

Angel Soria García

Caracterización de los elementos
reguladores de la respuesta
transcripcional y traduccional de
las omega-3 desaturasas
plastidiales FAD7 y FD8 frente a
estímulos ambientales y
hormonales en Arabidopsis

Departamento

Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Director/es

ALFONSO LOZANO, MIGUEL

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctora

**CARACTERIZACIÓN DE LOS
ELEMENTOS REGULADORES DE LA
RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL Y
TRADUCCIONAL DE LAS OMEGA-3
DESATURASAS PLASTIDIALES FAD7**

Autor

Angel Soria García

Director/es

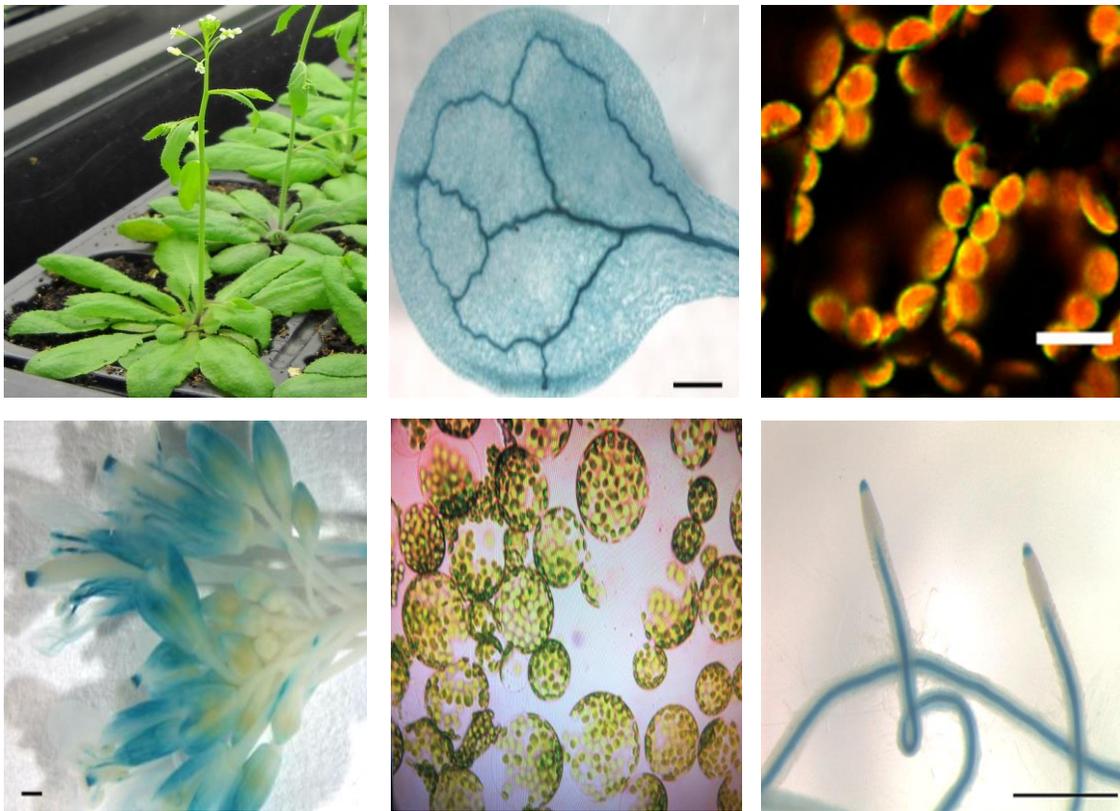
ALFONSO LOZANO, MIGUEL

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2017

Caracterización de los elementos reguladores de la respuesta transcripcional y traduccional de las omega-3 desaturasas plastidiales FAD7 y FAD8 frente a estímulos ambientales y hormonales en *Arabidopsis thaliana*



TESIS DOCTORAL
Ángel Soria García



Universidad
Zaragoza

2017



CSIC





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

CERTIFICA:

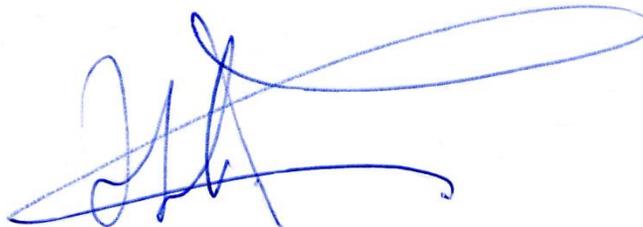
Que la Tesis Doctoral titulada: “*Caracterización de los elementos reguladores de la respuesta transcripcional y traduccional de las omega-3 desaturadas plastidiales FAD7 y FAD8 frente a estímulos ambientales y hormonales en Arabidopsis thaliana*”, ha sido realizada por D. ÁNGEL SORIA GARCÍA, licenciado en Biotecnología, en el Departamento de Nutrición Vegetal de la Estación Experimental de Aula Dei (CSIC) bajo mi dirección.

Que la memoria presentada por D. Ángel SORIA se corresponde íntegramente con los objetivos del proyecto de Tesis aprobado por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza. Este trabajo se ha centrado en el estudio de los mecanismos de regulación de las dos omega-3 desaturadas del cloroplasto, FAD7 y FAD8 en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Concretamente se ha llevado a cabo un estudio detallado del promotor de ambos genes con el objetivo de identificar elementos reguladores en su secuencia y factores de transcripción responsables de la expresión de ambos genes (*AtFAD7* y *AtFAD8*) en los diferentes tejidos de la planta, así como de su respuesta frente a estreses ambientales tales como la temperatura, la herida o diferentes tratamientos hormonales. Como hitos destacables del trabajo realizado por D. Ángel Soria cabe destacar la identificación de factores de transcripción de tipo WRKY como los responsables del alto nivel de expresión basal del gen *AtFAD7* en hojas. Del mismo modo, se han identificado factores de transcripción de la familia MYB como los responsables de la respuesta específica a la herida del gen *AtFAD7* en un mecanismo independiente de la hormona jasmónico. Del mismo modo, la respuesta a jasmónico pero no a la herida del gen *AtFAD8* también parece estar controlada por factores de transcripción de tipo MYB. Otro resultado muy relevante es el obtenido en el estudio de la respuesta al frío de ambos genes. Concretamente, se ha identificado al factor de transcripción ICE1 como el responsable de la inducción por frío de *AtFAD8*. Este resultado significa que *AtFAD8* pertenece a la misma cascada de respuesta al frío en la que se encuentran otras proteínas de estrés como algunas dehidrinas (RD29A o COR15A). La identificación de estos factores de transcripción ha proporcionado la primera imagen de la regulación coordinada de ambas enzimas y la interacción entre las diferentes rutas de señalización hormonales y de estrés para mantener la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados en plantas.

Otra parte importante del trabajo realizado en esta Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio de la abundancia relativa de ambas enzimas en los tejidos de la planta y su organización en las membranas del cloroplasto. El análisis de líneas transgénicas de Arabidopsis que expresaban ambas proteínas FAD7 y FAD8 fusionadas a GFP bajo el control de sus promotores endógenos nos ha permitido ver que la omega-3 desaturasa plastidial FAD7 es la más abundante en las hojas y en las raíces de la planta. El análisis mediante complementación molecular de fluorescencia ha permitido ver que ambas omega-3 desaturasas interaccionan con la omega-6 desaturasa FAD6, pero no entre sí. Estos datos sugieren que estas enzimas se disponen en la membrana bajo algún tipo de estructura cuaternaria, formando complejos multienzimáticos que serían los responsables de la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados en plantas.

Que esta Tesis Doctoral reúne, a mi juicio, las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor en Ciencias.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el siguiente informe en Zaragoza, a veinte de septiembre de dos mil diecisiete.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Fdo. Dr. Miguel ALFONSO LOZANO

Científico Titular CSIC

1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 LÍPIDOS Y MEMBRANAS VEGETALES	13
1.1.1 Estructura de los lípidos.....	13
1.1.2 Clasificación de los lípidos	17
1.1.3 Lípidos de membrana.....	18
1.1.3.1 Membranas extraplastidiales	21
1.1.3.2 Membranas plastidiales	23
1.2 METABOLISMO LÍPIDICO VEGETAL.....	27
1.2.1 Síntesis de ácidos grasos.....	27
1.2.2 Síntesis de lípidos de membrana.....	29
1.2.2.1 Ruta procariota	32
1.2.2.2 Ruta eucariota.....	33
1.2.2.3 Transporte de lípidos entre membranas.....	35
1.2.3 Ácidos grasos como precursores en la síntesis de jasmonatos.....	36
1.3 DESATURASAS DE ÁCIDOS GRASOS	40
1.3.1 Desaturasas en <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
1.3.1.1 Estructura de los genes de las ω 3 desaturasas	41
1.3.1.2 Estructura tridimensional las ω 3 desaturasas y reacción de desaturación.....	42
1.3.2 Función y regulación de las ω 3 desaturasas plastidiales.....	46
1.3.2.1 Efecto de la herida en las ω 3 desaturasas.....	48
1.3.2.2 Efecto de la temperatura en las ω 3 desaturasas.....	49
1.3.3 Localización, distribución y organización de las ω 3 desaturasas en la membrana.....	52
2. OBJETIVOS	55
3. MATERIALES Y MÉTODOS	59
3.1 MATERIAL VEGETAL	61
3.1.1 Especies vegetales utilizadas	61
3.1.2 Cultivo en placa de <i>Arabidopsis thaliana</i>	63
3.1.3 Crecimiento de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> en maceta	64
3.1.4 Propagación, obtención y almacenamiento de semillas	65
3.1.5 Tratamientos experimentales sobre cultivos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	66
3.1.5.1 Herida.....	66
3.1.5.2 Bajas temperaturas	67

3.1.5.3	Ciclos luz / oscuridad	67
3.1.5.4	Tratamientos hormonales	67
3.2	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	69
3.2.1	Identificación y análisis <i>in silico</i> de promotores.....	69
3.3	ÁCIDOS NUCLEICOS	70
3.3.1	Extracción de DNA genómico	70
3.3.2	Extracción de DNA plasmídico	71
3.3.3	Extracción de RNA total.....	71
3.3.4	Síntesis de cDNA	72
3.3.5	Técnicas de PCR.....	73
3.3.5.1	PCR semicuantitativa	74
3.3.5.2	PCR en colonia.....	75
3.3.5.3	PCR de genotipado y caracterización genética de mutantes de Arabidopsis	75
3.3.5.4	PCR en tiempo real	77
3.3.5.5	Diseño y listado de cebadores para PCR.....	78
3.3.6	Determinación de la concentración de ácidos nucleicos.....	80
3.3.7	Electroforesis de ácidos nucleicos	80
3.3.8	Extracción y purificación de ácidos nucleicos en geles de electroforesis.....	81
3.3.9	Digestión con enzimas de restricción.....	81
3.3.10	Secuenciación de ácidos nucleicos	82
3.3.11	Clonaje de productos amplificados por PCR	82
3.3.11.1	Generación de los constructos promotor::GUS.....	84
3.3.11.2	Generación de constructos promotor::gen-GFP	87
3.3.11.3	Generación de constructos para BIFC.....	93
3.3.11.4	Cultivos bacterianos de <i>Escherichia coli</i>	95
3.3.11.4.1	Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	96
3.3.11.4.2	Transformación de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	97
3.3.11.5	Conservación de las construcciones génicas	97
3.4	OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS.....	98
3.4.1	Cultivos bacterianos de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	98
3.4.1.1	Preparación de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	98
3.4.1.2	Transformación de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	98

3.4.2	Transformación estable de <i>Arabidopsis thaliana</i>	99
3.4.3	Selección y segregación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> transformadas	100
3.5	TÉCNICAS HISTOLÓGICAS.....	102
3.5.1	Tinción histoquímica GUS	102
3.5.2	Análisis fluorimétrico GUS	103
3.6	ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE COMPLEMENTACIÓN BIOMOLECULAR DE FLUORESCENCIA.....	104
3.6.1	Obtención y purificación de protoplastos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	105
3.6.2	Transformación de protoplastos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	107
3.7	MICROSCOPIA CONFOCAL Y DE FLUORESCENCIA.....	108
3.8	TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS	109
3.8.1	Western Blot	109
3.8.1.1	Preparación de extractos crudos de proteínas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	109
3.8.1.2	Cuantificación de proteínas	110
3.8.1.3	Preparación de geles de poliacrilamida	110
3.8.1.5	Transferencia de proteínas a membrana.....	112
3.8.1.6	Detección inmunológica de proteínas	113
3.9	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	114
4.	RESULTADOS.....	115
4.1	IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS REGULADORAS Y FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES <i>AtFAD7</i> Y <i>AtFAD8</i>	117
4.1.1	Análisis <i>in silico</i> de los promotores de los genes <i>AtFAD7</i> y <i>AtFAD8</i>	117
3.1.2	Análisis funcional de los promotores de los genes <i>AtFAD7</i> y <i>AtFAD8</i> en tejidos fotosintéticos	121
4.1.2.1	La luz ejerce un fuerte control transcripcional del gen <i>AtFAD7</i> en hojas.....	123
3.1.3	Análisis funcional de los promotores de los genes <i>AtFAD7</i> y <i>AtFAD8</i> en tejidos no fotosintéticos	124
3.1.4	Disección del promotor del gen <i>AtFAD7</i>	128
4.1.4.1	Identificación de elementos reguladores implicados en el patrón de expresión tisular de <i>AtFAD7</i>	128
4.2.4.2	Identificación de elementos reguladores implicados en la respuesta a la herida de <i>AtFAD7</i>	132
3.1.5	Disección del promotor del gen <i>AtFAD8</i>	136

4.1.5.1	Identificación de elementos reguladores implicados en el patrón de expresión tisular de <i>AtFAD8</i>	136
4.1.5.2	Identificación de elementos reguladores implicados en la respuesta a las bajas temperaturas de <i>AtFAD8</i>	140
3.1.6	Análisis de la actividad de los promotores de <i>AtFAD7</i> y <i>AtFAD8</i> en respuesta a hormonas.....	144
4.1.6.1	Estudio del efecto del jasmonato y el ácido abscísico en la regulación de los genes <i>AtFAD7</i> y <i>AtFAD8</i>	144
4.1.6.2	Identificación de elementos reguladores responsables de la respuesta específica a hormonas de los genes <i>AtFAD7</i> y <i>AtFAD8</i>	148
4.2	ESTUDIO DE LA ABUNDANCIA RELATIVA Y DE LA DISTRIBUCIÓN Y LA ORGANIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS <i>AtFAD7</i> Y <i>AtFAD8</i> EN LAS MEMBRANAS PLASTIDIALES.....	151
4.2.1	Análisis de la abundancia relativa de las proteínas <i>AtFAD7</i> y <i>AtFAD8</i> en diferentes tejidos	151
4.2.2	Análisis de la abundancia relativa de las proteínas <i>AtFAD7</i> y <i>AtFAD8</i> en respuesta a estímulos ambientales.....	156
4.2.3	Estudio de interacción entre las ω 3 desaturasas plastidiales <i>AtFAD7</i> y <i>AtFAD8</i> y con la ω 6 desaturasa plastidial <i>AtFAD6</i>	158

5. DISCUSIÓN.....161

5.1	IDENTIFICACIÓN DE LOS ELEMENTOS REGULADORES EN <i>CIS</i> IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES QUE CODIFICAN LAS ω3 DESATURASAS PLASTIDIALES <i>AtFAD7</i> Y <i>AtFAD8</i>.....	163
5.1.1	<i>AtFAD7</i> es la ω 3 desaturasa más expresada en hojas	164
5.1.2	Las ω 3 desaturasas plastidiales se expresan en tejidos no fotosintéticos.....	165
5.1.3	Elementos reguladores en <i>cis</i> de tipo WRKY intervienen en el mantenimiento de la expresión basal del gen <i>AtFAD7</i> en hojas.....	167
5.1.4	Elementos reguladores en <i>cis</i> de tipo MYB regulan la expresión de las ω 3 desaturasas plastidiales en procesos relacionados con la herida y el JA.....	169
5.1.5	El factor de transcripción ICE1 interviene en la regulación de la respuesta del gen <i>AtFAD8</i> a las bajas temperaturas	171
5.1.6	Los genes <i>AtFAD7</i> y <i>AtFAD8</i> presentan una respuesta diferencial y coordinada a la herida y a las bajas temperaturas.....	173
5.2	ESTUDIO DE LA ABUNDANCIA RELATIVA Y ORGANIZACIÓN EN LA MEMBRANA DE LAS ω3 DESATURASAS PLASTIDIALES	178
5.2.1	<i>AtFAD7</i> es la principal ω 3 desaturasa en <i>Arabidopsis</i>	178

5.2.2	El estudio de la interacción entre las $\omega 3$ y $\omega 6$ desaturasas plastidiales sugiere la existencia de complejos cuaternarios	180
6.	CONCLUSIONES	183
7.	BIBLIOGRAFÍA	189

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LÍPIDOS Y MEMBRANAS VEGETALES

1.1.1 Estructura de los lípidos

Los lípidos son un grupo química y estructuralmente heterogéneo de moléculas orgánicas cuya principal característica es la insolubilidad en soluciones acuosas. Están compuestos básicamente por moléculas de carbono, hidrógeno y en menor medida oxígeno, aunque algunas clases de lípidos también pueden contener fósforo, nitrógeno y azufre (Somerville et al., 2000). Los lípidos son un componente esencial de las células vegetales al constituir entre el 5-10% de su peso seco, casi todo como parte de las membranas celulares (Ohlrogge y Browse, 1995).

Los ácidos grasos son los lípidos más sencillos y los principales constituyentes de buena parte de los lípidos. Están formados por largas cadenas hidrocarbonadas de tipo alifático y longitud variable, en cuyo extremo se encuentra un grupo carboxilo. La longitud de la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos oscila entre 4 y 36 átomos de carbono, pero en plantas, los más comunes son los que presentan 16 o 18 átomos de carbono. Cada átomo de carbono está unido a los carbonos colindantes mediante un enlace covalente simple o doble. Los ácidos grasos que no presentan dobles enlaces se denominan saturados (SFAs), mientras los que presentan dobles enlaces se denominan insaturados (UFAs) y éstos a su vez, se denominan respectivamente mono o poliinsaturados (MUFAs o PUFAs) en función de si presentan uno o varios dobles enlaces. Dentro de los ácidos grasos poliinsaturados, los más comunes en plantas son los que presentan dos o tres dobles enlaces, conocidos como ácidos grasos dienoicos y trienoicos respectivamente. Los dobles enlaces presentan isomería en función de si la cadena hidrocarbonada se encuentra en el mismo lado (conformación *cis*) o en lados diferentes (conformación *trans*) del doble enlace. El doble enlace con conformación *cis* genera un ángulo, permitiendo que los ácidos grasos insaturados *cis* presenten pliegues en su estructura, a diferencia de los ácidos grasos saturados e insaturados *trans* que presentan una estructura lineal. En los ácidos grasos vegetales, la conformación *cis* es la más habitual, aunque existen excepciones como la del ácido *trans*-palmitoleico sintetizado en el cloroplasto (Somerville et al., 2000).

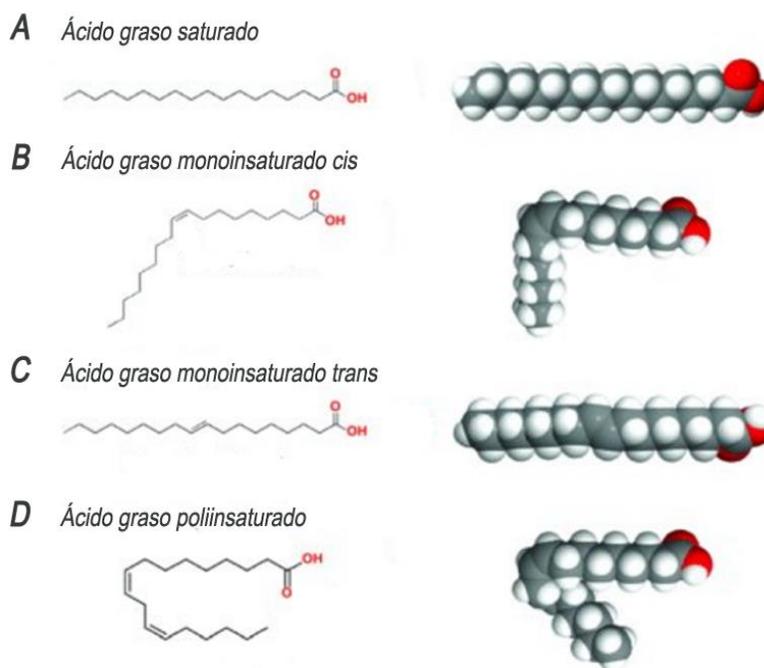


Figura 1.1 Representación estructural y tridimensional correspondiente a moléculas de ácidos grasos: (A) saturado (B) monoinsaturado cis (C) monoinsaturado trans (D) poliinsaturado.

Los ácidos grasos pueden denominarse por su nombre común, su nombre sistemático, o bien por la forma abreviada. Según la forma abreviada, el primer número indica el número de carbonos y el segundo, el número de insaturaciones. Ambos números están separados por un doble punto. Un superíndice indica la posición de los dobles enlaces contando desde el grupo carboxilo (carbono delta (Δ)) o bien desde el grupo terminal (carbono omega (ω)). Dado que la mayoría de ácidos grasos insaturados presentan conformación *cis*, la isomería del doble enlace no se especifica, excepto si se trata de conformación *trans*. Por ejemplo, el ácido linoleico o cis-octadecadienoico, presenta la abreviatura $18:2^{\Delta 9,12}$ o alternativamente $18:2^{\omega 6,9}$, lo que indica que se trata de un ácido graso de 18 carbonos con dos insaturaciones en las posiciones 9 y 12 contando desde el carbono Δ (o en las posiciones 6 y 9 contando desde el carbono ω). En este trabajo, para simplificar se utilizará preferentemente la forma abreviada (sin especificar la posición de las insaturaciones) para referirse a los diferentes tipos de ácidos grasos.

Nombre común	Estructura	Abreviatura
Ácido laúrico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	12:0
Ácido palmítico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	16:0
Ácido esteárico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	18:0
Ácido araquidónico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	20:0
Ácido behénico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	22:0
Ácido lignocérico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	24:0
Ácido oleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:1 ^{A9}
Ácido petroselinico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	18:1 ^{A6}
Ácido linoleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:2 ^{A9,12}
Ácido α -linolénico	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:3 ^{A9,12,15}
Ácido γ -linolénico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	18:3 ^{A6,9,12}
Ácido ruginico	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$	16:3 ^{A7,10,13}
Ácido erúxico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$	22:1 ^{A13}

Tabla 1.1 Listado de los principales ácidos grasos presentes en plantas. Los ácidos grasos saturados se encuentran sobre fondo amarillo y los insaturados sobre fondo naranja. Tabla adaptada a partir de Somerville et al., 2000.

La composición de ácidos grasos es muy variable de una especie vegetal a otra. Generalmente, los ácidos grasos más comunes son el 16:0, el 18:1 y el 18:2, y en menor proporción el 18:3. Algunas especies también acumulan ácidos grasos de cadena larga (>18 carbonos) con función de reserva (Robles-Medina et al., 2009) (ver tabla 1.2). Actualmente, las plantas oleaginosas tienen un creciente interés agronómico, ya que el aceite extraído de sus semillas puede ser utilizado tanto en la alimentación humana (girasol, oliva) como con finalidad industrial en la fabricación de lubricantes o biodiesel (colza, jatrofa, camelina).

Aceite	Ácido graso								SFAs/UFAs
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	
Almendra	6,5	0,5	1,4	70,7	20,0	-	-	0,9	7,9 / 91,2
Borraja	12,9	0,2	4,3	19,1	39,0	18,7	0,3	2,0	17,5 / 82,5
Maíz	11,7	-	1,9	25,2	60,5	0,5	0,2	-	13,8 / 86,2
Algodón	28,3	-	0,9	13,3	57,5	-	-	-	29,2 / 70,8
Jatrofa	16,4	1,0	6,2	37,0	39,2	-	0,2	-	22,8 / 77,2
Oliva	11,8	1,5	2,7	74,1	8,5	0,7	0,4	-	14,9 / 85,1
Palma	42,6	0,3	4,4	40,5	10,1	0,2	-	1,9	47,0 / 51,1
Canola	3,5	-	0,9	64,4	22,3	8,2	-	0,7	4,4 / 94,9
Soja	11,4	-	4,4	20,8	53,8	9,3	0,3	-	16,1 / 83,9
Girasol	7,1	-	4,7	25,5	62,4	-	0,3	-	12,1 / 87,9

Tabla 1.2 Composición de ácidos grasos de aceites obtenidos de semillas de diferentes especies vegetales de interés agronómico. También se representa el balance entre ácidos grasos saturados e insaturados. Los resultados se representan como % del total de ácidos grasos. Tabla adaptada a partir de Robles-Medina et al., 2009.

Concretamente, en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, en la cual se centra este trabajo, destacan por su abundancia el ácido graso 18:3, que en hojas puede llegar al 48% del total de ácidos grasos (Miquel y Browse, 1992). También hay que destacar una elevada proporción de ácidos grasos poliinsaturados de 16 carbonos, especialmente el 16:3, que en hojas puede superar el 10% del total de ácidos grasos (Miquel y Browse, 1992). Sin embargo, la composición de ácidos grasos es muy variable en función del tejido analizado, ya que en los tejidos fotosintéticos el contenido de ácidos grasos trienoicos es notablemente superior que en los tejidos no fotosintéticos, donde los ácidos grasos dienoicos son los más abundantes (Miquel y Browse, 1992; Li et al., 2006; Beaudoin et al., 2009) (ver tabla 1.3).

ácido graso	Tejido			
	Hoja (5 semanas)	Raíz (2 semanas)	Flor	Semilla
16:0	15,0	20,7	28,0	8,7
16:1	3,8	1,2	-	-
16:2	1,1	0,4	-	-
16:3	13,8	1,5	3,3	-
18:0	1,0	1,9	1,9	3,6
18:1	3,5	7,5	-	15,0
18:2	15,7	36,5	36,9	29,0
18:3	46,0	24,6	28,3	19,2
20:0	-	1,4	0,6	2,2
20:1	-	-	-	20,2
20:2	-	-	-	2,0
22:0	-	-	0,5	-
22:1	-	-	-	1,7
24:0	-	-	0,4	-

Tabla 1.3 Composición de ácidos grasos en diferentes tejidos de *Arabidopsis*. Tabla adaptada a partir de Li-Beisson et al., 2013.

1.1.2 Clasificación de los lípidos

Dado su carácter heterogéneo, existen múltiples formas de clasificar a los lípidos en función de diferentes parámetros. La clasificación más utilizada, agrupa a los lípidos en función de si presentan o no ácidos grasos como sustituyentes. Los lípidos con ácidos grasos se hidrolizan en presencia de una solución alcalina pudiendo llevar a cabo reacciones de saponificación, por lo que son llamados *lípidos saponificables*. Por el contrario, los lípidos sin ácidos grasos son llamados *lípidos insaponificables*. A su vez, los lípidos se consideran como *simples* si están constituidos únicamente por átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno, o bien, se consideran *complejos* si estos incluyen además átomos de fósforo, nitrógeno o azufre en su composición.

		Ácidos grasos
	Simple	Acilglicéridos
		Céridos
Lípidos con ácidos grasos (saponificables)		Galactolípidos
		Glucolípidos
	Complejos	Sulfolípidos
		Fosfolípidos
		Fosfoglicéridos
		Esfingolípidos
		Terpenos o isoprenoides
Lípidos sin ácidos grasos (insaponificables)		Esteroides
		Oxilipinas

Tabla 1.4 Clasificación tradicional de los lípidos principales encontrados en plantas.

Otra clasificación muy utilizada, divide a los lípidos en función de sus características químicas, clasificándolos como lípidos *neutros* o *polares*. Los *lípidos neutros* (como los acilglicéridos) son aquellos que carecen de carga eléctrica y por lo general, son moléculas poco reactivas. Los *lípidos polares* (como los fosfolípidos y glucolípidos) presentan simultáneamente una zona hidrófoba y otra hidrófila o polar, de modo que tienen un comportamiento anfipático, lo que permite su agrupación en micelas, liposomas y membranas. Por último, los lípidos también pueden clasificarse según su función, en lípidos estructurales (lípidos de membrana), de reserva energética o de función reguladora.

1.1.3 Lípidos de membrana

Las membranas biológicas son bicapas lipídicas, flexibles y dinámicas, que actúan a modo de barreras naturales, delimitando el contorno de células y orgánulos subcelulares y controlando la composición del espacio que delimitan. Las membranas también actúan como matriz donde diversas proteínas ejercen su función. (Singer y Nicolson, 1972).

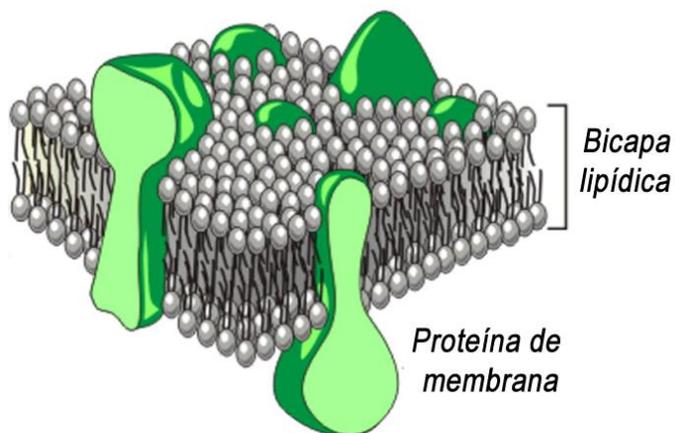


Figura 1.2 Representación de una membrana biológica según el modelo de mosaico fluido propuesto por Singer y Nicolson, 1972.

Los glicerolípidos son el principal constituyente de las bicapas lipídicas que forman las membranas. La estructura de los glicerolípidos se basa en un esqueleto de glicerol esterificado con dos ácidos grasos y un grupo polar. Para designar la posición en la que esterifica la molécula de glicerol, se utiliza la designación *sn* (del inglés, *stereospecific nomenclature*). Los ácidos grasos se esterifican en las posiciones *sn-1* y *sn-2* de la molécula de glicerol, mientras que el grupo polar esterifica en la posición *sn-3*. Los distintos tipos de glicerolípidos se clasifican en función de la naturaleza de su grupo polar (ver tabla 1.5). La presencia del grupo polar otorga a los glicerolípidos el carácter anfipático, lo que les permite formar las bicapas lipídicas que constituyen las membranas (Somerville y Browse, 1991).

En plantas, los glicerolípidos que intervienen en la formación de membranas son los fosfolípidos, los galactolípidos y los sulfolípidos. Estos glicerolípidos se diferencian principalmente dependiendo de si el grupo polar esterificado con el glicerol es un grupo fosfato, una o varias moléculas de galactosa o una molécula de sulfoquinovosa respectivamente. A diferencia de las membranas de animales y de hongos constituidas exclusivamente por fosfolípidos, las membranas vegetales contienen además galactolípidos y sulfolípidos (Somerville y Browse, 1991). En plantas, la composición lipídica es diferente según el tipo membrana, tal como se explica en los apartados 1.1.3.1 y 1.1.3.2.

$$\begin{array}{l}
 \text{sn-1 CH}_2\text{-O} \text{---} \text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---} \end{array} \text{---} \text{C}_{17}\text{H}_{35} \\
 | \\
 \text{sn-2 CH-O} \text{---} \text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---} \end{array} \text{---} \text{C}_{17}\text{H}_{33} \\
 | \\
 \text{sn-3 CH}_2\text{---} \text{P} \text{---} \text{X}
 \end{array}$$

Ácido graso saturado
 Ácido graso insaturado

Glicerofosfolípido (estructura general)

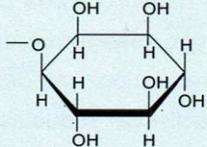
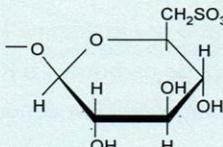
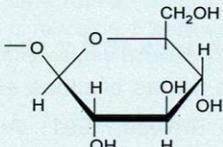
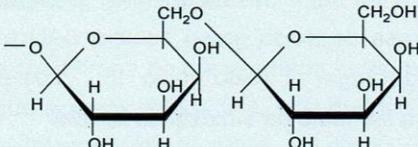
	Fórmula de (P)	Nombre de X-OH	Fórmula de X	Nombre del lípido
Fosfolípidos		Agua	-H	Ácido fosfatídico (PA)
		Colina	-CH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	Fosfatidilcolina (PC)
		Etanolamina	-CH ₂ CH ₂ NH ₃ ⁺	Fosfatidiletanolamina (PE)
		Glicerol	-CH ₂ CHOHCH ₂ OH	Fosfatidilglicerol (PG)
		Serina	-CH ₂ -CH(NH ₃ ⁺)COO ⁻	Fosfatidilserina (PS)
		Fosfatidilglicerol	-CH ₂ CHOH-CH ₂ -O-P(=O)(O ⁻)-O-CH ₂ -RCOCH ₂ OCR	Difosfatidilglicerol (cardiolipina)
		mio-Inositol		Fosfatidilinositol (PI)
Galactolípidos	Sin grupo (P)	Sulfoquinovosa		Sulfoquinovosildiácilglicerol o sulfolípidos (SL) (SQ)
		Galactosa		Monogalactosildiácilglicerol (MGDG)
		Digalactosa		Digalactosildiácilglicerol (DGDG)

Tabla 1.5 Clases principales de glicerolípidos de membrana. Tabla adaptada a partir de Somerville et al., 2000.

Las diferencias en la composición lipídica, así como en el tipo de ácidos grasos presentes en los lípidos, determinan las características físico-químicas de la membrana, confiriendo diferentes grados de fluidez que influyen en su permeabilidad y propiedades dinámicas (Chapman, 1975). Estas propiedades dinámicas tienen relevancia en una gran multitud de procesos biológicos, entre otros, permitiendo la aclimatación a diferentes condiciones medioambientales tales como la temperatura o el déficit hídrico (Guschina y Harwood, 2006).

1.1.3.1 Membranas extraplastidiales

En plantas, las membranas extraplastidiales están constituidas principalmente por el sistema endomembranoso (formado por la membrana plasmática, la membrana nuclear, el retículo endoplasmático (RE) y el tonoplasto) y por las envueltas mitocondriales. Los fosfolípidos son el principal constituyente de las membranas extraplastidiales aunque también son abundantes otros tipos de lípidos como los esfingolípidos (mayoritariamente las glucosilceramidas, también llamados cerebrósidos) (Somerville et al., 2000). Estos últimos, se encuentran exclusivamente en el sistema endomembranoso, especialmente en la membrana plasmática donde pueden representar hasta el 40% de los lípidos totales (Dunn et al., 2004; Sperling et al., 2005).

Los fosfolípidos son glicerolípidos que presentan un grupo fosfato esterificado en la posición *sn-3* del esqueleto de glicerol. En función del sustituyente unido al grupo fosfato, se generan los diferentes tipos de fosfolípidos. Los fosfolípidos encontrados en plantas son: el ácido fosfatídico (PA), la fosfatidilcolina (PC), la fosfatidiletanolamina (PE), el fosfatidilglicerol (PG), la fosfatidilserina (PS), el fosfatidilinositol (PI) y el difosfatidilglicerol o cardiolipina (CL) (ver tabla 1.5).

La PC y la PE son los fosfolípidos vegetales más abundantes, representando entorno al 80% del total de los lípidos encontrados en membranas extraplastidiales, mientras que la PS, el PI, el PG y el PA son lípidos minoritarios, cuya proporción individual oscila entre el 1 y el 4% (Browse and Somerville, 1994). El PA, la PC y el PG pueden encontrarse tanto en membranas plastidiales como extraplastidiales, mientras que la PE, la PS y el PI son exclusivos de membranas extraplastidiales (Moreau et al., 1998) (ver tabla 1.6).

Clase de Glicerolípido	Membrana	
	Extrplastidial	Plastidial
PC	47,8	12
PE	36,5	-
PI + PS	10,9	-
PA	-	-
PG	4,4	9,5
MGDG	-	53,7
DGDG	-	20,9
SQDG	-	3,9

Tabla 1.6 Composición en glicerolípidos de las membranas plastidiales y extrplastidiales de hojas de *Arabidopsis*. Los datos se representan como % del total de glicerolípidos. Tabla adaptada a partir de Li-Beisson et al., 2013.

Los ácidos grasos mayoritarios presentes en los fosfolípidos que constituyen las membranas extrplastidiales son el 18:3, 18:2 y 16:0. Además es importante remarcar que no contienen UFAs de 16 carbonos en su composición. El único fosfolípido que sí presenta UFAs de 16 carbonos, concretamente 16:1^{trans}, es el PG presente en las membranas plastidiales (ver apartado 1.1.3.2) (ver tabla 1.8).

Los fosfolípidos que constituyen estas membranas también actúan como segundos mensajeros, jugando importantes papeles en la señalización celular (Meijer y Munnik, 2003). La principal función de la PC es la constitución de las membranas extrplastidiales, aunque también podría estar involucrada en la remodelación de los lípidos mediante el intercambio de lípidos entre membranas a través de su derivado lisofosfatidilcolina (LPC) (Kazachkov et al., 2008). La PE se acumula mayoritariamente en tejidos no fotosintéticos y se ha relacionado con diferentes procesos tales como la germinación, el desarrollo de la raíz o la senescencia floral (Kilaru et al., 2007; Coulon et al., 2012). El PG es un lípido minoritario en membranas extrplastidiales, donde apenas representa un 4% (Browse and Somerville, 1994). Sin embargo, el PG ejerce un importante papel en la constitución de las membranas plastidiales (ver apartado 1.1.3.2). El PI juega un papel muy importante en la señalización celular derivada de lípidos, ya que es la molécula precursora en la síntesis de inositol-fosfato (IP3 o IP6), cuya función se ha relacionado con la liberación de Ca y el estrés osmótico (Meijer y Munnik, 2003). El papel ejercido por la PS en la señalización celular en

plantas es poco conocido, sin embargo, se ha descrito su acumulación en flores donde podría jugar un papel determinante para el correcto desarrollo del polen (Yamaoka et al., 2011). El PA es un intermediario en la síntesis de glicerolípidos de membrana y su presencia en membranas es muy reducida (Browse and Somerville, 1994), a excepción de algunas situaciones de estrés o en procesos como la aclimatación al frío o estrés biótico, donde su proporción puede verse incrementada representando apenas un 1% de la composición lipídica (Testerik y Munnik, 2011). Por último, la CL es un fosfolípido exclusivo de la envuelta mitocondrial interna, donde su composición supera el 10% de los lípidos totales (Caiveau et al., 2001). La función en plantas de CL no está bien caracterizada, pero en diversos organismos se sabe que el papel de este lípido es vital para el proceso de fosforilación oxidativa producido en las mitocondrias (Schlame et al., 2000).

1.1.3.2 Membranas plastidiales

Las membranas plastidiales hacen referencia principalmente a las envueltas y a la membrana tilacoidal de los cloroplastos. La principal característica de estas membranas es su elevada proporción de glucolípidos, especialmente galactolípidos (ver tabla 1.6), pudiendo llegar éstos a representar el 50% de los lípidos totales en hojas (Benning y Ohta, 2005) y hasta el 75% de los lípidos totales cloroplásticos (Dörmann y Benning, 2002).

Los glucolípidos son glicerolípidos que presentan esterificado en la posición *sn-3* del esqueleto de glicerol una o varias moléculas de azúcar. En plantas, los glucolípidos mayoritarios son los galactolípidos, concretamente el monogalactosildiacilglicerol (MGDG) y el digalactosildiacilglicerol (DGDG), que presentan respectivamente una galactosa y una digalactosa esterificadas en la posición *sn-3* del esqueleto de glicerol (ver tabla 1.5). Dentro de los glucolípidos, también se encuentra el único sulfolípidos presente en plantas, el sulfoquinovosildiacilglicerol (SQDG). La estructura de esta molécula es muy similar a la del MGDG, pero en este caso la galactosa esterificada en posición *sn-3* presenta un residuo sulfurado unido al carbono 6 (ver tabla 1.5).

La distribución de los lípidos en las membranas plastidiales no es homogénea. La membrana tilacoidal y la envuelta interna del cloroplasto están constituidas básicamente por los galactolípidos MGDG, DGDG y en menor grado por el sulfolípidos SQDG. Estos lípidos contribuyen con más del 80% a la composición de lípidos totales de estas membranas (Moreau et al., 1998; Andersson y Dörmann, 2008). También cabe destacar la presencia de PG, el cual es el fosfolípido más abundante

en estas membranas. Sin embargo, no se trata de un lípido mayoritario, ya que representa en torno al 10% de su composición lipídica (Joyard et al., 1998; Moreau et al., 1998; Andersson y Dörmann, 2008). Sin embargo, la composición de la envuelta externa del cloroplasto difiere substancialmente del resto de membranas plastidiales, al presentar un aumento considerable en la composición de fosfolípidos, especialmente PC, y una disminución considerable del contenido del galactolípidos MGDG (Moreau et al., 1998; Andersson y Dörmann, 2008) (ver tabla 1.7).

