico, que incluye

una reacción de reducción de un doble enlace seguida de tres ciclos de β -oxidación, tiene lugar en los peroxisomas (Vick y Zimmerman, 1984; Schaller y col., 2005).

A pesar de la importancia de los jasmonatos como moléculas señalizadoras, el conocimiento actual de los mecanismos moleculares de transmisión de señales mediadas por estos compuestos es muy limitado. Los componentes de esta ruta de señalización descritos hasta el momento se han identificado gracias a escrutinios genéticos buscando plantas que, o bien mostrasen una respuesta constitutiva o aumentada a ácido jasmónico (JA), o bien exhibieran una sensibilidad reducida a JA, a derivados como metiljasmonato (MeJA) ó a análogos como la coronatina (Turner y col., 2002). Uno de los mutantes insensibles a ácido jasmónico identificados en *Arabidopsis thaliana* es el mutante *coi1* (Feys y col., 1994). La identificación de COI1, hace una década, como una proteína de tipo F-box componente del complejo SCF sugirió la participación de la degradación de proteínas por el proteosoma como mecanismo central de señalización de JA (Xie y col., 1998). Además, mutantes deficientes en otros componentes del complejo SCF también mostraban deficiencias en la señalización de JA (Devoto y col., 2002; Xu y col., 2002; Feng y col., 2003). Aunque se describió inicialmente en *Arabidopsis thaliana*, la función COI1 está conservada en otras especies de plantas como demuestra la identificación de homólogos en tomate, tabaco y soja (Wang y col., 2005; Paschold y col., 2007; Li y col., 2004).

Además de *coi1* se han descrito otros mutantes insensibles a JA, como *jai1/jin1*, *jar1* y *jai3*, que han permitido identificar molecularmente nuevos componentes de esta ruta de señalización. Así, el gen *JAI1/JIN1* codifica la proteína AtMYC2, que es un factor de transcripción de tipo bHLHzip localizado en el núcleo celular (Lorenzo y col., 2004). El análisis transcriptómico del mutante *jin1* ha permitido comprobar que AtMYC2 es un regulador positivo de la expresión de un gran número de genes de respuesta a herida, y al mismo tiempo, reprime la expresión de genes de respuesta al ataque por patógenos. Este efecto es antagónico al de ERF1 (Factor de

respuesta a etileno¹), que regula positivamente la expresión de genes de respuesta al ataque por patógenos y tiene un efecto negativo en la expresión de genes de respuesta a herida (Lorenzo y col., 2003; Lorenzo y col., 2004). Esto evidencia la existencia de dos ramas en la ruta de señalización de JA reguladas diferencialmente por AtMYC2 y ERF1, y que explican la interacción molecular entre las rutas de etileno y ácido jasmónico en la activación de defensas. Por lo tanto, la alternativa de la planta para activar el tipo de respuesta adecuada a dos tipos distintos de estrés (patógenos y herida) depende sustancialmente de la relación que se establece entre estos dos reguladores transcripcionales.

La existencia de una familia de represores que se unen al complejo SCF^{COI1} con la activación transcripcional de las respuestas a JA ha sido demostrada gracias a la identificación de la familia de proteína JAZ, que representan el nexo de unión, a nivel molecular, entre los dos pasos descritos anteriormente en la ruta de señalización de JA. Las proteínas JAZ, dianas directas de COI1, son degradadas por el proteosoma 26S en respuesta a la hormona. Además, estas proteínas también interaccionan directamente con MYC2 reprimiendo su actividad y, por lo tanto, funcionan como represores de la ruta de JA (Chini y col., 2007).

Actualmente, los detalles moleculares de la percepción de ácido jasmónico son prácticamente desconocidos. El papel crítico de COI1 en todas las respuestas de ácido jasmónico y la similitud entre las rutas de ácido jasmónico y auxinas sugiere que COI1 podría ser el receptor de JA (Chini y col., 2007; Santner y Estelle, 2007; Katsir y col., 2008). La ruta biosintética de JA finaliza con la producción de JA y el éster metílico, metiljasmonato (MeJA), moléculas que han sido consideradas desde hace mucho tiempo como moléculas bioactivas (Feussner y Wasternack, 2002; Wasternack, 2007). La caracterización del mutante *jar1* permitió identificar a JAR1 como una enzima que cataliza la conjugación de ácido jasmónico a diferentes aminoácidos, preferentemente isoleucina (Staswick y col., 2002; Staswick y Tiryaki, 2004). Aunque el mutante *jar1* era deficiente en algunas respuestas de JA, los

defectos se complementan por aplicación externa de JA-Ile, lo que indica la relevancia biológica de este derivado de ácido jasmónico y sugiere que el JA no es activo *per se* (Wasternack, 2007; Suza y Staswick, 2008). Estudios recientes han demostrado que JA-Ile induce directamente la interacción entre COI1 y múltiples proteínas JAZ a concentraciones fisiológicas, mientras que ninguno de los precursores o intermedios probados, como OPDA, MeJA ó JA, pueden promover dicha interacción (Thines y col., 2007; Katsir y col., 2008; Melotto y col., 2008). Por lo tanto, JA-Ile posee todas las características esenciales de molécula bioactiva. Aunque JA-Ile ha sido el primer derivado de JA descrito como molécula bioactiva, probablemente no sea la única. Debido a que otras oxilipinas, además de JA-Ile, son responsables de las respuestas dependientes de JA se podría esperar la existencia de otras moléculas adicionales con actividad biológica. Por ejemplo, el mutante *opr3* de *Arabidopsis thaliana*, incapaz de convertir el OPDA en JA, es deficiente en varias respuestas reguladas por JA como la inhibición del crecimiento y la fertilidad, pero no en las respuestas de defensa (Stintzi y col., 2001). La cuantificación simultánea de los miembros de la familia de los jasmonatos en hojas dañadas de *Arabidopsis* y patata sugirió que las distintas especies de plantas tenían niveles relativos distintos de JA, OPDA y dn-OPDA (Weber y col., 1997). Por lo tanto, el control del metabolismo celular, de los procesos de desarrollo y de las respuestas de defensa podría ejercerse a través de cambios en los niveles de estas moléculas biológicamente activas (Stintzi y col., 2001). Así, se ha postulado que JA y OPDA pueden regular un grupo específico de genes o actuar conjuntamente para controlar la expresión de genes comunes (Stintzi y col., 2001). En este sentido, OPDA además de inducir la expresión de genes de respuesta a JA, modula un grupo específico de genes (ORGs) vía una ruta de señalización independiente de COI1, lo que confirma la capacidad de esta hormona para desencadenar en las plantas repuestas distintas a las de JA (Taki y col., 2005; Ribot y col., 2008). Sin embargo, aunque se ha demostrado que dn-OPDA tiene fuerte actividad biológica y que probablemente

participe en la regulación de la respuesta a la herida (Weber y col., 1997), hasta la fecha se desconoce qué genes regula y qué función biológica desempeña a nivel celular.

Por otro lado, múltiples evidencias sostienen fuertemente que COI1, o el complejo COI1-JAZ, es el receptor de JA-Ile. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha descrito la unión directa entre COI1 y la hormona. En este sentido, la resolución estructural de complejo COI1-hormona-JAZ sería crucial para revelar los detalles moleculares de la percepción de la hormona (Chini y col., 2009).

La activación de las respuestas a JA está regulada por la existencia de un bucle de retroalimentación negativa que incluye a MYC2 y las proteínas JAZ y proporciona el mecanismo de acción hormonal en la señalización de JA. Así, en estado basal, los factores de transcripción que estimulan la expresión de genes de respuesta a JA (MYC2 y, probablemente, otros factores de transcripción) son reprimidos por los miembros de la familia de proteínas JAZ. El incremento de los niveles de JA-Ile producido por estrés estimula la interacción física de las proteínas JAZ con COI1. Esta interacción inducida por la hormona desencadena la degradación de las proteínas JAZ vía ruta del proteosoma 26S, liberándose así los factores de transcripción correspondientes. La activación de MYC2 y otros factores de transcripción induce la expresión de genes de respuesta a JA, incluyendo la expresión de genes JAZ. La síntesis de novo de proteínas JAZ restablece la represión de MYC2 por formación del complejo JAZ-MYC2 y desconecta la respuesta a JA (Chini y col., 2007; Chini y col., 2009).



Objetivos

2. **OBJETIVOS**

En esta tesis doctoral se han abordado los siguientes objetivos:

1. Localización subcelular de la proteína *GmFAD7*.
2. Caracterización bioquímica y molecular de la familia *GmFAD7* en plantas de soja.
 - 2.1 Identificación de un nuevo gen *GmFAD7* en soja.
 - 2.2 Regulación de la expresión de los genes de las ω 3 desaturasas de ácidos grasos en plantas de soja.
 - 2.3 Regulación de la expresión de los genes de las ω 3 desaturasas de ácidos grasos bajo condiciones de estrés.
3. Análisis transcriptómico de dos mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes en la insaturación de ácidos grasos, mutante *fad5* y triple mutante *fad3/fad7/fad8*.



Materiales y métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIÓLOGICO Y CONDICIONES DE CULTIVO

3.1.1. Cultivo de plantas de soja en medio hidropónico

En primer lugar, las semillas comerciales de soja (*Glycine max* cv. Volania) se germinaron en una bandeja de plástico que contenía una mezcla humedecida de perlita/vermiculita (50%) actuando como lecho inerte y poroso. Las semillas se sometieron al proceso de vernalización manteniéndolas en oscuridad en la cámara de crecimiento durante tres días bajo condiciones controladas de temperatura y humedad para sincronizar su germinación. Tras este periodo de tiempo, se retiró el papel de aluminio que impedía la iluminación de la bandeja y, al cabo de una semana aproximadamente, aparecieron pequeñas plántulas de soja (figura 3.1-A) que se llevaron a cultivo hidropónico en un recipiente de 20 L con solución nutritiva Hoagland y borboteo de aire (figura 3.1-B).

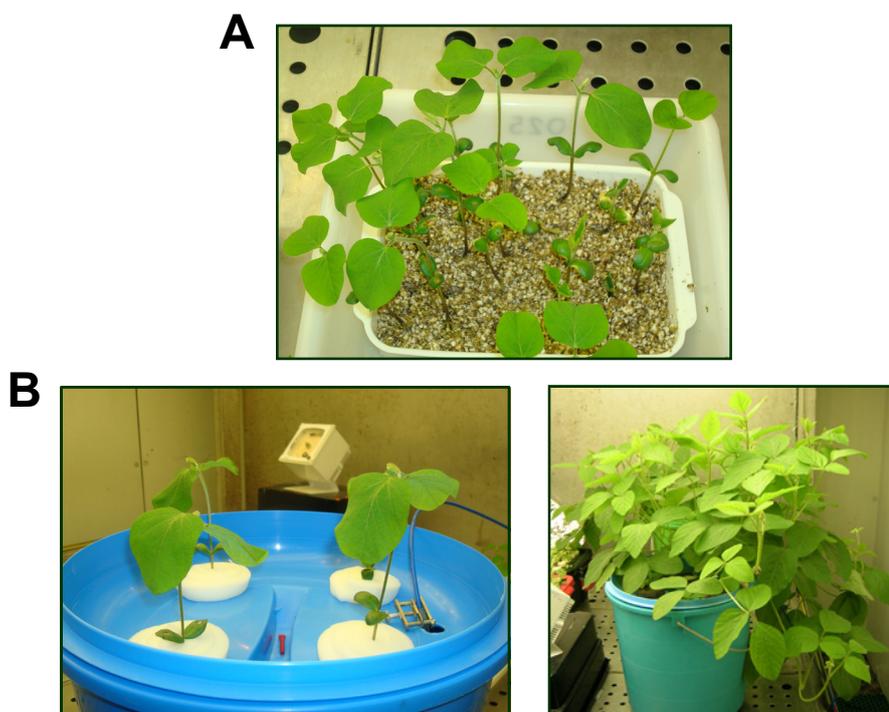


Figura 3.1. (A) Germinación de semillas de soja en perlita/vermiculita. (B) Crecimiento de plantas de soja en medio hidropónico.

La composición de la solución nutritiva utilizada se detalla en la tabla 3.1. Las plantas de soja (*Glycine max* cv. Volania) se crecieron en una cámara bioclimática bajo condiciones controladas de luz ($300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), temperatura (24°C) y humedad (70%) y con un fotoperíodo 16h/8h (luz/oscuridad).

Macronutrientes	Concentración (mg L^{-1})
KNO_3	250
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	240
KH_2PO_4	130
NaCl	29
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	780
Secuestrene (6% Fe)	42

Micronutrientes	Concentración (mg L^{-1})
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,905
H_3BO_3	1,43
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,015
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,05
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,115

Tabla 3.1. Composición de la solución nutritiva utilizada para el cultivo de plantas de soja.

3.1.2. Cultivo de suspensiones celulares de soja (*Glycine max*)

La línea celular fotoautótrofa silvestre de soja (*Glycine max* (L.) Merr var Corsoy) utilizada en esta tesis doctoral fue donada gentilmente por el profesor Jack M. Widholm del Departamento de Agronomía de la Universidad de Illinois (Urbana, USA). Esta línea celular fue establecida por Horn y col. (1983) y, posteriormente, caracterizada desde el punto de vista fisiológico por Rogers y col. (1987). Desde este punto de vista, las suspensiones celulares se comportan de forma similar a células de mesófilo de hojas jóvenes de soja.

Para el cultivo de esta línea celular se han utilizado dos sistemas diferentes: cultivo en medio líquido y cultivo en medio sólido.

3.1.2.1. Cultivo en medio líquido

El cultivo en medio líquido es un sistema rápido y eficaz para el crecimiento de células vegetales en suspensión. El medio de cultivo basal usado fue un medio MS (Mursahige y Skoog) modificado descrito por Rogers y col. (1987), en el que se han cambiado algunos micronutrientes y determinadas hormonas para permitir el crecimiento celular indiferenciado (medio KN⁰). La composición de la solución nutritiva se indica en la tabla 3.2. Además, el pH se ajustó a 5,8 con KOH diluido y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Opcionalmente, puede añadirse un 1% de sacarosa para facilitar el crecimiento celular (medio KN¹). Este medio de cultivo es utilizado para el mantenimiento de la colección celular, mientras que todos los experimentos se realizaron con células crecidas en condiciones 100 % fotosintéticas.

Los cultivos celulares se crecieron en un matraz erlenmeyer con un volumen de 50 ml de medio fresco en un incubador orbital (New Brunswick Scientific Co., Modelo G-25) a 22 °C de temperatura, 70 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica y una agitación de 130 r.p.m. En estas condiciones, las suspensiones celulares de soja mantuvieron un color verde intenso, característico del buen estado de los cultivos (figura 3.2-A).

La manipulación de los cultivos celulares se realizó en una campana de flujo laminar (TELSTAR, AH-100) para mantener condiciones de esterilidad estrictas durante todo el proceso y evitar así cualquier tipo de contaminación indeseada.

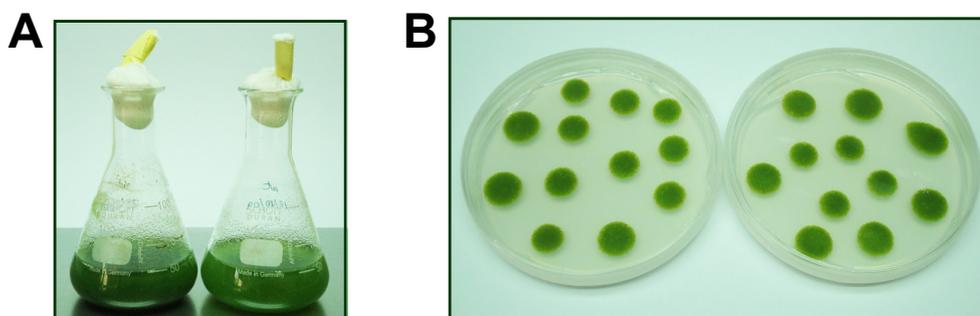


Figura 3.2. Crecimiento de suspensiones celulares de soja: (A) en medio líquido y (B) en medio sólido.

Composición	Nutrientes	Concentración (g L⁻¹)
<i>Disolución de macronutrientes (10%)</i>	NH ₄ NO ₃	16,5
	KNO ₃	19
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	4,40
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	3,7
	KH ₂ PO ₄	1,7
<i>Disolución de micronutrientes (1%)</i>	MnSO ₄ ·4H ₂ O	2,23
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,86
	H ₃ BO ₃	0,62
	KI	0,083
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,025
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,0025
<i>Disolución de hierro (1%)</i>	Co(NO ₃) ₂	0,003
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	3,72
<i>Vitaminas y hormonas (0,1%)</i>	FeSO ₄ ·7H ₂ O	2,78
	Tiamina	0,1
	Kinetina	0,2 g L ⁻¹ en HCl 0,5N
	ANA	1 g L ⁻¹ en etanol

Tabla 3.2. Composición de la solución nutritiva utilizada para el cultivo de suspensiones celulares de soja (Rogers y col., 1987).

3.1.2.2. Cultivo en medio sólido

Debido a la ausencia de un método eficaz de congelación que permitiera preservar de forma adecuada las colecciones celulares, se estableció en el laboratorio un sistema de cultivo en medio sólido para conseguir dicho propósito. Para ello, las suspensiones celulares crecidas en medio líquido se sembraron en placas de Petri, que contenían medio sólido KN¹, mediante disposición gota a gota por toda la superficie (figura 3.2-B). Las placas se sellaron con parafilm y se crecieron en las mismas condiciones de luz, temperatura y gaseo a las que se sometieron los cultivos líquidos. El medio de cultivo utilizado es idéntico al descrito en la tabla 3.2 excepto por la presencia de 1,5% de agar, que actúa como agente gelificante.

3.1.3. Cultivo de plantas de *Arabidopsis thaliana*

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* wild type (ecotipo Col-0) y de los mutantes *fad5* y *fad3/fad7/fad8* fueron cedidas por el Dr. J. Browse (Washington State University, Pullman WA USA). Las semillas se esterilizaron con una solución de hipoclorito sódico 50% (v/v) que contenía un par de gotas de Tween-20 durante 3 minutos; a continuación, se trataron con una solución de etanol al 70% durante un minuto y, finalmente, se lavaron con abundante agua estéril (3-4 lavados). Seguidamente, las semillas se transfirieron a placas Petri con medio nutritivo estéril y se sellaron con cinta porosa. El medio base de cultivo utilizado fue el medio MS (Murashige-Skoog) sólido estándar cuya composición se detalla en la tabla 3.3. La estratificación de las semillas se realizó después de haber sido esterilizadas, almacenándolas a 4 °C durante un periodo de 3 días de oscuridad. Transcurrido este tiempo, las plantas se crecieron hasta los 14 días de edad en cámara bioclimática bajo un régimen lumínico de 16h luz/ 8h oscuridad con una intensidad lumínica entre 100 y 140 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (figura 3.3). La humedad relativa de la cámara se ajustó al 70% y la temperatura se fijó en 22 °C/18 °C (ciclos diurno/nocturno).

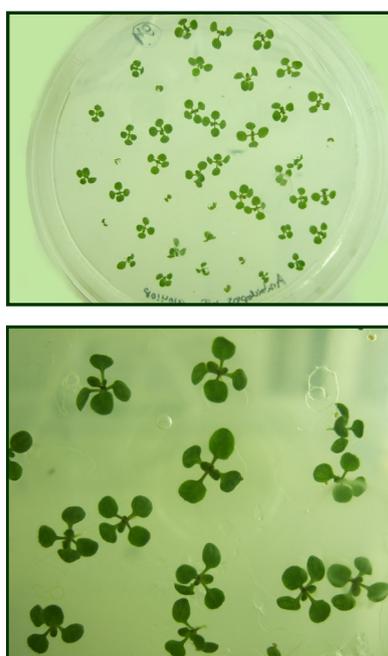


Figura 3.3. Crecimiento plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Nutriente	Concentración (g L⁻¹)
MS (Sigma)	4
MES	9,76
Sacarosa	10
Plant Agar	9

Tabla 3.3. Composición de la solución nutritiva utilizada para el cultivo de *Arabidopsis thaliana* en medio sólido.

3.2. TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES

3.2.1. Crecimiento de material vegetal a bajas temperaturas

3.2.1.1. Crecimiento de plantas de soja en frío

Para el estudio de la regulación de los genes de las desaturasas durante el proceso de aclimatación al frío, las plantas de soja se crecieron en medio hidropónico tal como se indica en el apartado 3.1.1 durante 19 días. A partir de ese momento, las plantas de soja se mantuvieron a 4 °C durante 3 días bajo condiciones estándar de luz y humedad. Durante el periodo de incubación en frío, se recogieron hojas trifoliales de soja de 18 días de edad cada 24 horas, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

3.2.1.2. Crecimiento de suspensiones celulares de soja en frío

Las suspensiones celulares se crecieron en medio líquido bajo condiciones estándar de luz, temperatura y humedad durante 19 días tal como se detalla en el apartado 3.1.2.1., momento en el que los cultivos se encuentran al comienzo de la fase estacionaria. Posteriormente, los cultivos celulares se mantuvieron a 4 °C durante tres días consecutivos. Cada 24 horas, las células de soja de un matraz erlenmeyer se recogieron por filtración a través de papel Miracloth (Hoechst, Calbiochem) para eliminar el medio de cultivo, se pesaron y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido.

3.2.2. Experimentos de respuesta al estrés producido por herida

Los experimentos de herida se realizaron en hojas trifoliales de plantas de soja crecidas en medio hidropónico, tal y como se indica en el apartado 3.1.1. Para ello, se realizaron cortes muy finos a intervalos de aproximadamente 3 milímetros con un bisturí estéril a lo largo del nervio central de hojas trifoliales de soja. Las hojas control se recogieron antes de realizar los cortes en las hojas (tiempo 0) y las hojas dañadas se recogieron 30 y 240 minutos después de haber efectuado la herida. El material vegetal recolectado se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se guardó a -80 °C hasta su uso.

3.2.3. Tratamiento de hojas de soja con la hormona metiljasmonato

El tratamiento con la hormona metiljasmonato (MeJA) se realizó sobre hojas trifoliales de plantas de soja crecidas en medio hidropónico según el apartado 3.1.1. Para ello, se aplicó cuidadosamente una solución de metiljasmonato [0,01 % reactivo metiljasmonato comercial en agua destilada; Sigma] sobre el haz de la hoja con la ayuda de un pincel para evitar el daño tisular. Las hojas control se recolectaron antes del tratamiento y las hojas tratadas con la hormona MeJA se recogieron 30 y 240 minutos después de la aplicación.

3.2.4. Tratamiento de plantas de soja con el inhibidor MG-132

MG-132 es inhibidor específico del proteosoma 26S (Lim y col., 2004). Para analizar su efecto, las plantas de soja se incubaron en presencia de MG-132 (Calbiochem) durante 12 horas bajo condiciones estándar de crecimiento. El inhibidor se añadió a la solución de crecimiento a una concentración final de 50 µM a partir de una solución stock 6,3 mM de MG-132 preparada en dimetilsulfóxido (DMSO) y etanol (50% v/v). Las plantas control se trataron con la misma concentración de DMSO y etanol como control específico del tratamiento con MG-132. Tras el periodo

de incubación, las raíces de las plantas control y tratadas se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

3.3. TÉCNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS Y DE BIOLOGÍA CELULAR

Estas técnicas han sido realizadas en la Unidad de Desarrollo de Plantas y Arquitectura Nuclear del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC, Madrid) bajo la dirección de las Dras. M^a Carmen Risueño y Pilar Testillano.

3.3.1. Procesamiento de muestras

Las células de soja se fijaron en paraformaldehído al 4 % (p/v) en tampón PBS, pH 7,3, sometiéndolas, en primer lugar, a un minuto de vacío que facilita la penetración del fijador y, posteriormente, manteniéndose en el fijador a 4°C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, las muestras se lavaron en PBS y se almacenaron en una disolución de 0,1% de paraformaldehído en PBS, pH 7,3 a 4°C para evitar que revertiera la fijación de las muestras. Este tipo de fijación permite preservar la estructura celular y mantener la reactividad química y antigénica de la muestra.

Una parte de las muestras de células de soja fijadas se utilizaron para obtener cortes de 30 µm en un vibratomo (Vibratomo 1000, Formely Lancer). Los cortes obtenidos se depositaron en un portaobjetos recubierto con el adherente 3-aminopropiltriétoxissilano, se dejaron secar a temperatura ambiente y, finalmente, se almacenaron a -20°C hasta utilizarlos en ensayos de inmunofluorescencia.

Otra parte de las muestras de células de soja fijadas se deshidrataron en una serie de soluciones de acetona de concentración creciente (30%, 50%, 70%, 90% y 100%) y, seguidamente, se infiltraron e incluyeron en la resina acrílica Histo-resin 8100 a 4°C. Los bloques de Histo-resin así obtenidos se guardaron a temperatura ambiente hasta su posterior utilización.

3.3.2. Tinciones generales para análisis estructural y tinciones citoquímicas preferenciales para almidón y DNA

Las tinciones se realizaron en cortes semifinos de 2 μm de muestras incluidas en Histo-resin, resina acrílica hidrofílica muy adecuada para las citoquímicas, siguiendo básicamente el protocolo descrito en Solís y col. (2008). El azul de toluidina es un colorante de tiamina que se utiliza para el estudio de la organización celular ya que permite obtener un contraste general de la mayor parte de los componentes celulares, proporcionando mayor contraste, por ejemplo a la cromatina nuclear y a las paredes celulares. Para el análisis estructural, la muestra teñida se observó en contraste de fase y campo claro en un microscopio Leitz acoplado con una cámara digital Olympus DP10.

El almidón se detectó por la técnica citoquímica con I_2/K en cortes semifinos de Histo-resin. La observación de los cortes teñidos se realizó en campo claro en un microscopio Leitz acoplado con una cámara digital Olympus DP10.

La tinción con 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para la observación del DNA se realizó también sobre cortes semifinos de 2 μm y se observó bajo luz UV en un microscopio Axioplan Universal de Zeiss, para epifluorescencia y luz transmitida que permite trabajar en campo claro y contraste de fase, acoplado a una cámara CCD.

3.3.3. Inmunofluorescencia y Microscopía Láser Confocal

Los ensayos de inmunofluorescencia se realizaron sobre cortes de vibratomo obtenidos según lo descrito en el apartado anterior (Fortes y col., 2004). Estos cortes se descongelaron unos minutos antes de realizar la inmunofluorescencia ya que el congelado y descongelado produce roturas que facilitan la permeabilización del corte a los anticuerpos.

En primer lugar, los cortes se deshidrataron-rehidrataron en una serie de soluciones sucesivas de metanol en PBS (30%, 50%, 70%, 100%, 70%, 50%, 30% y PBS). Seguidamente, se trataron con celulasa (Onozuka R-10) al 2% en PBS durante

45 minutos a temperatura ambiente con el objetivo de digerir la pared celular y facilitar la penetración del anticuerpo. Tras tres lavados de 5 minutos en PBS, los cortes se incubaron con 5% BSA en PBS durante 10 minutos y, a continuación, con el anticuerpo primario anti-*GmFAD7* (dilución 1:25 en 1% BSA) durante una hora a temperatura ambiente. Se realizaron, entonces, tres lavados de 5 minutos con PBS y los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG_(rabbit)-Alexa 488 (dilución 1:25 en PBS) durante 45 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. A partir de este momento, todos los pasos se realizaron en oscuridad para evitar que decayera la fluorescencia. Tras tres lavados de 5 minutos con PBS, los cortes se incubaron con DAPI durante 5 minutos, se lavaron de nuevo con agua milliQ y, posteriormente, se realizó un montaje en Mowiol 40-88 (Sigma-Aldrich).

Para el análisis de la inmunofluorescencia se utilizó un Microscopio Láser Confocal (Leica TCS-SP2-ADBS) y se recogieron las series-z de las secciones ópticas a intervalos 0,5-1,0 μm . Las imágenes se tomaron de las proyecciones máximas de series de 15 a 20 secciones ópticas y la imagen de contraste de interferencia diferencial (DIC) se utilizó para visualizar en relieve las distintas estructuras celulares. Los fluoróforos y las longitudes de onda de excitación y emisión utilizadas para obtener las imágenes de fluorescencia se indican en la tabla 3.4.

Fluoróforo	Láser	Longitud de onda (nm)	
		Excitación	Emisión
Alexa 488	Argón	488	500-550
Clorofila	Helio-Neón	633	649-738
DAPI	UV	364	385-475

Tabla 3.4. Fluoróforos y las longitudes de onda de excitación y emisión utilizadas para obtener las imágenes de fluorescencia

Los experimentos control se realizaron reemplazando el anticuerpo primario anti-*GmFAD7* por PBS o por el anticuerpo primario bloqueado.

3.3.3.1. Experimento control por pre-bloqueo del anticuerpo primario:

experimento de inmunodepleción

El pre-bloqueo del anticuerpo primario anti-*GmFAD7* se realizó incubando el anticuerpo con una solución 1mM del mismo péptido antigénico empleado para la inmunización y obtención del anticuerpo policlonal en proporción 1:2 (v/v) a 4°C durante toda la noche. La solución de anticuerpo bloqueado se empleó como anticuerpo primario en inmunofluorescencia, siguiendo el mismo protocolo que se ha descrito en el apartado 3.3.3. El resultado negativo de este control indica que el anticuerpo no reconoce otros antígenos por lo que la unión previa al péptido ha bloqueado su reactividad en el corte y, por tanto, valida su especificidad *in situ*.

3.4. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

El fraccionamiento subcelular es un conjunto de métodos y técnicas que tienen como objetivo obtener fracciones puras o enriquecidas en un determinado componente celular.

3.4.1. Preparación de extractos crudos celulares a partir de diferentes tejidos de plantas de soja

Para la preparación de extractos crudos de diferentes tejidos de plantas de soja (raíz, tallo, hoja y semillas en desarrollo) se utilizaron 0,5 gramos de tejido vegetal excepto en raíces donde se emplearon 2 gramos. Los diferentes tejidos se machacaron en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino. El sedimento celular obtenido se resuspendió en tampón A (0,1M Tris-HCl (pH 7,5), 20% glicerol, 1mM EDTA, 10mM MgCl₂ y 14mM β-mercaptoetanol) y se homogeneizó con un homogeneizador manual con émbolo de teflón durante 10 minutos. El calentamiento de la muestra se evitó realizando la homogeneización a intervalos de 2 minutos interrumpiendo el proceso para incubar la muestra en hielo durante 3 minutos. Tras la homogeneización, la muestra se centrifugó a 2400 r.p.m. (centrífuga

Beckman Allegra™ 21R; rotor F2402H) durante 3 minutos para eliminar los restos celulares. En cada uno de los pasos del protocolo, se añadieron inhibidores de proteasas con el propósito de impedir la degradación de las proteínas. Las distintas fracciones celulares se conservaron en presencia de los inhibidores de proteasas pefabloc (100µg/ml), antipaína (1µg/ml) y leupeptina (1µg/ml).

3.4.2. Aislamiento de cloroplastos a partir de hojas de soja

Las hojas de soja se trituraron en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino y, a continuación, se resuspendieron en tampón B₁ (tabla 3.5.), el cual se añadió a razón de 1,5 mililitros por gramo de hoja utilizado. La rotura de las células se llevó a cabo con un homogeneizador manual con émbolo de teflón durante 10 minutos. Para evitar el calentamiento de la preparación, la homogenización se realizó en intervalos de dos minutos interrumpiendo el proceso durante 3 minutos, periodo de tiempo en el que la muestra se mantuvo constantemente en hielo. Seguidamente, el homogeneizado se agitó durante 10 minutos a 4°C para favorecer la liberación de los cloroplastos retenidos en los restos celulares. Entonces, el extracto se centrifugó a 1200 r.p.m. durante 2 minutos (centrífuga Sorvall, Dupont Wilmington DL Estados Unidos; rotor SS-34) para eliminar los restos celulares. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 10000 r.p.m. durante 10 minutos (centrífuga Sorvall; rotor SS-34). El precipitado, que contiene fundamentalmente cloroplastos, se resuspendió suavemente en tampón B₂ (tabla 3.5.) con la ayuda de un pincel.

El procedimiento general se realizó a temperaturas bajas (aprox. 4°C) y en cada una de las etapas se añadieron los inhibidores de proteasas citados anteriormente con el propósito de evitar la degradación de los componentes celulares. Además, el aislamiento de cloroplastos se llevó a cabo en condiciones de luz débil para minimizar la fotodestrucción de la clorofila.

3.4.3. Aislamiento de cloroplastos a partir de suspensiones fotosintéticas de soja

El aislamiento de cloroplasto se realizó a partir de 50 ml de cultivo de suspensiones celulares de soja. Las células de soja se filtraron a través de papel Miracloth (Hoechst, Calbiochem) para eliminar el medio de cultivo y, seguidamente, se resuspendieron en tampón B₁ (tabla 3.5). A partir de este paso, el procedimiento a seguir es idéntico al descrito para hojas de soja en el apartado 3.4.2.

Tampón	Reactivo	Concentración (mM)
B₁	Tris-HCl (pH 7,5)	10
	EDTA	2
B₂	NaCl	150
	MgCl ₂	5
	Tricina (pH 8)	20

Tabla 3.5. Composición de las soluciones utilizadas para el aislamiento de cloroplastos.

3.4.4. Aislamiento de cloroplastos intactos a partir de hojas de soja

La obtención de cloroplastos intactos se efectuó según el método descrito por van Wijk y col. (1995) en el que se incluyeron algunas modificaciones con el objetivo de adaptarlo a hojas de soja. Como material de partida se utilizaron 50 g de hojas a las que se eliminó la nervadura central. Una vez troceadas en pequeñas secciones y tras ser lavadas con agua destilada, las hojas se trituraron en un homogeneizador tipo politrón en presencia de medio A (tabla 3.6). Tras filtrar la muestra a través de dos capas de papel Miracloth (Hoechst, Calbiochem), el homogeneizado se centrifugó a 1300 r.p.m durante 3 minutos (centrífuga Sorvall; rotor JLA 10.500). Seguidamente, el sobrenadante se centrifugó a 10000 r.p.m durante 10 minutos obteniéndose un sedimento que representa una fracción enriquecida en cloroplastos. El pellet se resuspendió cuidadosamente con un pincel en 4 ml de medio B (tabla 3.6)

y se centrifugó en un colchón de Percoll 35% (v/v) en medio B a 6875 r.p.m. durante 10 minutos (centrífuga Sorvall; rotor SS-34). Tras la centrifugación, los cloroplastos intactos aparecieron como una banda verde intensa situada aproximadamente a un centímetro de la parte superior del colchón de Percoll, que se recogió con una pipeta de boca ancha. Seguidamente, la fracción de cloroplastos intactos recogida se lavó con medio C (tabla 3.6) y se centrifugó a 10000 r.p.m. durante 10 minutos (centrífuga Sorvall; rotor SS-34) para eliminar así los posibles restos de Percoll presentes en la muestra. Finalmente, el pellet se resuspendió suavemente en 2 ml de medio C obteniéndose así la fracción de cloroplastos deseada.

Medio	Reactivo	Concentración (mM)
A	Sorbitol	330
	Ascorbato	5
	EDTA	2
	NaCl	20
	MgCl ₂	1
	MnCl ₂	1
	KH ₂ PO ₄	0,5
	MES (KOH)	5
B	Sorbitol	330
	Ascorbato	5
	EDTA	2
	NaCl	20
	MgCl ₂	1
	MnCl ₂	1
	KH ₂ PO ₄	0,5
	MES (KOH)	5
C	Sorbitol	330
	HEPES (KOH)	50

Tabla 3.6. Composición de las soluciones utilizadas para el aislamiento de cloroplastos intactos.

3.4.5. Aislamiento de fracciones subcloroplásticas a partir de cloroplastos intactos de hojas de soja

Los cloroplastos intactos aislados tal y como se describe en el apartado 3.4.4. se utilizaron para aislar las distintas fracciones subcelulares del cloroplasto según el protocolo establecido por Li y col. (1991). Los cloroplastos intactos se recogieron mediante centrifugación y se resuspendieron en tampón B₃ (tabla 3.7). A continuación, los cloroplastos se rompieron en presencia de un volumen igual de una solución hipotónica, TE, manteniéndolos en hielo durante 10 minutos. Seguidamente, 2 ml de la fracción de cloroplastos lisados se cargaron en un gradiente discontinuo de sacarosa preparado con soluciones de sacarosa de 1,2 M, 1 M y 0,46 M y se centrifugó a 39000 r.p.m. durante 70 minutos (centrífuga Beckman; rotor SW41Ti). Tras la centrifugación, la envuelta formó una banda ligeramente verde en la interfase entre la disolución de 0,46 M de sacarosa y la disolución de sacarosa 1 M, mientras que los tilacoides formaron un pellet de color verde oscuro en el fondo del tubo. La fracción de envuelta se recogió cuidadosamente, se diluyó en tampón TE y se sedimentó por centrifugación a 20000 r.p.m. durante 45 minutos (centrífuga Beckman; rotor 70.1 Ti). Por otro lado, el precipitado de tilacoides se resuspendió en TE y se centrifugó a 7500 r.p.m. durante 10 minutos (centrífuga Beckman; rotor SS-34). Las fracciones de envuelta y de membranas tilacoidales se resuspendieron en volúmenes adecuados de tampón TE, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su utilización. El estroma, presente en la disolución de 0,46 M de sacarosa, se precipitó en una solución de acetona 80% y se guardó a -20 °C durante toda la noche. Tras este período de tiempo, la muestra se centrifugó a 11136 r.p.m. (centrífuga Beckman; rotor SS-34) y el pellet obtenido se resuspendió en TE.

Todo el procedimiento descrito anteriormente se realizó a temperaturas bajas (aprox. 4 °C) y en condiciones de luz débil. Además, las distintas fracciones subcloroplásticas se aislaron y conservaron en presencia de los inhibidores de proteasas pepabloc (100µg/ml), antipaína (1µg/ml) y leupeptina (1µg/ml).

Medio	Reactivo	Concentración (mM)
B₃	NaCl	15
	MgCl ₂	5
	MES (pH 6)	50
	Sacarosa	400
TE	Tris-HCl (pH 7,5)	10
	EDTA	2

Tabla 3.7. Composición de la soluciones utilizadas para el aislamiento de fracciones subcelulares del cloroplasto.

3.5. TÉCNICAS ANALÍTICAS

3.5.1. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

La determinación de la concentración de proteínas se realizó con un kit comercial (Biorad Protein Assay; Biorad) basado en el método espectrofotométrico diseñado por Bradford (1976). Este método se basa en el desplazamiento del máximo de absorción del colorante Azul de Coomasie G-250 en solución ácida desde 465 nm a 595 nm cuando se une a las proteínas. El colorante de Azul Coomassie se une principalmente a los residuos de aminoácidos básicos y aromáticos, especialmente arginina. La interpolación del valor de absorbancia a 595 nm respecto a una curva estándar proporciona una medición relativa de la concentración de proteína total presente en la muestra.

En primer lugar, se realizó una curva estándar de calibración a partir de disoluciones de albúmina sérica bovina (BSA) de concentración conocida (0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1 y 2 mg/ml). Una vez elaborados los patrones de calibrado, la mezcla de reacción se preparó añadiendo los siguientes componentes:

- 10 µl de estándar correspondiente
- 790 µl de H₂O miliQ
- 200 µl de reactivo Biorad

A continuación, la mezcla se agitó enérgicamente con vortex, se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente para que el color se desarrollara y, seguidamente, se midió su absorbancia a 595 nm. La curva de calibrado se obtuvo representando los valores de absorbancia correspondientes a cada una de las disoluciones patrón frente a la concentración de proteína de las mismas.

Para llevar a cabo el análisis cuantitativo, las muestras problema se sometieron al mismo tratamiento que las muestras estándar y el contenido de proteína total se obtuvo interpolando los valores de absorbancia en la curva de calibración correspondiente.

3.5.2. Determinación de la concentración de clorofila

La extracción de pigmentos se realizó en una solución de acetona:agua 80% (v/v). La mezcla se sonicó durante 3 minutos en un baño de ultrasonidos a 4 °C para favorecer la extracción de los pigmentos y, a continuación, se centrifugó en una microcentrífuga a 8500 r.p.m. (centrífuga Beckman Allegra™ 21R; rotor F2402H) durante 5 minutos. Tras la centrifugación, se obtuvo un sedimento blanquecino constituido por proteína y un sobrenadante de color verde que contenía los pigmentos libres. El sobrenadante recogido se utilizó para determinar por espectrometría la absorbancia de la muestra a 645 y 663 nm.

La concentración de clorofila total (Chl_T) de la muestra se determinó aplicando la ecuación experimental desarrollada por Arnon (1949):

$$(Chl_T)_{mg/l} = 8,02 \times Abs_{663} + 20,2 \times Abs_{645}$$

3.5.3. Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (PAGE) en condiciones desnaturizantes fue descrita originalmente por Laemmli (1970) y es una de las técnicas más ampliamente utilizadas para caracterizar mezclas complejas de proteínas.

Las muestras objeto de estudio en esta tesis doctoral se separaron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida de 0,75 mm de espesor con el sistema de electroforesis vertical Miniprotean III (Biorad). El sistema de electroforesis está formado por dos geles de distinta porosidad y pH: un gel concentrador, en el que la muestra se enfoca en una zona muy estrecha lo que determina la separación en bandas finas en el gel separador y alto poder de resolución y, un gel separador, donde la migración está determinada por la carga y el tamaño molecular de las proteínas.

3.5.3.1. Preparación de los geles de poliacrilamida

En la tabla 3.8 se muestran los reactivos utilizados para la preparación de los geles concentrador y separador. En todos los casos, la concentración de poliacrilamida de los geles concentrador y separador fue del 4 % y 12 %, respectivamente.

Reactivo	Gel concentrador (4%)	Gel separador (12%)
Urea	-	1,2 g
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	-	1,25 ml
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	625 µl	-
SDS 10% (p/v)	25 µl	50 µl
Acrilamida/ Bis-acrilamida 40%	244 µl	1,5 ml
APS 10%	25 µl	25 µl
TEMED	5 µl	2,5 µl
H ₂ O miliQ	1,606 ml	1,5 ml aprox. ^a
Volumen total	2,53 ml	5 ml

Tabla 3.8. Composición de los geles empleados en electroforesis SDS-PAGE

^a Debido al carácter higroscópico de la urea, hay que tener la precaución de disolverla sin añadir H₂O miliQ y una vez disuelta ajustar el volumen total de la disolución.

En primer lugar, se preparó la disolución del gel separador y, justo antes de rellenar el molde, se agregaron el APS y el TEMED. La mezcla se vertió en el molde hasta una altura aproximada de un centímetro por debajo del peine y, a continuación, se añadió alcohol isopropílico hasta el borde del mismo para evitar la deshidratación del gel y favorecer la formación de un frente uniforme. El gel separador se dejó polimerizar durante 45 minutos.

Completa la polimerización del gel separador, se eliminó el alcohol isopropílico lavando con abundante agua y se añadió el gel concentrador. Rápidamente, se colocó el peine con cuidado para evitar la formación de burbujas y el gel concentrador se dejó polimerizar 45 minutos.

3.5.3.2. Desarrollo de la electroforesis SDS-PAGE

Una vez que los geles habían polimerizado completamente, se retiraron los peines y los pocillos se lavaron cuidadosamente con H₂O miliQ para eliminar posibles restos de poliacrilamida. Seguidamente, los geles se colocaron en la cámara de electroforesis en presencia del tampón de electroforesis cuya composición fue Tris-HCl 25 mM (pH 8,3), glicina 192 mM y SDS 0,1% (p/v). Antes de ser cargadas en los pocillos, las muestras se desnaturalizaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 90 minutos con tampón de desnaturalización en proporción 3:1 (muestra:tampón). La composición del tampón de desnaturalización se detalla en la tabla 3.9. Este método de desnaturalización supone una alternativa válida a la desnaturalización térmica en el caso de proteínas del cloroplasto, ya que la desnaturalización térmica resulta en agregados de alto peso molecular que dificultan la separación y, por lo tanto, la identificación de las proteínas de interés. Además, se empleó un marcador de peso molecular preteñido (Low range prestained SDS-PAGE Standard, Biorad), que se cargó en el mismo gel que las muestras problema para poder estimar el peso molecular de las proteínas cuando se detectaran al final del

western blot [apartado 3.5.4]. La electroforesis se desarrolló a voltaje constante, 100V durante aproximadamente 3:30 h.

Tampón de desnaturalización	Agente reductor	Reactivo	Composición
Reductor	β-mercaptoetanol	Tris-HCl (pH 6,8)	62 mM
		SDS	8 % (p/v)
Reductor	DTT	Glicerol	10 % (v/v)
		Azul de bromofenol	0,08 % (p/v)
		β-mercaptoetanol	5 % (v/v)
		Tris-HCl (pH 6,8)	62,5 mM
		SDS	2 % (p/v)
No reductor	-	Glicerol	30% (v/v)
		Azul de bromofenol	0,16 % (p/v)
		DTT	80mM
		Tris-HCl (pH 6,8)	62mM
		SDS	8 % (p/v)
No reductor	-	Glicerol	10 %
		Azul de bromofenol	0,08 %

Tabla 3.9. Composición de los tampones de desnaturalización (x4)

3.5.3.3. Detección de proteínas en geles SDS-PAGE

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE se visualizaron mediante el método de tinción con azul de coomasie. Para ello, una vez finalizada la electroforesis, el gel se retiró de la cubeta correspondiente y se incubó durante 12 horas con la solución de tinción. Seguidamente, el gel se decoloró con la solución de desteñido durante unos 20 minutos (tabla 3.10).

Tampón	Reactivo	Composición
<i>De tinción</i>	Azul de Coomasie	0,025 % (p/v)
	Etanol	45% (v/v)
	Ácido acético	6% (v/v)
	Agua desionizada	49% (v/v)
<i>De desteñido</i>	Metanol	10% (v/v)
	Ácido acético	30% (v/v)
	Agua desionizada	60% (v/v)

Tabla 3.10. Composición de las soluciones utilizadas para detección de proteínas en geles SDS-PAGE.

3.5.4. Western blot y detección inmunológica de proteínas

Una vez separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Pall Corporation) mediante la aplicación de un campo eléctrico y, posteriormente, se detectaron mediante la utilización de anticuerpos específicos. La transferencia se llevó a cabo en el equipo Mini Trans-Blot (Biorad) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Así, en la carpeta de transferencia se colocaron en orden ascendente los siguientes componentes: una esponja plana, un papel Whatman, el gel de poliacrilamida, la membrana de PVDF, un papel Whatman y, finalmente, otra esponja plana. Antes de disponerse en la carpeta de transferencia, todos los componentes se empaparon en la solución de transferencia; además la membrana de PVDF, debido a su hidrofobicidad, requirió una incubación previa en metanol antes de sumergirla en el tampón de transferencia. Todo el conjunto se colocó en la cubeta de transferencia que contenía el tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM (pH 7,5), glicina 192 mM y metanol 20% [v/v]) previamente enfriado y la unidad de refrigeración. Las proteínas se transfirieron a voltaje constante, 100V, durante 90 minutos. Tras la transferencia, la membrana se lavó con agua destilada y se bloqueó en leche desnatada 5% (p/v) en tampón TBS (Tris-HCl 25mM (pH 7,5), NaCl 0,9% (p/v)) con agitación y a 4 °C de temperatura durante toda la noche para evitar posteriores uniones inespecíficas del anticuerpo utilizado para la detección de la proteína de interés a su superficie. Tras esta incubación, se realizó una serie de tres lavados de 10 minutos con tampón TTBS (tampón TBS con 0,05% Tween-20 (v/v); Biorad) y, seguidamente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario (dilución 1:200) durante 90 minutos. Entonces, se realizaron tres lavados con TTBS de 15 minutos de duración y la membrana se incubó con el anticuerpo secundario (dilución 1:20000) durante 90 minutos a temperatura ambiente y con agitación. Después de realizar tres lavados de 20 minutos con TTBS, se procedió al revelado de la membrana. Las disoluciones de anticuerpo primario y secundario se prepararon en 1% y 5% de leche desnatada en

TTBS, respectivamente, para conseguir incrementar la sensibilidad del ensayo reduciendo la interferencia por el ruido de fondo (background).

Los anticuerpos usados durante el ensayo fueron un anticuerpo primario específico para la proteína *GmFAD7* (Collados y col., 2006) y, un anticuerpo secundario, que reconoce al anticuerpo primario y que, a su vez, lleva conjugada peroxidasa de rábano [anti-rabbit IgG (whole molecule) peroxidase conjugate; Sigma Aldrich].

El método de detección de proteínas empleado se basa en la utilización de un sustrato quimioluminiscente que cuando se combina con la enzima correspondiente, genera luz, que puede detectarse con una película de autoradiografía. Para la detección, la membrana se incubó 5 minutos con el reactivo Supersignal West Pico Chemiluminescent a temperatura ambiente. A continuación, la membrana se expuso a una película de fotografía (CL-XPosure Blue X-Ray Film; Pierce) en una cámara oscura a diferentes tiempos de exposición hasta obtener la adecuada relación señal:ruido que permitiera ver correctamente los resultados. El revelado de la película se realizó en la solución de revelador (T-Max Professional; Kodak) durante 3-4 minutos. Entonces, la película se lavó en agua destilada durante un minuto y se incubó en un baño de fijador (Polymax, Kodak) durante 2 minutos. Todas las películas se digitalizaron con un escáner EPSON Perfection 2400 Photo.

3.5.5. Análisis de lípidos

3.5.5.1. Extracción de lípidos totales de material biológico vegetal

3.5.5.1.1 Extracción de lípidos de diferentes tejidos de plantas de soja (raíz, tallo, hoja y semilla)

Para la extracción de lípidos totales a partir de diferentes tejidos se aplicó el protocolo desarrollado por Bligh y Dyer (1959). Un gramo de tejido vegetal se rompió en nitrógeno líquido con la ayuda de un mortero y, seguidamente, se homogeneizó en

un homogeneizador de tipo teflón en presencia de 2 ml de tampón B₁. La composición del tampón B₁ se muestra en la tabla 3.5. Al lisado celular se le añadieron 6 ml de una mezcla de extracción metanol:cloroformo (2:1, v/v), 2 ml de cloroformo y 2 ml de agua miliQ. Tras la adición de estos reactivos, la muestra se agitó con vortex durante 30 segundos y, seguidamente, se centrifugó a 2000 r.p.m. durante 20 minutos a 4 °C (centrífuga Sorvall; rotor SS-34). Tras la centrifugación, la fase orgánica, compuesta fundamentalmente por lípidos y pigmentos fotosintéticos, se recogió cuidadosamente con una pipeta Pasteur. Por otro lado, se añadieron 3 ml de cloroformo a la fase acuosa y la mezcla se volvió a centrifugar en las condiciones anteriores. La fase orgánica obtenida después del paso de centrifugación se recogió y se mezcló con la obtenida en la primera centrifugación. El disolvente de la fase orgánica se evaporó con nitrógeno gas a 4 °C y en oscuridad, quedando un sedimento seco que contiene los lípidos y los pigmentos fotosintéticos. Este residuo se almacenó a -20 °C y en oscuridad hasta su posterior utilización.

3.5.5.1.2 Análisis de lípidos a partir de suspensiones celulares de soja

Las células de soja se filtraron a través de papel Miracloth (Hoechst, Calbiochem) para eliminar el medio de cultivo y se homogeneizaron en un homogeneizador de teflón en presencia de 2 ml de tampón B₁. A partir de este paso, el protocolo seguido para la extracción de lípidos fue el que se describe en el apartado 3.5.5.1.1.

3.5.5.2. Análisis de la composición de ácidos grasos mediante cromatografía de gases

El análisis de los ácidos grasos presentes en los lípidos totales se realizó en el Departamento de Grasas y Aceites del Laboratorio Agroambiental del Gobierno de Aragón. Los residuos secos de lípidos totales se transesterificaron con KOH en metanol. Los ésteres metílicos así obtenidos se analizaron y cuantificaron en un

cromatógrafo de gases (modelo 5890 serie 2 plus, Hewlett Packard) equipado con un detector de ionización a la llama (FID) y con una columna SE2330 (30 x 0,25 mm de diámetro interno, 0,2 df).

3.6. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.6.1. Extracción de RNA

La extracción de RNA total se realizó a partir de 0,5 gramos de material biológico (excepto en raíces, 1 gramo) utilizando el método de extracción fenólica con Trizol. En el caso de suspensiones celulares de soja, antes de pesarse, las células se recogieron por filtración a través de papel Miracloth y se lavaron con medio de cultivo KN⁰. En primer lugar, el material biológico se rompió en nitrógeno líquido con la ayuda de un mortero hasta obtener un polvo muy fino. A continuación, el lisado celular se homogeneizó con un homogeneizador manual con émbolo de teflón en presencia de solución de Trizol (Invitrogen) añadida a razón de 1ml de reactivo por cada 0,1 gramos de material de partida. Entonces, la muestra homogeneizada se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente para favorecer la disociación completa de los complejos nucleoproteicos. A continuación, se añadió cloroformo (0,2 ml/ 1ml Trizol) y las muestras se agitaron vigorosamente durante 15 segundos. Tras un periodo de incubación de 2-3 minutos a temperatura ambiente, la mezcla se centrifugó a 9500 r.p.m. (centrífuga Sorvall; rotor SS-34) durante 15 minutos a 4 °C. Tras la centrifugación, la mezcla se separó en dos fases bien diferenciadas: una fase orgánica fenol-cloroformo, que contenía el DNA y restos de proteínas desnaturalizadas, y una fase superior acuosa, que contenía el RNA. Esta última fase se transfirió a un nuevo tubo y la precipitación del RNA se consiguió añadiendo isopropanol a razón de 0,5 ml por cada 1 ml de trizol usado para la homogeneización inicial. La mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó de nuevo a 9500 r.p.m. durante 10 minutos (centrífuga Sorvall; rotor SS-34). Tras la centrifugación, el RNA, que formó un sedimento en el fondo del tubo, se

lavó con 5 ml de etanol 75% (v/v) en agua DEPC estéril y se centrifugó a 8000 r.p.m durante 5 minutos a 4 °C. Finalmente, el RNA se resuspendió en un volumen adecuado de agua DEPC estéril.

A continuación, se llevó a cabo una purificación adicional del RNA a través de columnas del kit comercial RNeasy (Quiagen) de acuerdo con las instrucciones suministradas por el fabricante.

3.6.2. Determinación de la concentración y pureza del RNA total

La concentración y la calidad del RNA total extraído se determinaron espectrofotométricamente midiendo la absorbancia de la muestra a 260 y 280 nm. La pureza del RNA se estimó mediante el cálculo del coeficiente Abs_{260}/Abs_{280} , de forma que las muestras de RNA con una relación superior a 1,9-2,0 se consideraron suficientemente libres de proteínas. Para el cálculo de la concentración, cada unidad de absorbancia a 260 nm se consideró como 40 µg/ml de RNA. Finalmente, el RNA se diluyó con agua 0,1% (v/v) DEPC hasta una concentración estándar de trabajo de 2 µg/µl y se añadió un 1 µl de inhibidor de RNasas (RNase OUT, Invitrogen) para su almacenamiento a -80 °C.

3.6.3. Extracción de DNA genómico

Para la extracción de DNA genómico, se utilizaron como material de partida 2 gramos de hojas de soja que se maceraron en un mortero de porcelana con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino. A continuación, se añadieron 20 ml de tampón de extracción, 600 µg de proteinasa K (Sigma-Aldrich) y 1% SDS (p/v) y la muestra se incubó a 55 °C durante 2 horas. A partir de este momento, la mezcla se manipuló con cuidado para evitar la rotura del DNA. Tras el periodo de incubación a 55 °C, la muestra se centrifugó a 6000 r.p.m. (centrífuga Beckman Avanti J-20; rotor JA 25.50) durante 10 minutos a 4 °C. Al sobrenadante se le añadieron 0,6 volúmenes de isopropanol previamente enfriado y, entonces, la muestra se mezcló suavemente y

se centrifugó a 8.000 r.p.m. (centrífuga Beckman Avanti J-20; rotor JA 25.50) durante 15 minutos a 4 °C para precipitar los ácidos nucleicos. Tras eliminar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en TE y los ácidos nucleicos se purificaron con un volumen de fenol:cloroformo:isoamilalcohol (25:24:1) centrifugando a 8000 r.p.m. durante 10 minutos a 4 °C. Posteriormente, la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se agregó un volumen de cloroformo-isoamilalcohol (24:1) para eliminar los restos de fenol presentes en la muestra. Tras una centrifugación a 8000 r.p.m. durante 10 minutos a 4 °C, los ácidos nucleicos se precipitaron añadiendo a la fase acuosa dos volúmenes de etanol 96 % (v/v) frío y 1/5 de volumen de acetato de sodio 3 M (pH 5,2). La muestra se incubó a -20 °C durante 1 hora y, seguidamente, se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 30 minutos a 4 °C. A continuación, se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 200 µl de etanol 70 % (v/v) frío centrifugando a 12000 r.p.m. durante 5 minutos a 4 °C. Finalmente, el sedimento se resuspendió en 200 µl y se incubó con RNasa H libre de DNasa (Roche) a 37 °C durante 1 hora para eliminar el RNA. La calidad del DNA obtenido se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa. La composición de las soluciones utilizadas para la extracción de DNA genómico se especifican en la tabla 3.11.

Medio	Reactivo	Concentración (mM)
<i>Tampón de extracción</i>	NaCl	50
	EDTA	0,5
	Tris-HCl (pH 8,0)	50
<i>TE</i>	Tris-HCl (pH 8,0)	50
	EDTA	10

Tabla 3.11. *Composición de las soluciones utilizadas para el aislamiento de DNA genómico.*

3.6.4. Técnicas de RT-PCR

3.6.4.1. RT-PCR semicuantitativa

La técnica de RT-PCR se utilizó para estudiar la expresión de los genes de las desaturasas de forma semicuantitativa. Esta técnica supone una alternativa válida al análisis por Northern dado que las desaturasas de plantas presentan una elevada homología entre sí y, por tanto, resulta complicado diseñar sondas específicas de una desaturasa en concreto. En conjunto, el método RT-PCR conlleva dos etapas: una primera etapa que consiste en la síntesis de DNA complementario (cDNA) a partir del mRNA, lo que permite obtener una muestra de moléculas de cDNA representativa de los tipos de mensajeros expresados en un determinado momento, y una segunda etapa de amplificación mediante utilización de parejas de cebadores específicos del mRNA de interés.

3.6.4.1.1 Síntesis de cDNA

El cDNA se sintetizó a partir de 4 µg de RNA total empleando 200 unidades de transcriptasa reversa (M-MLV Reverse transcriptase; Promega) y una concentración 0,16 µM de oligo (dT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen). Para ello, el RNA extraído se dispuso en un volumen total de 5 µl de agua miliQ 0,1% (v/v) DEPC. Seguidamente, la muestra se trató con 5 unidades de DNasa I libre de RNasa (Roche) a 37 °C durante 10 minutos para eliminar la posible contaminación de DNA genómico. Tras inactivar la DNasa I mediante la adición de EDTA a una concentración final de 2,5 µM e incubar la muestra a 65 °C durante 15 minutos, la hebra de cDNA se sintetizó utilizando como cebador un oligonucleótido compuesto por desoxiribonucleótidos de timina que hibrida con la secuencia de poli(A) situada en el extremo 3' del mRNA. Para ello, la muestra se incubó con oligo (dT)₁₂₋₁₈ a una concentración final de 0,16 µM a 70 °C durante 10 minutos y, a continuación, se enfrió rápidamente a 4°C durante 5 minutos para evitar la formación de estructuras secundarias en el RNA. A continuación, se

añadieron el resto de los componentes de la reacción excepto la retrotranscriptasa: 5 µl de tampón de reacción 5x (Promega), 2 µl de dNTPmix 10 µM (Invitrogen) y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 25 µl. Tras un periodo de incubación de 1 minuto a 42 °C, se añadió la retrotranscriptasa M-MLV y, de nuevo, la muestra se incubó a la misma temperatura durante 75 minutos. Entonces, la mezcla de reacción se sometió a una temperatura de 70 °C durante 10 minutos para inactivar la retrotranscriptasa. Para eliminar el híbrido cDNA-mRNA, la muestra se incubó a 37 °C durante 30 minutos en presencia de RNasa H libre de DNasa (Roche). Finalmente, el cDNA sintetizado se diluyó hasta un volumen final de 120 µl con agua miliQ estéril y se almacenó a -80 °C hasta su utilización.

3.6.4.1.2 Amplificación del cDNA por PCR

La amplificación *in vitro* del cDNA (específico del mRNA de estudio) se realizó mediante PCR en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems) utilizando los cebadores específicos que se enumeran en la tabla 3.12. El diseño de parejas de cebadores específicos de los genes objeto de estudio se realizó de forma manual o mediante la utilización del programa primer3. La mezcla de reacción de PCR se detalla en la tabla 3.13. Para la reacción de amplificación se utilizó la enzima *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones suministradas por el fabricante.

El programa de PCR consistió en un primer paso de desnaturalización y activación de la *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen) a 94 °C durante 3 minutos, seguida de un número determinado de ciclos compuestos por una etapa de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, otra de hibridación de los cebadores y una de extensión a 72 °C. La temperatura de hibridación (T_m) es específica para cada pareja de cebadores y el tiempo de extensión (t) depende de la longitud del fragmento de DNA que se va a amplificar (tabla 3.14). Cada uno de los programas de PCR se finalizó con una etapa de extensión a 72 °C durante 10 minutos (figura 3.4).

Cuando las reacciones de amplificación se realizaron sobre DNA genómico, el programa de PCR se modificó ligeramente siendo la duración de la primera etapa de desnaturalización 5 minutos.

Gen	Nº acceso Genbank	ORF	Secuencia del cebador ^a
GmFAD2-1	L43920	84-1247	5'-GTTGCTTTGTTTTCTGTGACTTACTC-3' 5'-ACTATGGCCCATTTGGTTGCTCCA-3'
GmFAD2-2	L43921	85-1236	5'-CTCTCACCCTCCTCTTCACAC-3' 5'-GAACTCCATAAACACACACCACA-3'
GmFAD3 (A+B)	L22964	855-1997	5'-GACAACTGGCTTCTCTGGCT-3' 5'-CTCAGTCTCGTTGCGAGTGGA-3'
GmFAD6	L29215	90-1364	5'-CCCT TGTTGTGAGCTTAATTC-3' 5'-GAGTTCCAACAATGTCTT CTACC-3'
GmFAD7-1	GQ144962	433-1794	5'-GGATATTATCAGAATGTGGCTTGAAGC-3' 5'-CCTACTAAAAGGTACACAGGAAA-3'
GmFAD7-2	EU621390	148-1509	5'-GGA/GTATTATCAGAATGTA/GGCTTGA-3' 5'-CCCCAAAGGTACACGGGATATGC-3'
GmFAD8	TC204934	444-1424	5'-CAAGCAAGAGGGTTAACATGCTGTATTT-3' 5'-ATACTTCCTCACCAACCCATTATTA-3'
ACTINA	U60503	140-533 853-1446	5'-ATTGTAGGTCGTCCTCGTC-3' 5'-TTGCATAAAGTGA AAGAACAG-3'

Tabla 3.12. Cebadores usados para la amplificación de los transcritos por PCR semicuantitativa.

^aLa secuencia superior corresponde al cebador sentido ("Forward") y la inferior al antisentido ("Reverse").

Reactivo	Volumen (µl)
cDNA	8
dNTP mix 10 mM	3,5
Tampón Taq x 10	5
MgCl ₂	4
5'Cebador (10 µM)	2
3'Cebador (10 µM)	2
H ₂ O miliQ	24,5
Taq platinum (5u/µl)	1

Tabla 3.13. Mezcla de reacción para el análisis mediante RT-PCR semicuantitativa.

cDNA	T _m (°C)	Nº ciclos	Tiempo extensión (s)	Tamaño del amplicón (pb)
GmFAD2-1	55	35	45	488
GmFAD2-2	64	32	90	842
GmFAD3	53	33	90	917
GmFAD6	55	35	45	580
GmFAD7-1	52	40	60	767
GmFAD7-2	56	40	60	765
GmFAD8	50	38	45	141
ACTINA	46	33	45	334

Tabla 3.14. Número de ciclos, temperatura de hibridación y tiempo de extensión a la que se ha realizado cada amplificación. Además, se indica el tamaño del amplicón generado.

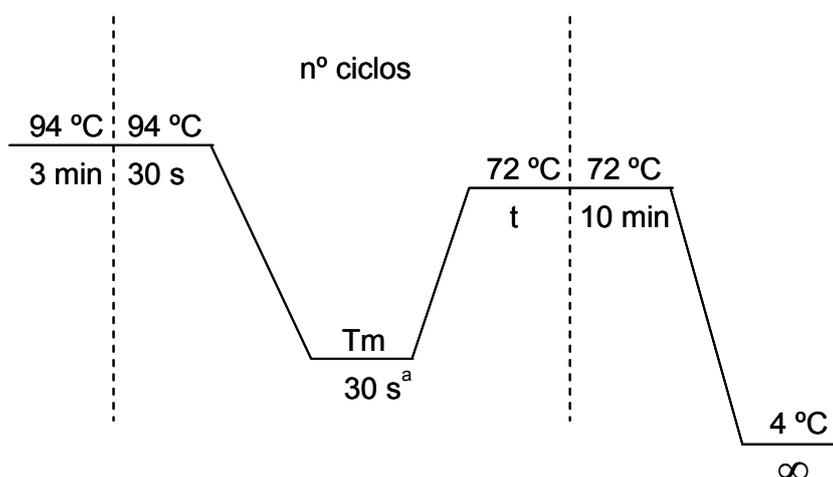


Figura 3.4. Programa tipo de PCR.

^a El tiempo de la etapa de hibridación fue 30 segundos en todos los casos excepto para la amplificación de los cDNAs FAD7-1 y FAD7-2 que fue de un minuto.

3.6.4.1.3 Análisis de los productos de PCR

El análisis de los productos amplificados por PCR se realizó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa. La concentración de agarosa utilizada depende del tamaño del fragmento de DNA que se desea analizar, siendo la concentración mínima utilizada 0,7 % de agarosa para los fragmentos más grandes y la concentración máxima 2 % de agarosa para los fragmentos pequeños. Para preparar el gel, la agarosa se fundió en tampón TBE por calor en una placa

calefactora con agitación. La composición del tampón TBE fue Tris-HCl 90 mM (pH 8,0), ácido bórico 90 mM y EDTA 2 mM. Una vez enfriada la disolución de agarosa, se añadió bromuro de etidio a una concentración final de 5 µg/µl. La mezcla resultante se vertió en un molde previamente sellado, se colocó el peine y se dejó polimerizar durante 30 minutos. Una vez transcurrido el periodo de solidificación, se retiró el peine y el gel se colocó en una cubeta de electroforesis que contenía un volumen adecuado de TBE. A continuación, se añadió 2 µl de tampón de carga a 10 µl de muestra de PCR y la mezcla se cargó en un pocillo del gel ya polimerizado. La composición del tampón de carga fue EDTA 50 mM (pH 8,0), glicerol 30 % (v/v), azul de bromofenol 0,25% (p/v) y azul de xilencianol 0,25 % (v/v). Además, se cargaron 4,5 µl de marcador de pesos moleculares (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen). Finalmente, los productos de PCR se visualizaron bajo luz ultravioleta en un equipo de análisis de imagen (Gel Doc, Biorad). El bromuro de etidio es un colorante que se une al DNA y fluoresce bajo luz UV lo que nos permite observar los fragmentos de DNA amplificados por PCR.

3.6.4.2. RT-PCR cuantitativa en tiempo real

La cuantificación relativa de cDNA se realizó mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). El análisis qRT-PCR se llevó a cabo en un equipo iCycler iQ utilizando el reactivo SyBr Green mix (Biorad) y los cebadores específicos indicados en la tabla 3.15. El hecho de que todos los cebadores tuvieran una temperatura de hibridación entre 59-60 °C y que el tamaño de los fragmentos amplificados fuera de 70 pares de bases, permitió analizar de forma simultánea varios genes con un único programa de qRT-PCR, minimizando así los problemas de hibridación y las señales inespecíficas.

El programa de qRT-PCR consistió en un primer paso de desnaturalización del cDNA y activación de la *Taq* DNA polimerasa a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos consistentes en una etapa de desnaturalización a 95 °C durante 15

segundos y una etapa de hibridación y extensión a 60 °C durante un minuto. La mezcla de reacción se especifica en la tabla 3.16.

Gen	Secuencia del cebador ^a
GmFAD2-2	5'-ACTGATGTTTCCTCCTGCCAAC-3' 5'-TGAGGTTTTTCAAATGGCACC-3'
GmFAD3 (A+B)	5'-GACCACTTCGTAAGTGACACTGGA-3' 5'-ACTCAGTCTCGTTGCGAGTGGA-3'
GmFAD6	5'-ATGCACTGGGTCTCTTCATGAT-3' 5'-TTGCAGTCCCTGTCCATACC-3'
GmFAD7 (1+2)	5'-CAGGAACCTGACCAAATAAATAAACC-3' 5'-TGCCATTGGACTAAAAAATGAAACT-3'
GmFAD8	5'-CAAGCAAGAGGGTTAACATGCTGTATTT-3' 5'-ATACTTCCTCACCAACCCCATTA-3'
ACTINA	5'-ACCTCAGCCGAGCGTGAAAT-3' 5'-TGCTCGTAGTCAAGGGCAATG-3'

Tabla 3.15. Cebadores usados para la amplificación de los transcritos por qRT-PCR.

^a La secuencia superior corresponde al cebador sentido ("Forward") y la inferior al antisentido ("Reverse").

Reactivo	Volumen (µl)
cDNA	2
SYBR Green mix	12,5
5´Cebador (5 µM)	1,5
3´Cebador (5 µM)	1,5
H ₂ O miliQ	5,5

Tabla 3.16. Mezcla de reacción para el análisis mediante qRT-PCR.

3.6.4.2.1 Cálculo de la eficiencia

La eficiencia de una PCR se define como la velocidad a la que el amplicón se está generando y se expresa generalmente en términos de porcentaje. La eficiencia es del 100% cuando la cantidad de amplicón se duplica en cada ciclo de la fase exponencial de la reacción de PCR. La estimación de este parámetro puede realizarse a partir de la regresión del ciclo umbral frente a una serie de diluciones

seriadas de una muestra de cDNA problema (1; 1:10; 1:100; 1:1000). La eficiencia de la reacción de qRT-PCR se calculó a partir de la pendiente de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$e = 10^{-1/a} - 1$$

donde e, es la eficiencia y a, es la pendiente de la regresión.

Cada dilución de la muestra se determinó por duplicado y sólo se consideraron las parejas de cebadores cuya eficiencia estuviera comprendida entre el 90 y el 100%.

3.6.4.2.2 Curva de desnaturalización (curva de melting)

Para determinar la especificidad de la reacción se realizó una curva de desnaturalización al final de la reacción de qRT-PCR. Para ello, los productos amplificados se sometieron a un calentamiento lento de la temperatura desde 50 °C hasta 95 °C aumentando ésta medio grado cada 10 segundos. La temperatura a la cual el DNA se desnaturaliza se observa como una drástica caída de la fluorescencia debido a la disociación del SYBR Green. Los productos de PCR de diferente longitud y diferente secuencia se desnaturalizan a diferentes temperaturas, observándose diferentes picos cuando se representa la derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura (-dF/dT) frente a la temperatura. Así, la curva de desnaturalización nos permitió discriminar si las muestras con curvas de amplificación positivas correspondían a productos específicos o inespecíficos o si se producían dímeros de los cebadores utilizados.

3.6.4.2.3 Cuantificación

La cuantificación relativa se utilizó para obtener la magnitud de los cambios fisiológicos en los niveles de expresión genética de un gen de estudio en comparación con un gen de referencia. Los niveles de mRNA de cada gen se normalizaron frente al gen de la actina, utilizado como "housekeeping", y se

expresaron de forma relativa a los niveles de mRNA de una muestra del experimento utilizada como calibrador o referencia (generalmente, la muestra control). Los cálculos en cuantificación relativa de expresión genética se realizaron utilizando el método del $2^{\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001), modelo que supone una eficiencia óptima e idéntica (correspondiente al 100%) en la reacción de qRT-PCR tanto del gen de estudio como del gen de referencia. El método $2^{\Delta\Delta Ct}$ expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct del control tal y como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\text{Inducción: } 2^{[\Delta Ct(\text{muestra}) - \Delta Ct(\text{calibrador})]}$$

$$\Delta Ct(\text{muestra}) = Ct(H)_m - Ct(P)_m$$

$$\Delta Ct(\text{calibrador}) = Ct(H)_c - Ct(P)_c$$

El ciclo umbral (Ct) es el ciclo a partir del cual la fluorescencia es estadísticamente significativa por encima del ruido de fondo (background). Ct (H)_m y Ct (H)_c representan el valor de Ct para el gen control en la muestra a analizar y en la muestra que se utiliza como calibrador respectivamente. De modo análogo, Ct (P)_m y Ct (P)_c representan el valor de Ct para el gen objeto de estudio en la muestra a analizar y en la muestra que se utiliza como calibrador, respectivamente.

3.6.4.3. PCR RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

La obtención de la secuencia completa de un cDNA a partir de una secuencia parcial previamente conocida se llevó a cabo mediante la técnica RACE empleando para ello el protocolo descrito en el kit comercial GeneRacer™ (Invitrogen) que engloba dos sistemas diferentes: 5'-RACE y 3'-RACE.

En primer lugar, el RNA total (4 µg) extraído de hojas maduras de soja, según el protocolo descrito en el apartado 3.6.1, se trató con fosfatasa intestinal de ternero para eliminar los grupos fosfato presentes en los extremos 5' de mRNAs parcialmente degradados, de modo que sólo los mRNA con secuencia completa

serían susceptibles de mantener su extremo 5' modificado covalentemente ("cap") y, por lo tanto, serían capaces de unirse al RNA oligo. A continuación, el mRNA se incubó con una pirofosfatasa que elimina la estructura "cap" del extremo 5' de la población de mRNAs íntegros dejando un grupo fosfato en posición 5' al cual, en el siguiente paso, se le unió un oligo de RNA con una secuencia específica que serviría para el proceso de amplificación propio de la técnica RACE. El mRNA así tratado se empleó finalmente para la síntesis de una hebra de cDNA a 50 °C durante 1 hora en presencia del oligo (dT) GeneRacer y 200 unidades de la enzima SuperScript III RT (Invitrogen). Para obtener los extremos 5' y 3', se llevaron a cabo reacciones específicas de PCR con diferentes cebadores GeneRacer suministrados por el kit junto con una serie de cebadores específicos del gen objeto de estudio (GSP). Los cebadores utilizados en las reacciones de amplificación se indican en la tabla 3.17. Posteriormente, en aquellos casos en los que fue necesario, se realizó una PCR adicional (PCR anidada) utilizando como molde el producto de amplificación de la reacción de PCR anterior. Finalmente, los productos de PCR RACE se clonaron en el vector pGEM-Teasy (Promega) y se secuenciaron en el Servicio de Secuenciación del CNIO tal y como se indica en el apartado 3.6.5.

Cebador ^a	Secuencia del cebador	Sentido del cebador
GSP1F	5'-GAGTGTTCGATGTAATCAATGGGAG-3'	Sentido
GSP1R	5'-CTCCCATTGATTACATCGACACAC-3'	Antisentido
GSP2	5'-GAAGCTTCTCATGCTCAAC-3'	Antisentido
GSP3	5'-ATGGTGGTGGAGCACCAGGGTC-3'	Antisentido
GSP4	5'-CCCCAAAGGTACACGGGATATGC-3'	Antisentido
GSP5	5'-GTCTCTGAACAATTTTCAGGCA-3'	Antisentido
GSP6	5'-GTTGAGCATGAGAAGCTTC-3'	Sentido
GSP7	5'-GGA/GTATTATCAGAATGTA/GGCTTGA-3'	Sentido
GSP8	5'-CCTACTAAAAAGGTACACAGGAAA-3'	Antisentido
GSP9	5'-GGATATTATCAGAATGTGGCTTGAAGC-3'	Sentido
GSP10	5'-GTCGATGTAATCAATGGGAGTA-3'	Sentido
GSP11	5'-GTTGATTTAACCAATGGGGCTAAT-3'	Sentido
GSP12	5'-CTCTGATTTGGACGAGCCATTAATC-3'	Antisentido

Tabla 3.17. Cebadores usados en la técnica RACE.

3.6.5. Clonación de los productos amplificados por RT-PCR

Los productos de amplificación generados en la RT-PCR semicuantitativa se clonaron y se enviaron a secuenciar al Servicio de Secuenciación del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas para comprobar su secuencia e identidad.

3.6.5.1. Extracción de los productos de PCR de gel de agarosa por el método de lana de vidrio

Una vez visualizado el gel de agarosa bajo luz ultravioleta, la zona del gel que contenía el fragmento de PCR deseado se recortó con un bisturí estéril. El fragmento de agarosa recortado se troceó y se colocó junto con 20 µl de agua miliQ estéril en un tubo eppendorf de 0,5 ml al que previamente se le había practicado un orificio en el fondo y en el que se había dispuesto lana de vidrio ocupando 2/3 partes de su capacidad. Este tubo se acopló a un tubo eppendorf de 1,5 ml y el conjunto se centrifugó a 10000 r.p.m durante 10 minutos (centrífuga Beckman Allegra™ 21R; rotor F2402H). Tras esta centrifugación, el tubo con lana de vidrio se acopló a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 ml, se añadieron 20 µl de agua miliQ estéril y se centrifugó de nuevo en las condiciones anteriores. El DNA obtenido en las fracciones eluidas se purificó por centrifugación a 8000 r.p.m. (centrífuga Beckman Allegra™ 21R; rotor F2402H) durante 10 minutos a 4 °C en presencia de un volumen de fenol:cloroformo-isoamilalcohol (1:1, v/v). Entonces, se retiró la fase acuosa a la que se añadió un volumen de cloroformo:isoamilalcohol (24:1, v/v) y la muestra se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones. Finalmente, el DNA se precipitó con dos volúmenes de etanol y 1/5 de volumen de acetato de sodio 3 M a -20 °C durante toda una noche. Transcurrido este periodo de tiempo, la muestra se centrifugó a 13.000 r.p.m. (centrífuga Beckman Allegra™ 21R; rotor F2402H) durante 30 minutos a 4 °C, se decantó el sobrenadante y se añadieron 200 µl de etanol 70%. Tras una centrifugación a 13000 r.p.m durante 5 minutos a 4 °C, el DNA se resuspendió en un volumen adecuado de agua miliQ estéril.

3.6.5.2. Ligación de los fragmentos de DNA en el vector pGEM[®]-T Easy

Una de las características de la enzima *Taq* DNA polimerasa utilizada en las reacciones de RT-PCR es que introduce una base de adenina (A) en el extremo 3' del amplicón generado. Este hecho es aprovechado por diversos sistemas de clonación cuyos vectores se generan por la adición de una base de timina (T) en el extremo 5' lo que permite la clonación TA, como es el caso del vector pGEM[®]-T Easy.

El vector pGEM[®]-T Easy fue el plásmido utilizado para la clonación de los fragmentos amplificados por RT-PCR mediante la utilización del enzima de T4 ligasa (Promega). Para que la ligación sea óptima, la mezcla de reacción debe contener cantidades equimolares del plásmido y del amplicón que se desea clonar. Una vez añadidos todos los componentes necesarios para la ligación, la muestra se incubó a temperatura ambiente durante una hora y, luego, a 4 °C durante toda la noche.

3.6.5.3. Transformación del plásmido recombinante en *E. Coli* JM109

Las células competentes *E.coli* JM109 se transformaron mediante choque térmico con la mezcla de ligación correspondiente. En primer lugar, las bacterias competentes conservadas a -80 °C se descongelaron en hielo durante 15-20 minutos. Una vez descongeladas, se añadieron 100 µl de las mismas a la totalidad de la mezcla de ligación y la mezcla resultante se incubó en hielo durante 20 minutos. A continuación, se transfirió rápidamente a un baño a 42 °C durante 2 minutos y, tras este paso, se incubó de nuevo en hielo durante 15 minutos. Después de añadir 500 µl de medio LB (Luria Bertani Broth Miller's modification), la muestra se incubó a 37 °C durante 1 hora. Seguidamente, la mezcla se sembró en placas de LB que contenían ampicilina en concentración 50 µg/ml. La ampicilina se utilizó como marcador selectivo ya que el vector pGEM[®]-T Easy confiere resistencia a este antibiótico. Tras incubar las placas sembradas a 37 °C durante toda la noche, aparecieron colonias individuales correspondientes en su mayoría a clones positivos

que contenían el fragmento de DNA deseado. Finalmente, algunas colonias se inocularon en 4 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/µl) y se incubaron a 37 °C durante toda una noche.

3.6.5.4. Extracción de DNA plasmídico

La extracción del DNA plasmídico se realizó empleando el protocolo del kit comercial “High Pure Plasmid Isolation Kit” (Roche), que comprende una primera etapa de extracción del DNA plasmídico y una segunda etapa de purificación del mismo en minicolumnas. Para ello, las bacterias se recogieron por centrifugación a 13000 r.p.m (centrífuga Beckman Allegra™ 21R; rotor F2402H) durante 3 minutos a partir de 3 ml del cultivo líquido correspondiente. El sedimento de bacterias se resuspendió en 250 µl de tampón de resuspensión y se mezcló cuidadosamente con 250 µl de tampón de lisis. Entonces, la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, se añadieron 350 µl de tampón de unión previamente enfriado y, de nuevo, se incubó en hielo durante 5 minutos para favorecer la precipitación del DNA genómico de la bacteria. Transcurrido este tiempo, la muestra se centrifugó a 13000 r.p.m (centrífuga Beckman Allegra™ 21R; rotor F2402H) durante 10 minutos y el sobrenadante recogido tras la centrifugación se transvasó a una columna y se centrifugó a 13000 r.p.m. (centrífuga Beckman Allegra™ 21R; rotor F2402H) durante 1 minuto. Descartada la fracción no retenida, se añadieron 500 µl de tampón de lavado I a la columna y la muestra se centrifugó en las condiciones anteriores descartando nuevamente la fracción no retenida. Seguidamente, se añadieron 700 µl de tampón de lavado II y se realizaron dos centrifugaciones consecutivas a 13.000 r.p.m. durante 1 minuto (centrífuga Beckman Allegra™ 21R; rotor F2402H). Finalmente, el DNA plasmídico se eluyó de la columna con un volumen adecuado de una mezcla de tampón de elución y agua miliQ estéril (1:2, v/v).

Una alícuota del DNA plasmídico purificado se digirió con las enzimas de restricción adecuadas para liberar el producto de PCR clonado del vector. Los

fragmentos originados tras la digestión enzimática se separaron en geles de agarosa y se visualizaron bajo luz ultravioleta. Aquellos plásmidos que habían incorporado el inserto del tamaño deseado se enviaron a secuenciar al Servicio de Secuenciación del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas. Los resultados de secuencia proporcionados por este servicio se analizaron con el programa BioEdit 7.0.9.0. para comprobar la identidad del producto amplificado.

3.7. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO

3.7.1. Material biológico y diseño experimental

Como material biológico de trabajo se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* wild type (ecotipo Col-0) y los mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes en la insaturación de ácidos grasos *fad5* y *fad3/fad7/fad8* crecidos siguiendo la metodología detallada en el apartado 3.1.3.

Un diseño experimental apropiado es crucial en los experimentos de micromatrices. Por ello, con el objetivo de disminuir al máximo la variabilidad experimental y poder así diferenciar cambios reales en la expresión génica, se realizaron dos experimentos independientes con tres replicas biológicas por experimento (utilizando entre 25-35 plantas de cada estirpe por réplica).

3.7.2. Preparación de la muestra

La extracción y purificación del RNA de las muestras a analizar se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.6.1. El RNA total obtenido se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C hasta su envío al Servicio de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología (Madrid, España).

3.7.3. Procesado experimental del chip

Los experimentos para el análisis de expresión génica mediante hibridación en micromatrices de DNA fueron realizados por la Unidad de Genómica del Centro

Nacional de Biotecnología, UGCNB (Madrid, España). Para ello, las muestras de RNA extraídas se enviaron al servicio mencionado donde la unidad de genómica llevó a cabo los siguientes pasos:

1. Análisis de la integridad del RNA total mediante la utilización del bioanalizador Bioanalyzer 2100.
2. Síntesis de cDNA a partir de RNA total, transcripción *in vitro* y marcaje de la muestra (cRNA biotinilado). El cRNA marcado con biotina se obtuvo a partir de 4 µg de RNA total mediante la utilización del kit “ One cycle target labeling and control reagents” de Affymetrix. A continuación, el cRNA biotinilado se fragmentó a 94 °C durante 35 minutos para obtener fragmentos de 35 a 200 pares de bases de longitud.
3. Hibridación de la muestra con el Genechip[®], escaneado del microchip y análisis de imagen. Tres muestras biológicas se hibridaron de forma independiente para cada condición. Cuando la calidad del cRNA marcado con biotina fue adecuada, 10 µg de cRNA fragmentado se hibridó en el microchip Arabidopsis ATH1 Genome Array Affimatrix (Affymetrix, Santa Clara, CA) a 45 °C durante 16 horas. Cada muestra se añadió a la solución de hibridación (10 mM MES, 1 M Na⁺, 20 mM en presencia de 0,01 % de Tween-20) a una concentración final de 0,05 µg/ml. Tras la hibridación, las micromatrices se lavaron y tiñeron con estreptavidina-ficoeritrina en una estación de fluidos 450 y se escaneron con el escáner Genechip[®] Scanner 3000 7G (Affymetrix). El análisis de datos se realizó utilizando el software Genechip Operating Software (GCOS).
4. Análisis bioinformático de los resultados mediante la aplicación de los algoritmos estadísticos más adecuados y entrega de los resultados. La corrección del ruido de fondo, la normalización y el cálculo sumariado de los niveles de expresión se realizaron utilizando el algoritmo Robust Multiarray Analysis (Irizarry y col., 2003). Seguidamente, el análisis de expresión

diferencial se llevo a cabo mediante un modelo lineal bayesiano para datos de micromatrices (Limma). Para el control FDR, los valores p se corrigieron usando el método descrito por Benjamini and Hochberg (1995).

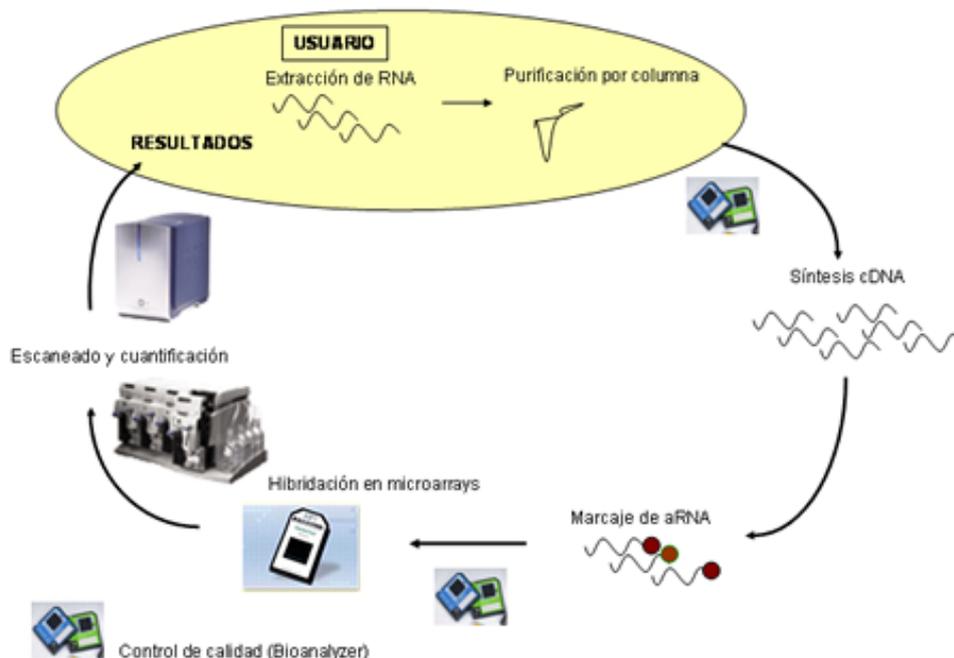


Figura 3.5. Esquema del procesado experimental del chip realizado por la Unidad de Genómica del CNB. Adaptada de www.cnb.uam.es/genómica

El Genechip® utilizado para la hibridación es el microchip comercial de la compañía Affymetrix denominado “Arabidopsis ATH1 Genome Array”. Este microarray fue diseñado en colaboración con el Institute for Genome Research (TIGR) y contiene unas 22500 sondas que representan aproximadamente 24000 secuencias génicas en un único microarray. Los microchips de la compañía Affymetrix se obtienen mediante la síntesis *in situ* de oligonucleótidos de 25-mer utilizando la técnica de fotolitografía sobre una superficie de cuarzo. Cada gen se representa por un conjunto de 11-20 sondas específicas de 25-mer diseñadas en el extremo 3’ del gen de interés. A su vez, cada una de estas sondas es pareada con un control negativo que presenta la misma secuencia pero con una mutación puntual en posición central. Esta estrategia sirve como control de la especificidad de la hibridación.

3.7.4. Análisis estadístico de los resultados

Los resultados proporcionados por el Servicio de Genómica del CNB se analizaron exhaustivamente mediante la utilización de criterios de filtrado de los datos basados en la variación del nivel de expresión de los genes. Para ello, realizamos una asignación arbitraria de un valor de corte respecto a la diferencia de expresión de forma que aquellos genes que presentaban una tasa de variación $\geq 1,5$ se consideraron genes inducidos y aquellos genes que presentaban tasas de variación $\leq -1,5$ se consideraron genes reprimidos. Además, los genes se seleccionaron y ordenaron en función del p-valor ($\leq 0,001$), lo que nos permitió distinguir entre las diferencias biológicamente significativas de las muestras de estudio y las diferencias puramente debidas al azar (discriminación de falsos positivos), y del b-valor (≥ 5), que es indicativo del número de veces que un determinado gen se expresa de forma diferencial con respecto a su control.

La clasificación funcional de los genes expresados de forma diferencial en las muestras objeto de estudio se llevó a cabo mediante la utilización de “Gene Ontologies classification” en el sitio web Arabidopsis Internacional Resource Gen Ontology (TAIR-GO; www.arabidopsis.org) y la web FatiGo (fatigo.bionfo.cipf.es).

El método de agrupamiento jerárquico en el programa Multiple Array Viewer, disponible en TIGR, se utilizó para identificar grupos de genes con un perfil de expresión génica similar en las condiciones experimentales analizadas (Saeed y col., 2006).

3.7.5. Validación de los resultados

La validación de los resultados se realizó por PCR semicuantitativa tal y como se detalla en el apartado 3.6.4.1. En la tabla 3.18 se indican los cebadores utilizados para la validación de los resultados del análisis transcriptómico.

Gen	Secuencia del cebador ^a
At4g02540	5'-GACTTCATGTCGCTCGTTGA-3' 5'-CAGAGAAAATGGGAAGCGAG-3'
At1g66100	5'-GTAGGTAGCCCGTCAAGCTG-3' 5'-TGGATATGGTGGTCTACGCA-3'
At3g16450	5'-CGTTCCTCTCTCCTCAGGT-3' 5'-GTCCATGGAAGCCAACAAGT-3'
At4g19500	5'-TTGGATGAGGAGTTTCCTGG-3' 5'-GCCTCAGTGCTGCCTAAAAC-3'
At1g27540	5'-TATTGAGGCTGTTTCAGGGGT-3' 5'-CATTCTCCTCTCCTTACGC-3'
At3g66400	5'-CCAGATCCGGAGCGGTGAAGC-3' 5'-CGTTCCTCTCTCCTCAGGT-3'
At1g09420	5'-TGCACTCGTCTTCCACTTTG-3' 5'-CAAGGCTTCCACTTCTGGAG-3'
At1g54040	5'-AAGGCCAGTGGATCAAGGT-3' 5'-GCGAAAGTTTTCGAAGTTGC-3'

Tabla 3.18. Cebadores usados en la validación de los resultados del análisis transcriptómico de los mutantes *fad5* y *fad3/fad7/fad8*.



Resultados

4. RESULTADOS

4.1. INMUNOLocalIZACIÓN DE LA PROTEÍNA *GmFAD7*

4.1.1. Localización subcelular de la proteína *GmFAD7* por inmunofluorescencia

Con el propósito de determinar la localización subcelular de la ω 3 desaturasa de ácidos grasos FAD7, se desarrolló un método de inmunomarcaje utilizando un anticuerpo específico diseñado contra la proteína *GmFAD7*. La obtención y las propiedades de este anticuerpo han sido descritas en un trabajo anterior de nuestro grupo (Collados, 2006; Collados y col., 2006). El anticuerpo se obtuvo contra un oligopéptido sintético situado entre los residuos 69-84 de la secuencia de la proteína *GmFAD7* madura (figura 4.1). La región elegida es específica de la proteína *GmFAD7* y presenta una homología muy baja con las tres isoformas de la proteína *GmFAD3* (*GmFAD3A*, *GmFAD3B* y *GmFAD3C*) y con la ω 3 desaturasa plastidial inducida por frío, *GmFAD8* (figura 4.1). El anticuerpo sintetizado reaccionó con un polipéptido de aproximadamente 39 kDa, que corresponde con el peso molecular aparente para la proteína FAD7 de soja. Esta banda se observó tanto en cloroplastos de células en cultivo como en plantas de soja crecidas en cámara bioclimática. Sin embargo, el anticuerpo no mostró reacción significativa en membranas microsomales, que presentan grandes cantidades de FAD3 (Collados, 2006; Collados y col., 2006). Estos resultados confirmaron la especificidad del anticuerpo obtenido en nuestro laboratorio por la ω 3 desaturasa cloroplástica FAD7.

De forma previa al ensayo de inmunofluorescencia y para poder interpretar adecuadamente los resultados de localización subcelular, se realizó un análisis de la organización estructural de los cultivos celulares fotosintéticos de soja en muestras fijadas e incluidas en resina acrílica. La organización estructural de las células fotosintéticas de soja, visualizada en secciones semifinas teñidas con azul de

Resultados

toluidina, es similar a la de células de mesófilo de hojas jóvenes de soja (Rogers y col., 1987).

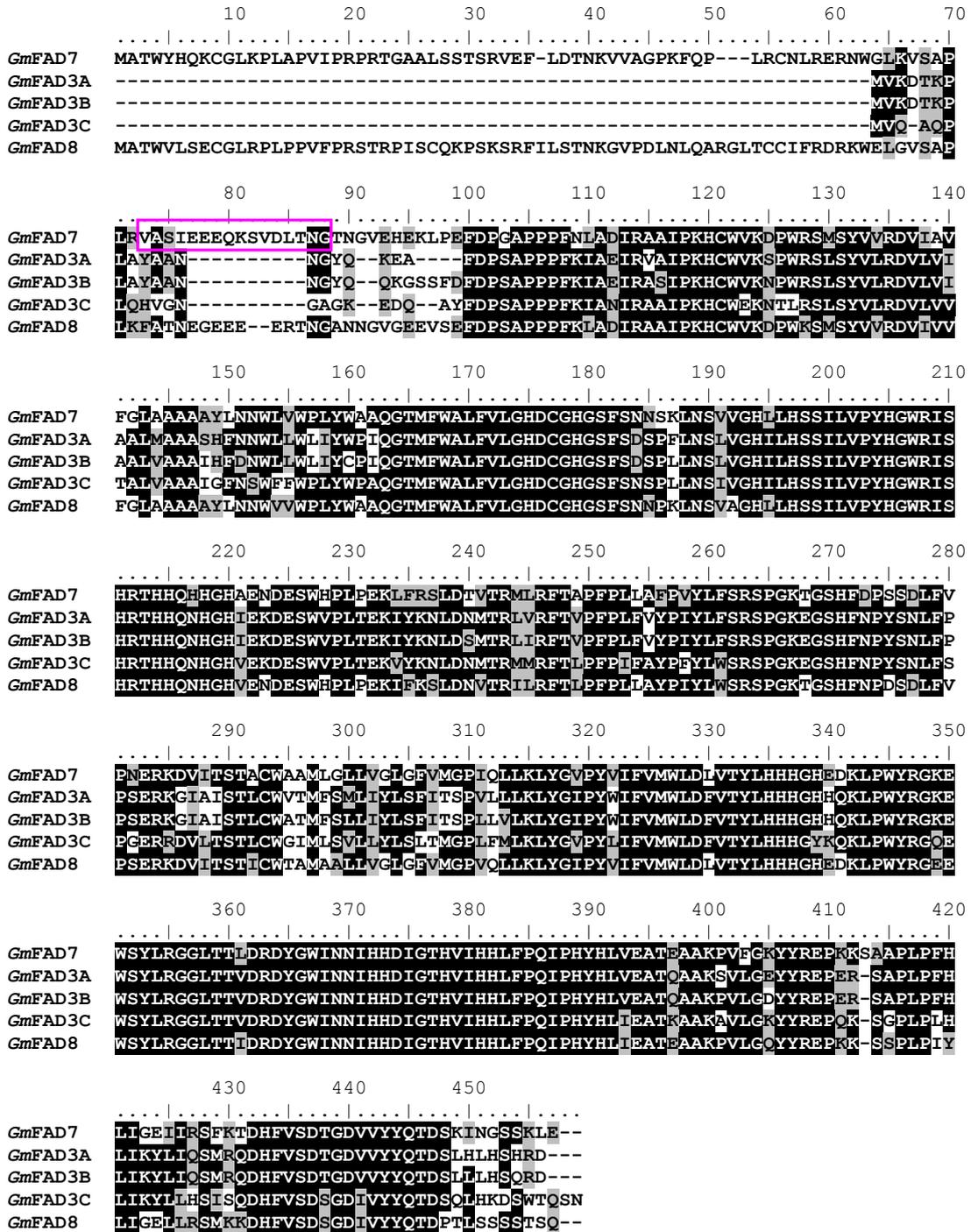


Figura 4.1. Alineamiento de las secuencias de las proteínas GmFAD3 (A, B, C), GmFAD7 y GmFAD8. Los residuos idénticos se representan sobre fondo negro y los cambios conservativos sobre fondo gris. El recuadro indica el péptido sintético utilizado para desarrollar el anticuerpo anti-GmFAD7.

Las imágenes muestran la existencia de una gran vacuola central citoplasmática, numerosos cloroplastos distribuidos a lo largo de la capa periférica del citoplasma y un núcleo elipsoide, en el que se distingue claramente el nucléolo (figuras 4.2.-A). La mayoría de los cloroplastos contienen grandes inclusiones cuyo contenido se reveló mediante tinción con I_2/K como cúmulos de almidón (figuras 4.2.-C, 4.2.-D).

Los experimentos de inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-*GmFAD7* en células de soja (figuras 4.2.-B, 4.2.-E) proporcionaron señales específicas como fluorescencia de color verde intenso en pequeñas estructuras celulares ovaladas situadas en la periferia del citoplasma (figuras 4.2.-B, 4.2.-C). No se observó marcaje ni en el núcleo, que se reveló con DAPI (intercalante específico del DNA que emite bajo irradiación UV) como fluorescencia de color azul intenso, o en la vacuola, que aparece como una gran área central sin fluorescencia (figuras 4.2.-B, 4.2.-E). La comparación del patrón de distribución del marcaje fluorescente obtenido con la organización estructural de las células de soja es compatible con una localización cloroplástica de la proteína *GmFAD7*. Con el propósito de identificar los cloroplastos en las mismas secciones utilizadas para los experimentos de inmunofluorescencia, las muestras se excitaron con líneas específicas para la autofluorescencia de la clorofila, visualizándose los cloroplastos como señales definidas de color rojo (figuras 4.2.-F, 4.2.-I, 4.2.-L). La superposición de las señales fluorescentes verde y roja mostró la colocalización de ambas señales en color amarillo y, por tanto, la localización del antígeno *GmFAD7* en los cloroplastos (figura 4.2.-G). Además no se observaron spots individuales de color verde o rojo en las imágenes combinadas, lo que sugiere que la colocalización fue completa. El área de color oscuro visualizada en el interior de los cloroplastos corresponde probablemente con los gránulos de almidón descritos anteriormente y revelados por técnicas citoquímicas específicas (figuras 4.2.-C, 4.2.-D).

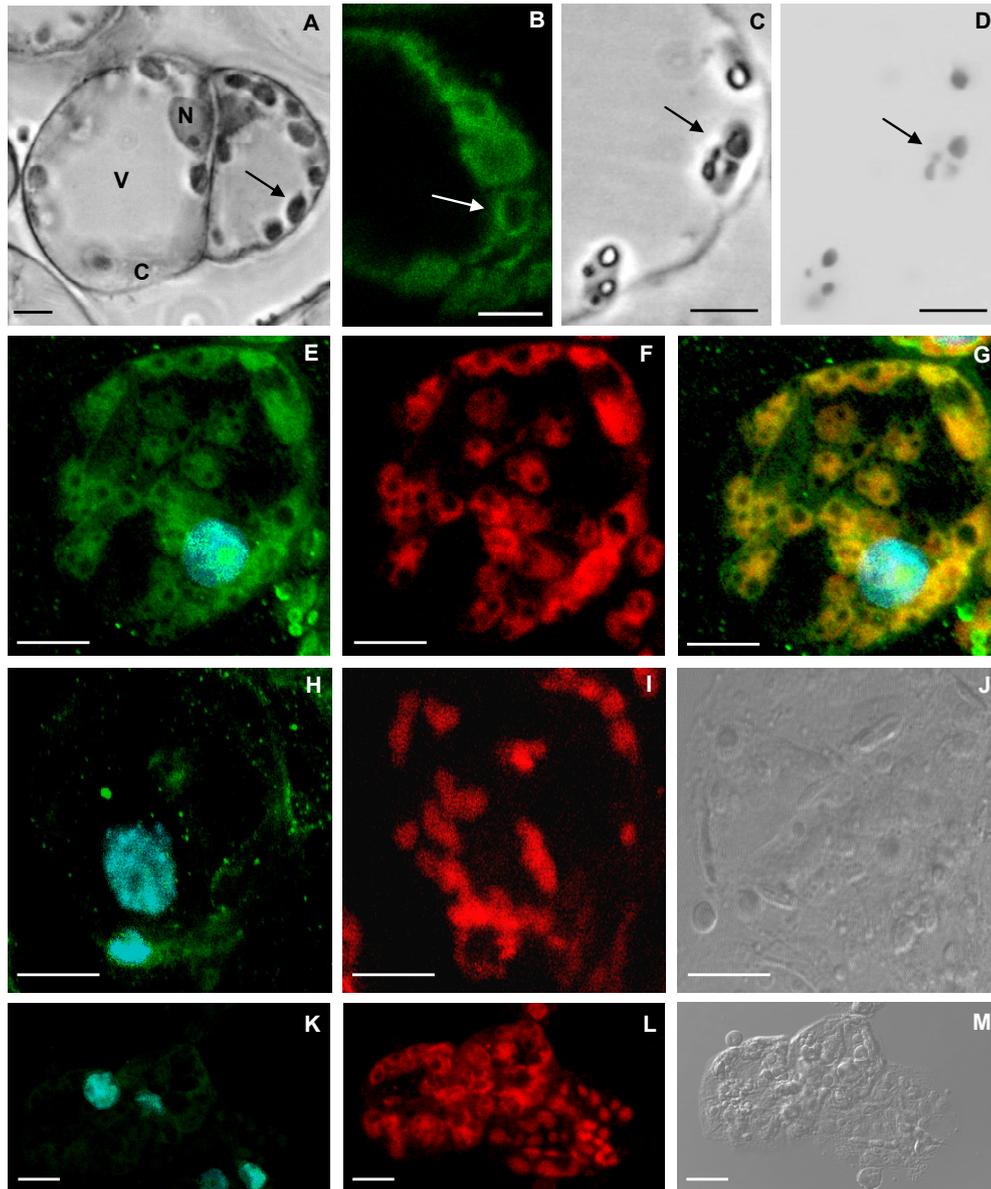


Figura 4.2. Inmunolocalización subcelular de la proteína GmFAD7. (A) Organización estructural de células fotosintéticas de soja en cultivo, corte de Histioselin tras tinción con azul de toluidina. Vacuola (V), citoplasma (C), núcleo (N) y cloroplastos (flechas); (B) Inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-GmFAD7 mostrada como señal verde en estructuras citoplasmáticas redondeadas (flechas); (C y D) Organización estructural de una zona citoplasmáticas similar a la mostrada en (B). (C) Sección semifina de Histioselin visualizada bajo contraste de fase tras tinción con I_2IK para almidón. (D) Depósitos de almidón observados como inclusiones oscuras en campo claro tras tinción con I_2IK ; (E-M) Observación de secciones de vibratomo por microscopía láser confocal. Las imágenes representan las proyecciones máximas de series de 15 a 20 secciones ópticas. Los núcleos se visualizaron con DAPI (azul). (E) Inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-GmFAD7 (verde) en células fotosintéticas de soja.(F) Autofluorescencia de la clorofila (señal en rojo). (G) La colocalización de las imágenes E y F en color amarillo muestra la localización cloroplástica de GmFAD7. (H) Control con el anticuerpo anti-GmFAD7 bloqueado con péptido sintético. (I) Autofluorescencia de la clorofila (señal en color rojo). (J) Imagen de contraste de interferencial (DIC) de la correspondiente sección. (K) Control sin el anticuerpo primario. (L) Autofluorescencia de la clorofila (señal en color rojo). (M) Imagen de contraste de interferencial (DIC) de la correspondiente sección. La escala representa 5 μm en las figs. B-D y 10 μm en las figs. A y E-M.

4.1.1.1. Análisis de la especificidad de la señal de inmunofluorescencia

Para verificar la especificidad de la señal de inmunofluorescencia se realizaron diversos experimentos control. Uno de ellos fue la *inmunodepleción* que consiste en realizar el mismo experimento de inmunofluorescencia pero pre-incubando el anticuerpo anti-*GmFAD7* con el oligopéptido contra el que fue diseñado. Los ensayos de inmunofluorescencia con este anticuerpo pre-bloqueado anularon la señal verde en los cloroplastos intactos de células de soja, visualizados por la autofluorescencia de su propia clorofila (señal roja; figuras 4.2.-H, 4.2.-I). Estos resultados proporcionaron una evidencia experimental adicional a la especificidad del anticuerpo. En el otro experimento control realizado se reemplazó el anticuerpo *GmFAD7* por tampón PBS y no se observó marcaje significativo (figuras 4.2.-K, 4.2.-L).

4.1.2. Fraccionamiento bioquímico

Con el objetivo de confirmar mediante técnicas bioquímicas el resultado de inmunolocalización y de analizar la distribución de la proteína *GmFAD7* en los diferentes compartimentos subcloroplásticos, se llevó a cabo un fraccionamiento bioquímico del cloroplasto seguido de un análisis de las distintas fracciones subcloroplásticas obtenidas (estroma, envuelta y tilacoides) mediante western blot, utilizando el anticuerpo anti-*GmFAD7*. Para ello, los cloroplastos intactos aislados de hojas de soja se rompieron en un medio hipotónico y las distintas fracciones subcloroplásticas se separaron en un gradiente discontinuo de sacarosa (0,46 M, 1 M y 1,2 M). La calidad del fraccionamiento se comprobó mediante western blot utilizando anticuerpos específicos diseñados contra marcadores de cada fracción subcloroplástica. Así, la proteína Tic110 se utilizó como marcador específico de envuelta (Jackson y col., 1998). La proteína LHCII, antena principal del fotosistema II, se utilizó como marcador tilacoidal. Finalmente, un anticuerpo contra la enzima ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCo), la proteína más abundante del estroma, se utilizó como marcador de esta fracción subcloroplástica.

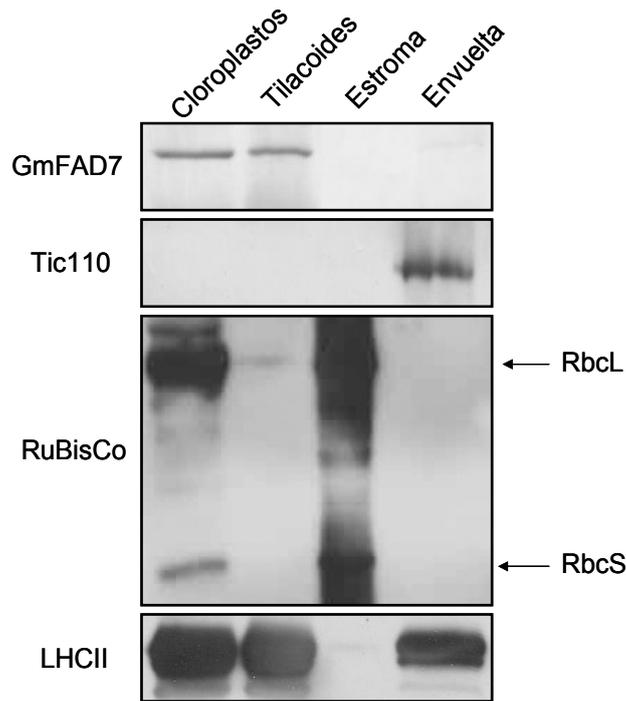


Figura 4.3. Detección inmunológica de las proteínas FAD7, Tic110, Rubisco y LHCII en las distintas fracciones cloroplásticas aisladas a partir de hojas de soja. En el análisis por western-blot con los anticuerpos anti-GmFAD7 y anti-Tic110, se cargaron 19 μ g, 16 μ g, 12,5 μ g y 19 μ g de proteína total en cloroplastos, tilacoides, estroma y envuelta respectivamente. En el análisis por western-blot con los anticuerpos anti-RuBisCo y anti-LHCII se cargó en cada pocillo la mitad de cantidad de proteína total que en el caso anterior.

Como muestra la figura 4.3, la proteína Tic110 se detectó únicamente en la fracción purificada de envuelta pero fue difícilmente visible en el cloroplasto. El hecho de que dicha proteína no se detectara en los cloroplastos puede deberse probablemente a su baja abundancia con respecto a otras proteínas plastidiales. La enzima RuBisCo está presente en los cloroplastos y en la fracción estromática pero no se detectó en el resto de fracciones, indicando que el fraccionamiento bioquímico fue correcto. Por último, las fracciones tilacoidales estaban enriquecidas en proteína LHCII tal y como se esperaba. Además, una cantidad significativa de proteína LHCII se detectó en la fracción purificada de envuelta. Diversos estudios de proteómica han descrito la presencia de la proteína LHCII en fracciones de envuelta como parte contaminante de las preparaciones extremadamente puras utilizadas para los

ensayos (Ferro y col., 2003). Sin embargo, no puede descartarse que parte de este reservorio de LHCII encontrado repetidamente en las fracciones de envuelta pudiera representar una fracción de proteína LHCII en tránsito a través de su ruta de transporte a la membrana tilacoidal.

Como la fuente más probable de contaminación en las fracciones de envuelta obtenidas durante el fraccionamiento bioquímico del cloroplasto es una contaminación cruzada con las membranas tilacoidales, se decidió determinar el grado de contaminación presente en la envuelta del cloroplasto. Puesto que la clorofila es uno de los componentes tilacoidales más importantes, se determinó la presencia de este pigmento en las preparaciones enriquecidas de envuelta. En base a proteína, el ratio estimado entre el contenido de clorofila detectado en la envuelta purificada respecto al de la membrana tilacoidal fue de 1/25. Este valor se encuentra dentro del rango aportado por otros grupos que aíslan fracciones de envuelta para realizar estudios de proteómica (Ferro y col., 2003; Froehlich y col., 2003). Teniendo en cuenta esta información, se estimó que la contaminación tilacoidal en la envuelta se encontraba entre un 5-10 % dependiendo de las preparaciones, indicando que dicha fracción estaba muy pura. Todos estos datos indican que el fraccionamiento bioquímico fue correcto.

Cuando se utilizó el anticuerpo contra la proteína *GmFAD7* para determinar su distribución en las distintas fracciones subcloroplásticas, la mayor cantidad de proteína *GmFAD7* se encontró en la membrana del tilacoide (figura 4.3). También se detectó una pequeña cantidad de *GmFAD7* en la fracción purificada de envuelta. Sin embargo, la proteína no se detectó en la fracción estromática. Por lo tanto, el fraccionamiento bioquímico indicó que la ω 3 desaturasa cloroplástica *GmFAD7* estaba localizada preferentemente en el tilacoide.