Membrana cloplástica	Clase de gliceroplípido					
	MGDG	DGDG	SQDG	PC	PG	PI
Envuelta externa	17	29	6	32	10	5
Envuelta interna	49	30	5	6	8	1
Membrana tilacoidal	52	26	6,5	4,5	9,5	1,5

Tabla 1.7 Composición en glicerolípidos de las diferentes membranas plastidiales en hojas de espinaca. Los datos se representan como % del total de glicerolípidos. Tabla adaptada a partir de Block et al., 1983.

El hecho de que las membranas plastidiales estén constituidas principalmente por galactolípidos permite que puedan sintetizarse independientemente de la presencia de fósforo en el medio, aportando una gran ventaja evolutiva (Frentzen, 2004) ya que el fósforo es un macronutriente limitante para el crecimiento de la planta (Raghothama, 1999). También se ha observado que bajo algunas condiciones de estrés, algunos galactolípidos presentes en las membranas plastidiales pueden ser exportados a las membranas extraplastidiales y substituir a los fosfolípidos allí presentes. Concretamente, el DGDG puede ser incorporado tanto a la membrana plasmática como al tonoplasto y a las envueltas mitocondriales en condiciones de déficit de fósforo (Andersson et al., 2003, 2005; Jouhet et al., 2004). También aumentan los niveles de SQDG en estas condiciones (Shimojima, 2011).

Los lípidos que componen las membranas plastidiales, están formados en su mayoría por PUFAs (Somerville et al., 2000). La práctica totalidad del MGDG está constituido por ácidos grasos trienoicos 18:3 y 16:3 que llegan a superar el 90% del total de ácidos grasos presentes en estos lípidos. El DGDG y el SQDG también presentan un alto contenido en ácidos grasos trienoicos, pero

en este caso básicamente 18:3 (los niveles de 16:3 son mínimos) y destaca también la presencia de 16:0 (Miquel y Browse, 1992). El fosfolípido PG presente en el cloroplasto, también presenta elevados niveles de 18:3 y 16:0, pero se caracteriza por ser el único fosfolípido que contiene una insaturación en un átomo de 16 carbonos, concretamente el ácido graso 16:1^{trans} (Dubacq y Trémolières, 1983; Dörmann, 2005) y además con una presencia elevada que supera el 30% (Miquel y Browse, 1992) (ver tabla 1.8).

Ácido graso	Clase de glicerolípido						
	PC	PE	PI	PG	MGDG	DGDG	SQDG
16:0	20,6	31,2	43,5	20,7	1,5	13,6	43,2
16:1	0,6	-	-	33,5	1,5	0,3	-
16:2	-	-	-	-	1,3	0,6	-
16:3	-	-	-	-	30,6	2,1	-
18:0	2,7	3,4	5,2	1,8	0,2	1,1	3,7
18:1	4,4	3,3	4,3	6,0	1,5	1,3	5,3
18:2	38,8	43,0	27,0	12,5	1,3	5,0	10,4
18:3	32,1	18,7	20,0	25,6	60,0	75,9	37,4

Tabla 1.8 Composición de ácidos grasos en las diferentes clases de glicerolípidos en hojas de *Arabidopsis*. Los datos se representan como % del total de glicerolípidos. * En el caso del PG el ácido graso es 16:1^{trans}. Tabla adaptada a partir de Li-Beisson et al., 2013.

La presencia de lípidos en las membranas plastidiales no se limita simplemente a una función meramente estructural (Dörmann y Benning, 2002). Los galactolípidos, los sulfolípidos y el PG presentes en la membrana tilacoidal tienen una importante función en la estabilidad de los complejos fotosintéticos PSI y PSII, por lo que están directamente implicados en la eficiencia fotosintética de la planta (Loll et al., 2007; Kern y Guskov, 2011). Las líneas mutantes *mgd1-1* y *mgd1-2* de *Arabidopsis*, deficientes en la síntesis de MGDG, mostraban una disminución del contenido en clorofila, alteraciones en la formación de las membranas tilacoidales y un menor rendimiento fotosintético (Jarvis et al., 2000; Kobayashi et al., 2007). Del mismo modo, la línea mutante *dgd1* de *Arabidopsis*, deficiente en la síntesis de DGDG, también presentaba alteraciones

en la estructura del cloroplasto afectando negativamente al rendimiento fotosintético (Dörmann et al., 1995), siendo estas afectaciones todavía más severas en el doble mutante *dgd1 dgd2* (Kelly et al., 2003). Sin embargo, los mutantes *sqd1* y *sqd2* de *Arabidopsis*, deficientes en la síntesis de SQDG, no mostraron alteraciones en la estructura del cloroplasto ni en el rendimiento fotosintético, sugiriendo que SQDG no es un lípido esencial para el desarrollo de la actividad fotosintética de la planta (Essigmann et al., 1998; Yu et al., 2002). Por otro lado, aunque no se trate de un lípido mayoritario en las membranas plastidiales, muchos estudios se han centrado en el fosfolípido PG, debido a su importante implicación en la estabilización de los complejos fotosintéticos. Se observó en estudios realizados con liposomas enriquecidos en este fosfolípido, que el PG podría estar directamente implicado en la dimerización del PSII y en la trimerización de su complejo antena (LHC) (Trémolières et al., 1981; Remy et al., 1984; Hobe et al., 1994; Kruse et al., 2000). Posteriormente, estudios realizados con el mutante *pgp1* de *Arabidopsis*, deficiente en la síntesis de PG, revelaron alteraciones en la morfología de los cloroplastos y una eficiencia fotosintética muy reducida en estas plantas (Xu et al., 2002; Hagio et al., 2002; Babiychuck et al., 2003). Además, también se observó que en condiciones de estrés por déficit de fósforo, los niveles del galactolípido SQDG en las membranas plastidiales aumentan considerablemente con la finalidad de substituir al PG en la estabilización de los complejos proteicos (Nakamura, 2013). Esto se debe a que tanto PG como SQDG tienen carácter aniónico, y se ha descrito que la presencia de lípidos con carácter aniónico en los tilacoides está relacionado con su capacidad fotosintética (Yu y Benning, 2003). Finalmente, los datos de cristalización de proteínas revelaron que cada monómero de PSI contiene 1 molécula de MGDG y tres de PG (Jones, 2007). Del mismo modo, en la estructura del PSII se detectaron 11 moléculas de MGDG, 7 de DGDG, 5 de SQDG y 2 de PG (Guskov et al., 2009).

Además, también se ha descrito la implicación del PG confiriendo resistencia y adaptación a las bajas temperatura mediante la estabilización de complejos proteicos de membrana (Wada y Murata, 2007) (ver apartado 1.3.2.2). Por último, muchos lípidos presentes en las membranas plastidiales, actúan como precursores en la síntesis de importantes moléculas señalizadoras como los jasmonatos (Feussner y Wasternack, 2002) (ver apartado 1.3.2.1).

1.2 METABOLISMO LÍPIDICO VEGETAL

1.2.1 Síntesis de ácidos grasos

La síntesis de ácidos grasos en plantas tiene lugar en los plastidios, y consiste en una serie de reacciones de condensación sucesivas de grupos acilo que generalmente finalizan al obtenerse ácidos grasos de 16 o 18 carbonos. Las enzimas implicadas en este proceso son los complejos acetil-CoA carboxilasa (ACC) y ácido graso sintasa (FAS). Este proceso requiere gran cantidad de poder reductor, el cual se obtiene del NADPH proveniente de la fotosíntesis o de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato en condiciones de oscuridad (Somerville et al., 2000).

La molécula precursora para la síntesis de los ácidos grasos es el acetil-CoA (Ohlrogge y Browse, 1995; Somerville et al., 2000). Los niveles de acetil-CoA plastidial son bajos pero constantes, por lo que es necesaria su reposición constante (Ohlrogge y Browse, 1995). Debido a que el acetil-CoA no puede atravesar las membranas plastidiales, la manera más rápida de generar acetil-CoA es mediante el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa plastidial (PDHC) que cataliza la descarboxilación oxidativa del piruvato para producir acetil-CoA (Johnston et al., 1997).

La síntesis de ácidos grasos se inicia mediante la carboxilación de una molécula de acetil-CoA para obtener malonil-CoA, en un proceso que requiere la presencia de ATP. Esta reacción es catalizada por el complejo enzimático ACC (Konishi et al., 1996; Somerville et al., 2000). A continuación, el complejo enzimático FAS realiza la elongación del ácido graso mediante la adición de dos carbonos cedidos por la molécula de malonil-CoA. El complejo enzimático FAS, es un complejo disociable formado por una serie de enzimas monofuncionales (Brown et al., 2006). La primera enzima del complejo FAS es la malonil-CoA:ACP aciltransferasa o malonil transferasa (MCMT), que se encarga de transferir el grupo malonilo a la proteína transportadora de acilos (ACP). El ácido graso permanecerá unido a la proteína ACP durante todo el proceso de elongación. Seguidamente, la enzima 3-cetoacil sintasa III (KAS III) condensa una primera molécula de acetil-CoA a la molécula de malonil-ACP, sufriendo el grupo malonilo una descarboxilación que genera un intermediario de 4 carbonos. El intermediario sufre una reacción de reducción, una deshidratación y una nueva reducción para generar un grupo acilo de 4 carbonos. Nuevamente, se produce una nueva condensación catalizada por la enzima 3-cetoacil sintasa I (KAS I), esta vez con un molécula de malonil-CoA, y el ciclo se repite añadiendo 2 carbonos a la cadena hidrocarbonada del ácido graso en cada ciclo, hasta obtener un ácido graso de 16 carbonos. Los ácidos de 16 carbonos pueden sufrir

una nueva reacción de condensación adicional catalizada por la enzima 3-cetoacil sintasa II (KAS II) (también denominada FAB1 en *Arabidopsis*) para obtener un ácido graso de 18 carbonos (Somerville et al., 2000).

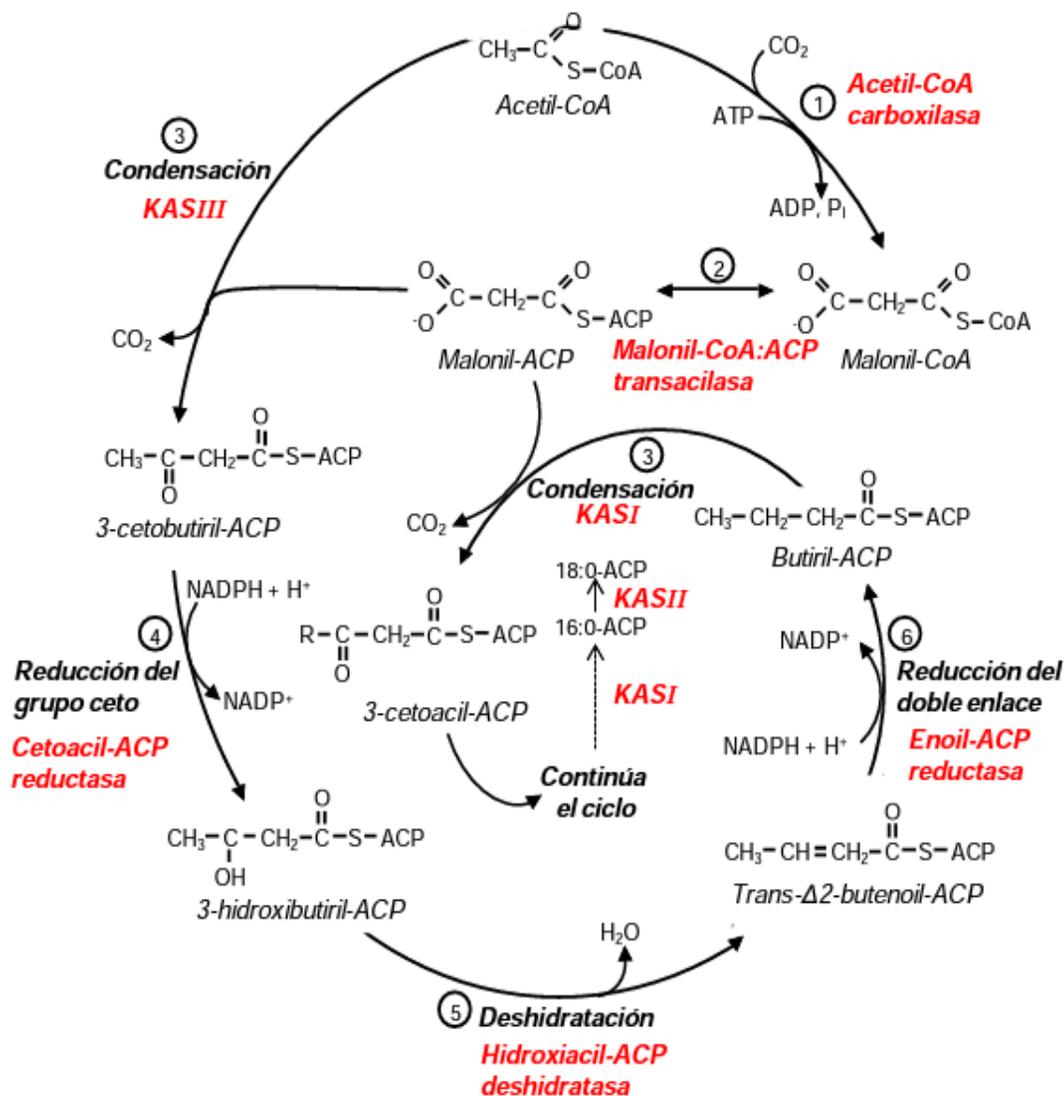


Figura 1.3 Reacciones implicadas en la biosíntesis de ácidos grasos en plantas. En rojo se indican las enzimas implicadas en la reacción. Figura adaptada a partir de Ohlrogge y Browse, 1995.

Los ácidos grasos 16:0 y 18:0 se desvinculan del complejo FAS y éstos pueden sufrir procesos de edición, consistentes básicamente en reacciones de elongación y desaturación, catalizadas por enzimas elongasas y desaturasas, respectivamente (Somerville et al., 2000). Generalmente, el ácido graso 18:0-ACP es desaturado muy eficientemente por la única desaturasa soluble en plantas, la $\Delta 9$

estearoil:ACP desaturasa (SAD) (también denominada FAB2 en *Arabidopsis*) para producir 18:1-ACP (McKeon y Stumpf, 1982). Los ácidos 16:0, 18:0 y 18:1 que no sufren procesos de elongación se incorporan a las rutas de síntesis de los diferentes lípidos de membrana.

Aunque la actividad de algunas enzimas como la ACC es determinante en la acumulación de ácidos grasos, se sabe muy poco de los elementos que regulan los niveles de expresión de las enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos en plantas (Ohlrogge y Jaworski, 1997). Sin embargo, diferentes estudios realizados en semillas y en tejidos embrionarios han establecido que este proceso presenta una importante regulación temporal de carácter transcripcional (Fawcett et al., 1994; O'Hara et al., 2002; Baud y Graham, 2006). El uso de mutantes deficientes en la síntesis de ácidos grasos, ha permitido identificar al factor de transcripción WRINKLED1 (WRI1), perteneciente a la familia APETALA 2/etileno, como uno de los principales reguladores a nivel transcripcional de la síntesis y acumulación de ácidos grasos en semillas y en tejidos embrionarios de plantas (Focks y Benning, 1998; Ruuska et al., 2002; Cernac y Benning, 2004). Más recientemente, se ha observado que WRI1 es capaz de regular la expresión de los genes que codifican para las proteínas PKp- β 1 y BCCP2, subunidades de la piruvato quinasa plastidial y la Acetil-CoA carboxilasa respectivamente (Baud et al., 2009).

1.2.2 Síntesis de lípidos de membrana

Los ácidos grasos 16:0, 18:0- y 18:1-ACP producidos en el cloroplasto, pueden incorporarse directamente a los lípidos del cloroplasto, o bien ser exportados para incorporarse a los lípidos del retículo endoplasmático (RE). De este modo, en la síntesis de glicerolípidos en plantas están implicados dos orgánulos: el cloroplasto y el RE, y se produce mediante dos rutas biosintéticas bien diferenciadas: la *ruta procariota* y la *ruta eucariota* (Roughan y Slack, 1982). La ruta procariota, llamada así por su similitud con bacterias, hace referencia a la síntesis de glicerolípidos en los plastidios. La ruta eucariota hace referencia a la síntesis de glicerolípidos en el RE, a la transferencia de algunos lípidos entre RE y plastidios, y a la posterior modificación de estos lípidos en los plastidios (Somerville et al., 2000).

Algunos glicerolípidos como la PC, la PE, la PS y el PI sólo se sintetizan a partir de la ruta eucariota, pero otros como el MGDG, el DGDG, el SQDG y el PG se pueden sintetizar a través de ambas rutas. La ruta biosintética seguida por los glicerolípidos vegetales es distinguible debido al ácido graso que se encuentra esterificado en la posición *sn-2* de la molécula de glicerol. Así, debido

a la especificidad de las aciltransferasas plastidiales, los lípidos sintetizados por la ruta procariota presentan ácidos grasos de 16 carbonos en la posición *sn-2* de la molécula de glicerol, a diferencia de los sintetizados en la ruta eucariota, que sólo los contienen en la posición *sn-1* de la molécula de glicerol. Además, el ácido graso 16:3 es un producto exclusivo de la síntesis lipídica en el cloroplasto, por lo que el tipo de metabolismo lipídico de cada especie vegetal se puede clasificar en función de los niveles de ácido graso 16:3 (Heinz and Roughan, 1983; Mongrand et al., 1998; Somerville et al., 2000).

Las plantas 16:3 utilizan tanto la ruta procariota como la eucariota en la síntesis de sus lípidos de membrana, por lo que presentan unos niveles elevados (aunque variables) de ácido graso 16:3. Algunos ejemplos de plantas 16:3 serían el tomate, la patata, la espinaca o *Arabidopsis*, el organismo utilizado en este trabajo (ver tabla 1.9). En estas especies vegetales, ambas rutas contribuyen en la síntesis del MGDG, DGDG y SQDG presentes en el cloroplasto (Mongrand et al., 1998; Somerville et al., 2000). Sin embargo, la contribución de ambas rutas a la síntesis lipídica difiere mucho entre especies, y además también depende del tipo de tejido, grado de desarrollo y de condiciones ambientales dentro de una misma especie (Awai et al., 2001). Por ejemplo, en este caso de *Arabidopsis*, se sabe que aproximadamente el 40% de los ácidos grasos presentes en las hojas entran en la ruta procariota, mientras el 60% restante entran en la ruta eucariota (Browse et al., 1986).

Por el contrario, las plantas con niveles de 16:3 inferiores al 2% de la composición total de ácidos grasos reciben el nombre de plantas 18:3. En este caso, se utiliza mayoritariamente la ruta eucariota en la síntesis de sus lípidos de membrana, utilizando la ruta procariota únicamente para la síntesis de PG (que no contiene 16:3). La mayoría de especies vegetales de interés agrícola como los cereales y las legumbres son plantas 18:3 (ver tabla 1.9). En estas plantas, el MGDG, DGDG y SQDG presentes en el cloroplasto provienen exclusivamente de la ruta eucariota y por lo tanto, el ácido graso mayoritario es el 18:3 (Mongrand et al., 1998; Somerville et al., 2000).

Especie	Familia	% 16:3 total
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brasicáceas	13,8
Colza (<i>Brassica napus</i>)	Brasicáceas	29,0 / 3,0 *
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Solanáceas	13,8
Patata (<i>Solanum tuberosum</i>)	Solanáceas	11,6
Tabaco (<i>Nicotiana sylvestris</i>)	Solanáceas	14,1
Espinaca (<i>Spinacia oleracea</i>)	Quenopodiáceas	11,8
Remolacha azucarera (<i>Beta vulgaris</i>)	Quenopodiáceas	5,0 / 1,5 *
Lechuga (<i>Lactuca sativa</i>)	Asteráceas	-
Girasol (<i>Helianthus annuus</i>)	Asteráceas	-
Soja (<i>Glycine max</i>)	Papilonáceas	-
Guisante (<i>Pisum sativum</i>)	Papilonáceas	-
Maíz (<i>Zea mays</i>)	Gramíneas	-
Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	Gramíneas	-
Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	Gramíneas	-
Cebada (<i>Hordeum vulgare</i>)	Gramíneas	-
Olivo (<i>Olea europaea</i>)	Oleáceas	-
Vid (<i>Vitis vinifera</i>)	Vitáceas	-

Tabla 1.9 Composición de ácido graso 16:3 en algunas plantas. Sobre fondo amarillo plantas 16:3 y sobre fondo naranja plantas 18:3. * % 16:3 en MGDG / DGDG. Tabla adaptada a partir de Mongrand et al., 1998.

Se ha asumido que la diferencia entre las plantas 16:3 y las 18:3 se debe a que las plantas 18:3 no presentan la enzima fosfatidato fosfatasa (PAP) en los plastidios, de modo que no pueden sintetizar el DAG necesario para la síntesis de MGDG, DGDG y SQDG (Heinz y Roughan, 1983) (ver apartado 1.2.2.1). La presencia de 16:3 es común en determinadas familias de plantas, siendo muy raro encontrar especies 16:3 y 18:3 dentro de una misma familia (Mongrand et al., 1998). En general, se ha observado que las especies más primitivas son plantas 16:3. Sin embargo, entre las plantas 18:3 la pérdida de la ruta procariota ocurrió de manera independiente y en diferentes etapas

de la evolución. Aunque se desconocen qué ventajas evolutivas ofrece cada una de las rutas metabólicas de síntesis de glicerolípidos en plantas, se estima que en las plantas 18:3 la presión evolutiva debida a la pérdida de la ruta procariota no ha sido demasiado severa (Mongrand et al., 1998).

1.2.2.1 Ruta procariota

En la ruta procariota, los ácidos grasos unidos a la proteína ACP se transfieren a una molécula de glicerol-3-fosfato mediante la acción de dos enzimas aciltransferasas plastidiales (Ohlrogge y Browse, 1995; Somerville et al., 2000) localizadas en la envuelta interna del cloroplasto (Xu et al., 2005; Benning, 2008). Primeramente, la enzima glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) también llamada aciltransferasa 1 (ATS1) en *Arabidopsis*, esterifica en la mayoría de casos, un ácido graso 18:1 en la posición *sn-1* de la molécula de glicerol-3-fosfato originando ácido lisofosfatídico (LPA) (Xu et al., 2006). Seguidamente, la enzima lisofosfatidil aciltransferasa (LPAAT) también llamada aciltransferasa 2 (ATS2) en *Arabidopsis*, esterifica un ácido graso 16:0 en la posición *sn-2* de la molécula de LPA, originando ácido lisofosfatídico (PA) (Kim y Huang, 2004). De esta forma, los ácidos grasos se incorporan a las membranas plastidiales sin abandonar en ningún momento el plastidio.

El PA sintetizado en la envuelta interna, puede ser utilizado para la síntesis de PG plastidial, o bien para la síntesis de galactolípidos y sulfolípidos mediante la formación de DAG (Ohlrogge y Browse, 1995; Somerville et al., 2000). La síntesis de PG a partir de PA requiere de la participación de tres enzimas: CDP-DAG sintasa, PG-fosfato sintasa y PG-fosfato fosfatasa (Andrews y Mudd, 1985). El PA no utilizado en la síntesis de PG se transforma en DAG mediante la enzima fosfatidato fosfatasa (PAP). El DAG se transforma en MGDG o SQDG mediante la adición de UDP-galactosa o UDP-sulfoquinovosa por las enzimas MGDG y SQDG sintasas respectivamente. El DGDG puede ser sintetizado mediante la adición de una segunda UDP-galactosa al MGDG por la enzima DGDG sintasa (Ohlrogge y Browse, 1995; Somerville et al., 2000) o bien, por transferencia de una molécula de galactosa entre dos moléculas de MGDG por la enzima galactolípido galactosil transferasa (Benning y Othta, 2005). En *Arabidopsis*, existen tres MGDG sintasas (MGD1, MGD2 y MGD3), dos DGDG sintasas (DGD1 y DGD2) y dos SQDG sintasas (SQ1 y SQ2), clasificadas en dos grupos, A y B, según su homología, localización y función. Las sintasas del tipo A (MGD1, DGD1 y SQ1) se localizan mayormente en los tejidos verdes de la planta y la síntesis de MGDG, DGDG y SQDG depende principalmente de ellas. Por el contrario, las sintasas del tipo B se

localizan en tejidos no fotosintéticos y su función está relacionada con la deficiencia de fósforo (Awai et al., 2001; Kobayashi et al., 2009; Shimojima y Ohta, 2011; Kalisch et al., 2016). MGD1 y SQ1 se encuentran localizadas en la envuelta interna del cloroplasto, mientras que DGD1 se encuentra en la envuelta externa (Froehlich et al., 2001; Xu et al., 2005; Benning, 2008).

Finalmente, los ácidos grasos que forman parte de los glicerolípidos sintetizados por la ruta procariota, son posteriormente desaturados por la acción de las desaturasas plastidiales (ver apartado 1.3).

1.2.2.2 Ruta eucariota

En la ruta eucariota, los ácidos grasos sintetizados en los plastidios se exportan al RE en forma de acil-CoA (ver apartado 1.2.2.3). Los ácidos grasos en forma de acil-CoA se incorporan a una molécula de glicerol-3-fosfato de una manera muy similar a la ruta procariota (ver apartado 1.2.2.1), aunque la especificidad de sustrato de las aciltransferasas reticulares es diferente a la de las plastidiales. La GPAT reticular, esterifica un ácido graso 18:1, y en menor grado 16:0 en la posición *sn-1* de la molécula de glicerol-3-fosfato (Ohlrogge y Browse, 1995; Somerville et al., 2000). Además, en *Arabidopsis*, existen cuatro isoformas reticulares para la enzima GPAT (Zheng et al., 2003). Posteriormente, la LPAAT reticular esterifica un segundo ácido graso de 18 carbonos en la posición *sn-2* de la molécula de LPA para originar PA. Finalmente, el PA puede ser transformado en DAG, precursor de PC y PE, o en CDP-DAG, precursor de PG, PI y PS (Ohlrogge y Browse, 1995; Somerville et al., 2000).

Por otra parte, algunas especies lipídicas sintetizadas en el RE pueden retornar al cloroplasto y transformarse en DAG con el objetivo de sintetizar galactolípidos y sulfolípidos propios del cloroplasto de una forma similar a la descrita en el apartado 1.2.2.1 (Ohlrogge y Browse, 1995; Somerville et al., 2000). Los mecanismos de transporte lipídico entre ambos orgánulos, así como la naturaleza exacta del lípido transportado, son todavía objeto de experimentación y debate a día de hoy (Moreau et al., 1998; Andersson y Dörmann, 2008; Benning, 2008, 2009) y se comentaran en el apartado 1.2.2.3.

Finalmente, los ácidos grasos que forman parte de los glicerolípidos sintetizados por la ruta eucariota, son posteriormente desaturados por la acción de las desaturasas reticulares o por la acción de las desaturasas plastidiales en el caso de los lípidos importados de nuevo al cloroplasto (ver apartado 1.3).

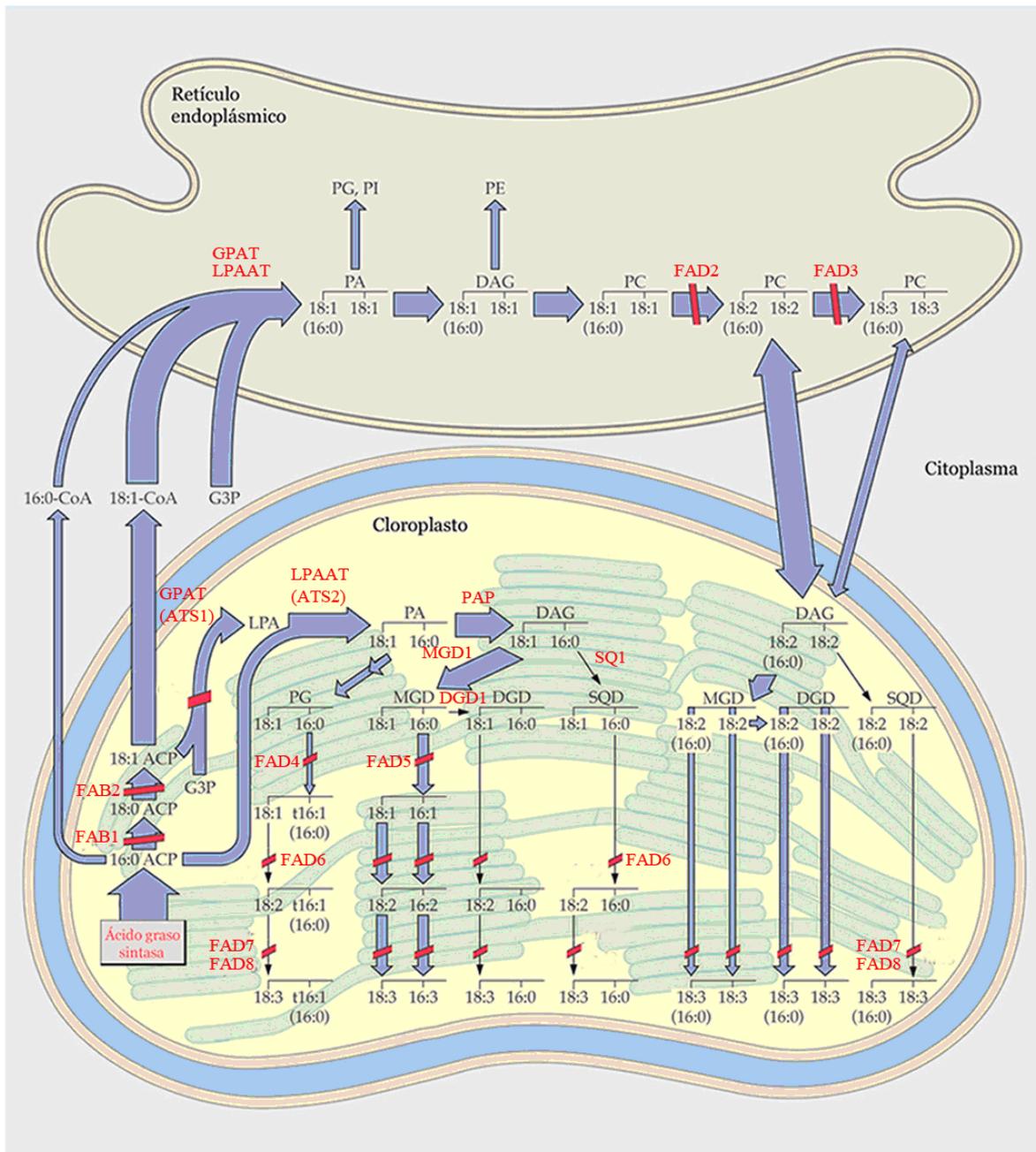


Figura 1.4 Esquema de la ruta procarionta y la ruta eucariota de síntesis de lípidos de membrana en hojas de *Arabidopsis*. En rojo se indican las enzimas implicadas en la biosíntesis lipídica. Las barras rojas indican enzimas de las cuales se han obtenido mutantes en *Arabidopsis*. Figura adaptada a partir de Somerville et al., 2000.

1.2.2.3 Transporte de lípidos entre membranas

La biosíntesis lipídica en plantas requiere la coordinación entre distintos orgánulos celulares. Además, muchos lípidos de membrana han de ser transportados desde su lugar de síntesis hasta las membranas donde ejercen su función. Todo esto hace que el transporte intracelular de lípidos de membrana sea un proceso esencial para el desarrollo celular y de los diferentes orgánulos subcelulares (Somerville et al., 2000; Benning, 2009; Li-Beisson et al., 2013; Hurlock et al., 2014).

El mayor flujo de intercambio lipídico se produce entre los plastidios y el RE, los dos principales orgánulos encargados de la biosíntesis lipídica (Benning et al., 2008). El proceso de exportación de ácidos grasos sintetizados en el cloroplasto hacia el RE requiere de dos enzimas tioesterasas, denominadas FATA y FATB, que liberan los ácidos grasos de la ACP (Salas y Ohlrogge, 2002; Bonaventure et al., 2003). Recientemente, se ha identificado un translocador de tipo flipasa llamado FAX1 (del inglés, Fatty Acid Export), localizado en la envuelta interna del cloroplasto e involucrado en la exportación de ácidos grasos a través de las envueltas plastidiales (Li et al., 2015). Posteriormente, una acil-CoA sintetasa de cadena larga (LACS) une los ácidos grasos con el CoA. Se han identificado 9 genes que codifican para LACS en *Arabidopsis* pero se especula que la principal encargada de la síntesis de acil-CoA para su exportación fuera del plastidio es LACS9, ya que es la única localizada en la envuelta externa del cloroplasto (Shockey et al., 2002). Para la entrada de los ácidos grasos al RE, se ha identificado el transportador de tipo ABC llamado ABCA9, localizado en la membrana reticular y capaz de interactuar con varias proteínas transportadoras de acil-CoA (ACBPs) (Kim et al., 2013), concretamente ACBP4 y ACBP5, de localización citosólica y con elevada afinidad por el 18:1 acil-CoA (Leung et al., 2004; Xiao et al., 2008).

Los ácidos grasos exportados hacia el RE pueden retornar de nuevo a los plastidios (ver apartado 1.2.2.2). En este proceso, se ha demostrado el importante papel ejercido por los translocadores trigalactosildiacilglicerol (TGD), flipasas dependientes de ATP localizadas en las envueltas plastidiales. Se han identificado cinco TGDs en *Arabidopsis*, de las cuales TGD1, TGD2 y TGD3 se localizan en la envuelta interna (Roston et al., 2012) y TGD4 en la envuelta externa del cloroplasto (Xu et al., 2008; Wang et al., 2012). TGD5 es capaz de interactuar con el resto de translocadores TGD facilitando el transporte lipídico entre las envueltas plastidiales (Fan y Zhai, 2015). Se ha comprobado los translocadores TGD tienen afinidad por el PA, por lo que se ha sugerido que el PA es el glicerolípido transportado entre membranas (Roston et al., 2012; Wang et al., 2012). Además, se ha comprobado que TGD4 presenta afinidad por la lisofosfatidilcolina (LPC), compuesto formado a partir de la PC reticular mediante la acción de la enzima lisofosfatidilcolina:acil-CoA

aciltransferasa (LPCAT) (Bessoule et al., 1995), lo cual explicaría la composición asimétrica en los niveles de PC entre las dos envueltas cloroplásticas (Wang et al., 2013). Finalmente, se ha observado la existencia de regiones de contacto entre las membrana del RE y la envuelta externa del cloroplasto llamadas PLAM (del inglés, Plastid Asociated Microsome Fraction) (Anderson et al., 2007), aunque todavía no se ha determinado si los translocadores TGD se encuentran asociados a estos puntos de contacto.

El transporte vesicular juega un papel fundamental en la formación de las membranas tilacoidales del cloroplasto (Morre et al., 1991). En la envuelta interna del cloroplasto es donde se encuentran la mayoría de las enzimas que intervienen en la biosíntesis de los lípidos de membrana. Sin embargo, los tilacoides son las membranas plastidiales más abundantes y presentan una composición lipídica similar a la de la envuelta interna, por lo que es evidente la existencia de un transporte lipídico desde la envuelta interna hacia el interior del cloroplasto (Dörmann y Benning, 2002; Hurlock et al., 2014). La proteína VIPPI (del inglés, Vesicle-Inducing Protein in Plastids) ejerce un importante papel en la organización de las vesículas encargadas de generar las membranas tilacoidales a partir de las envueltas cloroplásticas (Kroll et al., 2001; Zhang y Sakamoto, 2015).

Por último, también se ha descrito la existencia de proteínas transportadoras de lípidos (LTPs), las cuales son capaces de transportar y realizar el intercambio de glicerolípidos entre membranas (Aronel et al., 2000). La mayoría de estas proteínas se han encontrado en el espacio extracelular y están relacionadas por ejemplo con el transporte y deposición de las ceras (DeBono et al., 2009). Sin embargo, también se han detectado en algunas especies vegetales LTPs en el citoplasma celular, aunque se desconoce la función que ejercen allí (Carvalho et al., 2004; Diz et al., 2011). De ese modo, no puede descartarse que las proteínas LTPs puedan estar implicadas en el transporte lipídico entre los diversos orgánulos celulares.

1.2.3 Ácidos grasos como precursores en la síntesis de jasmonatos

Las oxilipinas son una extensa familia de metabolitos secundarios generados a partir de la oxidación de los PUFAs. Estos compuestos intervienen en diferentes procesos relacionados con la respuesta a estrés biótico o abiótico, y con el desarrollo de diferentes tejidos vegetales (Ponce de León et al., 2015). Las oxilipinas más conocidas son las pertenecientes a la familia de los jasmonatos (JAs), formada por el ácido jasmónico (JA) y todos sus derivados (Feussner y Wasternack, 2002).

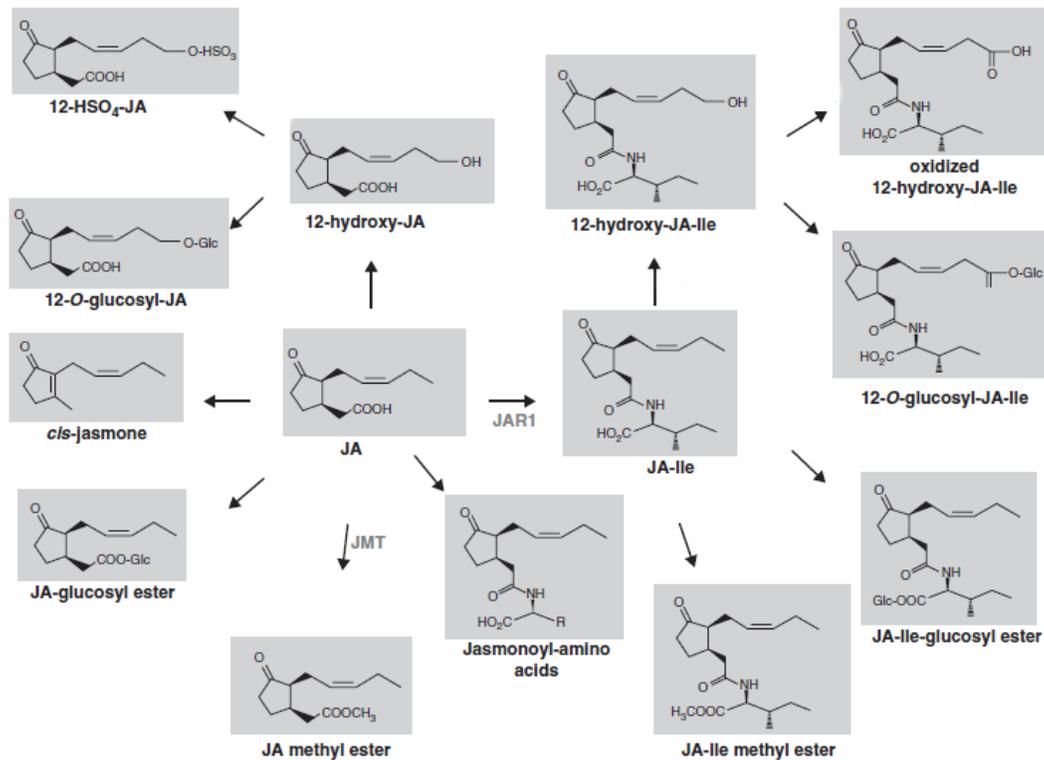


Figura 1.5 Metabolismo del ácido jasmónico (JA) a partir del cual se originan sus diferentes derivados. Las enzimas que han sido caracterizadas, JAR1 (JA-aminoácido sintetasa) y JMT (JA metil transferasa) se encuentran en gris. Imagen adaptada de Wasternack y Hause, 2013.

Los ácidos grasos trienoicos son los principales precursores para la síntesis de los JAs (Vick y Zimmerman, 1984). En *Arabidopsis thaliana*, una planta 16:3, la fuente de ácidos grasos para la síntesis de JAs proviene de dos vías: una octadecanoica a partir del ácido graso 18:3, que conduce a la formación de ácido 12-oxo fitodienoico (OPDA) (Ishiguro et al., 2001), y otra hexadecanoica a partir del ácido graso 16:3 (generalmente contenido en el MGDG), que conduce a la formación de ácido dinor-oxo fitodienoico (dnOPDA) (Stelmach et al., 2001).

La síntesis de JAs a partir de ácidos grasos trienoicos se inicia en los plastidios. El primer paso de esta síntesis consiste en la separación de los ácidos grasos trienoicos de los glicerolípidos a los que se encuentran esterificados. En este proceso intervienen varias enzimas del tipo lipasa o acilhidrolasa. Tradicionalmente, se ha postulado que diferentes tipos de fosfolipasa A (PLA) eran las responsables de la liberación de los ácidos grasos precursores en la síntesis de JAs (Schaller, 2001). Sin embargo, la mayoría de los PUFAs que se encuentran en el cloroplasto se encuentran

asociados a galactolípidos. Sin embargo, en *Arabidopsis* se ha descrito la existencia de acilhidrolasas y galactolipasas que poseen mayor especificidad por los galactolípidos que la PLA (Ellinger et al., 2010). Una vez liberados los ácidos grasos trienoicos, sobre éstos actúan las enzimas Lipoxigenasa (LOX), Aleno Óxido sintasa (AOS) y Aleno Óxido ciclasa (AOC) que sintetizan los intermediarios OPDA y dnOPDA. Seguidamente, estos compuestos se exportan a los peroxisomas, donde tras varios ciclos de β -oxidación se convierten finalmente en JA. Finalmente, el JA sintetizado en los peroxisomas es modificado para obtener compuestos con mayor actividad biológica, como el conjugado JA-Ile o el metil jasmonato (Schaller, 2001; Feussner y Wasternack, 2002; Wasternack y Hause; 2013).