4.2. CARACTERIZACIÓN DE LA FAMILIA FAD7 DE SOJA

4.2.1. Identificación de un nuevo gen *GmFAD7* en soja

En 1993, Yadav y col. aislaron mediante escrutinio genético de una librería de cDNA de semillas de soja en desarrollo una única secuencia *GmFAD7* (denominada en esta tesis, *GmFAD7-1a* o L22965) homóloga al gen *FAD7* de *Arabidopsis thaliana* descrito previamente. Sin embargo, cuando en nuestro laboratorio utilizamos la base de datos DFCI (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>) para realizar búsquedas tipo BLAST de secuencias de soja con homología al gen *GmFAD7-1a*, el programa proporcionó varias secuencias consenso (TC204932, TC204936 y BE610928) cuyo análisis mostró la existencia de múltiples cambios de residuos de nucleótidos respecto a la secuencia descrita previamente por Yadav y col., 1993. Así, el análisis *in silico* en la base de datos citada anteriormente parecía sugerir la presencia de diversos genes *FAD7* en el genoma de soja. Con el fin de comprobar la existencia de los posibles genes *FAD7* y, ayudándonos de los datos de secuencia procedentes del DFCI, se diseñaron distintas estrategias tanto de PCR-RACE como de PCR semicuantitativa. Estos experimentos se llevaron a cabo sobre cDNA de hojas trifoliales de soja de 18 días de edad por cuanto, a priori, es en este tejido donde cabría esperar un máximo de expresión de los genes *GmFAD7*. Tras el análisis pertinente, se identificaron dos secuencias distintas que codificaban proteínas con un alto grado de identidad a la proteína *FAD7* de soja descrita anteriormente. En la figura 4.4 se muestra un alineamiento a nivel de proteína de las dos nuevas secuencias aisladas y la *GmFAD7-1a* previamente anotada. Una de las secuencias nucleotídicas codificaba una proteína de 453 aminoácidos que presentaba una homología del 98 % con *GmFAD7-1a*. Esta proteína tenía un peso molecular teórico de 51,2 kDa y un punto isoeléctrico de 8,45. La segunda secuencia de nucleótidos codificaba una proteína de 453 aminoácidos que tenía un peso molecular teórico de 51,2 kDa y un punto isoeléctrico de 7,80 y presentaba un grado de homología del 92,3 % con *GmFAD7-1a*. A partir de este

momento, decidimos designar a la primera secuencia aislada como *GmFAD7-1b* por su elevada homología con *GmFAD7-1a*. La segunda secuencia se designó como *GmFAD7-2*. Ambas secuencias se depositaron en la base de datos GenBank y sus números de acceso correspondientes son GQ144962 y EU621390, respectivamente.

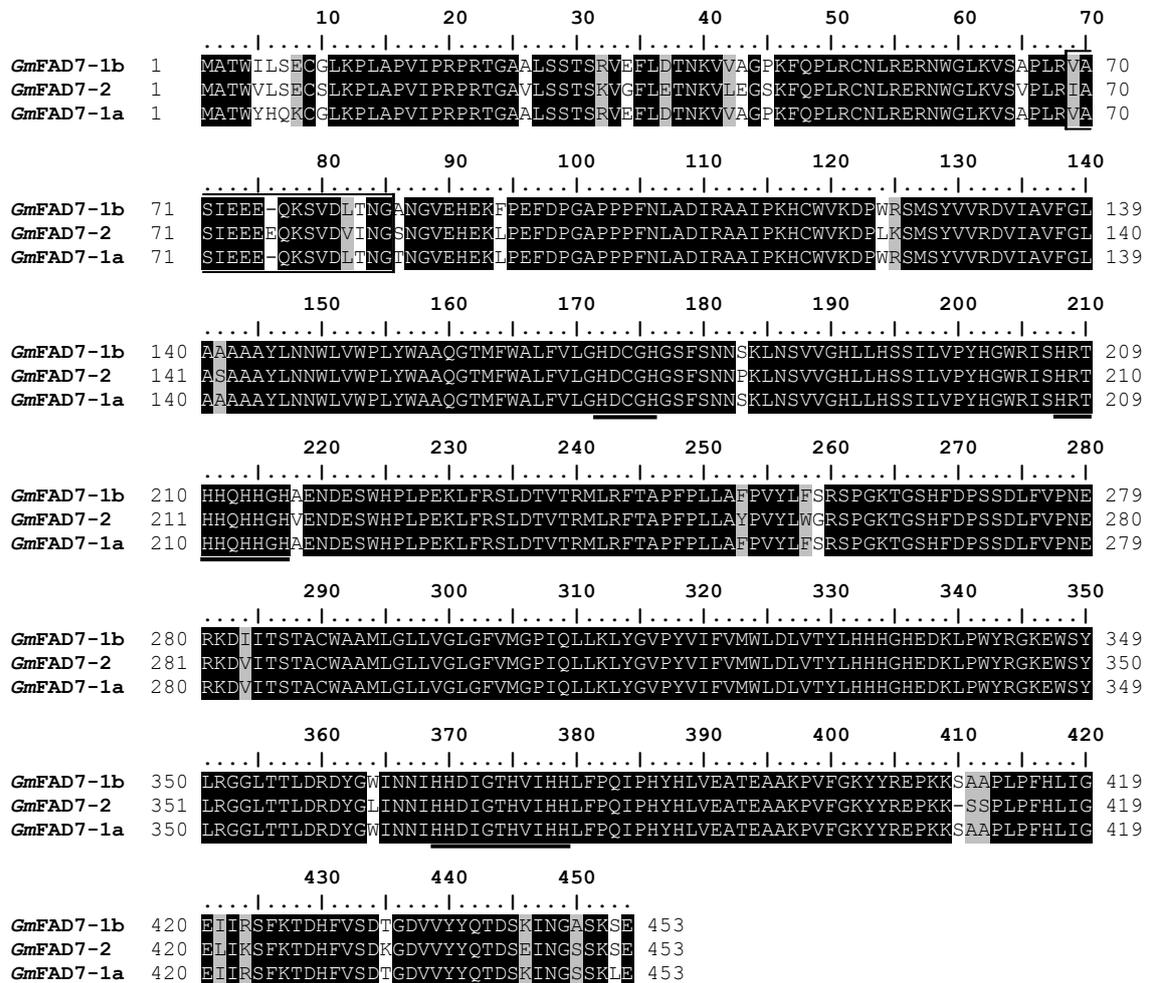


Figura 4.4. Alineamiento de las secuencias de las proteínas *GmFAD7-1b*, *GmFAD7-2* y *GmFAD7-1a*. La secuencia *GmFAD7-1a* fue obtenida por Yadav y col. (1993). (Su número de acceso GenBank es L22965). Los residuos idénticos se representan sobre fondo negro y los cambios conservativos sobre fondo gris. El recuadro indica la localización de la secuencia del péptido sintético utilizado para desarrollar el anticuerpo anti-*GmFAD7*. Las tres cajas de histidinas características de las desaturasas se muestran subrayadas.

Cuando el software ChloroP se utilizó para predecir la localización subcelular de *GmFAD7-1a*, *GmFAD7-1b* y *GmFAD7-2*, el programa predijo la presencia de un

Resultados

péptido señal cloroplástico en las secuencias y, por lo tanto, una localización cloroplástica de las proteínas *GmFAD7* (tabla 4.1).

Nombre de la proteína	Longitud (Aa)	Predicción de péptido señal cloroplástico	Longitud del péptido señal (Aa)	Score
<i>GmFAD7-1a</i>	453	Sí	42	0.523
<i>GmFAD7-1b</i>	453	Sí	42	0.502
<i>GmFAD7-2</i>	453	Sí	27	0.517

Tabla 4.1. Análisis de la predicción de la presencia y localización del péptido señal cloroplástico en las secuencias *GmFAD7-1a*, *GmFAD7-1b* y *GmFAD7-2* mediante la utilización del programa *ChloroP*.

Además, como puede observarse en la figura 4.4, las proteínas *GmFAD7-1b* y *GmFAD7-2* poseen un extremo amino-terminal con las principales características de un péptido señal cloroplástico: un alto contenido de residuos hidroxilados (Ser, Thr), un bajo contenido de residuos ácidos y un dipéptido Met-Ala conservado en el extremo N-terminal. También es importante destacar que la secuencia del extremo amino-terminal de las dos nuevas secuencias identificadas (MATWILSE en *GmFAD7-1b* y MATWVLSE en *GmFAD7-2*) es más parecido al de las ω 3 desaturasas cloroplásticas de otras especies vegetales que al extremo N-terminal de la proteína *GmFAD7-1a* (MATWYHQK). Además, otra característica esencial de estas proteínas fue la presencia de tres clusters de histidinas conservados en su secuencia, que son esenciales para la actividad de las desaturasas ya que actúan como potenciales ligandos de los átomos de hierro no hemínicos (Shanklin y Cahoon, 1998). Por otro lado, el uso de herramientas bioinformáticas (Pro-THMM) permitió predecir la existencia de cuatro regiones transmembrana en ambas proteínas *GmFAD7*, lo que es consistente con el modelo topológico de plegamiento propuesto para estas proteínas (Dyer y Mullen, 2001; Tang y col., 2005).

El alineamiento de estas dos nuevas secuencias *GmFAD7* deducidas con la secuencia de la ω 3 desaturasa cloroplástica *FAD8* a nivel de proteína mostró que *GmFAD7-1b* y *GmFAD7-2* presentaban una homología del 77% con la proteína

GmFAD8 (tabla 4.2). Sin embargo, el grado de homología obtenido entre estas dos nuevas secuencias y *GmFAD7-1a* fue mayor que el obtenido con *GmFAD8*, sugiriendo que tanto *GmFAD7-1b* como *GmFAD7-2* representan genes que codifican ω 3 desaturasas cloroplásticas del tipo FAD7 (tabla 4.2).

	<i>GmFAD7-1a</i>	<i>GmFAD7-1b</i>	<i>GmFAD7-2</i>	<i>GmFAD8</i>
<i>GmFAD7-1a</i>	100	98	92,3	76,5
<i>GmFAD7-1b</i>		100	92,5	77,2
<i>GmFAD7-2</i>			100	77,6
<i>GmFAD8</i>				100

Tabla 4.1. Porcentaje de identidad a nivel de proteína entre las distintas ω 3 desaturasas cloroplásticas de soja.

Para dilucidar la relación filogenética de las proteínas *GmFAD7-1a* y *GmFAD7-2*, sus secuencias de aminoácidos se alinearon con las de otras ω 3 desaturasas cloroplásticas de diferentes especies vegetales presentes en las bases de datos y, seguidamente, se generó un árbol filogenético (figura 4.5). El análisis filogenético reveló la existencia de dos clusters diferentes para la familia de las ω 3 desaturasas cloroplásticas: un primer grupo integrado por las ω 3 desaturasas cloroplásticas de algas verdes y un segundo grupo integrado por las ω 3 desaturasas cloroplásticas de plantas. A su vez, este último cluster se dividió en dos grupos distintos, de acuerdo a la distribución convencional de plantas, separando las especies monocotiledóneas de las especies dicotiledóneas. Como se esperaba, las especies de leguminosas tales como *Glycine max*, *Vigna unguiculata* o *Medicago truncatula* se agruparon en una misma rama del dendograma. Además, el estudio filogenético mostró que las proteínas de tipo *GmFAD7-1* y de tipo *GmFAD7-2* se localizan en dos subgrupos claramente diferenciados, corroborando así las diferencias encontradas a nivel genético entre los diferentes genes *GmFAD7*. Por otro lado, la proteína *GmFAD8* se agrupaba en una rama separada, junto con la proteína *VuFAD8*, resultado consistente con la conclusión extraída a partir de la comparación del porcentaje de homología entre las ω 3 desaturasas cloroplásticas.

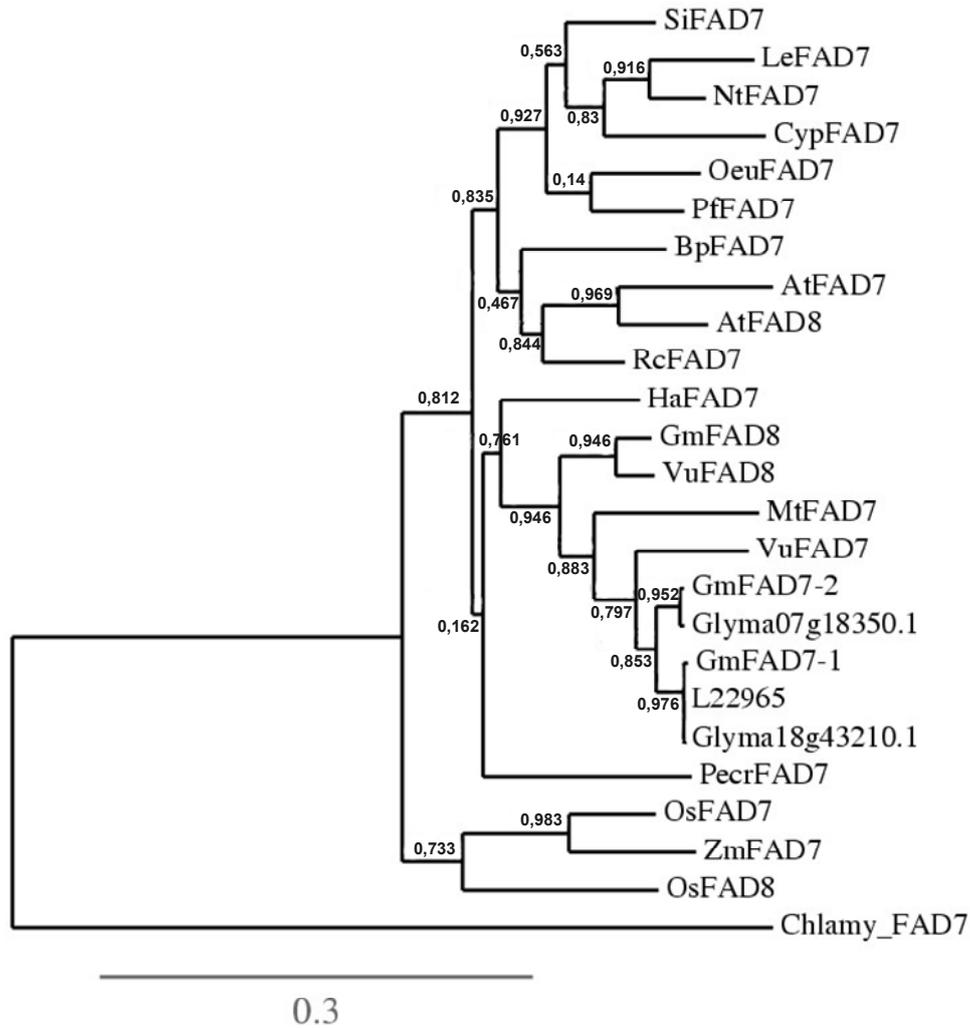


Figura 4.5. Análisis filogenético de las ω 3 desaturasas de ácidos grasos cloroplásticas. El árbol filogenético se realizó con el software PhyML y se utilizaron 500 replicas por bootstrap. Los nombres y los números de acceso GenBank de las secuencias utilizadas para el análisis son: At, *Arabidopsis thaliana* (AtFAD7, D14007; AtFAD8, L27158); Bp, *Betula pendula* (BpFAD7, AY135565); Chlamy, *Chlamydomonas reinhardtii* (ChlamyFAD7, XM0011689611); Cyp, *Cyclamen persicum* (CypFAD7, AB250917); Gm, *Glycine max* (GmFAD7-1a, L22965; GmFAD7-1 cv. *Volania*, GQ144962; GmFAD7-2 cv. *Volania*, EU621390; Glyma0718350.1 y Glyma18g4320.1); GmFAD8, TC204934); Ha, *Helianthus annuus* (HaFAD7, AY254858); Le, *Lycopersicon esculentum* (LeFAD7, AY157317); Mt, *Medicago truncatula* (TC127685+TC132770+TC136381); Nt, *Nicotiana tabacum* (NtFAD7, D79979); Oeu, *Olea europea* (OeuFAD7, DQ788674); Os, *Oriza sativa* (OsFAD7, AB232382; OsFAD8, AK062022); Pectr, *Petroselinum crispum* (PcFAD7, U75745); Rc, *Ricinus communis* (RcFAD7, L25897); Si, *Sesamum indicum* (SiFAD7, V25817); Vu, *Vigna unguiculata* (VuFAD7, EU180596; VuFAD8, EU180595); Zm, *Zea mays* (ZmFAD7, D6395).

Las diferencias encontradas a nivel de nucleótidos entre *GmFAD7-2* y *GmFAD7-1a* o *GmFAD7-1b* son consistentes con la hipótesis de que *GmFAD7-2* representa un nuevo gen que codifica para uno de los miembros de la familia multigénica *GmFAD7* de soja. Sin embargo, el elevado grado de homología encontrado entre *GmFAD7-1a* y *GmFAD7-1b* sugiere que ambas secuencias podrían representar el mismo gen con cambios polimórficos asociados al cultivar de soja utilizado para el análisis. Cabe destacar que todos los datos de secuencia mostrados en esta tesis doctoral se han obtenido a partir de plantas de soja del cultivar Volania y, desafortunadamente, no se ha podido obtener información del cultivar de soja usado para aislar la secuencia del gen *GmFAD7-1a* (Yadav y col., 1993). Por lo tanto, para confirmar nuestra hipótesis, decidimos utilizar los cebadores específicos del gen *GmFAD7-1b* para llevar a cabo los mismos experimentos de RT-PCR mencionados anteriormente en dos cultivares distintos de soja disponibles en nuestro laboratorio, Safrana y Corsoy. Un alineamiento de las secuencias de proteína *GmFAD7-1* obtenidas tras el análisis correspondiente en los diferentes cultivares se muestra en la figura 4.6. La comparación de las secuencias proteicas de *GmFAD7-1b* de la variedad Volania y Corsoy mostró la existencia de catorce cambios de residuos aminoacídicos, seis de los cuales eran cambios conservativos. Algunos de los cambios encontrados entre la secuencia *GmFAD7-1b* del cultivar Corsoy respecto a la secuencia *GmFAD7-1b* del cultivar Volania eran idénticos a los residuos presentes en la secuencia *GmFAD7-1a* anotada por Yadav. De forma similar, algunos de los cambios presentes en la secuencia *GmFAD7-1b* del cultivar Volania respecto a la del cultivar Corsoy también eran idénticos a los residuos de *GmFAD7-1a* (figura 4.6). Todos estos datos indican que las diferencias encontradas entre las secuencias *GmFAD7-1* pueden atribuirse a cambios polimórficos específicos del cultivar más que a la presencia de genes adicionales *GmFAD7-1*. Por ello, a partir de este momento, decidimos no hacer diferencias entre *GmFAD7-1a* y *GmFAD7-1b* y, simplemente, designarlos como *GmFAD7-1*.

Resultados

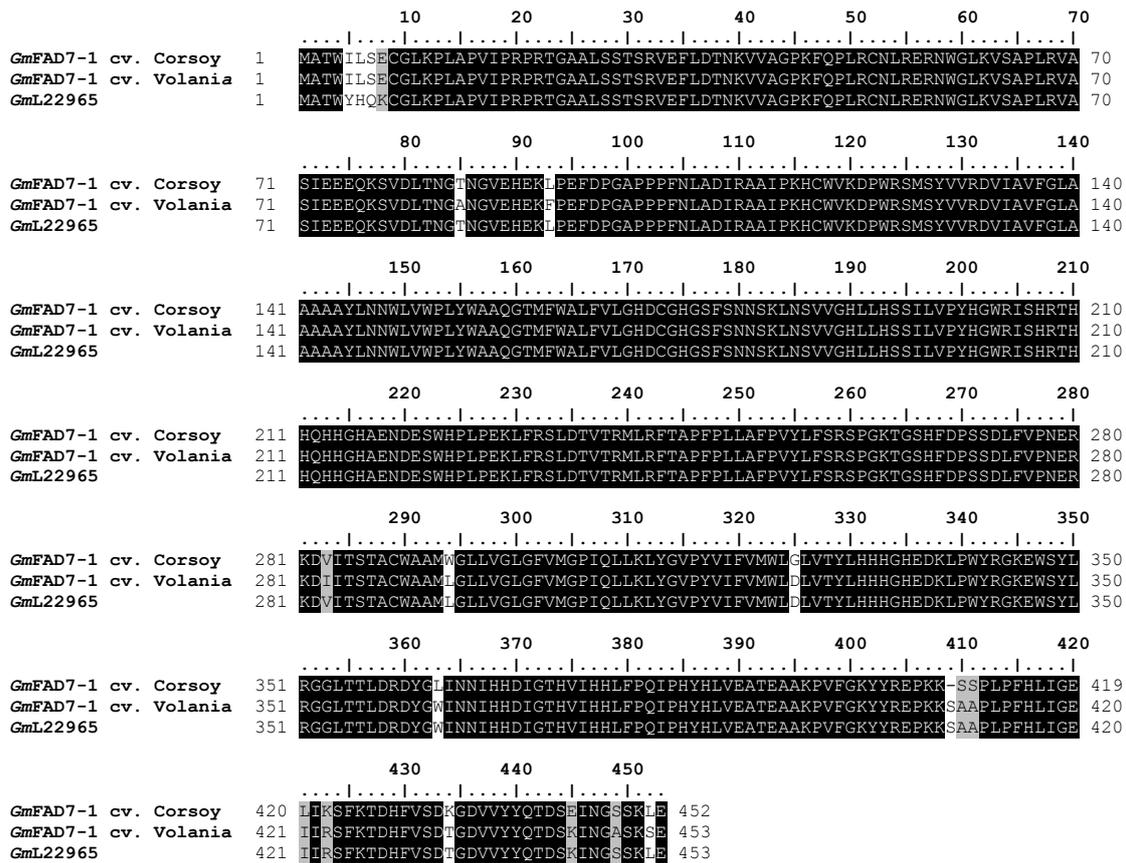


Figura 4.6. Alineamiento de la secuencia de la proteínas GmFAD7-1 de los diferentes cultivares de soja. Las secuencias proteicas de GmFAD7-1 de los cultivares Volania y Corsoy han sido obtenidas en esta tesis doctoral. La secuencia L22965 fue obtenida por Yadav y col. (1993). Los residuos idénticos se representan sobre fondo negro y los cambios conservativos sobre fondo gris.

Es importante mencionar que cuando se realizó un análisis similar con las secuencias de GmFAD7-2, sólo se detectaron tres sustituciones, siendo una de ellas un cambio conservativo (figura 4.7). Estos resultados sugieren que durante la evolución la variabilidad genética se ha focalizado en el gen GmFAD7-1 más que en el gen GmFAD7-2.

GmFAD7-2 cv. Volania	1	MATWVLSSECSLKPLAPVIPRPRTGAVLSSTSKVGFLETNKVLEGSKFQPLRCNLRERNWG	60	
GmFAD7-2 cv. Williams	82	1	MATWVLSSECSLKPLAPVIPRPRTGAVLSSTSKVGFLETNKVLEGSKFQPLRCNLRERNWG	60
GmFAD7-2 cv. Volania	61	LKVSVPRIASIEEEEQKSVVDVINGSNGVEHEKLEPFDPGAPPPFNLADIRAAIPKHCWV	120	
GmFAD7-2 cv. Williams	82	61	LKVSVPRIASIEEEEQKSVVDVINGSNGVEHEKLEPFDPGAPPPFNLADIRAAIPKHCWV	120
GmFAD7-2 cv. Volania	121	KDPLKMSYVVRDVI AVFGLASAAA YLNNWLWVPLYWAAQGTMFWALFVLGHDCGHGSFS	180	
GmFAD7-2 cv. Williams	82	121	KDPLKMSYVVRDVI AVFGLASAAA YLNNWLWVPLYWAAQGTMFWALFVLGHDCGHGSFS	180
GmFAD7-2 cv. Volania	181	NNPKLNSVVGHLHSSILVPHYGWRI SHRTHHQHHGHVENEDESWHPLPEKLFRLDVTVTR	240	
GmFAD7-2 cv. Williams	82	181	NNPKLNSVVGHLHSSILVPHYGWRI SHRTHHQHHGHVENEDESWHPLPEKLFRLDVTVTR	240
GmFAD7-2 cv. Volania	241	MLRFTAPFPFLAYPVYLWGRSPGKTGSHFDPSSDLFVPNERKDVTITSTACWAAMLGLLVG	300	
GmFAD7-2 cv. Williams	82	241	MLRFTAPFPFLAYPVYLWGRSPGKTGSHFDPSSDLFVPNERKDVTITSTACWAAMLGLLVG	300
GmFAD7-2 cv. Volania	301	LGFMGPIQLLKLYGVPYVIFVMWLDLVTYLHHHGHE	360	
GmFAD7-2 cv. Williams	82	301	LGFMGPIQLLKLYGVPYVIFVMWLDLVTYLHHHGHE	360
GmFAD7-2 cv. Volania	361	DYGLINNIHHDIGTHVIHHLFPQIPHYHLVEATEAAKPVFGKYYREPKKSSPLPFHLIGE	420	
GmFAD7-2 cv. Williams	82	361	DYGLINNIHHDIGTHVIHHLFPQIPHYHLVEATEAAKPVFGKYYREPKKSSPLPFHLIGE	420
GmFAD7-2 cv. Volania	421	LIKSFKTDHFVSDKGDVYYQTDSEIN	453	
GmFAD7-2 cv. Williams	82	421	LIRSFKTDHFVSDKGDVYYQTDSEIN	453

Figura 4.7. Alineamiento de la secuencia de la proteína GmFAD7-2 de dos cultivares diferentes de soja. La secuencia de la proteína GmFAD7-2 cv. Volania ha sido obtenida en esta tesis doctoral. La secuencia GmFAD7-2 cv. Williams se ha obtenido de la base de datos del genoma de soja. Los residuos idénticos se representan sobre fondo negro y los cambios conservativos sobre fondo gris.

4.2.2. Caracterización genómica de los genes GmFAD7 de soja

Con el fin de caracterizar en profundidad ambas secuencias GmFAD7 a nivel genómico, llevamos a cabo distintos experimentos de PCR sobre DNA genómico de soja cv. Volania utilizando pares de cebadores específicos para cada uno de los genes: GSP9/GSP8 para GmFAD7-1 y GSP7/GSP4 para GmFAD7-2. Como resultado de la reacción de amplificación, se obtuvo en ambos casos un único fragmento de 1200-1300 pares de bases, que representaba el 57% de la secuencia completa de los genes GmFAD7-1 y GmFAD7-2. Ambos fragmentos se clonaron, se secuenciaron y, finalmente, se analizaron con los programas bioinformáticos adecuados para determinar la estructura exón-intrón de los genes GmFAD7. Los fragmentos genómicos parciales de GmFAD7-1 y GmFAD7-2 presentaban una estructura exón-intrón idéntica formada por cuatro exones y tres intrones. El hecho de que ambos genes FAD7 presentaran la misma estructura exón/intrón no es sorprendente ya que probablemente se originaron por un evento de duplicación del

Resultados

genoma de soja durante la evolución a partir de un ancestro común (Shoemaker y col., 1996). El tamaño de los exones e intrones de los genes *GmFAD7* se detalla en la tabla 4.3.

Nombre	Tamaño (bp)		Número de diferencias a nivel de nucleótidos
	<i>GmFAD7-1</i>	<i>GmFAD7-2</i>	
Exones			
Exón 1	519	521	32
Exón 2	90	90	3
Exón 3	67	67	1
Exón 4	93	93	5
Intrones			
Intrón I	121	129	16
Intrón II	319	310	66
Intrón III	112	112	13

Tabla 4.3. Tamaño de los exones y los intrones de los genes *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2* identificados experimentalmente. La última columna de la tabla indica el número de diferencias encontradas entre los exones e intrones de los genes *GmFAD7* a nivel de nucleótidos.

Todos los intrones conservan el dinucleótido GT en el inicio de su secuencia y el dinucleótido AG en el final de la misma, lo que indica que siguen la regla GT/AG y, por lo tanto, pertenecen al grupo de intrones de tipo II (figura 4.8). La comparación de las secuencias exónicas e intrónicas de ambos genes *GmFAD7* a nivel de nucleótidos permitió observar que las principales diferencias se encontraban en las regiones intrónicas, donde se observaban tanto inserciones como sustituciones de nucleótidos (figura 4.8). Estas diferencias en el tamaño y en la secuencia de los intrones sugerían, por lo tanto, que *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2* eran genes diferentes.

La secuencia completa del genoma de soja se ha liberado recientemente y está disponible en la base de datos www.phytozome.net (Schmutz y col., 2010). Por ello, se decidió utilizar esta base de datos de soja para poder contrastar y completar la información concerniente a ambos genes *GmFAD7*. Los resultados procedentes del análisis *in silico* en la base de datos del genoma de soja fueron consistentes con nuestros datos experimentales (figura 4.9)

<i>GmFAD7-1</i>	genómico	1	ATGGCAACTTGGGTTATTATCAGAAATGGCTTGAAGCCTCTTGCTCCAGTAATTCCTAGACCTAGAAGCTGGGGCTGGCTTT	80
<i>GmFAD7-2</i>	genómico	1	ATGGCAACTTGGGTTATTATCAGAAATGGCTTGAAGCCTCTTGCTCCAGTAATTCCTAGACCTAGAAGCTGGGGCTGGCTTT	80
<i>GmFAD7-1</i>	genómico	81	GTCCAGCACCTCAAGGGTTGATTTTTTGGGACAAAACAAGGTTATGGGAGGTTCTAAGTTTCAACCTTTGAGGTGAACC	160
<i>GmFAD7-2</i>	genómico	81	GTCCAGCACCTCAAGGGTTGATTTTTTGGGACAAAACAAGGTTATGGGAGGTTCTAAGTTTCAACCTTTGAGGTGAACC	160
<i>GmFAD7-1</i>	genómico	161	TTAGGGAGAGGAATGGGGCTCAAAAGTGAGTCCCTTTGAGGCTTGCTTCCATTGAAGAGGAGCAAAGAGTGT	237
<i>GmFAD7-2</i>	genómico	161	TTAGGGAGAGGAATGGGGCTCAAAAGTGAGTCCCTTTGAGGCTTGCTTCCATTGAAGAGGAGCAAAGAGTGT	240
<i>GmFAD7-1</i>	genómico	238	GATTTAAACAATGGGCTAAATGGGTTGAGCATGAGAAGTTCCAGAATTTGACCCTGGTGTCTCCACCATTCAACTT	317
<i>GmFAD7-2</i>	genómico	241	GATTTAAACAATGGGCTAAATGGGTTGAGCATGAGAAGTTCCAGAATTTGACCCTGGTGTCTCCACCATTCAACTT	320
<i>GmFAD7-1</i>	genómico	318	GGCTGATATTAGAGCAGCATTTCCAAGCATTGCTGGTGAAGGACCCTTGGGCGTCCATGAGCTATGTGGTGAGGGATG	397
<i>GmFAD7-2</i>	genómico	321	AGCTGATATTAGAGCAGCATTTCCAAGCATTGCTGGTGAAGGACCCTTGGGCGTCCATGAGCTATGTGGTGAGGGATG	400
<i>GmFAD7-1</i>	genómico	398	TGATTGCTGTCTTTGGTTTGGCTGCTGCTGCTGCTATCTCAATAATGGTGGTGGTGGCCCTCTCTATTGGGCTGCTCAA	477
<i>GmFAD7-2</i>	genómico	401	TGATTGCTGTCTTTGGTTTGGCTGCTGCTGCTGCTATCTCAATAATGGTGGTGGTGGCCCTCTCTATTGGGCTGCTCAA	480
<i>GmFAD7-1</i>	genómico	478	GGCACTATGTTCTGGGCTCTGTTTCTTGGTCATGATTTACTATACTTAACTATTTTCTTTTCTTCATTTGTT	553
<i>GmFAD7-2</i>	genómico	481	GGCACTATGTTCTGGGCTCTGTTTCTTGGTCATGATTTACTATACTTAACTATTTTCTTTTCTTCATTTGTT	560
<i>GmFAD7-1</i>	genómico	554	AAAATTGGATGTAGCTAGATTTGGAGTGCAGAAATGGGTTTCAAAATTTGTGACTTGATGATTTTCTTTGTTGTTT	629
<i>GmFAD7-2</i>	genómico	561	AAAATTGGATGTAGCTAGATTTGGAGTGCAGAAATGGGTTTCAAAATTTGTGACTTGATGATTTTCTTTGTTGTTT	640
<i>GmFAD7-1</i>	genómico	630	TGTGTTTCAGTGGTCATGGTGGCTTTTCAAAACAATCCAATTTGAACAGTGTGTGGTGCATCTGCATCTTCTTCAATT	709
<i>GmFAD7-2</i>	genómico	641	TGTGTTTCAGTGGTCATGGTGGCTTTTCAAAACAATCCAATTTGAACAGTGTGTGGTGCATCTGCATCTTCTTCAATT	720
<i>GmFAD7-1</i>	genómico	710	CTAGTGCCATATCATGGATGCTATGCTATGCTTTCGCTGGCCTATAGCCTTTCTAATTTTTTTTATAGATAAAATATGTT	789
<i>GmFAD7-2</i>	genómico	721	CTAGTGCCATATCATGGATGCTATGCTATGCTTTCGCTGGCCTATAGCCTTTCTAATTTTTTTTATAGATAAAATATGTT	773
<i>GmFAD7-1</i>	genómico	790	TTATCCTTCATATATCTTCCATTTGGTTTTAGTGCATATAAAAAATATAATTCGATTTTAGTCTTTTACATTT	859
<i>GmFAD7-2</i>	genómico	774	TTATCCTTCATATATCTTCCATTTGGTTTTAGTGCATATAAAAAATATAATTCGATTTTAGTCTTTTACATTT	853
<i>GmFAD7-1</i>	genómico	860	TAAATAAAGATTTTTAGTCTTGTAGTAATGACTATTTTCCATTAATTTTGTATAAATGTAGAGACTAAAAATATATTT	937
<i>GmFAD7-2</i>	genómico	854	TAAATAAAGATTTTTAGTCTTGTAGTAATGACTATTTTCCATTAATTTTGTATAAATGTAGAGACTAAAAATATATTT	933
<i>GmFAD7-1</i>	genómico	938	ATTTTTTGTAAAGACTCAAAATCAAAATTTAGATATTGTAGGGATAAAAACACATTTTACCTTTTCTTTTCTTTT	1012
<i>GmFAD7-2</i>	genómico	934	ATTTTTTGTAAAGACTCAAAATCAAAATTTAGATATTGTAGGGATAAAAACACATTTTACCTTTTCTTTTCTTTT	1013
<i>GmFAD7-1</i>	genómico	1013	GTTTGAATTCATGTTTGAAGCTGATATTTTATTCAGGAGAATCAGTCATAGGACTCATCACCACATCATGGTCATCT	1092
<i>GmFAD7-2</i>	genómico	1014	GTTTGAATTCATGTTTGAAGCTGATATTTTATTCAGGAGAATCAGTCATAGGACTCATCACCACATCATGGTCATCT	1093
<i>GmFAD7-1</i>	genómico	1093	GAAAATGATGAATCATGGCATCCCGTGCAGATGATATCATTTGTTTCTTTGTTTAAAGACATGCTTTTATCTAAGTTTT	1172
<i>GmFAD7-2</i>	genómico	1094	GAAAATGATGAATCATGGCATCCCGTGCAGATGATATCATTTGTTTCTTTGTTTAAAGACATGCTTTTATCTAAGTTTT	1173
<i>GmFAD7-1</i>	genómico	1173	TTCTTTTAAAGTGAATCAAAAGTTTCTGACATAAGAGGTTTATTGGTAAATCCCTGCATTGCGCTGAAAAATTTGTTGAGAA	1250
<i>GmFAD7-2</i>	genómico	1174	TTCTTTTAAAGTGAATCAAAAGTTTCTGACATAAGAGGTTTATTGGTAAATCCCTGCATTGCGCTGAAAAATTTGTTGAGAA	1251
<i>GmFAD7-1</i>	genómico	1251	GCTTGGACACTGTATGCTATGTTAAGATTACAGCACCTTTTCCACTTCTTGCATTTCTCGGTGTACCTT	1321
<i>GmFAD7-2</i>	genómico	1252	GCTTGGACACTGTATGCTATGTTAAGATTACAGCACCTTTTCCACTTCTTGCATTTCTCGGTGTACCTT	1322

Figura 4.8. Alineamiento a nivel de nucleótidos de los fragmentos genómicos parciales de los genes *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2* de soja. Las secuencias de los exones se representan sobre fondo blanco y las secuencias de los intrones se representan sobre fondo negro. Los recuadros negros indican los cambios encontrados en las regiones exónicas y los recuadros blancos indican los cambios encontrados en las regiones intrónicas.

Así, la base de datos Phytozome mostraba la existencia de dos secuencias diferentes localizadas en los cromosomas 7 y 18, que codificaban proteínas con alto grado de homología a *GmFAD7*. La secuencia localizada en el cromosoma 7, identificada por Phytozome como *Glyma07g18350.1*, coincidía perfectamente con la secuencia *GmFAD7-2* tanto a nivel exónico como a nivel intrónico. De la misma forma, la secuencia localizada en el cromosoma 18, identificada por Phytozome como *Glyma18g43210.1* coincidía con la secuencia *GmFAD7-1*. Además, el análisis *in silico* en la base de datos del genoma de soja nos permitió obtener la organización

Resultados

genómica completa de los genes *GmFAD7*. Así, los genes *Glyma07g18350.1* y *Glyma18g43210.1* presentaban una estructura exón/intrón formada por ocho exones y siete intrones (figura 4.9). Es importante destacar que la secuencia de proteína *Glyma18g43210.1* proporcionada por la base de datos del genoma de soja presentaba una delección de 135 aminoácidos en la región C-terminal cuando la comparábamos con las proteínas *GmFAD7-1b* aisladas en este estudio (cv. Corsoy y cv. Volania) y con la proteína *GmFAD7-1a* descrita en 1993. Sin embargo, un análisis detallado de la secuencia del exón 5 de *Glyma07g18350.1* nos permitió identificar un error de anotación en la asignación del final del exón 5 y el comienzo del intrón V. Cuando este error se corrigió de forma apropiada los tres últimos exones se podían identificar fácilmente, obteniéndose así la proteína completa. En conjunto, estos resultados indican que los genes *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2* están localizados en dos loci diferentes en los cromosomas 18 y 7, respectivamente, en el genoma de soja.

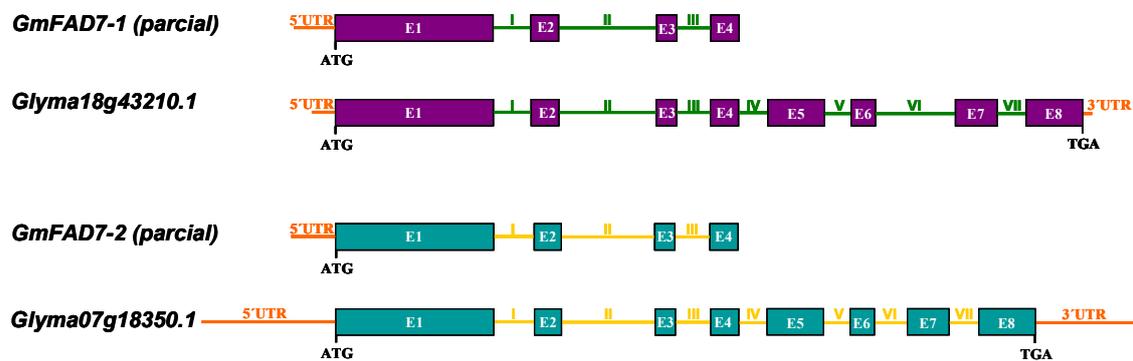


Figura 4.9. Organización genómica de los genes *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2* de soja. Las cajas coloreadas representan los exones mientras que las líneas coloreadas marcadas con números romanos representan los intrones. Los fragmentos genómicos parciales denominados *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2* se han obtenido experimentalmente en esta tesis doctoral. La organización genómica de los genes *Glyma18g43210.1* y *Glyma07g18350.1* se han obtenido a partir del análisis *in silico* en la base de datos del genoma de soja.

4.3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS ω 3 DESATURASAS DE ÁCIDOS GRASOS EN PLANTAS DE SOJA

4.3.1. Regulación de las ω 3 desaturasas de ácidos grasos en diferentes tejidos de plantas de soja

4.3.1.1. Análisis de la expresión de los genes de las ω 3 desaturasas en diferentes tejidos de plantas de soja

Como primer paso para determinar la relevancia funcional de los genes *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2* en la producción de ácidos grasos trienoicos, se analizaron los niveles de expresión de las dos ω 3 desaturasas cloroplásticas FAD7 (*GmFAD7-1* y *GmFAD7-2*) en los diferentes tejidos de plantas de soja. Para ello, se aisló el RNA total de hojas, raíces, tallos, flores y semillas en desarrollo. Las semillas en desarrollo se clasificaron en orden creciente de tamaño bajo la siguiente designación <4 mm, 4 mm, 5-6 mm, 7-9 mm y 9-11 mm. El nivel de los transcritos se examinó por PCR semicuantitativa, utilizando pares de cebadores específicos para cada uno de los genes *GmFAD7* y la expresión constitutiva de la actina como control interno. El perfil de expresión de los genes de las ω 3 desaturasas de ácidos grasos en los tejidos vegetativos de plantas se muestra en la figura 4.10. Los mRNAs de *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2* se detectaron en todos los tejidos de soja analizados siendo especialmente abundantes en hojas maduras y flores. Por último, el análisis de expresión reveló que los mRNAs de ambos genes *GmFAD7* estaban presentes en semillas en desarrollo y que sus niveles no se modificaban como resultado del desarrollo de la semilla (figura 4.11).

El perfil de expresión de los genes *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2* se comparó con el del gen *GmFAD8*. Los resultados muestran que los niveles del mRNA de *GmFAD8* son muy similares en todos los tejidos analizados (figuras 4.10 y 4.11). Estos resultados indican que en soja, a la temperatura óptima de crecimiento, el gen

Resultados

GmFAD8 se expresa de forma constitutiva tanto en los tejidos vegetativos como en las semillas en desarrollo.

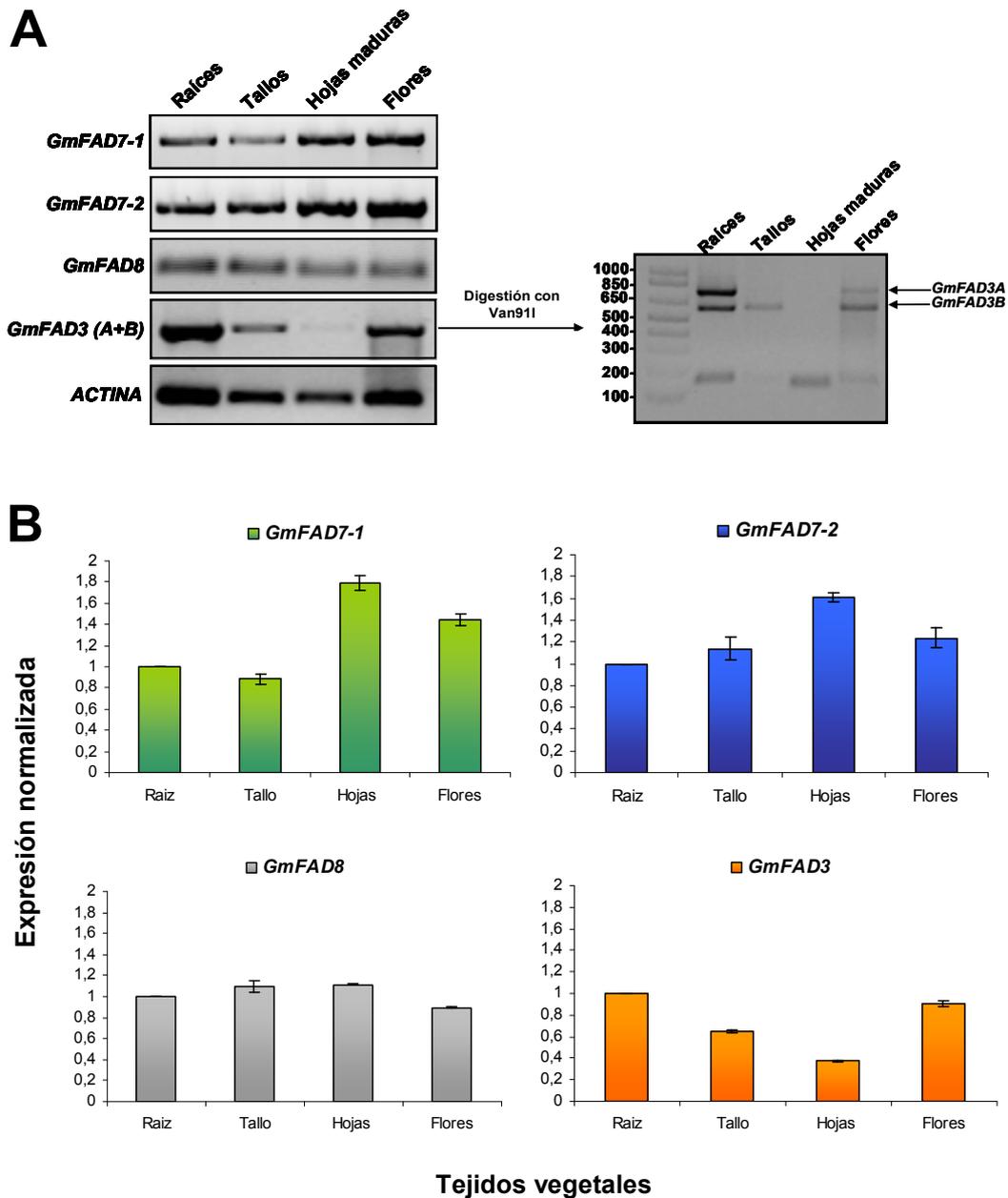


Figura 4.10. (A) Expresión de los genes de las $\omega 3$ desaturasas de ácidos grasos en raíces, tallos, hojas maduras y flores de soja. El panel de la derecha muestra la digestión del fragmento de PCR *GmFAD3* con la enzima Van911. El análisis de PCR semicuantitativa se realizó con oligos específicos para cada gen. El gen de la actina se utilizó como control interno. Los marcadores de pesos moleculares se indican en pares de bases. (B) Normalización de la expresión de los genes que codifican las $\omega 3$ desaturasas frente a la expresión del gen de la actina. La cuantificación de la cantidad de mRNA se realizó mediante densitometría de las bandas de PCR.

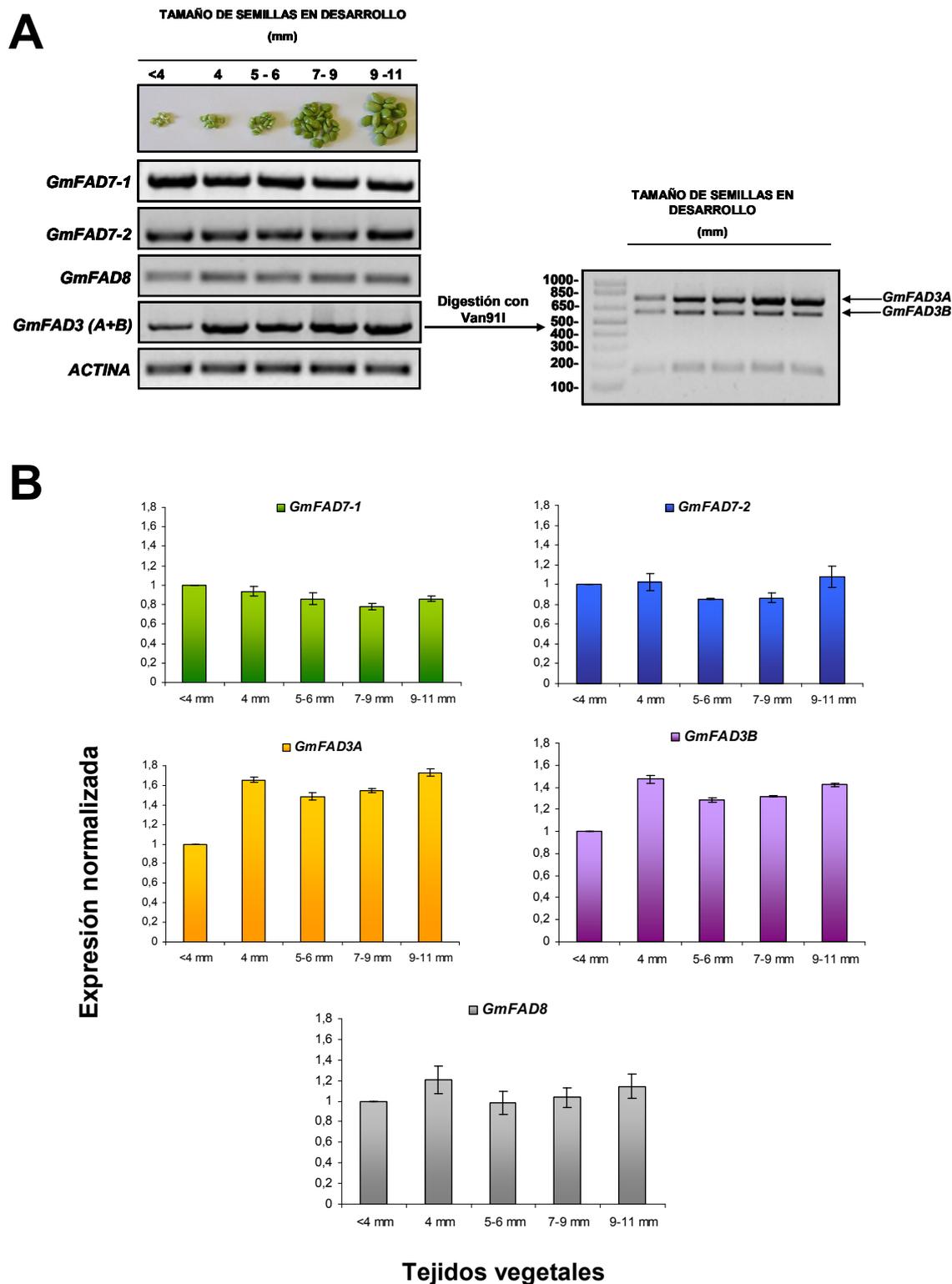


Figura 4.11. (A) Expresión de los genes de las ω 3 desaturasas de ácidos grasos en semillas de soja en desarrollo. El panel de la derecha muestra la digestión del fragmento de PCR GmFAD3 con la enzima Van911. (B) Normalización de la expresión de los genes que codifican las ω 3 desaturasas frente a la expresión del gen de la actina. La cuantificación de la cantidad de mRNA se realizó mediante densitometría de las bandas de PCR.

Resultados

Por último, se consideró de gran interés comparar la expresión de los genes que codifican las ω 3 desaturasas cloroplásticas con el perfil de expresión de las ω 3 desaturasas reticulares en los mismos tejidos y en las mismas condiciones experimentales. En soja, se ha descrito la existencia de tres genes independientes, denominados *GmFAD3A*, *GmFAD3B* y *GmFAD3C*, que contribuyen a los niveles de ácido linoleico en soja (Bilyeu y col., 2003). El análisis de expresión génica se focalizó en los genes *GmFAD3A* y *GmFAD3B* debido a que *GmFAD3C* parece expresarse de forma significativa únicamente en las yemas florales (Bilyeu y col., 2003). En los experimentos de PCR semicuantitativa, los cebadores utilizados para la amplificación del gen *GmFAD3* reconocían y amplificaban tanto el gen *GmFAD3A* como el gen *GmFAD3B*, dando lugar a dos fragmentos de PCR del mismo tamaño que eran indistinguibles mediante electroforesis en gel de agarosa, lo que impedía obtener un resultado final concluyente. Con el objetivo de analizar la expresión de los genes *GmFAD3* de forma independiente, se diseñó una estrategia para distinguirlos basada en la obtención de un perfil de bandas diferente tras un análisis de restricción con la enzima *Van91I*. Esta enzima reconoce y corta tanto el fragmento *GmFAD3A* como el *GmFAD3B* pero el sitio de reconocimiento y corte está localizado en posiciones diferentes en cada uno de ellos. La enzima *Van91I* corta a *GmFAD3A* en posición 164 generando dos fragmentos con un tamaño esperado de 164 y 755 pares de bases respectivamente, y corta a *GmFAD3B* en posiciones 164 y 758 generando tres fragmentos de tamaño de 161, 164 y 594 pares de bases. Así, el fragmento de PCR *GmFAD3* obtenido tras la amplificación por PCR semicuantitativa se digirió primero con la enzima de restricción *Van91I* y, posteriormente, los fragmentos generados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se visualizaron bajo luz UV. Los resultados mostraron que el mRNA *GmFAD3*, que incluye *GmFAD3A* y *GmFAD3B*, era muy abundante en raíces y flores y, en menor extensión, en tallos. Es interesante destacar que en hojas maduras se detectaron pequeñas cantidades de mRNA *GmFAD3* (figura 4.10). Cuando se realizó el análisis de restricción del

fragmento de PCR *GmFAD3* obtenido tras la amplificación, se observó que los mRNAs de *GmFAD3A* y *GmFAD3B* estaban presentes en niveles muy similares en raíces mientras que en tallos y flores, el mRNA *GmFAD3B* fue la principal especie detectada (figura 4.10-A, panel derecho). En semillas en desarrollo, el perfil de expresión fue diferente, observándose un marcado incremento del mRNA *GmFAD3*, que puede verse en la figura 4.11-A, panel derecho. Cuando se llevó a cabo el análisis de restricción del producto de PCR *GmFAD3* en semillas en desarrollo, se observó un aumento de los mRNAs *GmFAD3A* y *GmFAD3B*, siendo este incremento mucho más significativo en el caso de *GmFAD3A*.

Una vez obtenido el patrón de expresión de las ω 3 desaturasas de ácidos grasos en diferentes tejidos de plantas de soja, determinamos la abundancia relativa de cada uno de los genes *GmFAD7* en los diferentes tejidos de la planta. Debido a la elevada homología que presentan ambos genes entre sí, fue muy complicado diseñar una estrategia de PCR cuantitativa para conseguir este propósito, y todos los intentos dieron resultados inadecuados debido a amplificaciones cruzadas. Por esta razón, decidimos utilizar PCR semicuantitativa para comparar la abundancia relativa de los mRNA de los genes *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2*. Para ello, se utilizaron diluciones seriadas de cDNA de hojas, raíces y semillas 9-11 mm como muestra para la reacción de PCR semicuantitativa. En todos los casos se utilizaron parejas de cebadores específicos para cada gen. Los resultados se muestran en la figura 4.12. En hojas maduras, los transcritos de *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2* eran muy abundantes, y su abundancia relativa era bastante similar. Estos resultados fueron consistentes con los de las figuras 4.10. y 4.11. Finalmente, en raíces y semillas de 9-11mm, se detectaron ambos transcritos *GmFAD7* pero el mRNA *GmFAD7-2* parecía ser más abundante que el mRNA *GmFAD7-1*.

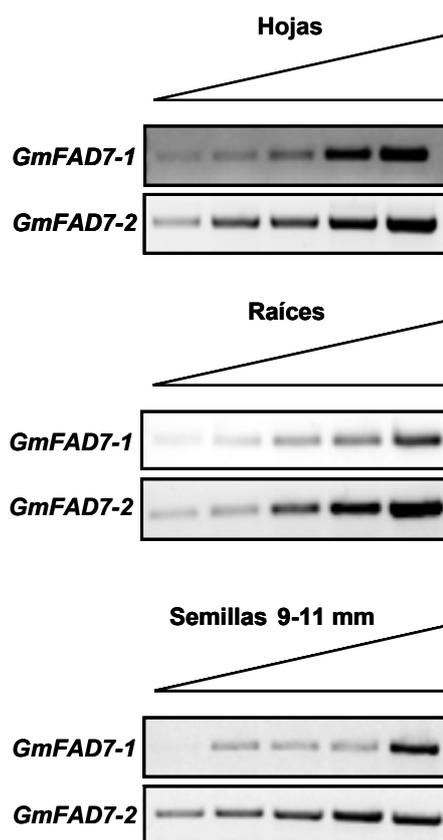


Figura 4.12. Análisis de la abundancia relativa de los genes *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2* en diferentes tejidos de soja. El cDNA se sintetizó a partir del RNA extraído de hojas maduras, raíces y semillas 9-11 mm. En cada tejido, se utilizaron diluciones seriadas de cDNA (sin diluir, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16) como muestra para la reacción de PCR.

4.3.1.2. Análisis de la composición de ácidos grasos de los diferentes tejidos de plantas de soja

La composición de ácidos grasos de los lípidos totales extraídos de los diferentes tejidos de plantas de soja (raíz, tallo, hoja madura y semillas de 9-11 mm) se analizó mediante cromatografía de gases. La composición de ácidos grasos de hojas y de semillas de soja se ha descrito detalladamente por otros autores en trabajos anteriores; sin embargo, la composición de ácidos grasos de otros tejidos como la raíz y el tallo no ha sido analizada en profundidad. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.13. En hojas, los ácidos grasos poliinsaturados representan más del 70 % de los ácidos grasos totales, siendo el ácido linolénico la especie

mayoritaria. Así, en hojas, los niveles de ácido linoleico y el ácido linolénico constituyen aproximadamente un 15 % y un 58 % de los ácidos grasos totales, respectivamente. Estos resultados son consistentes con los descritos anteriormente para suspensiones celulares de soja cv Corsoy (Martin y col., 1984; Alfonso y col., 2001; Collados y col., 2006). En raíces, los ácidos grasos poliinsaturados representan aproximadamente el 60 % de los ácidos grasos totales pero, a diferencia de las hojas, las raíces presentan niveles similares de ácido linoleico ($18:2^{\Delta 9,12}$) y de ácido linolénico ($18:3^{\Delta 9,12,15}$), mostrando valores de 30 % y 29 % de los ácidos grasos totales, respectivamente. Los resultados obtenidos en semillas de soja son muy similares a los observados por otros autores (Heppard y col., 1996). Así, el ácido linoleico ($18:2^{\Delta 9,12}$) es la especie más abundante en este tejido (alrededor del 38,5 %) y, además, cabe destacar que las semillas presentan el porcentaje más alto de ácido linoleico cuando se comparan con el resto de los tejidos (raíces, hojas y flores). Por último, en flores, los ácidos grasos poliinsaturados representan un 38 % de los ácidos grasos totales. Al igual que en raíces, los ácidos grasos $18:2^{\Delta 9,12}$ y $18:3^{\Delta 9,12,15}$ presentan valores muy similares en flores, alrededor del 19 % y 20 %, respectivamente.

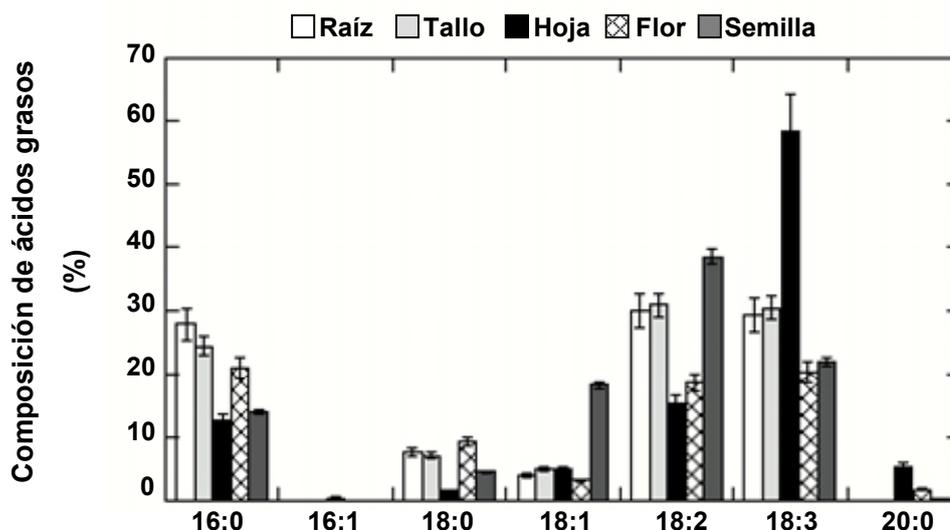


Figura 4.13. Composición de ácidos grasos de los lípidos totales de diferentes tejidos de plantas de soja (raíz, tallo, hoja, flor y semilla 9-11 mm). Los lípidos totales se extrajeron a partir del tejido correspondiente y los ácidos grasos se determinaron por cromatografía de gases.

4.3.1.3. Análisis de los niveles de proteína *GmFAD7*

4.3.1.3.1 Análisis de los niveles de proteína *GmFAD7* en tejidos vegetativos

Para analizar el patrón de distribución de la proteína *GmFAD7* en los diferentes tejidos de la planta, los extractos de raíz, tallos y hojas maduras se analizaron mediante western blot utilizando un anticuerpo policlonal producido frente a la proteína *GmFAD7-1* de soja disponible en nuestro laboratorio. Como ya se mencionó anteriormente en el apartado 4.1.1. de esta sección, un trabajo previo de nuestro grupo describió que dicho anticuerpo reaccionaba con un único polipéptido de aproximadamente 39 kDa en cloroplastos de plantas de soja que correspondía bien con el peso molecular aparente para la proteína *FAD7* de soja (Collados y col., 2006). Sin embargo, cuando la separación electroforética de las muestras fue mayor, tanto en extractos celulares como en cloroplastos de hojas de soja se empezó a observar repetidamente la presencia de dos bandas bien diferenciadas en el rango de peso molecular de 39-42 kDa (figura 4.14-A, calle 1 y figura 4.14-B; calles 3 y 4). Además, en los cloroplastos aislados de hojas de soja, la señal de ambas bandas fue mucho más intensa, lo que es consistente con la localización cloroplástica de la proteína *GmFAD7* determinada experimentalmente mediante inmunolocalización (Andreu y col., 2007). Dado que el epítipo reconocido por el antisuero anti-*GmFAD7* está muy conservado en la secuencia de la proteína *GmFAD7-2* (de los 17 residuos de aminoácidos, 13 son idénticos y 2 son cambios conservativos), sería probable que el anticuerpo anti-*GmFAD7* reconociera también la proteína *GmFAD7-2*. Esto sugeriría que las dos bandas detectadas en hojas podrían ser el resultado de la traducción de los dos mRNAs *GmFAD7* detectados en este mismo tejido. Con el propósito de verificar si las dos bandas que reaccionaban con el antisuero anti-*GmFAD7* eran los productos derivados de los dos transcritos *GmFAD7* que se acumulaban en hojas, se llevó a cabo un análisis de los niveles de proteína *FAD7* en diferentes especies de plantas mediante western blot. Las especies de plantas seleccionadas para el estudio

incluían *Lotus japonicus*, *Medicago sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Vigna unguiculata* y *Arabidopsis thaliana*. Con excepción de *Phaseolus vulgaris*, la información disponible en la base de datos DFCI o en los diferentes trabajos publicados (Yadav y col., 1993; Torres-Franklin y col., 2009) reveló que la ω 3 desaturasa cloroplástica FAD7 está codificada por un único gen en todas las especies de plantas utilizadas. Así, la búsqueda en las bases de datos de los genomas de *Lotus japonicus* y *Medicago sativa* confirmó que, en dichas especies de plantas, la ω 3 desaturasa cloroplástica FAD7 parece estar codificada por un único gen. Además, recientemente, se han descrito los genes que codifican las ω 3 desaturasas de ácidos grasos en *Vigna unguiculata*, observándose un solo gen que codifica la proteína FAD7 (Torres-Franklin y col., 2009). Es importante destacar que aunque no se dispone de información genética acerca del genoma de *Phaseolus vulgaris*, se sabe que esta leguminosa está más relacionada filogenéticamente con soja que *Lotus japonicus* y *Medicago sativa* (Young y col., 2003). Como se muestra en la figura 4.14-A (calles 2-6), el anticuerpo anti-GmFAD7 mostraba reacción en los cloroplastos de todas las especies analizadas excepto en *Arabidopsis thaliana*. Este hecho no es sorprendente ya que el epítipo reconocido por el anticuerpo no está conservado en la secuencia de la proteína AtFAD7 (figura 4.14-A; calle 3). Con excepción de *Phaseolus vulgaris*, en la mayoría de las especies de plantas testeadas (*Lotus japonicus*, *Medicago sativa* y *Vigna unguiculata*), el anticuerpo anti-GmFAD7 reaccionó con una única banda en el rango de pesos moleculares de 39-42 kDa, resultado que es consistente con la información obtenida a partir de la búsqueda en las bases de datos. *Phaseolus vulgaris* constituye el único caso en el que se observó un patrón de distribución de la proteína FAD7 idéntico al detectado en hojas de soja, mostrando dos bandas diferenciadas tras el análisis por western blot. Como ya se ha mencionado anteriormente, aunque no se dispone de información genética acerca del genoma de *Phaseolus vulgaris*, se sabe que esta leguminosa está más relacionada filogenéticamente con soja que *Lotus japonicus* y *Medicago sativa* (Young y col., 2003). Por lo tanto, todos estos resultados

Resultados

sugieren que probablemente la presencia de una doble banda en hojas de soja está asociada con la existencia de distintas isoformas de la proteína *GmFAD7*.

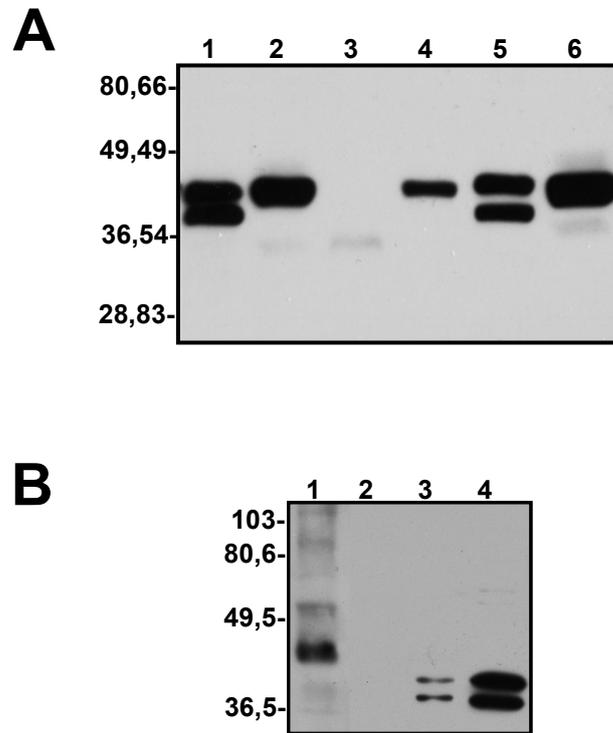


Figura 4.14. (A) Detección inmunológica de la proteína *GmFAD7* en cloroplastos extraídos de hojas de soja de diferentes especies de plantas: 1, *Glycine max*; 2, *Lotus japonicus*; 3, *Arabidopsis thaliana*; 4, *Vigna unguiculata*; 5, *Phaseolus vulgaris*; 6, *Medicago sativa*. (B) Detección inmunológica de la proteína *GmFAD7* en diferentes tejidos de plantas: 1, extractos crudos de raíces; 2, extractos crudos de tallos; 3, extractos crudos de hojas maduras; 4, cloroplastos aislados de hojas maduras de soja. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda de cada panel.

Sorprendentemente, en tallos no se detectó proteína *GmFAD7* a pesar de la presencia de su mRNA en este mismo tejido, lo que sugiere que la regulación de *GmFAD7* parece ocurrir a nivel post-transcripcional (figura 4.14-B, calle 2).

Finalmente, se estudió la distribución de la proteína *GmFAD7* en extractos de raíces de soja. En raíces, el antisuero *GmFAD7* reaccionó con múltiples bandas de diferente peso molecular que oscilaban entre 47 kDa y más de 90 kDa (figura 4.14-B, calle 1). Así, la exposición prolongada de los inmunoblots de muestras de raíces de

forma rutinaria daba lugar a la detección de especies de alto peso molecular cuya intensidad variaba dependiendo de las preparaciones. Estas bandas de alto peso molecular podrían surgir de la interacción de las proteínas *GmFAD7* con otras proteínas o bien de la existencia de algún tipo de modificación post-traducciona de tipo desconocido que afectase a la movilidad de la proteína *GmFAD7*. Sin embargo, diversos estudios han descrito que las bandas de alto peso molecular son características de proteínas conjugadas a ubiquitina que han sido marcadas para su degradación vía el proteosoma 26S. Un mecanismo similar se ha descrito en soja para el control de la enzima *GmFAD2-1* a altas temperaturas (Tang y col., 2005). Por ello, se decidió estudiar la implicación del proteosoma 26S en la degradación de la proteína *GmFAD7*. Para tal fin, las plantas de soja se incubaron en presencia del inhibidor específico del proteosoma 26S, MG-132, durante 12 horas (Lim y col., 2004). Tras el tratamiento con el inhibidor, se realizaron extractos de raíces que, posteriormente, se analizaron mediante western blot. Como se muestra en la figura 4.15-A, aunque las bandas de alto peso molecular seguían siendo visibles, el tratamiento con MG-132 resultaba en un incremento de la cantidad de proteína *GmFAD7*. Estos resultados parecen sugerir que la ruta del proteosoma 26S podría estar implicada en la degradación de la proteína *FAD7* en raíces de soja. Sin embargo, el análisis de estas mismas muestras mediante western blot con un anticuerpo anti-ubiquitina (figura 4.15-B) no mostró reacción significativa con las bandas de alto peso molecular objeto de estudio, lo que impide postular una hipótesis concluyente acerca de si, en raíces, las proteínas *GmFAD7* son más susceptibles de degradación a través de la ruta del proteosoma 26S.

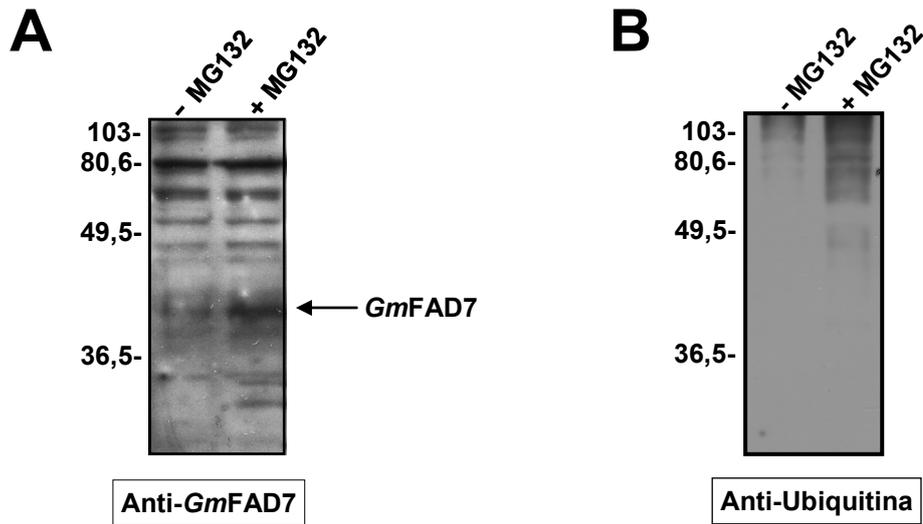


Figura 4.15. (A) Detección inmunológica de la proteína GmFAD7 en extractos crudos de raíces de soja en ausencia o presencia del inhibidor del proteosoma 26S, MG-132. (B) Detección inmunológica de la proteína ubiquitina en extractos crudos de raíces de soja en ausencia o presencia del inhibidor del proteosoma 26S, MG-132. Las plantas se incubaron con MG-132 durante 12 horas bajo condiciones estándar de crecimiento. Tras la incubación, las raíces se cortaron y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. El inhibidor se añadió a la solución nutritiva en concentración final de 50 μ M. En cada pocillo se cargaron 15 μ g de proteína. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda del panel.

4.3.1.3.2 Análisis de los niveles de proteína GmFAD7 en semillas en desarrollo

A continuación, se examinó la distribución de la proteína GmFAD7 en semillas en desarrollo. Como se muestra en la figura 4.16, durante el desarrollo de la semilla tiene lugar la acumulación de una banda de aproximadamente 80 kDa. Además, se detectó una banda de baja intensidad de 39 kDa en los últimos estadios del desarrollo de la semilla analizados (9-11 mm), que coincide en peso molecular con la banda inferior del doblete detectado en hojas.

Este perfil tan complejo para la acumulación de la proteína GmFAD7 se observó cuando las muestras se desnaturalizaron en presencia del agente reductor β -mercaptoetanol.

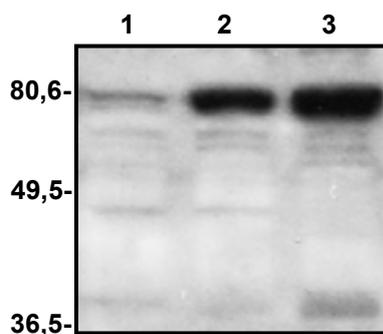


Figura 4.16. Detección inmunológica de la proteína *GmFAD7* en extractos crudos de semillas de 4, 5-6 y 9-11 mm de tamaño (pocillos 1,2 y 3 respectivamente). En cada pocillo se cargaron 15 μ g de proteína. La desnaturalización de las muestras se realizó en presencia del agente reductor β -mercaptoetanol. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda del panel.

A continuación, se estudió en detalle el efecto del cambio del estado de oxidación de los grupos tiol en la distribución de las distintas conformaciones de la proteína *GmFAD7* en extractos de semillas de 9-11 mm. Los resultados se muestran en la figura 4.17-A. Los extractos de semillas desnaturalizados en un tampón de carga que contenía β -MeOH ó DTT como agentes reductores mostraron, tal y como se esperaba, un patrón idéntico al descrito en el párrafo anterior. Sorprendentemente, cuando los agentes reductores se eliminaron del tampón de desnaturalización, además de las bandas de 39 kDa y 80 kDa, se detectó una banda adicional de 42 kDa de gran intensidad (figura 4.17-A, calle 3). Esta banda, que estaba presente en todos los estadios del desarrollo de la semilla, coincidía en tamaño con la banda superior del doblete *GmFAD7* detectado en hojas. Cuando las muestras se incubaron en presencia de un agente oxidante como diamida se observaron resultados idénticos (figura 4.17-A; calle 4). Además, si las muestras pre-tratadas con diamida se desnaturalizaban en presencia de un agente reductor (β -MeOH ó DTT), la banda de 42 kDa desaparecía y la banda predominante detectada era la banda de 80 kDa (figura 4.17-A, calles 5 y 6). Estos resultados confirman que el estado de oxidación de los grupos tiol afecta a la distribución de las distintas conformaciones de la proteína *GmFAD7* en semillas de soja. Este efecto parece ser específico de semillas ya que la

Resultados

ausencia de β -MeOH ó DTT en experimentos realizados en cloroplastos de hojas de soja no tuvo ningún efecto en el perfil de distribución de dicha proteína.

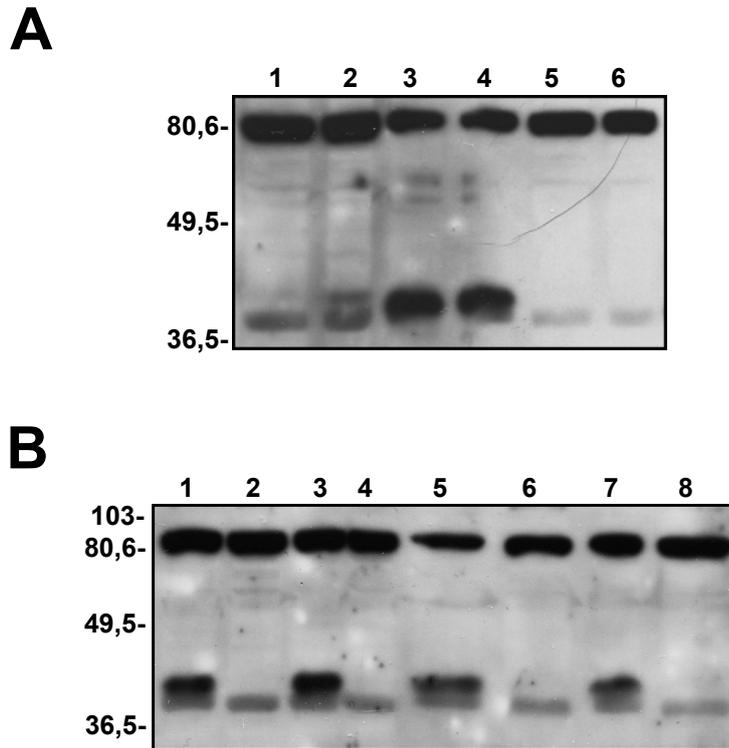


Figura 4.17. Detección inmunológica de la proteína GmFAD7 en extractos crudos de semillas 9-11 mm. (A) Los extractos de semillas se incubaron con: 1, tampón de carga que contenía β -mercaptoetanol; 2, tampón de carga que contenía DTT; 3, tampón de carga sin agentes reductores; 4, tampón de incubación con diamida. Las semillas pre-tratadas con diamida se desnaturalizaron con tampón de carga que contenía: 5, β -mercaptoetanol; 6, DTT. (B) Las semillas se incubaron en un tampón que contenía: 3 y 4, 8 M urea; 5 y 6, 1.5 M NaCl, 7 y 8, 1 M cloruro de guanidinio. Las muestras 3, 5 y 7 se desnaturalizaron en ausencia de agente reductor y las muestras 4, 6 y 8 se desnaturalizaron en presencia de β -mercaptoetanol. Las muestras 1 y 2 son extractos de semillas desnaturalizados en ausencia (1) o presencia (2) de β -mercaptoetanol.

Un patrón idéntico de bandas se observó cuando las muestras se trataron, antes de la desnaturalización en ausencia o presencia de agentes reductores, con un tampón de incubación que contenía agentes desnaturalizantes, caotrópicos o alta fuerza iónica (figura 4.17-B). Así, cuando los extractos de semillas de 9-11 mm se trataron con un tampón que contenía 8 M de urea, 1,5 M NaCl o 1 M de cloruro de

guanidinio no se observó ningún cambio en la distribución de las distintas conformaciones de la proteína *GmFAD7* respecto a la muestra control. Estos resultados sugieren que la interacción que mantiene el complejo de 80 kDa *GmFAD7* en los extractos de semillas de soja es muy estable.

Efecto del hierro en las distintas conformaciones de la proteína GmFAD7

El hierro es un cofactor necesario para la actividad de las desaturasas ya que forma parte del centro activo de estas enzimas (Somerville y col., 2000). Por ello, se analizó el efecto de la presencia o ausencia de este metal en la distribución de las diferentes conformaciones en extractos de semillas de 9-11 mm (figura 4.18). El efecto del hierro se analizó inicialmente en ausencia de agentes reductores, situación en la que se detectaban todas las conformaciones de la proteína *GmFAD7*. Bajo estas condiciones, la adición de 100 mM de EDTA reduce considerablemente los niveles de la fracción de 42 kDa detectada en las muestras control (figura 4.18, calles 1 y 2). De nuevo, no se observó ningún efecto en la fracción de 39 kDa. Sin embargo, en presencia de un exceso de hierro (Fe^{2+}), la distribución relativa de las distintas conformaciones de la proteína *GmFAD7* fue similar a la observada en muestras control (figura 4.18, calles 1 y 3). Seguidamente, los mismos experimentos se realizaron en presencia del agente reductor β -mercaptoetanol. Como se esperaba, en la muestra de semillas 9-11 mm control, el anticuerpo reaccionó con una banda de 80 kDa y con una banda de 39 kDa de baja intensidad. En este caso, la adición de EDTA no provocó ningún cambio significativo en el perfil de distribución de las bandas de proteína (figura 4.18, calles 5 y 6). Sin embargo, cuando los extractos de semillas se incubaron con un exceso de Fe^{2+} , la banda de 42 kDa incremento significativamente (figura 4.18, calles 5 y 7). Resultados similares se obtuvieron cuando el Fe^{2+} fue sustituido por Fe^{3+} en el tampón de incubación. Todos estos resultados indican que el hierro promueve la acumulación de la banda de 42 kDa de la proteína *GmFAD7* en semillas de soja.

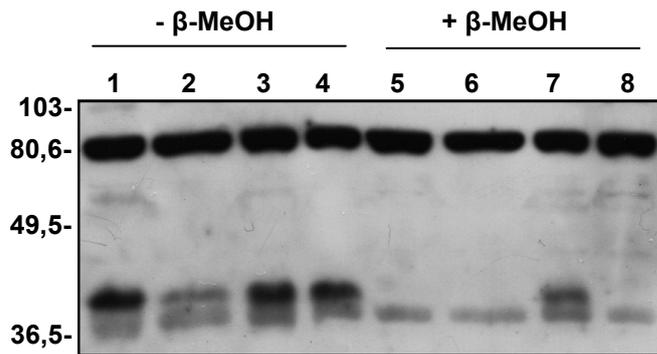


Figura 4.18. Influencia del hierro en la conformación de la proteína GmFAD7. Los extractos de semillas se incubaron en tampón de incubación: 1, control; 2, con 100 mM EDTA; 3, con 1mM Fe²⁺ y 5 mM de ascorbato; 4, con 5 mM de ascorbato durante 15 minutos y, seguidamente, se desnaturalizaron con tampón de carga sin agentes reductores. Las calles de 5-8 muestran los mismos tratamientos con desnaturalización en presencia de β-mercaptoetanol.

4.3.2. Regulación de la expresión de las desaturasas de ácidos grasos durante el desarrollo de la hoja

Durante el desarrollo de la hoja se producen muchos cambios a nivel morfológico que implican la síntesis de membranas celulares. En el contexto actual del estudio que sobre el mecanismo de regulación de las desaturasas de plantas desarrollamos en nuestro laboratorio, decidimos analizar el efecto del desarrollo de la hoja en la expresión de los genes que codifican las desaturasas de ácidos grasos, centrándonos principalmente en el estudio de las ω3 desaturasas.

Las plantas de soja presentan tres tipos de hoja bien diferenciados: hojas cotiledonares, primer par de hojas verdaderas (también llamadas hojas simples) y hojas trifoliales (figura 4.19). Inicialmente, decidimos trabajar con hojas simples y hojas trifoliales recogidas en distintos estadios del desarrollo bajo la siguiente designación: hojas recién abiertas (RA) y hojas de 3, 7, 14 y 18 días de edad.

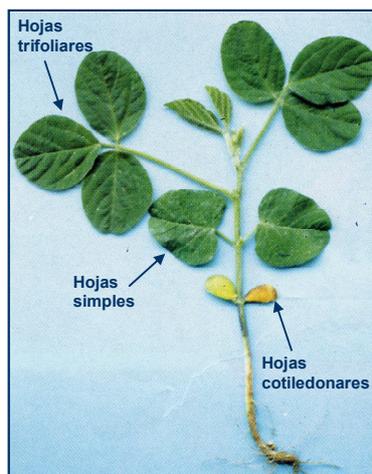


Figura 4.19. Tipos de hojas de una planta de soja.

4.3.2.1. Análisis de la composición de ácidos grasos de los lípidos totales en hojas de soja

Con el objetivo de dilucidar que ocurre con la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados durante el desarrollo de la hoja se analizaron los cambios que se producen en la composición de ácidos grasos en muestras de lípidos totales extraídos de hojas en distintos estadios del desarrollo. De nuevo, en hojas maduras de plantas de soja, los ácidos grasos poliinsaturados representan aproximadamente un 70 % de los ácidos grasos totales, siendo la especie mayoritaria es el ácido linolénico (alrededor del 65 %; figura 4.20). Los datos obtenidos mostraron que el contenido de $18:3^{\Delta 9,12,15}$ de los lípidos totales de hojas es relativamente más bajo en las hojas jóvenes (40 % de los ácidos grasos totales) y que, la proporción de dicho ácido graso se incrementa con la edad de la hoja, representando un 65 % de los ácidos grasos totales en hojas maduras. Por el contrario, se produce un descenso concomitante de los niveles de ácido graso $18:2^{\Delta 9,12}$, que es el sustrato tanto de *FAD3* como de *FAD7* para la producción de $18:3^{\Delta 9,12,15}$ (figura 4.20), disminuyendo su porcentaje desde un 28 % en hojas jóvenes hasta un 12 % en hojas maduras. Por otro lado, la composición de ácidos grasos de los lípidos de las hojas simples de soja fue muy similar a la obtenida para hojas trifoliales de 18 días de edad (figura 4.21).

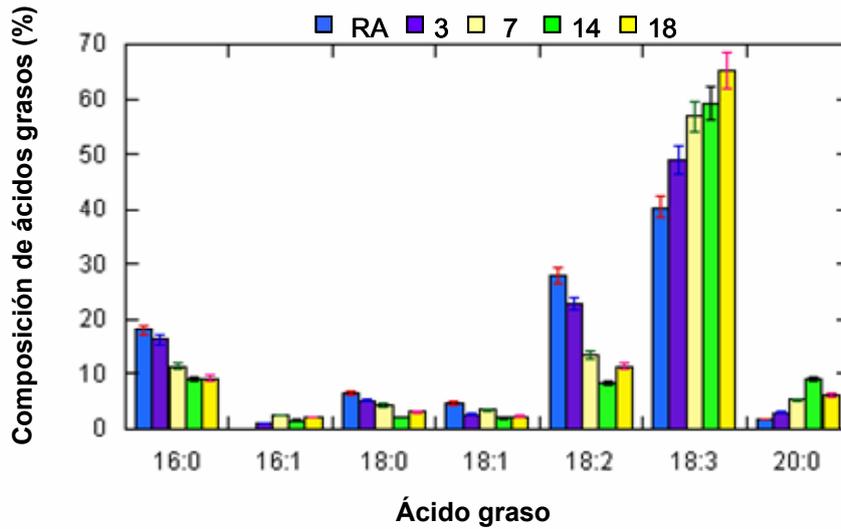


Figura 4.19. Composición de ácidos grasos de hojas trifoliales de soja de diferente edad de desarrollo. RA, hojas recién abiertas; 3, hojas de tres días de edad; 7, hojas de siete días de edad; 14, hojas de 14 días de edad; 18, hojas de 18 días de edad. Los lípidos totales se extrajeron a partir de la hoja y los ácidos grasos se determinaron por cromatografía de gases.

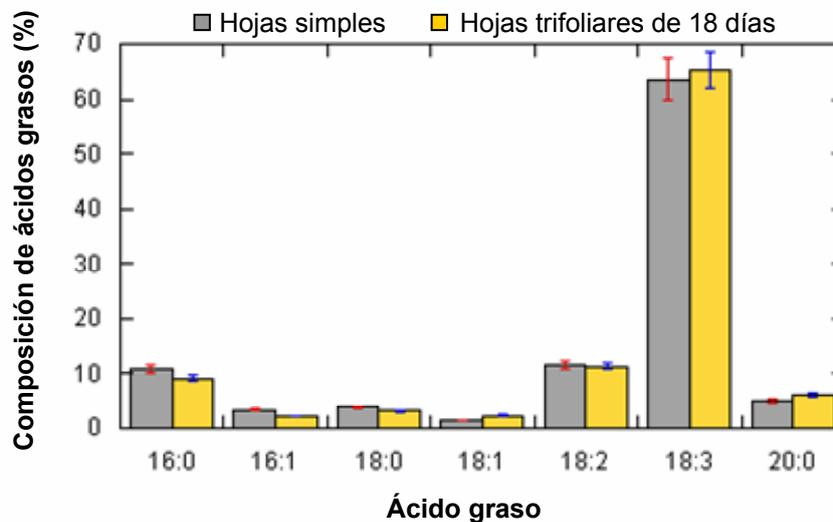


Figura 4.20. Composición de ácidos grasos de hojas simples y hojas trifoliales de 18 días de edad. Los lípidos totales se extrajeron a partir de la hoja y los ácidos grasos se determinaron por cromatografía de gases.

4.3.2.2. Análisis de la expresión de los genes de las desaturasas en hojas de soja

A continuación, decidimos establecer la existencia de una posible correlación entre los cambios obtenidos en los niveles de ácidos grasos observados durante el desarrollo de la hoja y la expresión de los genes de las desaturasas. Para ello, analizamos los niveles de RNA mensajero de cada uno de los genes de las desaturasas mediante RT-PCR (figura 4.22).

Con el desarrollo de las hojas trifoliales se observó que los niveles de mRNA *GmFAD3* (ω 3 desaturasa reticular) descienden, mientras que los niveles de mensajero de *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2* (ω 3 desaturasas cloroplásticas) aumentan (figura 4.22). La digestión del fragmento de PCR *GmFAD3* con la enzima de restricción *Van91I* mostró que los mRNAs mensajeros *GmFAD3A* y *GmFAD3B* disminuían durante el desarrollo de la hoja. Sin embargo, la disminución fue más drástica en el caso del mRNA *GmFAD3A*, llegando hasta niveles prácticamente indetectables en las hojas trifoliales de catorce y dieciocho días de edad (figura 4.22; panel derecho). El resto de los genes que codifican las desaturasas de ácidos grasos (*GmFAD2*, *GmFAD6* y *GmFAD8*) no parecen estar sometidos a cambios en la expresión tan dramáticos como los observados para los genes *GmFAD7* y *GmFAD3* (figura 4.22). Por último, los resultados mostraron que las hojas simples se comportan como hojas maduras y la expresión de los genes de cada una de las desaturasas no varía a lo largo del desarrollo de dichas hojas.

Resultados

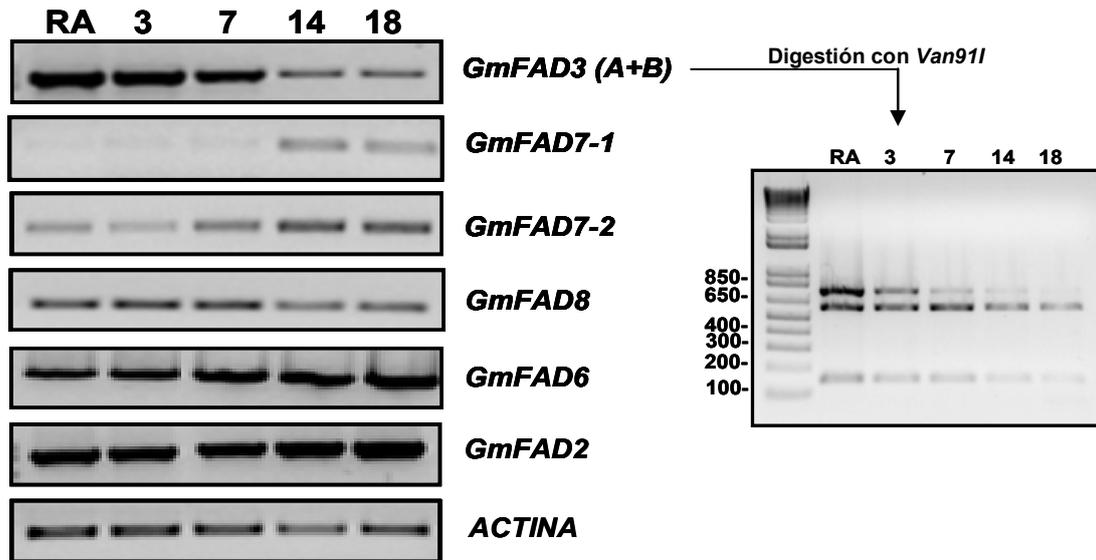


Figura 4.22. Análisis de expresión de los genes de las desaturasas mediante PCR semicuantitativa. RA, hojas recién abiertas; 3, hojas de tres días de edad; 7, hojas de siete días de edad; 14, hojas de 14 días de edad; 18, hojas de 18 días de edad. El análisis de PCR semicuantitativa se realizó con oligos específicos para cada gen. El gen de la actina se utilizó como control interno en todos los experimentos. El panel de la derecha muestra la digestión del fragmento de PCR *GmFAD3* con la enzima *Van91I*. Los marcadores de pesos moleculares se indican en pares de bases a la izquierda de la figura.

Dado que el desarrollo de la hoja parecía modular principalmente la expresión de los genes que codifican las $\omega 3$ desaturasas cloroplástica y reticular, *GmFAD3* y *GmFAD7*, respectivamente, decidimos centrar nuestro estudio mediante PCR en tiempo real en el análisis de la expresión génica de los mismos. La utilización de esta técnica de biología molecular no nos ha permitido estudiar de forma independiente la expresión de los genes que codifican las distintas isoformas de la proteína *GmFAD7*, ya que, debido a la elevada homología que presentan entre sí, los cebadores utilizados reconocen tanto a *GmFAD7-1* como a *GmFAD7-2*. De forma similar, los cebadores utilizados para analizar la expresión de los genes *GmFAD3* reconocen los genes *GmFAD3A* y *GmFAD3B*, lo que impide que su expresión sea analizada de forma independiente. Los datos obtenidos por PCR en tiempo real confirmaron los resultados por PCR semicuantitativa.

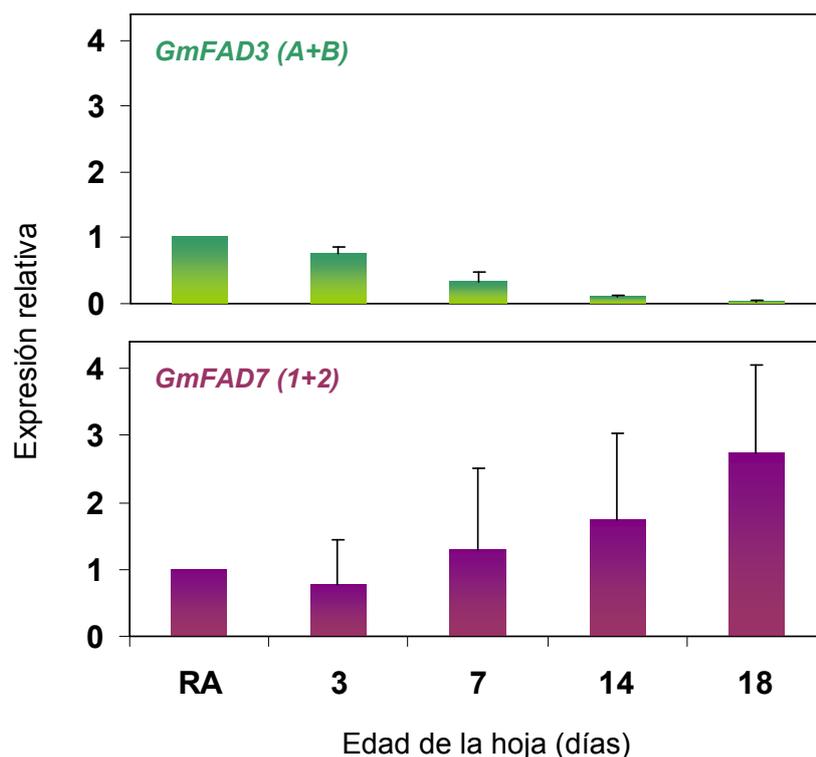


Figura 4.23. Análisis de expresión relativa de los genes *GmFAD3 (A+B)* y *GmFAD7 (1+2)* por PCR en tiempo real. Los niveles de expresión se relativizaron frente al nivel de expresión de hojas abiertas, a las que se asignó valor arbitrario de 1.

Así, el perfil de expresión obtenido para cada una de las ω 3 desaturasas fue diferente (figura 4.23): con el desarrollo de la hoja se produce un descenso de los niveles de mRNA de la ω 3 desaturasa reticular (*GmFAD3*) que coincide en el tiempo con un aumento específico de los niveles de mRNA de la ω 3 desaturasa cloroplástica (*GmFAD7*). Estos resultados indican que la expresión de los genes *FAD3* y *FAD7* está regulada a nivel transcripcional durante el desarrollo de la hoja. Esta regulación parece estar estrictamente regulada ya que mientras la expresión de los genes *GmFAD7* parecen activarse durante el desarrollo de la hoja, la expresión de los genes que codifican la ω 3 desaturasa reticular *GmFAD3* parecen reprimirse.

4.3.2.3. Análisis de la proteína *GmFAD7* durante el desarrollo de la hoja

A la vista de los resultados de expresión génica, decidimos comprobar si el aumento de mRNAs *FAD7* se traducía en un aumento de los niveles de proteína de la ω 3 desaturasa cloroplástica. Para ello, se examinó la cantidad de proteína presente en cada una de las fracciones cloroplásticas extraídas de las muestras de hojas de soja en distintos estadios del desarrollo. De nuevo, el anticuerpo anti-*GmFAD7* reconoce dos bandas bien diferenciadas y de peso molecular muy próximo (39-42 kDa) en las muestras de cloroplastos de 7, 14 y 18 días de edad. Además, el análisis muestra que los niveles de proteína *GmFAD7* aumentan durante la maduración de las hojas, dato que es consistente con los datos de expresión correspondientes a los genes *GmFAD7* mostrados en el apartado anterior (figura 4.24) y que confirman el efecto transcripcional sobre *FAD7* en respuesta al desarrollo de la hoja.

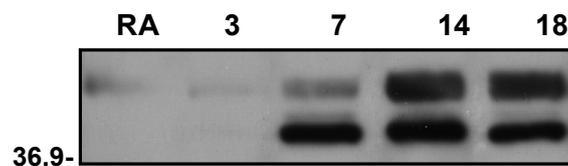


Figura 4.24. Detección inmunológica de la proteína *GmFAD7* en muestras de cloroplastos de hojas de soja en diferentes estadios del desarrollo. En cada pocillo se cargó 15 μ g de proteína total.

4.4. REGULACIÓN DE LAS ω 3 DESATURASAS DE ÁCIDOS GRASOS BAJO

CONDICIONES DE ESTRÉS

Tras abordar el estudio espacio-temporal de la expresión de los genes *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2*, decidimos analizar su expresión en plantas de soja sometidas a diferentes condiciones de estrés. Dos han sido los estresés estudiados por ser aquellos en los que se han descrito alteraciones en los niveles de expresión del gen *FAD7* o cambios en el contenido de ácidos grasos trienoicos: la herida (estrés biótico) y el frío (estrés abiótico).

4.4.1. Regulación de la expresión de los genes *GmFAD7* en respuesta a la herida

4.4.1.1. Análisis de la expresión de los genes *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2* en respuesta a la herida

Para estudiar el efecto de la herida en la expresión de los genes *GmFAD7*, se provocó daño por herida en hojas trifoliales de soja y el material vegetal dañado se recolectó 30 y 240 minutos después de haber sido realizado el daño. Los resultados del análisis de expresión se muestran en la figura 4.25. El daño mecánico provoca un aumento de la expresión de los genes *GmFAD7*. Así, los niveles de mRNA *GmFAD7-1* se acumularon rápidamente en respuesta a la herida, mostrando un incremento significativo (aproximadamente 2,5 veces) respecto al control después de 30 minutos del tratamiento. Además, estos niveles de expresión se mantuvieron constantes 240 minutos después de la herida. Sin embargo, el incremento del RNA mensajero de *GmFAD7-2* en respuesta a la herida es más leve, observándose un aumento de 1,75 veces respecto al control.

Diversos estudios han puesto de manifiesto que el daño por herida activa la transcripción de un gran número de genes estimulando rutas de señalización dependientes e independientes de ácido jasmónico. Por ello, a continuación, se decidió determinar el perfil de expresión de ambos genes *GmFAD7* en respuesta al tratamiento con ácido jasmónico y comprobar, de esta forma, si la inducción del gen *GmFAD7-1* por herida era dependiente de dicha hormona vegetal. Como muestra la figura 4.25, cuando las hojas trifoliales de soja se trataron con JA no se observaron cambios perceptibles en los niveles de RNA mensajero de los genes *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2*. Por lo tanto, los datos sugieren que la respuesta de los genes *GmFAD7* en respuesta a la herida es independiente de ácido jasmónico.

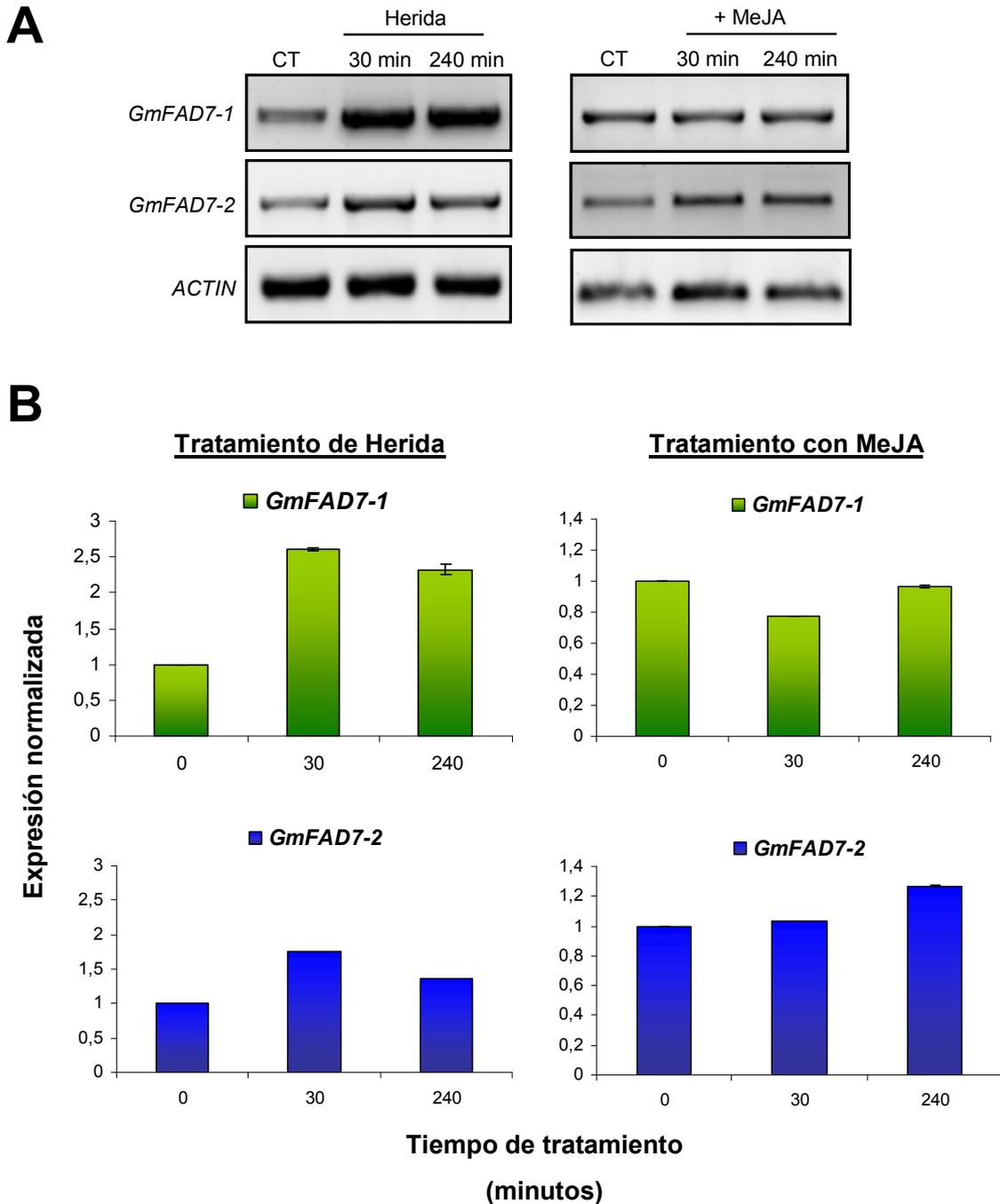


Figura 4.25. (A) Análisis de expresión de los genes *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2* en hojas de soja en respuesta a la herida y al tratamiento con metiljasmonato. El análisis de PCR semicuantitativa se realizó con cebadores específicos para cada gen. El gen de la actina se utilizó como control interno en todos los experimentos. (B) Normalización de la expresión de los genes de las ω 3 desaturasas frente a la expresión del gen de la actina. La cuantificación de la cantidad de mRNA se realizó mediante densitometría de las bandas de PCR.

4.4.1.2. Análisis de los niveles de proteína *GmFAD7* en respuesta a la herida

Para completar el estudio del efecto de la herida sobre las distintas isoformas de la ω 3 desaturasa de ácidos grasos *GmFAD7*, se determinó el perfil de acumulación de dicha proteína en hojas de soja control y sometidas al tratamiento de herida mediante análisis por western blot. Los resultados obtenidos se exponen en la figura 4.26. Tanto en hojas control como en hojas dañadas se observaron las dos bandas características en el rango de pesos moleculares de 39-42 kDa, que ya se han descrito en apartados anteriores de esta misma sección. Cuatro horas después de haberse realizado el daño por herida se observó un incremento de la banda de 39 kDa mientras que la banda de 42 kDa permaneció constante. En conjunto, estos resultados indican que aunque la herida provoca un aumento del mRNA de ambos *GmFAD7*; a nivel de proteína, sólo una de las bandas correspondientes a la proteína *GmFAD7* se ve afectada de forma significativa por el tratamiento de herida.

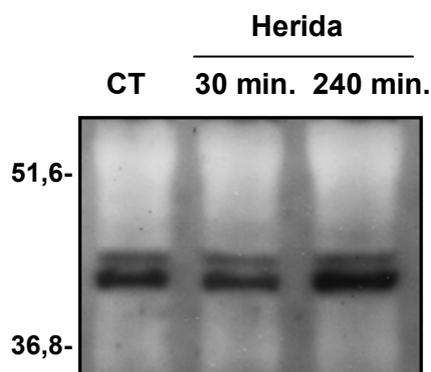


Figura 4.26. Detección inmunológica de la proteína *GmFAD7* en extractos crudos de hojas de soja. CT, hojas control; 30 min., hojas recogidas 30 minutos después de haberse realizado el daño; 240 min., hojas recogidas 240 minutos después de haberse realizado el daño. Se cargaron 15 μ g de proteína por pocillo.

4.4.2. Regulación de la expresión de los genes de las ω 3 desaturasas de ácidos grasos durante el proceso de aclimatación al frío

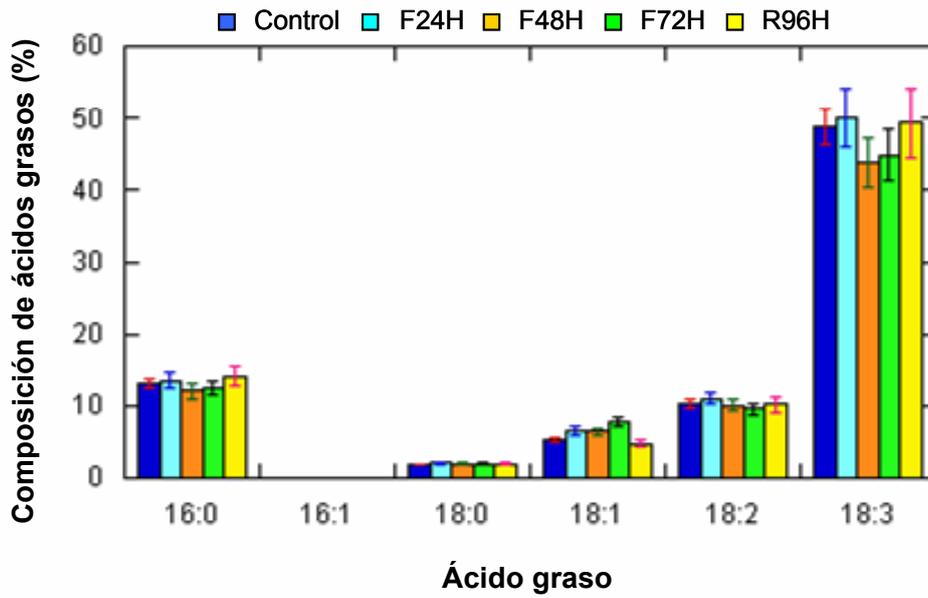
4.4.2.1. Composición de ácidos grasos de suspensiones celulares y plantas de soja crecidas a bajas temperaturas

Con el objetivo de estudiar el efecto de las bajas temperaturas en la desaturación de los ácidos grasos constituyentes de los lípidos, se analizó en primer lugar la composición de ácidos grasos de suspensiones celulares de soja crecidas en medio fotoautótrofo a bajas temperaturas. Para ello, las suspensiones celulares de soja se crecieron en medio líquido KN⁰ bajo condiciones estándar de luz, temperatura y humedad durante 19 días y, posteriormente, se mantuvieron a 4 °C durante tres días consecutivos. Durante el período de incubación en frío, las células de soja se recogieron tal y como se indica en el apartado 3.2.1.2. de la sección de materiales y métodos. Es importante destacar que durante el período de exposición a temperaturas bajas, las suspensiones celulares de soja mostraron un color verde intenso similar al de las células crecidas a la temperatura óptima de crecimiento. Finalmente, la composición de ácidos grasos de los lípidos totales extraídos de las suspensiones celulares de soja correspondientes se analizó mediante cromatografía de gases. El análisis mostró que las suspensiones celulares de soja presentaban un alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados, siendo el ácido linolénico la especie mayoritaria (alrededor del 58 % de los ácidos grasos totales; figura 4.27-A). Estos resultados son similares a los descritos en trabajos anteriores para la misma línea celular (Martin y col., 1984; Alfonso y col., 2001). Como puede observarse en la figura 4.27-A, tras 72 horas de exposición a temperaturas bajas (4-8 °C), el porcentaje de ácido graso 18:3^{Δ^{9,12,15}} desciende levemente, alrededor del 4 %, cuando se compara con la muestra crecida en condiciones estándar de temperatura. Además, este descenso de ácidos grasos trienoicos va acompañado de un ligero aumento (3%) de ácido oleico.

A la vista de estos resultados se decidió comprobar la reversibilidad del efecto que las bajas temperaturas ejercen sobre la composición de ácidos grasos de los lípidos totales. Para ello, las suspensiones celulares sometidas a bajas temperaturas se expusieron a la temperatura estándar de crecimiento durante 4 días y, la composición de ácidos grasos de sus lípidos se determinó mediante cromatografía de gases. Los resultados obtenidos tras el análisis se muestran en la figura 4.27-A. Así, tras el período de exposición a la temperatura óptima de crecimiento, los niveles de los ácidos grasos 18:1^{Δ9} y 18:3^{Δ9,12,15} se recuperaron hasta alcanzar niveles similares a los observados para células control.

Por último, se repitió el mismo estudio en plantas de soja cv Volania. Así, después de 19 días de crecimiento en cultivo hidropónico bajo condiciones estándar de luz, temperatura y humedad, las plantas de soja se mantuvieron a 4 °C durante 3 días consecutivos. Posteriormente, se extrajeron los lípidos totales de las muestras correspondientes y se analizó la composición de ácidos grasos de dichos lípidos por cromatografía de gases. Los resultados de la composición de ácidos grasos se muestran en la figura 4.27-B. Al incubar las plantas de soja a bajas temperaturas durante 72 horas se produce un leve aumento (5 %) de ácido graso linolénico. Es importante destacar que el aumento de ácidos grasos insaturados se produce de forma secuencial con el tiempo de exposición a bajas temperaturas. Así, a las 24 horas de exposición a 4 °C, se produce un incremento leve (3 %) del porcentaje de ácido graso oleico. A las 48 horas de incubación a bajas temperaturas, ese aumento de ácido graso 18:1 se ha convertido en un aumento (4 %) del porcentaje de ácido linoleico y, finalmente, a las 72 horas se observa un aumento de los ácidos grasos trienoicos.

A



B

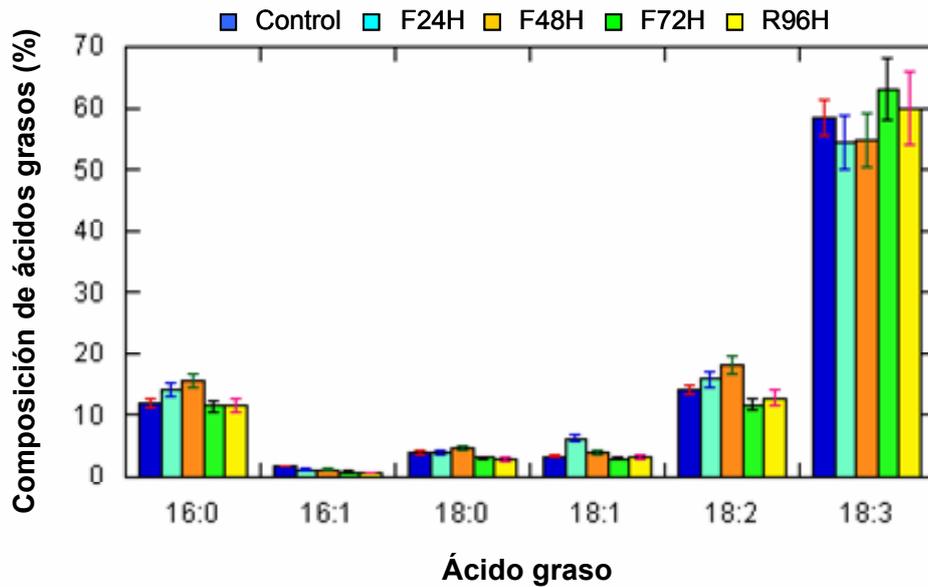


Figura 4.27. (A) Composición de ácidos grasos de suspensiones celulares de soja durante el proceso de aclimatación al frío. (B) Composición de ácidos grasos de hojas trifoliales de soja de 18 días de edad durante el proceso de aclimatación al frío. Control; F24H, 24 horas de exposición a bajas temperaturas; F48H, 48 horas de exposición a bajas temperaturas; F72H, 72 horas de exposición a bajas temperaturas, R96H, 96 horas de exposición a la temperatura estándar de crecimiento. Los lípidos totales se extrajeron a partir de la hoja y los ácidos grasos se determinaron por cromatografía de gases.

De forma idéntica a lo que ocurre en suspensiones celulares, cuando las plantas de soja se sometieron a la temperatura estándar de crecimiento mostraron una recuperación de los niveles de ácidos grasos poliinsaturados hasta valores similares a los de plantas control (figura 4.27-B).