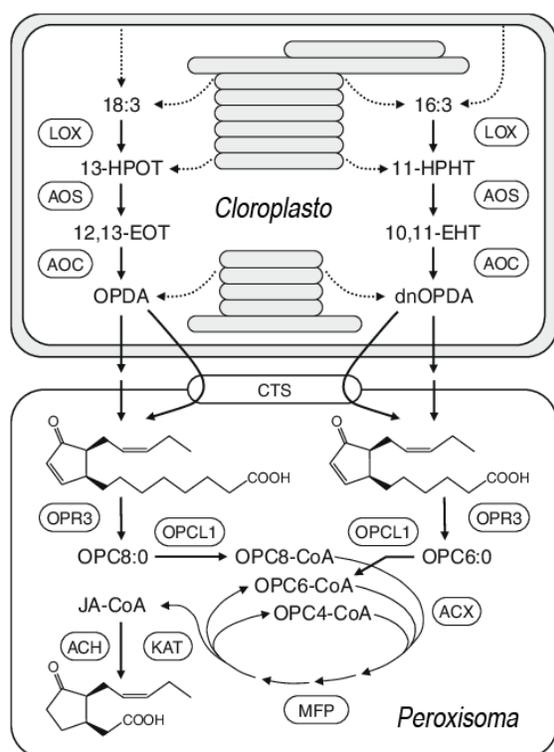


Figura 1.6 Esquema de las reacciones de síntesis de jasmonatos en hojas de *Arabidopsis*. Figura adaptada a partir de Schaller y Stintzi, 2009.

Los jasmonatos ejercen un importante papel en el desarrollo de diferentes tejidos al intervenir en procesos tales como el crecimiento de la raíz, el desarrollo de estambres y del polen o la maduración de los frutos (Staswick et al., 1992; McConn y Browse, 1996; Acosta y Farmer, 2010). No obstante, la función más conocida de estos compuestos es su función clave en las respuestas de defensa de la planta frente a la herida (McConn et al., 1997; Farmer et al., 2003; Lorenzo y Solano, 2005; Wasternack y Hause, 2013). La herida, producida a nivel local por el ataque de herbívoros o

algunos patógenos, desencadena un rápido incremento de los niveles de JA en las hojas en pocos minutos, mediante la inducción de la transcripción de los genes que codifican para las enzimas LOX, AOS, AOC y OPR3 (Stenzel et al., 2003; Taki et al., 2005). Posteriormente, el JA actúa como segundo mensajero activando genes de defensa, que actúan sintetizando compuestos tóxicos o antinutricionales como por ejemplo inhibidores de proteinasas (Wasternack y Hause, 2013). Finalmente, también se conoce que los intermediarios de la síntesis del JA OPDA y dnOPDA, aparte de encontrarse en su forma libre pueden estar esterificados a galactolípidos actuando como moléculas de reserva para la síntesis de JAs, además de tener actividad propia como sustancias antipatogénicas (Acosta y Farmer, 2010).

1.3 DESATURASAS DE ÁCIDOS GRASOS

1.3.1 Desaturasas en *Arabidopsis thaliana*

En plantas, concretamente en *Arabidopsis*, los PUFAs dienoicos y trienoicos constituyen más del 70% de los ácidos grasos presentes en hojas (ver tabla 1.3). La biosíntesis de PUFAs es catalizada por las desaturasas. Las desaturasas de ácidos grasos (FADs, del inglés Fatty Acid Desaturases) realizan la conversión de un enlace simple entre dos átomos de carbono (C-C) a un doble enlace, también llamado enlace insaturado (C=C), en la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos esterificados en lípidos de membrana (Somerville et al., 2000).

La actividad desaturasa se detectó inicialmente en preparaciones de microsomas y cloroplastos de distintos tejidos de plantas (Schmidt y Heinz, 1990; Ohlrogge y Browse, 1995). Sin embargo, la naturaleza hidrofóbica de las desaturasas dificulta considerablemente su caracterización por métodos bioquímicos convencionales, como el desarrollo de métodos de purificación que permitan determinar sus parámetros enzimáticos o la obtención de anticuerpos específicos que permitan analizar su abundancia relativa en los diferentes tejidos de la planta. Sin embargo, la caracterización molecular de una serie de mutantes de *Arabidopsis* deficientes en la insaturación de ácidos grasos en sus lípidos de membrana, permitió la identificación de los genes que codifican las diferentes desaturasas y aportaron datos específicos sobre su número, especificidad de sustrato y su localización celular (Wallis y Browse, 2002).

El genoma de *Arabidopsis thaliana* contiene 8 genes que codifican 8 desaturasas diferentes: *AtFAB2*, *AtFAD2*, *AtFAD3*, *AtFAD4*, *AtFAD5*, *AtFAD6*, *AtFAD7* y *AtFAD8* (ver tabla 1.8). Todas las desaturasas, excepto FAB2, son proteínas integrales de membrana localizadas en dos orgánulos celulares diferentes: FAD2 y FAD3 se localizan en el RE (Dyer y Mullen, 2001), mientras que FAD4, FAD5, FAD6, FAD7 y FAD8 se localizan en los cloroplastos (Browse et al., 1986; Wallis y Browse, 2002; Román et al., 2015). FAB2 (McKeon y Stumpf, 1982), FAD4 y FAD5 (Kunst et al., 1989; Heilmann et al., 2004) introducen una primera insaturación en diferentes posiciones de los ácidos grasos. FAB2 es una acil-ACP desaturasa que actúa sobre ácidos grasos de 18 carbonos localizada en el estroma del cloroplasto, siendo la única desaturasa soluble (Somerville et al., 2000). FAD4 actúa específicamente sobre ácidos grasos de 16 carbonos asociados al PG plastidial, mientras que FAD5 actúa principalmente sobre ácidos grasos de 16 carbonos asociados a galactolípidos y sulfolípidos (Somerville et al., 2000). FAD2 (Miquel y Browse, 1992) y FAD6 (Browse et al., 1989) introducen una segunda insaturación en la posición ω_6 , por lo que reciben el

nombre de ω 6 desaturasas. Por último, FAD3 (Lemieux et al., 1990), FAD7 (Browse et al., 1986) y FAD8 (Gibson et al., 1994; McConn et al., 1994) introducen una tercera insaturación en la posición ω 3, por lo que reciben el nombre de ω 3 desaturasas. Mientras que las desaturasas reticulares FAD2 y FAD3 actúan sobre fosfolípidos, las desaturasas plastidiales FAD6, FAD7 y FAD8 actúan principalmente sobre galactolípidos, sulfolípidos y el PG plastidial (Somerville et al., 2000) (ver figura 1.4).

Esta Tesis doctoral se centra en el estudio de las ω 3 desaturasas plastidiales *AtFAD7* y *AtFAD8* en *Arabidopsis thaliana*.

Gen	Código TAIR	Enzima	Sustrato (lípidos)	Sustrato (AG)	Producto (AG)	Posición doble enlace
FAB2*	At2g43710	Δ 9 estearoil-ACP desaturasa	Acil-ACP*	18:0	18:1 ^{Δ9}	Δ 9
FAD2	At3g12120	Δ 12 oleato desaturasa	PC	18:1 ^{Δ9}	18:2 ^{Δ9,12}	ω 6
FAD3	At2g29980	Δ 15 linoleato desaturasa	PC	18:2 ^{Δ9,12}	18:3 ^{Δ9,12,15}	ω 3
FAD4	At4g27030	Δ 3 <i>trans</i> -palmitato desaturasa	PG	16:0	16:1 ^{Δ3t}	Δ 3
FAD5	At3g15850	Δ 7 <i>cis</i> -palmitato desaturasa	GL, SQ	16:0	16:1 ^{Δ7}	Δ 7
FAD6	At3g30950	Δ 10 palmitoleato desaturasa	GL,SQ,PG	16:1 ^{Δ7}	16:2 ^{Δ7,10}	ω 6
		Δ 12 oleato desaturasa	GL,SQ,PG	18:1 ^{Δ9}	18:2 ^{Δ9,12}	
FAD7	At3g11170	Δ 13 palmitolinoleato desat.	GL,SQ,PG	16:2 ^{Δ7,10}	16:3 ^{Δ7,10,13}	ω 3
		Δ 15 linoleato desaturasa	GL,SQ,PG	18:2 ^{Δ9,12}	18:3 ^{Δ9,12,15}	
FAD8	At5g05580	Δ 13 palmitolinoleato desat.	GL,SQ,PG	16:2 ^{Δ7,10}	16:3 ^{Δ7,10,13}	ω 3
		Δ 15 linoleato desaturasa	GL,SQ,PG	18:2 ^{Δ9,12}	18:3 ^{Δ9,12,15}	

Tabla 1.11 Desaturasas en *Arabidopsis* con sus principales características. Sobre fondo verde se encuentran las desaturasas plastidiales y sobre fondo amarillo las reticulares. (*) indica la única desaturasa soluble, el resto son proteínas de membrana. La posición del doble enlace se indica mediante la terminología Δ o ω según la denominación tradicional de estas enzimas. Tabla adaptada a partir de Somerville et al., 2000.

1.3.1.1 Estructura de los genes de las ω 3 desaturasas

Todas las desaturasas de plantas están codificadas por genes nucleares. En *Arabidopsis* cada ω 3 desaturasa se encuentra codificada por un único gen: *AtFAD3*, *AtFAD7* y *AtFAD8* (Yadav et al., 1993; Gibson et al., 1994). Sin embargo, en otras especies como soja (*Glycine max*) o lino (*Linum usitatissimum*) se han detectado varias isoformas de FAD3 (Bilyeu et al., 2003; Vrinten et al., 2005). En soja se han descubierto dos genes que codifican las diferentes isoformas tanto de FAD7 (GmFAD7-1 y GmFAD7-2) como de FAD8 (GmFAD8-1 y GmFAD8-2), siendo el único caso

hasta el momento en que varias isoformas de ω 3 desaturasas plastidiales han sido detectadas en plantas (Andreu et al., 2010; Román et al., 2012). El estudio de la expresión de estos genes, mostró un comportamiento diferencial de cada una de las isoformas en respuesta a la herida o a las bajas temperaturas, lo que sugiere un alto grado de especialización entre ellas (Andreu et al., 2010; Román et al., 2012). Los genes que codifican las ω 3 desaturasas se encuentran muy conservados, incluso entre especies, aunque existe una clara separación filogenética entre los genes que codifican la ω 3 desaturasa reticular FAD3 con los genes de las ω 3 desaturasas plastidiales. Sin embargo, los genes que codifican las ω 3 desaturasas FAD7 y FAD8, presentan entre ellos una estructura muy similar en plantas, al estar constituidos por 8 exones y 7 intrones, excepto en arroz en cuyo caso los genes solo presentan 7 exones (Upchurch y Ramirez, 2011). Esto sugiere, desde un punto de vista filogenético, que los genes que codifican las ω 3 desaturasas plastidiales FAD7 y FAD8 descienden de un gen común, cuya diferenciación es bastante más reciente que la que les separó del gen que codifica la ω 3 desaturasa reticular FAD3.

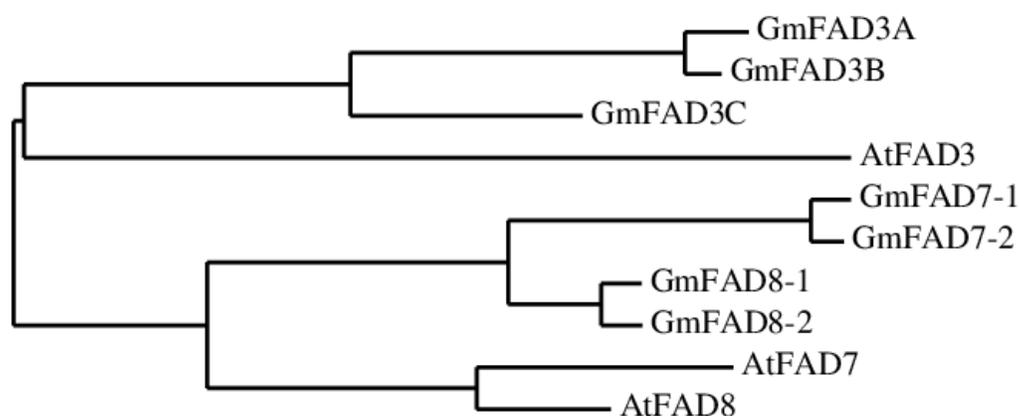


Figura 1.7 Árbol filogenético basado en los genes que codifican las ω 3 desaturasas de *Arabidopsis thaliana* *AtFAD3* (At2g29980), *AtFAD7* (At3g11170) y *AtFAD8* (At5g05580), y las ω 3 desaturasas de soja (*Glycine max*) *GmFAD3A* (Glyma14g37350), *GmFAD3B* (Glyma02g39230), *GmFAD3C* (Glyma18g06950), *GmFAD7-1* (Glyma18g43210), *GmFAD7-2* (Glyma07g18350), *GmFAD8-1* (Glyma01g29630), *GmFAD8-2* (Glyma03g07570). Para la realización de este árbol filogenético se ha utilizado la aplicación Phylogeny.fr (Dereeper et al., 2008).

En la mayoría de plantas, incluida *Arabidopsis*, los genes que codifican las ω 3 desaturasas expresan proteínas de 380-450 aminoácidos, con tamaños predichos de alrededor de 50 kDa. La única desaturasa de plantas que ha sido purificada y cristalizada hasta el momento es la desaturasa soluble FAB2 de ricino (*Ricinus comunis*), y se compone de un homodímero en el que cada uno de los

monómeros consta de 11 α hélices (Lindqvist et al., 1996). Sin embargo, ninguna de las ω 3 desaturasas, al igual que el resto de desaturasas de membrana, ha podido ser cristalizada, por lo que su estructura secundaria y terciaria es desconocida. Este desconocimiento limita la información disponible sobre el centro activo de estas enzimas y su funcionamiento. No obstante, se han descrito 8 residuos de histidina conservados que son esenciales para la función catalítica de las desaturasas, y que se encuentran agrupados en tres regiones llamadas cajas de histidinas (Shanklin et al., 1994). El análisis de las secuencias de aminoácidos de las ω 3 desaturasas en varias especies vegetales, ha revelado que estas cajas de histidinas están altamente conservadas, manteniendo no sólo el número y posición de los residuos de histidina, sino además el del resto de aminoácidos que los acompañan. Se ha propuesto que estas cajas de histidina coordinan los átomos de hierro que intervienen en la reacción de desaturación (Los y Murata, 1998; Somerville et al., 2000). En la mayoría de plantas, entre ellas *Arabidopsis*, las secuencias de aminoácidos de las cajas de histidina de las ω 3 desaturasas son las siguientes: caja Ia, HDCGH; caja Ib, HRTTH; caja II, HVIHH.

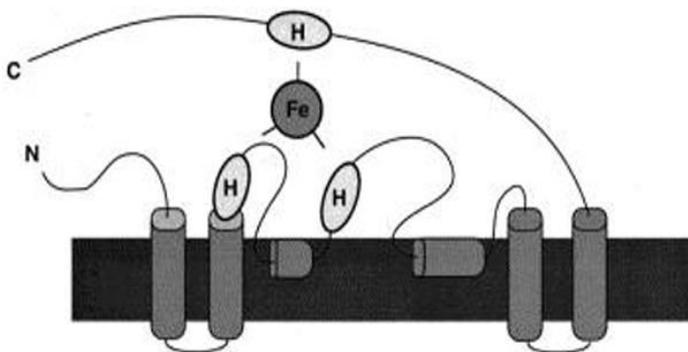


Figura 1.8 Modelo propuesto de estructura secundaria para las desaturasas de membrana. La predicción considera que las cajas conservadas de His coordinadas con átomos de hierro forman parte del centro activo de la enzima. Figura adaptada a partir de Los y Murata, 1998.

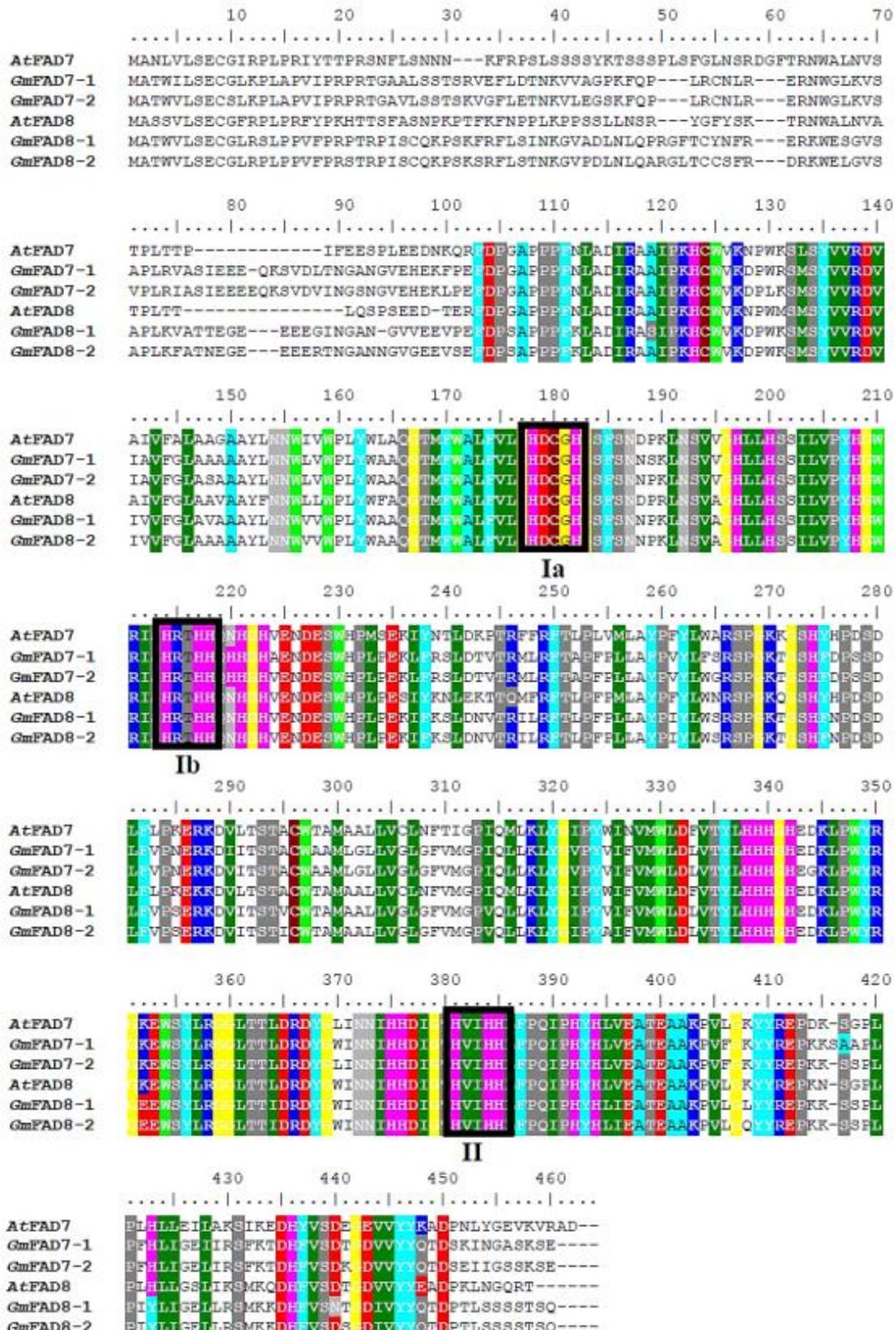


Figura 1.9 Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las ω3 desaturasas plastidiales de *Arabidopsis* y soja. Los recuadros negros indican las cajas de histidina conservadas.

Según el sustrato al que reconocen, hay tres tipos de desaturasas: las acil-CoA desaturasas, las acil-ACP desaturasas y las acil-lípido desaturasas, grupo al que pertenecen las $\omega 3$ desaturasas (Murata y Wada, 1995). Todas ellas son enzimas que catalizan reacciones de oxidación por deshidrogenación donde se necesita de la transferencia de dos electrones además de una molécula de oxígeno. Estas reacciones son altamente estereoselectivas, regioselectivas y quimioselectivas (Behrouzian y Buist, 2002). Las desaturasas reticulares utilizan al citocromo b_5 como donador de electrones (Los y Murata, 1998) mientras que las plastidiales utilizan la ferredoxina como donador de electrones (Schmidt y Heinz, 1990). La recuperación del estado reducido del citocromo b_5 se debe a la acción de la enzima NADH-citocromo b_5 oxidoreductasa (Kearns et al., 1991), mientras que la recuperación de la ferredoxina se debe a la actividad fotosintética, o bien a la acción de la enzima ferredoxina-NADP reductasa en condiciones de oscuridad (Schmidt y Heinz, 1990). El mecanismo enzimático utilizado por las desaturasas es en realidad desconocido, pero se ha propuesto un modelo de funcionamiento similar al de enzimas emparentadas, como algunas monooxigenasas, basado en la existencia de un centro dihierro en su centro activo. En estado basal, el centro dihierro se encuentra en su forma oxidada $Fe^{III}-O-Fe^{III}$, pero la transferencia electrónica desde el donador de electrones origina la forma reducida $Fe^{II}-O-Fe^{II}$. Tras la formación de la forma reducida del centro dihierro, una molécula de oxígeno se une a éste dando lugar a una forma activa del centro dihierro capaz de actuar como oxidante. De esta manera, la transferencia de dos electrones desde el centro dihierro de la enzima hacia dos grupos metileno del ácido graso, genera un doble enlace y una molécula de agua, a la vez que se restituye la forma basal del centro activo de la enzima (Shanklin y Cahoon, 1998; Somerville et al., 2000).

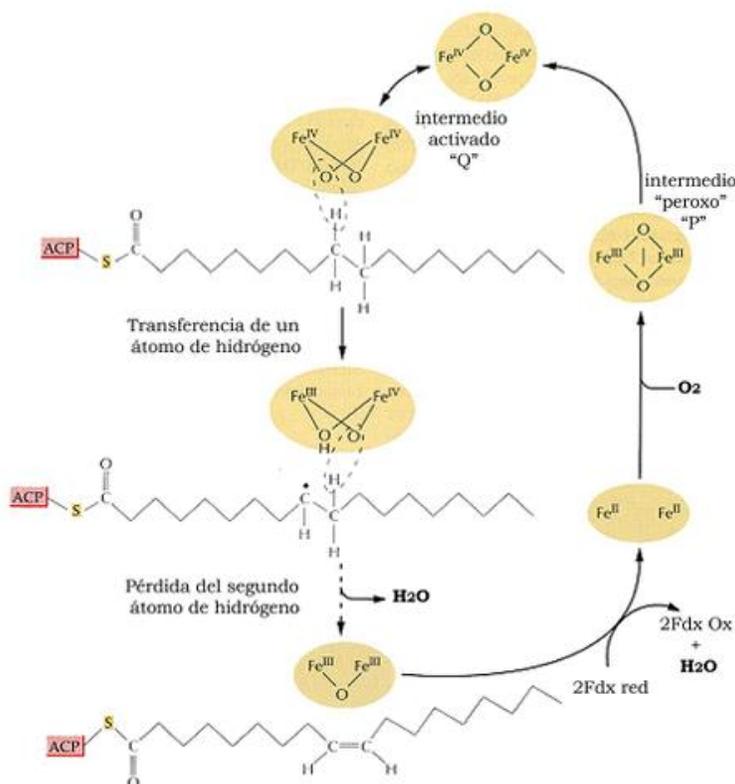


Figura 1.10 Mecanismo catalítico propuesto para la desaturación de ácidos grasos. Figura adaptada a partir de Somerville et al., 2000

1.3.2 Función y regulación de las ω 3 desaturasas plastidiales

Tradicionalmente, se ha considerado que el mayor aporte a la producción de ácidos grasos trienoicos en tejidos no fotosintéticos lo ejerce la ω 3 desaturasa reticular FAD3 (Lemieux et al., 1990), mientras que en tejidos fotosintéticos esta función es ejercida por la ω 3 desaturasa plastidial FAD7 (Browse et al., 1986). Posteriormente, también se identificó el gen de la ω 3 desaturasa plastidial FAD8 a partir de una línea mutante *fad7* de *Arabidopsis* que presentaba bajos niveles de ácidos grasos trienoicos a temperatura control. Sin embargo, también se observó que los bajos niveles de ácidos grasos trienoicos aumentaban cuando las plantas eran sometidas a bajas temperaturas a la vez que también aumentaba la transcripción del gen *FAD8* (Gibson et al., 1994; McConn et al., 1994). De este modo, tradicionalmente se ha considerado a FAD8 como una ω 3 desaturasa plastidial inducible por frío.

En todas las especies vegetales analizadas, se ha visto que las dos ω 3 desaturasas plastidiales FAD7 y FAD8 comparten un alto grado de homología en su secuencia de aminoácidos, con un porcentaje de identidad superior al 85% (Gibson et al., 1994; Berberich et al., 1998; Wang et al., 2006; Martz et al., 2006; Tang et al., 2007; Torres-Franklin et al., 2009; Román et al., 2012) (ver figura 1.9). Esto, unido al hecho de que ambas proteínas son ω 3 desaturasas localizadas en el mismo compartimiento celular, ha llevado a pensar que FAD8 ejerce una función redundante respecto a FAD7 y que, además, ésta sólo llevaría a cabo su función en condiciones de bajas temperaturas. Sin embargo, un reciente análisis funcional realizado en diferentes mutantes de *Arabidopsis* deficientes en su actividad ω 3 desaturasa, ha revelado que estas proteínas difieren en su especificidad, tanto en lo que se refiere a la longitud de la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos como a la naturaleza de la cabeza polar de los lípidos de membrana que reconocen. Así, mientras FAD7 es capaz de desaturar los ácidos grasos 16:2 y 18:2, presentes sobretodo en galactolípidos, FAD8 solamente lo haría con el ácido graso 18:2, mostrando además mayor preferencia por el fosfolípido PG. Además, también se confirmó que FAD8 es activa a temperatura control (Román et al., 2015). Una hipótesis atractiva establecida por Román y colaboradores, consiste en que FAD8 actuaría preferentemente sobre ácidos grasos esterificados en la posición *sn-1* de los glicerolípidos, lo que podría explicar porque esta desaturasa actúa preferentemente sobre sustratos 18:2 (los ácidos grasos 16:2 siempre se encuentran esterificados en la posición *sn-2*) o su alta especificidad por PG (sólo contiene 18:2 en la posición *sn-1*). En cualquier caso, estos hechos demuestran que FAD8 ejerce un papel no redundante y con una función especializada.

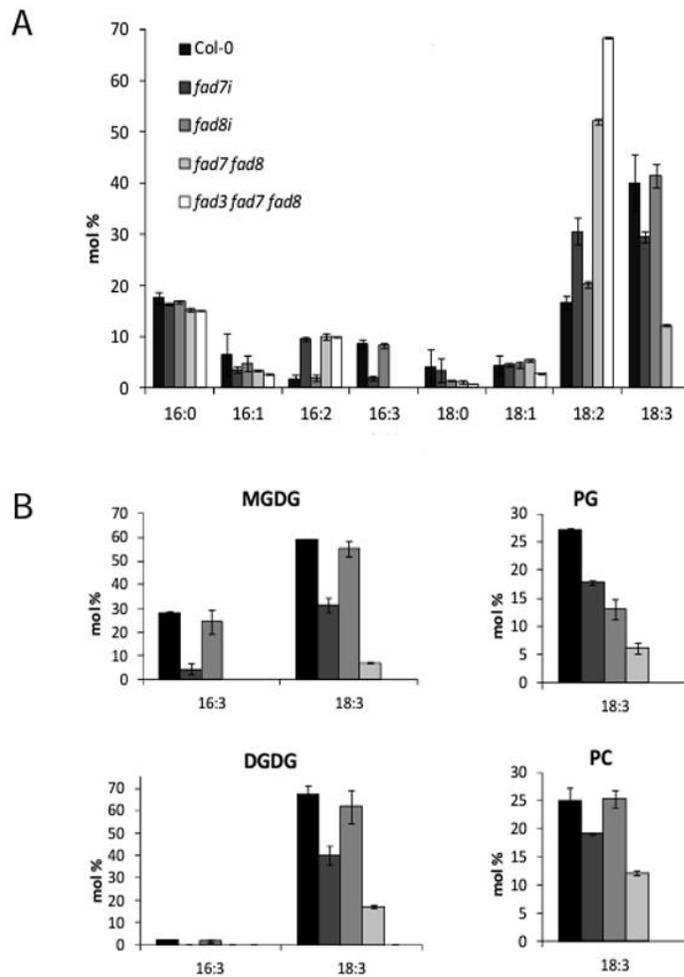


Figura 1.11 (A) Composición de ácidos grasos en lípidos totales y (B) en clases de lípidos a partir de hojas de *Arabidopsis* Col-0 y diferentes líneas mutantes de pérdida de función ω 3 desaturasa crecidas a 22°C. FAD8 es capaz de compensar parcialmente los niveles de 18:3 en el mutante *fad7i* demostrando ser activa a temperatura control. Por otro lado, los niveles de PG son más bajos en el mutante *fad8i*, a diferencia de lo ocurrido en otras clases de lípidos, demostrando que FAD8 tiene una elevada especificidad por este fosfolípido. Figura extraída de Román et al., 2015.

Además de las diferencias existentes respecto a la actividad y especificidad de las ω 3 desaturasas plastidiales, también existen evidencias de que éstas responden de manera diferencial a diferentes estímulos. Se ha observado que existen varios factores que regulan los niveles de expresión de los genes que codifican las ω 3 desaturasas en diferentes especies vegetales, tales como el desarrollo de la planta (Horiguchi et al., 1996, 1998; Lagunas et al., 2013), la luz (Nishiuchi et al., 1995; Horiguchi et al., 1996; Collados et al., 2006), la herida (Hamada et al., 1996; Nishiuchi et al., 1997, 1999) o la temperatura (Gibson et al., 1994; Horiguchi et al., 2000; Matsuda et al., 2005; Román et al., 2012; 2015). No obstante, se desconocen los elementos reguladores exactos que desencadenan la respuesta transcripcional de las ω 3 desaturasas a estos estímulos. Recientemente, se ha identificado al factor de transcripción del tipo cremallera de leucinas bZIP67 como un activador de

la expresión del gen *FAD3* durante la maduración de las semillas en *Arabidopsis* (Mendes et al., 2013). Sin embargo, en el caso de las $\omega 3$ desaturasas plastidiales aún no se ha identificado ninguno.

A continuación, se describe de manera más detallada el papel de las $\omega 3$ desaturasas en la respuesta a la herida y a la temperatura.

1.3.2.1 Efecto de la herida en las $\omega 3$ desaturasas

Las plantas combaten las heridas provocadas por la alimentación de los herbívoros o el ataque de agentes patógenos mediante la activación de una serie de genes de defensa. El JA y sus derivados son las principales moléculas señalizadoras relacionadas con los procesos con la respuesta a herida, y su acumulación permite la inducción de los genes de defensa que protegen a la planta del ataque de herbívoros o algunos patógenos (McConn et al., 1997; Vijayan et al., 1998). El JA se sintetiza a partir de los ácidos grasos trienoicos 18:3 y 16:3 a través la ruta de los octadecanoides y hexadecanoides respectivamente (ver apartado 1.2.3), por lo que las $\omega 3$ desaturasas juegan un papel determinante a la hora de proveer de ácidos grasos trienoicos precursores para la síntesis de JA (Nishiuchi e Iba, 1998). En diferentes tejidos y cultivos celulares de perejil y soja, se ha observado un incremento significativo de la proporción de ácidos grasos trienoicos en presencia de diferentes elicitors bacterianos (Kirsch et al., 1997; Zou et al., 2005) lo que es indicativo de la importancia de estos ácidos grasos en la respuesta a herida o patógenos.

Se ha observado en diferentes especies vegetales, entre ellas *Arabidopsis*, tabaco y soja, que el gen *FAD7* se induce significativamente en situaciones de estrés biológico producido por herida. Esto sucede no sólo en hojas, sino también en tejidos no fotosintéticos como la raíz (Nishiuchi et al., 1997; Reymond et al., 2000; Andreu et al., 2010). Respecto al gen *FAD3*, se ha detectado un incremento de su expresión en hojas heridas de judía mungo (*Vigna radiata*) (Yamamoto et al., 1992) mientras que en otras especies como tabaco, la expresión de *FAD3* permanece inalterada al producirse la herida (Hamada et al., 1996). De este modo, el papel ejercido por *FAD3* en la respuesta a herida es discutido a día de hoy, pero podría depender de la especie vegetal o el tipo de tejido (Nishiuchi e Iba, 1998). Un estudio realizado en el doble mutante *fad7fad8* de *Arabidopsis* demostró que estas plantas presentan una producción muy disminuida de radicales libres de oxígeno (ROS) necesarios para ejercer daño oxidativo a los patógenos que amenazan la planta. Esto pone de manifiesto la importancia de los ácidos grasos trienoicos de origen plastidial para la señalización por JA y la correcta activación de los genes de defensa (Yaeno et al., 2004). Actualmente, se

considera que la inducción del gen *FAD7* en herida, responde a la necesidad de suministrar ácidos grasos trienoicos para la síntesis de JA y de ese modo iniciar los procesos de señalización activados por herida (Nishiuchi e Iba, 1998; Upchurch, 2008). Sin embargo, múltiples estudios sugieren que la respuesta a la herida del gen *FAD7* es independiente de JA (Devoto et al., 2005; Taki et al., 2005; Chaturvedi et al., 2007; Matsuda et al., 2009; Andreu et al., 2010).

1.3.2.2 Efecto de la temperatura en las ω 3 desaturadas

La temperatura es uno de los factores ambientales que más influyen en el crecimiento y desarrollo vegetal, además de determinar la distribución geográfica de las diferentes especies vegetales, siendo el rango de temperaturas que las plantas pueden soportar extremadamente variable (Woodward, 1988). Las bajas temperaturas provocan generalmente una reducción de la actividad enzimática, llegando incluso en casos extremos a producirse la congelación, cuando al formarse cristales de hielo aumenta la concentración de soluto en el interior de las células produciendo plasmólisis y muerte celular. Por otra parte, las altas temperaturas provocan un plegamiento incorrecto de las proteínas, llegando en casos extremos a su completa desnaturalización y pérdida de la función celular.

Sin embargo, las membranas biológicas son uno de los principales puntos de afectación al producirse cambios de temperatura, ya que éstos provocan variaciones en el grado de fluidez de las membranas. De forma general, las bajas temperaturas favorecen la transición de las membranas del estado gel al estado cristalino volviéndolas así más rígidas, mientras que las temperaturas altas favorecen la transición de la membrana del estado gel al estado líquido volviéndolas así más fluidas (Chapman, 1975; Benga y Holmes, 1984; Yeagle, 1989; Iba, 2002; Ruelland y Zachowski, 2010). En cualquiera de los dos casos, el paso de solutos a través de la membrana se ve afectado, a la vez que se produce la desestabilización de los complejos proteicos de membrana, afectándose procesos biológicos tan importantes como la fotosíntesis o la respiración celular, entre otros (Ruelland y Zachowski, 2010).

La fluidez de las membranas biológicas depende de la naturaleza de los glicerolípidos de membrana, así como también de la longitud y el grado de insaturación de los ácidos grasos que los componen (Nishida y Murata, 1996; Iba, 2002). Algunos glicerolípidos, concretamente PG, podrían ejercer un papel específico en la respuesta a las bajas temperaturas. Se ha observado, que los niveles PG saturado son altos (>40% del total de PG) en especies vegetales sensibles al frío, y bajos (<20%

del total de PG) en especies tolerantes al frío (Murata et al., 1982). Posteriormente, también se ha observado que en plantas sensibles al frío, el PG presenta una temperatura de transición entre fase líquida y gel entorno a los 30°C, mientras que en plantas tolerantes al frío esta temperatura es considerablemente más baja, entorno a los 20-15°C (Murata y Yamaya, 1984). Además, también se ha observado que el PG, aunque no es un lípido mayoritario, es vital para la formación de las membranas tilacoidales, y concretamente, para la estabilización de los complejos fotosintéticos (Hagio et al., 2002; Sakamoto et al., 2004; Wada y Murata, 2007). De este modo, se ha sugerido que el contenido de PG saturado/insaturado está estrechamente relacionado con la adaptabilidad de las plantas a la temperatura (Iba, 2002). A parte del contenido de PG, el mecanismo más común de adaptación de las plantas a los cambios de temperatura es la modificación del grado de insaturación de sus ácidos grasos (Somerville et al., 2000; Iba, 2002). Las temperaturas bajas provocan un aumento en la producción de PUFAs, especialmente el 18:3, lo que comporta una mayor tolerancia al frío. Sin embargo, este incremento es muy variable en función de la especie vegetal, el grado de desarrollo, el tipo de tejido, la temperatura de crecimiento y el tiempo de exposición a dicha temperatura (Iba, 2002). El incremento más alto descrito en los niveles de 18:3 tras la exposición a bajas temperaturas, fue de un 22% y se produjo en raíces de trigo (Horiguchi et al., 2000). Sin embargo, en muchos casos este incremento fue considerablemente inferior al esperado, como es el caso de las hojas de abedul (Martz et al., 2006), algodón (Kargiotidou et al., 2008), tabaco (Kodama et al., 1995) o soja (Heppard et al., 1996; Li et al., 2007; Upchurch y Ramirez, 2011) donde se detectaron incrementos de 18:3 entorno al 3-8%. En *Arabidopsis* se han descrito incrementos de 18:3 un poco más elevados, concretamente del 7% (Browse et al., 1986), 12% (Falcone et al., 2004), 13% (McConn et al., 1994) o 15% (Shi et al., 2011) tras la exposición a 18, 17, 12 y 4°C respectivamente. En el sentido contrario, sí que parece existir una relación más clara entre la disminución del grado de insaturación de los ácidos grasos y la tolerancia a las altas temperaturas (Iba, 2002). Por ejemplo, el silenciamiento de una ω 3 desaturasa plastidial de tabaco, producía plantas tolerantes a altas temperaturas (Murakami et al., 2000). Resultados similares se obtuvieron en suspensiones celulares de soja, que presentaban un menor contenido en ácidos grasos trienoicos y una mayor tolerancia a las altas temperaturas (Alfonso et al., 2001). Además en algunos mutantes tolerantes a altas temperaturas, cuyos complejos fotosintéticos presentan un grado de desestabilización menor, se ha detectado una disminución del grado de insaturación de sus ácidos grasos (Hugly et al., 1989; Kunst et al., 1989).

A pesar de que la variación de los niveles de 18:3 es uno de los mecanismos de adaptación a temperatura más descritos, se desconocen las bases moleculares de dicha adaptación. La expresión de las ω 3 desaturasas tras la exposición a bajas temperaturas ha sido estudiada en varias especies,

encontrándose nuevamente una gran diversidad de resultados. Se ha observado que la expresión del gen de la ω 3 desaturasa reticular FAD3 tras su exposición a bajas temperaturas aumenta en varias especies como colza (Tasseva et al., 2004), abedul (Martz et al., 2006) o en raíces de trigo (Horiguchi et al., 2000) y en soja, se ha observado también un aumento de la expresión del gen *GmFAD3A* tras la exposición a 5°C durante 24, 48 y 72 horas (Román et al., 2012). En *Arabidopsis*, la expresión del gen *AtFAD3* en hojas no se inducía tras la exposición a bajas temperaturas, aunque sí se detectó un aumento de su expresión en raíces (Shi et al., 2011). También se ha descrito un control post-traducciona l en el caso de la FAD3 de colza y vernicia relacionado con la temperatura. Estas proteínas al ser expresadas en levaduras, mostraron mayor actividad al disminuir la temperatura y degradarse a temperaturas elevadas (O'Quin et al., 2010). Los niveles de expresión del gen de la ω 3 desaturasa plastidial FAD7 tras la exposición a bajas temperatura presentan comportamientos dispares según la especie analizada. En especies como el abedul, no se detectaron variaciones en los niveles de expresión (Martz et al., 2006) pero en otras como el maíz, el gen *ZmFAD7* disminuía su expresión al bajar la temperatura por debajo de 15°C (Berberich et al., 1998) o como en *Arabidopsis*, donde el gen *AtFAD7* se inducía tras 48 horas de exposición a 4°C, aunque disminuyendo a mayores tiempos de exposición (Shi et al., 2011), del mismo modo que en soja, donde el gen *GmFAD7-2* se inducía tras 24 horas de exposición a 5°C (Román et al., 2012). Por último, en el caso de la ω 3 desaturasa plastidial FAD8, existe un consenso bastante generalizado de que se trata de una desaturasa inducible por frío, tal como se ha comentado anteriormente en el apartado 1.3.2. Además de en *Arabidopsis* (Gibson et al., 1994; Shi et al., 2011; Román et al., 2015), las bajas temperaturas inducen la expresión del gen *FAD8* en la mayoría de especies estudiadas, como maíz (Berberich et al., 1998), arroz (Wang et al., 2006) o abedul (Martz et al., 2006), mientras que en soja su expresión se reduce con temperaturas elevadas (Román et al., 2012). Nuevamente, en el caso de FAD8, además de una regulación transcripcional directa, también se han descrito otros mecanismos de control de tipo post-transcripcional que modulan la actividad de esta enzima en respuesta a los cambios de temperatura. Concretamente, se ha demostrado que la proteína *AtFAD8* se desestabiliza y se degrada a temperaturas elevadas. Esto sugiere que FAD8 está sometida a un control post-traducciona l, donde el extremo C-terminal de esta proteína es determinante para su desestabilización a temperaturas superiores a 22°C (Matsuda et al., 2005).

1.3.3 Localización, distribución y organización de las ω 3 desaturasas en la membrana

Las ω 3 desaturasas son proteínas integrales de membrana. Como se ha comentado anteriormente, su localización celular, purificación y caracterización bioquímica, se han visto dificultadas debido a su alta hidrofobicidad. El elevado grado de homología y la dificultad de utilizar métodos de purificación tradicionales también dificulta el diseño y la obtención de anticuerpos específicos contra estas proteínas, los cuales permitirían estudiar su abundancia relativa en diferentes tejidos de la planta, a lo largo del desarrollo o bajo determinadas condiciones ambientales. A pesar de esto, se han hecho algunos estudios que han permitido determinar la localización de las ω 3 desaturasas mediante la sobreexpresión de estas proteínas fusionadas con proteínas testigo o epítopos intrínsecos, permitiendo así su detección en ausencia de anticuerpos específicos.

La ω 3 desaturasa FAD3 de colza ha sido localizada en el RE mediante técnicas inmunocitológicas tras su sobreexpresión en células de tabaco (Dyer y Mullen, 2001). Por otro lado, las ω 3 desaturasas FAD7 y FAD8 presentan un péptido señal en su extremo N-terminal, lo que indica su localización plastidial (Gibson et al., 1994). Estas desaturasas también han sido detectadas en la envuelta interna del cloroplasto en diferentes estudios de proteómica (Ferro et al., 2003; Froehlich et al., 2003). Recientemente, la localización cloroplástica, y concretamente en las envueltas, de las ω 3 desaturasas *AtFAD7* y *AtFAD8* ha sido confirmada en plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresaban estas proteínas fusionadas con proteínas fluorescentes, permitiendo así su detección (Román et al., 2015). También se observó que tanto *AtFAD7* como *AtFAD8* no se distribuían homogéneamente a lo largo de las envueltas cloroplásticas, sino que se acumulaban en determinados puntos discretos conocidos como *foci* (Román et al., 2015). Aunque el patrón de distribución en *foci* ha sido descrito en otras proteínas de las envueltas del cloroplasto, como por ejemplo MSL2, MSL3, SPD1 y CLMP1 (Haswell y Meyerowitz, 2006; Ruppel et al., 2011; Yang et al., 2011), el hecho de que las ω 3 desaturasas se sobreexpresen, hace que no presenten una regulación endógena, imposibilitando la extracción conclusiones acerca de su distribución genuina en la membrana.

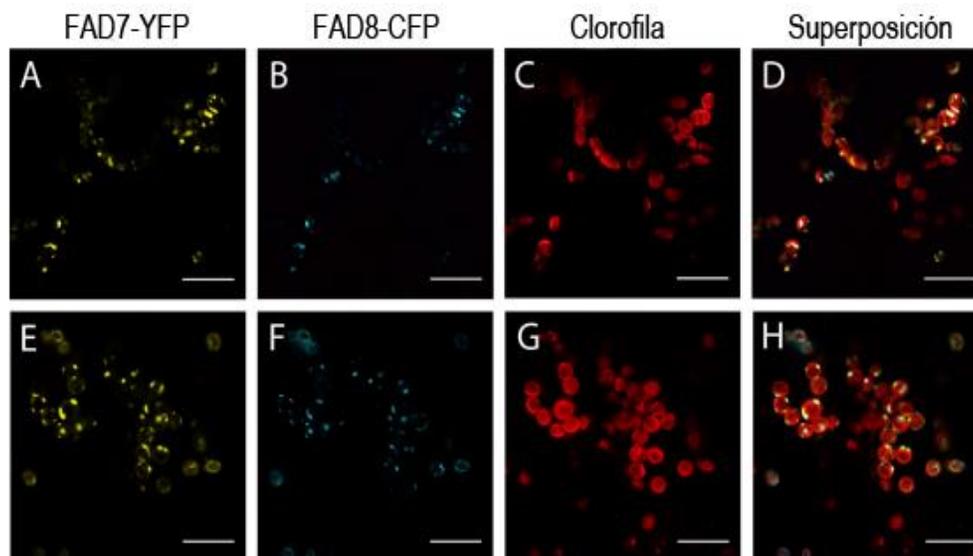


Figura 1.12 Colocalización transitoria de *AtFAD7*-YFP y *AtFAD8*-CFP en hojas de *Nicotiana benthamiana*. (A y E) *AtFAD7*-YFP en amarillo, (B y F) *AtFAD8*-CFP en azul, (C y G) autofluorescencia clorofila en rojo, (D y H) superposición de los canales anteriores, en blanco colocalización de *AtFAD7*-YFP y *AtFAD8*-CFP. Las barras de escala representan 10 μ m. Figura adaptada de Román et al., 2015.

El modo como se organizan las ω 3 desaturasas en la membrana para llevar a cabo su función es también desconocido. Se ha observado mediante experimentos de coexpresión de las ω 6 desaturasas de colza, que FAD2 colocaliza con FAD3 en el RE de células de tabaco (Dyer y Mullen, 2001). En la misma línea, también se ha observado que las ω 3 desaturasas plastidiales *AtFAD7* y *AtFAD8* colocalizan en los cloroplastos de *Arabidopsis* (Román et al., 2015) del mismo modo que también lo hacen con la ω 6 desaturasa plastidial FAD6 respectivamente (datos no publicados). Esto sugiere que estas proteínas se encuentran localizadas en las mismas regiones quedando muy cercanas unas de otras, lo que abre la posibilidad a que puedan interactuar entre ellas organizándose para formar complejos cuaternarios especializados en la desaturación de ácidos grasos. Recientemente, se ha comprobado mediante la técnica del doble híbrido y la complementación biomolecular de la proteína testigo luciferasa, que las ω 3 desaturasas de *Arabidopsis* son capaces de formar homodímeros con ellas mismas y heterodímeros con las ω 6 desaturasas de sus respectivos compartimentos celulares. Otro hallazgo importante es que mediante la coexpresión de proteínas en levadura y el marcaje radioactivo de ácidos grasos, se ha podido observar que el complejo proteico formado por la interacción de *AtFAD3* con la ω 6 desaturasa reticular *AtFAD2* es funcional, ya que, aunque con una proporción menor de la esperada, hasta un 20% del ácido graso 18:3 se producía

directamente a partir del 18:1 a través de la desaturación en cadena mediada por este complejo proteico (Lou et al., 2014). En cualquier caso, la existencia de complejos proteicos especializados en la desaturación en cadena de ácidos grasos aún es poco clara a día de hoy.

2. OBJETIVOS

Esta Tesis doctoral se centra en el estudio de las ω 3 desaturasas plastidiales FAD7 y FAD8 en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. El alto grado de hidrofobicidad de estas proteínas dificulta mucho su purificación y posterior análisis bioquímico, lo que ha impedido que datos claves de su biología como su abundancia relativa, determinación de parámetros enzimáticos o su precisa localización subcelular sean conocidos a día de hoy. De hecho, el análisis funcional de las desaturasas se ha visto limitado en la mayoría de casos al estudio de la expresión de los genes y a su correlación con los niveles de ácidos grasos trienoicos en diferentes mutantes deficientes en la función desaturasa.

En los últimos años se ha analizado la expresión de los genes que codifican estas enzimas en respuesta a multitud de factores ambientales, tales como la luz, la temperatura o la herida. En aquellos casos en los que se ha realizado un análisis comparado, se ha visto que ambos genes presentan respuestas diferentes a algunos de estos estímulos ambientales. Sin embargo, los elementos reguladores implicados en estas respuestas son a día de hoy desconocidos. Se desconocen que factores de transcripción y a través de que elementos de las rutas de señalización celular se lleva a cabo el control específico de la expresión de ambos genes. Por eso, en este trabajo se pretende la realización de un análisis funcional de los promotores de las ω 3 desaturasas plastidiales para identificar los elementos reguladores en *cis* y factores de transcripción encargados de la regulación transcripcional de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8*, que codifican las dos ω 3 desaturasas plastidiales de *Arabidopsis*. Los datos obtenidos permitirán una mejor comprensión de la regulación de estas proteínas, analizando de manera precisa el grado de coordinación entre estas enzimas para mantener el grado de insaturación de las membranas.

Los estudios de localización subcelular de las ω 3 desaturasas realizados con plantas sobreexpresoras limitan las conclusiones sobre su distribución genuina en las membranas plastidiales e impiden extraer cualquier conclusión acerca de su abundancia relativa. De este modo, se pretende abordar el estudio de la localización subcelular, distribución y abundancia relativa de estas proteínas en plantas donde su regulación sea endógena. Paralelamente, también se estudiará el modo en que las ω 3 desaturasas se organizan en las membranas plastidiales para llevar a cabo su función. Datos obtenidos recientemente, sugieren que estas proteínas co-localizan entre ellas y con la ω 6 desaturasa plastidial FAD6. De ese modo, se analizará si estas proteínas son capaces de interactuar entre ellas *in vivo*. El estudio de la localización subcelular, distribución y posible interacción de las desaturasas plastidiales permitirá una mejor comprensión de su funcionamiento dentro de la ruta secuencial de desaturación.

Por todo ello, esta Tesis doctoral se ha centrado en los siguientes objetivos específicos:

- 1. Análisis funcional de los promotores de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8* e identificación de elementos reguladores (secuencias reguladoras en *cis* y factores de transcripción) encargados su regulación transcripcional en los diferentes tejidos de la planta y en respuesta a determinados estímulos ambientales (luz, temperatura, herida) y hormonales.**
- 2. Análisis comparado de los niveles de abundancia relativa de las ω 3 desaturasas plastidiales *AtFAD7* y *AtFAD8* en los diferentes tejidos de la planta y en respuesta a determinados estímulos ambientales (luz, temperatura, herida) y hormonales.**
- 3. Análisis de la localización subcelular, distribución y organización en la membrana de las ω 3 desaturasas plastidiales *AtFAD7* y *AtFAD8*.**

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

3.1.1 Especies vegetales utilizadas

Este trabajo se ha realizado utilizando como base de estudio la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

Arabidopsis thaliana es una planta herbácea pequeña de la familia de las crucíferas o brasicáceas (Brassicaceae), endémica de Europa, Asia y el noreste de África. Una serie de características hacen que sea idónea para ser utilizada como organismo modelo en la investigación fitobiológica. Se trata de una planta con un ciclo de vida relativamente corto (6-8 semanas), de fecundación autógama, que produce numerosas semillas que permanecen viables durante muchos años y fácilmente transformable. Desde el punto de vista genético, es además, un organismo diploide, con un genoma compacto organizado en 5 cromosomas. Su genoma posee un tamaño aproximado de 135 Mpb, por lo que se trata de la planta superior con el genoma más pequeño conocido. Además, su genoma se encuentra completamente secuenciado.

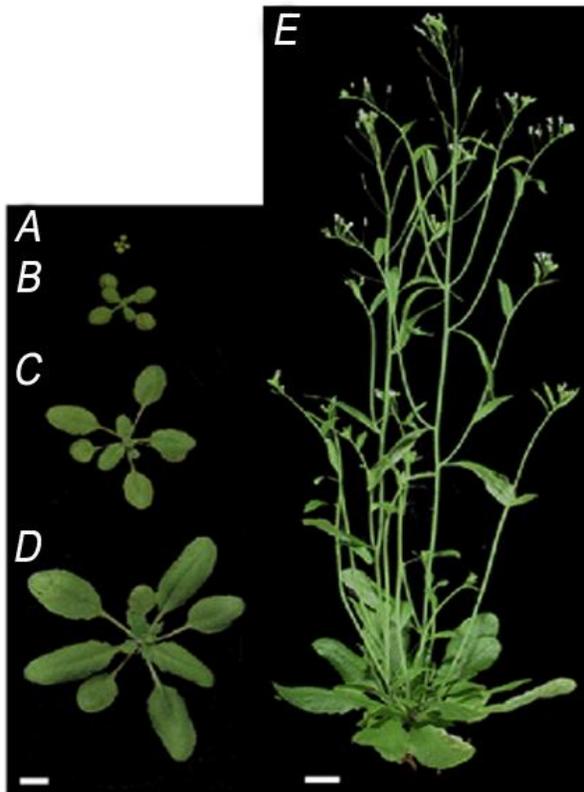


Figura 3.1 Plantas de *Arabidopsis thaliana* a diferentes estadios de desarrollo desde la germinación: (A) 1 semana (B) 2 semanas (C) 3 semanas (D) 4 semanas (E) 6 semanas. Imagen extraída de Ecured (https://www.ecured.cu/Arabidopsis_thaliana)

Todas las líneas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en este estudio derivan de la línea silvestre Columbia-0. Durante el desarrollo de esta Tesis doctoral, se han generado una serie de líneas transgénicas estables basadas en fusiones promotor::GUS y en fusiones promotor::proteína-GFP.

Nombre	Vector destino	Transformación	Marcador selección	
			Bacteria	Planta
Análisis funcional de los promotores de los genes <i>FAD7</i> y <i>FAD8</i>				
FAD7p1,7kb-GUS	pMDC163	Estable	Kan	Hyg
FAD7p1kbdist.-GUS	pMDC163	Estable	Kan	Hyg
FAD7p0,7kb-GUS	pMDC163	Estable	Kan	Hyg
FAD7p0,5kb-GUS	pMDC163	Estable	Kan	Hyg
FAD8p3kb-GUS	pMDC163	Estable	Kan	Hyg
FAD8p1kbdist.-GUS	pMDC163	Estable	Kan	Hyg
FAD8p1,9kb-GUS	pMDC163	Estable	Kan	Hyg
FAD8p0,7kb-GUS	pMDC163	Estable	Kan	Hyg
FAD8p0,3kb-GUS	pMDC163	Estable	Kan	Hyg
Análisis de la abundancia relativa de las proteínas <i>FAD7</i> y <i>FAD8</i>				
FAD7p1,7kb::FAD7-GFP	pH7m34GW	Estable	Sm/Sp	Hyg
FAD8p3kb::FAD7-GFP	pH7m34GW	Estable	Sm/Sp	Hyg
Estudio de interacción entre las proteínas <i>FAD7</i>, <i>FAD8</i> y <i>FAD6</i> (BIFC)				
35S::FAD7-nYFP	pUC-SPYNE	Transitoria	Amp	
35S::FAD8-nYFP	pUC-SPYNE	Transitoria	Amp	
35S::FAD6-nYFP	pUC-SPYNE	Transitoria	Amp	
35S::FAD7-cYFP	pUC-SPYCE	Transitoria	Amp	
35S::FAD8-cYFP	pUC-SPYCE	Transitoria	Amp	
35S::FAD6-cYFP	pUC-SPYCE	Transitoria	Amp	

Tabla 3.1 Listado de las construcciones génicas generadas durante el desarrollo de esta Tesis doctoral.

Además se utilizaron mutantes obtenidos de los bancos de semillas del Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC). Estos mutantes fueron concretamente, el mutante de inserción *myb44* (NASC ID: N67843) y el mutante inducido químicamente por EMS *ice1-1* (NASC ID: N665207). La caracterización genética de estos mutantes se detalla más adelante (ver apartado 3.3.5.3).

3.1.2 Cultivo en placa de *Arabidopsis thaliana*

Para la siembra y posterior cultivo de *Arabidopsis*, las semillas utilizadas fueron previamente sometidas a un protocolo de esterilización durante 3 minutos. La solución de esterilización contenía lejía comercial al 50% (v/v) y una gota de Tween-20 (Bio-Rad). Posteriormente, las semillas fueron tratadas con Etanol 70% (v/v) durante 1 minuto y lavadas 5 veces con agua destilada ultrapura estéril.

La siembra de semillas se llevó a cabo en placas de Petri con medio de cultivo sólido. El medio de cultivo utilizado fue el denominado Murashige-Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962), complementado con sacarosa y ajustado a un pH de 5,7. Según las necesidades experimentales, también se complementaba con la adición de antibióticos, usados a modo de marcadores selectivos. La composición del medio MS se detalla a continuación.

Ingrediente	Concentración (g/l)
MS including vitamins (Sigma-Aldrich)	4,3
Sacarosa	10
MES	0,5
Agar Planta	8
Antibiótico	Concentración (µg/ml)
Higromicina	25 µg/ml

Tabla 3.2 Composición del medio Murashige-Skoog (MS) (Murashige-Skoog, 1962) utilizado para el cultivo en placa de *Arabidopsis*. Todos los antibióticos utilizados pertenecen a la casa comercial Duchefa Biochemie.

Para su siembra, las semillas se resuspendieron en agua destilada ultrapura + agarosa 0,1% (p/v) autoclavada, y se depositaron sobre el medio de cultivo con ayuda de una micropipeta y puntas estériles. Todo el proceso de siembra se llevó a cabo en condiciones de esterilidad, trabajando bajo una campana de flujo laminar.

Finalmente, las placas con semillas fueron selladas con cinta porosa (Leukopor®), envueltas en papel de aluminio y guardadas en la nevera a 4°C durante un periodo de estratificación de 3 días para sincronizar su germinación. Tras la estratificación, las placas se llevaron a las cámaras de cultivo.



Figura 3.2 Cultivo de *Arabidopsis* en placa con medio MS, plantas de 2 semanas.

Las semillas sembradas en placa germinaron y crecieron en la cámara bioclimática Conviron CMP 6010 bajo condiciones controladas de intensidad de luz ($150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), fotoperiodo (16 h luz / 8 h oscuridad), temperatura (20-22°C) y humedad relativa (50%).

Posteriormente, fueron utilizadas en los experimentos o en caso de ser necesario, las plantas se transfirieron a maceta.

3.1.3 Crecimiento de plantas de *Arabidopsis thaliana* en maceta

Tras 2-3 semanas de crecimiento en placa, las plantas se transfirieron a maceta con ayuda de unas pinzas de plástico sin relieve, para evitar dañarlas en la medida de lo posible. En algunos casos, cuando las plantas querían utilizarse para propagar semillas o cuando plantas silvestres iban a ser utilizadas para ser transformadas, las semillas se sembraron directamente en maceta, eliminando el paso de cultivo en placa.

Las macetas se rellenaron con una mezcla de turba:vermiculita 3:1 (v/v) con fertilizante Osmocote® (Ibercampo) a una concentración de 1,5 g/l. También se espolvoreó sobre la superficie una muy

pequeña cantidad del insecticida Chas 5G® (Cheminova Agro), que contiene cloropirifos 5% (p/p), para evitar la aparición de larvas de dípteros u otros insectos. Finalmente, tras humedecer la tierra y esperar unos minutos a que el insecticida se disolviese, las plantas eran transferidas (o sembradas) a maceta.



Figura 3.3 Cultivo de *Arabidopsis* en maceta, plantas de 5 semanas.

Las plantas en macetas crecieron en una cámara bioclimática Fitoclima 10000 EHHF (Aralab) con condiciones similares a las descritas en el apartado 3.1.2, pero con una intensidad de luz superior ($180\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Para la obtención de protoplastos (ver apartado 3.6.2.1) o para experimentos de fraccionamiento celular (ver apartado 3.7.1.1), las plantas se crecieron bajo fotoperiodo de ciclo corto (8 h luz / 16 h oscuridad) para favorecer la formación de la roseta. El aporte de agua se realizó 1 o 2 veces por semana, según las necesidades de cada planta.

3.1.4 Propagación, obtención y almacenamiento de semillas

Cuando el objetivo era favorecer la propagación y la posterior obtención de semillas, las plantas en maceta se dejaron crecer durante 6-8 semanas para permitir su desarrollo completo, es decir, la floración y el posterior desarrollo de las silicuas con semillas. Para facilitar el posterior trabajo, los tallos de las plantas se enrollaban sobre guías de madera. Al empezar a secarse las silicuas, se introdujo la parte aérea de las plantas en bolsas de papel parafinado transpirables, de modo que a medida que las silicuas se abrían las semillas caían al interior de la bolsa.

Al secarse completamente las plantas, las bolsas con las semillas ya maduras en el interior se retiraban. El contenido de las bolsas se vertió sobre un colador, y las semillas se separaron del resto de partes secas de la planta a lo largo de sucesivos procesos de tamización. Finalmente, las semillas se introdujeron en tubos eppendorf y se almacenaron en la nevera a 4°C para su posterior utilización.



Figura 3.4 Proceso de obtención de semillas de *Arabidopsis*.

3.1.5 Tratamientos experimentales sobre cultivos de *Arabidopsis thaliana*

A lo largo del desarrollo de este trabajo, se han realizado diferentes tratamientos experimentales. Dichos tratamientos fueron: herida, baja temperatura, alteraciones en el ciclo luz/oscuridad y diferentes tratamientos hormonales. Generalmente, las plantas se crecieron en placas de medio MS durante 2 semanas y, transcurrido ese tiempo, se procedió a la realización del tratamiento. En caso de querer evaluarse el efecto del tratamiento a lo largo de varias etapas del desarrollo de la planta, el tiempo de crecimiento se varió ajustándose a las necesidades experimentales. Tras la realización del tratamiento, todo material vegetal no analizado *in situ* se congeló con N₂(l) y se almacenó en un congelador a -80°C para su posterior análisis. De forma general, se realizaron tres réplicas biológicas por cada tratamiento

3.1.5.1 Herida

El tratamiento de herida sobre tejido foliar se realizó empleando un punzón o una punta de pipeta usada a modo de aguja, presionando sobre la hoja, o bien, apretando ligeramente con unas pinzas

metálicas con relieve. Cuando la herida se realizaba sobre tejido radicular, el tejido simplemente se cortaba con un bisturí.

3.1.5.2 Bajas temperaturas

Para el cultivo de plantas a baja temperatura, las plantas se transfirieron a la cámara bioclimática GER-700 ESP (Radiber). A partir de ese momento, las plantas permanecieron durante 6 días a una temperatura de 6-8°C antes de ser analizadas o almacenadas. El resto de condiciones de la cámara bioclimática eran similares a las descritas en el apartado 3.1.2. Algunas plantas se crecieron a 20-22°C como tratamiento control.

3.1.5.3 Ciclos luz / oscuridad

Para evaluar en efecto de los ciclos de luz / oscuridad se trabajó con plantas crecidas bajo un fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad sometidas a un periodo adicional de 10 horas de luz o de 10 horas de oscuridad antes de su recolección.

En estos casos, todas las plantas se recolectaron a la misma hora, con el objetivo de controlar de la manera más exacta posible las horas de exposición a luz y a oscuridad. El resto de condiciones de la cámara bioclimática eran similares a las descritas en el apartado 3.1.2.

3.1.5.4 Tratamientos hormonales

En este trabajo se han realizado tratamientos hormonales con ácido abscísico (ABA) y con metil jasmonato (MeJA). Para ello, las plantas se transfirieron a placas con medio MS suplementado con 100 µM de (+/-)-ABA (Sigma-Aldrich) o a placas con medio MS suplementado con 100 µM de MeJA (Sigma-Aldrich). Los tratamientos hormonales con ABA tuvieron una duración de 2 o 48 horas según las necesidades experimentales, mientras que los tratamientos con MeJA tuvieron una duración de 2 horas y posteriormente, las plantas se analizaron o almacenaron. Plantas crecidas en placas con medio MS suplementado con 100 µM de metanol se utilizaron como control, ya que el metanol fue utilizado como solvente para el ABA. En el caso del MeJA, la hormona se encontraba disuelta en agua y se utilizaron plantas crecidas en placas con medio MS estándar como control.

Para demostrar la efectividad de los diferentes tratamientos hormonales, se determinó el grado de expresión génica mediante PCR semicuantitativa (ver apartado 3.3.5.1) de los genes *AtABI1* (At4g26080) y *AtLOX2* (At3g45140), genes marcadores de la respuesta a ABA y MeJA, respectivamente, y que fueron utilizados a modo de control positivo.

3.2 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

3.2.1 Identificación y análisis *in silico* de promotores

En primer lugar, se identificaron las localizaciones y las secuencias exactas en el genoma de *Arabidopsis thaliana* de los genes *AtFAD7* (At3g11170) y *AtFAD8* (At5g05580), utilizando la base de datos The Arabidopsis Information Resource (TAIR) (<https://www.arabidopsis.org>). Posteriormente, las secuencias nucleotídicas situadas delante del ATG de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8* se descargaron en formato FASTA y se procedió a su análisis bioinformático.

Para el análisis bioinformático de estas secuencias, se utilizaron los programas Plant Cis-Acting Response Elements software (PlantCare) (Lescot et al., 2002) y Plant Cis-Acting Regulatory DNA Elements (PLACE) (Higo et al., 1999). Estos programas contienen una base de datos con secuencias reconocidas por factores de transcripción en plantas superiores, en muchos casos con una breve explicación, organismo o referencias bibliográficas de éstas. De este modo, al introducir una secuencia determinada, el programa identifica todos los sitios de unión putativos de factores de transcripción presentes en la base de datos y que están contenidos en dicha secuencia. Los enlaces a estos programas se adjuntan a continuación:

PlantCare: <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>

PLACE: <http://nhjy.hzau.edu.cn/kech/swxxx/jakj/dianzi/Bioinf6/GeneFeature/BCM6.htm>

Finalizado el análisis bioinformático, se localizaron en la secuencia nucleotídica todos los elementos de regulación en cis detectados por el programa y que fuesen propios de *Arabidopsis*. Esto permitió delimitar el tamaño de los promotores putativos de *AtFAD7* y *AtFAD8*, basándose en la presencia o ausencia de elementos reguladores, así como también la distribución de estos elementos a lo largo del promotor. De este modo, se determinó como posible secuencia de trabajo del promotor de *AtFAD7* una secuencia de 1682 pb, y de 2958 pb en el caso del promotor de *AtFAD8*.

3.3 ÁCIDOS NUCLEICOS

3.3.1 Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA genómico (gDNA) de *Arabidopsis* se realizó mediante el uso del surfactante catiónico bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), siguiendo el protocolo establecido por Doyle and Doyle, 1990 con algunas adaptaciones.

Para la extracción de DNA genómico, se partió de 100 mg de tejido foliar congelado previamente en N₂(l). El material vegetal todavía congelado se homogeneizó mediante la utilización de un molino de bolas Retsch MM400 (Retsch) programado a 30 agitaciones / s durante 1 minuto, hasta convertirse en un polvo fino. Posteriormente, se añadieron 500 µl de solución de extracción CTAB previamente calentado a 60°C, y la mezcla se incubó durante 40 minutos a 60°C, agitando suavemente por inversión cada 5 minutos. La composición de la solución de extracción CTAB se detalla a continuación.

Solución CTAB: Tris-HCl 100 mM a pH 8,0, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, CTAB 2% (p/v), PVP 1% (p/v), β-mercapto-etanol 0,2% (v/v).

Tras esta incubación, se centrifugó la muestra a 10.000 rpm, a 4°C y durante 10 min, y se recuperó el sobrenadante. Se añadieron 400 µl de Cloroformo – Isoamil alcohol 24:1 (v/v) y la mezcla se agitó suavemente por inversión durante 2 minutos. Seguidamente, se centrifugó la muestra a 10.000 rpm durante 5 minutos y se recuperó la fase acuosa. Llegados a este punto, y aunque se trata de un paso opcional, se consideró conveniente eliminar la contaminación por trazas de RNA mediante un tratamiento RNasa. Para ello, se añadió 1 µl de RNasa A 10 µg/ml (Roche) y se incubó la muestra a 37°C durante 30 minutos. Tras este tratamiento, se añadieron 300 µl de isopropanol, se agitó la muestra suavemente por inversión y se incubó a -20°C durante 2 horas para precipitar el gDNA. A continuación, se centrifugó la muestra a 10.000 rpm durante 3 min y en este caso, se descartó el sobrenadante. El precipitado con el gDNA se lavó con etanol 75% (v/v), se dejó secar al aire y finalmente, se resuspendió en 50 µl de agua destilada ultrapura.

El gDNA obtenido se cuantificó espectrofotométricamente (ver apartado 3.3.6). Se comprobó su integridad mediante un gel de agarosa (ver apartado 3.3.7). Generalmente, se obtuvieron rendimientos superiores a 1 µg/µl por muestra. Las muestras con gDNA se almacenaron a -20°C para su posterior utilización.

3.3.2 Extracción de DNA plasmídico

Para extraer el DNA plasmídico se partió de 5 ml de cultivo bacteriano de *E. coli* crecido bajo las condiciones especificadas en el apartado 3.3.11.4. Los 5 ml de cultivo se centrifugaron a 13.000 rpm durante 1 min para precipitar todas las bacterias. El DNA plasmídico se extrajo mediante el método de lisis alcalina y purificación en columna, utilizando el producto comercial GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante.

Alternativamente, si se precisaba de un mayor rendimiento para la extracción de DNA plasmídico, se partió de 25 ml de cultivo y las bacterias se centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 min para su total sedimentación. En este caso, el método de la lisis alcalina se realizó utilizando los reactivos suministrados por el producto comercial (escalando los volúmenes a las nuevas condiciones de partida), pero el proceso de purificación en columna fue substituido por un proceso de desproteinización y precipitación de DNA tradicional y similar al descrito en el apartado 3.3.1.

El DNA plasmídico obtenido se cuantificó espectrofotométricamente (ver apartado 3.3.6). Generalmente, se obtuvieron rendimientos de 100-300 ng/μl por muestra cuando se purificaba en columna, o superior a 3 μg/μl. Las muestras con DNA plasmídico se almacenaron a -20°C hasta su posterior utilización.

3.3.3 Extracción de RNA total

La extracción de RNA total de *Arabidopsis* se realizó según el método de tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo establecido por Chomczynski y Sachi, 1987. Se utilizó el reactivo comercial TRIzol (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante, con algunas adaptaciones.

Para la extracción de RNA total, se partió como mínimo de 100 mg de tejido foliar o radicular congelado previamente en N₂(l). El material vegetal todavía congelado se homogeneizó mediante la utilización de un molino de bolas Retsch MM400 (Retsch) programado a 30 agitaciones / s durante 1 minuto, hasta convertirse en un polvo fino. Posteriormente se añadieron 1 ml de TRIzol por cada 100 mg de tejido de partida agitando vigorosamente durante 15 segundos y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Seguidamente, se añadieron 200 μl de cloroformo por cada 1 ml de TRIzol agitando vigorosamente durante 15 segundos, y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos. A continuación, la muestra se centrifugó a 10.000 rpm a

4°C durante 15 minutos y se recuperó la fase acuosa. Tras esto, se añadieron 500 µl de isopropanol por cada 1 ml de TRIzol agitando la mezcla suavemente por inversión, y la muestra se incubó a -20°C como mínimo durante 2 horas para precipitar el RNA. Luego, se centrifugó la muestra a 10.000 rpm a 4°C durante 10 minutos y, en este caso, se descartó el sobrenadante. El precipitado con el RNA se lavó con etanol 75% (v/v) disuelto en agua destilada ultrapura con dietil pirocarbonato (DEPC) 0,1% (v/v), se dejó secar al aire y finalmente, se resuspendió en 40 µl de agua destilada ultrapura con DEPC 0,1% (v/v).

El RNA obtenido se cuantificó mediante espectrofotómetro (ver apartado 3.3.6) y se comprobó su integridad mediante un gel de agarosa (ver apartado 3.3.7). Generalmente, se obtuvieron rendimientos superiores a 1 µg/µl por muestra. Las muestras con RNA se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización.

3.3.4 Síntesis de cDNA

La síntesis de DNA complementario (cDNA) se realizó mediante la hibridación con Oligo dT y utilizando la enzima retrotranscriptasa M-MLV Reverse Transcriptase (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas adaptaciones. Se partió como mínimo de 3 µg de RNA total extraído anteriormente (ver apartado 3.3.3), al que se le realizó un tratamiento DNasa para su purificación.

Los 3 µg de RNA se disolvieron con agua destilada ultrapura con DEPC 0,1% (v/v) en un volumen de 10 µl, al que se le añadieron 0,2 µl de enzima DNasa I recombinant 10 U/µl (Roche) y 1 µl de tampón DNasa 10x. El tratamiento DNasa se realizó incubando la muestra a 37°C durante 15 minutos. Posteriormente, la enzima DNasa se inactivó añadiendo a la mezcla 0,5 µl de EDTA 0,2 M e incubando a 75°C durante 10 minutos.

Finalizado el tratamiento DNasa, al RNA purificado se le añadieron 0,68 µl de Oligo dT 50 µM (Isogen) por cada µg RNA de partida, y agua destilada ultrapura con DEPC 0,1% (v/v) hasta un volumen de 15 µl. Posteriormente se realizó una incubación a 70°C durante 5 minutos y seguidamente, a 4°C durante 5 minutos más. A continuación, se sintetizó el cDNA añadiendo 10 µl de mezcla de retrotranscripción e incubando a 42°C durante 1 hora. Finalmente, se añadieron 0,4 µl de RNasa H 5 U/µl (Thermo Scientific™) y se incubó a 37°C durante 20 minutos para eliminar el RNA. La composición de la mezcla de retrotranscripción se detalla a continuación.

- Mezcla de retrotranscripción:
- 5 μ l tampón M-MLV 5x (Promega).
 - 1,25 μ l dNTPs 10 mM.
 - 0,6 μ l RNasa OUT 40 U/ μ l (InvitrogenTM, Thermo Scientific).
 - 1 μ l M-MLV Reverse Transcriptase 200 U/ μ l (Promega).
 - agua destilada ultrapura con DEPC 0,1% (v/v) hasta 10 μ l.

El cDNA obtenido se diluyó añadiendo agua destilada ultrapura hasta un volumen de 100 μ l y las muestras se almacenaron a -20°C para su posterior utilización. La integridad del cDNA sintetizado se comprobó mediante la amplificación por PCR semicuantitativa (ver apartado 3.3.5.1) de un exón del gen constitutivo *AtACTIN1* (At2g37620).

3.3.5 Técnicas de PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés, polymerase chain reaction) consiste, en la amplificación de un fragmento específico de DNA mediante en un determinado número de ciclos, generalmente entre 25 y 40, compuestos por tres etapas que se repiten sucesivamente: una etapa de desnaturalización del DNA a 95-98°C durante 30 segundos, una etapa de hibridación de los cebadores durante 30 segundos y una etapa de extensión de la cadena de DNA a 72°C. Además la PCR consta de una etapa inicial de activación de la polimerasa a 95-98°C durante 5 minutos, y una etapa final de extensión a 72°C durante 10 minutos.

La temperatura de hibridación (T_h) es específica de cada pareja de cebadores y se calcula empíricamente a partir de la temperatura de fusión (T_m) más baja de la pareja de cebadores. Generalmente se utilizó como T_h la $T_m + 2^\circ\text{C}$. La duración de la etapa de extensión depende de la longitud del fragmento de DNA a amplificar y de la velocidad de amplificación de la polimerasa (generalmente se precisa 1 min / Kpb, aunque existen polimerasas modificadas que amplifican a mayor velocidad).

Todas las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Thermo Scientific) o en el C1000 TouchTM Thermal Cycler (Bio-Rad). Se utilizaron polimerasas con propiedades distintas según el tipo de reacción de PCR realizada. El

listado de cebadores con sus respectivas T_m utilizados en este trabajo se puede consultar en el apartado 3.3.5.5.

3.3.5.1 PCR semicuantitativa

La amplificación rutinaria de DNA se realizó utilizando una Taq DNA polimerasa estándar producida en el propio laboratorio. La cepa DH5 α de *E. coli* se transformó con el plásmido pTaq, que contiene el gen *Taq* bajo control de un promotor inducible. La inducción y posterior purificación de la polimerasa se hizo según el protocolo establecido por Pluthero, (1993). El volumen de Taq DNA polimerasa utilizada en las reacciones de PCR semicuantitativas fue determinado empíricamente. La composición de la mezcla de reacción de PCR utilizada se detalla a continuación.

Mezcla PCR Taq:

- 2 μ l tampón PCR 10x MgCl₂ Free (Biotools).
- 2 μ l MgCl₂ 50 mM (Biotools).
- 1 μ l dNTPs 10 mM.
- 1 μ l cebador 5' 10 mM.
- 1 μ l cebador 3' 10 mM.
- 1 μ l Taq DNA polimerasa.
- x μ l DNA molde para 80-100 ng.
- agua destilada ultrapura hasta 20 μ l.

Cuando el objetivo de la PCR era el clonaje del fragmento amplificado en un vector plasmídico, se utilizó la enzima Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Thermo Scientific). Dicha polimerasa presenta actividad 5' \rightarrow 3' exonucleasa, por lo que permite una amplificación más fiable debido a su actividad correctora de pruebas. Además, genera extremos romos en el producto amplificado. Según las instrucciones del fabricante, la temperatura de desnaturalización utilizada con esta polimerasa es de 98°C y el tiempo de extensión de 30 s / Kpb. Además, la T_h utilizada con esta polimerasa es diferente a la utilizada con la Taq polimerasa estándar (ver apartado 3.3.5.5). La composición de la mezcla de reacción de PCR utilizada se detalla a continuación.

Mezcla PCR Phusion:

- 10 μ l tampón Phusion® HF 5x (incluye MgCl₂) (Finnzymes, Thermo Scientific).
- 1 μ l dNTPs 10 mM.
- 1 μ l cebador 5' 10 mM.

- 1 μ l cebador 3' 10 mM.
- 0,5 μ l Phusion® High Fidelity DNA Polymerase 2U/ μ l (Finnzymes, Thermo Scientific).
- (1,5 μ l DMSO)*.
- x μ l DNA molde para 80-100 ng.
- agua destilada ultrapura hasta 50 μ l.

*opcional, se utilizó para amplificar fragmentos de DNA mayores a 1 Kpb.

3.3.5.2 PCR en colonia

La transformación de colonias de *E. coli* con el vector ligado al fragmento de DNA de interés, se verificó mediante la realización de una PCR utilizando como molde la propia colonia bacteriana. Se trata de una metodología rápida para comprobar colonias transformadas. Para ello, se picaron colonias individuales con una punta de pipeta estéril y, tras hacer una resiembra de la colonia en una placa con MS y el antibiótico adecuado, se introdujo la punta directamente en la mezcla de reacción. Se utilizó la Taq Polimerasa estándar bajo las mismas condiciones de reacción que las especificadas en el apartado 3.3.5.1, pero aumentado hasta 30 minutos la etapa de desnaturalización y activación inicial para favorecer la completa lisis térmica de las bacterias.

3.3.5.3 PCR de genotipado y caracterización genética de mutantes de *Arabidopsis*

La PCR de genotipado se utilizó para comprobar la presencia del transgen correspondiente en todas las líneas transgénicas obtenidas durante la realización de este trabajo. Las reacciones de genotipado se realizaron utilizando el producto comercial Phire® Plant Direct PCR Kit (Finnzymes, Thermo Scientific), que permite la realización de la reacción de PCR directamente a partir del material vegetal, sin necesidad de una purificación previa del material genético. Este producto utiliza la polimerasa modificada Phire® Hot Start II DNA Polymerase, la cual es resistente a muchos de los inhibidores de PCR presentes en plantas. El producto también incluye un punzón/émbolo de 0,5 mm \varnothing para cortar el material vegetal e introducirlo en el tubo de PCR.



Figura 3.5 Extracción de disco de hoja con producto comercial Phire® Plant Direct PCR Kit para genotipado. Imagen obtenida del manual del producto. (Finnzymes, Thermo Scientific).

Según las instrucciones del fabricante, la temperatura de desnaturalización utilizada con esta polimerasa es de 98°C y el tiempo de extensión de 20 s / Kpb. La composición de la mezcla de reacción utilizada se detalla a continuación.

- Mezcla PCR genotipado:
- 10 µl tampón Phire® Plant 2x (incluye MgCl₂ y dNTPs) (Finnzymes, Thermo Scientific).
 - 1 µl cebador 5' a 10 mM.
 - 1 µl cebador 3' a 10 mM.
 - 0,4 µl Phire® Hot Start II DNA Polymerase (Finnzymes, Thermo Scientific).
 - disco de hoja de 0,5mm Ø.
 - agua destilada ultrapura hasta 20 µl.

Para detectar la inserción de T-DNA en el mutante myb44, se llevó a cabo una PCR de genotipado utilizando el cebador Lba1, que reconoce el extremo LB del T-DNA, junto con los cebadores 5' y 3' del gen, respectivamente (a priori se desconoce la orientación de la inserción del T-DNA). Para verificar la homocigosis de este mutante, también se llevó a cabo una PCR de genotipado utilizando los cebadores 5' y 3' del gen. En el caso de que el mutante fuese homocigoto, la presencia del T-DNA insertado en el gen impediría la amplificación, y en consecuencia no se detectaría ningún producto de PCR.