4.4.2.2. Efecto de las bajas temperaturas en la expresión de los genes de las ω 3 desaturasas de ácidos grasos

Una vez examinados los resultados expuestos en el apartado anterior, se decidió comprobar si los cambios observados en la composición de ácidos grasos tanto de suspensiones celulares como de plantas de soja se correlacionaban con variaciones en los niveles de expresión de los genes de las ω 3 desaturasas de ácidos grasos. Para ello, se extrajo el RNA total de los mismos cultivos a partir de los cuales se realizó el análisis de ácidos grasos y se examinaron los niveles de RNA mensajero de los genes de las ω 3 desaturasas mediante RT-PCR. Como se muestra en la figura 4.28, tras 72 horas de exposición a temperaturas bajas no se observaron cambios significativos en los niveles de mRNA de *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2*. De forma similar, los niveles de mRNA *FAD8* permanecieron constantes a lo largo del período de exposición a temperaturas de 4-8 °C, lo que indica que en suspensiones celulares de soja no se produce activación transcripcional del gen *GmFAD8* por frío. En el caso de las distintas isoformas de la ω 3 desaturasa reticular *FAD3*, cuando se realizó el análisis de restricción del fragmento de PCR *GmFAD3* con la enzima *Van91I* para estudiar la expresión de los genes *GmFAD3A* y *GmFAD3B* de forma independiente, se observó que aunque sus mRNAs estaban presentes tanto en las muestras de células control como en las muestras de células sometidas a bajas temperaturas, su perfil de expresión era diferente en respuesta al frío. Así, mientras que los niveles del mRNA de *GmFAD3A* permanecían constantes tras 72 horas de exposición al frío, los niveles de mRNA de *GmFAD3B* disminuían significativamente hasta alcanzar niveles

Resultados

muy bajos. Estos resultados indican que en suspensiones celulares de soja, el gen *GmFAD3B* se regula por frío a nivel transcripcional (figura 4.28).

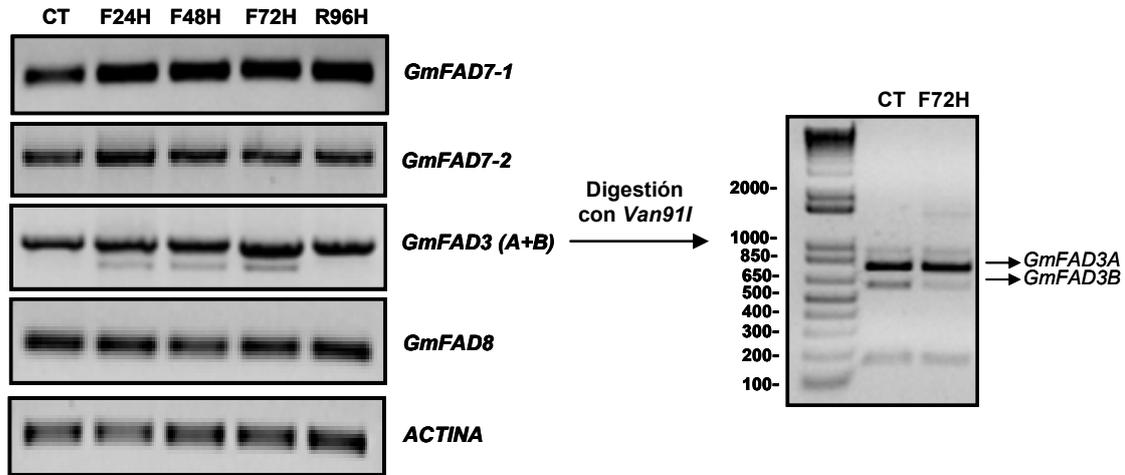


Figura 4.28. Análisis de expresión de los genes de las ω 3 desaturasas mediante PCR semicuantitativa en suspensiones celulares de soja. CT, control; F24H, 24 horas de exposición a bajas temperaturas; F48H, 48 horas de exposición a bajas temperaturas; F72H, 72 horas de exposición a bajas temperaturas, R96H, 96 horas de exposición a la temperatura estándar de crecimiento. El análisis de PCR semicuantitativa se realizó con oligos específicos para cada gen. El gen de la actina se utilizó como control interno en todos los experimentos. El panel de la derecha muestra la digestión del fragmento de PCR *GmFAD3* con la enzima de restricción *Van91I*. Los marcadores de pesos moleculares se indican en pares de bases a la izquierda de la figura.

El estudio de la expresión de los genes de las ω 3 desaturasas de ácidos grasos se completó realizando los mismos experimentos en plantas de soja cv. Volania sometidas a temperaturas bajas (4 °C). De forma análoga, se analizaron los niveles de RNA mensajero de los genes de las ω 3 desaturasas en hojas trifoliales de soja maduras mediante RT-PCR (figura 4.29). Los resultados obtenidos fueron muy similares a los de suspensiones celulares de soja. Así, los niveles de mRNA *GmFAD8* no se modificaron en respuesta a las bajas temperaturas, lo que sugiere que en plantas de soja la regulación del gen *GmFAD8* por frío no tiene lugar a nivel transcripcional. De igual forma, los niveles de RNA mensajero *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2* no variaban de forma significativa tras 72 horas de exposición a frío. El

patrón de bandas obtenido tras la digestión del fragmento de PCR *GmFAD3* con la enzima de restricción *Van91I* confirmó la presencia de los RNA mensajeros de *GmFAD3A* y *GmFAD3B* tanto en las muestras control como en las muestras de frío. Como puede observarse en la figura 4.29, los genes *GmFAD3* presentaban una perfil de expresión diferente y opuesto en respuesta al frío.

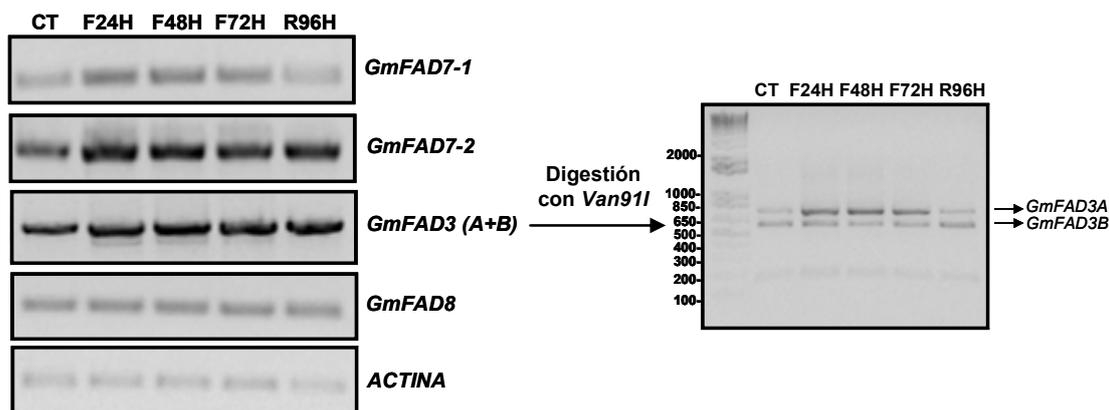


Figura 4.29. Análisis de expresión de los genes de las ω 3 desaturasas mediante PCR semicuantitativa en hojas trifoliales de soja. CT, control; F24H, 24 horas de exposición a bajas temperaturas; F48H, 48 horas de exposición a bajas temperaturas; F72H, 72 horas de exposición a bajas temperaturas, R96H, 96 horas de exposición a la temperatura estándar de crecimiento. El análisis de PCR semicuantitativa se realizó con oligos específicos para cada gen. El gen de la actina se utilizó como control interno en todos los experimentos. El panel de la derecha muestra la digestión del fragmento de PCR *GmFAD3* con la enzima de restricción *Van91I*. Los marcadores de pesos moleculares se indican en pares de bases a la izquierda de la figura.

Así, tras la exposición a bajas temperaturas se producía un aumento significativo del gen *GmFAD3A*. Además, cuando las hojas de soja se sometían de nuevo a la temperatura estándar de crecimiento, los niveles de mRNA *GmFAD3A* disminuían hasta alcanzar niveles similares a los de las plantas control. Por el contrario, el gen *GmFAD3B* experimentó una ligera disminución en los niveles de expresión génica cuando las plantas de soja se incubaron a bajas temperaturas. Al igual que ocurre con *GmFAD3A*, cuando las plantas se sometieron de nuevo a la

Resultados

temperatura óptima de crecimiento, los niveles de *GmFAD3B* alcanzaron los niveles de las plantas control. Los resultados mostraron que a la temperatura óptima de crecimiento el mRNA *GmFAD3B* es más abundante que el mRNA *GmFAD3A* mientras que a temperaturas de 4 °C ocurre lo contrario. Todos estos datos sugieren que los genes *GmFAD3A* y *GmFAD3B* se regulan a nivel transcripcional en respuesta a las bajas temperaturas.

Sorprendentemente, tras la exposición a bajas temperaturas, tanto en suspensiones celulares como en plantas de soja, se produjo una inducción específica de un fragmento de PCR de peso molecular inferior al fragmento de PCR *GmFAD3*, que desaparecía cuando las suspensiones celulares y las plantas se incubaban de nuevo a la temperatura óptima de crecimiento (figura 4.29). Sin embargo, la inducción de esta banda es más leve en plantas de soja y parece disminuir con el tiempo de exposición al frío. Después de la extracción y la purificación mediante el método de lana de vidrio, dicho fragmento de PCR se clonó en el vector pGEM[®]-T Easy y se envió a secuenciar al servicio de secuenciación del CNIO. La secuencia enviada por dicho servicio se analizó con el software BioEdit 7.0.9.0. para comprobar la identidad del producto amplificado. En base a los alineamientos realizados con este programa se identificó un nuevo mRNA, denominado *GmFAD3A-1*, que únicamente se diferenciaba del mRNA *GmFAD3A* en que presentaba una delección interna de 138 nucleótidos (figura 4.30). Para comprobar si los mRNAs *GmFAD3A* y *GmFAD3A-1* se generaban a partir de un mismo gen o de dos genes diferentes, realizamos una búsqueda exhaustiva en la base del genoma de soja (www.phytozome.net). Esta búsqueda nos permitió determinar la existencia de un único gen *GmFAD3A*, lo que indica que los dos mRNAs se generan a partir del gen *GmFAD3A* por “splicing” alternativo.

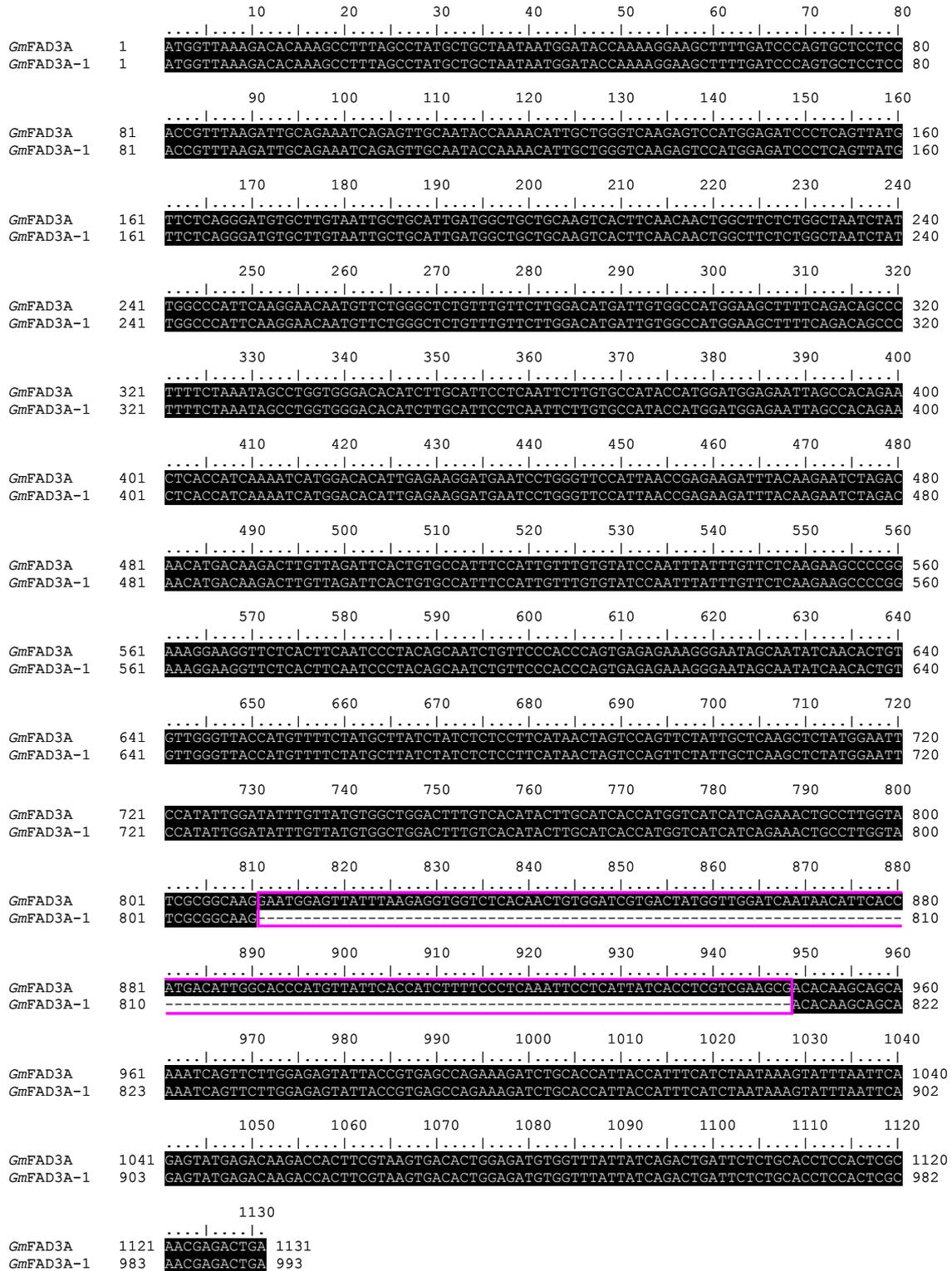


Figura 4.30. Alineamiento de las secuencias de GmFAD3A y GmFAD3A-1 a nivel de nucleótidos. Los residuos idénticos se representan sobre fondo negro. El recuadro de color rosa representa la delección de 138 nucleótidos presente en GmFAD3A-1.

Resultados

La comparación de las secuencias *GmFAD3A* y *GmFAD3A-1*, deducidas experimentalmente, y la secuencia genómica del gen *GmFAD3A*, obtenida a partir de la base de datos del genoma de soja, nos permitió identificar que la delección de 138 nucleótidos observada en el mRNA *GmFAD3A-1* conlleva la pérdida del exón siete en su totalidad y, por lo tanto, el evento de “splicing” alternativo resulta en una fusión del exón seis con el exón ocho (figura 4.31). Todos estos resultados apuntan que durante el proceso de aclimatación al frío, el gen *GmFAD3A* está regulado por splicing alternativo del tipo eliminación de exón.

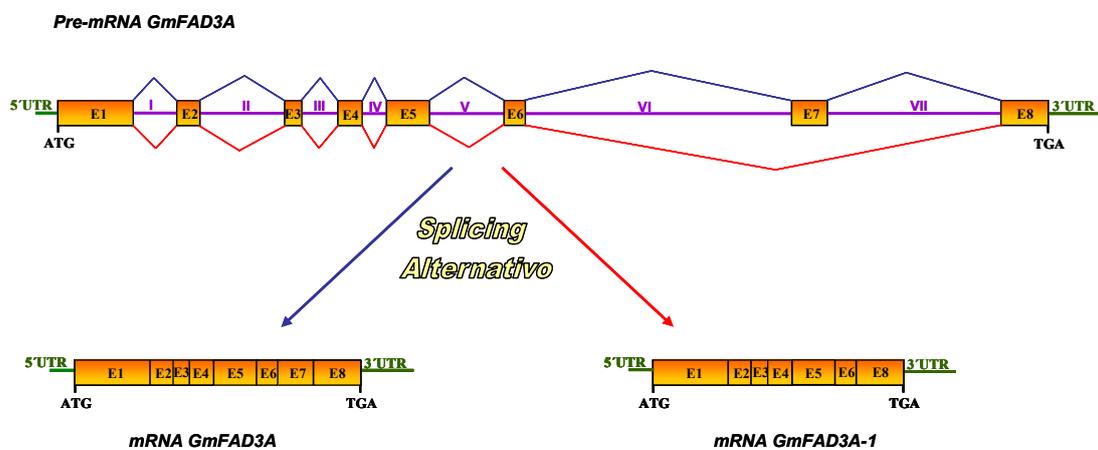


Figura 4.31. Esquema del “splicing” alternativo del pre-mRNA de *GmFAD3A*.

Por último, datos preliminares acerca del análisis de los niveles de proteína *GmFAD7* indican que, tanto en plantas como en suspensiones celulares de soja, la proteína *GmFAD7* no varía por la exposición a bajas temperaturas.

4.5. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LOS MUTANTES *fad5* y *fad7/fad8/fad3* DE *ARABIDOPSIS THALIANA*

Con el objetivo de obtener información a nivel molecular de los componentes y mecanismos implicados en la comunicación que se establece entre el cloroplasto y el retículo endoplasmático para la síntesis coordinada de lípidos en plantas, se compararon los perfiles de transcripción de dos mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes en la insaturación de ácidos grasos (mutante *fad5* y triple mutante *fad3/fad7/fad8*) con la cepa silvestre *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-0). El mutante *fad5* de *Arabidopsis thaliana* se caracteriza bioquímicamente por tener cantidades elevadas de ácido palmítico y cantidades reducidas de ácidos grasos insaturados de dieciséis átomos de carbono como consecuencia de una única mutación nuclear en el locus *fad5* (tabla 4.4). Además de los cambios de los niveles de insaturación de los lípidos de hojas, desde el punto de vista fisiológico este mutante presenta una ligera disminución del contenido de clorofila (15%) y una velocidad de recuperación reducida después de la fotoinhibición (Kunst y col., 1988). Sin embargo, no presenta alteraciones fenotípicas siendo indistinguible de la cepa silvestre durante el crecimiento bajo condiciones estándar (Kunst y col., 1988). Además, como consecuencia de la ausencia de 16:3^{Δ7,10,13}, el mutante *fad5* es incapaz de producir la oxilipina dn-OPDA, hormona implicada en la respuesta a la herida (Kunst y col., 1988; Weber y col., 1997).

<i>A. thaliana</i>	Ácidos grasos								
	16:0	cis-16:1	trans-16:1	16:2	16:3	18:0	18:1	18:2	18:3
Cepa silvestre	15	traza	3	traza	14	1	3	14	48
<i>fad5</i>	24	1	3	traza	traza	1	3	17	50
<i>fad3/fad7/fad8</i>	15	1	2	9	0	1	6	65	0

Tabla 4.4. Composición total de ácidos grasos (%) de los lípidos de hoja de la cepa silvestre de *Arabidopsis thaliana* y de los mutantes *fad5* y *fad3/fad7/fad8*. Adaptada de Wallis y Browse, 2002.

Resultados

El triple mutante *fad3/fad7/fad8* de *Arabidopsis thaliana* es incapaz de sintetizar ácidos grasos trienoicos como consecuencia de una mutación en tres genes estructurales que codifican ω 3 desaturasas de ácidos grasos (tabla 4.4). Este mutante no presenta diferencias ni en el desarrollo vegetativo ni en el crecimiento bajo condiciones normales cuando se compara con la cepa silvestre y, además, la fotosíntesis apenas se ve afectada. Sin embargo, este mutante presenta esterilidad masculina y no produce semillas bajo condiciones estándar de crecimiento. Debido a que carece del precursor de las oxilipinas, el triple mutante *fad3/fad7/fad8* es incapaz de producir estas hormonas, que son componentes de señalización esenciales que regulan los últimos estadios de maduración y la liberación del polen. Es importante destacar que la aplicación exógena de ácido linolénico o jasmonatos en el estadio específico adecuado restablece la fertilidad de este mutante (McConn y Browse, 1996).

Durante la manipulación de la línea mutante *fad3/fad7/fad8* se observó, de forma reiterada, un aumento de la longitud de la raíz (figura 4.32). Esta característica fenotípica del triple mutante es consistente con el papel que desempeña el ácido jasmónico en el control del crecimiento de la raíz (Staswick y col., 1992). Sin embargo, de forma inesperada, en el caso del mutante *fad5*, se observó también un aumento del tamaño de la raíz pero de menor magnitud que en el mutante *fad3/fad7/fad8* (figura 4.32).



Figura 4.32. (A) Crecimiento de la línea vegetal silvestre (ecotipo Col-0) y de las líneas mutantes *fad5* y *fad3/fad7/fad8* de *Arabidopsis thaliana*.

Para llevar a cabo esta comparación se han realizado experimentos de análisis global de la expresión génica mediante la tecnología de micromatrices de DNA. Los experimentos para el análisis de expresión génica mediante hibridación en micromatrices de DNA fueron realizados por la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología, UGCNB (Madrid, España). El Genechip[®] utilizado para la hibridación es el microchip comercial de la compañía Affymetrix denominado “Arabidopsis ATH1 Genome Array”. Este microarray fue diseñado en colaboración con el Institute for Genome Research (TIGR) y contiene unas 22500 sondas que representan aproximadamente 24000 secuencias génicas en un único microarray. Los resultados proporcionados por este servicio se analizaron exhaustivamente mediante la utilización de criterios de filtrado de los datos basados en la variación del nivel de expresión de los genes. Para ello, realizamos una asignación arbitraria de un umbral respecto a la diferencia de expresión de forma que aquellos genes que presentaban una tasa de variación ≥ 1.5 se consideraron genes inducidos y aquellos genes que presentaban una tasa de variación ≤ -1.5 se consideraron genes reprimidos. Además, los genes se seleccionaron y ordenaron en función dos valores diferentes: el p-valor ($\leq 0,001$) lo que nos permitió distinguir entre las diferencias biológicamente significativas de las muestras de estudio y las diferencias puramente debidas al azar, es decir, nos permitió realizar una discriminación de falsos positivos y el b-valor (≥ 5), que es indicativo del número de veces que un determinado gen se expresa de forma diferencial con respecto a su control.

4.5.1. Análisis transcriptómico del triple mutante *fad3/fad7/fad8* de *Arabidopsis thaliana*

El estudio transcriptómico del triple mutante *fad3/fad7/fad8* de *Arabidopsis thaliana* nos ha permitido detectar cambios reales en los niveles de expresión de 700 genes de los 24000 representados en el oligochip ATH1. Tras realizar un análisis completo de los datos utilizando los criterios de filtrado citados anteriormente, se

Resultados

seleccionaron 159 genes que se expresaron de forma diferencial, de los cuales 100 se indujeron y 59 se reprimieron respecto al genotipo silvestre (figura 4.33).

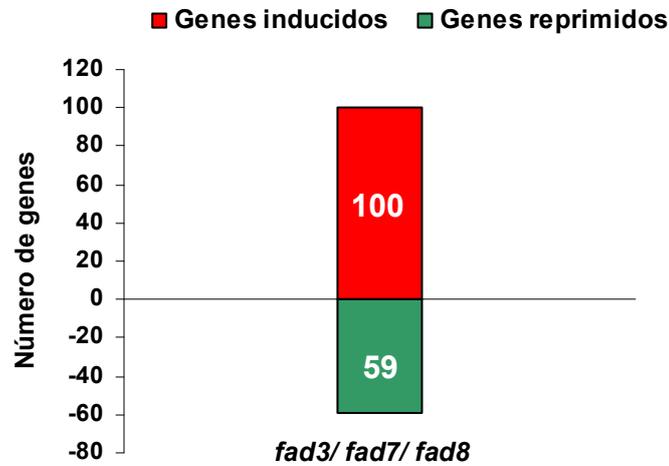


Figura 4.33. Número de genes inducidos (en rojo) o reprimidos (en verde) en el mutante *fad3/fad7/fad8* tras el análisis transcriptómico en el chip ATH1 de Affymetrix.

Los genes seleccionados se agruparon en distintas categorías funcionales mediante la utilización de “Gene Ontologies classification” en el sitio web Arabidopsis Internacional Resource Gen Ontology (TAIR-GO; www.arabidopsis.org). La figura 4.34 muestra la distribución de los genes seleccionados en las distintas categorías funcionales y la web FatiGo (fatigo.bionfo.cipf.es).

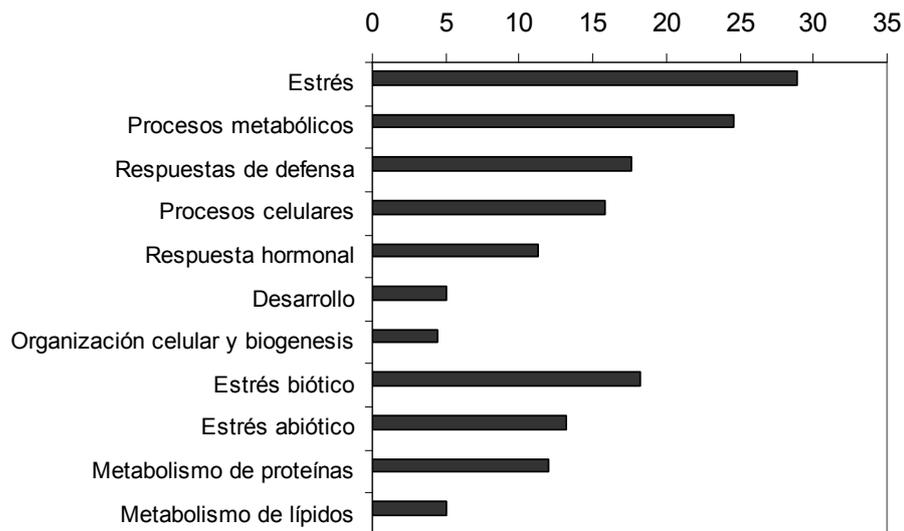


Figura 4.34. Clasificación de los genes expresados significativamente en el mutante *fad3/fad7/fad8* según las distintas categorías funcionales.

La información más relevante que surge del análisis “GO” de los genes con expresión diferencial en el mutante *fad3/fad7/fad8* es que las categorías funcionales de “estrés” y “respuesta de defensa” son las más representadas, con un 29 % y 17,6 % del total, respectivamente. Si la categoría de respuesta a estrés se desglosa en respuesta a estímulos bióticos y abióticos, se obtiene que un 18,24 % de los genes expresados de forma diferencial están implicados en estrés biótico y un 13,2 % de los genes está relacionado con los estímulos abióticos. Este resultado no es sorprendente en el caso del triple mutante *fad3/fad7/fad8* ya que debido a su incapacidad para sintetizar ácidos grasos trienoicos, este mutante no produce ninguna de las hormonas de la familia de los jasmonatos. De hecho, un 11,3 % de los genes con expresión diferencial estaban implicados en respuesta hormonal.

Un dato relevante obtenido del análisis transcriptómico del mutante *fad3/fad7/fad8* es que un número importante de genes con expresión diferencial están directamente relacionados con la biosíntesis de jasmonatos o con las rutas de señalización de dichas hormonas. Así, entre los genes reprimidos en el triple mutante se detectan varios genes que codifican proteínas directamente implicadas en la síntesis de los componentes de la familia de los jasmonatos tales como óxido de aleno ciclasa (AOC2; *At3g25780*) y lipooxigenasas (LOX2, *At3g45140*; LOX3, *At1g17420*). Además, algunos de los genes expresados diferencialmente han sido identificados como genes regulados por las hormonas de la familia de los jasmonatos, como es el caso del gen *At1g19670*, que codifica una proteína inducible por coronatina, del gen *At2g39330*, que codifica una proteína de unión a mirosinasa y de los genes *At3g45140* y *At1g17420*, que codifican las lipoxigenasas *AtLOX2* y *AtLOX3*, respectivamente (Benedetti y col., 1998). Además, como consecuencia de la propia mutación, uno de los genes fuertemente reprimidos es el gen *At3g11170*, que codifica la ω 3 desaturasa *AtFAD7*. Esta ω 3 desaturasa de ácidos grasos es la responsable de la síntesis del precursor de los miembros de la familia de los jasmonatos.

Resultados

Un grupo de genes expresados de forma diferencial en el triple mutante *fad3/fad7/fad8* de *Arabidopsis thaliana* codifica proteínas de defensa contra patógenos tales como *At2g19990*, que codifica una proteína relacionada con la patogénesis PR1, *At1g66100*, que codifica tionina y los genes *At5g44420* y *At2g26020* que codifican las proteínas PDF1.2a y PDF1.2b, respectivamente. Todos estos genes codifican proteínas de defensa contra patógenos bien caracterizadas y, además, algunos de ellos están regulados fuertemente por ácido jasmónico y etileno (Penninckx y col., 1998; Solano y col., 1998; Sels y col., 2008).

Múltiples evidencias indican que los procesos de regulación de la estabilidad de proteínas por ubiquitinación constituyen un mecanismo central de la señalización de ácido jasmónico en plantas (Devoto y col., 2002; Xu y col., 2002; Feng y col., 2003). En este sentido, es reseñable la presencia de tres genes relacionados con la degradación de proteínas a través del proteosoma en rutas dependientes de ubiquitina. Así, el gen *At5g41700*, codifica una enzima conjugadora de ubiquitina E2; el gen *At1g27540*, codifica una proteína de la familia F-box que podría estar implicada en este proceso y el gen *At3g48360* codifica una proteína de tipo "Speckle POZ" que participa en el reconocimiento de proteínas diana que van a conjugarse con ubiquitina (Gingerich y col., 2005).

De acuerdo a todo lo anterior, cabe señalar que el 22 % de los genes con expresión diferencial seleccionados en el triple mutante de *Arabidopsis thaliana* fueron identificados previamente, mediante análisis de micromatrices, como genes regulados por ácidos jasmónico (JRGs) y genes regulados por OPDA (ORGs) por Taki y col., (2005).

El ácido jasmónico y sus derivados desempeñan un papel central en la cascada de eventos que ocurren en los procesos de elicitación, causando directa o indirectamente la activación de genes del metabolismo secundario (Gundlach y col., 1992). Entre los genes expresados diferencialmente en el triple mutante respecto a la cepa silvestre, sólo se han identificado ocho genes relacionados con el metabolismo

secundario, tales como la enzima LDOX (*At5g05600*), la enzima 2-hidroxiflavona reductasa (*At1g19540*) o hidroxiflavonol 4- reductasa (*At5g42800*).

Por último, tres genes expresados de forma diferencial en el triple mutante respecto a la cepa silvestre codifican enzimas implicadas en el metabolismo energético. Así, el gen *At1g60810*, codifica la enzima ATP citrato liasa, el gen *At1g59900*, codifica la enzima piruvato deshidrogenasa y, finalmente, el gen *At1g09420*, codifica la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Las enzimas ATP-citrato liasa y piruvato deshidrogenasa, se han implicado en la formación del acetyl-CoA necesario para la síntesis de ácidos grasos; sin embargo, en el caso de la ATP citrato liasa, dicha contribución no está aceptada universalmente (Ke y col., 2000). Por otro lado, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa es la enzima que cataliza la primera reacción enzimática de la ruta de las pentosas fosfato. El hecho de que el gen que codifica esta enzima esté reprimido en el triple mutante podría asegurar que toda la glucosa-6-fosfato sintetizada fuera utilizada para la síntesis de piruvato a través de la ruta glucolítica.

4.5.1.1. Agrupamiento jerárquico de los genes con expresión diferencial en el mutante *fad3/fad7/fad8* de *Arabidopsis thaliana*

Para identificar grupos de genes con un perfil de expresión génica similar en las condiciones experimentales analizadas se realizó un análisis de clusters mediante la utilización del método de agrupamiento jerárquico en el programa Multiple Array Viewer. Para realizar el agrupamiento jerárquico se utilizaron únicamente los genes que se expresaban de forma diferencial, siendo excluido el subconjunto de genes restante. Los algoritmos de agrupamiento jerárquico construyen un árbol o dendograma que representa la estructura jerárquica de los genes en base a los valores de expresión génica, de modo que la longitud de las ramas refleja el grado de similitud entre ellos. El dendograma generado se muestra en la figura 4.35.

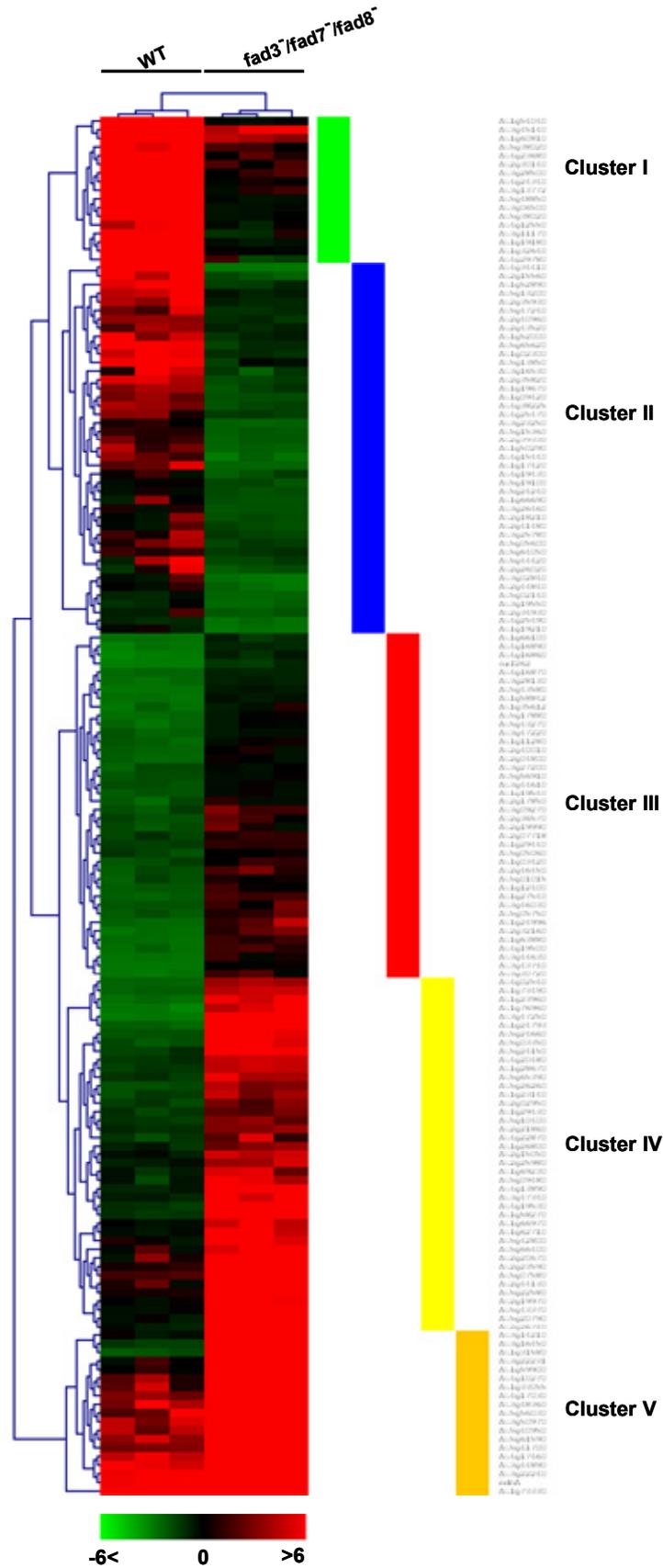


Figura 4.35. Agrupamiento jerárquico de los genes expresados diferencialmente en el triple mutante *fad3/fad7/fad8* de *Arabidopsis thaliana*.

Los genes se agruparon en cinco clusters claramente diferenciados. Los clusters I y II corresponden a genes reprimidos en el análisis y los cluster restantes (III-V) incluyen genes que se encuentran inducidos en el mutante respecto a la cepa silvestre. En la figura 4.36 se muestran los gráficos que detallan el perfil de expresión de los genes agrupados por clusters en el triple mutante *fad3/fad7/fad8* de *A.thaliana*. En la tabla 4.5 se muestra un listado de los genes expresados diferencialmente en el mutante *fad3/fad7/fad8* agrupados por clusters.

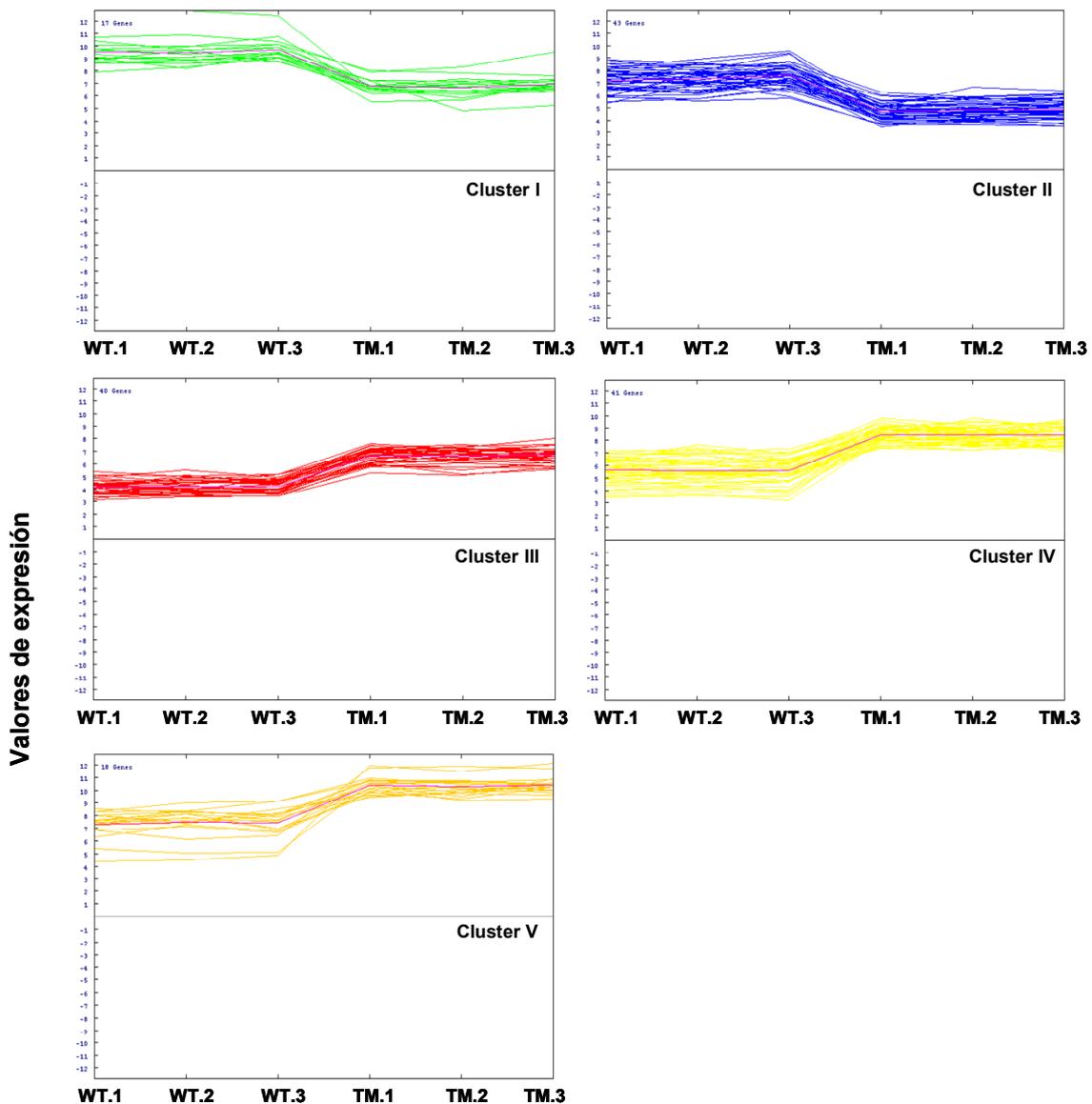


Figura 4.36. Perfil de expresión de los genes agrupados por clusters en el triple mutante *fad3/fad7/fad8*.

Resultados

El análisis de los genes agrupados por clusters mostró que un 31,25 % y un 32,56 % de los genes agrupados en los clusters I y II eran genes previamente identificadas por Taki y col., (2005) como JRGs. La mayoría de los ORGs se agruparon en el cluster II. Aunque en el resto de los clusters también se localizaron genes JRGs y ORGs, éstos se encontraron más dispersos no mostrando ningún patrón de agrupamiento.

Gen	Fold change	p-valor	Descripción	Taki ^a	Devoto ^b
<i>Genes reprimidos</i>					
<i>Cluster I</i>					
<i>At1g54040</i>	-6,15	2,61E-12	jasmonate inducible protein		coi-1 (-)
<i>At3g11170</i>	-3,93	9,85E-08	omega-3 fatty acid desaturase, chloroplast precursor		
<i>At4g29780</i>	-3,88	4,54E-06	hypothetical protein	ORG (-)	
<i>At1g19180</i>	-3,81	2,24E-08	unknown protein	JRG (-)	
<i>At1g32640</i>	-3,07	2,97E-08	protein kinase	JRG (-)	
<i>At3g06500</i>	-2,86	1,51E-09	neutral invertase, putative similar to neutral invertase	JRG (+)	
<i>At5g48850</i>	-2,70	1,37E-08	putative protein similar to unknown protein		
<i>At5g38020</i>	-2,29	1,29E-06	S-adenosyl-L-methionine:carboxyl methyltransferase family protein	JRG (+)	
<i>At1g60810</i>	-2,20	9,00E-10	ATP citrate-lyase		
<i>At4g24340</i>	-2,13	8,46E-09	putative protein storage protein - <i>Populus deltoides</i> ,		
<i>At3g28500</i>	-2,08	2,92E-06	acidic ribosomal protein P2b (rpp2b),		
<i>At4g23680</i>	-2,06	2,83E-08	major latex protein-related / MLP-related		
<i>At3g45140</i>	-2,05	1,97E-05	lipoxygenase AtLOX2	JRG (+)	
<i>At4g12550</i>	-2,03	5,54E-05	putative cell wall-plasma membrane disconnecting CLCT protein		
<i>At2g30140</i>	-1,90	3,82E-05	putative glucosyltransferase		
<i>At3g13772</i>	-1,84	1,22E-05	multispanning membrane protein		
<i>Cluster II</i>					
<i>At4g34410</i>	-5,38	4,78E-12	putative protein ethylene-responsive element binding protein	JRG (-)	
<i>At2g15560</i>	-4,27	1,65E-08	unknown protein		
<i>At4g15440</i>	-3,65	8,23E-11	hydroperoxide lyase (HPOL) like protein	JRG (+)	coi-1 (-)
<i>At1g17420</i>	-3,62	1,60E-10	lipoxygenase	JRG (+)	coi-1 (-)
<i>At1g52890</i>	-3,53	1,99E-06	NAM-like protein similar to NAM (no apical meristem)	JRG (-)	
<i>At1g50290</i>	-3,38	8,45E-10	hypothetical protein		
<i>At2g35820</i>	-3,17	1,67E-10	unknown protein		
<i>At3g02840</i>	-3,02	1,89E-08	unknown protein		

La tabla continua en la página siguiente

Gen	Fold change	p-valor	Descripción	Taki ^a	Devoto ^b
<i>At5g65620</i>	-2,99	3,44E-08	oligopeptidase A		
<i>At3g16530</i>	-2,98	4,97E-05	putative lectin		
<i>At2g39330</i>	-2,95	7,56E-11	putative myrosinase-binding protein	JRG (+)	
<i>At4g38225</i>	-2,90	6,84E-10	Expressed protein		
<i>At2g44840</i>	-2,89	1,20E-09	putative ethylene response element binding protein (EREBP)	JRG (-)	coi-1 (-)
<i>At1g09420</i>	-2,88	1,38E-10	putative glucose-6-phosphate dehydrogenase		
<i>At3g23250</i>	-2,79	3,38E-11	myb-related transcription factor	ORG (-)	
<i>At1g19670</i>	-2,75	1,24E-08	unknown protein contains similarity to chlorophyllase	JRG (+)	coi-1 (-)
<i>At1g19210</i>	-2,72	1,16E-08	AP2 domain transcription factor, putative similar to AP2 domain transcription factor	ORG (-)	
<i>At5g15360</i>	-2,69	9,94E-11	putative protein		
<i>At1g02300</i>	-2,68	3,57E-10	cathepsin B-like cysteine protease, putative		
<i>At5g44420</i>	-2,48	3,65E-04	antifungal protein-like (PDF1.2)		coi-1 (-)
<i>At5g13850</i>	-2,36	6,56E-06	putative protein contains similarity to nascent polypeptide associated complex alpha chain		
<i>At2g26020</i>	-2,34	6,68E-04	putative antifungal protein		
<i>At5g05600</i>	-2,34	2,62E-07	leucoanthocyanidin dioxygenase-like protein	JRG (+)	
<i>At1g52000</i>	-2,32	1,30E-05	myrosinase binding protein	JRG (+)	
<i>At4g25470</i>	-2,28	1,08E-06	DRE CRT-binding protein DREB1C involved in low-temperature-responsive		coi-1 (+)
<i>At3g25780</i>	-2,26	1,31E-07	unknown protein, allene oxide cyclase, putative		
<i>At3g26460</i>	-2,22	6,95E-07	major latex protein-related / MLP-related	JRG (+)	
<i>At5g13200</i>	-2,22	6,51E-07	ABA-responsive protein	ORG (+)	
<i>At2g35930</i>	-2,21	2,08E-07	unknown protein	ORG/JA (-/+)	
<i>At1g66690</i>	-2,16	1,61E-05	unknown protein		
<i>At2g18210</i>	-2,15	7,14E-06	unknown protein		
<i>At4g19430</i>	-2,14	5,36E-06	expressed protein		
<i>At2g40960</i>	-2,14	8,34E-10	unknown protein	JRG (+)	
<i>At5g47240</i>	-2,09	2,79E-06	mutT domain protein-like	JRG (+)	

La tabla continua en la página siguiente

Gen	Fold change	p-valor	Descripción	Taki^a	Devoto^b
<i>At2g34930</i>	-1,98	1,26E-05	putative disease resistance protein	JRG (+)	coi-1 (+)
<i>At5g02140</i>	-1,95	4,72E-08	thaumatin-like protein thaumatin-like protein SCUTL2		
<i>At3g19550</i>	-1,91	5,22E-06	hypothetical protein		
<i>At4g25490</i>	-1,90	1,18E-07	transcriptional activator CBF1 involve in low-temperature-responsive	ORG (+)	
<i>At5g19100</i>	-1,90	3,93E-08	dermal glycoprotein precursor		
<i>At5g24240</i>	-1,89	5,98E-08	ubiquitin		
<i>At2g41480</i>	-1,88	3,26E-05	putative peroxidase		
<i>At2g43520</i>	-1,78	2,88E-06	trypsin inhibitor, putative	JRG (+)	
<i>At5g64050</i>	-1,76	2,15E-08	glutamate-tRNA ligase		
Genes activados					
<u>Cluster III</u>					
<i>At2g32160</i>	3,58	1,39E-09	hypothetical protein predicted by genscan		
<i>At1g24996</i>	3,46	1,47E-07	F5A9.10 unknown protein		
<i>At3g30720</i>	3,42	8,65E-11	unknown protein		
<i>At1g63880</i>	3,28	2,26E-12	putative disease resistance protein		
<i>At4g19500</i>	3,23	3,08E-11	resistance protein, like downy mildew resistance protein <i>AtRPP5</i>		
<i>At3g44630</i>	3,19	1,55E-08	disease resistance protein		
<i>At3g43740</i>	3,16	1,21E-12	leucine-rich repeat protein LRP		
<i>At1g27540</i>	2,97	3,30E-09	F-box family protein		
<i>At5g05750</i>	2,70	4,51E-09	DnaJ-like protein		
<i>At3g46030</i>	2,67	6,46E-08	histone H2B -like protein histone H2B1		
<i>At5g17880</i>	2,66	8,65E-09	disease resistance protein		
<i>At2g46450</i>	2,64	1,20E-08	putative cyclic nucleotide-regulated ion channel protein		coi-1 (+)
<i>At3g09270</i>	2,58	1,10E-08	putative glutathione transferase	JRG (+)	
<i>At1g35612</i>	2,58	9,55E-08	hypothetical protein		
<i>At5g43270</i>	2,56	1,33E-09	squamosa promoter binding protein-like 2		
<i>At2g04800</i>	2,54	6,23E-08	unknown protein		

La tabla continua en la página siguiente

Gen	Fold change	p-valor	Descripción	Taki ^a	Devoto ^b
<i>At4g16860</i>	2,52	3,35E-09	disease resistance RPP5 like protein		
<i>At1g12400</i>	2,51	1,70E-10	hypothetical protein		
<i>At2g40010</i>	2,51	4,14E-09	60S acidic ribosomal protein P0		coi-1 (-)
<i>At1g58842</i>	2,50	5,62E-10	viral resistance protein, putative		
<i>At5g43580</i>	2,47	3,29E-08	unknown protein	JRG (+)	
<i>At1g11280</i>	2,46	4,15E-09	serine/threonine kinase		
<i>At2g36570</i>	2,39	2,07E-06	putative receptor-like protein kinase		coi-1 (-)
<i>At5g01015</i>	2,29	1,35E-07	Expressed protein		
<i>At2g17850</i>	2,26	7,98E-07	senescence-associated protein		
<i>At1g03420</i>	2,25	2,26E-08	unknown protein		
<i>At2g19990</i>	2,24	2,17E-06	pathogenesis-related protein (PR-1)		
<i>At4g16890</i>	2,20	5,43E-06	disease resistance RPP5 like protein		
<i>At1g19540</i>	2,08	1,42E-08	2-hydroxyisoflavone reductase		
<i>At3g28130</i>	2,05	2,62E-08	unknown protein		
<i>At3g47220</i>	2,03	1,20E-08	phosphoinositide-specific phospholipase C family protein		
<i>At3g27200</i>	1,99	1,99E-06	blue copper protein, putative similar to uclacyanin I		
<i>orf262</i>	1,97	2,87E-06	hypothetical protein		
<i>At2g07718</i>	1,96	1,18E-06	hypothetical protein		
<i>At1g29440</i>	1,95	9,29E-11	auxin-induced protein		
<i>At3g44610</i>	1,95	3,54E-08	protein kinase		
<i>At5g56910</i>	1,94	4,38E-09	expressed protein		
<i>At4g16870</i>	1,83	6,47E-09	retrotransposon like protein		
<i>At5g05060</i>	1,82	1,50E-07	putative protein similar to unknown protein (pir T00890)		
<i>At1g66100</i>	1,81	1,60E-06	thionin	JRG (+)	
<u>Cluster IV</u>					
<i>At3g47250</i>	5,56	0,00000000	putative protein various predicted genes		
<i>At1g24793</i>	5,13	0,00000000	F5A9.18 unknown protein		

La tabla continua en la página siguiente

Gen	Fold change	p-valor	Descripción	Taki ^a	Devoto ^b
<i>At1g76960</i>	4,90	0,00000000	unknown protein		
<i>At1g23960</i>	4,46	0,00000000	unknown protein		
<i>At5g24660</i>	4,00	0,00000000	putative protein	ORG (+)	
<i>At5g03350</i>	3,99	0,00000002	putative protein		
<i>At1g73490</i>	3,81	0,00000000	unknown protein		
<i>At4g02540</i>	3,74	8,13E-13	putative protein similar to <i>A. thaliana</i> hypothetical protein		
<i>At5g24150</i>	3,45	7,38E-10	squalene monooxygenase		coi-1 (+)
<i>At1g58270</i>	3,43	2,97E-08	unknown protein contains Pfam profile		
<i>At4g19530</i>	3,32	1,50E-09	TMV resistance protein N		
<i>At5g26260</i>	2,99	2,68E-11	putative protein		
<i>At4g13890</i>	2,98	1,29E-09	glycine hydroxymethyltransferase		
<i>At5g20790</i>	2,87	1,75E-07	putative protein		
<i>At1g28670</i>	2,81	2,31E-10	lipase		
<i>At1g23140</i>	2,78	1,63E-08	unknown protein		
<i>At3g47340</i>	2,74	1,05E-08	glutamine-dependent asparagine synthetase		coi-1 (-)
<i>At4g20480</i>	2,70	1,84E-11	hypothetical protein		
<i>At5g65390</i>	2,66	2,23E-08	unknown protein		
<i>At2g19970</i>	2,51	1,21E-06	putative pathogenesis-related protein		
<i>At5g43370</i>	2,46	9,85E-08	inorganic phosphate transporter (dbj BAA24282.1)		
<i>At5g09480</i>	2,46	5,28E-06	PEE-rich protein		
<i>At2g02950</i>	2,39	6,74E-08	unknown protein		
<i>At4g22870</i>	2,39	1,85E-06	anthocyanidin synthase		
<i>At2g20670</i>	2,34	6,23E-06	unknown protein	JRG (+)	
<i>At5g10400</i>	2,26	5,74E-08	histone H3		
<i>At5g66400</i>	2,24	2,11E-03	dehydrin (RAB18)		coi-1 (-)
<i>At2g23590</i>	2,23	6,22E-07	putative acetone-cyanohydrin lyase		
<i>At1g29430</i>	2,13	3,65E-06	auxin-induced protein		

La tabla continua en la página siguiente

Gen	Fold change	p-valor	Descripción	Taki ^a	Devoto ^b
<i>At1g62710</i>	2,08	3,29E-06	beta-VPE		coi-1 (+)
<i>At5g42800</i>	2,05	1,13E-05	dihydroflavonol 4-reductase		coi-1
<i>At2g21860</i>	2,04	1,23E-09	violaxanthin de-epoxidase		
<i>At1g69230</i>	2,00	1,05E-05	putative nitrilase-associated protein similar to NAP16kDa protein		
<i>At5g07580</i>	1,94	1,22E-06	transcription factor-like protein ethylene responsive element binding factor 5	JRG (+)	
<i>At2g44130</i>	1,85	2,82E-06	unknown protein		
<i>At1g26800</i>	1,84	1,79E-05	hypothetical protein		
<i>At1g66970</i>	1,82	1,81E-05	unknown protein		
<i>At2g15050</i>	1,80	7,87E-08	putative lipid transfer protein		
<i>At2g25980</i>	1,79	1,88E-06	similar to jasmonate-inducible proteins from Brassica napus		
<i>At5g22580</i>	1,78	2,83E-06	unknown protein		
<u>Cluster V</u>					
<i>At1g31580</i>	7,24	1,03E-13	ORF1, putative		
<i>At3g14210</i>	5,35	3,47E-13	myrosinase-associated protein		
<i>At3g16450</i>	5,26	2,19E-12	putative lectin contains Pfam profile: PF01419 jacalin-like lectin domain; similar to jasmonate inducible protein GB:Y11483		
<i>At2g26740</i>	3,11	1,74E-09	epoxide hydrolase (ATsEH)		coi-1 (-)
<i>At5g41700</i>	3,10	8,35E-10	E2, ubiquitin-conjugating enzyme 8 (UBC8)		
<i>At1g59900</i>	3,09	1,14E-11	pyruvate dehydrogenase e1 alpha subunit		
<i>At3g22231</i>	3,04	3,10E-06	Expressed protein _		
<i>At4g10270</i>	2,68	3,54E-07	probable wound-induced protein	JRG (-)	
<i>At4g17460</i>	2,50	4,00E-11	homeobox-leucine zipper protein HAT1 (hd-zip protein 1)		
<i>At5g40950</i>	2,44	8,55E-06	50S ribosomal protein L27		
<i>At5g61590</i>	2,43	5,95E-07	ethylene responsive element binding factor		
<i>At3g50970</i>	2,19	2,84E-04	dehydrin xero2 (XERO2) / low-temperature-induced protein LTI30	ORG+JA (+)	coi-1 (+)
<i>At1g33055</i>	2,14	6,48E-06	Expressed protein		

La tabla continua en la página siguiente

Gen	Fold change	p-valor	Descripción	Taki ^a	Devoto ^b
<i>At3g44890</i>	2,08	1,28E-08	50S ribosomal protein L9, chloroplast (CL9)		
<i>At5g56030</i>	2,07	5,16E-06	heat shock protein 81-2 (HSP81-2)	ORG+JA (+)	
<i>At1g73330</i>	2,05	4.90E-07	Dr4 (protease inhibitor)		
<i>At3g22240</i>	2,01	7,56E-07	unknown protein		coi-1 (+)
<i>At4g17030</i>	1,93	1,19E-05	allergen like protein		
<i>At3g48360</i>	1,92	3,96E-04	speckle-type POZ protein-related		coi-1 (+)
<i>ndhA</i>	1,80	2,77E-05	NADH dehydrogenase ND1		

Tabla 4.5. Tabla de genes inducidos o reprimidos en el triple mutante *fad3/fad7/fad8* de *Arabidopsis thaliana*.

^a Genes identificados como genes regulados por ácido jasmónico (JRGs), por OPDA (ORGs) en Taki y col. (2005).