Para detectar la mutación puntual producida por EMS en el mutante ice1-1 se llevó a cabo una PCR de genotipado utilizando los cebadores 5' y 3' que flanqueaban la región del gen que contenía la mutación puntual. Finalmente, el producto de PCR se purificó y posteriormente, se secuenció (ver apartados 3.3.8 y 3.3.10, respectivamente).

3.3.5.4 PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR, del inglés quantitative PCR) permite la cuantificación precisa del producto de PCR amplificado. La técnica se utilizó para determinar los niveles de expresión relativa de los genes de las $\omega 3$ desaturasas de *Arabidopsis thaliana* bajo determinadas condiciones. Se utilizó el reactivo SYBR Green (Applied Biosystems, Thermo Scientific), compuesto que al asociarse al DNA emite fluorescencia, lo que permite cuantificar los niveles de DNA amplificado. Para la reacción, se utilizaron placas de 96 pocillos, y en cada pocillo se introdujeron 18 μl de mezcla de reacción junto con 2 μl de muestra de cDNA obtenida anteriormente (ver apartado 3.3.4). El pipeteo se realizó con puntas con filtro para evitar contaminaciones. La qPCR se llevó a cabo en el termociclador 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Scientific) utilizando unas condiciones de reacción similares a las de una PCR semicuantitativa (ver apartado 3.3.5.1), pero fijando el número de ciclos de amplificación a 40. La composición de la mezcla de reacción se especifica a continuación.

Mezcla de qPCR:

- 10 μl Power SYBR® Green PCR Mix (Applied Biosystems, Thermo Scientific).
- 5 μl mezcla de cebadores:
 - 2,5 μl Cebador 5' 4 μM + 2,5 μl Cebador 5' 4 μM .
- agua destilada ultrapura hasta 18 μl .

Para la visualización de los resultados se utilizó el programa 7500 Software v2.0.1 (Applied Biosystems, Thermo Scientific), obteniendo el valor Ct de cada reacción. El valor Ct es el ciclo de PCR en el que empieza la fase exponencial de amplificación del DNA.

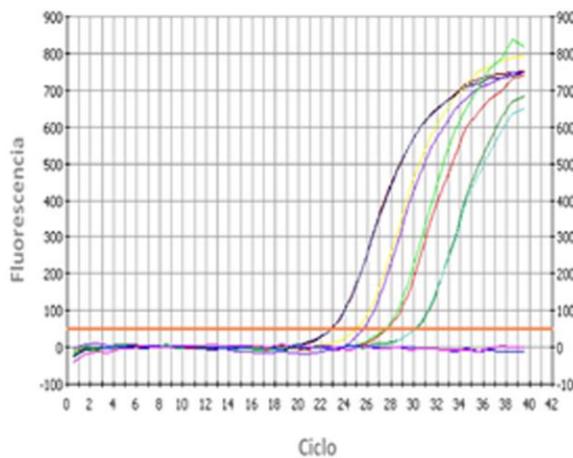


Figura 3.6 Curva de amplificación del cDNA por qPCR. La barra horizontal naranja determina el valor Ct utilizado para el cálculo de la expresión relativa.

A partir del valor Ct se calcularon los niveles de expresión relativa de los genes de las $\omega 3$ desaturasas usando el método del $\Delta\Delta Ct$ establecido por Livak y Schmittgen, 2001. El gen de referencia utilizado fue el *AtEF1 α* (*At5g60390*). La eficiencia de los cebadores utilizados (qFAD7mix, qFAD8mix, qFAD3mix y EF1 α mix) fue calculada anteriormente y era superior al 99% en todos los casos, por lo que se estimó una eficiencia del 100% para todos los cálculos. Los resultados se obtuvieron a partir del análisis de al menos tres muestras biológicas con tres replicados técnicos por muestra.

3.3.5.5 Diseño y listado de cebadores para PCR

Los cebadores para PCR se diseñaron de acuerdo con las diferentes necesidades experimentales. Para el cálculo de la Tm de los cebadores se utilizó el programa Tm calculator, a disposición de los usuarios en la página web de Thermo Scientific, ya que el programa discrimina entre la Tm utilizada por la Taq DNA polimerasa y la Tm utilizada por la Phusion® High Fidelity. El resto de propiedades de los cebadores (%GC, ΔG , formación de estructuras secundarias) se comprobaron mediante el programa NetPrimer (PREMIER Biosoft) (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>). La síntesis de los cebadores se encargó a la casa comercial Isogen.Life Science. El listado de cebadores utilizados durante el desarrollo de esta tesis se detalla a continuación.

Nombre	Secuencia cebador 5'→3'	Tm estándar	Tm phusion
Actina			
Act2A	ATTGTAGGTCGTCCTCGTC	55,3°C	
Act2D	TTGCATAAAGTGAAAGAACAG	50,3°C	
Clonaje promotores <i>FAD7</i> y <i>FAD8</i> para fusiones promotor::GUS			
FAD7p1,7kb_F	CACCTCTCAGATCTCTCTCCATCGTT	56,9°C	63,2°C
FAD7p_R	TAGAACTTGAGCTCTCTCCCCAGA	60,9°C	66,7°C
FAD7p1kbdist_R	GCCTGAAATAAATTAGCCCAAGAG	55,6°C	64,9°C
FAD7p0,7kb_F	CACCGGGCTAATTTATTTTCAGGCTGA	54,3°C	63,3°C
FAD7p0,5kb_F	CACCGTTTCTTACCAAACCTCTCTTG	55,3°C	63,2°C
FAD8p3kb_F	CACCACATTGGTGTGCCGTCAGTA	57,7°C	64,6°C
FAD8p_R	TGGAGCCTCTTCCAAGAA	57,6°C	65,3°C
FAD8p1kbdist_R	GCTCTCTTCTAAGAAATCTCACCAG	56,4°C	62,9°C
FAD8p1,9kb_F	CACCTGGTGAGATTTCTTAGAAGAGAGC	56,4°C	62,9°C

FAD8p0,7kb_F	CACCCCTTGCTAAGCAAATGGAGAAGC	56°C	64,3°C
FAD8p0,3kb_F	CACCCCTAAATCCCGCTTATTCCTTC	55,3°C	64,8°C

Clonaje promotor *FAD7* y *FAD8* para construcciones promotor:: gen-GFP

KpnI-FAD7p_1,7_F	GGGGGGTACCCTCTCAGATCTCTCTCCATCGTT	56,9°C	63,2°C
XmaI-FAD7p_1,7_R	GGGGCCCGGGTAGAACTTGAGCTCTCTCCCCAGA	60,9°C	66,7°C
KpnI-FAD8p_F	GGGGGGTACCACATTGGTGTGCCGTCAGTA	57,7°C	64,6°C
KpnI-FAD8p_R	GGGGGGTACCTGGAGCCTCTTCCCAAGAA	57,6°C	65,3°C

Clonaje gen *FAD7*, *FAD8* y *FAD6* para BIFC

BamHI-FAD7noSTOP(+Ala)_F	GGGGGGATCCATGGCGAACTTGGTCTTATCAG	52,9°C	64,4°C
XmaI-FAD7noSTOP(+Ala)_R	GGGGCCCGGGGCATCTCGTCTTACTTTGACC	53,6°C	64,1°C
BamHI-FAD8noSTOP(+Ala)_F	GGGGGGATCCATGGCGAGCTCGGTTTTATC	53°C	65,5°C
XmaI-FAD8noSTOP(+Ala)_R	GGGGCCCGGGGCTGTTCTTTGTCCATTGAG	52,2°C	63,9°C
BamHI-FAD6noSTOP(+Ala)_F	GGGGGGATCCATGGCTTCCAGAATTGCTGATTC	53,9°C	67,5°C
XmaI-FAD6noSTOP(+Ala)_R	GGGGCCCGGGGCGGCTGTGTAGTTAGGCA	57,3°C	67,6°C

Genotipado de mutantes

gICE1_F	CTGCTCGGTCACTTCTTGCG	55,8°C
gICE1_R	CTCAGCCATCAGATTCTTAGC	50,1°C
gMYB44_F	CTCGAACTTGTTTTGGTTTCATCTC	54,5°C
gMYB44_R	GTACATGAGTTTTTAATTCCTATAAATTTG	50,5°C
LbaI	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	63,7°C

Genes sensores de hormonas

ABI1_F	ATGGAGGAAGTATCTCCGGCGATC	55,9°C
ABI1_R	TCAGTTCAAGGGTTTGCTCTTG	53,4°C
LOX2_F	ATGTATTGTAGAGAGTCCTTGTCGA	62,4°C
LOX2_R	TCAAATAGAAATACTATAAGGAACACCC	56,8°C

qPCR

qEF1 α _F	TGAGCACGCTCTTCTTGCTTTCA	60°C
qEF1 α _R	GGTGGTGGCATCCATCTTGTTACA	60°C
qFAD7_F	CTCTCCAACAACAACAATTTCAGAC	60°C
qFAD7_R	CCAAAAGACAGAGGAGATGATGAT	60°C
qFAD8_F	GCCTCTAACCCCTAAACCCA	60°C

qFAD8_R	CGGGAATTGAGAAGAGAAGAA	60°C
qFAD3_F	CGCCACGAAAGCAGCTAAAC	60°C
qFAD3_R	TCGGTATTGCTCCTGACGTCTT	60°C

Tabla 3.3 Listado de cebadores utilizados en las reacciones de PCR, junto con sus respectivas Tm.

3.3.6 Determinación de la concentración de ácidos nucleicos

La cuantificación de ácidos nucleicos se realizó mediante la medición de la absorbancia (A) en el microespectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™). Se consideró que 1 unidad de absorbancia medida a 260 nm equivale a una concentración de 50 µg/ml de DNA y a 40 µg/ml de RNA. También se determinó la pureza, mediante la medición del coeficiente A_{260}/A_{280} (1,8-2) y del coeficiente A_{260}/A_{230} (2-2,2), que indican el grado de contaminación por proteínas y sales respectivamente. La determinación se realizó a partir de 2 µl de muestra y utilizando como blanco el tampón en el que estuviesen disueltos los ácidos nucleicos.

3.3.7 Electroforesis de ácidos nucleicos

La electroforesis en gel de agarosa se utilizó para el análisis de productos amplificados por PCR, la separación de fragmentos de DNA tras una digestión o la comprobación de la integridad del gDNA y el RNA extraídos. Los geles utilizados se prepararon con tampón TBE 1x y contenían un 1% de agarosa, concentración adecuada para la separación de fragmentos comprendidos entre 3 Kpb y 200 pb. Para la visualización de los ácidos nucleicos en el gel, se utilizó 1 µl del agente intercalante SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™, Thermo Scientific) por cada 10 ml de gel. En cada pocillo, generalmente se cargaron 20 µl de muestra y 1 µl de tampón de carga por cada 5 µl de muestra. Sin embargo, cuando el objetivo era la extracción y purificación de un producto de PCR o de una digestión se cargaban 50 µl de muestra, mientras que, cuando la finalidad era comprobar la integridad de gDNA o RNA sólo se cargaban 2 µl de muestra junto con 3 µl de agua destilada ultrapura, en ambos casos con el volumen de tampón de carga correspondiente. En el caso de las electroforesis con RNA, la muestra previamente se desnaturalizó calentando a 65°C durante 5 minutos en tampón de carga con formamida. La composición del tampón TBE y los tampones de carga se detallan a continuación.

Tampón TBE: Tris-HCl 90 a mM pH 8,0, H_3B_3 90 mM, EDTA 2 mM

Tampón de carga: Orange G 0,25% (p/v) (Sigma-Aldrich), glicerol 30% (p/v)

Tampón de carga RNA: formamida 95% (v/v), azul de bromofenol 0,1% (p/v),
xilencianol 0,1% (p/v), EDTA 5 mM

La electroforesis se realizó sumergiendo el gel en una cubeta de electroforesis (Bio-Rad) con tampón TBE 1x a un voltaje constante de 100 V durante 30 minutos. La captura de la imagen del gel se realizó con el transiluminador UV Gel DocTM (Bio-Rad) utilizando el programa de análisis de imagen Quantity One (Bio-Rad). La masa molecular de los ácidos nucleicos se estimó usando como referencia el marcador de masa molecular GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo ScientificTM).

3.3.8 Extracción y purificación de ácidos nucleicos en geles de electroforesis

Los productos de PCR se extrajeron y purificaron cuando el objetivo era su introducción en un vector plasmídico. Finalizada la electroforesis, el gel se iluminó con luz UV con el transiluminador UV Gel DocTM (Bio-Rad) y se recortó el fragmento que contenía el ácido nucleico de interés en su interior. Posteriormente, la elución del contenido y su purificación, se realizó utilizando el producto comercial GeneJETTM Gel Extraction (Fermentas, Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante.

3.3.9 Digestión con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción (Fermentas, Thermo Scientific) utilizadas para la digestión de DNA durante la realización de esta tesis se especifican en cada caso determinado. Todas las digestiones se realizaron partiendo de 1 μ g de DNA y utilizando un volumen de enzima equivalente a 5-20 U/ μ g de DNA, según las instrucciones del fabricante. La proporción de enzimas de restricción, así como el tampón de digestión utilizado en las dobles digestiones se determinaron según las condiciones estipuladas por el programa DoubleDigest Calculator, a disposición de los usuarios en la página web de Thermo Scientific. Generalmente, las digestiones se realizaban a 37°C durante 1 h 30 min.

3.3.10 Secuenciación de ácidos nucleicos

La identidad e integridad de la secuencia de fragmentos de ácidos nucleicos de interés se comprobó enviando las muestras al servicio de secuenciación del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) en Madrid.

3.3.11 Clonaje de productos amplificados por PCR

El DNA amplificado por PCR se introdujo en un vector plasmídico de entrada, generalmente de origen comercial, para desde allí poder ser transferido a múltiples vectores de destino, que pueden ser comerciales, o bien diseñados y suministrados por grupos de investigación. En esta Tesis doctoral se han utilizado vectores plasmídicos que se basan en diferentes tecnologías de clonaje, y en muchas ocasiones en combinaciones de éstas. A continuación se enumeran y se explican brevemente las diferentes tecnologías de clonaje utilizadas.

Los vectores para clonaje tradicionales, contienen regiones llamadas MCS (del inglés, MultiCloning Sites) con una alta densidad de dianas de enzimas de restricción. Alternativamente al uso de enzimas de restricción, existen los vectores de clase pGEMINI, los cuales son vectores linealizados que presentan un extremo cohesivo con una T en sus extremos 3'. Estos vectores, se basan en la capacidad de las polimerasas sin actividad 3'→5' exonucleasa (como la Taq Polimerasa) de introducir un nucleótido protuberante, generalmente una A, al final del extremo 3' del producto de amplificación (Clark, 1988). De este modo, el fragmento de PCR puede ser introducido en el plásmido mediante la utilización de una enzima DNA ligasa. Una variante mejorada de estos vectores, es la tecnología Topo Cloning® (Invitrogen™, Thermo Scientific). Los vectores basados en la tecnología Topo Cloning®, son vectores linealizados que presentan una enzima DNA topoisomerasa I conjugada con los extremos 3' del vector, que reconoce una secuencia concreta de DNA y la ensambla con el vector.



Figura 3.7 Esquema del funcionamiento de la metodología de clonaje Topo Cloning®. Imagen obtenida del manual de vector pENTR D-TOPO® (Invitrogen™, Thermo Scientific).

En la actualidad, los vectores más ampliamente difundidos son los basados en la tecnología Gateway® (Invitrogen™, Thermo Scientific), los cuales permiten un clonaje rápido y versátil. La tecnología Gateway®, se basa en la especificidad de los sitios de recombinación att del bacteriófago lambda (Landy, 1989). Las recombinasas utilizadas en la tecnología Gateway®, son una mezcla de una excisasa (Xis) y una integrasa (Int) que han sido modificadas genéticamente para hacerlas más eficientes, de modo que permiten incorporar fragmentos de DNA flanqueados por regiones att a estos vectores (Hartley et al., 2000). Los vectores Gateway® también presentan el marcador de contraselección *ccdB*, gen que inhibe la DNA girasa, flanqueado por los att en la región donde se producirá el clonaje, de manera que se impide la replicación de los vectores vacíos.

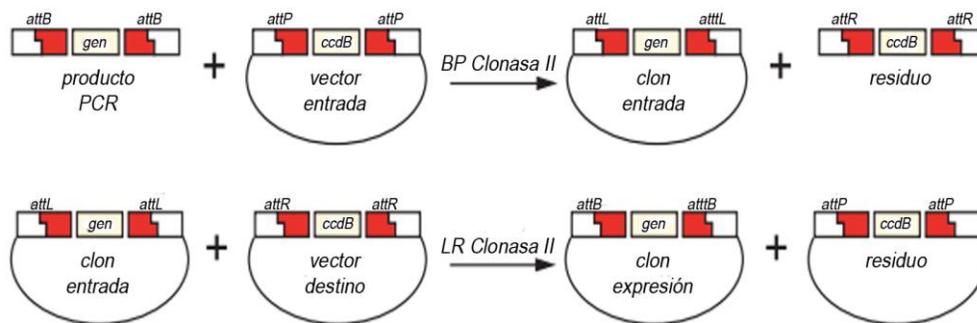


Figura 3.8 Esquema del funcionamiento de la metodología de clonaje Gateway®. Imagen obtenida del manual de la tecnología MultiSite Gateway® (Invitrogen™, Thermo Scientific).

La tecnología MultiSite Gateway®, es una variante del Gateway® que permite el clonaje de hasta cuatro fragmentos de DNA en un mismo vector de destino de forma simultánea. Los diferentes fragmentos de DNA están flanqueados cada uno de ellos por regiones att específicas, las cuales

permiten que los fragmentos de DNA se clonen en el vector de destino con la orientación y en el orden deseado (Yahata et al., 2005).

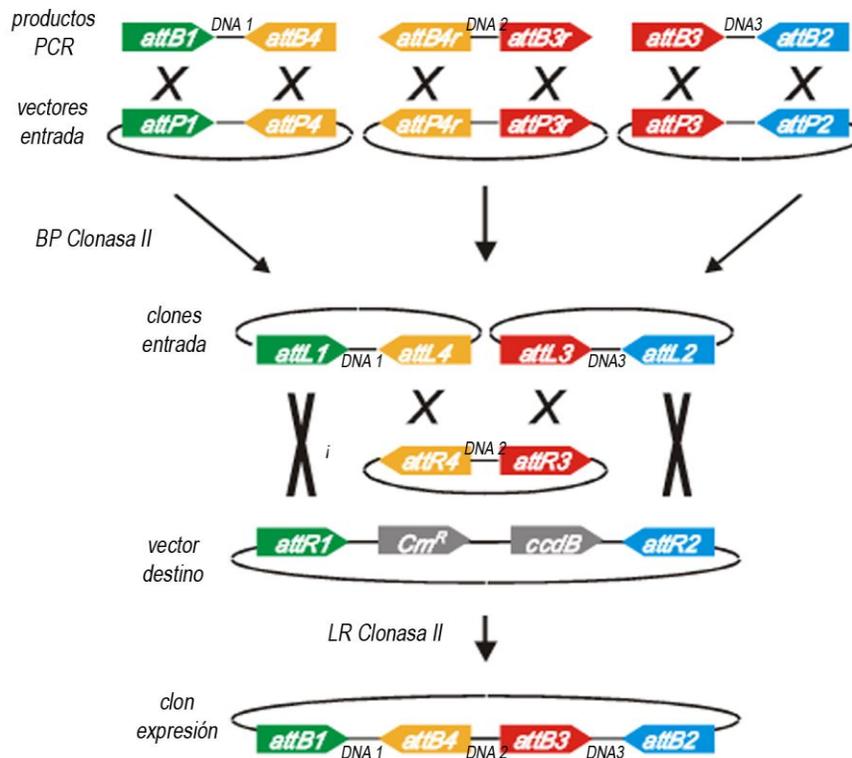


Figura 3.9 Esquema del funcionamiento de la metodología de clonaje MultiSite Gateway® adaptado a tres componentes. Imagen obtenida del manual de la tecnología MultiSite Gateway® (Invitrogen™, Thermo Scientific).

3.3.11.1 Generación de los constructos promotor::GUS

El objetivo de este apartado fue la generación de construcciones génicas en las cuales el gen testigo GUS se expresase bajo el control de fragmentos de diferente longitud de los promotores putativos de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8*.

Se utilizó el vector de entrada pENTR D-TOPO® (Invitrogen™, Thermo Scientific), el cual se basa en la tecnología del Topo Cloning®. Además este vector tiene un extremo cohesivo 5' con la secuencia GTGG, de modo que todos los cebadores 5' utilizados para amplificar productos destinados a ser clonados en este vector, debían presentar una secuencia CACC para permitir el clonaje (ver listado de cebadores en apartado 3.3.5.5). Flanqueando la zona de clonaje, se

encuentran las regiones attL1 y attL2 que permiten la transferencia del fragmento de DNA clonado a un vector de destino basado en la tecnología Gateway®. También contiene un marcador de selección que confiere resistencia al antibiótico Kanamicina.

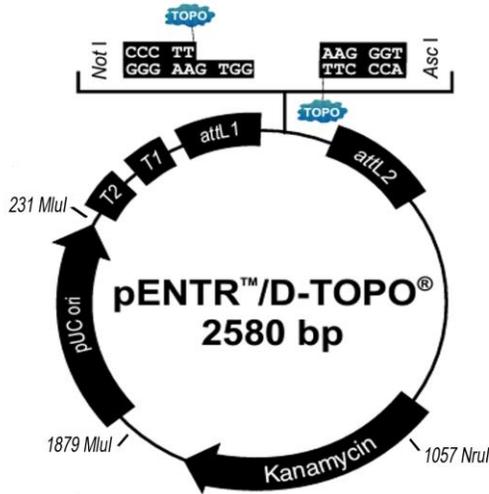


Figura 3.10 Mapa detallado de las regiones del vector pENTR D-TOPO®. Imagen obtenida del manual del vector (Invitrogen™, Thermo Scientific).

Las secuencias correspondientes a fragmentos de -1682, -703 y -499 pb del promotor putativo del gen *AtFAD7*, y a fragmentos de -2958, -1912, -643 and -290 pb del promotor putativo del gen *AtFAD8* se amplificaron mediante PCR utilizando la enzima Phusion® High Fidelity, tal como se especifica en el apartado 3.3.5.1. También se amplificaron fragmentos correspondientes a la región distal comprendida entre -1682 y -685 pb del promotor putativo del gen *AtFAD7* y a la región distal comprendida entre -2958 y -1893 pb del promotor putativo del gen *AtFAD8*.

Tras la amplificación, se procedió a la ligación de los productos de PCR con el vector pENTR D-TOPO®. A continuación, se especifica la mezcla de reacción utilizada para dicha ligación.

Mezcla de ligación pENTR:

- x µl producto de PCR para relación molar 2:1 inserto:vector.
- 1 µl tampón ligación pENTR (Invitrogen™, Thermo Scientific).
- 0,5 µl (≈9 ng) pENTR D-TOPO® (Invitrogen™, Thermo Scientific).
- agua destilada ultrapura hasta 6 µl.

Nota: La fórmula empleada para el cálculo de la relación molar es la siguiente:

$$ng = fmoles \cdot N(pb) \cdot \left(\frac{660}{10^6}\right)$$

Las mezclas de ligación se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min y posteriormente se transformaron células competentes DH5 α (ver apartado 3.3.11.4.2) con 3-6 μ l de la ligación. Los diferentes clones resistentes a Kanamicina obtenidos se comprobaron mediante PCR en colonia, y se extrajo el DNA plasmídico de los clones positivos (ver apartados 3.3.5.2 y 3.3.2, respectivamente). Para confirmar los clones positivos, se realizó una digestión del DNA plasmídico con las enzimas *NotI* y *AscI*.

Con los promotores de diferente longitud de *AtFAD7* y *AtFAD8* clonados en el vector de entrada, se procedió a su clonaje en el vector de destino pMDC 163 (Curtis et al., 2003). Este vector, basado en la tecnología Gateway®, contiene el gen testigo GUS situado justo detrás de la región flanqueada por las regiones attR1 y attR2 donde se clonará el fragmento de DNA, por lo que es el vector idóneo para la creación constructos promotor::GUS. Contiene un marcador de selección que confiere resistencia al antibiótico Kanamicina. Además, presenta las secuencias LB y RB del T-DNA y un marcador de selección en plantas que confiere resistencia al antibiótico Higromicina, por lo que puede ser utilizado para la transformación de plantas *vía Agrobacterium*.

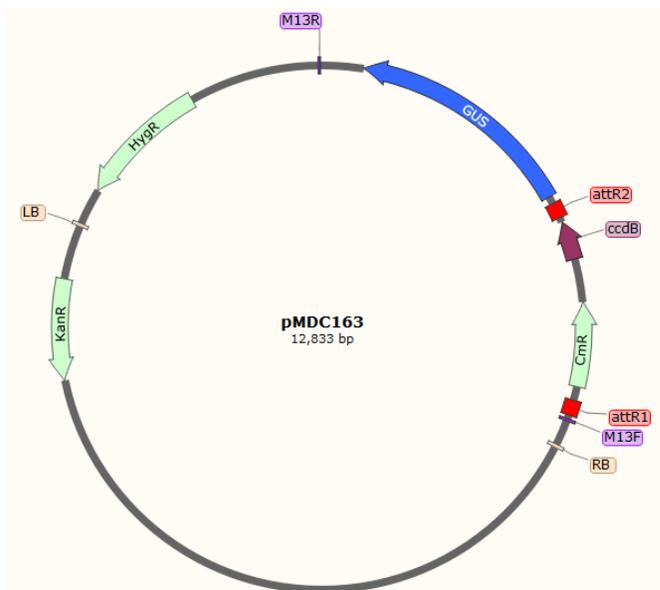


Figura 3.11 Mapa detallado de las regiones del vector pMDC163 (Curtis et al., 2003). Imagen obtenida con el programa SnapGene Viewer.

Debido a que en este caso, tanto el vector de entrada como el destino tenían la misma resistencia antibiótica, se digirió 1 µg de pENTR con el fragmento de promotor clonado, con las enzimas *NruI* y *MluI* al mismo tiempo. Estas enzimas cortan en el vector linealizándolo e impidiendo su recircularización, pero no cortan en ningún caso los fragmentos de promotor clonados. Posteriormente, los fragmentos obtenidos en la digestión se separaron en un gel de electroforesis y el fragmento que contenía la región del vector con el fragmento de promotor clonado y flanqueado por las regiones att fue purificado (ver apartado 3.3.8).

Para el clonaje en el vector de destino, se utilizó la enzima Gateway LR Clonase II® Enzyme Mix (Invitrogen™, Thermo Scientific). De este modo, el fragmento de DNA clonado que antes estaba en el vector de entrada, ahora pasa a estar en el vector de destino por recombinación de los att. A continuación, se especifica la mezcla de reacción utilizada para la reacción de recombinación LR.

Mezcla recombinación LR:

- x µl pENTR D-TOPO® digerido + fragmento clonado para 25 ng.
- x µl pMDC 163 para 50ng.
- 1 µl Gateway LR Clonase II® Enzyme Mix (Invitrogen™, Thermo Scientific).
- agua destilada ultrapura hasta 6 µl.

La mezcla de recombinación LR se incubó a temperatura ambiente durante 1 h y seguidamente, se le añadió 1 µl de Proteinasa K 2 µg/µl (Invitrogen™, Thermo Scientific). A continuación, se incubó la mezcla a 37°C durante 10 min para detener la reacción. Se transformaron células competentes DH5α (ver apartado 3.3.11.4.2) con 2 µl del producto de la reacción de recombinación LR. Los diferentes clones resistentes a Kan obtenidos se comprobaron por PCR en colonia, y se extrajo el DNA plasmídico de los clones positivos (ver apartados 3.3.5.2 y 3.3.2, respectivamente). Para confirmar los clones positivos, se realizó una digestión del DNA plasmídico con las enzimas *PacI* y *AscI* y la secuencia de los fragmentos clonados fue comprobada mediante secuenciación (ver apartado 3.3.10).

3.3.11.2 Generación de constructos promotor::gen-GFP

El objetivo de este apartado era la generación de construcciones génicas donde los genes quiméricos, formados por la región codificante de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8* (sin codón STOP),

respectivamente, fusionados al gen de la proteína fluorescente GFP, se expresasen bajo el control de sus respectivos promotores endógenos.

Para la generación de los constructos génicos promotor::gen-GFP, donde estos tres elementos deben tener una orientación y un orden adecuados, se recurrió a la tecnología MultiSite Gateway® (Invitrogen™, Thermo Scientific). De ese modo, primeramente se procedió al clonaje de cada uno de estos elementos: promotor, gen y GFP, en un vector de entrada diferente, de modo que cada fragmento de DNA clonado quedase flanqueado por secuencias de recombinación att específicas que permitiesen realizar el MultiSite Gateway con la orientación y el orden correcto. Los vectores de entrada pENTR D-TOPO® con las secuencias codificantes de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8* (sin codón STOP) previamente clonadas y flanqueadas por las regiones attL1 y attL2 fueron cedidos por la Dra. Ángela Román, y el vector de entrada pEN-R2-GFP-L3, el cual ya tiene una GFP flanqueada por las regiones attR2 y attL3, fue cedido por la Dra. M. Carmen Rubio. Por lo tanto, en esta tesis solo fue necesario generar los vectores de entrada que contuviesen los promotores putativos de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8* clonados respectivamente. El vector de entrada pUC57-L4-KpnI-XmaI-R1, cedido por la Dra. M. Carmen Rubio, se eligió para el clonaje de los promotores. Este vector de entrada presenta un MCS que permite el clonaje tradicional de un fragmento de DNA mediante el uso de varias enzimas de restricción, en este caso *KpnI* y *XmaI*, quedando el fragmento al final flanqueado por las regiones attL4 y attR1. Además, contiene un marcador de selección que confiere resistencia al antibiótico Ampicilina.

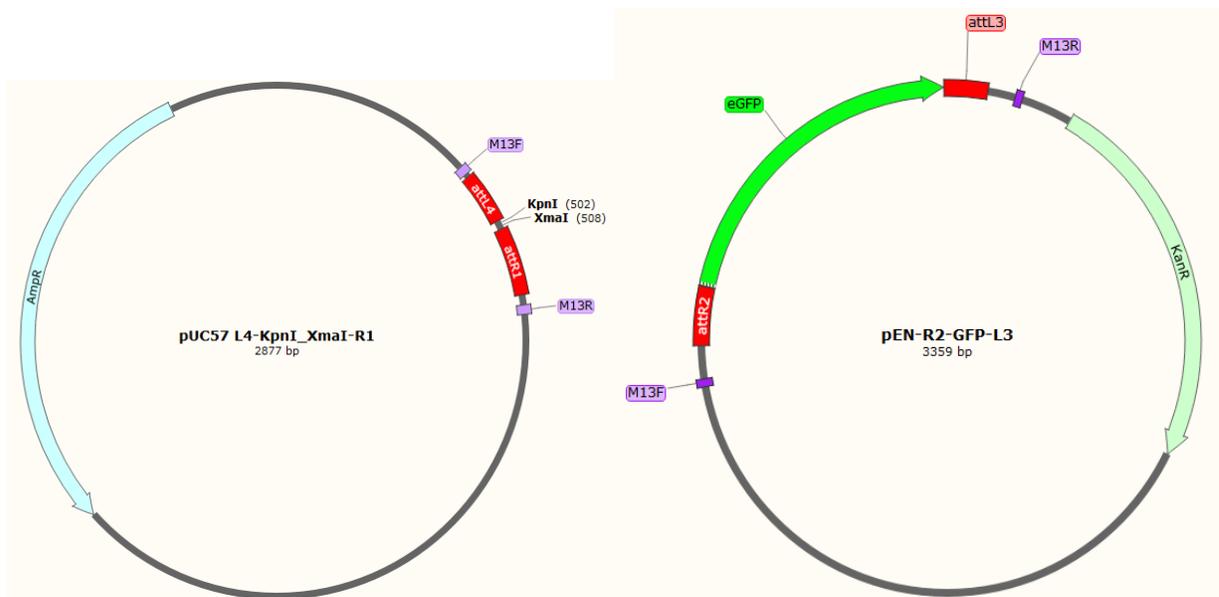


Figura 3.12 Mapa detallado de las regiones de los vectores pUC57-L4-KpnI-XmaI-R1 y pEN-R2-GFP-L3. El mapa del vector pENTR D-TOPO® se encuentra en el apartado 3.3.11.1. Imagen obtenida con el programa SnapGene Viewer.

Las secuencias correspondientes al fragmento de -1682 pb del promotor putativo del gen *AtFAD7*, y al fragmento de -2958 pb del promotor putativo del gen *AtFAD8* se amplificaron por PCR utilizando la enzima Phusion® High Fidelity tal como se especifica en el apartado 3.3.5.1. En este caso, los cebadores incorporaban extensiones con dianas de restricción para permitir que el producto de amplificación pudiese ser clonado posteriormente mediante clonaje tradicional en el vector de destino. En el caso del promotor de *AtFAD7*, éste pudo ser flanqueado por las dianas de restricción *KpnI* y *XmaI*, permitiendo un clonaje direccional en el vector. Sin embargo, el promotor de *AtFAD8* contenía una diana de *XmaI* en su secuencia, por lo que se flanqueó por una diana *KpnI* a cada lado (ver listado de cebadores en apartado 3.3.5.5). Esto tenía como inconveniente que el clonaje en el vector no era direccional, de modo que fue necesario comprobar que el fragmento se clonaba con la orientación correcta.

Debido a que las enzimas de restricción no son capaces de reconocer y cortar sus dianas si éstas se encuentran en un extremo de una cadena de DNA, los productos de PCR flanqueados por las dianas de restricción se clonaron en un vector del tipo pGEMINI llamado pGEM® T-Easy (Promega) previo paso al clonaje en el vector de entrada *pUC57-L4-KpnI_XmaI-R1*. Este vector contiene un marcador de selección que confiere resistencia al antibiótico Ampicilina.

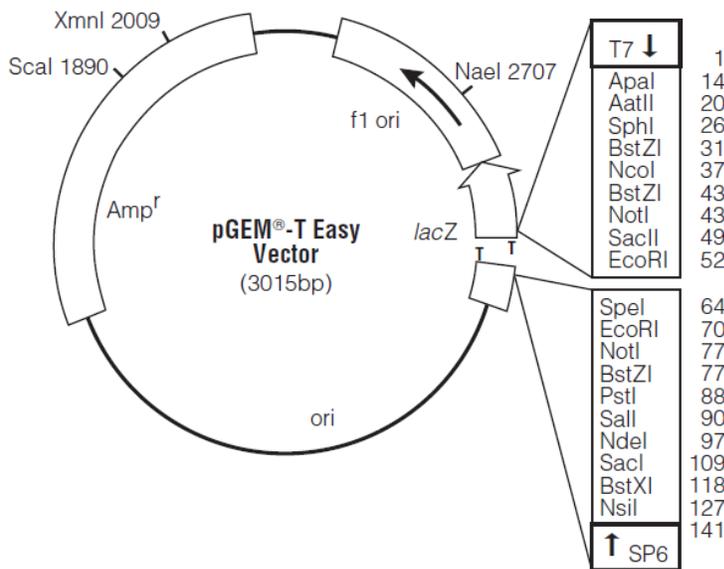


Figura 3.13 Mapa detallado de las regiones del vector pGEM® T-Easy. Imagen obtenida del manual del vector (Promega).

La polimerasa Phusion® High Fidelity presenta actividad 3'→5' exonucleasa y en consecuencia genera productos de amplificación con extremos romos por lo que éstos no se pueden clonar directamente en este vector. Para el clonaje en el vector pGEM® T-Easy es necesario añadir extremos cohesivos con una adenina en el extremo 3' mediante el proceso llamado (del inglés) “*A tailing*”. La mezcla de reacción utilizada en la reacción de “*A tailing*” se especifica a continuación.

Reacción “*A tailing*”:

- 7 µl producto de PCR.
- 1 µl tampón PCR 10x MgCl₂ Free (Biotools).
- 1 µl MgCl₂ a 50 mM (Biotools).
- 0,2 µl dATP 10 mM.
- 0,5 µl Taq DNA polimerasa.
- agua destilada ultrapura hasta 10 µl.

La reacción de “*A tailing*” se incubó durante 30 min a 70°C y una vez finalizada, se procedió a la realización de la reacción de ligación entre el producto de PCR y el vector de destino pGEM® T-Easy. La mezcla de reacción utilizada en la reacción de ligación se especifica a continuación.

Reacción ligación pGEM® T-Easy:

- x µl mezcla reacción “*A tailing*” para relación molar 2:1 inserto:vector (ver fórmula en el apartado 3.3.11.1).
- 5 µl tampón Rapid Ligation 2x (Promega).
- 1 µl (≈50ng) pGEM® T-Easy (Promega).
- 1 µl T4 DNA Ligase 2 U/µl (Promega).
- agua destilada ultrapura hasta 10 µl.

La mezcla de la reacción de ligación se incubó a temperatura ambiente durante 1 h y posteriormente, se transformaron células competentes DH5α (ver apartado 3.3.11.4.2) con 2 µl de la ligación. Los diferentes clones resistentes a Ampicilina obtenidos se comprobaron por PCR en colonia, y se extrajo el DNA plasmídico de los clones positivos (ver apartados 3.3.5.2 y 3.3.2, respectivamente). Para confirmar los clones positivos, se realizó una digestión del DNA plasmídico con las enzimas *KpnI* y *XmaI* cuyas dianas se encontraban en los productos de PCR clonados en el vector.

Los fragmentos de DNA con los promotores de *AtFAD7* y *AtFAD8* flanqueados con dianas de restricción y clonados en el vector pGEM® T-Easy, ahora ya podían ser digeridos correctamente. De este modo, se digirieron los plásmidos pGEM® T-Easy con los fragmentos de DNA clonados

con las enzimas *KpnI* y *XmaI* en el caso del promotor de *AtFAD7*, y con la enzima *KpnI* en el caso del promotor de *AtFAD8*. Al mismo tiempo, también se digirió el vector de entrada *pUC57-L4-KpnI_XmaI-R1* con las enzimas *KpnI* y *XmaI* (para permitir el clonaje del promotor de *AtFAD7*), y con la enzima *KpnI* (para permitir el clonaje del promotor de *AtFAD8*). En este último caso, para evitar la recircularización del vector, éste se desfosforiló añadiendo a la reacción de digestión 1 µl de Fast AP Thermosensitive Alkaline Phosphatase 1 U/µl (Thermo Scientific™) junto con el mismo volumen de tampón Fast AP Thermosensitive Alkaline Phosphatase 10x (Thermo Scientific™), inactivando posteriormente la enzima incubando la mezcla a 80°C durante 20 min.

En este punto, ya se disponía de fragmentos de DNA que contenían los promotores de *AtFAD7* y *AtFAD8* con extremos compatibles para ser clonados en el vector de entrada *pUC57-L4-KpnI_XmaI-R1*, por lo que se procedió a la ligación de los productos de PCR con el vector. La mezcla de la reacción de ligación se especifica a continuación.

Reacción ligación *pUC57-L4-KpnI_XmaI-R1*:

- x µl producto PCR digerido para relación molar 2:1 inserto:vector (ver fórmula en el apartado 3.3.11.1).
- 1 µl (≈50-150 ng) *pUC57-L4-KpnI_XmaI-R1*.
- 1 µl tampón de ligación 10x (Promega).
- 1 µl T4 DNA Ligase 2 U/µl (Promega).
- agua destilada ultrapura hasta 10 µl.

La mezcla de la reacción de ligación se incubó a 4°C durante toda la noche y posteriormente se transformaron células competentes *DH5α* (ver apartado 3.3.11.4.2) con 5 µl de la ligación. Los diferentes clones resistentes a Ampicilina obtenidos se comprobaron por PCR en colonia, y se extrajo el DNA plasmídico de los clones positivos (ver apartados 3.3.5.2 y 3.3.2, respectivamente). Para confirmar los clones positivos, se realizó una digestión del DNA plasmídico con las enzimas *KpnI* y *XmaI* cuyas dianas se encontraban en los productos de PCR clonados en el vector.

Obtenidos los vectores de entrada con los promotores de *AtFAD7* y *AtFAD8*, con los genes *AtFAD7* y *AtFAD8*, y con el gen GFP clonados, se procedió a la realización del MultiSite Gateway en el vector de destino *pH7m34GW*, cedido por la Dra. M. Carmen Rubio. Este vector Gateway presenta una región flanqueada por las regiones *attR4* y *attR3* donde se clonarán los tres fragmento de DNA con la orientación y el orden adecuados, por lo que es idóneo para la creación de los constructos promotor::gen-GFP, teniendo en cuenta los vectores de entrada elegidos. El vector contiene un

marcador de selección que confiere resistencia a los antibióticos Estreptomicina y Espectinomicina. Además, presenta las secuencias LB y RB del T-DNA y un marcador de selección en plantas que confiere resistencia al antibiótico Higromicina, por lo que puede ser utilizado para la transformación de plantas vía *Agrobacterium*.

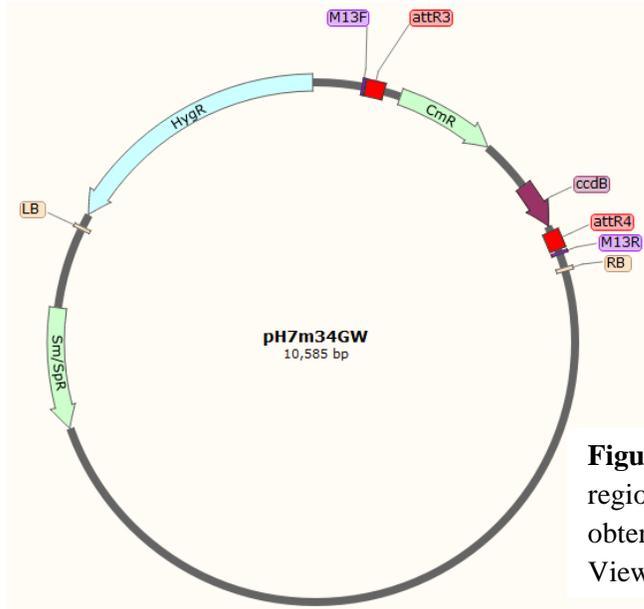


Figura 3.14 Mapa detallado de las regiones del vector pH7m34GW. Imagen obtenida con el programa SnapGene Viewer.

Para el clonaje de los tres fragmentos de DNA en el vector de destino mediante MultiSite Gateway®d, el fabricante recomienda el uso de una enzima LR Clonasa mejorada llamada Gateway LR Clonase II® Plus Enzyme Mix (Invitrogen™, Thermo Scientific), sin embargo, en esta Tesis, la reacción de recombinación de los att LR se realizó con la enzima Gateway LR Clonase II® Enzyme Mix convencional (Invitrogen™, Thermo Scientific). De este modo, los tres fragmentos de DNA clonado, que antes estaban en tres vectores de entrada diferentes, ahora pasan a estar en el vector de destino con la orientación y el orden deseados. A continuación se especifica la mezcla de reacción utilizada para la reacción de recombinación LR.

Mezcla recombinación LR Multi Gateway:

- x µl pUC57-L4-KpnI_XmaI-R1 + fragmento clonado para 25-30 ng
- x µl pENTR D-TOPO® + fragmento clonado para 25-30ng
- x µl pEN-R2-GFP-L3 para 25-30ng
- x µl pH7m34GW para 150 ng

- 2 μ l Gateway LR Clonase II® Enzyme Mix (Invitrogen™, Thermo Scientific)
- agua destilada ultrapura hasta 10 μ l

La mezcla de recombinación LR se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche y seguidamente se adicionó 1 μ l de Proteinasa K 2 μ g/ μ l (Invitrogen™, Thermo Scientific) y se incubó la mezcla a 37°C durante 10 min para parar la reacción. Se transformaron células competentes DH5 α (ver apartado 3.3.11.4.2) con 5 μ l del producto de la reacción de recombinación LR Multi Gateway. Los diferentes clones resistentes a Estreptomicina o Espectinomicina obtenidos se comprobaron por PCR en colonia, y se extrajo el DNA plasmídico de los clones positivos (ver apartados 3.3.5.2 y 3.3.2, respectivamente). Para confirmar los clones positivos, se realizó una digestión del DNA plasmídico con las enzimas *KpnI*, *XmaI* y *ApaI* y la integridad de los fragmentos clonados fue comprobada mediante secuenciación (ver apartado 3.3.10).

3.3.11.3 Generación de constructos para BIFC

El objetivo de este apartado era la generación de constructos génicos para el estudio de la interacción entre desaturasas mediante la técnica de complementación bimolecular de fluorescencia (BIFC) (ver apartado 3.6.2). Estos constructos, estaban formados por genes quiméricos donde *AtFAD7*, *AtFAD8* y *AtFAD6* se fusionaban con los genes que codificaban para el extremo N-terminal y para el extremo C-terminal de la proteína fluorescente YFP, respectivamente.

Los vectores utilizados para la obtención estos constructos fueron los plásmidos pUC-SPYNE y pUC-SPYCE, vectores diseñados específicamente para BIFC (Walter et al., 2004) y cedidos por el Dr. Jorge Lora. En este caso, estos vectores de destino no se basan en la tecnología Gateway, sino que presentan un MCS que permite el clonaje tradicional de un fragmento de DNA mediante el uso de varias enzimas de restricción, en este caso *BamHI* y *XmaI*. De este modo, el fragmento clonado queda delante del fragmento del gen que codifica para el fragmento N-terminal de la YFP (en el caso del vector pUC-SPYNE) o para el fragmento C-terminal de la YFP (en el caso del vector pUC-SPYNE), y detrás del promotor constitutivo 35S, el cual permitirá sobreexpresar estos elementos. Además, estos vectores presentan un marcador de selección que confiere resistencia al antibiótico Ampicilina.

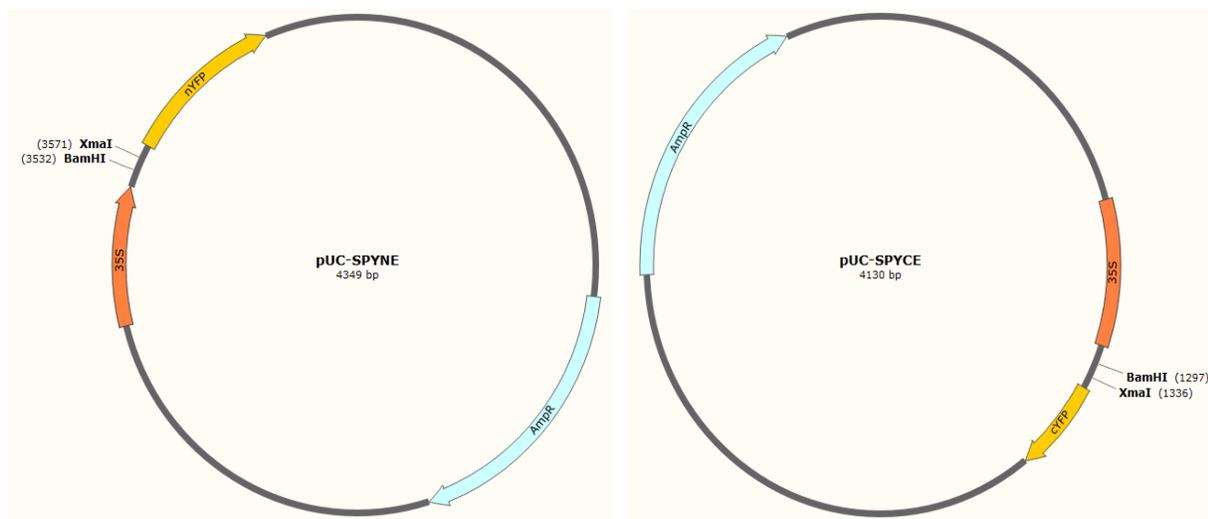


Figura 3.15 Mapa detallado de las regiones de los vectores pUC-SNYNE y pUC-SPYCE. Imagen obtenida con el programa SnapGene Viewer.

Los fragmentos de -1341 pb, -1308 pb y -1347 pb correspondientes a las secuencias codificantes de los genes *AtFAD7*, *AtFAD8* y *AtFAD6* (sin sus codones STOP), respectivamente, se amplificaron por PCR utilizando la enzima Phusion® High Fidelity tal como se especifica en el apartado 3.3.5.1. En este caso, los cebadores incorporaban extensiones con dianas de restricción para permitir que el producto de amplificación pudiese ser clonado posteriormente mediante clonaje tradicional en el vector de destino. De este modo, los productos de PCR fueron flanqueados por dianas de restricción para las enzimas *BamHI* y *XmaI* (ver listado de cebadores en apartado 3.3.5.5).

Tal y como se ha comentado anteriormente, las enzimas de restricción no son capaces de reconocer y cortar sus dianas si estas se encuentran en un extremo de una cadena de DNA. Por eso, a los productos de PCR flanqueados por las dianas de restricción se les realizó una reacción de “*A tailing*” y se clonaron en el plásmido pGEM® T-Easy (Promega) previo paso al clonaje en el vector de destino tal como se detalla en el apartado 3.3.11.2, sólo que para confirmar los clones positivos se realizó una digestión del DNA plasmídico con las enzimas *BamHI* y *XmaI* cuyas dianas se encontraban en los productos de PCR clonados en el vector.

Los fragmentos de DNA con la secuencia codificante de los genes *AtFAD7*, *AtFAD8* y *AtFAD6* (sin sus codones STOP) flanqueados con dianas de restricción y clonados cada uno de ellos en el vector pGEM® T-Easy se digirieron con las enzimas *BamHI* y *XmaI*. Al mismo tiempo, también se digirieron los vectores de destino pUC-SPYNE y pUC-SPYCE con las mismas enzimas.

En este punto, ya se disponían de fragmentos de DNA con la secuencia codificante de los genes *AtFAD7*, *AtFAD8* y *AtFAD6* (sin sus codones STOP) con extremos compatibles para ser clonados los vectores de destino pUC-SPYNE y pUC-SPYCE, por lo que se procedió a su ligación con los vectores. La mezcla de la reacción de ligación se especifica a continuación.

Reacción ligación pUC-SPYNE /SPYCE:

- x μ l producto PCR digerido para relación molar 2:1 inserto:vector (ver fórmula en el apartado 3.3.11.1).
- 1 μ l (\approx 50-150 ng) pUC-SPYNE /SPYCE.
- 1 μ l tampón de ligación 10x (Promega).
- 1 μ l T4 DNA Ligase 2 U/ μ l (Promega)
- agua destilada ultrapura hasta 10 μ l.

La mezcla de la reacción de ligación se incubó a 4°C durante toda la noche y posteriormente se transformaron células competentes DH5 α (ver apartado 3.3.11.4.2) con 5 μ l de la ligación. Los diferentes clones resistentes a Ampicilina obtenidos se comprobaron por PCR en colonia, y se extrajo el DNA plasmídico de los clones positivos (ver apartados 3.3.5.2 y 3.3.2, respectivamente). Para confirmar los clones positivos, se realizó una digestión del DNA plasmídico con las enzimas *BamHI* y *XmaI* cuyas dianas se encontraban en los productos de PCR clonados en el vector y la integridad de los fragmentos clonados fue comprobada mediante secuenciación (ver apartado 3.3.10).

3.3.11.4 Cultivos bacterianos de *Escherichia coli*

Todos los clonajes realizados durante este trabajo, se llevaron a cabo utilizando como organismo huésped la cepa DH5 α de *E. coli*. También se utilizó la cepa DB3.1 de *E. coli*, resistente al gen *ccdB*, para propagar los vectores Gateway vacíos. Las bacterias se crecieron utilizando el medio conocido como Caldo de Lisogenia, en inglés Lysogeny Broth (LB) (Bertani, 1951; Miller, 1972), ajustado a pH=7,2. Para la selección de transformantes, el medio se complementaba de un antibiótico según las necesidades experimentales. Las bacterias se crecían a 37°C durante toda la noche en placas de Petri con medio de consistencia sólida, o bien, en cultivo con medio líquido y agitación suave. La composición del medio LB se detalla a continuación.

Ingrediente	Concentración (g/l)
Triptona	10
NaCl	10
Extracto de levadura	5
Agar bacteriológico Americano*	15

Antibiótico	Concentración (µg/ml)
Kanamicina	50
Ampicilina	50
Gentamicina	25
Spectinomicina	25

Tabla 3.4 Composición del caldo de lisogenia (LB) (Bertani, 1951; Miller, 1972) utilizado para el cultivo bacteriano. Todos los antibióticos utilizados pertenecen a la casa comercial Duchefa Biochemie. *Sólo en LB sólido

3.3.11.4.1 Preparación de células competentes de *Escherichia coli*

El proceso de preparación de células competentes se llevó a cabo por el método del Cloruro de Rubidio (Gietz y Woods, 1994) por ser más eficiente que el método tradicional del Cloruro de Calcio. Todo el proceso se realizó en condiciones de esterilidad y a 4°C. Se partió de un cultivo crecido en 50 ml de LB sin antibióticos con $A_{600}=0,5-0,6$, el cual se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min para precipitar las bacterias. Se resuspendió el precipitado con 15 ml de solución TB1 (del inglés, Transformation Buffer) mediante agitación suave, y nuevamente se volvió a centrifugar a 3000 rpm durante 5 min. El precipitado se resuspendió esta vez con 2 ml de solución TB2 mediante agitación suave. Posteriormente, se hicieron alícuotas de 100 µl que se congelaron en N₂(l) y se almacenaron a -80°C. Las composiciones exactas de las soluciones de transformación TB1 y TB2 se detallan a continuación.

Tampón TB1: $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$ 30 mM a pH=5,8, MnCl_2 50 mM, RbCl_2 100 mM, CaCl_2 10 mM, glicerol 15% (p/v),

Tampón TB2: MOPS 10 mM a pH=7, RbCl_2 10 mM, CaCl_2 75 mM, glicerol 15% (p/v).

3.3.11.4.2 Transformación de células competentes de *Escherichia coli*

Las células competentes de *E. coli* se transformaron mediante choque térmico. Para ello, las células competentes se descongelaron en hielo durante 5 min. Posteriormente, se añadieron generalmente unos 2-5 μl de mezcla de ligación con el plásmido correspondiente, y la solución se mezcló cuidadosamente por pipeteo. Tras incubar nuevamente la mezcla a 4°C durante 5 min, se realizó el choque térmico incubando la mezcla a 42°C durante 1 min. Tras el choque térmico, se añadieron 600 μl de medio LB y las bacterias se incubaron a 37°C durante 1h 30 min. Pasado ese tiempo, las células se centrifugaron a 4000 rpm durante 1 min y se decantó todo el LB salvo 100-200 μl . Las células se resuspendieron en estos 100-200 μl de LB restante y se sembraron en una placa con medio LB sólido con el correspondiente antibiótico de selección. Las placas sembradas se incubaron a 37°C durante toda la noche hasta obtener colonias individuales. Los clones resistentes se comprobaron por PCR en colonia (ver apartado 3.3.5.2).

3.3.11.5 Conservación de las construcciones génicas

Los clones positivos para todos los clonajes realizados durante esta tesis se almacenaron añadiendo 200 μl de Glicerol 100% (p/v) a 800 μl de cultivo bacteriano de *E. coli* transformado con el vector que contiene el fragmento de DNA clonado. Finalmente, esta mezcla se congeló en $\text{N}_2(\text{l})$ y se almacenó a -80°C. De este modo, si se precisaba la utilización del constructo génico, simplemente se descongelaba la mezcla, se crecía el cultivo y se realizaba una extracción de DNA plasmídico (ver apartado 3.3.2).

3.4 OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS

3.4.1 Cultivos bacterianos de *Agrobacterium tumefaciens*

Todas las construcciones génicas clonadas anteriormente en *E. coli*, se introdujeron en la cepa desarmada GV3101 de *A. tumefaciens* con el objetivo de transformar posteriormente *Arabidopsis*. Esta cepa contiene el plásmido de ayuda pMP90, que además de conferir resistencia al antibiótico Gentamicina, contiene los genes de virulencia (*Vir*) que reconocen y procesan los LB/RB del T-DNA, permitiendo la transferencia a la planta de los constructos génicos obtenidos con anterioridad y que se encuentran en diferentes vectores de destino. Las bacterias se crecieron utilizando el medio LB (cuya composición se detalla en el apartado 3.3.11.4) ajustado a pH=7,2 y complementado con el antibiótico Gentamicina. Para la selección de transformantes, el medio se complementaba con la adición un segundo antibiótico según las necesidades experimentales. Las bacterias se crecían a 28°C durante aproximadamente 48h en placas de Petri con medio LB de consistencia sólida, o bien, en cultivo con medio LB líquido y agitación suave.

3.4.1.1 Preparación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

El proceso de preparación de células competentes, se llevó a cabo utilizando la solución tampón HEPES, en condiciones de esterilidad y a 4°C. Se partió de un cultivo crecido en 50 ml de LB con Gen con $A_{600}=0,5-0,6$, el cual se centrifugó a 3500 rpm durante 15 min para precipitar las bacterias. Se resuspendió el precipitado con 15 ml de solución HEPES 1 mM, pH=5, mediante agitación suave. Nuevamente se volvió a centrifugar a 3500 rpm durante 10 min y el precipitado se resuspendió esta vez con 25 ml de solución HEPES 1 mM, pH=5 y glicerol 10% (p/v) mediante agitación suave. Este último paso volvió a repetirse una segunda vez resuspendiendo en 400 μ l de solución. Posteriormente, se hicieron alícuotas de 50 μ l que se congelaron en $N_2(l)$ y se almacenaron a -80°C.

3.4.1.2 Transformación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

Las células competentes de *A. tumefaciens* se transformaron mediante electroporación. Para ello, las células competentes se descongelaron en hielo durante 5 min. Seguidamente, se añadieron generalmente $\approx 10-20$ ng de vector plasmídico con el constructo génico deseado y se mezcló por pipeteo. Rápidamente, la mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación previamente lavada

con Etanol, y se procedió a la electroporación. La electroporación se llevó a cabo utilizando un electroporador Gene Pulser II (Bio-Rad) durante 10 ms fijando los siguientes parámetros: capacitancia a 25 μ F, voltaje a 1,8 kV y resistencia eléctrica a 400 Ω . Tras la electroporación, se añadió a la cubeta 1 ml de LB, las células se recogieron en otro tubo que se incubó a 28°C durante 1h 30 min. Pasado ese tiempo, las células se centrifugaron a 4000 rpm durante 1 min y se decantó todo el LB salvo 100-200 μ l. Las células se resuspendieron en estos 100-200 μ l de LB restante y se sembraron en una placa con medio LB sólido con Gentamicina y un segundo antibiótico de selección según las necesidades experimentales. Las placas sembradas se incubaron a 28°C durante 48 h hasta obtener colonias individuales. Los clones resistentes se comprobaron por PCR en colonia (ver apartado 3.3.5.2).

3.4.2 Transformación estable de *Arabidopsis thaliana*

Durante la realización de esta Tesis se transformaron plantas de *Arabidopsis Col-0* con *A. tumefaciens* GV3101 transformados con el vector plasmídico que contenía el constructo génico deseado, mediante el método de inmersión floral (en inglés, floral dip) (Clough y Bent, 1998) adaptando el protocolo establecido por Zhang et al., 2003. Primeramente, se crecieron plantas de *Arabidopsis* en maceta, sembrándose unas 20 plantas por maceta, y dos macetas por cada constructo génico a transformar. Cuando empezaron a desarrollarse las primeras inflorescencias (5 semanas de crecimiento), se estableció un cultivo de *A. tumefaciens* en 500 ml de LB suplementado con el antibiótico Gentamicina y el antibiótico de selección correspondiente. Cuando se alcanzó una $A_{600}=1-1,2$, el cultivo se centrifugó a 4000 g durante 10 min y seguidamente, las células se resuspendieron cuidadosamente con un pincel en 500 ml de solución que contenía Sacarosa 5% (p/v) y el detergente Silwet L-77 0,02% (v/v) (Lehle Seeds). La solución con las bacterias se mezclaba constantemente con una vara agitadora a la vez que se sumergían las inflorescencias de las plantas a transformar durante 20-30 s. Tras la inmersión, se colocaron unas guías de madera alrededor de la maceta, y las plantas se envolvieron con plástico durante 24 h para conservar la humedad y que las bacterias pudiesen acceder adecuadamente al interior de las inflorescencias. Finalmente, las plantas se continuaron creciendo hasta obtener semillas (semillas T1).



Figura 3.16 Proceso de inmersión floral en plantas de *Arabidopsis* de 5 semanas. Imagen obtenida de Zhang et al., 2003.

3.4.3 Selección y segregación de plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas

Las plantas de *Arabidopsis* fueron transformadas con vectores que contenían marcadores de selección al antibiótico Higromicina, por lo que para la selección de transformantes las plantas se sembraron en placas con medio MS con el antibiótico Higromicina. Se sembraron aproximadamente unas 1000 semillas T1 (0,1 g) de las cuales solo crecieron aproximadamente entre el 0'5-1%. Cada una de las plántulas resistentes a Higromicina se consideró como un evento de transformación independiente.

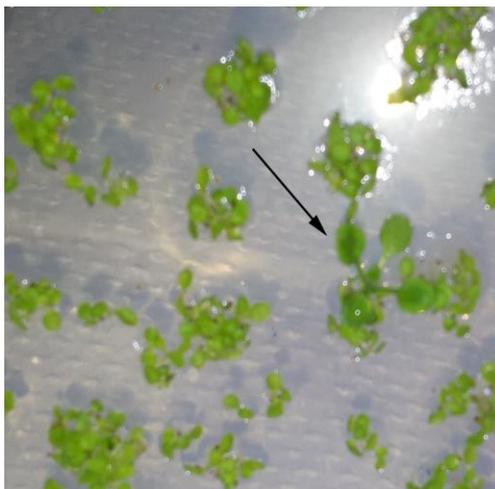


Figura 3.17 Selección de semillas T1 en placas con medio MS con Higromicina a 25 $\mu\text{g/ml}$. La flecha señala una planta resistente al antibiótico.

Las plántulas transformadas se transfirieron a maceta y se crecieron hasta obtener nuevamente semillas (semillas T2). Posteriormente, se sembraron 100 semillas T2 (0,01 g) de cada evento de transformación, y se buscaron líneas en las que se obtuviese un porcentaje de germinación de alrededor del 75% (segregación mendeliana). Algunas de esas plántulas se volvieron a transferir a maceta y se crecieron hasta obtener nuevamente semillas (semillas T3). Nuevamente, se sembraron 100 semillas T3 (0,01 g) de cada línea seleccionada anteriormente, y se buscaron líneas en las que se obtuviese un porcentaje de germinación de alrededor del 100%. Estas líneas se consideraron como homocigotas para un determinado transgen y se utilizaron posteriormente para los experimentos pertinentes. La presencia del transgen también se comprobó por PCR tal y como se detalla en el apartado 3.3.5.3.

3.5 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

3.5.1 Tinción histoquímica GUS

La tinción histoquímica GUS, se realizó en plantas transgénicas estables que expresaban el gen testigo GUS bajo el control de fragmentos de diferente longitud de los promotores putativos de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8*. La enzima de origen bacteriano β -glucuronidasa (GUS) es capaz de metabolizar el reactivo 5-bromo-4-cloro-3-indolilglucuronidato (X-Gluc) dando un producto fácilmente detectable por su coloración azul. La detección histoquímica del gen GUS permite, en primer lugar, llevar a cabo un análisis semicuantitativo de la expresión de un gen determinado. En segundo lugar, permite visualizar en que parte concreta de un órgano o tejido de la planta se produce la expresión del gen de interés (Jefferson et al., 1987).

El protocolo de tinción seguido en esta tesis es una adaptación del protocolo establecido por Jefferson et al., 1987. Las muestras (plántulas, hojas, raíces,...) se sumergieron en solución de tinción GUS fría y se infiltraron al vacío durante 20 min. Seguidamente, la tinción GUS se realizó incubando las muestras a 37°C, en oscuridad y con agitación suave durante un tiempo variable dependiendo del nivel de expresión del gen analizado (en esta Tesis doctoral, entre 1-3 h). A continuación, se detalla la composición de la solución de tinción GUS.

Solución Tinción GUS: NaPi 50 mM a pH=7,2, EDTA 10mM, ferrocianuro de potasio 2,5 mM, ferricianuro de potasio 2,5 mM, Triton X-100 0.1% (v/v), X-Gluc (ThermoScientific™) 1 mg/ml.

Transcurrido este tiempo, se retiró la solución de tinción y las muestras se incubaron en primer lugar en una solución acético : etanol 96% (3:1) (v/v) durante 15 min, y posteriormente en Etanol 70% (v/v) hasta que la clorofila se eliminó completamente (generalmente durante toda la noche). Las muestras se almacenaron en Etanol 70% a 4°C para su posterior visualización en una lupa Leica M165 FC (Leica Microsystems). Los resultados se obtuvieron a partir de la visualización de al menos tres plantas individuales de dos líneas transgénicas independientes para cada construcción génica.

3.5.2 Análisis fluorimétrico GUS

Este análisis se llevó a cabo de forma complementaria al análisis histoquímico. El análisis fluorimétrico GUS, se realizó en plantas transgénicas estables que expresaban el gen testigo GUS controlado por fragmentos de diferente longitud de los promotores putativos de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8*. La técnica consiste en una variación del principio de la tinción histoquímica GUS, donde en esta ocasión se suministra a la enzima GUS el reactivo 4-metil-umbelliferil- β -D-glucuronidato (MUG), cuyo producto emite fluorescencia. Esta técnica permite un análisis cuantitativo de la actividad GUS y en consecuencia, de los niveles de actividad del promotor que regula la expresión de este gen testigo.

El protocolo seguido para el ensayo fluorimétrico GUS es una adaptación del protocolo establecido por Vitha et al., (1993). Se partió como mínimo de 100 mg de tejido foliar congelado previamente en N₂(l). La muestra todavía congelada se homogeneizó mediante un molino de bolas Retsch MM400 (Retsch) programado a 30 agitaciones / s durante 1 minuto, hasta obtener un polvo fino. Seguidamente, a la muestra se le añadieron 200 μ l de solución de extracción GUS fría mezclando vigorosamente. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 14.000x g y 4°C durante 5 min y se recogió el sobrenadante. Los niveles de proteína de la muestra se cuantificaron como se establece en el apartado 3.7.1.2. Al extracto así obtenido (el cuál contenía 100 μ g de proteína total) se le añadió 100 μ l de solución fluorimétrica GUS fría y se mezcló vigorosamente. Seguidamente, el ensayo fluorimétrico GUS se realizó incubando las muestras a 37°C, en oscuridad y con agitación suave durante un tiempo variable dependiente del nivel de expresión del gen analizado (en esta Tesis doctoral, entre 1-3 h). A continuación, se detallan las composiciones de la solución de extracción GUS y de la solución fluorimétrica GUS.

Solución extracción GUS: NaPi 50 mM a pH=7,2, EDTA 10mM, N-lauroilsacosil de Sodio 0,1% (p/v), Triton X-100 0.1% (v/v), β -mercapto-etanol 0,7 μ l/ml.

Solución fluorimétrica GUS: Solución extracción GUS con MUG 2 mM.

Finalizada la incubación, la reacción se interrumpió añadiendo 800 μ l de solución Na₂CO₃ 0,2 M. Finalmente, los datos de fluorescencia se determinaron utilizando un lector de placas SynergyTM HT plate reader (BioTek) con una longitud de onda de excitación de 365 nm y de emisión de 455 nm. Los resultados se obtuvieron a partir del análisis de al menos tres muestras biológicas con tres replicados técnicos por muestra.

3.6 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE COMPLEMENTACIÓN BIOMOLECULAR DE FLUORESCENCIA

La complementación biomolecular de la fluorescencia (BIFC, del inglés Biomolecular Fluorescence Complementation), se utilizó para la evaluación de la posible interacción entre diferentes desaturasas plastidiales: *AtFAD7*, *AtFAD8* y *AtFAD6*. En esta técnica, los genes que codifican las proteínas cuya interacción se quiere evaluar, se fusionan con los genes de los fragmentos de la región N-terminal y C-terminal, respectivamente, de una proteína fluorescente truncada. De este modo, al coexpresar los constructos en un mismo entorno, la proteína fluorescente sólo se ensambla y emite señal si las dos proteínas problema se encuentran a una distancia mínima de 100 Å (10 nm). La técnica de BIFC suele dar muy pocos falsos positivos debido a la escasa autofluorescencia, por lo es el método más fiable del que se dispone en plantas a día de hoy para demostrar la interacción de proteínas *in vivo* (Bracha-Drori et al., 2004). En este trabajo la proteína fluorescente utilizada para la técnica de BIFC fue la YFP.

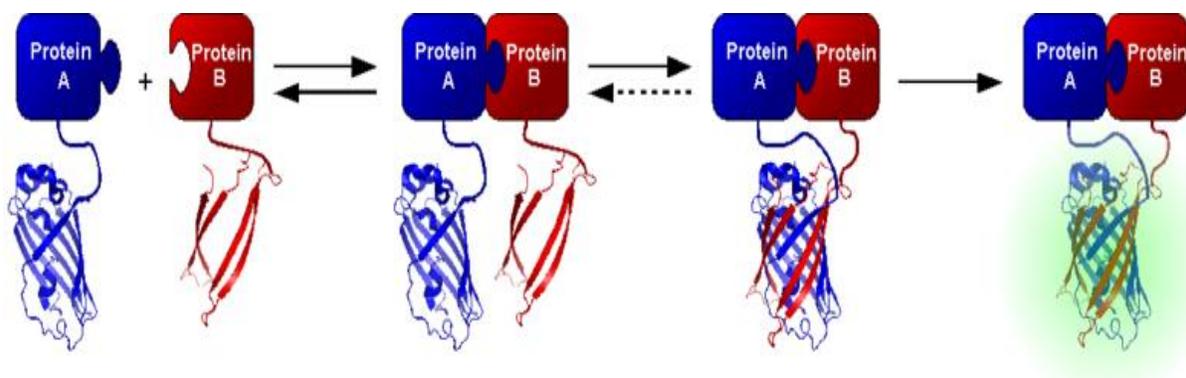


Figura 3.18 Esquema donde se muestra el principio de la técnica de BIFC. Imagen obtenida de Wikimedia ([https://commons.wikimedia.org/wiki/File:BiFC_\(details\).png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:BiFC_(details).png))

Las construcciones génicas necesarias para la realización del análisis de interacción mediante BIFC se han detallado en el apartado 3.3.11.3. La técnica de BIFC se realizó mediante expresión transitoria en protoplastos de *Arabidopsis* (TEAMP, del inglés Transient Expression of Arabidopsis Mesophyll Protoplasts). Para ello, en primer lugar es necesario obtener protoplastos y tras su purificación, proceder a su transformación transitoria con los vectores de interés.

3.6.1 Obtención y purificación de protoplastos de *Arabidopsis thaliana*

Los protoplastos se obtuvieron a partir de hojas de roseta de plantas de *Arabidopsis* crecidas durante 4 semanas. Los protoplastos, al carecer de pared celular, se rompen con mucha facilidad, por lo que se optó por la utilización del método del sándwich descrito por Wu et al., (2009), donde la manipulación es mínima y por tanto se obtiene un rendimiento muy superior al descrito por otros métodos. Primeramente, el haz de las hojas se fijó a una superficie adhesiva y sobre el envés se colocó una tira de cinta adhesiva Scotch®. Al tirar rápidamente de la cinta Scotch se eliminó la cutícula de la superficie del envés y tras esto, un total de 10-15 hojas se sumergieron en 10 ml de solución de digestión de la pared celular con las enzimas celulasa y macerozima. La digestión se realizó en oscuridad, sin agitación y a temperatura ambiente durante 1 h, no excediendo nunca este tiempo.

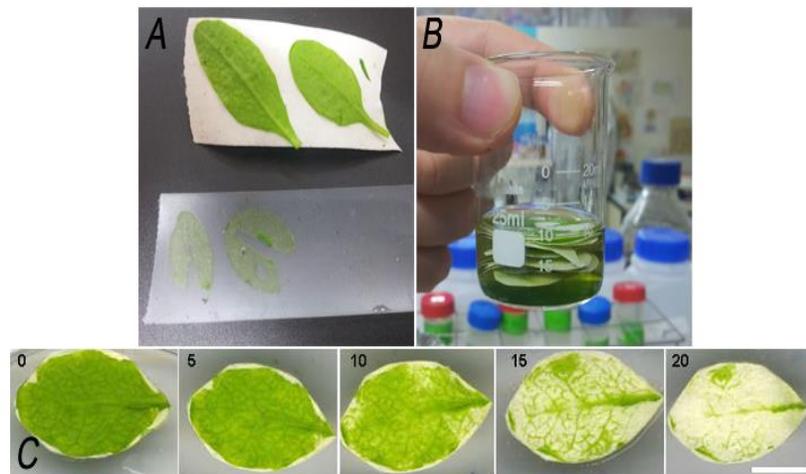


Figura 3.19 Proceso de obtención de protoplastos a partir de hojas de 4 semanas de *Arabidopsis* por el método del sándwich: (A) Eliminación de la cutícula con cinta Scotch® (B) Digestión de células del mesófilo con celulasa y macerozima (C) Obtención de protoplastos a diferentes tiempos de digestión (en min). Imagen adaptada de Wu et al., 2009.

Finalizada la digestión, la solución que contenía los protoplastos se diluyó con 20 ml de solución de lavado, y posteriormente la mezcla se vertió cuidadosamente a un tubo falcon de 50 ml a través de un filtro con un poro de 0,2 μm de \O . La solución filtrada se centrifugó a 100x g, a 4°C y con aceleración/desaceleración al mínimo durante 5 min para precipitar los protoplastos. Los protoplastos se resuspendieron cuidadosamente por pipeteo (utilizando una punta de pipeta con el

extremo cortado) en 4 ml de solución de resuspensión. En este momento se comprobó el estado e integridad de los protoplastos visualizándolos con el microscopio Leica M165 FC (Leica Microsystems).

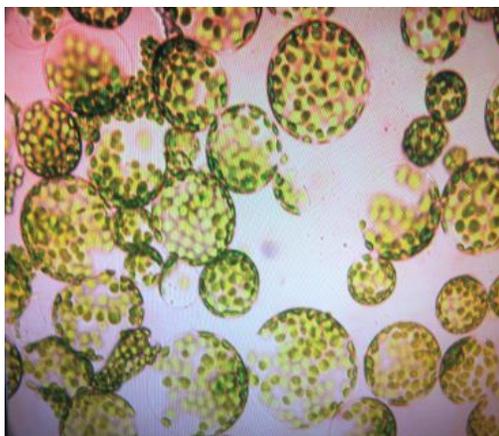


Figura 3.20 Visualización del estado e integridad de protoplastos de *Arabidopsis* con microscopio Leica M165 FC tras su purificación.

La composición de las soluciones de digestión, lavado y resuspensión de protoplastos se detallan a continuación.

Solución digestión protoplastos: manitol 0,4 M, KCl 20 mM, CaCl₂ 10 mM, MES 20 mM a pH=5,7. Posteriormente añadir celulasa R10 1,5% (p/v) (Duchefa Biochemie) y macerozima 0,4% (p/v) (Duchefa Biochemie). Para disolver las enzimas la solución se calentó a 55°C durante 10 min, y posteriormente se dejó enfriar.

Solución lavado protoplastos: CaCl₂ 125 mM, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MES 2 mM a pH=5,7.

Solución resuspensión protoplastos: manitol 0,4 M, MgCl₂ 15 mM, MES 4 mM a pH=5,7.

3.6.2 Transformación de protoplastos de *Arabidopsis thaliana*

Los protoplastos obtenidos y purificados en el apartado 3.6.2.1 se transformaron mediante el método del polietilenglicol-calcio (PEG-Ca) descrito por Yoo et al., 2007 con algunas modificaciones. A mayor porcentaje de PEG utilizado en la transformación, mayor es el rendimiento de ésta, pero también aumenta el porcentaje de protoplastos lisados. Por lo tanto, se calculó empíricamente que el porcentaje óptimo de polietilenglicol utilizado para la transformación de protoplastos era del 30%, teniendo en cuenta el balance de protoplastos transformados / lisados. Para la transformación, se mezclaron 100 µl de solución de protoplastos con 100 µl de solución de transformación de protoplastos, y a continuación se añadió el volumen equivalente a 20 ng de DNA plasmídico de cada una de las construcciones génicas necesarias para el estudio de BIFC (la que contiene la región N-terminal y la que contiene la región C-terminal de la proteína fluorescente). Se mezcló todo cuidadosamente por pipeteo (utilizando una punta de pipeta con el extremo cortado) y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Pasado ese tiempo, se añadieron 400 µl de solución de lavado de protoplastos para parar la reacción de transformación y posteriormente la mezcla se centrifugó a 100x g, a 4°C y con aceleración/desaceleración al mínimo durante 5 min. Finalmente, los protoplastos transformados se resuspendieron en 2 ml de solución de incubación de protoplastos, y se dejaron incubar a 20-22°C y luz permanente durante 12-24 h como paso previo a la visualización de la fluorescencia. A continuación se detalla la composición exacta de las soluciones de transformación y de incubación de protoplastos. La composición de la solución de lavado de protoplastos puede consultarse en el apartado 3.6.2.1.

Solución transformación protoplastos: manitol 0,2 M, CaCl₂ 100 mM, PEG4000 30% (p/v) (FlukaTM, Thermo Scientific).

Solución incubación protoplastos: manitol 0,5 M, KCl 20 mM, MES 4 mM a pH=5,7.

3.7 MICROSCOPIA CONFOCAL Y DE FLUORESCENCIA

Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron en un microscopio confocal Leica SP2 (Leica Microsystems) perteneciente al Servicio Técnico de Microscopía e Imagen del Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBA) del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS), y utilizado en modo autoservicio. Se visualizaron muestras de plantas de *Arabidopsis* con las construcciones promotor::gen-GFP donde se detectó la señal fluorescente de la proteína GFP. Las muestras se visualizaron con objetivos de inmersión de 40x o 63x. Para la excitación de la GFP se utilizó el láser de argón a 488 nm y su emisión se recogió en el espectro comprendido entre 510-540 nm. Cuando se analizaban muestras de tejido foliar, la autofluorescencia de la clorofila se detectó excitando con el láser de helio-neón a 633 nm y su emisión se recogió en el espectro comprendido entre 650-715 nm. Cuando se analizaban muestras de tejido radicular, las muestras previamente se teñían con una solución de yoduro de propidio 15 μ M durante 10 min con el objetivo de marcar la pared celular de las células de la raíz. La fluorescencia del yoduro de propidio se detectó excitando con el láser de argón a 488 nm y su emisión se recogió en el espectro comprendido entre 600-680 nm. Se comprobó que no se producían solapamientos en los canales de fluorescencia.

La fluorescencia YFP emitida por los protoplastos transformados utilizados en el ensayo de BIFC (ver apartado 3.6.2) se detectó en el microscopio de fluorescencia Leica DM 2500. Las muestras se visualizaron el objetivo de inmersión de 40x. La YFP fue excitada con un láser de 514 nm y su emisión se recogió en el espectro comprendido entre 520-560 nm, mientras que la autofluorescencia de la clorofila se detectó excitando con un láser de 633 nm y su emisión se recogió en el espectro comprendido entre 650-715 nm.

3.8 TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

3.8.1 Western Blot

El análisis inmunológico de proteínas se realizó mediante la técnica de Western blot o inmunodetección, consistente en una electroforesis para separar las proteínas, la transferencia de dichas proteínas a una membrana adsorbente y la hibridación de la misma con anticuerpos específicos contra la proteína de interés, que en este caso, eran detectados por quimioluminiscencia. En este trabajo, la técnica de Western blot se utilizó para determinar la abundancia relativa de las proteínas *AtFAD7* y *AtFAD8* en plantas transgénicas que contenían el constructo promotor::gen-GFP mediante la inmunodetección de la proteína fluorescente GFP.

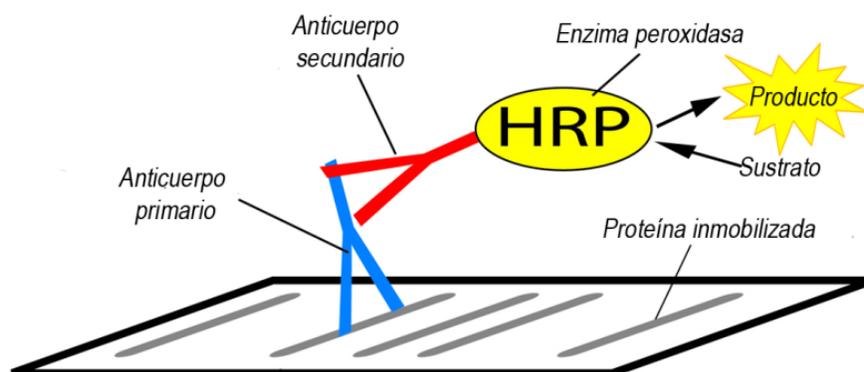


Figura 3.21 Esquema donde se muestra el principio de la técnica de Western blot y del método de detección por quimioluminiscencia. Imagen adaptada de G-BIOSCIENCES (<http://info.gbiosciences.com/blog/bid/159273/Which-Blocking-Agent-for-Western-Blotting>).

3.8.1.1 Preparación de extractos crudos de proteínas de *Arabidopsis thaliana*

Para la preparación de los extractos crudos de proteínas, se partió como mínimo de 100 mg de tejido vegetal congelado previamente en $N_2(l)$. El material todavía congelado, se homogeneizó mediante la utilización de un molino de bolas Retsch MM400 (Retsch) programado a 30 agitaciones / s durante 1 minuto, hasta convertirse en un polvo fino. Posteriormente, se añadieron 300 μ l de solución de resuspensión de extractos de proteínas y la mezcla se agitó vigorosamente. Las

muestras se congelaron de nuevo en N₂(l) y se almacenaron a -80°C para su posterior utilización. La composición de la solución de resuspensión de extractos de proteínas se detalla a continuación.

Solución resuspensión extractos: Tris-HCl 0,1 M a pH=7,5, EDTA 1 mM, MgCl₂ 10 mM, glicerol 20% (v/v), β-mercapto-etanol 14 mM.