^b Genes identificados en Devoto y col. (2005).

4.5.2. Análisis transcriptómico del mutante *fad5* de *Arabidopsis thaliana*

El estudio transcriptómico del mutante *fad5* de *Arabidopsis thaliana* reveló que 379 genes de los 24000 representados en el oligochip ATH1 presentaban cambios reales en los niveles de expresión. Un análisis detallado de los datos teniendo en cuenta los criterios de filtrado citados anteriormente permitió seleccionar 132 genes que se inducían y 22 genes que se reprimían de forma específica en la línea mutante *fad5* respecto a la silvestre (figura 4.37).

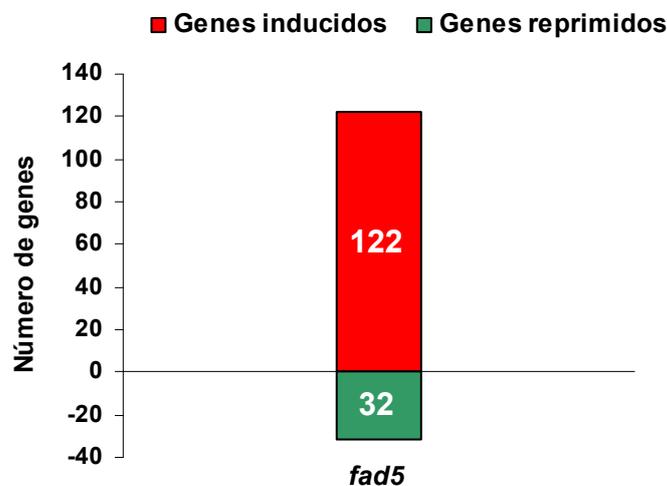


Figura 4.37. Número de genes inducidos (en rojo) o reprimidos (en verde) en el mutante *fad5* tras el análisis transcriptómico en el chip ATH1 de Affymetrix.

A continuación, se llevó a cabo un análisis de los genes expresados de forma diferencial en base a las categorías funcionales a las que pertenecen (figura 4.38). La clasificación funcional de los genes expresados de forma diferencial en las muestras objeto de estudio se llevó a cabo mediante la utilización de “Gene Ontologies classification” en el sitio web Arabidopsis Internacional Resource Gen Ontology (TAIR-GO; www.arabidopsis.org) y la web FatiGo (fatigo.bionfo.cipf.es). Al igual que en el triple mutante *fad3/fad7/fad8*, las categorías funcionales más representadas son las relacionados con “las respuestas de defensa” y “la respuesta al estrés”, representando aproximadamente 16,34 % y un 17,6 %, del total, respectivamente. En este último caso, la subclasificación de los genes de respuesta a estrés en las

categorías de estrés biótico y abiótico mostró que un 16,34 % de los genes pertenecía a genes de respuesta a estímulos bióticos y un 5,88 % de los genes eran asignables a estrés abiótico. Este dato es sorprendente, ya que a diferencia del triple mutante *fad3/fad7/fad8*, el mutante *fad5* no presenta ninguna alteración en la ruta de síntesis de los octadecanoides, sugiriendo que estos cambios reflejan genes en cuya regulación no intervienen las hormonas OPDA, JA ó MeJA. De hecho, sólo un 6 % de los genes seleccionados en el mutante *fad5* estaban implicados en la respuesta y señalización hormonal y, sólo 17 genes fueron identificados como JRGs u ORGs por Taki y col., (2005).

Por último, en relación a la función molecular que desempeñan los genes expresados diferencialmente, es importante señalar que la principal diferencia encontrada respecto a los datos obtenidos para el triple mutante *fad3/fad7/fad8* se encuentra en el número de genes que codifican proteínas con actividad factor de transcripción. Así, en el mutante *fad5* sólo tres genes codifican este tipo de proteínas, un número más reducido que en el caso del mutante *fad3/fad7/fad8* (13 genes).

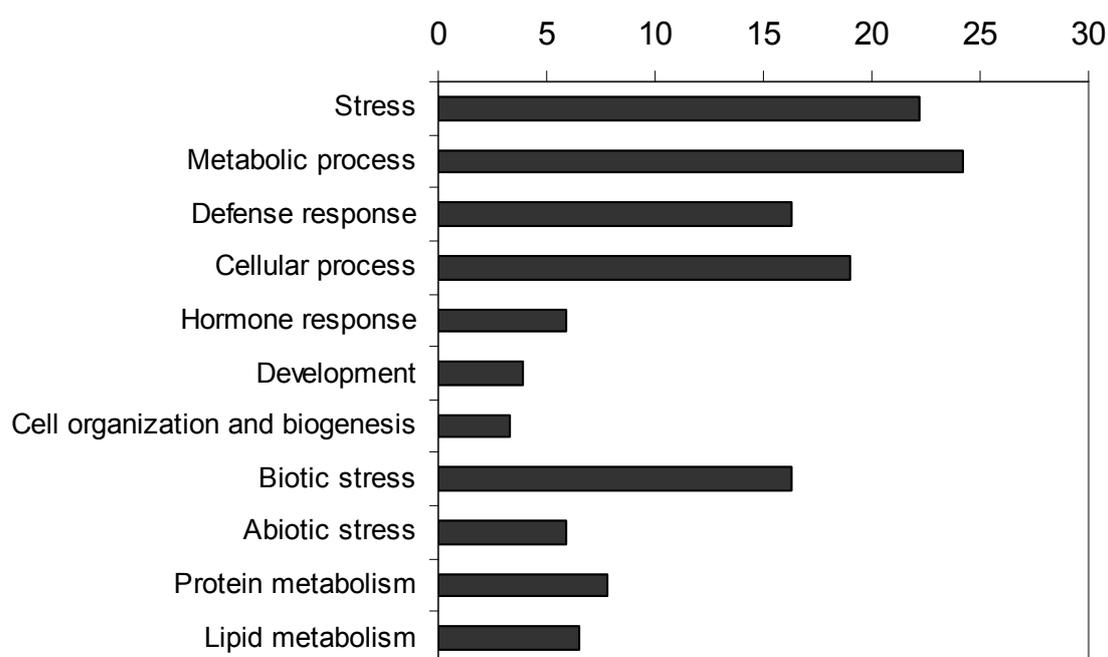


Figura 4.38. Clasificación de los genes expresados significativamente en el mutante *fad5* según las distintas categorías funcionales.

4.5.2.1. Agrupamiento jerárquico de los genes con expresión diferencial en el mutante *fad5* de *Arabidopsis thaliana*

Finalmente, se llevó a cabo una agrupación de estos genes en clusters de acuerdo con la similitud en los patrones de expresión obtenidos en el experimento transcriptómico realizado. El dendograma generado se muestra en la figura 4.39. Los genes con expresión diferencial identificados en el mutante *fad5* mostraron una estructura jerárquica más compleja. Así, los genes expresados diferencialmente se agruparon en seis clusters distintos. A su vez, el cluster V se dividió en dos grupos diferentes que fueron designados Va y Vb. Los clusters de I a III representaban genes reprimidos en el mutante *fad5* respecto a la cepa silvestre de *Arabidopsis thaliana* y los clusters de IV a VI representaban genes inducidos. Además, a diferencia de lo que ocurría en el triple mutante, los genes seleccionados en el mutante *fad5* identificados como JRGs por Taki y col., (2005) se encontraban distribuidos de forma dispersa en los diferentes clusters a excepción del clusters III. En este último cluster se agrupaban 4 JRGs de un total de 11 genes. Por último, es importante destacar que gran parte de los genes que codifican proteínas de defensa contra patógenos se agrupan en los clusters IV y V. En la figura 4.40 se muestran los gráficos que detallan el perfil de expresión de los genes agrupados por clusters en el mutante *fad5*. En la tabla 4.6 se muestra un listado de los genes expresados diferencialmente en el mutante *fad5* agrupados por clusters.

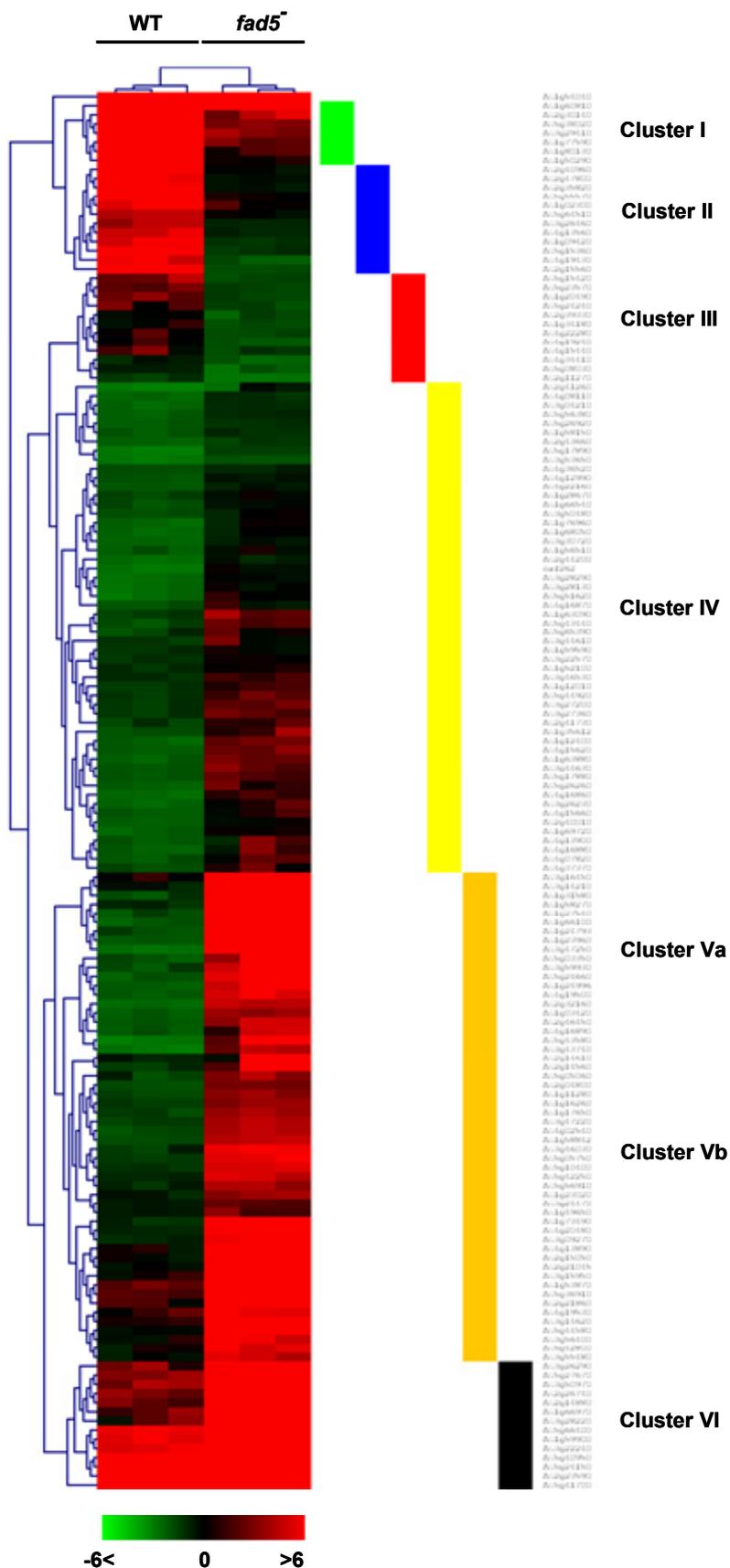


Figura 4.39. Agrupamiento jerárquico de los genes expresados diferencialmente en el mutante *fad5* de *Arabidopsis thaliana*.

Resultados

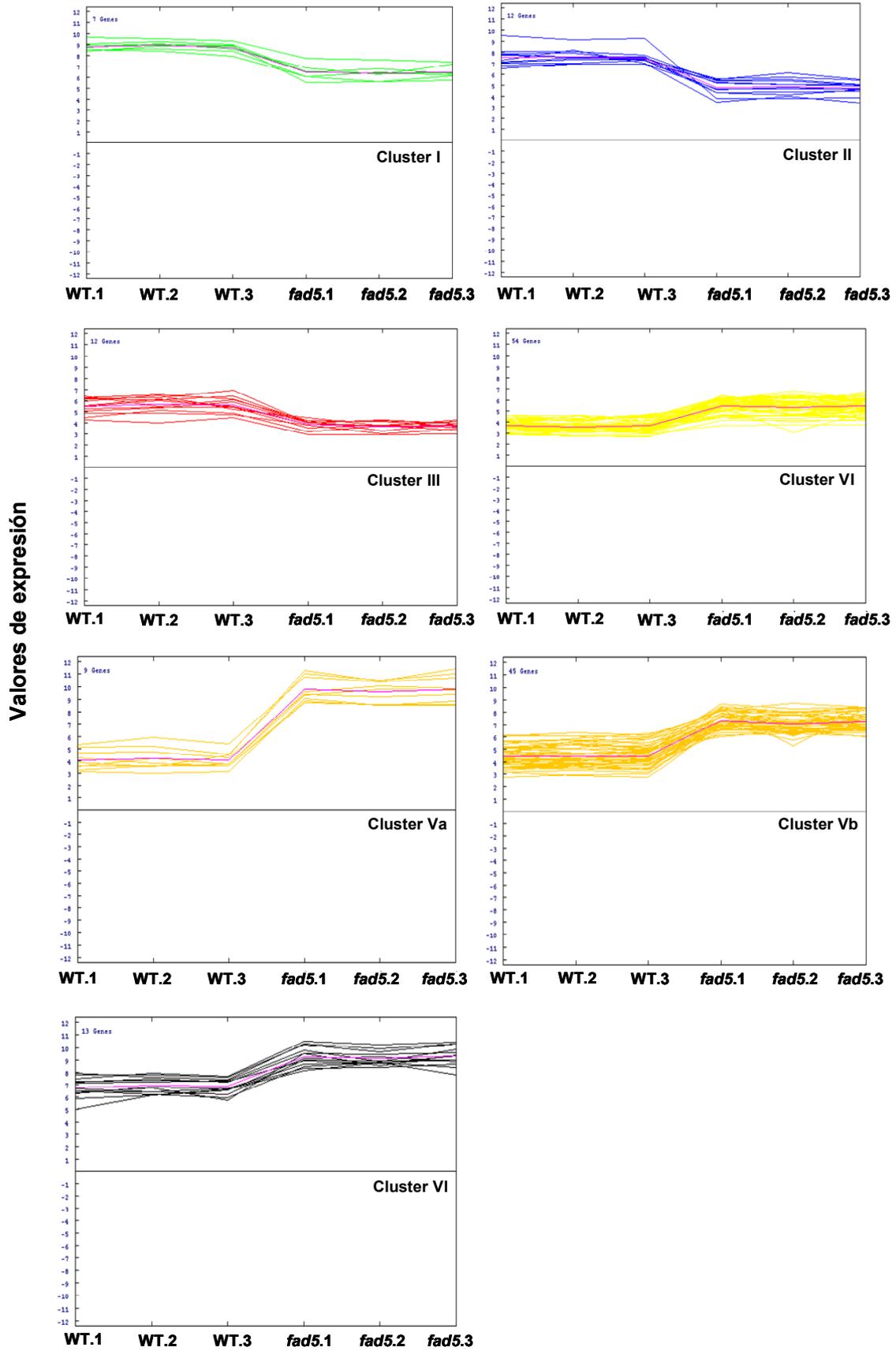


Figura 4.40. Perfil de expresión de los genes agrupados por clusters en el mutante fad5.

Gen	Fold change	p-valor	Descripción	Taki ^a	Devoto ^b
<i>Genes reprimidos</i>					
<i>Cluster I</i>					
<i>At1g54040</i>	-4,97	1.07E-11	jasmonate inducible protein]		coi-1 (-)
<i>At1g50290</i>	-3,58	8.38E-10	hypothetical protein		
<i>At5g38020</i>	-2,54	2.36E-07	SAMT-like protein S-adenosyl-L-methionine	JRG (+)	
<i>At1g80130</i>	-2,47	3.33E-06	unknown protein		
<i>At3g29410</i>	-2,42	4.32E-05	terpene synthase		
<i>At1g77590</i>	-1,97	1.81E-05	putative acyl-CoA synthetase		
<i>At2g30140</i>	-1,90	1.18E-04	putative glucosyltransferase		
<i>At1g60810</i>	-1,79	2.63E-07	ATP citrate-lyase		
<i>Cluster II</i>					
<i>At2g15560</i>	-5,50	2.30E-10	unknown protein		
<i>At5g15360</i>	-4,37	1.64E-09	putative protein		
<i>At4g19430</i>	-4,28	2.19E-06	expressed protein		
<i>At1g09420</i>	-2,89	8.31E-09	putative glucose-6-phosphate dehydrogenase		
<i>At4g13560</i>	-2,54	1.46E-07	putative protein LEA		
<i>At2g35820</i>	-2,46	1.71E-08	unknown protein		
<i>At5g55570</i>	-2,39	2.12E-06	unknown protein		
<i>At2g40960</i>	-2,38	6.15E-08	unknown protein		
<i>At2g47800</i>	-2,37	2.08E-05	glutathione-conjugate transporter AtMRP4		
<i>At3g26460</i>	-2,14	3.91E-06	major latex protein	JRG (+)	
<i>At5g64510</i>	-1,57	3.47E-05	putative protein		
<i>At1g02300</i>	-1,42	2.59E-05	cathepsin B-like cysteine protease		
<i>Cluster III</i>					
<i>At5g24240</i>	-4,94	3.98E-05	ubiquitin		
<i>At2g11270</i>	-3,62	1.89E-04	putative citrate synthetase		
<i>At5g15420</i>	-3,47	2.29E-06	putative protein		

La tabla continua en la página siguiente

Gen	Fold change	p-valor	Descripción	Taki ^a	Devoto ^b
<i>At5g08030</i>	-2,66	1.46E-03	glycerophosphodiester phosphodiesterase		
<i>At1g20490</i>	-2,51	1.46E-07	hypothetical protein	JRG (+)	
<i>At4g34410</i>	-2,23	0.0519	putative protein ethylene-responsive element binding protein homolog	JRG (-)	
<i>At5g23570</i>	-1,93	5.71E-06	putative protein		
<i>At4g22280</i>	-1,87	3.87E-05	putative protein hypothetical		
<i>At4g15440</i>	-1,67	2.16E-03	hydroperoxide lyase (HPOL) like protein	JRG (+)	
<i>At1g34180</i>	-1,66	5.29E-04	hypothetical protein similar to NAM		
<i>At2g39330</i>	-1,56	3.59E-03	putative myrosinase-binding protein	JRG (+)	
Genes activados					
<u>Cluster IV</u>					
<i>At2g41260</i>	5,88	0.015	late embryogenesis abundant M17 protein		
<i>orf262</i>	5,69	2.10E-05	hypothetical protein		
<i>At1g76960</i>	5,09	4.35E-03	unknown protein		
<i>At5g17890</i>	4,72	1.15E-06	disease resistance protein - like resistance protein RPP5		
<i>At3g04210</i>	4,72	6.90E-03	putative disease resistance protein similar to disease resistance protein RPP1		
<i>At3g28290</i>	4,68	5.20E-04	At14a-1 protein identical	JRG (+)	
<i>At3g50480</i>	4,58	1.12E-03	hypothetical protein		
<i>At4g13900</i>	4,56	3.12E-03	putative disease resistance protein Hcr9-9A		
<i>At5g51620</i>	4,46	1.15E-05	unknown protein		
<i>At1g35612</i>	4,32	1.14E-05	hypothetical protein		
<i>At1g68050</i>	4,26	2.19E-05	F-box protein FKF1/ADO3, AtFBX2a identical to FKF1		
<i>At4g16860</i>	4,07	2.89E-09	disease resistance RPP5 like protein		
<i>At1g69720</i>	4,02	1.93E-05	putative heme oxygenase		
<i>At4g15620</i>	4,00	7.83E-08	hypothetical protein		
<i>At3g30720</i>	3,87	4.52E-05	unknown protein		
<i>At3g28130</i>	3,83	7.10E-05	unknown protein		

La tabla continua en la página siguiente

Gen	Fold change	p-valor	Descripción	Taki^a	Devoto^b
<i>At5g56380</i>	3,80	3.64E-04	putative protein		
<i>At4g36520</i>	3,74	8.09E-04	trichohyalin like protein		
<i>At4g08110</i>	3,72	2.25E-05	predicted protein of unknown function		
<i>At2g43660</i>	3,71	9.88E-04	putative beta-1,3-glucanase		
<i>At5g17880</i>	3,66	2.63E-07	disease resistance protein		
<i>At2g40010</i>	3,63	9.08E-08	60S acidic ribosomal protein P0		
<i>At4g07820</i>	3,54	3.87E-05	putative pathogenesis-related protein		
<i>At1g12400</i>	3,46	8.26E-08	hypothetical protein		
<i>At3g26230</i>	3,04	1.50E-06	cytochrome P450	JRG (-)	
<i>At1g66540</i>	2,99	1.08E-04	cytochrome P450		
<i>At3g53650</i>	2,94	1.47E-04	histone H2B		
<i>At4g15660</i>	2,79	1.24E-04	glutaredoxin		
<i>At2g44200</i>	2,79	1.01E-04	hypothetical protein		
<i>At1g63880</i>	2,78	8.26E-08	putative disease resistance protein		
<i>At5g43440</i>	2,77	5.22E-06	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase		
<i>At1g52100</i>	2,74	3.29E-05	jasmonate inducible protein		
<i>At1g28670</i>	2,72	1.45E-03	lipase identical		
<i>At3g44630</i>	2,66	4.15E-06	disease resistance protein homolog disease resistance protein RPP1		
<i>At1g12010</i>	2,63	2.84E-05	putative amino-cyclopropane-carboxylic acid oxidase (ACC oxidase)		
<i>At5g26260</i>	2,58	2.46E-05	putative protein		
<i>At4g16880</i>	2,56	1.47E-04	disease resistance RPP5 like protein		
<i>At5g26920</i>	2,52	7.38E-05	calmodulin-binding	ORG (-)	
<i>At1g58150</i>	2,40	1.53E-03	phosphoglycerate kinase		
<i>At5g65390</i>	2,30	7.06E-03	unknown protein		
<i>At1g59590</i>	2,28	1.84E-03	hypothetical protein	ORG (-)	
<i>At3g27200</i>	2,19	2.62E-06	blue copper protein, putative similar to uclacyanin		
<i>At3g27360</i>	2,16	4.65E-05	histone H3		

La tabla continua en la página siguiente

Gen	Fold change	p-valor	Descripción	Taki ^a	Devoto ^b
<i>At1g56510</i>	2,07	6.84E-05	disease resistance protein contains domains associated with disease resistance genes in plants: TIR/NB-ARC/LRR		
<i>At4g22160</i>	2,07	2.19E-05	Expressed protein		
<i>At5g44920</i>	2,06	6.65E-06	putative protein contains similarity to disease resistance protein		
<i>At4g16870</i>	2,03	6.57E-04	retrotransposon like protein		
<i>At4g12990</i>	1,93	1.54E-05	putative protein		
<i>At4g37370</i>	1,92	5.10E-03	cytochrome P450		
<i>At1g63090</i>	1,90	1.01E-05	unknown protein		
<i>At3g46530</i>	1,81	1.83E-05	disease resistance protein RPP13-like		
<i>At3g22570</i>	1,69	2.94E-04	unknown protein		
<i>At3g44610</i>	1,67	5.09E-03	protein kinase		
<i>At2g41730</i>	1,61	7.96E-03	hypothetical protein		
<u>Cluster Va</u>					
<i>At4g19500</i>	6,02	2.38E-09	resistence protein		
<i>At5g43580</i>	5,82	6.25E-07	unknown protein	JRG (+)	
<i>At2g32160</i>	5,72	7.94E-10	hypothetical protein		
<i>At2g04800</i>	5,69	2.39E-07	unknown protein		
<i>At1g24996</i>	5,54	1.24E-04	F5A9.10 unknown protein		
<i>At1g03420</i>	4,62	1.78E-09	unknown protein		
<i>At1g58842</i>	4,54	2.95E-07	viral resistance protein		
<i>At3g43740</i>	4,51	1.26E-07	leucine-rich repeat protein LRP		
<i>At5g03350</i>	4,46	3.51E-05	putative protein		
<i>At5g05060</i>	4,42	3.28E-05	putative protein		
<i>At2g14560</i>	4,37	1.12E-03	unknown protein		
<i>At5g24660</i>	4,00	3.71E-08	putative protein	ORG (+)	
<i>At5g42250</i>	3,57	2.09E-07	alcohol dehydrogenase		
<i>At4g02540</i>	3,46	2.84E-06	putative protein similar to A. thaliana hypothetical protein F8K4.22		

La tabla continua en la página siguiente

Gen	Fold change	p-valor	Descripción	Taki ^a	Devoto ^b
<i>At3g47220</i>	3,41	7.80E-09	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase		
<i>At1g73490</i>	3,39	5.74E-08	unknown protein		
<i>At3g59930</i>	3,20	2.12E-06	putative protein hypothetical protein F10A16.1		
<i>At2g15050</i>	3,16	6.44E-08	putative lipid transfer protein		
<i>At5g05750</i>	3,00	1.40E-08	DnaJ-like protein		
<i>At2g21045</i>	2,94	2.08E-07	senescence-associated protein		
<i>At2g46450</i>	2,92	1.18E-04	putative cyclic nucleotide-regulated ion channel protein		coi-1 (+)
<i>At1g16260</i>	2,92	6.61E-05	putative wall-associated kinase		
<i>At5g10400</i>	2,77	8.56E-08	histone H3		
<i>At4g13890</i>	2,73	2.16E-06	glycine hydroxymethyltransferase		
<i>At3g46030</i>	2,64	2.53E-06	histone H2B -like protein histone H2B1		
<i>At4g20480</i>	2,60	4.01E-09	hypothetical protein		
<i>At2g14610</i>	2,54	0.05659	pathogenesis-related PR-1-like protein identical to GB:M90508		
<i>At1g11280</i>	2,52	8.56E-08	serine/threonine kinase		
<i>At4g16890</i>	2,39	1.14E-04	disease resistance RPP5 like protein		
<i>At5g56910</i>	2,22	1.07E-05	putative protein		
<i>At1g17650</i>	2,19	8.61E-08	Expressed protein		
<i>At3g09270</i>	2,14	1.47E-08	putative glutathione transferase	JRG (+)	
<i>At5g44580</i>	2,10	5.16E-05	unknown protein		
<i>At3g24470</i>	2,08	2.53E-04	hypothetical protein		
<i>At2g21860</i>	2,07	3.29E-05	violaxanthin de-epoxidase		
<i>At3g15950</i>	1,88	3.01E-05	unknown protein	JRG (+)	
<i>At5g36910</i>	1,87	2.12E-06	thionin Thi2.2		
<i>At3g14620</i>	1,77	2.66E-05	putative cytochrome P450		
<i>At1g53870</i>	1,67	2.12E-06	hypothetical protein		
<i>At1g49650</i>	1,66	2.40E-04	unknown protein		
<i>At5g42800</i>	1,66	9.15E-05	dihydroflavonol 4-reductase		coi-1

La tabla continua en la página siguiente

Gen	Fold change	p-valor	Descripción	Taki ^a	Devoto ^b
<i>At3g55480</i>	1,63	3.91E-06	AP3-complex beta-3A adaptin subunit-like protein AP-3 complex		
<i>At3g56400</i>	1,62	1.56E-03	DNA-binding protein-like DNA-binding protein 4 WRKY4		
<i>At1g23020</i>	1,60	1.54E-05	putative superoxide-generating NADPH oxidase flavocytochrome		
<i>At4g19530</i>	1,46	1.53E-03	TMV resistance protein N - like TMV resistance protein N, Nicotiana glutinosa		
<u>Cluster Vb</u>					
<i>At1g23960</i>	8,09	1.17E-11	unknown protein		
<i>At1g66100</i>	7,57	3.14E-10	thionin	JRG (+)	
<i>At1g24793</i>	6,96	5.13E-10	F5A9.18 unknown protein		
<i>At1g31580</i>	6,79	2.29E-09	ORF1, putative similar to ORF1		
<i>At3g47250</i>	6,26	5.48E-11	putative protein		
<i>At3g14210</i>	5,52	1.40E-09	myrosinase-associated protein		
<i>At1g27540</i>	5,17	7.94E-10	F-box family protein		
<i>At3g16450</i>	5,03	7.94E-10	putative lectin		
<i>At1g58270</i>	4,11	1.00E-09	unknown protein		
<u>Cluster VI</u>					
<i>At3g28220</i>	3,18	2.16E-04	unknown protein	JRG (+)	
<i>At2g26740</i>	2,73	5.40E-08	epoxide hydrolase (ATsEH)		coi-1 (-)
<i>At2g23590</i>	2,68	3.93E-07	putative acetone-cyanohydrin lyase		
<i>At3g22240</i>	2,64	1.80E-05	unknown protein .		coi-1 (+)
<i>At5g40950</i>	2,52	5.59E-05	50S ribosomal protein L27		
<i>At3g26290</i>	2,40	6.06E-05	cytochrome P450		
<i>At5g41700</i>	2,29	8.94E-08	E2, ubiquitin-conjugating enzyme 8 (UBC8)		
<i>At5g24150</i>	2,17	1.87E-04	squalene monooxygenase		coi-1 (+)
<i>At1g59900</i>	2,09	6.15E-08	pyruvate dehydrogenase e1 alpha subunit		
<i>At3g50970</i>	2,07	2.26E-06	dehydrin Xero2	ORG+JA (+)	
<i>At5g27670</i>	1,79	1.83E-05	histone H2A-like protein histone H2A		

La tabla continua en la página siguiente

Gen	Fold change	p-valor	Descripción	Taki ^a	Devoto ^b
At5g66400	1,72	6.06E-06	dehydrin RAB18-like protein (sp P30185)		coi-1 (-)
At2g14880	1,67	6.25E-06	unknown protein		
At1g66970	1,51	1.14E-03	unknown protein		

Tabla 4.6. Tabla de genes inducidos o reprimidos en el mutante *fad5* de *Arabidopsis thaliana*.

^a Genes identificados como genes regulados por ácido jasmónico (JRGs), por OPDA (ORGs) en Taki y col. (2005).

^b Genes identificados en Devoto y col. (2005)

4.5.3. Análisis comparativo de los estudios transcriptómicos de los mutantes *fad5* y *fad3/fad7/fad8* de *Arabidopsis thaliana*

La comparación de los resultados obtenidos del análisis transcriptómico de los mutantes *fad5* y *fad3/fad7/fad8* de *Arabidopsis thaliana* reveló que 81 de los genes cuya expresión se modificaba significativamente en el estudio eran comunes en ambos mutantes. En la figura 4.41 se muestra un diagrama de Venn que indica el solapamiento entre el número de genes expresados de forma diferencial en los mutantes *fad5* y *fad3/fad7/fad8*. Esta cifra, que corresponde aproximadamente al 50% de los genes seleccionados, sugiere que la modificación de la ruta de desaturación de lípidos a distintos niveles provoca una serie de respuestas comunes cuyo análisis resulta interesante. En la tabla 4.7 se muestra el listado de los genes comunes en ambos mutantes.

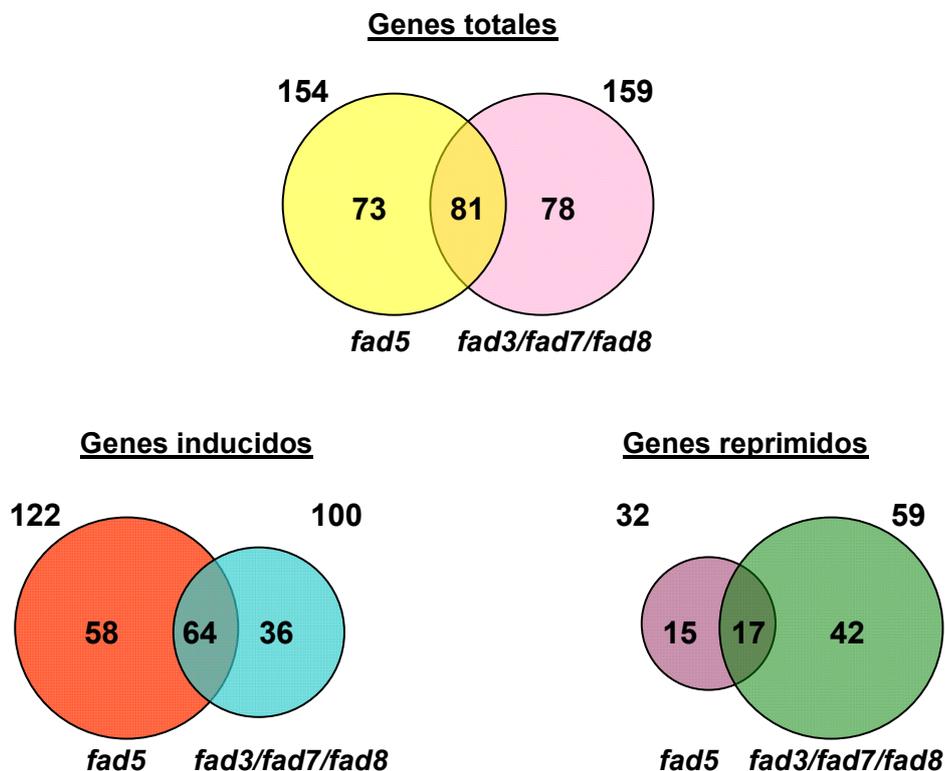


Figura 4.41. Diagrama de Venn que muestra el solapamiento entre el número de genes expresados de forma diferencial en el mutante *fad5* y en el triple mutante *fad3/fad7/fad8*.

Uno de los resultados más relevantes de la comparación del análisis transcriptómico de ambos mutantes es el número de genes implicados directamente en la respuesta al estrés, tanto biótico como abiótico, que se activan. Así, se detecta un grupo de genes implicados en las *respuestas de defensa*, que principalmente pertenecen a la familia TIR-NBS-LRR [Toll/Interleukin receptor1-Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeat; (DeYoung y Innes, 2006)]. Esta familia de proteínas se caracteriza por poseer un motivo estructural rico en leucina y por participar en el reconocimiento directo o indirecto de patógenos a través de la interacción con proteínas patogénicas (Holt y col., 2003; DeYoung y Innes, 2006). Dentro del grupo de genes de defensa, también se encuentran los genes *At3g16450* y *At3g14210*, que codifican proteínas de unión a mirosinasa y el gen *At5g43580*, que codifica un inhibidor de proteasas de tipo endopeptidasa (Sels y col., 2008). Por otro lado, entre los genes de respuesta a estrés abiótico inducidos destacan RAB18 (*At5g66400*), Xero2 (*At3g50970*), DnaJ (*At5g05750*) y glutation-S-transferasa (*At3g09270*), que codifican proteínas implicadas en la respuesta a estreses abióticos como el déficit hídrico, el frío o la eliminación de xenobióticos o sustancias nocivas. Probablemente, la presencia de estos genes se debe a la existencia de una alteración del equilibrio de las hormonas que los regulan en las diferentes situaciones fisiológicas.

Además, aparece también un grupo de genes que intervienen en *rutas de señalización*. Como ya se ha citado anteriormente, de manera general, los procesos de regulación de genes de la estabilidad de proteínas por ubiquitación constituyen un mecanismo central de control de la señalización dependiente de JA en plantas (Devoto y col., 2002; Xu y col., 2002; Feng y col., 2003). En este sentido, es reseñable la presencia de tres genes relacionados con la degradación de proteínas a través del proteosoma en rutas dependientes de ubiquitina. Así, el gen *At5g41700*, codifica una enzima conjugadora de ubiquitina E2 (UBC8); el gen *At1g27540*, codifica una proteína de la familia F-box que podría estar implicada en este proceso y el gen

Resultados

At4g02540, que codifica una proteína con un dominio DC1, relacionado con la degradación de proteínas a través de rutas dependientes de ubiquitina.

Dentro de la categoría de genes que intervienen en rutas de señalización, encontramos el gen *At3g47220*, que codifica una fosfolípasa C específica de fosfoinosítidos. La fosfolípasa C escinde el sustrato fosfatidilinositol-4,5-bifosfato y genera inositol-1,4,5-trifosfato y diacilglicerol, compuestos que actúan como segundos mensajeros en rutas de transducción de señal. Diversos estudios sugieren que la fosfolípasa C específica de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato podría participar en las respuestas de defensa en plantas (Tasma y col., 2008). Así, esta enzima se ha implicado en la activación de la explosión oxidativa que se produce en respuesta de los elicitores patogénicos (Legendre y col., 1993; Chapman, 1998). Además, se ha establecido que esta enzima juega un papel importante en la acumulación de prolina que se produce en plantas en respuesta a varios estreses medioambientales tales como la salinidad y la sequía (Chapman, 1998; Parre y col., 2007).

Entre los genes seleccionados tras el análisis comparativo del análisis transcriptómico de los mutantes *fad5* y *fad3/fad7/fad8* destacan dos genes, *At1g11280* y *At3g44610*, que codifican una proteína S-locus Serin/treonin quinasa y una proteína quinasa, respectivamente. Diversas evidencias experimentales indican que las proteínas quinasa juegan un papel central en señalización durante el reconocimiento del patógeno y la subsiguiente activación del mecanismo de defensa de la planta (Romeis, 2001).

Sorprendentemente, el número de genes implicados en el *metabolismo lipídico* es muy reducido. Tan sólo 2 genes, el *At1g28670*, que codifica una enzima con actividad lipasa y, el *At2g15050*, que codifica una proteína de transporte de lípidos, se inducen tanto en el mutante *fad5* como en el triple mutante *fad3/fad7/fad8*. Esta observación podría ser explicada por el hecho de que el contenido total de glicerolípidos de estos mutantes de *Arabidopsis thaliana* es similar al de la cepa silvestre. Así, diversos estudios han demostrado que la interrupción de diferentes

pasos de la ruta de síntesis o desaturación tiene efectos mínimos en el contenido global de lípidos ya que existen mecanismos que aseguran la síntesis y la transferencia de suficientes especies lipídicas entre el retículo endoplasmático y el cloroplasto para mantener niveles normales de biogénesis de membrana (Wallis y Browse, 2002). Sin embargo, a día de hoy, se desconoce el mecanismo molecular y bioquímico que gobierna este proceso y todavía no se ha conseguido identificar ninguna proteína específica que participe en el mismo. En este sentido, la caracterización y el estudio detallado del gen *At2g15050* resulta interesante dado que podría codificar una proteína implicada en este flujo lípido y, por lo tanto, podría ayudar a identificar uno de los componentes de este proceso.

Los genes reprimidos se clasifican también en diferentes categorías funcionales. Así, se encuentran genes implicados en la respuesta al estrés biótico o abiótico tales como el gen *At3g26460*, que codifica una MLP1 (del inglés, "Major Latex Protein") implicada en las respuestas de defensa, el gen *At5g24240*, que codifica una hidropéroxido liasa, que se induce por herida (Bate y col., 1998), y el gen *At1g02300*, que codifica una proteasa tipo captosina B, que se induce por combinación de calor y sequía (Rizhsky y col., 2004). Además, también se detectan genes que codifican proteínas implicadas en la respuesta hormonal como *At1g54040*, que codifica una proteína que se induce por jasmonato y el gen *At2g39330*, que codifica una proteína de unión a mirosinasa, que se induce por MeJA (Devoto y col., 2005).

Es importante destacar que entre los genes reprimidos en ambos mutantes se identifica el gen *At4g34410*, que codifica un factor de transcripción de tipo AP2/ERF, que está implicado en la respuesta a etileno.

Finalmente, el análisis de los genes comunes en ambos mutantes revela la presencia de tres genes que codifican proteínas implicadas en el metabolismo energético. Así, los genes *At1g60810* y *At1g09420*, que codifican las enzimas ATP-citrato liasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa respectivamente, se reprimen en

Resultados

ambos mutantes, y el gen *At1g59900*, que codifica una subunidad de la piruvato deshidrogenasa mitocondrial, se induce.

Gen	Descripción	Fold change	
		<i>fad5</i>	<i>fad3/fad7/fad8</i>
Genes inducidos			
Grupo I: Componentes de señalización			
<i>Proteínas quinasas</i>			
<i>At1g11280</i>	S-locus serine/threonine Kinase	2,52	2,46
<i>At3g44610</i>	protein kinase	1,66	1,94
<i>Fosfoinositidos</i>			
<i>At3g47220</i>	phosphoinositide-specific phospholipase C family protein	3,41	2,02
<i>Proteosoma dependiente de ubiquitina</i>			
<i>At1g27540</i>	F-box family protein	5.17	2.97
<i>At5g41700</i>	E2 Ubiquitin conjugating	2.28	3.09
<i>At4g02540</i>	DC1 domain-containing protein similar to <i>A. thaliana</i> hypothetical protein F8K4.22	3.45	3.74
Grupo III: Respuesta a estrés			
<i>Patogénesis</i>			
<i>At4g16890</i>	disease resistance RPP5 like protein (TIR-NBS-LRR class)	2.39	2.20
<i>At1g58842</i>	viral resistance protein (CC-NBS-LRR class)	4.54	2.50
<i>At4g16860</i>	disease resistance RPP5 like protein (TIR-NBS-LRR class)	4.06	2.52
<i>At5g17880</i>	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative	3.65	2.66
<i>At4g19500</i>	resistance protein - like downy mildew resistance protein (TIR-NBS-LRR class)	6.02	3.22
<i>At1g63880</i>	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative similar to RPP1-WsC protein	2.77	3.28
<i>At3g43740</i>	Leucine Rich Repeat protein (LRR class)	4.51	3.16
<i>At1g66100</i>	Thionin	7.56	1.81
<i>At3g44630</i>	disease resistance protein homolog	2.65	3.19
<i>At4g19530</i>	disease resistance protein RPP1	1.45	3.32
<i>At3g16450</i>	TMV resistance protein N	5.03	5.26
<i>At3g14210</i>	myrosinase-binding protein	5.52	5.34
<i>At5g43580</i>	myrosinase-associated protein	5.82	2.47
<i>At2g46450</i>	Protease inhibitor (Serine-type endopeptidase)	2.92	2.64
	putative cyclic nucleotide-regulated ion channel protein		
<i>Modificación de la pared celular</i>			
<i>At4g16870</i>	Retrotransposon	2.03	1.83
<i>At1g31580</i>	ORF1, cell wall protein	6.78	7.24
<i>Déficit hídrico</i>			
<i>At5g66400</i>	dehydrin RAB18	1.72	2.23
<i>At3g50970</i>	dehydrin Xero2	2.06	2.19

La tabla continua en la página siguiente

Resultados

Gen	Descripción	Fold change	
		<i>fad5</i>	<i>fad3/fad7/fad8</i>
<i>Estrés oxidativo</i>			
<i>At3g09270</i>	glutathione S-transferase, putative	2.14	2.58
<i>Choque térmico</i>			
<i>At5g05750</i>	DnaJ-like protein	3.00	2.70
Grupo IV: Metabolismo secundario			
<i>Biosíntesis de isoprenoides y carotenoides</i>			
<i>At2g21860</i>	Violaxanthin de-epoxidase	2.06	2.03
<i>Biosíntesis de biotina</i>			
<i>At2g23590</i>	acetone-cyanohydrin lyase, putative	2.67	2.23
<i>At2g26740</i>	epoxyde hydrolase (AtsEH)	2.73	3.11
<i>Biosíntesis de antocianinas</i>			
<i>At5g42800</i>	dihydroflavonol 4-reductase	1.65	2.04
Grupo V: Respuesta hormonal			
<i>Síntesis de brasinoesteroides</i>			
<i>At5g24150</i>	Squalene monooxygenase	2.16	3.44
Grupo VI: Otros			
<i>Síntesis de DNA y estructura de la cromatina</i>			
<i>At5g10400</i>	Histone H3	2.77	2.25
<i>At3g46030</i>	Histone H2B	2.64	2.66
<i>Ciclo TCA</i>			
<i>At1g59900</i>	pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit, mitochondrial (PDHE1-A)	2.08	3.08
<i>Metabolismo de lípidos</i>			
<i>At2g15050</i>	putative lipid transfer protein	3.15	1.80
<i>At1g28670</i>	lipase	2.72	2.80
<i>Síntesis de RNA y proteína</i>			
<i>At2g40010</i>	60S acidic ribosomal protein P0	3.63	2.51
<i>At5g40950</i>	50S Ribosomal protein L27	2.52	2.44
<i>Otros</i>			
<i>At1g73490</i>	RNA recognition motif (RRM)-containing protein	3.38	3.82
<i>At1g24996</i>	F5A9.10 protein	5.54	3.45
<i>At1g24793</i>	F5A9.18 protein	6.95	5.13
<i>At3g28130</i>	nodulin MtN21 family protein	2.57	2.99
<i>At1g66970</i>	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase family protein	1.51	1.81
<i>At3g27200</i>	blue copper protein, putative similar to uclacyanin I	2.19	1.98
<i>At5g26260</i>	Meprin and TRAF domain containing protein	3.83	2.04
<i>At1g58270</i>	Meprin and TRAF homology domain-containing protein	4.11	3.43

La tabla continua en la página siguiente

Gen	Descripción	Fold change	
		<i>fad5</i>	<i>fad3/fad7/fad8</i>
<i>At5g03350</i>	legume lectin family protein	4.45	3.99
<i>At5g65390</i>	arabinogalactan-protein (AGP7)	2,3	2,65
<i>At4g13890</i>	glycine hydroxymethyltransferase	2.73	2.98
<i>Proteínas de función desconocida</i>			
<i>At1g35612</i>	hypothetical protein	4.32	2.58
<i>At2g04800</i>	unknown protein	5.68	2.53
<i>Orf262</i>	hypothetical protein	5.69	1.97
<i>At5g56910</i>	putative protein	2.22	1.94
<i>At5g05060</i>	putative protein	4.42	1.82
<i>At1g03420</i>	unknown protein	4,62	2,25
<i>At1g12400</i>	hypothetical protein	3.45	2.51
<i>At2g32160</i>	hypothetical protein	5.72	3.57
<i>At3g30720</i>	unknown protein	3.86	3.42
<i>At1g23960</i>	unknown protein	8.08	4.46
<i>At1g76960</i>	unknown protein	5.08	4.90
<i>At3g47250</i>	putative protein	6.25	5.56
<i>At5g24660</i>	putative protein	4.00	4.00
<i>At3g22240</i>	unknown protein	2.64	2.00
<i>At4g20480</i>	hypothetical protein	2.60	2.70
Genes reprimidos			
Grupo I: Componentes de señalización			
<i>Proteosoma dependiente de ubiquitina</i>			
<i>At5g24240</i>	ubiquitin family protein	-4.94	-1.88
Grupo II: Factores de transcripción			
<i>At4g34410</i>	putative protein ethylene-responsive element binding protein homolog	-2.23	-5.58
Grupo III: Respuesta a estrés			
<i>At3g26460</i>	Major Latex protein 1	-2.14	-2.22
<i>At1g02300</i>	cathepsin B-like cysteine protease	-1.42	-2.67
<i>At4g15440</i>	hydroperoxide lyase (HPOL) like protein	-1.66	-3.64
Grupo V: Respuesta hormonal			
<i>Jasmonatos</i>			
<i>At2g39330</i>	putative myrosinase-binding protein	-1.55	-2.95
<i>At1g54040</i>	Jasmonate inducible protein	-4.96	-6.15
Grupo VI: Otros			
<i>Ruta de las pentosas fosfato</i>			
<i>At1g09420</i>	putative glucose-6-phosphate dehydrogenase	-2.88	-2.88
<i>Ciclo TCA</i>			
<i>At1g60810</i>	ATP citrate lyase	-1.78	-2.19

La tabla continua en la página siguiente

Gen	Descripción	Fold change	
		<i>fad5</i>	<i>fad3/fad7/fad8</i>
<i>Otros</i>			
<i>At2g30140</i>	putative glucosyltransferase	-1.9	-1.9
<i>At5g38020</i>	SAMT-like protein S-adenosyl-L-methionine	-2.54	-2.28
<i>Proteínas de función desconocida</i>			
<i>At2g15560</i>	unknown protein	-5.50	-4.27
<i>At2g40960</i>	unknown protein	-2.37	-2.14
<i>At2g35820</i>	unknown protein	-2.45	-3.17
<i>At5g15360</i>	putative protein	-4.36	-2.69
<i>At1g50290</i>	hypothetical protein	-3.57	-3.37
<i>At4g19430</i>	Expressed protein	-4.27	-2.14

Tabla 4.7. Tabla de genes comunes entre el mutante *fad5* y el triple mutante *fad3/fad7/fad8* de *Arabidopsis thaliana* obtenidos a partir del análisis comparativo de los estudios transcriptómicos de los mismos.

4.5.4. Validación de los resultados de los análisis transcriptómicos de los mutantes *fad5* y *fad3/fad7/fad8* de *Arabidopsis thaliana*

La validación de los datos obtenidos en el análisis transcriptómico de los mutantes *fad5* y *fad3/fad7/fad8* de *Arabidopsis thaliana* se realizó mediante la técnica de PCR semicuantitativa. Para ello, se analizaron los niveles de mRNA de ocho genes seleccionados tanto en la cepa silvestre como en las cepas mutantes. Los genes seleccionados fueron *At3g16450*, proteína de la familia jabalina-lectina; *At4g02540*, proteína que contiene un dominio DC1, similar a la proteína hipotética F8K4.22 de *A.thaliana*; *At1g66100*, tionina; *At4g19500*, proteína de defensa; *At1g27540*, proteína de la familia F-box; *At5g66400*, RAB18; *At1g09420*, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; *At1g54040*, proteína inducible por jasmonato, genes que se inducen o reprimen de forma significativa en ambos mutantes.

Como se muestra en la figura 4.41, el análisis por PCR semicuantitativa mostró un patrón de expresión similar al obtenido en los análisis transcriptómicos, corroborando así la validez de los datos obtenidos.

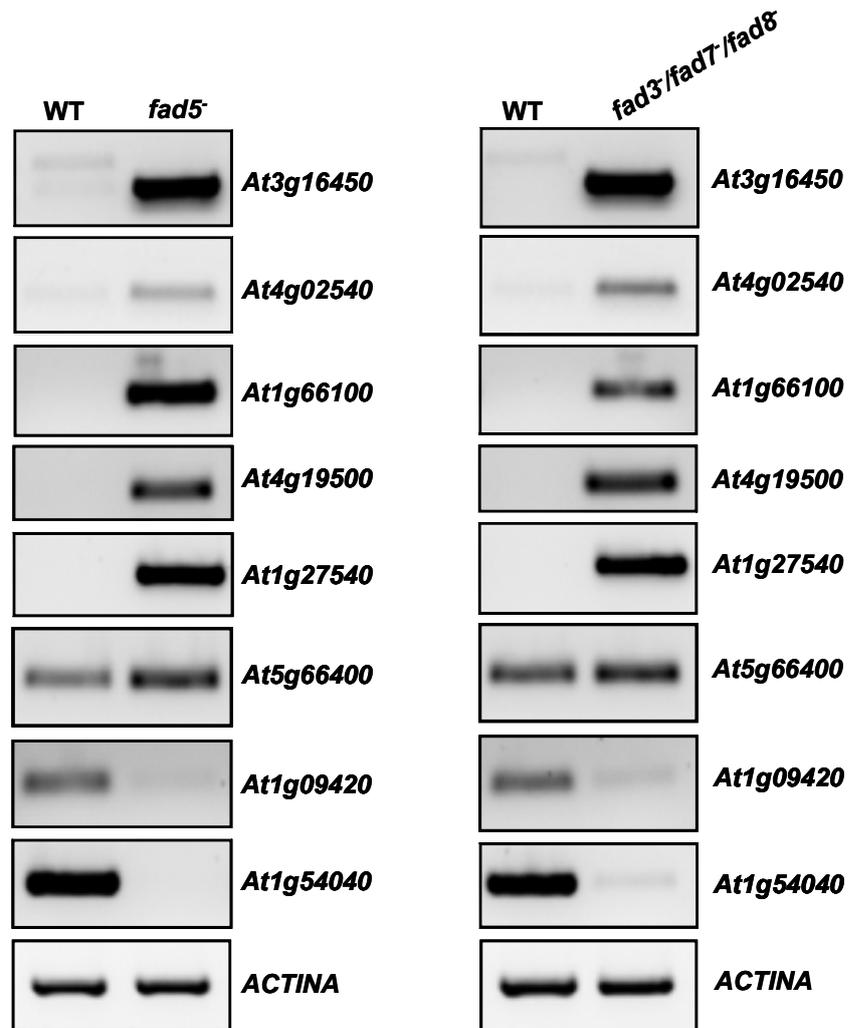


Figura 4.41. Análisis de expresión de algunos genes identificados en el análisis transcriptómico de los mutantes *fad5* y *fad3/fad7/fad8* mediante PCR semicuantitativa. *At3g16450*, proteína de la familia jabalina-lectina; *At4g02540*, proteína que contiene un dominio DC1, similar a la proteína hipotética F8K4.22 de *A.thaliana*; *At1g66100*, tionina; *At4g19500*, proteína de defensa; *At1g27540*, proteína de la familia F-box; *At5g66400*, RAB18; *At1g09420*, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; *At1g54040*, proteína inducible por jasmonato.



Discusión

5. DISCUSIÓN

5.1. IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO GEN *GmFAD7* DE SOJA

Los lípidos de las membranas cloroplásticas de todas las células vegetales contienen cantidades elevadas de ácidos grasos trienoicos, típicamente 18:3^{Δ9,12,15} y 16:3^{Δ7,10,13}. Así, estos ácidos grasos representan aproximadamente el 70 % de los ácidos grasos tilacoidales y más del 90 % de los ácidos grasos esterificados a MGDG, el lípido cloroplástico más abundante. Los ácidos grasos trienoicos se sintetizan a partir de los ácidos grasos dienóicos gracias a la actividad de las ω3 desaturasas en dos compartimentos celulares diferentes, el cloroplasto y el retículo endoplasmático. Los genes que codifican las ω3 desaturasas de ácidos grasos se han aislado y caracterizado en numerosas especies vegetales. En general, se han identificado tres genes independientes que codifican ω3 desaturasas de ácidos grasos; un gen que codifica la ω3 desaturasa FAD3 (Yadav y col., 1993; Hamada y col., 1994; Kodama y col., 1997), enzima específica del retículo endoplasmático y dos genes que codifican la ω3 desaturasa FAD7 (Yadav y col., 1993; Hamada y col., 1996; Berberich y col., 1998; Torres-Franklin y col., 2009) y la ω3 desaturasa inducible por frío, FAD8 (McConn y col., 1994; Berberich y col., 1998; Torres-Franklin y col., 2009), que son específicas del cloroplasto. Adicionalmente, en soja, se han identificado tres isoformas diferentes de la proteína *GmFAD3*, denominadas *GmFAD3A*, *GmFAD3B* y *GmFAD3C*, que contribuyen a los niveles de ácido linolénico en soja (Bilyeu y col., 2003). Sin embargo, hasta la fecha, no se ha descrito la existencia de distintas isoformas de las desaturasas cloroplásticas en general y, más concretamente, de las ω3 desaturasas cloroplásticas FAD7 y FAD8.