3.8.1.2 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteína de los extractos obtenidos anteriormente se determinó por el método espectrofotométrico de Bradford (Bradford, 1976) utilizando el reactivo comercial BioRad Protein Assay (Bio-Rad). Al tratarse de un método de cuantificación relativo, se realizó una recta de calibrado con BSA con la solución utilizada para resuspender los extractos de proteína. Utilizando la recta de calibrado, se interpolaron los valores de A₅₉₅ de los extractos de proteínas para su cuantificación.

3.8.1.3 Preparación de geles de poliacrilamida

La separación de proteínas se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) en condiciones desnaturizantes (presencia de SDS y Urea). En esta Tesis doctoral, se utilizó un sistema de electroforesis vertical Miniprotean III (Bio-Rad), y se componían de dos fases, de distinta porosidad y pH: el gen concentrador, donde la muestra se agrupa en una zona muy estrecha de modo que entra uniformemente en la siguiente fase, y el gel separador, donde las proteínas migran según su masa molecular debido a su interacción con el SDS. Las composiciones exactas de los geles concentrador y separador utilizados para la realización de la electroforesis se detallan a continuación.

Reactivo	Gel concentrador 4%	Gel separador 12%
urea	-	4 M
Tris-HCl pH=8,8	-	375 mM
Tris-HCl pH=6,8	125 mM	-
SDS	0,1% (p/v)	0,1% (p/v)
acrilamida/bis-acrilamida (Bio-Rad)	4% (v/v)	12% (v/v)
APS (Bio-Rad)	0,02% (p/v)	0,01% (p/v)
TEMED (Bio-Rad)	13,36 mM	3,34 mM
H ₂ O destilada ultrapura	hasta 2,5 ml	hasta 5 ml

Tabla 3.5 Reactivos y concentraciones utilizadas en la preparación de los geles concentrador y separador.

3.8.1.4 Electroforesis SDS-PAGE de proteínas

Finalizada la polimerización del gel, se procedió a la realización de la electroforesis. Para desnaturalizar las muestras, se cargó el volumen equivalente a 20 µg de proteína total con 5 µl de solución de desnaturalización, en un volumen final de 20 µl, y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Se realizó este método de desnaturalizado en vez del hervido tradicional debido a que las proteínas de membrana tienen tendencia a agregarse, formando complejos de alto peso molecular de difícil separación e identificación. La composición exacta de la solución de desnaturalización de proteínas se detalla a continuación.

Solución desnaturalización proteínas: Tris-HCl 62 mM a pH=6,8, SDS 8% (p/v), glicerol 10% (v/v), azul de bromofenol 0,08% (p/v), β-mercapto-etanol 5% (v/v).

Una vez desnaturalizadas las muestras, los geles de poliacrilamida preparados anteriormente se introdujeron en una cubeta con solución de electroforesis. Se cargaron los pocillos con 20 µl de muestra desnaturalizada. La electroforesis se desarrolló a un voltaje constante de 100V durante 3-4 h. La masa molecular de las proteínas se estimó usando como referencia el marcador de masa molecular SeeBlue Plus2 (InvitrogenTM, Thermo Scientific). A continuación se especifica la composición de la solución de electroforesis de proteínas.

Solución electroforesis proteínas: Tris-HCl 25 mM a pH=8,3, glicina 192 mM, SDS 0,1% (p/v).

3.8.1.5 Transferencia de proteínas a membrana

Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Pall Corporation) mediante electrotransferencia, utilizando el equipo Mini Trans-Blot (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Previamente, la membrana se hidrató en metanol durante 5 min y posteriormente se incubó con solución de transferencia otros 5 min adicionales. A continuación, se colocó la membrana junto al gel de electroforesis en la carpeta de transferencia, entre dos esponjas planas y dos trozos de papel Whatman, y todo se sumergió en una cubeta con solución de transferencia fría. Las proteínas se transfirieron a la membrana a voltaje constante de 100 V durante 1 h 30 min. A continuación, se detalla la composición de la solución de transferencia de proteínas.

Solución transferencia proteínas: Tris-Hcl 25 mM a pH=7,5, glicina 192 mM, metanol 20% (v/v).

Tras la transferencia, la membrana se bloqueó incubando en solución T-TBS con leche desnatada 5% (p/v) a 4°C con agitación suave y durante toda la noche. Al día siguiente, la membrana se volvió a lavar durante 10 min tres veces con solución T-TBS. La composición de la solución T-TBS se detalla a continuación.

Solución T-TBS: Tris-Hcl 25 mM a pH=7,5, NaCl 0,9% (p/v), Tween-20 0,05% (Bio-Rad).

Tras la transferencia, el gel de electroforesis se tiñó durante toda la noche con solución azul de Coomassie para la visualización de las proteínas, y posteriormente se quitó el exceso de colorante incubando el gel durante 20 min con solución de desteñido. Las composiciones de las soluciones Coomassie y de desteñido se detallan a continuación.

Solución azul de Coomassie: etanol 45% (v/v), ácido acético 6% (v/v), azul de Coomassie 0,025% (p/v).

Solución de desteñido: metanol 10% (v/v), ácido acético 30% (v/v).

3.8.1.6 Detección inmunológica de proteínas

La detección inmunológica de proteínas se realizó utilizando el anticuerpo comercial anti-GFP (Abcam) como anticuerpo primario. La membrana bloqueada con las proteínas transferidas, se incubó a temperatura ambiente y con agitación suave durante 1h 30 min en solución T-TBS con el anticuerpo anti-GFP a una dilución 1 / 2.000. Posteriormente, la solución con el anticuerpo primario se retiró y la membrana se lavó durante 15 min tres veces con solución T-TBS.

El método de detección de proteínas se basa en la utilización de un sustrato quimioluminiscente conjugado a un anticuerpo secundario que reconoce la cadena fija del anticuerpo primario. Se utilizó como anticuerpo secundario una IgG anti-conejo comercial conjugada a la enzima peroxidasa de rábano (HRP) (Sigma-Aldrich). La membrana previamente tratada con el anticuerpo primario, se incubó a temperatura ambiente y con agitación suave durante 1h 30 min en una solución T-TBS con leche desnatada 5% (p/v) y con el anticuerpo IgG anti-conejo a una dilución 1/ 1.000. Posteriormente, la solución con el anticuerpo secundario se retiró y la membrana se lavó durante 20 min tres veces con solución T-TBS.

La quimioluminiscencia emitida por la peroxidasa conjugada al anticuerpo secundario, se captó mediante una película autorradiográfica, tras suministrar a la enzima el sustrato necesario para la reacción quimioluminiscente. La membrana se incubó durante 5 min con el reactivo SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific™). Seguidamente, la membrana se expuso a una película fotográfica CL-Exposure Blue X-Ray Film (Pierce) en una cámara oscura Hypercassette (Amersham Biosciences) con un tiempo de exposición calculado empíricamente para obtener una señal adecuada (generalmente 10-15 min de exposición). El revelado y fijado de la película se realizó incubando 2 min con la solución reveladora T-Max Professional (Kodak) y seguidamente otros 2 min con la solución fijadora Polymax (Kodak). La película revelada se escaneó para su digitalización.

3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados presentados en esta Tesis doctoral proceden de la media de tres repeticiones biológicas con tres determinaciones analíticas por experimento. Para comparar tratamientos se aplicó el análisis de la varianza (ANOVA) y las diferencias entre las medias fueron comprobadas con el test de rango múltiple de Duncan. Se llevó a cabo el análisis estadístico con el programa Statgraphics Plus de Windows 2.1, con un nivel de significancia de 0,05.

4. RESULTADOS

4.1 IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS REGULADORAS Y FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES *AtFAD7* Y *AtFAD8*

4.1.1 Análisis *in silico* de los promotores de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8*

Como primer paso para la identificación de elementos reguladores en *cis*, se realizó un análisis bioinformático de la región nucleotídica situada por delante del codón de inicio de la traducción (ATG) de los genes *AtFAD7* (*At3g11170*) y *AtFAD8* (*Atg05580*). Para el análisis se utilizaron las herramientas online Plant Cis-Acting Response Elements (PlantCare) (Lescot et al., 2002) y Plant Cis-Acting Regulatory DNA Elements (PLACE) (Higo et al., 1999). Ambas herramientas son las más comúnmente usadas en la literatura, y utilizan bases de datos experimentales obtenidas a partir del análisis funcional de diferentes promotores de genes de plantas. De este modo, se detectaron varios elementos reguladores en *cis* comunes y otros específicos, así como su distribución en las secuencias de los promotores de ambos genes.

En el caso del gen *AtFAD7*, se consideró como posible promotor una secuencia de 1682 pb situada por delante de su ATG en el cromosoma 3, mientras que en el caso de *AtFAD8*, se consideró una secuencia de 2958 pb en el cromosoma 5. Se consideraron fragmentos de estas longitudes debido a que el análisis bioinformático reveló la existencia de elementos reguladores aún en regiones tan distantes con respecto al ATG. Es importante tener en cuenta, que el fragmento con el promotor de *AtFAD7* contiene 843 pb de la secuencia codificante del gen *At3g11165*, de función desconocida y que está situado en la hebra antisentido del DNA (ver Fig. 4.1). A su vez, el fragmento con el promotor de *AtFAD8* contiene 2520 pb de la secuencia codificante del gen *At5g05570*, que codifica una proteína con actividad metiltransferasa y que está situado en la misma hebra que el gen *AtFAD8* (ver Fig. 4.1).

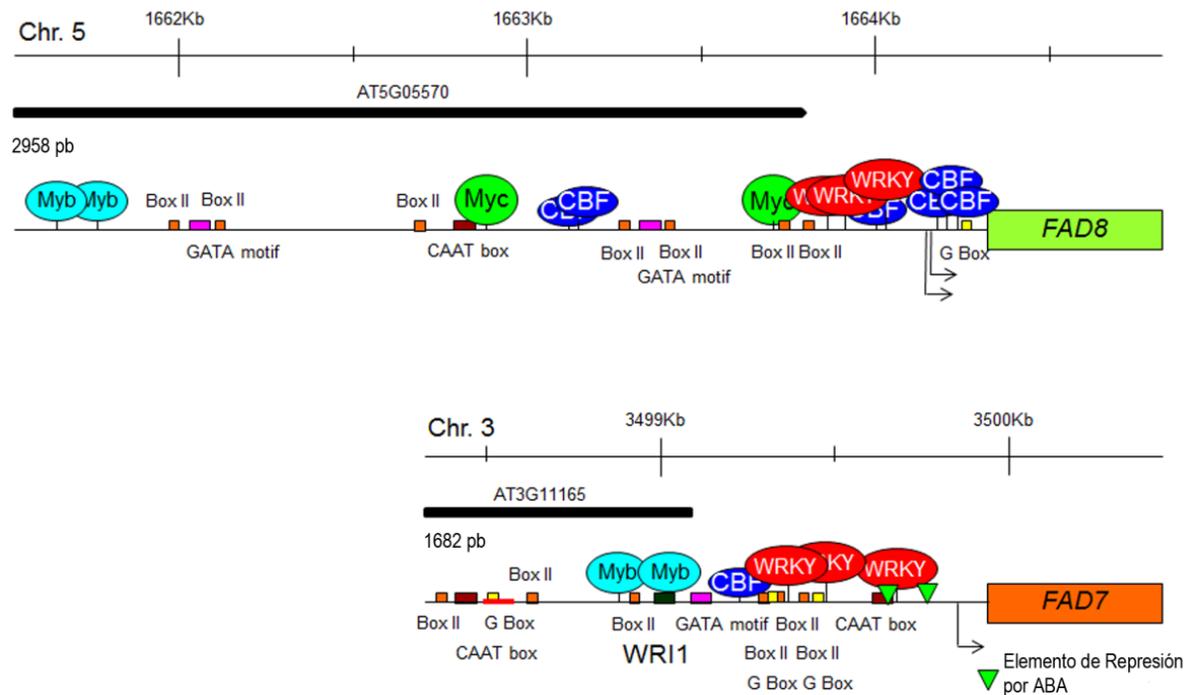


Figura 4.1 Diagrama esquemático de los promotores putativos de *AtFAD7* y *AtFAD8* considerados en este estudio. Se representan los elementos reguladores en cis detectados por los programas informáticos PlantCare y PLACE.

El análisis de las secuencias con los promotores putativos de *AtFAD7* y *AtFAD8* reveló la presencia de tres secuencias consenso para la unión de factores de transcripción de tipo WRKY en cada uno de los promotores. Los factores de transcripción de tipo WRKY se caracterizan por tener un dominio de unión a DNA cercano a su extremo N-terminal y formado por los aminoácidos W-R-K-Y. Estos factores de transcripción reconocen la secuencia TTGAC(T/C), que recibe el nombre de caja W (aunque son más conocidas por su nombre en inglés “W-box”). En el promotor de *AtFAD7*, las secuencias de unión a factores de transcripción de tipo WRKY se detectaron en -594/-588 (TTGACT), -521/-516 (TTGACT) y -263/-258 (TTGACC) con respecto al ATG, mientras que en el promotor de *AtFAD8* estas secuencias se detectaron en -490/-485 (TTGACC), -428/-423 (TTGACT) y -309/-304 (TTGACT) (ver Fig.1). Estas cajas han demostrado ser funcionales en procesos relacionados con la respuesta a estrés biótico y abiótico, senescencia y dormancia, germinación y desarrollo de semillas (Meier et al., 1991; Rushton y Somssich, 1998; Rushton et al., 2010). Se ha comprobado que las cajas W se agrupan en determinadas regiones de los promotores de genes inducibles por estrés (Malek et al., 2000; Chi et al., 2013; Van Aken et al., 2013). El

análisis de los promotores de *AtFAD7* y *AtFAD8* también mostró un agrupamiento de las tres secuencias reconocidas por factores de transcripción de tipo WRKY.

Otro elemento común entre los promotores de *AtFAD7* y de *AtFAD8* era la presencia de dos secuencias consenso reconocidas por factores de transcripción de tipo MYB. La superfamilia de factores de transcripción de tipo MYB se encuentra presente en todos los eucariotas, siendo el subgrupo R2R3 el más abundante en plantas. Estos factores de transcripción presentan el dominio MYB de unión a DNA, formado por una serie de repeticiones constituidas cada una de ellas por 52 aminoácidos agrupados en tres hélices α , la última de las cuales interacciona directamente con el DNA. El número de repeticiones junto con la secuencia de aminoácidos de cada repetición, es lo que determina las diferentes subfamilias de factores de transcripción de tipo MYB (Ogata et al., 1996; Jia et al., 2004; Dubos et al., 2010). La secuencia consenso reconocida por los factores de transcripción de tipo MYB es tAACTG (Urao et al., 1993). En el promotor de *AtFAD7*, las secuencias de unión a factores de transcripción de tipo MYB se detectaron en -1093/-1087 (CAACTG) y -927/-922 (TAACGG) con respecto al ATG, mientras que en el promotor de *AtFAD8* estas secuencias se detectaron mucho más alejadas del TSP, concretamente en -2840/-2834 y -2708/-2703 (CAACTG) (ver Fig. 4.1). Se ha comprobado que la cadena complementaria reversa de estas secuencias coinciden con la secuencia funcional CNGTT(G/A) determinada por Romero et al., (1998) y que recientemente, se ha comprobado que es reconocida por el factor de transcripción *AtMYB44* en el promotor de *AtWRKY70* (Shim et al., 2013).

También se detectaron tanto en el promotor de *AtFAD7* como en el de *AtFAD8* la presencia de varias cajas G (aunque son más conocidas por su nombre en inglés “G-box”), concretamente cuatro en el caso de *AtFAD7* y una, situada en la región transcrita no traducida (5'-UTR), en el caso de *AtFAD8*. Las cajas G son reconocidas por factores de transcripción de tipo GBFs (del inglés, “G-box Binding Factors”), los cuales participan en procesos de desarrollo relacionados con la regulación por luz o por hormonas (Siberil et al., 2001).

El análisis bioinformático también reveló la presencia de elementos reguladores diferenciales entre ambos promotores. Es el caso de dos secuencias consenso reconocidas por factores de transcripción de tipo MYC identificadas en -1503/-1498 y en -652/-647 (CACATG) con respecto al ATG en el promotor de *AtFAD8*, pero no detectadas en el promotor de *AtFAD7* (ver Fig. 4.1). Se ha comprobado que estas secuencias son funcionales y que intervienen en la activación, entre otros genes, del gen *rd22* en respuesta al estrés abiótico en *Arabidopsis* (Abe et al., 1997). La secuencia CACATG identificada en el promotor de *AtFAD8* es idéntica a la reconocida por ICE1 (del inglés, “Inducer of CBF Expression 1”), un factor de transcripción de tipo MYC que interviene en la

activación de genes implicados en la respuesta a bajas temperaturas mediante un proceso de señalización independiente de ABA (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005, 2006). Como su propio nombre indica, se ha comprobado que ICE1 induce la expresión de varios factores de transcripción de la familia CBF/DREB (del inglés, “Cold Binding Factor / Dehydration Responsive Element Binding”) y que actúa conjuntamente con ellos (Chinnusamy et al., 2003; Lee et al., 2005; Zhou et al., 2011; Kim et al., 2015). En este sentido, el análisis bioinformático también reveló la existencia de varias secuencias consenso para la unión de factores de transcripción de tipo CBF/DREB. Concretamente se identificaron seis secuencias de unión a CBF/DREB situadas en -1300/-1295 (GGCGAC), -1297/-1292, -346/-341, -128/-123, -125/-120 y -122/-117 (GACGAC) con respecto al ATG en el promotor de *AtFAD8*, mientras que en el promotor de *AtFAD7* sólo se detectó una en la posición -738/-733 (AGCGAC) (ver Fig. 4.1). Los CFB/DREB son factores de transcripción pertenecientes a la familia APETALA2 sensibles a etileno y a las bajas temperaturas pero insensibles al ABA o a la deshidratación (Medina et al., 1999). La presencia de las secuencias consenso para ICE1 junto con la presencia de múltiples secuencias de unión para factores de transcripción de tipo CBF/DREB en el promotor de *AtFAD8*, podría estar relacionado con el aumento de la transcripción de este gen en respuesta a las bajas temperaturas (McConn et al., 1994; Román et al., 2015).

Otro resultado interesante, fue la presencia en el promotor de *AtFAD7* de dos secuencias de represión por ABA situadas en -278/-267 (CAACTTG) y -203/-197 (GAAGTTG) con respecto al ATG (ver Fig. 4.1). Estas secuencias se encuentran presentes en más del 80% de los genes reprimidos por ABA (Wang et al., 2011). Estos elementos no estaban presentes en el promotor de *AtFAD8*. Las secuencias de represión por ABA en el promotor de *AtFAD7* se encontraban entre una secuencia TATA y el TSP, lo que sugiere que estos elementos pueden ser funcionales y que actúen además como efectores negativos.

Finalmente, hay que destacar la presencia en estos promotores de otros elementos reguladores, como por ejemplo secuencias CAAT, GATA o BoxII, o de varias secuencias TATA situadas cerca del TSP en ambos promotores. En el caso del promotor de *AtFAD7* también se detectó la secuencia AAAAAGGATAATCAT situada en -941/-927 con respecto al ATG (ver Fig. 4.1), que aunque muy degenerada, contiene los nucleótidos esenciales presentes en la secuencia diana cAAAAGtAggggtT del factor de transcripción WR11, implicado en el control de la biosíntesis de ácidos grasos en semillas (Cernac y Benning, 2006; Baud et al., 2007).

3.1.2 Análisis funcional de los promotores de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8* en tejidos fotosintéticos

Para evaluar la funcionalidad de los promotores analizados bioinformáticamente, las secuencias de 1682 pb y 2958 pb correspondientes con los promotores putativos de *AtFAD7* y *AtFAD8*, se clonaron en el vector pMDC163 (Curtis et al., 2003) Este vector permite analizar la expresión del gen testigo GUS bajo el control del promotor diana. Posteriormente, se obtuvieron plantas transgénicas estables de *Arabidopsis* que expresaban el gen GUS bajo el control de los promotores de *AtFAD7* y *AtFAD8*, pudiendo estudiar su patrón de expresión mediante la detección histoquímica de la actividad GUS.

Dado que la mayor acumulación de ácidos grasos trienoicos se produce en hojas, en primer lugar se evaluó la actividad de los promotores de *AtFAD7* y *AtFAD8* en tejidos fotosintéticos. Tras 1 hora de tinción, se detectó una elevada actividad GUS en el tejido foliar, incluyendo haces vasculares, de plantas transgénicas con la construcción promotor *AtFAD7*::GUS. Esta elevada actividad se daba tanto en cotiledones como en hojas de roseta y en hojas caulinares (ver Fig. 4.2 A-D). No se detectaron diferencias entre hojas de roseta de 10 y 20 días de desarrollo (ver Fig. 4.2 B y C), lo que sugiere la ausencia de cambios en el perfil de expresión de *AtFAD7* durante el desarrollo de la hoja. La elevada actividad del promotor *AtFAD7* en tejidos fotosintéticos, contrastó con la considerablemente menor actividad del promotor *AtFAD8*. Tras 1 hora de tinción, sólo se detectó actividad GUS en cotiledones, principalmente en los haces vasculares, de plantas transgénicas con la construcción promotor *AtFAD8*::GUS, siendo prácticamente indetectable en hojas de roseta y en hojas caulinares (ver Fig. 4.2 E-F). Para evaluar mejor en que tejidos el promotor de *AtFAD8* era activo, se aumentó el tiempo de tinción a 3 horas. En este caso, se detectó actividad GUS tanto en hojas de roseta como en hojas caulinares, aunque ésta era mucho menor que en cotiledones (ver Fig. 4.2 I-L). Esto contrastaba con *AtFAD7*, donde no se observaban diferencias entre diferentes tipos de hoja. También se observó que en hojas de roseta no había actividad GUS en haces vasculares y que la actividad GUS era superior en hojas de roseta de 20 días que en hojas de 10 días (ver Fig. 4.2 J-K), lo que sugiere que la actividad del promotor de *AtFAD8* aumenta a lo largo del desarrollo de la hoja. Esto contrasta nuevamente con *AtFAD7*, donde se detectaba actividad GUS en los haces vasculares y no se detectaban cambios a lo largo del desarrollo de las hojas de la roseta. Finalmente, no se detectó actividad GUS en las plantas control con el vector pMDC163 vacío (ver Fig. 4.2 M-P), lo que indicaba que la actividad GUS detectada era específica para cada promotor.

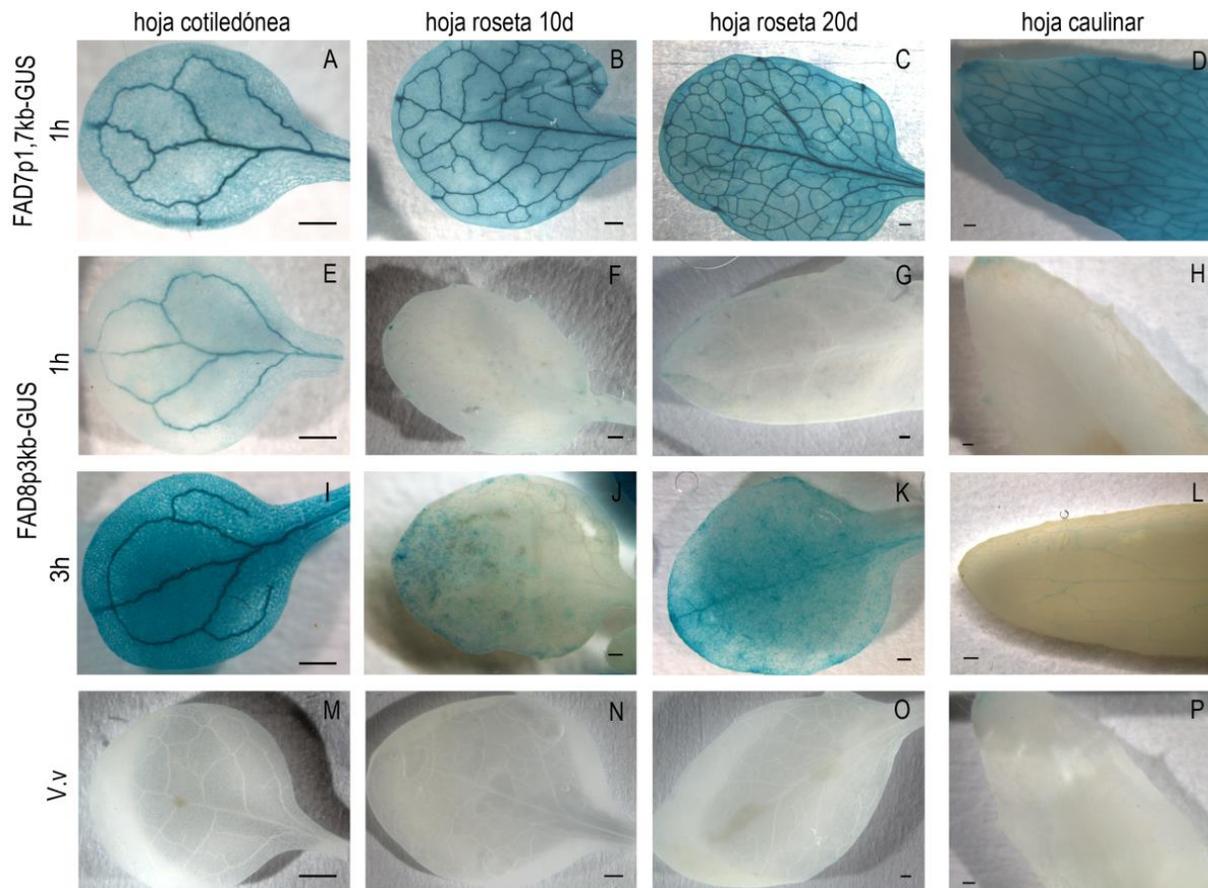


Figura 4.2 Comparación de la actividad de los promotores *AtFAD7* y *AtFAD8* mediante tinción histoquímica GUS en tejidos fotosintéticos. (A, E, I, M) hojas cotiledóneas de 2 semanas; (B, F, J, N) hojas de roseta de 10 días; (C, G, K, O) hojas de roseta de 20 días; (D, H, L, P) hojas caulinares de 4 semanas. (A-D) promotor *AtFAD7*::GUS tras 1 hora de tinción; (E-H) promotor *AtFAD8*::GUS tras 1 hora de tinción; (I-L) promotor *AtFAD8*::GUS tras 3 hora de tinción; (M-P) vector vacío (V.v) tras 1 hora de tinción. Las barras representan 500 μ m.

Los datos obtenidos a partir de la tinción histoquímica GUS fueron validados mediante qPCR. Para ello se analizó la expresión de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8* así como *AtFAD3*, que codifica la ω 3 desaturasa reticular, en hojas de roseta de 10 días o durante la maduración de la planta. Dicho análisis mostró que los niveles de expresión de *AtFAD7* eran 5 veces superiores a los de *AtFAD8* y 2,5 veces superiores a los de *AtFAD3* en hojas de roseta de 10 días de desarrollo (ver Fig. 4.3A). Estos resultados eran consistentes con los obtenidos a partir de la tinción histoquímica GUS en plantas promotor::GUS, y demuestran que *AtFAD7* es el gen con mayor expresión en tejidos fotosintéticos. Por otro lado, también se monitorizó la expresión de los genes que codifican las ω 3 desaturasas a lo largo del desarrollo de las hojas de la roseta. La expresión de *AtFAD7* se mantuvo

constante durante el desarrollo de las hojas de la roseta, lo que también era consistente con los datos de la tinción histoquímica GUS (ver Fig. 4.3B). Sin embargo, la expresión tanto de *AtFAD8* como de *AtFAD3* aumentaba durante la maduración de las hojas de la roseta (ver Fig. 4.3B).

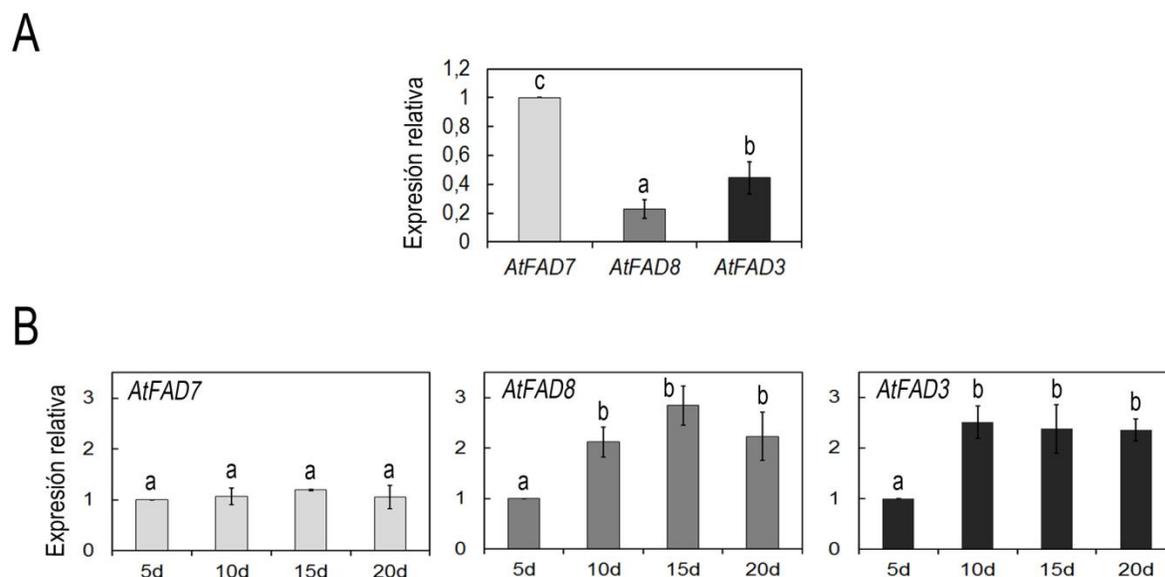


Figura 4.3 Análisis de expresión de los genes de las ω 3 desaturasas mediante qPCR en tejidos fotosintéticos. **(A)** Comparación de la expresión de *AtFAD7*, *AtFAD8* y *AtFAD3* en hojas de roseta de 10 días. **(B)** Evolución de la expresión de *AtFAD7*, *AtFAD8* y *AtFAD3* durante el desarrollo de las hojas de la roseta. Los datos proceden de la media de tres réplicas biológicas junto con tres réplicas técnicas.

4.1.2.1 La luz ejerce un fuerte control transcripcional del gen *AtFAD7* en hojas

La luz es fundamental para el desarrollo de las plantas, y más concretamente, para el desarrollo foliar y de los cloroplastos. Se ha descrito anteriormente que la luz es uno de los estímulos que regulan la expresión de *AtFAD7* en hojas (Nishiuchi et al., 1995; Collados et al., 2006). Como manera de valorar la funcionalidad de las regiones promotoras escogidas para este estudio, se decidió analizar el efecto de la luz en las plantas con las construcciones promotor *AtFAD7*::GUS y promotor *AtFAD8*::GUS. Para ello, se crecieron plantas con sendas construcciones con un fotoperiodo estándar (16 horas de luz / 8 horas de oscuridad) hasta desarrollarse las cuatro primeras hojas. En ese momento, un grupo de plantas fue sometido a un periodo de ausencia de luz de 10 horas, mientras otras se mantuvieron iluminadas por un tiempo similar. Las plantas promotor *AtFAD7*::GUS crecidas bajo fotoperiodo estándar y mantenidas con iluminación durante 10 horas

mostraban una alta actividad GUS tanto en hojas cotiledóneas como en hojas de roseta (ver Fig. 4.4 A). Sin embargo, la actividad GUS decayó considerablemente en las plantas sometidas a 10 horas de oscuridad (ver Fig. 4.4 B). El mismo experimento se llevó a cabo con plantas promotor *AtFAD8*::GUS pero aumentando el tiempo de tinción a 3 horas para facilitar la detección de la actividad GUS. En este caso, también se observó una disminución de la actividad GUS en las hojas de roseta tras 10 horas de oscuridad, aunque no se produjo una disminución de la actividad GUS en los cotiledones (ver Fig. 4.4 C y D). Todo esto sugiere que la luz ejerce un control transcripcional de los genes de las ω 3 desaturasas plastidiales, especialmente en el caso de *AtFAD7*. En el caso de *AtFAD8* este papel regulador pareció circunscribirse a las hojas de roseta.

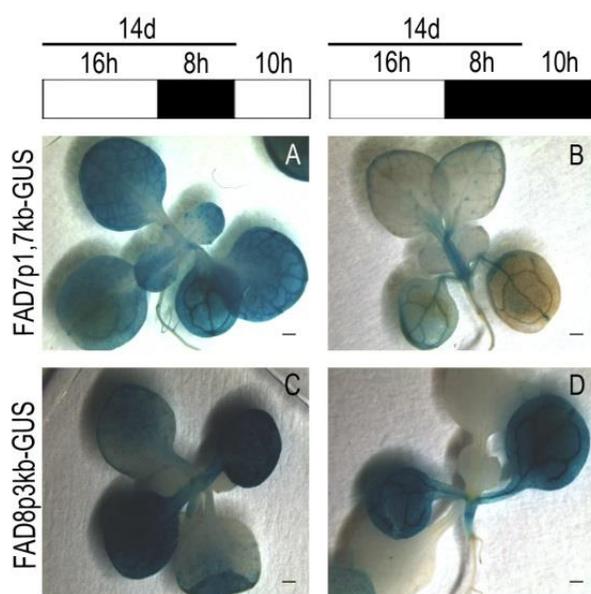


Figura 4.4 Estudio del efecto de la luz sobre los promotores de *AtFAD7* y *AtFAD8* en hojas mediante tinción histoquímica GUS. (A, C) plantas expuestas a 10 horas de luz adicionales; (B, D) plantas expuestas a 10 horas de oscuridad adicionales. (A, B) promotor *AtFAD7* tras 1 hora de tinción; (C, D) promotor *AtFAD8* tras 3 horas de tinción. La tinción se realizó en plantas de dos semanas. Las barras representan 500 μ m.

3.1.3 Análisis funcional de los promotores de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8* en tejidos no fotosintéticos

A pesar de su menor contenido en ácidos grasos, la actividad de los promotores de *AtFAD7* y *AtFAD8* también se evaluó en tejidos no fotosintéticos. Las plantas transgénicas que contenían el promotor de *AtFAD7* revelaron un patrón de expresión muy específico en estos tejidos. En raíces, y tras 1 hora de tinción, se observó una elevada actividad GUS en el tejido vascular de las zonas de elongación y diferenciación celular tanto de la raíz principal como de las raíces secundarias, pero no en las zonas meristemáticas (ver Fig 4.5 A). También se observó una elevada actividad GUS en la

punta de la raíz, tanto en la raíz principal como en raíces secundarias (ver Fig. 4.5 B). En flores, se detectó actividad GUS en los sépalos (tejido fotosintético) pero no en los pétalos, y en cuanto a los tejidos reproductivos, se observó que el promotor de *AtFAD7* era muy activo en los filamentos y en las anteras de los estambres y en el estigma del pistilo (ver Fig 4.5 C). Hay que destacar que no se detectó actividad GUS en el polen, lo cual es consistente con la ausencia de plastidios en los granos de polen (Reboud y Zeyl, 1994). Respecto a las silicuas, se detectó actividad GUS en los extremos de la vaina pero no en las semillas (ver Fig 4.5 D), lo que es consistente con la actividad GUS detectada en el estigma.

En el caso del promotor de *AtFAD8*, los niveles de actividad GUS en raíces, flores y silicuas fueron indetectables tras 1 hora de tinción (ver Fig. 4.5 E-H) y similares a los niveles detectados en plantas que contenían el vector vacío (ver Fig. 4.5 M-P). Esto sugiere que la expresión de *AtFAD8* en estos tejidos es muy baja. Sin embargo, para evaluar mejor la actividad del promotor de *AtFAD8* en estos tejidos, se aumentó el tiempo de tinción a 3 horas tal y como se había hecho anteriormente con los tejidos fotosintéticos (ver apartado 4.1.2). En este caso, se detectó actividad GUS en el tejido vascular de la raíz principal pero no en la punta, a diferencia de lo ocurrido con el promotor de *AtFAD7* (ver Fig 4.5 I-J). En flores, sólo se detectó actividad GUS en los sépalos y en el estigma del pistilo (ver Fig 4.5 K), y en silicuas, sólo en el extremo inferior de la vaina (Fig 4.5 L).

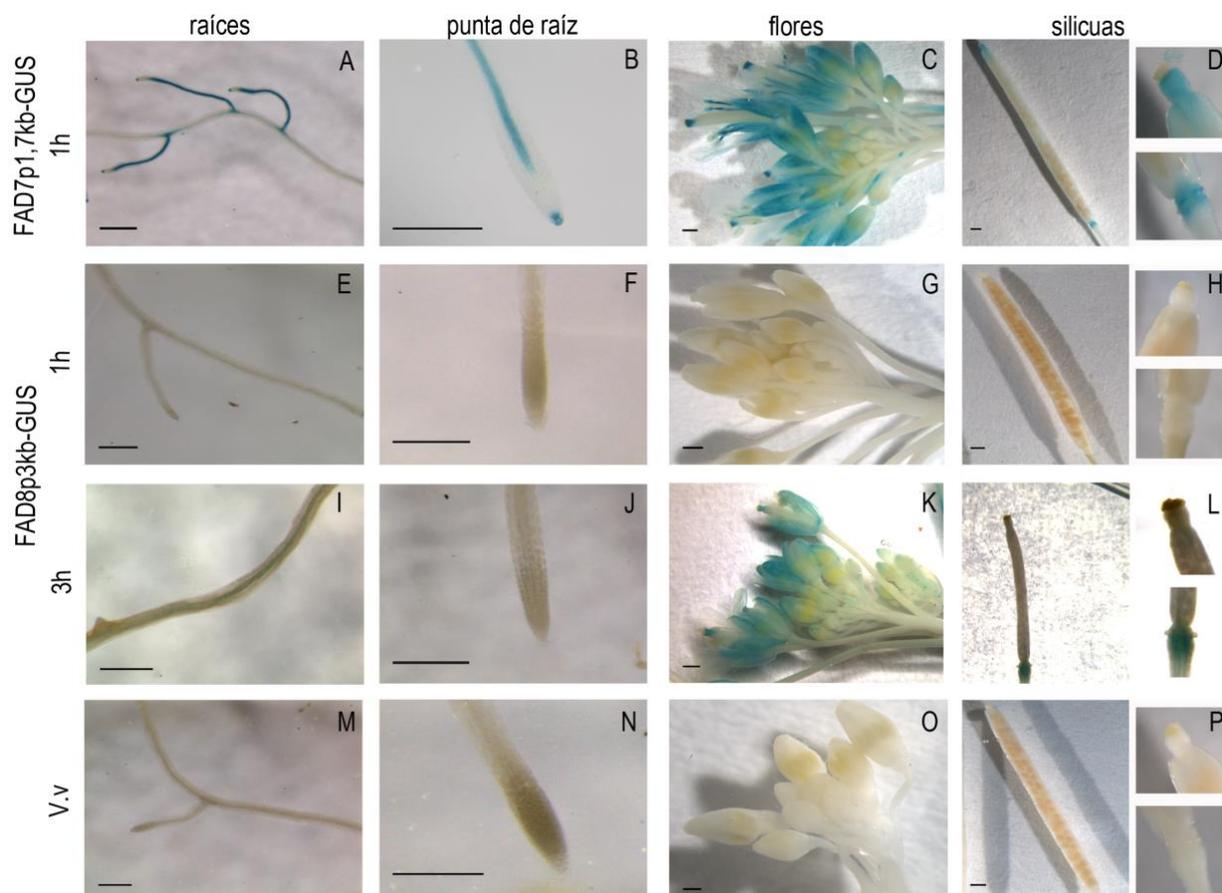


Figura 4.5 Comparación de la actividad de los promotores *AtFAD7* y *AtFAD8* mediante tinción histoquímica GUS en tejidos no fotosintéticos. (A, E, I, M) raíces de 2 semanas; (B, F, J, N) puntas de raíz; (C, G, K, O) flores de 4 semanas; (D, H, L, P) silicuas de 5 semanas. (A-D) promotor *AtFAD7*::GUS tras 1 hora de tinción; (E-H) promotor *AtFAD8*::GUS tras 1 hora de tinción; (I-L) promotor *AtFAD8*::GUS tras 3 hora de tinción; (M-P) vector vacío (V.v) tras 1 hora de tinción. Las barras representan 500 μm .

Los datos obtenidos a partir de la tinción histoquímica GUS se validaron mediante qPCR. Los resultados revelaron que los niveles de expresión de *AtFAD7* eran 5 veces superiores a los de *AtFAD8* en raíces de 10 días de desarrollo (ver Fig 4.6A), lo que concordaba con los datos de la tinción histoquímica GUS. Sin embargo, *AtFAD3* era el gen que codifica una $\omega 3$ desaturasa que más se expresaba en la raíz (ver Fig 4.6A). Este dato es coherente con la observación de que FAD3 es la principal contribuyente en la formación de ácidos grasos trienoicos en raíz (Lemieux et al., 1990; Yadav et al., 1993). Por otro lado, al monitorizar la expresión a lo largo del desarrollo de la

raíz, se observó que, a diferencia de lo que ocurría en hojas de roseta, los niveles de expresión de *AtFAD7*, *AtFAD8* y *AtFAD3* disminuían a lo largo del desarrollo de este tejido (ver Fig 4.6B).