Datos preliminares obtenidos del análisis *in silico* con la base de datos DFCI apuntaban que la ω3 desaturasa cloroplástica FAD7 podría estar codificada por más de un gen en plantas de soja. Por ello, un objetivo fundamental de esta tesis doctoral fue la caracterización del número de genes *GmFAD7*. Varias evidencias

experimentales apuntan que en soja, desde el punto de vista genético, existen dos genes que codifican ω 3 desaturasas cloroplásticas de tipo FAD7. En concreto, mediante técnicas de RACE y RT-PCR se identificaron, en diferentes cultivares de plantas de soja, dos secuencias que codificaban proteínas homólogas a la *GmFAD7* de soja descrita previamente por Yadav y col. (1993). Estas dos secuencias se denominaron *GmFAD7-1*, por su elevado grado de homología a la *GmFAD7* anteriormente anotada, y *GmFAD7-2*. El alineamiento de las secuencias deducidas experimentalmente con la secuencia de aminoácidos de las ω 3 desaturasas cloroplásticas FAD7 y FAD8 de otras especies vegetales y el subsiguiente análisis filogenético corroboraron que ambas secuencias codificaban ω 3 desaturasas cloroplásticas del tipo FAD7. La caracterización genómica de las secuencias *GmFAD7* deducidas junto con el análisis *in silico* en la base de datos del genoma de soja nos permitió confirmar que las secuencias *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2* están localizadas en dos cromosomas diferentes, 18 y 7 respectivamente, indicando que no representan alelos diferentes de un mismo gen sino dos genes paralogos *GmFAD7*. Debido a que la soja es una especie vegetal tetraploide, la presencia de dos genes independientes que codifican ω 3 desaturasas de tipo FAD7 puede deberse a la existencia de un evento de duplicación del genoma que hubiera tenido lugar durante la evolución. De hecho, existen diferentes evidencias experimentales que apuntan que el genoma de soja ha sufrido dos eventos de duplicación, que ocurrieron hace 13 y 59 millones de años, dando lugar a un genoma donde aproximadamente el 75 % de los genes presentan múltiples copias (Shoemaker y col., 1996; Schmutz y col., 2010). Posteriormente, se produjo diversificación y pérdida de genes así como numerosas reorganizaciones de los cromosomas. Esta cuestión ha sido analizada en detalle para genes que codifican proteínas implicadas en el metabolismo lípidico. Así, se ha descrito que actividades implicadas en el metabolismo de lípidos codificadas por un único gen en *Arabidopsis thaliana* están codificadas por familias multigénicas en soja, incluyendo las enzimas cetoacil-ACP sintasa (12 copias en soja), malonil-CoA:ACP

maloniltransferasa (2 copias), enoil-ACP reductasa (5 copias), acil-ACP tioesterasa FatB (6 copias) y acetil-CoA carboxilasa cloroplástica (3 copias). Además, acil-CoA sintetasas de cadena larga, aciltransferasas del retículo endoplasmático, glicerol-fosfato aciltransferasas mitocondriales y lipooxigenasas están codificadas en soja por grandes familias multigénicas, que contienen 24, 21, 20 y 52 miembros, respectivamente (Schmutz y col., 2010). La naturaleza multigénica de éstas y otras actividades implicadas en el metabolismo lipídico sugiere la existencia de mecanismos de control transcripcional más complejos en soja que en *Arabidopsis* (Schmutz y col., 2010).

5.1.1. Análisis funcional de los genes *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2*

5.1.1.1. Análisis espacio-temporal de la expresión de los genes *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2*

El análisis de expresión génica de los genes *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2* en plantas de soja ha revelado que ambos genes se expresan en todos los tejidos de planta analizados (raíces, tallos, hojas, flores y semillas en desarrollo). Así, las hojas presentan altos niveles de expresión de ambos genes *GmFAD7* en comparación con el resto de los tejidos. Este dato es consistente con el hecho de que FAD7 es una ω 3 desaturasa cloroplástica y, por lo tanto, se supone que debe expresarse de forma abundante en tejidos fotosintéticos como las hojas. Sin embargo, también se detecta expresión de los genes *GmFAD7* en raíces, tejido vegetal no fotosintético. Hay que mencionar que, en contraste con nuestros resultados, en otras especies vegetales como *Arabidopsis* (Yadav y col., 1993; Nishiuchi y col., 1997), tabaco (Hamada y col., 1996) o trigo (Horiguchi y col., 1998) se ha descrito que el mRNA *FAD7* es indetectable en este tejido vegetal.

Uno de los resultados más relevantes que surge del análisis de expresión está relacionado con la observación de que, en soja, a la temperatura óptima de crecimiento, el gen *GmFAD8* se expresa de forma constitutiva tanto en los tejidos

vegetativos como en las semillas en desarrollo. Por lo tanto, en ausencia de datos relativos al análisis de la abundancia y la actividad de la proteína *GmFAD8* no puede descartarse que esta enzima sea funcional a temperatura ambiente.

Finalmente, la comparación de la expresión de ambos genes *GmFAD7* con la de los genes *GmFAD3A* y *GmFAD3B*, que codifican ω 3 desaturasas reticulares, muestra la existencia de algunas diferencias que parecen ser específicas de tejido. Así, en hojas maduras, mientras que ambos genes *GmFAD7* se expresan a niveles elevados, los RNA mensajeros *GmFAD3A* y *GmFAD3B* se detectan en pequeñas cantidades. Este dato parece sugerir la existencia de un mecanismo de regulación, específico de hojas, capaz de controlar de forma coordinada la expresión de los genes *GmFAD7* y *GmFAD3*. Por ello, en este trabajo se ha abordado también el estudio del efecto del desarrollo de las hojas sobre la actividad y la expresión de las ω 3 desaturasas de ácidos grasos. El conocimiento previo relativo al efecto del desarrollo sobre las desaturasas de plantas es incompleto. En *Arabidopsis thaliana* se ha descrito que los niveles de ácido linolénico aumentan con la maduración de la hoja y este incremento se ha asociado con cambios en la expresión de los genes de las ω 3 desaturasas (Horiguchi y col., 1996b). Nuestros resultados están de acuerdo con esta observación en *Arabidopsis thaliana*, indicando que durante el desarrollo de la planta tanto la demanda de ácidos grasos poliinsaturados necesaria para la formación de membranas tilacoidales, como la demanda de ácido jasmónico, hormona que interviene en rutas de señalización durante el desarrollo, estimulan la producción de $18:3^{\Delta 9,12,15}$.

Los análisis de expresión génica de las desaturasas realizados mediante RT-PCR, con el objetivo de analizar si el incremento significativo del ácido $18:3^{\Delta 9,12,15}$ se debía a cambios en los perfiles de expresión de las ω 3-desaturasas, mostraron que mientras el mRNAs *GmFAD3* disminuye drásticamente con la edad de maduración de las hojas hasta niveles muy bajos, los niveles de mRNAs *GmFAD7* aumentan de forma progresiva. Cabe destacar que la expresión del resto de las desaturasas no

parece estar sometida al mismo perfil de expresión que *GmFAD3* y *GmFAD7*. Además, durante el desarrollo de la hoja, el aumento de los niveles de mRNAs *FAD7* conlleva un aumento concomitante de los niveles de proteína *GmFAD7* y, por lo tanto, de la cantidad del ácido linolénico ($18:3^{\Delta 9,12,15}$). En base a la información obtenida puede decirse que, en determinados estadios del desarrollo de la hoja, las plantas requieren una actividad diferencial de las $\omega 3$ desaturasas *GmFAD3* y *GmFAD7*, a la que responden aumentando o disminuyendo la expresión de los genes correspondientes. Así, el mecanismo de regulación de las desaturasas *GmFAD3* y *GmFAD7* por el desarrollo de la hoja parece ser fundamentalmente transcripcional. Sin embargo, en trigo, se ha descrito que los niveles de transcrito *FAD7* permanecen constantes independientemente del estado de maduración de la hoja (Horiguchi y col., 1996a; Horiguchi y col., 1996b). La existencia de una expresión diferencial de los genes de las $\omega 3$ desaturasas cloroplástica y reticular durante el desarrollo de la planta sugiere la existencia de un intercambio de funcionalidad entre el retículo endoplasmático y el cloroplasto para la producción de ácido linolénico. Así, en las etapas iniciales del desarrollo, donde el tejido fotosintético no se encuentra bien diferenciado, sería el retículo endoplasmático a través de *FAD3* el responsable de la síntesis de ácido $18:3^{\Delta 9,12,15}$. Por el contrario, una vez que las hojas se desarrollan, los cloroplastos van tomando el control de la síntesis de ácido $18:3^{\Delta 9,12,15}$ y, al mismo tiempo, el retículo endoplasmático deja de ser importante.

Los genes que codifican las $\omega 3$ desaturasas cloroplástica y reticular, *FAD7* y *FAD3* respectivamente, son genes nucleares. El intercambio de función entre el retículo endoplasmático y el cloroplasto, constatable a nivel de expresión génica, parece sugerir la existencia de una señal retrógrada que, partiendo del cloroplasto fuera capaz de activar la expresión del gen *FAD7* y reprimir la expresión del gen *FAD3*. En la literatura, se han descrito tres rutas independientes de señalización retrógrada cloroplasto-núcleo: la ruta dependiente de la acumulación de Mg-protoporfirina IX, intermediario biosintético de la clorofila; las propias reacciones

redox del cloroplasto y, por último, la ruta generada por la inhibición de la expresión de genes cloroplásticos (Gray, 2003; Woodson y Chory, 2008). Diversos estudios han puesto de manifiesto la participación de este tipo de señales retrógradas en la regulación de proteínas cloroplásticas codificadas por genes nucleares como es el caso de la LHCII, la subunidad pequeña de la RuBisCo o la plastocianina (Susek y col., 1993; Sullivan y Gray, 2002; McCormac y Terry, 2004). Sin embargo, a pesar de los numerosos intentos desarrollados en esta tesis doctoral, hasta la fecha ha sido imposible identificar cuál o cuáles pueden ser los componentes de esa ruta de señalización retrógrada.

5.1.1.2. Distribución de las proteínas *GmFAD7* en los diferentes tejidos de soja

La ausencia de anticuerpos específicos contra las desaturasas de membrana de plantas, de métodos de purificación y de métodos de determinación de su actividad enzimática *in vitro* ha dificultado enormemente la caracterización bioquímica de estas enzimas. La disponibilidad de un anticuerpo específico contra la ω 3 desaturasa *GmFAD7* diseñado en nuestro grupo (Collados y col., 2006) nos ha permitido estudiar la distribución de las diferentes isoformas de la proteína *GmFAD7* en los diferentes tejidos de plantas y correlacionar su acumulación con la producción de ácidos grasos trienoicos.

Los datos obtenidos en hojas, raíces y semillas en desarrollo a nivel de proteína sugieren la existencia de diferentes mecanismos post-traduccionales específicos de tejidos que controlan la distribución y conformación de los diferentes miembros de la familia de proteínas *GmFAD7* de soja. Así, en hojas de soja, donde se detecta un alto contenido de ácido graso linolénico ($18:3^{A9,12,15}$) y donde ambos genes *GmFAD7* se expresan de forma similar, el anticuerpo detectó dos bandas claramente diferenciadas en el rango de pesos moleculares esperado. La presencia de estas dos bandas parece estar asociada con la existencia de varios genes *GmFAD7* ya que en aquellas especies de plantas que sólo poseen un gen *FAD7* en su genoma, el

anticuerpo reconoció una sola banda. Si la hipótesis planteada fuera la correcta, podría afirmarse que en hojas de soja, los RNA mensajeros *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2* se traducen eficientemente para dar lugar a las proteínas correspondientes. La comparación de la secuencia de ambas proteínas *GmFAD7* indicó que no existen diferencias significativas en sus ORF que puedan explicar la diferente movilidad de las dos bandas detectadas. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, un análisis detallado con el programa ChloroP predijo diferentes sitios de procesamiento del péptido señal cloroplástico entre *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2*. El análisis de espectrometría de masas de proteínas cloroplásticas sugiere que esta herramienta de predicción determina con bastante precisión la longitud del péptido de tránsito y el tamaño de las proteínas maduras de la envuelta cloroplástica (Ferro y col., 2003). Una de las proteínas para la cual la predicción del programa ChloroP fue correcta fue la ω 6 desaturasa de ácidos grasos FAD6. Si la predicción que el programa ChloroP realiza para las dos proteínas *GmFAD7* es cierta, tras el procesamiento proteolítico, la proteína madura *GmFAD7-2* debería ser 15 aminoácidos más larga que la proteína *GmFAD7-1*. Esta diferencia de tamaño sería consistente con los tamaños de las dos bandas detectadas en western blot para las distintas isoformas de la proteína *GmFAD7*. Además, esta asignación es consistente con la inducción específica de la proteína *GmFAD7-1* en respuesta a la herida. Las diferencias en la longitud del péptido señal cloroplástico podrían sugerir la existencia de una distribución diferencial de ambas proteínas *GmFAD7* en las diferentes membranas cloroplásticas. Esta hipótesis es atractiva ya que los resultados procedentes del análisis de los niveles de proteína *GmFAD7* en las distintas fracciones subcloroplásticas mostraban una localización dual de la proteína *GmFAD7* en la envuelta cloroplástica y la membrana tilacoidal. Sin embargo, en ausencia de datos procedentes del análisis mediante electroforesis bidimensional y análisis de huella peptídica mediante MALDI-TOF, no pueden descartarse otras hipótesis como, por ejemplo, la existencia de algún tipo de modificación post-traducciona que afecte de forma específica a una o ambas

isoformas de la proteína *GmFAD7*, que expliquen la aparición de dos bandas bien diferenciadas en hojas de soja tras el análisis por western blot.

Las raíces y las semillas de soja se caracterizan por tener niveles más bajos de ácidos grasos trienoicos que las hojas. Diversos estudios han demostrado que las enzimas microsomales contribuyen principalmente a los niveles de ácidos grasos trienoicos en semillas y raíces (Lemieux y col., 1990; Yadav y col., 1993). Este hecho implica necesariamente que la actividad de FAD7 debe estar fuertemente regulada en los tejidos no fotosintéticos. En semillas en desarrollo, los datos de proteína indican la existencia de distintas conformaciones de la proteína *GmFAD7*. Aunque no se puede descartar una interacción de la proteína *GmFAD7* con otra proteína de su mismo peso molecular, la banda de 80 kDa podría ser compatible con un dímero *GmFAD7*. A día de hoy se desconoce si el dímero se origina por homodimerización de alguna de las isoformas de la proteína *GmFAD7* o si representa un forma heterodimérica de ambos productos *GmFAD7*. Dado que en este tejido vegetal la actividad de FAD7 es baja podría sugerirse que esta distribución monómero(s)/dímero podría ser la base de un mecanismo regulador que controlara la actividad de FAD7 en semillas de soja. Al menos dos factores, la disponibilidad de hierro y el estado redox de los grupos tiol, parecen alterar *in vitro* la distribución de las distintas conformaciones de la proteína *GmFAD7* en semillas de soja. La implicación del hierro no es sorprendente ya que este metal forma parte del centro activo del enzima (Somerville y col., 2000). Las metaloproteínas necesitan su cofactor para un correcto plegamiento y funcionamiento (Wilson y col., 2004). Los resultados obtenidos con agentes específicos de grupos tiol sugieren que los grupos tiol de los residuos de cisteína de la proteína podrían estar implicados en el control de la conformación de la proteína *GmFAD7* en semillas. La ausencia de condiciones reductoras favorece el incremento de la fracción monomérica de 42 kDa, lo que parece indicar que un puente disulfuro, probablemente intramolecular, podría estar implicado en la formación de esta conformación monomérica. En este sentido, un análisis minucioso de la secuencia de proteína de

las desaturasas de ácidos grasos mostró que dos residuos de cisteína (Cys¹¹⁸ y Cys¹⁷⁴) están conservados en todas las ω 3 desaturasas cloroplásticas. Cys¹⁷⁴ está localizada en una de las cajas de histidina que son esenciales para la actividad de desaturación. En ausencia de datos estructurales para las desaturasas de membrana, es tentador especular que ambos residuos de cisteína podrían estar implicados en la formación de un puente disulfuro que podría contribuir al plegamiento correcto y/o a la estabilización del sitio activo de la enzima (figura 5.1).

Las semillas se caracterizan por su bajo contenido en hierro en comparación con las hojas [aproximadamente dos veces menos en el caso de las hojas, (Drakakaki y col., 2000; Sludge y col., 2008)] y por tener un ambiente interior hipóxico. De acuerdo con nuestros datos, ambos parámetros fisiológicos podrían favorecer la acumulación del dímero *GmFAD7* en semillas. Probablemente, este hecho también podría explicar por qué la conformación dimérica de la proteína *GmFAD7* es específica de semillas y no puede reproducirse en cloroplastos.

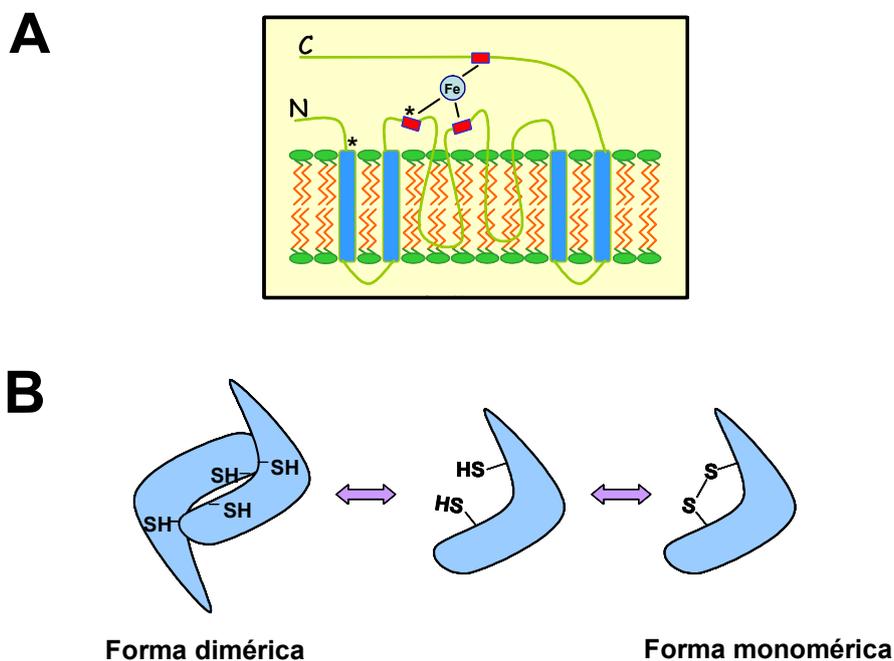


Figura 5.1. (A) Modelo topológico de las desaturasas asociadas a membrana. Las cajas de histidina, representadas como recuadros de color rojo en la figura, actúan como ligandos de los átomos de hierro del sitio activo. Los asteriscos indican la posición de las Cys¹¹⁸ y Cys¹⁷⁴. (B) Mecanismo hipotético de formación de la posible forma dimérica de la proteína *GmFAD7*.

Diferentes cuestiones podrían explicar el significado biológico de la presencia de la conformación dimérica de la proteína *GmFAD7* en semillas. Durante el desarrollo de la semilla, se produce una alta tasa de biosíntesis de lípidos de reserva, principalmente TAG. Bajo estas condiciones, la actividad de la ω 3 desaturasa debe estar estrictamente regulada. La fracción dimérica de *GmFAD7* específica de semillas podría servir como pool de reserva para iniciar la actividad de FAD7 bajo la germinación y la diferenciación de los tejidos vegetales, cuando el tejido de las hojas se está formando y los lípidos de membrana son necesarios.

5.1.1.3. Regulación de las ω 3 desaturasas bajo condiciones de estrés

Herida

A día de hoy, se sabe que ciertos estreses tales como la herida o el ataque por patógenos producen una inducción específica de la expresión del gen *FAD7* en varias especies de plantas y en diversos órganos vegetales (Hamada y col., 1996; Nishiuchi y col., 1997). Con el objetivo de determinar papeles específicos de cada uno de los genes *GmFAD7*, se estudió si alguna de las isoformas de la proteína *GmFAD7* se veía afectada de forma específica por herida. Los resultados del análisis de la expresión génica mostraron la existencia de una inducción específica de ambos genes *GmFAD7* y, por lo tanto, confirmaron que la herida regula estos genes a nivel transcripcional. Puesto que la inducción del gen *GmFAD7-1* parece ser más significativa, los datos podrían sugerir que este gen podría tener un papel específico bajo estrés por herida. La aplicación exógena de metiljasmonato no produjo inducción específica de los genes *GmFAD7*, lo que sugiere que distintos mecanismos de señalización independientes de ácido jasmónico podrían estar implicados en la inducción específica del gen *GmFAD7* en respuesta a la herida. Este hecho que se ha descrito recientemente en *Arabidopsis thaliana* por Matsuda y col. (2009) estaría de acuerdo con la idea de que la activación de la mayoría de los procesos regulados por ácido jasmónico son el resultado de la interacción coordinada de mecanismos de

señalización dependientes e independientes de ácido jasmónico (Lorenzo y Solano, 2005; Matsuda y col., 2009).

Temperatura

A pesar de la existencia de una serie de evidencias que sugieren que la temperatura controla la expresión de los genes de las desaturasas, actualmente, todavía existe un cierto desconocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la regulación de estos genes por la temperatura. Un objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido estudiar el posible papel del frío como factor regulador de la actividad de las ω 3 desaturasas de ácidos grasos e intentar aportar nuevos datos que permitan profundizar en el conocimiento general sobre la regulación de las desaturasas de plantas.

El contenido y la composición de lípidos desempeñan un papel crucial en la adaptación de las plantas a las bajas temperaturas (Sakamoto y Murata, 2002; Falcone y col., 2004). Los análisis de la composición de ácidos grasos indican que los niveles de ácidos grasos poliinsaturados aumentan ligeramente en respuesta al frío en hojas de soja. Además, el aumento de los ácidos grasos poliinsaturados parece producirse de forma secuencial, aumentando en primer lugar el porcentaje de 18:1 ^{Δ 9}, a continuación el de 18:2 ^{Δ 9,12} y, finalmente, el del 18:3 ^{Δ 9,12,15}. Los datos relativos al aumento del 18:3 en frío son consistentes con los ya descritos en hojas de soja (Li y col., 2007). Por el contrario, en suspensiones celulares de soja, la exposición a bajas temperaturas produce un leve descenso del porcentaje de ácido graso 18:3 ^{Δ 9,12,15} que va acompañado de un ligero incremento de ácido oleico, 18:1 ^{Δ 9}. Las diferencias observadas en la composición de ácidos grasos de hojas maduras y de suspensiones celulares de soja probablemente se deben a que éstas últimas requieran tiempos más largos de exposición a bajas temperaturas para conseguir un aumento de los niveles de ácidos grasos trienoicos. Puesto que en hojas maduras el aumento de estos ácidos grasos se produce de forma secuencial, sería esperable que tras la

ampliación del tiempo de exposición a bajas temperaturas en suspensiones celulares, el incremento de ácido oleico observado se transformara en un aumento de los niveles de ácidos grasos trienoicos.

En 1994, McConn y col. identificaron FAD8 como una ω 3 desaturasa cloroplástica inducible por frío. Nuestros resultados indican que en soja no se produce activación transcripcional del gen *GmFAD8*, lo que sugiere que el frío podría regular este gen a nivel post-transcripcional, traduccional o post-traduccional. Estos datos contradicen los descritos anteriormente en maíz, donde se observó una regulación de FAD8 a nivel transcripcional (Gibson y col., 1994; Berberich y col., 1998). Por el contrario, son consistentes con un estudio más reciente realizado en *Arabidopsis thaliana* donde se ha sugerido que la respuesta de la actividad enzimática FAD8 a los cambios de temperatura en un rango fisiológico depende principalmente de un mecanismo post-traduccional (Matsuda y col., 2005). En general, estos datos indican que el nivel de expresión génica al que se ejerce la regulación del gen *GmFAD8* va a depender probablemente de la especie vegetal analizada.

El análisis de expresión de los genes que codifican las distintas isoformas de la proteína *GmFAD3* mostró que ambos se comportan de forma distinta en respuesta a las bajas temperaturas tanto en suspensiones de células fotosintéticas como en hojas de soja. Así, en suspensiones celulares de soja, mientras que la expresión del gen *GmFAD3A* no parece modificarse en respuesta al frío, la expresión del gen *GmFAD3B* parece reprimirse por las bajas temperaturas. En hojas de soja, el gen *GmFAD3B* muestra un patrón de expresión idéntico al descrito anteriormente. Sin embargo, el gen *GmFAD3A* también parece inducirse en respuesta al frío. Los resultados confirman que los genes *GmFAD3* son sensibles a las bajas temperaturas en plantas de soja y que su regulación se produce a nivel transcripcional.

Además, el frío regula el gen *GmFAD3A* mediante un mecanismo de splicing alternativo de tipo eliminación de exón. Sorprendentemente, durante la exposición a bajas temperaturas, se produce inducción de un mRNA específico de frío homólogo al gen *GmFAD3A*, que ha sido denominado *GmFAD3A-1*. El alineamiento de su secuencia con la secuencia del gen *GmFAD3A* disponible en la base de datos del genoma de soja nos ha permitido saber que este RNA mensajero carece del exón siete y, por tanto, ha sido generado por fusión del exón seis con el exón ocho. Hasta la fecha, desconocemos si el RNA mensajero *GmFAD3A-1* se traduce para dar lugar a una proteína distinta a la proteína *GmFAD3A* durante la exposición a bajas temperaturas. Sin embargo, un análisis detallado de la secuencia mostró que la traducción de este mRNA daría lugar a una proteína que carecería de uno de los dominios de histidinas (figura 5.2), que se ha demostrado que son esenciales para la actividad catalítica desaturasa ya que actúan como ligando del grupo dihierro del centro activo del enzima.

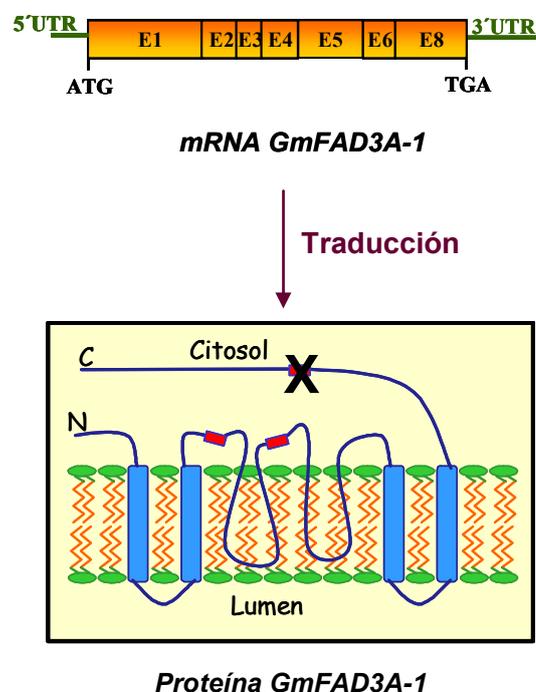


Figura 5.2. Esquema hipotético de la traducción del mRNA *GmFAD3A-1* sintetizado durante la exposición a bajas temperaturas.

Según lo descrito en la bibliografía por Shanklin y col. (1994), la mutación de cada uno de los ocho residuos de histidina conservados resulta en una pérdida de la actividad desaturasa. Por lo tanto, en principio, si el mRNA *GmFAD3A-1* se tradujera, la proteína generada carecería de actividad desaturasa y no sería funcional. A pesar de ello, su funcionalidad debería ser comprobada mediante ensayos de transformación en plantas transgénicas o en levaduras. En ausencia de estos resultados, puede especularse que este RNA mensajero *GmFAD3A-1* podría desempeñar algún tipo de función reguladora durante el tiempo de exposición a bajas temperaturas a día de hoy desconocida.

Estudios recientes sugieren que, en plantas, el splicing alternativo es un mecanismo de regulación de tipo post-transcripcional muy importante en la modulación de la expresión de diversos genes (Reddy, 2007). Análisis computacionales en los genomas de *Arabidopsis thaliana* y arroz han demostrado que, a diferencia de humanos, el "splicing" alternativo de tipo eliminación de exón es muy poco frecuente en plantas, representando un 8 % y un 13,8 % en las dos plantas modelo estudiadas, respectivamente (Wang y Brendel, 2006; Ali y Reddy, 2008). Múltiples estudios indican que diversos estreses bióticos y abióticos influyen en el patrón de splicing de distintos pre-mRNAs (Iida y col., 2004; Ali y Reddy, 2008). En abeto negro, el gen de la β -hidroxiacil-ACP deshidratasa, un enzima clave de la biosíntesis de ácidos grasos, se regula por splicing alternativo bajo estrés por frío. En condiciones normales, la mayoría de los transcritos retienen el intrón uno, lo que da lugar a una proteína truncada y, probablemente, no funcional. Sin embargo, las bajas temperaturas del invierno promueven la eliminación del intrón 1, generándose el enzima funcional correspondiente (Tai y col., 2007; Ali y Reddy, 2008). Aunque diversos estudios muestran que ciertos genes del metabolismo lipídico se regulan por splicing alternativo (Podkowinski y col., 2003; Tai y col., 2007), a día de hoy, no existen evidencias de que los genes que codifican las desaturasas de ácidos grasos se regulen de esta forma. Por lo tanto, es importante destacar que ésta es la primera

evidencia experimental que demuestra este tipo de regulación post-transcripcional para los genes de las desaturasas.

5.2. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA *GmFAD7*

La ausencia de anticuerpos específicos contra las desaturasas de membrana de plantas ha dificultado el desarrollo de métodos de inmunomarcaje que permitieran caracterizar la distribución, abundancia y localización subcelular de estas enzimas. En lo que se refiere a su distribución celular, los únicos datos disponibles en la literatura relativos a la localización de desaturasas integrales de membrana fueron obtenidos mediante ensayos de inmunofluorescencia en células de tabaco transformadas de forma transitoria con distintas fusiones entre un epítipo (mic- o hemaglutinina-) y el extremo N-terminal de la desaturasa correspondiente, FAD2 o FAD3 (Dyer y Mullen, 2001), consiguiendo así demostrar la localización de ambas enzimas en el retículo endoplasmático. En este trabajo, se proporciona la primera evidencia experimental acerca de la localización subcelular de la ω 3-desaturasa FAD7, que ha sido realizada mediante el análisis de inmunofluorescencia por microscopía confocal. Los resultados así obtenidos mostraron la localización del antígeno *GmFAD7* en los cloroplastos, lo que concuerda con la existencia de un péptido señal cloroplástico en la secuencia genómica de la proteína (Yadav y col., 1993) y con la detección de actividad desaturasa responsable de la producción de ácidos grasos poliinsaturados en preparaciones cloroplásticas de múltiples tejidos de diferentes especies vegetales (Ohlrogge y Browse, 1995). Cabe mencionar que, cronológicamente, estos resultados fueron los primeros obtenidos en esta Tesis Doctoral y que, en el momento de obtenerlos, se desconocía la existencia de un segundo gen *GmFAD7* en soja. Como se ha mencionado anteriormente (página 128, sección resultados), el anticuerpo anti-*GmFAD7* probablemente reconozca ambas proteínas, por lo que los datos de localización no nos permiten diferenciar entre *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2*.

El cloroplasto es uno de los orgánulos más complejos en términos de ultraestructura y está formado por tres compartimentos internos diferentes. En primer lugar, las dos membranas de la envuelta del cloroplasto (envueltas interna y externa) poseen una estructura continua que delimita completamente el cloroplasto. En el interior del cloroplasto se encuentran otras estructuras de membrana, denominadas tilacoides que se organizan en forma de apilamientos denominados grana. Las membranas de los tilacoides contienen componentes celulares claves para el funcionamiento del cloroplasto como clorofila, carotenoides, pigmentos fotosintéticos y distintos lípidos y proteínas de la cadena del transporte electrónico fotosintético y enzimas, como ciertas ATPasas. Por último, el espacio libre en el interior del cloroplasto se denomina estroma. Durante años, se ha asumido que las desaturasas cloroplásticas se encontraban localizadas exclusivamente en la envuelta del cloroplasto. Así, el aislamiento de envueltas cloroplásticas con actividad desaturasa y la localización en la envuelta de algunas de las enzimas que participan en la biosíntesis de galactolípidos, respaldaban esta idea (Schmidt y Heinz, 1990; Dörmann y Benning, 2002). Además, estudios recientes de proteómica han detectado las desaturasas FAD6 y FAD7 entre las proteínas de la envuelta interna del cloroplasto (Ferro y col., 2003; Froehlich y col., 2003). Para determinar con exactitud la localización de la proteína *GmFAD7* en los diferentes subcompartimentos cloroplásticos, se realizó un análisis de las distintas fracciones cloroplásticas (envuelta, estroma y tilacoide) obtenidas tras el fraccionamiento del cloroplasto mediante western-blot utilizando el anticuerpo *GmFAD7* junto con marcadores específicos de cada una de las fracciones subcloroplásticas. Los datos revelaron que aunque una pequeña cantidad de proteína se detecta en la envuelta del cloroplasto, la localización de la proteína *GmFAD7* es preferentemente tilacoidal. Estos resultados sugieren una localización dual de la proteína *GmFAD7* en el cloroplasto y proporcionan la primera evidencia experimental de su presencia en las membranas tilacoidales. Estos datos son consistentes con los obtenidos tras la localización

ultraestructural de la proteína *GmFAD7* por inmunomarcado con partículas de oro [Figura 5.3; (Collados, 2006; Andreu y col., 2007)].

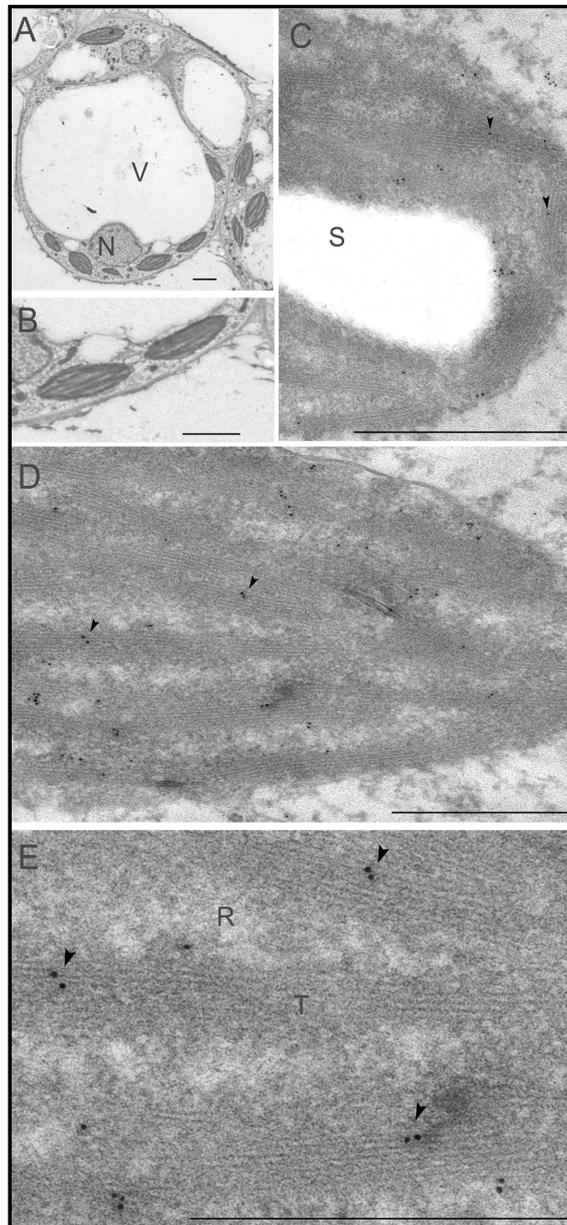


Figura 5.3. Inmunolocalización de la proteína *GmFAD7* mediante inmunomarcado con partículas de oro en las suspensiones celulares de soja. (A) Visión general de una célula de soja. (B) Visión general de un cloroplasto. (C) y (D) corresponden a secciones que muestran la distribución del marcaje de inmuno-oro. (E) Ampliación de una zona de la imagen (C) que muestra la localización tilacoidal de las partículas de oro. Partículas de oro localizadas en la envuelta (C) y en las membranas tilacoidales. V, vacuola; N, núcleo; R, estroma; T, membranas tilacoidales; S, granulos de almidón. Las barras representan en A y B 0,5 μm y en C, D y E 200 nm. Adaptada de Collados, 2006.

Varias evidencias experimentales apoyarían nuestros resultados. Así, algunos enzimas implicados en la síntesis de ácidos grasos también se encuentran localizados en la membrana tilacoidal. Este es el caso de la proteína transportadora de grupos acilo (ACP), que actúa como cofactor de la ACP: glicerol-3-fosfato acil-transferasa (Slabas y Smith, 1988). Sin embargo, el apoyo más fuerte a nuestros resultados son los estudios de inmuno-oro realizados en cianobacterias que revelaron que las Δ^6 , Δ^9 , Δ^{12} y ω 3-desaturasas se localizan tanto en la membrana citoplasmática como en la membrana tilacoidal (Mustardy y col., 1996). Los resultados indicarían que la localización tilacoidal de la proteína FAD7 se habría conservado durante la evolución.

La presencia de la proteína *GmFAD7* en el tilacoide sugiere que las membranas tilacoidales podrían ser lugar de desaturación de lípidos en plantas. El mayor reservorio de ácidos grasos poliinsaturados en los cloroplastos son los galactolípidos presentes en las membranas tilacoidales que, en general, representan entre 70-80 % de los lípidos cloroplásticos totales. Los resultados muestran que la ω 3 desaturasa responsable de la producción de ácidos grasos trienoicos en el cloroplasto se localizaría de forma preferencial en la misma membrana en la que su producto, el ácido α -linolénico, se acumula esterificado a galactolípidos. En este sentido, las desaturasas de ácidos grasos necesitan un donador de electrones para realizar su función. En los cloroplastos, la molécula encargada de proporcionar dichos electrones a las desaturasas plastidiales FAD6 y FAD7, es la ferredoxina en estado reducido. Según la idea aceptada hasta este momento, era necesario asumir que la ferredoxina migraba desde el tilacoide a determinadas regiones de la envuelta del cloroplasto para donar sus electrones a las desaturasas o que, alternativamente, existía una cadena de transporte electrónico en la envuelta que facilitara los electrones a las desaturasas cloroplásticas. En este sentido, se han detectado múltiples señales EPR correspondientes a clusters Fe-S, semiquinonas o flavinas que han sido propuestas como posibles componentes de esta cadena de transporte

electrónico específica (Jäger-Vottero y col., 1997). Sin embargo, ninguno de estos componentes ha sido aislado o caracterizado de forma precisa. Los resultados obtenidos en este trabajo, que indican que la desaturasa *GmFAD7* se encuentra localizada en la membrana tilacoidal, resolverían este problema por cuanto la desaturasa estaría localizada en vecindad con su principal donador de electrones.

Otra situación en la que la localización tilacoidal de la proteína *GmFAD7* podría ser relevante está relacionada con la implicación de esta enzima en la ruta de síntesis de jasmonatos. La síntesis de ácido jasmónico (JA) comienza con la oxigenación del ácido linolénico por una lipoxigenasa (LOX) dando lugar a la formación del correspondiente hidroperóxido (13(S)-hidroxiperoxido de ácido linolénico; ver figura 1.10 de la introducción). En esta ruta metabólica, el hidroperóxido sintetizado es convertido, por la acción consecutiva de dos enzimas denominadas óxido de aleno sintasa (AOS) y óxido de aleno ciclasa (AOC), en un precursor cíclico que tras una reducción y tres ciclos de β -oxidación da origen al ácido jasmónico (Vick y Zimmermann, 1979; Schaller y col., 2005). Existen evidencias de que tanto los ácidos grasos libres como los ácidos grasos esterificados a lípidos de membrana neutros, como los galactolípidos, pueden ser sustratos de la lipoxigenasa (Fuller y col., 2001; Feussner y Wasternack, 2002). Además, estudios proteómicos del tilacoide en *Arabidopsis thaliana* han permitido detectar la presencia de la enzima AOS (*At5g42650.1*) y de dos isoformas de la enzima AOC (*At3g25760.1* y *At3g25770.1*) como proteínas periféricas tilacoidales (Peltier y col., 2004). De esta forma, la localización de la proteína *GmFAD7* en el tilacoide coincidiría con la localización de algunas de las enzimas que intervienen en las primeras etapas de la síntesis de jasmonatos, situando el enzima a cargo de la síntesis del precursor de estos compuestos ($18:3^{\Delta 9,12,15}$) en la misma membrana en la que comienza el proceso. Todos estos resultados sugieren que las membranas tilacoidales podrían desempeñar un papel importante en la síntesis de jasmonatos y, por lo tanto,

intervenir en la respuesta defensiva de las plantas frente al ataque por patógenos, donde las oxilipinas tales como el ácido jasmónico están implicadas.

5.3. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LOS MUTANTES *fad5* y *fad7/fad8/fad3* DE *ARABIDOPSIS THALIANA*

En este trabajo, se ha llevado a cabo el análisis transcriptómico de dos mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes en la desaturación de ácidos grasos, el mutante *fad5* y el triple mutante *fad3/fad7/fad8*, lo que ha permitido identificar 154 y 159 genes cuya expresión se modifica diferencialmente en comparación con el genotipo silvestre respectivamente. El análisis comparativo de los estudios transcriptómicos de los mutantes *fad5* y *fad3/fad7/fad8* de *Arabidopsis thaliana* ha revelado que la modificación de la ruta de síntesis de lípidos a distintos niveles de desaturación provoca una serie de respuestas comunes en ambos mutantes. Así, se han identificado 81 genes comunes que modifican diferencialmente su expresión de manera estadísticamente significativa en los dos mutantes de *Arabidopsis thaliana*, de los cuales 64 se activan y 17 se reprimen respecto al genotipo silvestre.

Uno de los resultados más relevantes del análisis global de expresión génica mostró que un 23 % de los genes inducidos en ambos mutantes codifican proteínas de respuesta a estrés, incluyendo proteínas relacionadas con la patogénesis, con el estrés oxidativo, con la pérdida de agua y con la modificación de la pared celular. En el caso del triple mutante *fad3/fad7/fad8* de *Arabidopsis thaliana*, este resultado no es sorprendente ya que, como se mencionó anteriormente, debido a una mutación en tres genes estructurales que codifican ω 3 desaturasas de ácidos grasos, es incapaz de sintetizar ácidos grasos trienoicos. Debido a que estos ácidos grasos actúan como precursores de la familia de las oxilipinas, este mutante no acumula estas hormonas (tabla 5.1), que son componentes de señalización esenciales que regulan la respuesta de plantas a numerosas situaciones de estrés. Sin embargo, este resultado es inesperado en el mutante *fad5* ya que como consecuencia de una única mutación

nuclear en el locus *fad5* tiene cantidades reducidas de ácidos grasos insaturados de dieciséis átomos de carbono y, por lo tanto, posee niveles de JA muy similares a los de la cepa silvestre (Kunst y col., 1988). Bioquímicamente, la característica común a ambos mutantes es que no acumulan el ácido hexadecatrienóico, 16:3^{Δ7,10,13} y, por ello, son incapaces de sintetizar uno de los miembros de la familia de los jasmonatos, denominado dn-OPDA (tabla 5.1).

Compuesto	Cepa silvestre		Mutante <i>fad5</i>	
	No dañado	Dañado	No dañado	Dañado
dnOPDA	18.81 ± 8.50	86.96 ± 17.37	0	0
9S,13S-OPDA	343.41 ± 65.98	820.84 ± 203.95	23.12 ± 6.04	836.3 ± 213.5
3R,7S y 3R,7R JA	36.65 ± 5.72	1426 ± 228.1	25.52 ± 1.94	1022 ± 72.76

Tabla 5.1. Niveles de los miembros de la familia de los jasmonatos en hojas no dañadas y dañadas de la cepa silvestre y del mutante *fad5* de *Arabidopsis thaliana*. Adaptada de Weber y col. (1997).

Teniendo en cuenta esta información, podría decirse que los cambios transcriptómicos comunes observados podrían estar relacionados con las rutas de señalización controladas por dn-OPDA y, por tanto, la comparación de ambos análisis transcriptómicos nos habría permitido identificar un grupo específico de genes (81), que podrían representar genes regulados por dn-OPDA (dn-ORGs; figura 5.4).

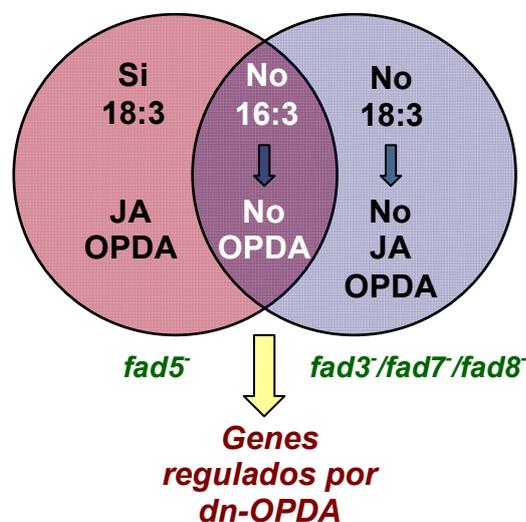


Figura 5.4. Esquema representativo de la característica bioquímica común en los mutantes *fad5* y *fad3/fad7/fad8* de *Arabidopsis thaliana*.

Estos resultados indicarían que el dn-OPDA tiene funciones diferentes al JA y OPDA respecto a la regulación de genes, sugiriendo que este compuesto podría actuar por sí mismo como una molécula de señalización hormonal. Aunque los genes que responden a JA, MeJA y OPDA han sido identificados mediante análisis global de expresión génica por micromatrices de DNA (Taki y col., 2005); hasta la fecha, los genes regulados por dn-OPDA son desconocidos.

De acuerdo con esta hipótesis, los genes reprimidos en ambos mutantes representarían genes inducidos por dn-OPDA. Dentro de este grupo de genes, se han identificado componentes de rutas de señalización tales como el gen *At5g24240*, que codifica una proteína de la familia de ubiquitina y el gen *At5g41700*, que codifica una enzima conjugadora de ubiquitina E2. Asimismo, también se han identificado genes que codifican proteínas relacionadas con estrés, como la MLP1, o genes implicados en respuestas hormonales, como los genes *At1g54040* y *At2g39330* que codifican una proteína inducible por jasmonato y una proteína de unión a mirosinasa, respectivamente. Ambos genes han sido descritos como inducibles por JA (Capella y col., 2001; Devoto y col., 2005). El gen *At4g15440*, que codifica una hidroxiperóxido liasa (HPL), también se ha identificado entre los genes inducidos por dn-OPDA. Las HPLs son enzimas clave en el metabolismo de oxilipinas en plantas, catalizando la degradación de los hidroxiperóxidos de ácidos grasos poliinsaturados producidos por la acción de las lipooxigenasas para generar aldehídos volátiles y oxo-ácidos grasos. Éstos aldehídos volátiles parecen tener un papel directo en la respuesta a la herida y en la defensa frente al ataque por patógenos (Matsui, 2006). La presencia de este gen entre los genes inducidos por dn-OPDA podría sugerir que esta hormona participaría en la inducción de respuestas complementarias al JA y que además, como el sustrato de las HPLs es común a la ruta de síntesis de JA, de alguna manera proporcionaría un mecanismo de control de la propia respuesta de JA.

Es importante mencionar que de los 17 genes comunes reprimidos seleccionados en este estudio como dn-ORGs, 6 genes fueron identificados como JRGs por Taki y col. (2005). Estos genes presentan perfiles diferentes de respuesta a JA y dn-OPDA. Así, los genes *At2g40960*, *At4g39330*, *At4g15440*, *At3g26460* y *At5g38020* se activan por JAs y por dn-OPDA, indicando que ambas hormonas actúan de forma sinérgica. Sin embargo, el gen *At4g34410* se reprime por JA y se activa por dn-OPDA, sugiriendo que en este caso ambas hormonas actúan de forma antagónica. En conjunto, estos resultados sugieren que JAs y dn-OPDA podrían actuar conjuntamente, tanto de forma sinérgica como antagónica, para regular la expresión de genes diana.

El gen *At4g34410* codifica un factor de transcripción de tipo AP2/ERF, que está implicado en la respuesta a etileno. El JA y el ET cooperan o antagonizan en la regulación de diferentes respuestas a estrés, incluyendo la defensa frente a patógenos y a la herida mecánica o biótica (Turner y col., 2002). La selección de la respuesta más adecuada a cada uno de estos estímulos está determinada en parte por la interacción, positiva o negativa, que se establece entre estas dos rutas de señalización. La presencia del gen *At4g34410* entre los genes inducidos por dn-OPDA podría sugerir la participación de este factor de transcripción en la integración de las señales hormonales de JA, ET y dn-OPDA.

Los genes inducidos en ambos mutantes representarían genes reprimidos por dn-OPDA. Un análisis detallado de los genes incluidos en la tabla 4.7, permitió identificar genes pertenecientes a una cascada de señalización hormonal. Así, entre los genes inducidos en ambos mutantes (reprimidos por dn-OPDA), encontramos proteína quinasa (*At3g44610*) o S-locus Ser/Thr quinasa (*At1g11280*). Dentro de la categoría de los genes que intervienen en rutas de señalización, identificamos una fosfolipasa C específica de fosfoinosítidos que podría participar en la respuesta de defensa (Chapman, 1998; Tasma y col., 2008). Finalmente, encontramos también un número importante de genes que codifican proteínas de respuesta a patógenos y

defensa como las proteínas de la familia TIR-NBS-LRR o las proteínas RPP. Sin embargo, en la lista de posibles genes reprimidos por dn-OPDA no identificamos ningún factor de transcripción. Esto sugeriría que el control negativo ejercido por dn-OPDA no se basaría en el control directo de factores de transcripción sino en el control de la expresión de genes que codifican diferentes proteínas capaces de inducir modificaciones específicas y desencadenar así la respuesta hormonal.

Como ya se ha citado anteriormente, de manera general, los procesos de regulación de la estabilidad de proteínas por ubiquitación constituyen un mecanismo central de control de la señalización dependiente de JA en plantas (Devoto y col., 2002; Xu y col., 2002; Feng y col., 2003). El análisis detallado de los genes inducidos en ambos mutantes mostró la presencia de tres genes que están implicados en la degradación de proteínas a través de rutas dependientes de ubiquitina. Así, el gen *At5g41700* codifica un enzima conjugante de ubiquitina E2 (UBC8) que forma parte del propio complejo responsable de la degradación de proteínas en el proteosoma y los genes *At1g27540* y *At4g0254*, codifican proteínas implicadas en el reconocimiento de proteínas diana que van a conjugarse a ubiquitina. La presencia de estos 3 genes en la lista de genes comunes a ambos mutantes sugiere que dn-OPDA, al igual que JA, actúa a través del control de las rutas de señalización dependientes de ubiquitina. Sorprendentemente, estos genes se encontraron en la lista de genes comunes inducidos en ambos mutantes, lo que sugiere que son regulados negativamente por dn-OPDA. Esta observación de que dn-OPDA podría regular negativamente algunos de los componentes de la ruta de degradación por el proteosoma sugiere que dn-OPDA actuaría de manera antagónica con JA en un intento de mantener la respuesta de esta hormona.

Por último, 3 de los genes inducidos en ambos mutantes fueron identificados por Taki y cols. (2005) como genes inducidos por JA u OPDA. Así, los genes *At1g66100*, *At5g43580*, *At3g09270* se activan por JAs y se reprimen por dn-OPDA. El gen *At1g66100* codifica una proteína tionina. Las tioninas pertenecen a un grupo bien

caracterizado de proteínas de defensa, que son activadas por JA o herida (Bohlmann et al, 1998; Taki et al, 2005). Por lo tanto, JA y dn-OPDA actuarían de forma antagónica para regular el gen *At1g66100*. De hecho, la tionina fue uno de los genes más inducidos en el mutante *fad5* probablemente debido a que, en ausencia de dn-OPDA, la respuesta de JA esta descontrolada.

5.3.1. Participación de COI1 en la ruta de señalización de dn-OPDA

La expresión de los JRGs se regula a través de una ruta de señalización dependiente de COI1 (Feys y col., 1994). COI1 es una proteína F-Box que participa en la degradación de las proteínas JAZ por el proteosoma como un mecanismo de regulación de la señalización de JA (Xie y col., 1998; Chini y col., 2007). Por el contrario, OPDA modula un grupo específico de genes vía una ruta de señalización independiente de COI1. Con el objetivo de conocer si el dn-OPDA regula la expresión de genes a través de rutas dependientes o independientes de COI1 comparamos nuestros resultados con los obtenidos a partir del análisis transcriptómico de un mutante *coi1-16* (Devoto y col., 2005). Así, únicamente 7 de los 81 genes comunes fueron identificados como genes dependientes de COI1 por Devoto y col. (2005). Sorprendentemente, ninguno de los 9 genes comunes identificados como genes JRGs por Taki y col. (2005) fueron seleccionados como genes dependientes de COI1. Sin embargo, este hecho podría ser una consecuencia de que el análisis transcriptómico del mutante *coi1-16* se realizó con un Affymetrix Gene Chip que representaba únicamente 8200 genes. Esta cifra supone aproximadamente un tercio de los genes analizados en esta tesis doctoral y, por tanto, múltiples genes objeto de estudio probablemente no están representados. Todo ello impide llegar a una conclusión final adecuada sobre la participación de COI1 como componente celular de las rutas de señalización desencadenadas por dn-OPDA.

5.3.2. Un número reducido de genes comunes están relacionados con el metabolismo lipídico

El objetivo inicial del estudio transcriptómico de los mutantes *fad5* y *fad3/fad7/fad8* de *Arabidopsis thaliana* era identificar componentes que participaran en los mecanismos compensatorios de transferencia lipídica entre el retículo endoplasmático y el cloroplasto, que se producen como consecuencia de la mutación específica de los genes que codifican desaturasas de ácidos grasos. Sorprendentemente, sólo se inducen dos genes directamente relacionados con el metabolismo de lípidos. Uno de ellos, el gen *At1g28670*, codifica una proteína lipasa, cuya función probablemente sea el aumento de la disponibilidad de ácidos grasos poliinsaturados a base de liberar los que se encuentren asociados a lípidos no neosintetizados. El segundo gen identificado, *At2g15050*, codifica una proteína relacionada con el transporte de lípidos (LTPs). Estas proteínas de pequeño tamaño son muy abundantes en plantas y, en *Arabidopsis*, están codificadas por más de 15 genes que se expresan diferencialmente durante el desarrollo, en los diferentes tejidos vegetales y en distintas situaciones fisiológicas (Vignols y col., 1997; Arondel y col., 2000). Aunque las funciones biológicas reales de estas proteínas todavía no se han determinado, existen múltiples evidencias que relacionan las proteínas de transporte de lípidos con funciones antipatogénicas y antimicrobianas (Molina y col., 1993; Molina y García-Olmedo, 1997; Kristensen y col., 2000; Velazhahan y col., 2001). También se ha documentado la inducción de los genes que codifican LTPs en respuesta a estrés hídrico, frío, estrés salino y a la infección por patógenos, a través de las rutas de señalización en las que participan ABA, SA, ET y JA (García-Garrido y col., 1998; Jung y col., 2003; Jung y col., 2006).

Finalmente, el análisis de los genes comunes en ambos mutantes revela la presencia de tres genes que codifican proteínas implicadas en el metabolismo energético. Así, los genes *At1g60810* y *At1g09420*, que codifican las enzimas ATP-citrato liasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa respectivamente, se reprimen en

ambos mutantes, y el gen *At1g59900*, que codifica una subunidad de la piruvato deshidrogenasa mitocondrial, se induce. La represión o inducción de los genes citados podría provocar un aumento de la disponibilidad de acetyl-CoA destinado al cloroplasto para la síntesis de ácidos grasos de 16 y 18 átomos de carbono.



Conclusiones

6. CONCLUSIONES

1. Los análisis de inmunofluorescencia por microscopía confocal y western blot indican que la ω 3 desaturasa de ácidos grasos *GmFAD7* está localizada preferentemente en las membranas tilacoidales de los cloroplastos de soja. Este dato sugiere que las membranas tilacoidales podrían ser sitios de desaturación de ácidos grasos en plantas.
2. En este trabajo, se ha identificado un nuevo gen *GmFAD7*, denominado *GmFAD7-2*, diferente al descrito anteriormente. Además, un análisis detallado de la proteína deducida reveló que la proteína *GmFAD7-2* posee las características típicas de las desaturasas de ácidos grasos asociadas a membrana.
3. El análisis *in silico* en la base de datos del genoma de soja junto con la caracterización genómica de los genes *GmFAD7* realizada de forma experimental nos ha permitido confirmar que los genes *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2* están localizados en dos loci diferentes en los cromosomas 18 y 7, respectivamente, lo que sugiere que la ω 3 desaturasa cloroplástica FAD7 está codificada por una familia multigénica en plantas de soja.
4. El análisis de los niveles de proteína *GmFAD7* en los distintos tejidos de la planta sugiere la existencia de diferentes mecanismos de regulación post-traduccionales específicos de tejido que controlan la conformación y distribución de los enzimas correspondientes y que, podrían estar implicados en la regulación de su actividad.
5. El desarrollo de la hoja parece modular principalmente la expresión de los genes que codifican las ω 3 desaturasas de ácidos grasos FAD3 y FAD7.

Este mecanismo de regulación por el desarrollo de la hoja parece ser fundamentalmente transcripcional.

6. En soja, a la temperatura óptima de crecimiento, el gen *GmFAD8* se expresa de forma constitutiva tanto en tejidos vegetativos como en semillas en desarrollo. En ausencia de datos de proteína *GmFAD8*, no puede descartarse que dicha proteína sea activa a temperatura ambiente. Además, durante el periodo de exposición a bajas temperaturas no se produce activación transcripcional del gen *GmFAD8*.
7. El frío ejerce, a nivel transcripcional, un papel regulador en la expresión de los genes que codifican las ω 3 desaturasas *GmFAD3A* y *GmFAD3B*. Durante el periodo de exposición a bajas temperaturas, el gen *GmFAD3A* se regula por splicing alternativo de tipo eliminación de exón. Así, se han detectado dos mensajeros diferentes, *GmFAD3A* y *GmFAD3A-1*, que únicamente difieren entre sí en que el mRNA *GmFAD3A* posee una delección de 138 nucleótidos que implica la eliminación completa del exón siete.
8. El análisis comparativo de los análisis transcriptómicos de los mutantes *fad5* y *fad3/fad7/fad8* de *Arabidopsis thaliana* nos ha permitido identificar un grupo específicos de genes, que podrían representar genes regulados por dn-OPDA (dn-ORGs). Los datos han puesto de manifiesto que los cambios transcriptómicos comunes observados podrían estar relacionados con las rutas de señalización controladas por dn-OPDA y, por tanto, indicarían que el dn-OPDA tiene funciones diferentes al JA y OPDA respecto a la regulación de genes, sugiriendo que este compuesto podría actuar por sí mismo como una molécula de señalización hormonal. Los datos indican que dn-OPDA podría establecer interacciones, sinérgicas o antagónicas, con el resto de los miembros de la familia de los jasmonatos.



Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alfonso, M., Yruela, I., Almarcegui, S., Torrado, E., Perez, M. A. y Picorel, R.** (2001). Unusual tolerance to high temperatures in a new herbicide-resistant D1 mutant from *Glycine max* (L.) Merr. cell cultures deficient in fatty acid desaturation. *Planta* **212**: 573 - 582.
- Ali, G. S. y Reddy, A. S. N.** (2008). Regulation of Alternative Splicing of Pre-mRNAs by Stresses. *Nuclear pre-mRNA Processing in Plants*: 257-275.
- Anai, T., Yamada, T., Kinoshita, T., Rahman, S. M. y Takagi, Y.** (2005). Identification of corresponding genes for three low-[alpha]-linolenic acid mutants and elucidation of their contribution to fatty acid biosynthesis in soybean seed. *Plant Science* **168**(6): 1615-1623.
- Andersson, M. X., Goksör, M. y Sandelius, A. S.** (2007). Optical Manipulation Reveals Strong Attracting Forces at Membrane Contact Sites between Endoplasmic Reticulum and Chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry* **282**(2): 1170-1174.
- Andreu, V., Collados, R., Testillano, P. S., Risueño, M. C., Picorel, R. y Alfonso, M.** (2007). In situ molecular identification of the plastid omega3 fatty acid desaturase FAD7 from soybean: evidence of thylakoid membrane localization. *Plant Physiology* **145**(4): 1336-44.
- Arondel, V., Vergnolle, C., Cantrel, C. y Kader, J. C.** (2000). Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* **157** 1–12.
- Awai, K., Xu, C., Tamot, B. y Benning, C.** (2006). A phosphatidic acid-binding protein of the chloroplast inner envelope membrane involved in lipid trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**(28): 10817-10822.

- Banilas, G., Nikiforiadis, A., Makariti, I., Moressis, A. y Hatzopoulos, P.** (2007). Discrete roles of a microsomal linoleate desaturase gene in olive identified by spatiotemporal transcriptional analysis. *Tree Physiology* **27**(4): 481-490.
- Bao, X., Focke, M., Pollard, M. y Ohlrogge, J. B.** (2000). Understanding *in vivo* carbon precursor supply for fatty acid synthesis in leaf tissue. *Plant Journal* **22**: 39-50.
- Bate, N. J., Sivasankar, S., Moxon, C., Riley, J. M. C., Thompson, J. E. y Rothstein, S. J.** (1998). Molecular Characterization of an Arabidopsis Gene Encoding Hydroperoxide Lyase, a Cytochrome P-450 That Is Wound Inducible. *Plant Physiology* **117**(4): 1393-1400.
- Bates, P. D., Ohlrogge, J. B. y Pollard, M.** (2007). Incorporation of Newly Synthesized Fatty Acids into Cytosolic Glycerolipids in Pea Leaves Occurs via Acyl Editing. *Journal of Biological Chemistry* **282**(43): 31206-31216.
- Benedetti, C. E., Costa, C. L., Turcinelli, S. R. y Arruda, P.** (1998). Differential Expression of a Novel Gene in Response to Coronatine, Methyl Jasmonate, and Wounding in the *Co1* Mutant of Arabidopsis. *Plant Physiology* **116**(3): 1037-1042.
- Benjamini, Y. y Hochberg, Y.** (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* **57**(1): 289-300.
- Benning, C. y Ohta, H.** (2005). Three Enzyme Systems for Galactoglycerolipid Biosynthesis Are Coordinately Regulated in Plants. *Journal of Biological Chemistry* **280**(4): 2397-2400.
- Benning, C.** (2008). A role for lipid trafficking in chloroplast biogenesis. *Progress in Lipid Research* **47**(5): 381-389.
- Benning, C.** (2009). Mechanisms of Lipid Transport Involved in Organelle Biogenesis in Plant Cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **25**(1): 71-91.

- Benson, A. A. y Mauro, B.** (1958). Plant phospholipids. I. Identification of the phosphatidylglycerols. *Biochimica et Biophysica Acta* **27**: 189-195.
- Berberich, T., Harada, M., Sugawara, K., Kodama, H., Iba, K. y Kusano, K.** (1998). Two maize genes encoding ω -3 fatty acid desaturase and their differential expression to temperature. *Plant Molecular Biology* **36**: 297-306.
- Bilyeu, K. D., Palavalli, L., Sleper, D. A. y Beuselinck, P. R.** (2003). Three microsomal omega-3 fatty-acid desaturase genes contribute to soybean linolenic acid levels. *Crop Science* **43**: 1833-1838.
- Black, P. N. y DiRusso, C. C.** (2003). Transmembrane Movement of Exogenous Long-Chain Fatty Acids: Proteins, Enzymes, and Vectorial Esterification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**(3): 454-472.
- Bligh, E. G. y Dyer, W. S.** (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37**: 911-917.
- Block, M. A., Dorne, A. J., Joyard, J. y Douce, R.** (1983). Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplast. *Journal of Biological Chemistry* **258**: 13281-13286.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-54.
- Bräutigam, A., Shrestha, R. P., Whitten, D., Wilkerson, C. G., Carr, K. M., Froehlich, J. E. y Weber, A. P. M.** (2008). Low-coverage massively parallel pyrosequencing of cDNAs enables proteomics in non-model species: Comparison of a species-specific database generated by pyrosequencing with databases from related species for proteome analysis of pea chloroplast envelopes. *Journal of Biotechnology* **136**(1-2): 44-53.

- Brown, J. H., Chambers, J. A. y Thompson, J. E.** (1991). Acyl Chain and Head Group Regulation of Phospholipid Catabolism in Senescing Carnation Flowers. *Plant Physiology* **95**(3): 909–916.
- Browse, J. y Somerville, C.** (1991). Glycerolipid synthesis: biochemistry and regulation. *Annual Review of Plant Physiology And Plant Molecular Biology* **42**: 467-506.
- Browse, J., McConn, M., James, D. y Miquel, M.** (1993). Mutants of Arabidopsis deficient in the synthesis of α -linolenate. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 16345-16351.
- Byfield, G. E. y Upchurch, R. G.** (2007). Effect of Temperature on Microsomal Omega-3 Linoleate Desaturase Gene Expression and Linolenic Acid Content in Developing Soybean Seeds. *Crop Science* **47**(6): 2445-2452.
- Cahoon, E. B., Shanklin, J. y Ohlrogge, J. B.** (1992). Expression of a coriander desaturase results in petroselinic acid production in transgenic tobacco. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA* **89**: 11184-11188.
- Cahoon, E. B., Crammer, A. M., Shanklin, J. y Ohlrogge, J. B.** (1994). Δ^6 hexadecenoic acid is synthesized by the activity of a soluble Δ^6 palmitoyl-ACP carrier protein desaturase in *Thunbergia alata* endosperm. *Journal of Biological Chemistry* **269**(44): 27519 - 27526.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(10): 4872-4877.
- Capella, A. N., Menossi, M., Arruda, P. y Benedetti, C. E.** (2001). *COI1* affects myrosinase activity and controls the expression of two flower-specific myrosinase-binding protein homologues in *Arabidopsis*. *Planta* **213**(5): 691-699.

- Cline, K. y Keegstra, K.** (1983). Galactosyltransferases Involved in Galactolipid Biosynthesis Are Located in the Outer Membrane of Pea Chloroplast Envelopes. *Plant Physiology* **71**(2): 366–372.
- Collados, R.** (2006). Mecanismos de regulación de la expresión de los genes de las desaturasas de plantas: adaptabilidad a la luz e influencia de los procesos redox fotosintéticos. *Tesis Doctoral*.
- Collados, R., Andreu, V., Picorel, R. y Alfonso, M.** (2006). A light-sensitive mechanism differently regulates transcription and transcript stability of omega3 fatty-acid desaturases (FAD3, FAD7 and FAD8) in soybean photosynthetic cell suspensions. *FEBS Letters* **580**(20): 4934-40.
- Chapman, K. D.** (1998). Phospholipase activity during plant growth and development and in response to environmental stress. *Trends in Plant Science* **3**(11): 419-426.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J. M., Lorenzo, O., Garcia-Casado, G., Lopez-Vidriero, I., Lozano, F. M., Ponce, M. R., Micol, J. L. y Solano, R.** (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**(7154): 666-671.
- Chini, A., Boter, M. y Solano, R.** (2009). Plant oxylipins: COI1/JAZs/MYC2 as the core jasmonic acid-signalling module. *FEBS Journal* **276**: 4682-4692.
- Chinnusamy, V., Ohta, M., Kanrar, S., Lee, B.-h., Hong, X., Agarwal, M. y Zhu, J.-K.** (2003). ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. *Genes & Development* **17**(8): 1043-1054.
- De Palma, M., Grillo, S., Massarelli, I., Costa, A., Balogh, G., Vigh, L. y Leone, A.** (2008). Regulation of desaturase gene expression, changes in membrane lipid composition and freezing tolerance in potato plants. *Molecular Breeding* **21**(1): 15-26.
- Devoto, A., Nieto-Rostro, M., Xie, D., Ellis, C., Harmston, R., Patrick, E., Davis, J., Sherratt, L., Coleman, M. y G. Turner, J.** (2002). COI1 links jasmonate

- signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **32**(4): 457-466.
- Devoto, A., Ellis, C., Magusin, A., Chang, H. S., Chilcott, C., Zhu, T. y Turner, J.** (2005). Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Molecular Biology* **58**(4): 497-513.
- DeYoung, B. J. y Innes, W. I.** (2006). Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nature Immunology* **7**(12): 1243-1249.
- Dörmann, P. y Benning, C.** (2002). Galactolipids rule in seed plants. *Trends in Plant Science* **7**(3): 112-118.
- Dörmann, P.** (2005). Membrane lipids, Blackwell Publishing.
- Drakakaki, G., Christou, P. y Stöger, E.** (2000). Constitutive Expression of Soybean Ferritin cDNA Intransgenic Wheat and Rice Results in Increased Iron Levels in Vegetative Tissues but not in Seeds. *Transgenic Research* **9**(6): 445-452.
- Drobak, B. K.** (2005). Inositol - containing lipids: roles in cellular signalling, Blackwell Publishing.
- Dyer, J. M. y Mullen, R. T.** (2001). Immunocytological localization of two plant fatty-acid desaturases in the endoplasmic reticulum. *FEBS Letters* **494**: 44-47.
- Dyer, J. M., Stymne, S., Green, A. G. y Carlsson, A. S.** (2008). High-value oils from plants. *Plant Journal* **54**(4): 640-55.
- Falcone, D., Ogas, J. y Somerville, C.** (2004). Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of *Arabidopsis* with alterations in membrane lipid composition. *BMC Plant Biology* **4**(1): 17.
- Farmer, E. E.** (1994). Fatty acid signalling in plants and their associated microorganisms. *Plant Molecular Biology* **26**(5): 1423-1437.
- Feng, S., Ma, L., Wang, X., Xie, D., Dinesh-Kumar, S. P., Wei, N. y Deng, X. W.** (2003). The COP9 Signalosome Interacts Physically with SCFCOI1 and Modulates Jasmonate Responses. *Plant Cell* **15**(5): 1083-1094.

- Ferro, M., Salvi, D., Brugière, S., Miras, S., Kowalski, S., Louwagie, M., Garin, J., Joyard, J. y Rolland, N.** (2003). Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and Cellular Proteomics* **2.5**: 325-345.
- Feussner, I. y Wasternack, C.** (2002). The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 275-97.
- Feys, B., Benedetti, C. E., Penfold, C. N. y Turner, J. G.** (1994). Arabidopsis Mutants Selected for Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate, and Resistant to a Bacterial Pathogen. *Plant Cell* **6(5)**: 751–759.
- Fortes, A. M., Coronado, M. J., Testillano, P. S., Risueño, M. C. y Pais, M. S.** (2004). Expression of lipoxygenase during organogenic nodule formation from hop internodes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **52(2)**: 227-41.
- Fowler, S. y Thomashow, M. F.** (2002). Arabidopsis Transcriptome Profiling Indicates That Multiple Regulatory Pathways Are Activated during Cold Acclimation in Addition to the CBF Cold Response Pathway. *Plant Cell* **14(8)**: 1675-1690.
- Frentzen, M., Heinz, E., McKeon, T. A. y Stumpf, P. K.** (1983). Specificities and Selectivities of Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase and Monoacylglycerol-3-Phosphate Acyltransferase from Pea and Spinach Chloroplasts. *European Journal of Biochemistry* **129(3)**: 629-636.
- Frentzen, M.** (2004). Phosphatidylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol: anionic membrane lipids and phosphate regulation. *Current Opinion in Plant Biology* **7(3)**: 270-276.
- Froehlich, J. E., Wilkerson, C. G., Ray, W. K., McAndrew, R. S., Osteryoung, K. W., Gage, D. A. y Phinney, B. S.** (2003). Proteomic study of the *Arabidopsis thaliana* chloroplastic envelope membrane utilizing alternatives to traditional two-dimensional electrophoresis. *Journal of Proteome Research* **2**: 413-425.

- Fujino, Y. y Miyazawa, T.** (1979). Chemical structures of mono-, di-, tri- and tetraglycosylglycerides in rice bran. *Biochimica et Biophysica Acta* **572**: 442-451.
- Fukuchi-Mizutani, M., Savin, K., Cornish, E., Tanaka, Y., Ashikari, T., Kusumi, T. y Murata, N.** (1995). Senescence-induced expression of a homologue of $\Delta 9$ desaturase in rose petals. *Plant Molecular Biology* **29**(4): 627-635.
- Fuller, M. A., Weichert, H., Fischer, A. M., Feussner, I. y Grimes, H. D.** (2001). Activity of soybean lipoxygenase isoforms against esterified fatty acids indicates functional specificity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **388**(1): 146-54.
- García-Díaz, T., Martínez-Rivas, J. M. y Mancha, M.** (2002). Temperature and oxygen regulation of oleate desaturation in developing sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *Physiologia Plantarum* **114**: 13-20.
- García-Garrido, J. M., Menossi, M., Puigdoménech, P., Martínez-Izquierdo, J. A. y Delseny, M.** (1998). Characterization of a gene encoding an abscisic acid-inducible type-2 lipid transfer protein from rice. *FEBS Letters* **428**(3): 193-199.
- Gibson, S., Arondel, V., Iba, K. y Somerville, C.** (1994). Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast omega-3 desaturase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **106**(4): 1615 - 1621.
- Gilmour, S. J., Zarka, D. G., Stockinger, E. J., Salazar, M. P., Houghton, J. M. y Thomashow, M. F.** (1998). Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression. *Plant Journal* **16**(4): 433-442.
- Gingerich, D. J., Gagne, J. M., Salter, D. W., Hellmann, H., Estelle, M., Ma, L. y Vierstra, R. D.** (2005). Cullins 3a and 3b Assemble with Members of the Broad Complex/Tramtrack/Bric-a-Brac (BTB) Protein Family to Form Essential Ubiquitin-Protein Ligases (E3s) in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* **280**(19): 18810-18821.

- Gray, J. C.** (2003). Chloroplast-to-nucleus signalling: a role for Mg-protoporphyrin. *Trends in Genetics* **19**(10): 526-529.
- Gundlach, H., Müller, M. J., Kutchan, T. M. y Zenk, M. H.** (1992). Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**(6): 2389-2393.
- Hamada, T., Kodama, H., Nishimura, M. y Iba, K.** (1994). Cloning of a cDNA encoding tobacco [ω]-3 fatty acid desaturase. *Gene* **147**(2): 293-294.
- Hamada, T., Nishiuchi, T., Kodama, H., Nishimura, M. y Iba, K.** (1996). cDNA cloning of a wounding-inducible gene encoding a plastid ω -3 fatty acid desaturase from tobacco. *Plant Cell Physiology* **37**: 606-611.
- Hamada, T., Kodama, H., Takeshita, K., Utsumi, H. y Iba, K.** (1998). Characterization of Transgenic Tobacco with an Increased alpha-Linolenic Acid Level. *Plant Physiology* **118**(2): 591-598.
- Hamilton, J. A.** (2007). New insights into the roles of proteins and lipids in membrane transport of fatty acids. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **77**(5-6): 355-361.
- Haralampidis, K., Milioni, D., Sanchez, J., Baltrusch, M., Heinz, E. y Hatzopoulos, P.** (1998). Temporal and transient expression of stearoyl-ACP carrier protein desaturase gene during olive fruit development. *Journal of Experimental Botany* **49**(327): 1661-1669.
- Harwood, J. L.** (1996). Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta* **1301**(1-2): 7-56.
- Harwood, J. L.** (2005). Fatty acid biosynthesis, Blackwell Publishing.
- Heinz, E. y Roughan, G.** (1983). Similarities and Differences in Lipid Metabolism of Chloroplasts Isolated from 18:3 and 16:3 Plants. *Plant Physiology* **72**(2): 273-279.

- Heppard, E. P., Kinney, A. J., Stecca, K. L. y Miao, G. H.** (1996). Developmental and growth temperature regulation of two different microsomal omega-6 desaturase genes in soybeans. *Plant Physiology* **110**(1): 311 - 319.
- Holt, B. F., Hubert, D. A. y Dangl, J. L.** (2003). Resistance gene signaling in plants -- complex similarities to animal innate immunity. *Current Opinion in Immunology* **15**(1): 20-25.
- Horiguchi, G., Iwakawa, H., Kodama, H., Kawakami, N., Nishimura, M. y Iba, K.** (1996a). Expression of a gene for plastid ω -3 fatty acid desaturase and changes in lipid and fatty acid compositions in light- and dark-grown wheat leaves. *Physiologia Plantarum* **96**: 275-283.
- Horiguchi, G., Kodama, H., Nishimura, M. y Iba, K.** (1996b). Role of ω -3 fatty acid desaturases in the regulation of the level of trienoic fatty acids during leaf cell maturation. *Planta* **199**: 439-442.
- Horiguchi, G., Kawakami, N., Kusumi, K., Kodama, H. y Iba, K.** (1998). Developmental Regulation of Genes for Microsome and Plastid omega-3 Fatty Acid Desaturases in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant and Cell Physiology* **39**(5): 540-544.
- Horiguchi, G., Fuse, T., Kawakami, N., Kodama, H. y Iba, K.** (2000). Temperature-dependent translational regulation of the ER ω -3 fatty acid desaturase gene in wheat root tips. *Plant Journal* **24**(6): 805-813.
- Horn, M. E., Sherrard, J. H. y Widholm, J. M.** (1983). Photoautotrophic Growth of Soybean Cells in Suspension Culture: I. Establishment of Photoautotrophic Cultures. *Plant Physiology* **72**(2): 426-429.
- Hugly, S. y Somerville, C.** (1992). A role for membrane lipid polyunsaturation in chloroplast biogenesis at low temperature. *Plant Physiology* **99**: 197-202.
- Iba, K.** (2002). Acclimative response to temperature stress in higher plants: Approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 225-245.

- Iida, K., Seki, M., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Toyoda, T., Konagaya, A. y Shinozaki, K.** (2004). Genome-wide analysis of alternative pre-mRNA splicing in *Arabidopsis thaliana* based on full-length cDNA sequences. *Nucleic Acids Research* **32**(17): 5096-5103.
- Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U. y Speed, T. P.** (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**(2): 249-264.
- Jackson, D. T., Froehlich, J. E. y Keegstra, K.** (1998). The hydrophilic domain of Tic110, an inner envelope membrane component of the chloroplastic protein translocation apparatus faces the stromal compartment. *The Journal of Biological Chemistry* **273**(26): 16583-16588.
- Jäger-Vottero, P., Dorne, A. J., Jordanov, J., Douce, R. y Joyard, J.** (1997). Redox chains in chloroplast envelope membranes: spectroscopic evidence for the presence of electron carriers, including iron-sulfur centers. *Proceedings of the National Academic of Science USA* **94**: 1597-1602.
- Jinpeng, G., Imad, A., Arthur, M., Andrew, S., Changcheng, X., John, E. F., Robert, L. L. y Christoph, B.** (2009). FATTY ACID DESATURASE4 of *Arabidopsis* encodes a protein distinct from characterized fatty acid desaturases. *Plant Journal* **60**(5): 832-839.
- Joyard, J., Ferro, M., Masselon, C., Seigneurin-Berny, D., Salvi, D., Garin, J. y Rolland, N.** (2010). Chloroplast proteomics highlights the subcellular compartmentation of lipid metabolism. *Progress in Lipid Research* **49**(2): 128-158.
- Jung, H. W., Lim, C. W. y Hwang, B. K.** (2003). Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic, and environmental stresses. *Plant, Cell & Environment* **26**(6): 915-928.

- Jung, H. W., Lim, C. W. y Hwang, B. K.** (2006). Isolation and functional analysis of a pepper lipid transfer protein III (CALTPIII) gene promoter during signaling to pathogen, abiotic and environmental stresses. *Plant Science* **170**(2): 258-266.
- Kargiotidou, A., Deli, D., Galanopoulou, D., Tsaftaris, A. y Farmaki, T.** (2008). Low temperature and light regulate *delta* 12 fatty acid desaturases (FAD2) at a transcriptional level in cotton (*Gossypium hirsutum*). *Journal of Experimental Botany* **59**(8): 2043-2056.
- Katsir, L., Schillmiller, A. L., Staswick, P. E., He, S. Y. y Howe, G. A.** (2008). COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**(19): 7100-7105.
- Ke, j., Behal, R. H., Back, S. L., Nikolau, B. J., Wurtele, E. S. y Oliver, D. J.** (2000). The role of pyruvate dehydrogenase and acetyl-coA synthetase in fatty acid synthesis in developing Arabidopsis seeds. *Plant Physiology* **123**: 497-508.
- Kim, M., Kim, H., Shin, J., Chung, C.-H., Ohlrogge, J. y Suh, M.** (2006). Seed-specific expression of sesame microsomal oleic acid desaturase is controlled by combinatorial properties between negative cis-regulatory elements in the *SeFAD2* promoter and enhancers in the 5'-UTR intron. *Molecular Genetics and Genomics* **276**(4): 351-368.
- Kinney, A. J., Cahoon, E. B. y Hitz, W. D.** (2002). Manipulating desaturase activities in transgenic crop plants. *Biochemical Society Transactions* **30**(Part 6): 1099-1103.
- Kjellberg, J. M., Trimborn, M., Andersson, M. y Sandelius, A. S.** (2000). Acyl-CoA dependent acylation of phospholipids in the chloroplast envelope. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1485**(2-3): 100-110.

- Kodama, H., Hamada, T., Horiguchi, C., Nishimura, M. y Iba, K.** (1994). Genetic enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast omega-3 fatty acid desaturase in transgenic tobacco. *Plant Physiology* **105**: 601-605.
- Kodama, H., Akagi, H., Kusumi, K., Fujimura, T. y Iba, K.** (1997). Structure, chromosomal location and expression of a rice gene encoding the microsomal omega-3 fatty acid desaturase. *Plant Molecular Biology* **33**(3): 493-502.
- Kojima, M., Seki, K., Ohnishi, M., Ito, S. y Fujino, Y.** (1990). Structure of novel glyceroglycolipids in Adzuki bean (*Vigna angularis*) seeds. *Biochemistry and Cell Biology* **68**: 59-64.
- Kristensen, A. K., Brunstedt, J., Nielsen, K. K., Roepstorff, P. y Mikkelsen, J. D.** (2000). Characterization of a new antifungal non-specific lipid transfer protein (nsLTP) from sugar beet leaves. *Plant Science* **155**(1): 31-40.
- Kunst, L., Browse, J. y Somerville, C.** (1988). Altered regulation of lipid biosynthesis in a mutant of Arabidopsis deficient in chloroplast glycerol-3-phosphate acyltransferase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 4143-4147.
- Kunst, L., Browse, J. y Somerville, C.** (1989). Enhanced Thermal Tolerance in a Mutant of Arabidopsis Deficient in Palmitic Acid Unsaturation. *Plant Physiology* **91**(1): 401-408.
- Kwon, J. H., Lee, Y. M. y An, C. S.** (2000). cDNA cloning of chloroplast omega-3 fatty acid desaturase from *Capsicum annuum* and its expression upon wounding. *Molecules and Cells* **10**(5): 493-7.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Legendre, L., Yueh, Y. G., Crain, R., Haddock, N., Heinstein, P. F. y Low, P. S.** (1993). Phospholipase C activation during elicitation of the oxidative burst in cultured plant cells. *Journal of Biological Chemistry* **268**(33): 24559-24563.

- Lemieux, B., Miquel, M., Somerville, C. y Browse, J.** (1990). Mutants of Arabidopsis with alterations in seed lipid fatty acid composition. *Theoretical & Applied Genetics* **80**: 234-240.
- Li, H. M., Moore, T. y Keegstra, K.** (1991). Targeting of proteins to the outer envelope membrane uses a different pathway than transport into chloroplasts. *Plant Cell* **3**(7): 709-17.
- Li, L., Wang, X., Gai, J. y Yu, D.** (2007). Molecular cloning and characterization of a novel microsomal oleate desaturase gene from soybean. *Journal of Plant Physiology* **164**(11): 1516-1526.
- Li, L., Zhao, Y., McCaig, B. C., Wingerd, B. A., Wang, J., Whalon, M. E., Pichersky, E. y Howe, G. A.** (2004). The Tomato Homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 Is Required for the Maternal Control of Seed Maturation, Jasmonate-Signaled Defense Responses, and Glandular Trichome Development. *Plant Cell* **16**(1): 126–143.
- Lim, J. H., Chang, Y.-C., Park, Y. B., Park, J.-W. y Kwon, T. K.** (2004). Transcriptional repression of E2F gene by proteasome inhibitors in human osteosarcoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **318**(4): 868-872.
- Lindqvist, Y., Huang, W. J., Schneider, G. y Shanklin, J.** (1996). Cristal structure of a Δ^9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seeds and its relationship to other di-iron proteins. *EMBO Journal* **15**: 4081-4092.
- Livak, K. J. y Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**(4): 402-8.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sanchez-Serrano, J. J. y Solano, R.** (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* **15**(1): 165-178.

- Lorenzo, O., Chico, J. M., Sanchez-Serrano, J. J. y Solano, R.** (2004). JASMONATE-INSENSITIVE1 Encodes a MYC Transcription Factor Essential to Discriminate between Different Jasmonate-Regulated Defense Responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**(7): 1938-1950.
- Lorenzo, O. y Solano, R.** (2005). Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Current Opinion in Plant Biology* **8**(5): 532-540.
- Los, D. A., Horvath, I., Vigh, L. y Murata, N.** (1993). The temperature-dependent expression of the desaturase gene *desA* in *Synechocystis* PCC6803. *FEBS Letters* **318**: 57-60.
- Los, D. A. y Murata, N.** (2000). Regulation of Enzymatic Activity and Gene Expression by Membrane Fluidity. *Science Signaling. STKE* **2000**(62): pe1.
- Lu, B., Xu, C., Awai, K., Jones, A. D. y Benning, C.** (2007). A Small ATPase Protein of Arabidopsis, TGD3, Involved in Chloroplast Lipid Import. *Journal of Biological Chemistry* **282**(49): 35945-35953.
- Martin, B. A., Horn, M. E., Widholm, J. M. y Rinne, R. W.** (1984). Synthesis, composition and location of glycerolipids in photoautotrophic soybean cell cultures. *Biochimica et Biophysica Acta* **796**: 146-154.
- Martinez-Rivas, J. M., Sperling, P., Luhs, W. y Heinz, E.** (2001). Spatial and temporal regulation of three different microsomal oleate desaturase genes (FAD2) from normal-type and high-oleic varieties of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Molecular Breeding* **8**(2): 159-168.
- Martinez-Rivas, J. M., Sanchez-Garcia, A., Sicardo, M. D., Garcia-Diaz, M. T. y Mancha, M.** (2003). Oxygen-independent temperature regulation of the microsomal oleate desaturase (FAD2) activity in developing sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *Physiologia Plantarum* **117**(2): 179-185.
- Matsuda, O., Watanabe, C. y Iba, K.** (2001). Hormonal regulation of tissue-specific ectopic expression of an Arabidopsis endoplasmic reticulum-type omega-3 fatty acid desaturase (FAD3) gene. *Planta* **213**(6): 833-840.

- Matsuda, O., Sakamoto, H., Hashimoto, T. y Iba, K.** (2005). A temperature-sensitive mechanism that regulates post-transcriptional stability of a plastidial ω -3 fatty acid desaturase (FAD8) in Arabidopsis leaf tissues. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 3597-3604.
- Matsuda, O., Sakamoto, H., Nakao, Y., Oda, K. y Iba, K.** (2009). CTD phosphatases in the attenuation of wound-induced transcription of jasmonic acid biosynthetic genes in Arabidopsis. *Plant Journal* **57**(1): 96-108.
- Matsui, K.** (2006). Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* **9**(3): 274-280.
- McConn, M., Hugly, S., Browse, J. y Somerville, C.** (1994). A mutation at the *fad8* locus of Arabidopsis identifies a second chloroplast ω -3 desaturase. *Plant Physiology* **106**: 1609-1614.
- McConn, M. y Browse, J.** (1996). The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an Arabidopsis mutant. *Plant cell* **8**: 403-416.
- McConn, M. y Browse, J.** (1998). Polyunsaturated membranes are required for photosynthetic competence in a mutant of Arabidopsis. *Plant Journal* **15**(4): 521-530.
- McCormac, A. C. y Terry, M. J.** (2004). The nuclear genes Lhcb and HEMA1 are differentially sensitive to plastid signals and suggest distinct roles for the GUN1 and GUN5 plastid-signalling pathways during de-etiolation. *Plant Journal* **40**(5): 672-685.
- Melotto, M., Mecey, C., Niu, Y., Chung, H. S., Katsir, L., Yao, J., Zeng, W., Thines, B., Staswick, P., Browse, J., Howe, G. A. y He, S. Y.** (2008). A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of Arabidopsis JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucine-dependent interactions with the COI1 F-box protein. *Plant Journal* **55**: 979-988.

- Miquel, M. y Browse, J.** (1992). Arabidopsis mutants deficient in polyunsaturated fatty acid synthesis. Biochemical and genetic characterization of a plant oleoyl-phosphatidylcholine desaturase. *Journal of Biological Chemistry* **267**(3): 1502-1509.
- Miquel, M., James, D., Dooner, H. y Browse, J.** (1993). Arabidopsis requires polyunsaturated lipids for low-temperature survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**(13): 6208-6212.
- Miquel, M. y Browse, J.** (1998). Arabidopsis lipids: A fat chance. *Plant Physiology and Biochemistry* **36**: 187-197.
- Molina, A., Segura, A. y García-Olmedo, F.** (1993). Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS Letters* **316**(2): 119-122.
- Molina, A. y García-Olmedo, F.** (1997). Enhanced tolerance to bacterial pathogens caused by the transgenic expression of barley lipid transfer protein LTP2. *Plant Journal* **12**(3): 669-75.
- Monroy, A. F. y Dhindsa, R. S.** (1995). Low-temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25 °C. *Plant Cell* **7**(3): 321-331.
- Moon, B. Y., Higashi, S., Gombos, Z. y Murata, N.** (1995). Unsaturation of the membrane lipids of chloroplasts stabilizes the photosynthetic machinery against low-temperature photoinhibition in transgenic tobacco plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 6219-6223.
- Murakami, Y., Tsuyama, M., Kobayashi, Y., Kodama, H. y Iba, K.** (2000). Trienoic fatty acids and plant tolerance of high temperature. *Science* **287**(5452): 476 - 479.
- Murata, N., Sato, N., Takahashi, N. y Hamazaki, Y.** (1982). Compositions and Positional Distributions of Fatty Acids in Phospholipids from Leaves of Chilling-

- Sensitive and Chilling-Resistant Plants. *Plant and Cell Physiology* **23**(6): 1071-1079.
- Murata, N., Ishizaki-Nishizawa, O., Higashi, H., Yasaka, I. y Nishida, I.** (1992). Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants. *Nature* **356**(710-713).
- Murata, N. y Los, D. A.** (1997). Membrane Fluidity and Temperature Perception. *Plant Physiology* **115**(3): 875-879.
- Murata, N. y Los, D. A.** (2006). Histidine kinase Hik33 is an important participant in cold-signal transduction in cyanobacteria. *Physiologia Plantarum* **126**: 17-27.
- Murphy, D. J. y Piffanelli, P.** (1998). Fatty acid desaturases: structure, mechanism and regulation.
- Mustardy, L., Los, D. A., Gombos, Z. y Murata, N.** (1996). Immunocytochemical localization of acyl-lipid desaturases in cyanobacterial cells: evidence that both thylakoid membranes and cytoplasmic membranes are sites of lipid desaturation. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA* **93**: 10524-10527.
- Nagai, J. y Bloch, K.** (1968). Enzymatic Desaturation of Stearyl Acyl Carrier Protein. *Journal of Biological Chemistry* **243**(17): 4626-4633.
- Nishiuchi, T., Hadama, T., Kodama, H. y Iba, K.** (1997). Wounding changes the spatial expression pattern of the Arabidopsis plastid ω -3 fatty acid desaturase gene (*FAD7*) through different signal transduction pathways. *Plant Cell* **9**: 1701-1712.
- Nishiuchi, T. y Iba, K.** (1998). Roles of plastid ω -3 fatty acid desaturases in defense response of higher plants. *Journal of Plant Research* **111**(4): 481-486.
- Ohlrogge, J. B. y Browse, J.** (1995). Lipid biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 957-970.
- Okuley, J., Lightner, J., Feldmann, K., Yadav, N., Lark, E. y Browse, J.** (1994). Arabidopsis *FAD2* gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. *Plant Cell* **6**(1): 147 - 158.

- Örvar, B. L., Sangwan, V., Omann, F. y Dhindsa, R. S.** (2000). Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant Journal* **23**(6): 785-794.
- Parre, E., Ghars, M. A., Leprince, A. S., Thiery, L., Lefebvre, D., Bordenave, M., Richard, L., Mazars, C., Abdelly, C. y Savoure, A.** (2007). Calcium Signaling via Phospholipase C Is Essential for Proline Accumulation upon Ionic But Not Nonionic Hyperosmotic Stresses in Arabidopsis. *Plant Physiology* **144**(1): 503-512.
- Paschold, A., Halitschke, R. y Baldwin, I. T.** (2007). Co(i)-ordinating defenses: NaCOI1 mediates herbivore-induced resistance in *Nicotiana attenuata* and reveals the role of herbivore movement in avoiding defenses. *Plant Journal* **51**(1): 79-91.
- Peltier, J. B., Ytterberg, A. J., Sun, Q. y van Wijk, K. J.** (2004). New functions of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* revealed by a simple, fast and versatile fractionation strategy. *Journal of Biological Chemistry* **279**(47): 49367-49383.
- Penninckx, I. A. M. A., Thomma, B. P. H. J., Buchala, A., Metraux, J.-P. y Broekaert, W. F.** (1998). Concomitant Activation of Jasmonate and Ethylene Response Pathways Is Required for Induction of a Plant Defensin Gene in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**(12): 2103-2114.
- Piffanelli, P., Ross, J. H. E. y Murphy, D. J.** (1997). Intra- and extracellular lipid composition and associated gene expression patterns during pollen development in *Brassica napus*. *Plant Journal* **11**: 549-562.
- Podkowinski, J., Jelenska, J., Sirikhachornkit, A., Zuther, E., Haselkorn, R. y Gornicki, P.** (2003). Expression of Cytosolic and Plastid Acetyl-Coenzyme A Carboxylase Genes in Young Wheat Plants. *Plant Physiology* **131**(2): 763-772.
- Poghosyan, Z. P., Haralampidis, K., Martsinkovskaya, A. I., Murphy, D. J. y Hatzopoulos, P.** (1999). Developmental regulation and spatial expression of a

- plastidial fatty acid desaturase from *Olea europaea*. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**(2): 109-119.
- Rawsthorne, S.** (2002). Carbon flux and fatty acid synthesis in plants. *Progress in Lipid Research* **41**(2): 182-196.
- Reddy, A. S. N.** (2007). Alternative Splicing of Pre-Messenger RNAs in Plants in the Genomic Era. *Annual Review of Plant Biology* **58**(1): 267-294.
- Ribot, C., Zimmerli, C., Farmer, E. E., Reymond, P. y Poirier, Y.** (2008). Induction of the Arabidopsis PHO1;H10 Gene by 12-Oxo-Phytodienoic Acid But Not Jasmonic Acid via a CORONATINE INSENSITIVE1-Dependent Pathway. *Plant Physiology* **147**(2): 696-706.
- Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S. y Mittler, R.** (2004). When Defense Pathways Collide. The Response of Arabidopsis to a Combination of Drought and Heat Stress. *Plant Physiology* **134**(4): 1683-1696.
- Rogers, S. M. D., Ogren, W. L. y Widholm, J. M.** (1987). Photosynthetic characteristics of a photoautotrophic cell suspension culture of soybean. *Plant Physiology* **84**: 1451-1456.
- Rolletschek, H., Borisjuk, L., Sanchez-Garcia, A., Gotor, C., Romero, L. C., Martinez-Rivas, J. M. y Mancha, M.** (2007). Temperature-dependent endogenous oxygen concentration regulates microsomal oleate desaturase in developing sunflower seeds. *Journal of Experimental Botany*: erm154.
- Romeis, T.** (2001). Protein kinases in the plant defence response. *Current Opinion in Plant Biology* **4**(5): 407-414.
- Saeed, A. I., Bhagabati, N. K., Braisted, J. C., Liang, W., Sharov, V., Howe, E. A., Li, J., Thiagarajan, M., White, J. A., Quackenbush, J., Alan, K. y Brian, O.** (2006). TM4 Microarray Software Suite. *Methods in Enzymology*. **411**: 134-193.
- Sakamoto, T. y Bryant, D. A.** (1997). Temperature-regulated mRNA accumulation and stabilization for fatty acid desaturase genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *Molecular Microbiology* **23**(6): 1281-1292.

- Sakamoto, T. y Murata, N.** (2002). Regulation of the desaturation of fatty acids and its role in tolerance to cold and salt stress. *Current Opinion in Microbiology* **5**(2): 206-210.
- Sánchez-García, A., Mancha, M., Heinz, E. y Martínez-Rivas, J. M.** (2004). Differential temperature regulation of three sunflower microsomal oleate desaturase (FAD2) isoforms overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Lipid Science and Technology* **106**(9): 583-590.
- Santner, A. y Estelle, M.** (2007). The JAZ Proteins Link Jasmonate Perception with Transcriptional Changes. *Plant Cell* **19**(12): 3839-3842.
- Sasaki, Y. y Nagano, Y.** (2004). Plant acetyl-CoA carboxylase: structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **68**(6): 1175-84.
- Schaller, A. y Stintzi, A.** (2009). Enzymes in jasmonate biosynthesis - Structure, function, regulation. *Phytochemistry* **70**(13-14): 1532-1538.
- Schaller, F., Schaller, A. y Stintzi, A.** (2005). Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *Journal of Plant Growth Regulation* **23**: 179-199.
- Schmidt, H. y Heinz, E.** (1990). Desaturation of oleoyl groups in envelope membranes from spinach chloroplasts. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA* **87**: 9477-9480.
- Schmutz, J., Cannon, S. B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., Hyten, D. L., Song, Q., Thelen, J. J., Cheng, J., Xu, D., Hellsten, U., May, G. D., Yu, Y., Sakurai, T., Umezawa, T., Bhattacharyya, M. K., Sandhu, D., Valliyodan, B., Lindquist, E., Peto, M., Grant, D., Shu, S., Goodstein, D., Barry, K., Futrell-Griggs, M., Abernathy, B., Du, J., Tian, Z., Zhu, L., Gill, N., Joshi, T., Libault, M., Sethuraman, A., Zhang, X. C., Shinozaki, K., Nguyen, H. T., Wing, R. A., Cregan, P., Specht, J., Grimwood, J., Rokhsar, D., Stacey, G., Shoemaker, R. C. y Jackson, S. A.** (2010). Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* **463**(7278): 178-183.

- Schneider, J. C., Nielsen, E. y Somerville, C.** (1995). A chilling-sensitive mutant of *Arabidopsis* is deficient in chloroplast protein accumulation at low temperature. *Plant, Cell and Environment* **18**: 23-32.
- Schultz, D. J., Cahoon, E. B., Shanklin, J., Craig, R., Cox-Foster, D. L., Mumma, R. O. y Medford, J. I.** (1996). Expression of Δ^9 14:0 - acyl carrier protein fatty acid desaturase gene is necessary for the production of ω 5 anacardic acids found in pest-resistant geranium (*Pelargonium xhortorum*). *Proceedings of the National Academic of Sciences USA* **93**(16): 8771-8775.
- Schwender, J. y Ohlrogge, J. B.** (2002). Probing in vivo metabolism by stable isotope labeling of storage lipids and proteins in developing *Brassica napus* embryos. *Plant Physiology* **130**: 347-361.
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B. M. A., Cammue, B. P. A. y De Bolle, M. F. C.** (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**(11): 941-950.
- Shanklin, J., Whittle, E. y Fox, B. G.** (1994). Eight Histidine Residues Are Catalytically Essential in a Membrane-Associated Iron Enzyme, Stearoyl-CoA Desaturase, and Are Conserved in Alkane Hydroxylase and Xylene Monooxygenase. *Biochemistry* **33**(43): 12787-12794.
- Shanklin, J. y Cahoon, E. B.** (1998). Desaturation and related modifications of fatty acid. *Annual Review of Plant Physiology And Plant Molecular Biology* **49**: 611-641.
- Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **3**(3): 217-223.
- Shoemaker, R. C., Polzin, K., Labate, J., Specht, J., Brummer, E. C., Olson, T., Young, N., Concibido, V., Wilcox, J., Tamulonis, J. P., Kochert, G. y Boerma, H. R.** (1996). Genome Duplication in Soybean (Glycine subgenus soja). *Genetics* **144**(1): 329-338.

- Slabas, A. R. y Smith, C. G.** (1988). Immunogold localization of acyl carrier protein in plants and *Escherichia coli*: Evidence for membrane association in plants. *Planta* **175**: 145-152.
- Slocombe, S. P., Piffanelli, P., Fairbairn, D., Bowra, S., Hatzopoulus, P., Tsiantis, M. y Murphy, D. J.** (1994). Temporal and tissue-specific regulation of a *Brassica napus* stearyl-acyl carrier protein desaturase gene. *Plant Physiology* **104**(1167-1176).
- Sludge, S., Pirdashti, H., Bahmanyar, M. A. y Abbasian, A.** (2008). Leaf and seed micronutrient accumulation in soybean cultivars in response to integrated organic and chemical fertilizers application. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **11**: 1227-1233.
- Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q. y Ecker, J. R.** (1998). Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes & Development* **12**(23): 3703-3714.
- Solís, M. T., Pintos, B., Prado, M. J., Bueno, M. A., Raska, I., Risueño, M. C. y Testillano, P. S.** (2008). Early markers of in vitro microspore reprogramming to embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.). *Plant Science* **174**: 597-605.
- Somerville, C., Browse, J., Jaworski, J. G. y Ohlrogge, J. B.** (2000). Lipids, American society of Plant Physiologist.
- Sperling, P. y Heinz, E.** (2003). Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular & Cell Biology of Lipids* **10**: 1-2.
- Staswick, P. E., Su, W. y Howell, S. H.** (1992). Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proceedings of the National Academic of Science USA* **89**(15): 6837–6840.

- Staswick, P. E., Tiryaki, I. y Rowe, M. L.** (2002). Jasmonate Response Locus JAR1 and Several Related Arabidopsis Genes Encode Enzymes of the Firefly Luciferase Superfamily That Show Activity on Jasmonic, Salicylic, and Indole-3-Acetic Acids in an Assay for Adenylation. *Plant Cell* **14**(6): 1405-1415.
- Staswick, P. E. y Tiryaki, I.** (2004). The Oxylin Signal Jasmonic Acid Is Activated by an Enzyme That Conjugates It to Isoleucine in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**(8): 2117-2127.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J. y Farmer, E. E.** (2001). Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(22): 12837-12842.
- Sullivan, J. A. y Gray, J. C.** (2002). Multiple plastid signals regulate the expression of the pea plastocyanin gene in pea and transgenic tobacco plants. *Plant Journal* **32**(5): 763-774.
- Susek, R. E., Ausubel, S. M. y Chory, J.** (1993). Signal transduction mutants of Arabidopsis uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development. *Cell* **74**: 787-799.
- Suza, W. y Staswick, P.** (2008). The role of JAR1 in Jasmonoyl-L-isoleucine production during Arabidopsis wound response. *Planta* **227**(6): 1221-1232.
- Suzuki, I., Los, D. A., Kanesaki, Y., Mikami, K. y Murata, N.** (2000). The pathway for perception and transduction of low-temperature signals in *Synechocystis*. *EMBO Journal* **19**: 1327-1334.
- Tai, H., Williams, M., Iyengar, A., Yeates, J. y Beardmore, T.** (2007). Regulation of the β -hydroxyacyl ACP dehydratase gene of *Picea mariana* by alternative splicing. *Plant Cell Reports* **26**(1): 105-113.
- Taki, N., Sasaki-Sekimoto, Y., Obayashi, T., Kikuta, A., Kobayashi, K., Aina, T., Yagi, K., Sakurai, N., Suzuki, H., Masuda, T., Takamiya, K. I., Shibata, D., Kobayashi, Y. y Ohta, H.** (2005). 12-Oxo-Phytodienoic Acid Triggers

- Expression of a Distinct Set of Genes and Plays a Role in Wound-Induced Gene Expression in Arabidopsis. *Plant Physiology* **139**(3): 1268-1283.
- Tang, G., Novitzky, W., Griffin, H., Huber, S. y Dewey, R.** (2005). Oleate desaturase enzymes of soybean: evidence of regulation through differential stability and phosphorylation. *Plant Journal* **44**: 433-446.
- Tasma, I. M., Brendel, V., Whitham, S. A. y Bhattacharyya, M. K.** (2008). Expression and evolution of the phosphoinositide-specific phospholipase C gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**(7): 627-637.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S. Y., Howe, G. A. y Browse, J.** (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{CO1} complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**(7154): 661-665.
- Thomashow, M. F.** (1999). PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology And Plant Molecular Biology* **50**(1): 571-599.
- Todoroki, S., Hayashi, T., Nagata, T., Kanegae, H., Mori, M., Kikuchi, S. y** (1998). cDNA cloning of gamma-ray inducible genes encoding ω -3 fatty acid desaturase from potato tuber. *Plant Cell Physiology* **39**: S136.
- Torres-Franklin, M. L., Repellin, A., Huynh, V. B., d'Arcy-Lameta, A., Zuily-Fodil, Y. y Pham-Thi, A. T.** (2009). Omega-3 fatty acid desaturase (*FAD3*, *FAD7*, *FAD8*) gene expression and linolenic acid content in cowpea leaves submitted to drought and after rehydration. *Environmental and Experimental Botany* **65**(2-3): 162-169.
- Turner, J. G., Ellis, C. y Devoto, A.** (2002). The Jasmonate Signal Pathway. *Plant Cell* **14**(90001): S153-164.
- van Wijk, K. J., Bingsmark, S., Aro, E.-M. y Andersson, B.** (1995). *In vitro* synthesis and assembly of photosystem II core proteins. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 25685-25695.

- Velazhahan, R., Radhajeyalakshmi, R., Thangavelu, R. y Muthukrishnan, S.** (2001). An Antifungal Protein Purified from Pearl Millet Seeds Shows Sequence Homology to Lipid Transfer Proteins. *Biologia Plantarum* **44**(3): 417-421.
- Vick, B. A. y Zimmermann, D. C.** (1979). Distribution of a Fatty Acid Cyclase Enzyme System in Plants. *Plant Physiology* **64**(2): 203-205.
- Vick, B. A. y Zimmerman, D. C.** (1984). Biosynthesis of Jasmonic Acid by Several Plant Species. *Plant Physiology* **75**(2): 458-461.
- Vigh, L., Los, D., Horvath, 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. *Proceedings of The National Academic of Sciences USA* **90**: 9090-9094.
- Vignols, F., Wigger, M., García-Garrido, J. M., Grellet, F., Kader, J. C. y Delseny, M.** (1997). Rice lipid transfer protein (LTP) genes belong to a complex multigene family and are differentially regulated. *Gene* **195**(2): 177-186.
- Viswanathan, C., Jianhua, Z. y Jian-Kang, Z.** (2006). Gene regulation during cold acclimation in plants. *Physiologia Plantarum* **126**(1): 52-61.
- von Wettstein, D.** (2001). Discovery of a protein required for photosynthetic membrane assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(7): 3633-3635.
- Wallis, J. G. y Browse, J.** (2002). Mutants of Arabidopsis reveal many roles for membrane lipids. *Progress in Lipid Research* **41**(3): 254-278.
- Wang, B. B. y Brendel, V.** (2006). Genomewide comparative analysis of alternative splicing in plants. *PNAS* **103**(18): 7175-7180.
- Wang, Z., Dai, L., Jiang, Z., Peng, W., Zhang, L., Wang, G. y Xie, D.** (2005). *GmCOI1*, a Soybean F-Box Protein Gene, Shows Ability to Mediate Jasmonate-Regulated Plant Defense and Fertility in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**(12): 1285-1295.

- Wasternack, C.** (2007). Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. *Annals of Botany* **100**(4): 681-697.
- Weber, H., Vick, B. A. y Farmer, E. E.** (1997). Dinor-oxo-phytodienoic acid: A new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(19): 10473-10478.
- Westphal, S., Heins, L., Soll, J. r. y Vothknecht, U. C.** (2001a). Vipp1 deletion mutant of *Synechocystis*: A connection between bacterial phage shock and thylakoid biogenesis? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(7): 4243-4248.
- Westphal, S., Soll, J. y Vothknecht, U. C.** (2001b). A vesicle transport system inside chloroplasts. *FEBS Letters* **506**(3): 257-261.
- Wilson, C. J., Apiyo, D. y Wittung-Stafshede, P.** (2004). Role of cofactors in metalloprotein folding. *Quarterly Reviews of Biophysics* **37**(3-4): 285-314.
- Williams, J. P., Imperial, V., Khan, M. U. y Hodson, J. N.** (2000). The role of phosphatidylcholine in fatty acid exchange and desaturation in *Brassica napus* L. leaves. *Biochemical Journal* **349**(1): 127-133.
- Wolter, F. P., Schmidt, R. y Heinz, E.** (1992). Chilling sensitivity of *Arabidopsis thaliana* with genetically engineered membrane lipids. *EMBO Journal* **11**(4685-4692).
- Woodson, J. D. y Chory, J.** (2008). Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nature Reviews Genetics* **9**(5): 383-395.
- Wu, J. y Browse, J.** (1995). Elevated levels of high-melting-point phosphatidylglycerols do not induce chilling sensitivity in an *Arabidopsis* mutant. *Plant Cell* **7**: 17-27.
- Xie, D. X., Feys, B. F., James, S., Nieto-Rostro, M. y Turner, J. G.** (1998). COI1: An *Arabidopsis* Gene Required for Jasmonate-Regulated Defense and Fertility. *Science* **280**(5366): 1091-1094.

- Xu, C., Fan, J., Froehlich, J. E., Awai, K. y Benning, C.** (2005). Mutation of the TGD1 Chloroplast Envelope Protein Affects Phosphatidate Metabolism in Arabidopsis. *Plant Cell* **17**(11): 3094-3110.
- Xu, C., Fan, J., Cornish, A. J. y Benning, C.** (2008). Lipid Trafficking between the Endoplasmic Reticulum and the Plastid in Arabidopsis Requires the Extrplastidic TGD4 Protein. *Plant Cell* **20**(8): 2190-2204.
- Xu, C. C., Fan, J. L., Riekhof, W., Froehlich, J. E. y Benning, C.** (2003). A permease-like protein involved in ER to thylakoid lipid transfer in Arabidopsis. *EMBO Journal* **22**(10): 2370-2379.
- Xu, L., Liu, F., Lechner, E., Genschik, P., Crosby, W. L., Ma, H., Peng, W., Huang, D. y Xie, D.** (2002). The SCF^{COI1} Ubiquitin-Ligase Complexes Are Required for Jasmonate Response in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**(8): 1919-1935.
- Yadav, N. S., Wierzbicki, A., Aegerter, M., Caster, C. S., Pérez-Grau, L., Kinney, A. J., Hitz, W. D., Russell Booth, J., Schweiger, B., Stecca, K. L., Allen, S. M., Blackwell, M., Reiter, R. S., Carlson, T. J., Russell, S. H., Feldmann, K. A., Pierce, J. y Browse, J.** (1993). Cloning of higher plant omega-3 fatty acid desaturases. *Plant Physiology* **103**: 467-476.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K.** (2005). Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends in Plant Science* **10**(2): 88-94.
- Yamamoto, K. T., Mori, H. y Imaseki, H.** (1992). Novel mRNA Sequences Induced by Indole-3-Acetic Acid in Sections of Elongating Hypocotyls of Mung Bean (*Vigna radiata*). *Plant and Cell Physiology* **33**(1): 13-20.
- Yamamoto, K. T.** (1994). Further characterization of auxin-regulated mRNAs in hypocotyl sections of mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]: sequence homology to genes for fatty acid desaturases and atypical late-embryogenesis-abundant protein, and the mode of expression of the mRNAs. *Planta* **192**: 359-364.

- Yoshida, S.** (1984). Chemical and Biophysical Changes in the Plasma Membrane during Cold Acclimation of Mulberry Bark Cells (*Morus bombycis* Koidz. cv Goroji). *Plant Physiology* **76**(1): 257-265.
- Young, N. D., Mudge, J. y Ellis, T. H. N.** (2003). Legume genomes: more than peas in a pod. *Current Opinion in Plant Biology* **6**(2): 199-204.
- Zheng, P., Allen, W. B., Roesler, K., Williams, M. E., Zhang, S., Li, J., Glassman, K., Ranch, J., Nubel, D., Solawetz, W., Bhatramakki, D., Llaca, V., Deschamps, S., Zhong, G. Y., Tarczynski, M. C. y Shen, B.** (2008). A phenylalanine in DGAT is a key determinant of oil content and composition in maize. *Nature Genetics* **40**(3): 367-372.
- Zou, J., Abrams, G. D., Barton, D. L., Taylor, D. C., Pomeroy, M. K. y Abrams, S. R.** (1995). Induction of Lipid and Oleosin Biosynthesis by (+)-Abscisic Acid and Its Metabolites in Microspore-Derived Embryos of *Brassica napus* L.cv Reston. *Plant Physiology* **108**(2): 563–571.



Publicaciones

8. ANEXO: PUBLICACIONES

8.1. PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS DOCTORAL

Andreu, V., Collados, R., Testillano, P. S., Risueño, M. C., Picorel, R. y Alfonso, M. (2007). In situ molecular identification of the plastid omega3 fatty acid desaturase FAD7 from soybean: evidence of thylakoid membrane localization. *Plant Physiology* 145(4): 1336-44.

Andreu, V., Lagunas, B., Collados, R., Picorel, R. y Alfonso, M. (2010). The GmFAD7 gene family from soybean: identification of novel genes and tissue specific conformations of the FAD7 enzymes involved in desaturase activity. *Journal of Experimental Botany*. 10.1093/jxb/erq158. En prensa.

Andreu, V., Lagunas, B., Picorel, R. y Alfonso, M. Transcriptome analysis of fatty acid desaturase mutants reveals specific dinor-oxo-phytodienoic acid (dn-OPDA) regulated genes in Arabidopsis. En preparación.

8.2. OTRAS PUBLICACIONES

Collados, R., **Andreu, V.**, Picorel, R. y Alfonso, M. (2006) A light sensitive mechanism differently regulates transcription and transcript stability of omega3 fatty acid desaturases (FAD3, FAD7 and FAD8) in soybean photosynthetic cell suspensions. *FEBS Letters* 580 (20): 4934-40