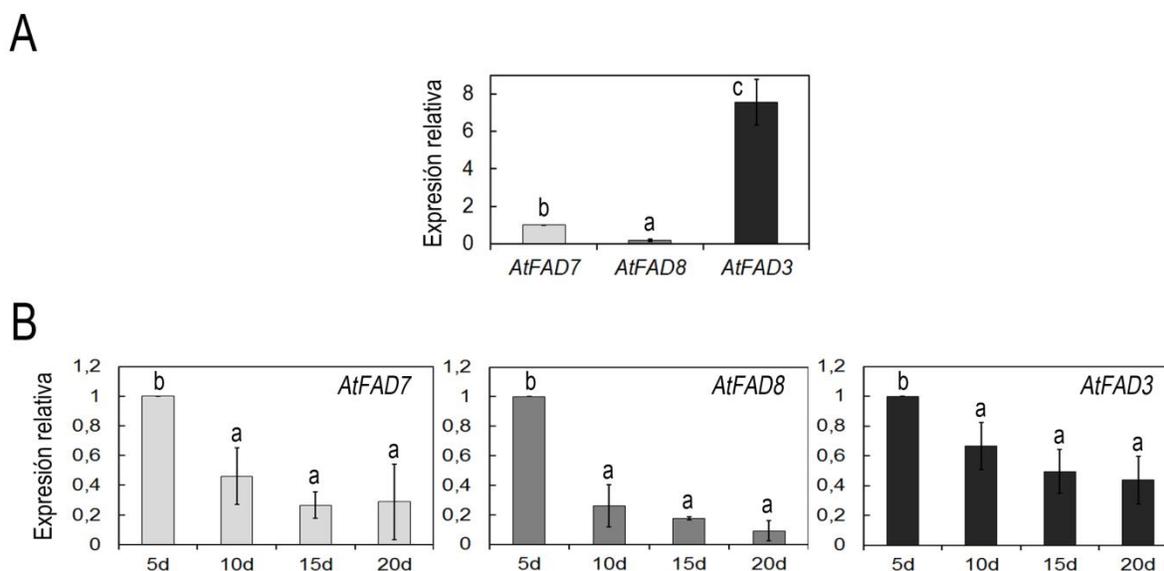


Figura 4.6 Análisis de expresión de los genes de las ω 3 desaturasas mediante qPCR en tejidos no fotosintéticos. **(A)** Comparación de la expresión de *AtFAD7*, *AtFAD8* y *AtFAD3* en raíces de 10 días. **(B)** Evolución de la expresión de *AtFAD7*, *AtFAD8* y *AtFAD3* durante el desarrollo de la raíz. Los datos proceden de la media de tres réplicas biológicas junto con tres réplicas técnicas.

Como ya se ha mencionado anteriormente, los niveles de ácidos grasos trienoicos en raíces y en flores son considerablemente menores a los observados en los tejidos fotosintéticos (ver tabla 1.3), por lo que tanto la expresión de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8* como los datos derivados del análisis histoquímico GUS de ambos promotores, sugieren una función específica para las ω 3 desaturasas plastidiales, diferente de la mera síntesis de ácidos grasos trienoicos en los tejidos no fotosintéticos. En este sentido, es conocido que los ácidos grasos trienoicos son los precursores para la síntesis de JAs (Vick et al., 1993), y que el JA interviene en procesos tales como el reconocimiento y maduración del polen (McConn y Browse, 1996) o la regulación negativa de la elongación de la raíz (Staswick et al., 1992), procesos que podrían explicar el perfil de expresión de *AtFAD7* y *AtFAD8* en flores y raíces. Para analizar el papel de las ω 3 desaturasas plastidiales en procesos relacionados con la síntesis de JA en tejidos no fotosintéticos, se determinó la longitud de la raíz en varios mutantes deficientes en la función ω 3 desaturasa, concretamente *fad3-2*, *fad7-2*, *fad8-1* y el doble mutante *fad7-2 fad8-1*. Los resultados mostraron que la longitud de la raíz era mayor en los mutantes *fad7*, *fad8* y *fad7fad8*, mientras que en el mutante *fad3* la longitud de la raíz era

equivalente a la de la línea salvaje Col-0 (ver Fig. 4.7). Estos datos sugieren que la actividad $\omega 3$ desaturasa plastidial, y no la reticular, es esencial para la inhibición del crecimiento de la raíz mediada por JA.

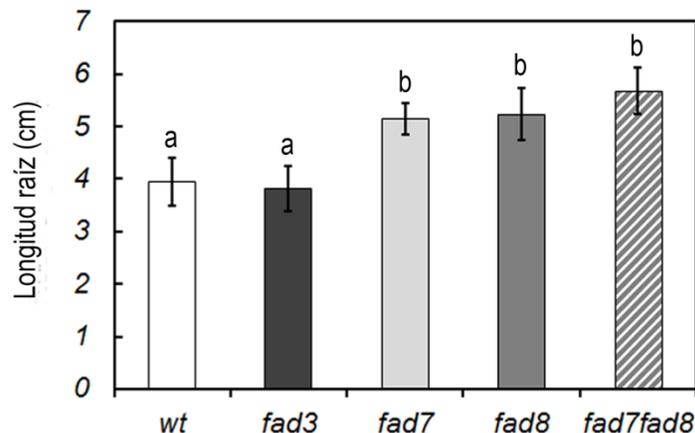


Figura 4.7 Determinación de la longitud de la raíz en mutantes de pérdida de función $\omega 3$ desaturasa: *fad3*, *fad7*, *fad8* y *fad7fad8*. El número de plantas analizadas fue superior a 20 para cada una de las líneas estudiadas.

3.1.4 Disección del promotor del gen *AtFAD7*

4.1.4.1 Identificación de elementos reguladores implicados en el patrón de expresión tisular de *AtFAD7*

Determinado el patrón de expresión tisular de los promotores de *AtFAD7* y *AtFAD8*, se realizaron sucesivas deleciones de los promotores de ambos genes con el objetivo de determinar que regiones del promotor eran esenciales para el mantenimiento de su expresión.

En el caso del promotor de *AtFAD7* se realizaron tres deleciones diferentes. La primera englobaba 994 pb correspondientes a la región distal del promotor. Este fragmento contenía las dos secuencias reconocidas por factores de transcripción de tipo MYB y una secuencia reconocida por factores de transcripción de tipo CBF/DREB, pero perdía las tres secuencias de unión a factores de transcripción de tipo WRKY y las dos secuencias de represión por ABA (ver Fig. 4.8). La segunda deleción englobaba 703 pb proximales correspondientes al resto del promotor. Este fragmento

contenía las tres secuencias reconocidas por factores de transcripción de tipo WRKY y las dos secuencias de represión por ABA, pero perdía las secuencias de unión a factores de transcripción de tipo MYB y CBF/DREB (ver Fig. 4.8). Finalmente, una última delección englobaba 499 pb de la región proximal. Este fragmento contenía sólo una de las secuencias de unión a factores de transcripción de tipo WRKY junto con las dos secuencias de represión por ABA (ver Fig. 4.8).

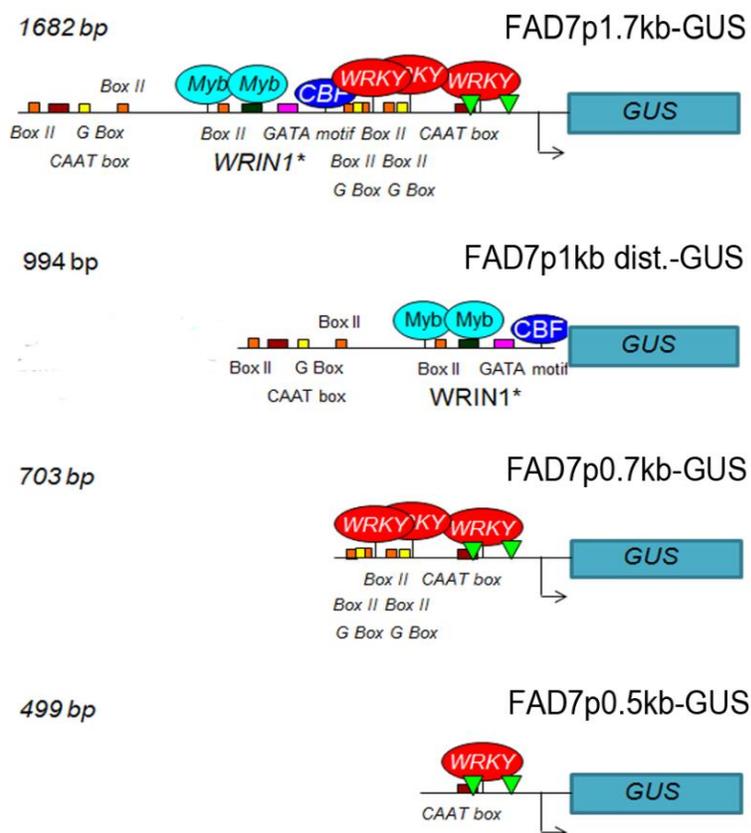


Figura 4.8 Representación esquemática de los fragmentos de 1682, 994 pb distales, 703 y 499 pb del promotor de *AtFAD7* usados en este estudio.

La actividad *GUS* de las líneas transgénicas conteniendo diferentes fragmentos del promotor *AtFAD7* se evaluó mediante tinción histoquímica para determinar el efecto de la eliminación de los diferentes elementos reguladores. En primer lugar, se analizó la actividad *GUS* en hojas. Las plantas transgénicas que contenían el promotor íntegro de 1682 pb de *AtFAD7* presentaban tras 1 hora de tinción, una elevada actividad *GUS* en hojas, tanto cotiledóneas como de roseta (ver Fig. 4.9 A). Cuando se analizó el fragmento distal de 944 pb no se detectó actividad *GUS* en hojas (ver Fig. 4.9 B), lo que indicaba que los elementos de regulación en cis distales no son capaces, por sí

solos, de mantener los niveles de actividad del promotor. Sin embargo, tampoco se puede descartar que elementos proximales fundamentales para la transcripción (como por ejemplo diversas cajas TATA) hayan sido eliminados en este fragmento. De cualquier modo, al analizar el fragmento proximal de 703 pb se comprobó que la actividad GUS en hojas era prácticamente idéntica a la del promotor íntegro (ver Fig. 4.9 C). En el caso del fragmento proximal de 499 pb sí se produjo una reducción fácilmente apreciable de la actividad GUS en hojas (ver Fig. 4.9 D). Todo esto sucedía tanto en hojas cotiledóneas como en hojas de roseta.

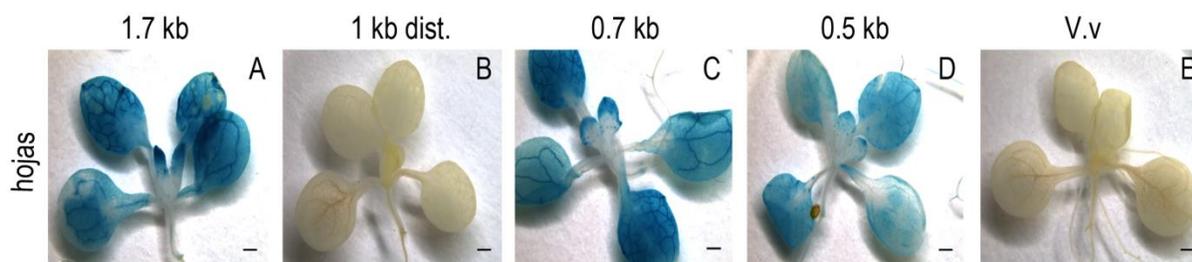


Figura 4.9 Comparación de la actividad en las diferentes deleciones del promotor de *AtFAD7* mediante histoquímica GUS en (A-E) hojas de roseta de dos semanas de *Arabidopsis* después de 1 hora de tinción: (A) fragmento de 1,7 Kpb; (B) fragmento de 1 Kpb distal; (C) fragmento de 0,7 Kpb; (D) fragmento de 0,5 Kpb; (E) vector vacío (V.v). Las barras representan 500 µm.

Para confirmar estos resultados, se realizó un análisis fluorimétrico de la actividad GUS, lo que a su vez permitió cuantificar la actividad GUS en las diferentes deleciones del promotor. La actividad GUS del promotor íntegro de 1682 pb fue considerada como la máxima actividad (100%) y usada como referencia. El promotor distal de 944 pb sufría una pérdida superior al 90% de su actividad (ver Fig. 4.10), lo que era consistente con los resultados de la tinción histoquímica. Por el contrario, el fragmento proximal de 703 pb, que contenía las tres secuencias reconocidas por factores de transcripción de tipo WRKY, conservaba un 90% de actividad GUS respecto a la del fragmento íntegro del promotor (ver Fig. 4.10), lo que sugiere que los elementos de regulación en cis necesarios para la expresión basal de *AtFAD7* se encuentran localizados en la región proximal de 703 pb de su promotor. Sin embargo, en el fragmento de 499 pb donde se perdían dos de las tres secuencias reconocidas por factores de transcripción de tipo WRKY, la actividad GUS se redujo hasta conservar un 65% de la actividad obtenida en el control (ver Fig. 4.10).

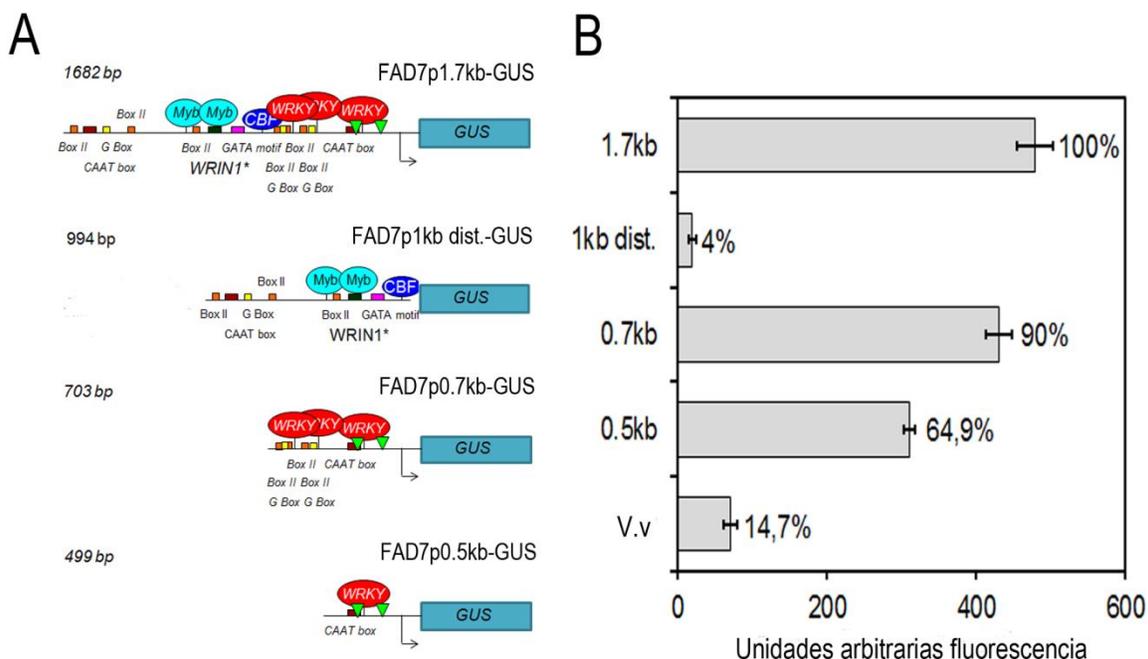


Figura 4.10 (A) Representación esquemática de los diferentes fragmentos del promotor de *AtFAD7* (B) Comparación de la actividad en las diferentes deleciones del promotor de *AtFAD7* mediante análisis fluorométrico GUS en hojas de roseta de dos semanas en las plantas transgénicas promotor::GUS de *Arabidopsis*. Los datos proceden de la media de tres réplicas biológicas junto con tres réplicas técnicas.

En tejidos no fotosintéticos, las plantas transgénicas con el promotor íntegro de 1682 pb de *AtFAD7* presentaban una elevada actividad GUS tanto en el tejido vascular de las regiones de elongación y diferenciación celular como en la punta de la raíz (ver Fig. 4.11 A y F). La tinción histoquímica GUS en el fragmento proximal de 733 pb reveló que el nivel de actividad GUS en el tejido vascular era similar a la del promotor íntegro pero, sin embargo, la actividad GUS en la punta de la raíz era prácticamente indetectable (ver Fig. 4.11 C y H). Estos mismos resultados se obtuvieron nuevamente al analizar el fragmento proximal de 499 pb (ver Fig. 4.11 D e I). En flores, las plantas transgénicas con el promotor íntegro de *AtFAD7* presentaban una elevada actividad GUS tanto en sépalos como en los órganos reproductivos, concretamente en los filamentos y en el estigma (ver Fig. 4.11 K). Al analizar la actividad GUS en el fragmento proximal de 733 pb, se observó que ésta desaparecía completamente tanto en los filamentos como en el estigma, mientras que la actividad en los sépalos, aunque apreciablemente disminuida, era fácilmente detectable (ver Fig. 4.11 M). Estos resultados se repitieron en el caso del fragmento proximal de 499 pb donde además, la actividad

GUS en los sépalos disminuía hasta ser prácticamente indetectable (ver Fig. 4.11 N). En el caso del fragmento distal de 944 pb no se detectó actividad GUS ni en raíces ni en flores, de manera similar a lo observado en hojas (ver Fig. 4.11 B, G y L).

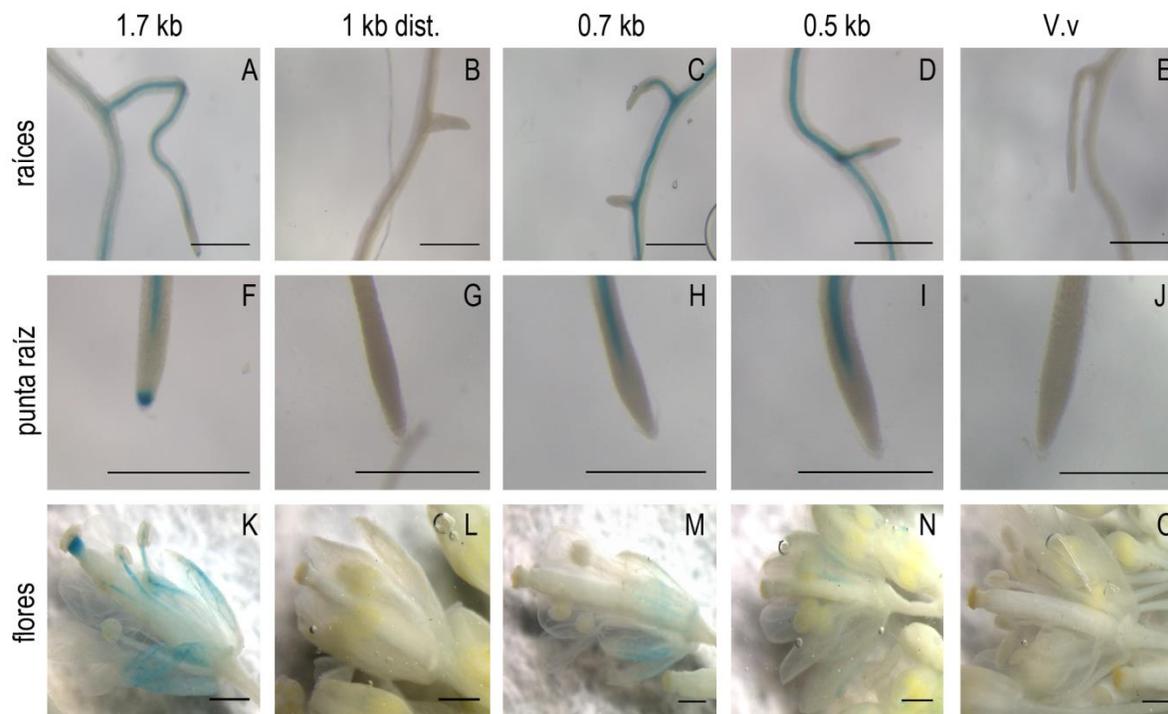


Figura 4.11 Comparación de la actividad en las diferentes deleciones del promotor de *AtFAD7* mediante histoquímica GUS en (A-E) raíces de dos semanas; (F-J) punta de raíz; (K-O) flores de cuatro semanas de las plantas promotor::GUS de *Arabidopsis* después de 1 hora de tinción: (A, F, K) fragmento de 1,7 Kpb; (B, G, L) fragmento de 1 Kpb distal; (C, H, M) fragmento de 0,7 Kpb; (D, I, N) fragmento de 0,5 Kpb; (E, J, O) vector vacío (V.v). Las barras representan 500 μ m.

4.2.4.2 Identificación de elementos reguladores implicados en la respuesta a la herida de *AtFAD7*

La herida es uno de los estímulos que inducen la expresión de *AtFAD7* (Nishiuchi et al., 1997; Matsuda et al., 2009). Sin embargo, los mecanismos moleculares que intervienen en la respuesta específica de *AtFAD7* a la herida son desconocidos, de modo que se decidió abordar el estudio de los elementos reguladores implicados en la respuesta transcripcional a herida de *AtFAD7* mediante el uso de los diferentes fragmentos delecionados de su promotor.

En primer lugar, se decidió comparar la actividad de los promotores íntegros de *AtFAD7* y *AtFAD8* en respuesta a herida en plantas transgénicas promotor::GUS. Cuando la herida se realizaba en hojas de plantas transgénicas con el promotor íntegro de 1682 pb de *AtFAD7*, se detectaba un halo de elevada actividad GUS alrededor de la zona de la herida (ver Fig. 4.12 A). Hay que destacar, que el incremento de actividad del promotor *AtFAD7* en respuesta a herida no era sistémica, sino que tenía un efecto local. El mismo efecto se observada en tallos (ver Fig. 4.12 B) y en raíces (ver Fig. 4.12 C y D). Sin embargo, en el caso del promotor íntegro de 2958 pb de *AtFAD8* no se detectó ningún efecto en la actividad de su promotor provocado por la herida ni en hojas, tallos ni en raíces (ver Fig. 4.12 E, F, G y H), indicando que la respuesta a la herida es específica de *AtFAD7*.

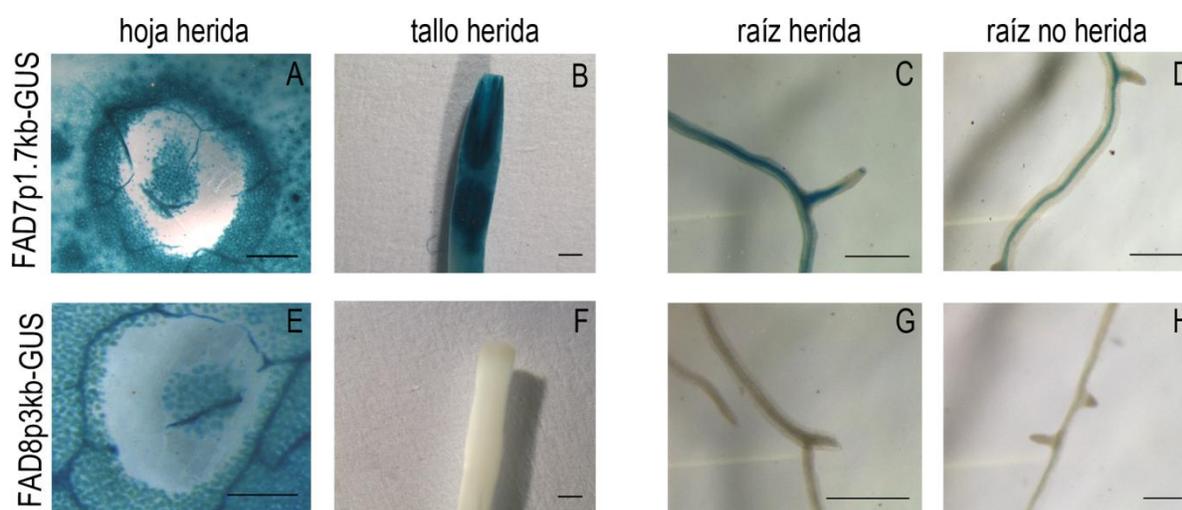


Figura 4.12 Comparación de la actividad de los promotores (A-D) *AtFAD7* y (E-H) *AtFAD8* mediante tinción histoquímica GUS en respuesta a herida en (A, E) hojas, (B, F) tallos y raíz (C, D, G, H). Los tiempos de tinción fueron de 1 hora para *AtFAD7* y de 3 horas para *AtFAD8*. Las barras representan 500 μm .

El comportamiento diferencial de *AtFAD7* y *AtFAD8* en respuesta a la herida fue validado mediante qPCR realizada en hojas de roseta. Este análisis detectó un incremento significativo de la expresión de *AtFAD7* en respuesta a herida de 1,6 veces respecto al control, mientras que la expresión de *AtFAD8* permanecía inalterada (ver Fig. 4.13), confirmando los resultados obtenidos en la tinción histoquímica GUS. Es importante tener en cuenta que en este análisis se utilizó la totalidad de la hoja, no solo la región herida. El efecto local de la herida podría explicar porque el incremento de la expresión de *AtFAD7*, aunque significativo, es aparentemente menor de lo esperado.

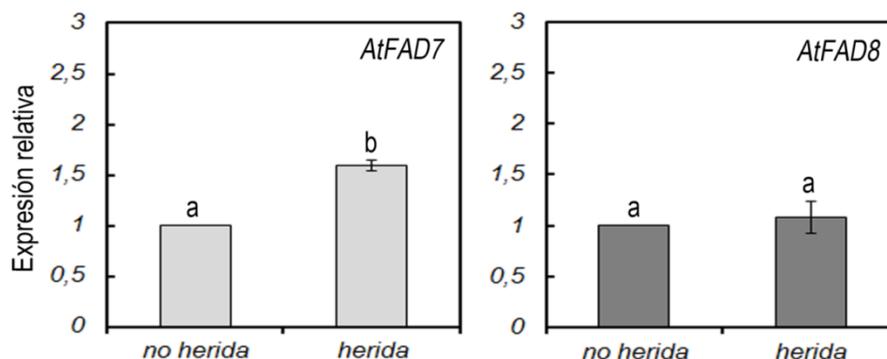


Figura 4.13 Análisis de expresión de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8* en hojas de roseta mediante qPCR en respuesta a herida. Los datos proceden de la media de tres réplicas biológicas junto con tres réplicas técnicas.

Para identificar los elementos reguladores en cis implicados en la respuesta a la herida del gen *AtFAD7*, se estudiaron los cambios de la actividad GUS en las diferentes delecciones de su promotor en hojas. Las plantas transgénicas con el promotor íntegro de 1682 pb de *AtFAD7* presentaban un halo de actividad GUS incrementada situado alrededor de la herida (ver Fig. 4.14 A). Sin embargo, el halo alrededor de la herida desaparecía al analizar plantas con el fragmento proximal de 733 pb del promotor (ver Fig. 4.14 C), efecto que era confirmado en el caso del fragmento proximal de 499 pb (ver Fig. 4.14 D). Estos resultados sugieren que los elementos de regulación en cis encargados de la respuesta a herida se encuentran en la región distal de 944 pb del promotor de *AtFAD7*, donde, según el análisis bioinformático, se encuentran las dos secuencias consenso para la unión de factores de transcripción de tipo MYB. No obstante, la ausencia de actividad GUS en el fragmento distal de 994 pb (ver Fig. 4.14 B) indica que estos elementos reguladores en cis no pueden desencadenar por si solos la respuesta a la herida.

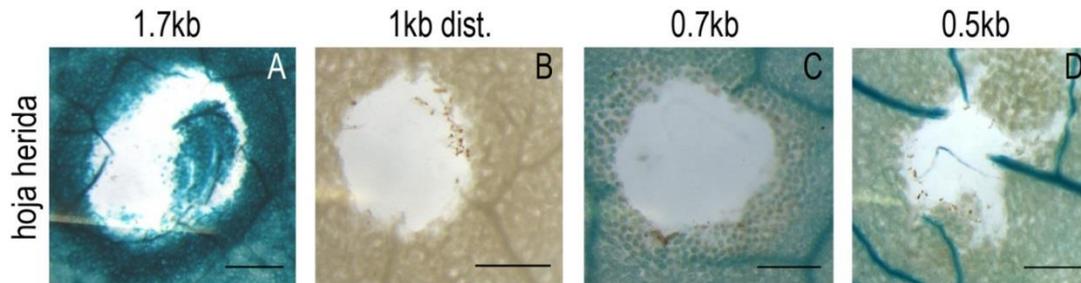


Figura 4.14 Tinción histoquímica GUS en hojas de plantas de *Arabidopsis* con los fragmentos de (A) 1,7 Kpb, (B) 1 Kpb distal, (C) 0,7 Kpb y (D) 0,5 Kpb del promotor de *AtFAD7* para la identificación de los elementos reguladores de respuesta a herida. El tiempo de tinción fue de 1 hora. Las barras representan 500 μm .

Los datos obtenidos a partir de las delecciones del promotor *AtFAD7* sugieren que los elementos reguladores reconocidos por factores de transcripción de tipo MYB serían esenciales para la respuesta a la herida de *AtFAD7*. La gran cantidad de factores de transcripción de tipo MYB presentes en plantas dificulta mucho la identificación de posibles candidatos que interaccionen directamente con las secuencias reguladoras encargadas de la respuesta a herida de *AtFAD7*. No obstante, se identificaron varios factores de transcripción de tipo MYB cuya expresión se inducía en herida, entre ellos *AtMYB44* (Taki et al., 2005). Se ha comprobado que *AtMYB44* interviene en la regulación de varios genes sensibles a herida mediante rutas metabólicas dependientes de JA y de SA, y que reconoce secuencias consenso de unión a MYBs similares a las presentes en el promotor de *AtFAD7* (Shim et al., 2013). Por lo tanto, *AtMYB44* podría ser un posible candidato para la regulación de *AtFAD7* en respuesta a herida. Para evaluar esta hipótesis, se comprobó la respuesta transcripcional de *AtFAD7* desencadenada por la herida mediante qPCR en hojas de roseta del mutante de pérdida de función *myb44*. Los resultados de qPCR revelaron que aunque la expresión basal de *AtFAD7* en el mutante *myb44* era similar a la de la línea Col-0, en el mutante se producía una menor inducción de este gen en respuesta a herida (ver Fig. 4.15). La pérdida parcial de la respuesta a herida en el mutante *myb44*, sugiere que este factor de transcripción podría estar implicado junto con otros elementos en la regulación transcripcional de *AtFAD7* en respuesta a la herida.

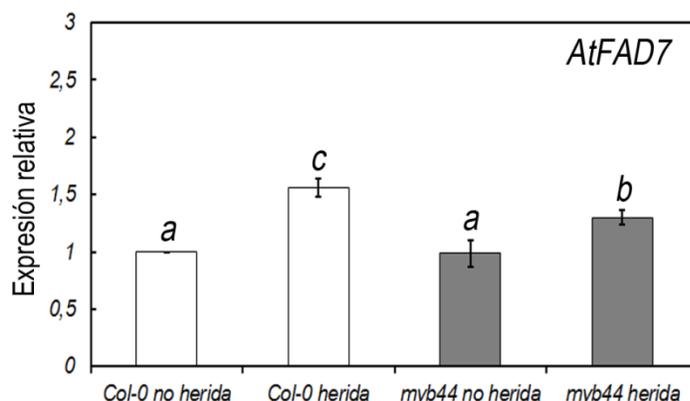


Figura 4.15 Análisis de expresión génica de *AtFAD7* en hojas de roseta del mutante *myb44* y de Col-0 mediante qPCR en respuesta a herida. Los datos proceden de la media de tres réplicas biológicas junto con tres réplicas técnicas.

3.1.5 Disección del promotor del gen *AtFAD8*

4.1.5.1 Identificación de elementos reguladores implicados en el patrón de expresión tisular de *AtFAD8*

Un análisis similar al realizado con el promotor del gen *AtFAD7* se llevó a cabo con el promotor del gen *AtFAD8*. El objetivo era nuevamente acotar y comprobar la funcionalidad de los elementos reguladores en cis detectados en el análisis bioinformático del promotor *AtFAD8*. En este caso, se realizaron cuatro deleciones en el promotor. La primera englobaba 1064 pb correspondientes a la región distal del promotor. Este fragmento contenía las dos secuencias reconocidas por factores de transcripción de tipo MYB, pero perdía las tres secuencias de unión a factores de transcripción de tipo WRKY, dos secuencias reconocidas por factores de transcripción de tipo MYC y varias secuencias de unión a factores de transcripción de tipo CBF/DREB (ver Fig. 4.16). La segunda englobaba los 1912 pb proximales correspondientes al resto del promotor. Este fragmento perdía los dos elementos reguladores reconocidos por factores de transcripción de tipo MYB, pero contenía las tres secuencias de unión a factores de transcripción de tipo WRKY, dos secuencias reconocidas por factores de transcripción de tipo MYC y varias secuencias de unión a factores de transcripción de tipo CBF/DREB (ver Fig. 4.16). La tercera englobaba 643 pb de la región distal del promotor, perdiéndose los dos elementos reconocidos por factores de transcripción de tipo MYC (ver Fig. 4.16). Finalmente, un último fragmento que englobaba 290 pb de la región proximal del promotor

también perdía los tres elementos reconocidos por factores de transcripción de tipo WRKY, conservando tan sólo algunos de los elementos de unión a factores de transcripción tipo CBF/DREB (ver Fig. 4.16).

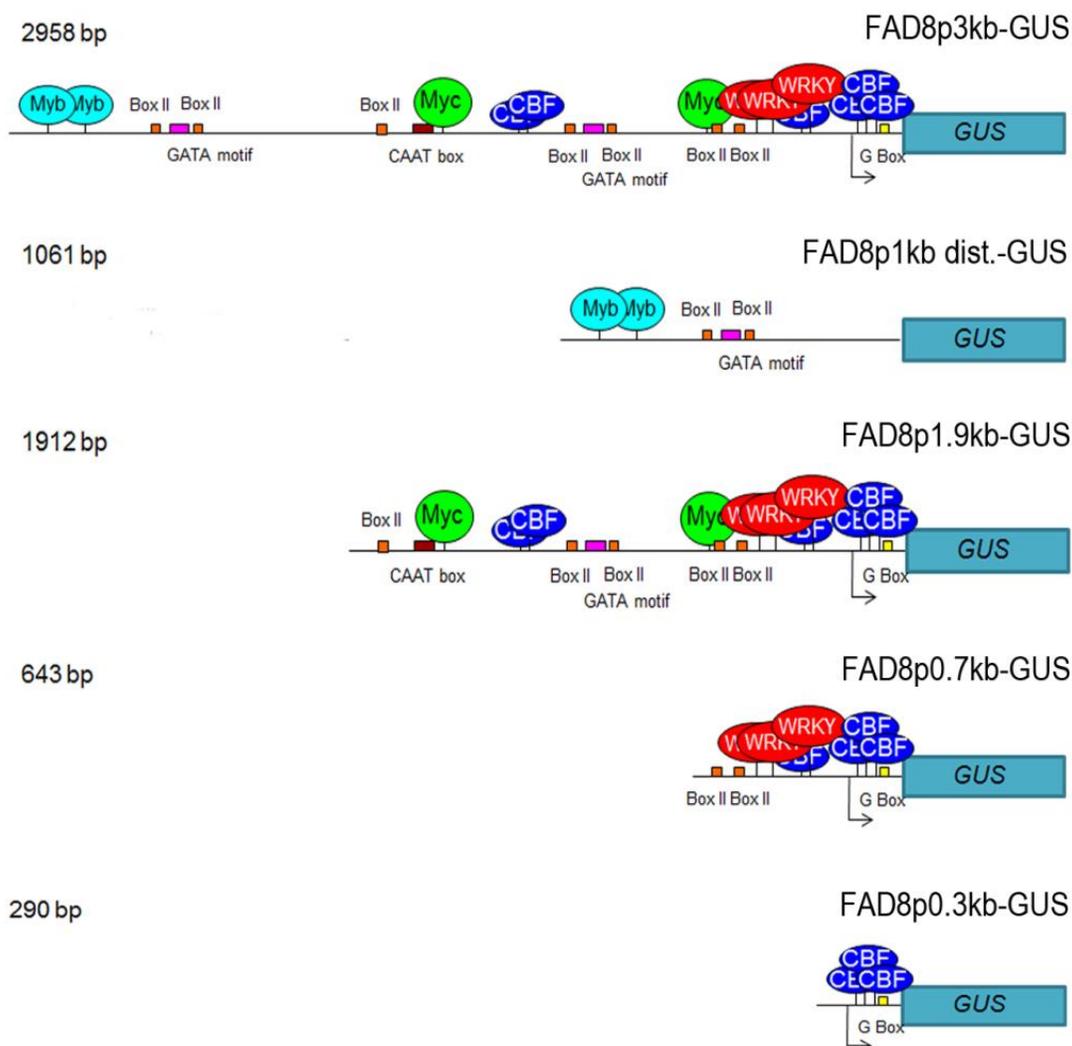


Figura 4.16 Representación esquemática de los fragmentos de 3, 1 Kpb distal, 1,9, 0,7 y 0,3 Kpb del promotor de *AtFAD8* usados en este estudio.

La actividad GUS de cada planta transgénica con los diferentes fragmentos de promotor se evaluó mediante tinción histoquímica para determinar el efecto de la eliminación de los diferentes elementos reguladores. En hojas, las plantas transgénicas que contenían el promotor íntegro de 2958 pb de *AtFAD8*, presentaban al cabo de 3 horas de tinción, una elevada actividad GUS en las hojas

cotiledóneas, mientras que en las hojas de roseta esta actividad era menor (ver Fig. 4.17 A). Cuando se analizó el fragmento de 1064 pb correspondiente a la región distal del promotor, no se detectó actividad GUS en hojas (ver Fig. 4.17 B), lo que indicaba que los elementos de regulación en cis distales no son capaces, por si solos, de mantener los niveles de actividad del promotor. Además, tampoco se puede descartar que elementos proximales fundamentales para la transcripción (como por ejemplo diversas cajas TATA) hayan sido eliminados en este fragmento. Al analizar el fragmento correspondiente a los 1912 pb proximales del promotor, no se detectaron cambios en la actividad GUS en los cotiledones. Sin embargo, se produjo un incremento de la actividad GUS en las hojas de la roseta (ver Fig. 4.17 C). Este mismo patrón, con una actividad GUS considerable, todavía se mantuvo en el fragmento proximal de 643 pb (ver Fig. 4.17 D). Sin embargo, al analizar el fragmento proximal de 290 pb, se produjo una reducción fácilmente apreciable de la actividad GUS tanto en hojas cotiledóneas como de roseta (ver Fig. 4.17 E).

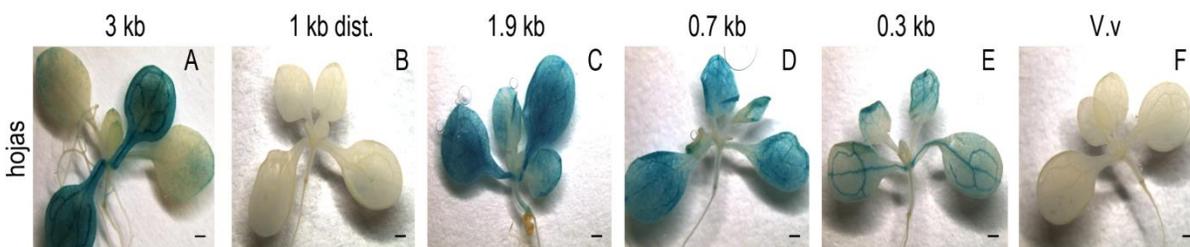


Figura 4.17 Comparación de la actividad en las diferentes deleciones del promotor de *AtFAD8* mediante histoquímica GUS en (A-F) hojas de roseta de dos semanas de *Arabidopsis* después de 3 horas de tinción: (A) fragmento de 3 Kpb; (B) fragmento de 1 Kpb distal; (C) fragmento de 1,9 Kpb; (D) fragmento de 0,7 Kpb; (E) fragmento de 0,3 Kpb; (F) vector vacío (V.v). Las barras representan 500 µm.

Para confirmar estos resultados, se realizó un análisis fluorométrico de la actividad GUS, tal como se hizo con el promotor de *AtFAD7*, lo que a su vez permitió cuantificar la actividad GUS en las diferentes deleciones. La actividad GUS del promotor íntegro de 2958 pb fue considerada como la máxima actividad y usada como referencia. En el caso del fragmento distal de 1064 pb los niveles de fluorescencia detectados fueron casi nulos. En el caso de los fragmentos proximales de 1912 pb y 643 pb conservaban un 78% y un 56% de actividad GUS respecto a la del fragmento íntegro del promotor, mientras que la mayor disminución se daba en el fragmento proximal de 290 pb, que sólo conservaba un 34% de actividad GUS (ver Fig. 4.18). Hay que destacar, que el ensayo fluorimétrico GUS no discernía entre cotiledones y hojas de roseta, por los que los resultados de actividad GUS son el resultado de la mezcla de ambos tipos de hojas.

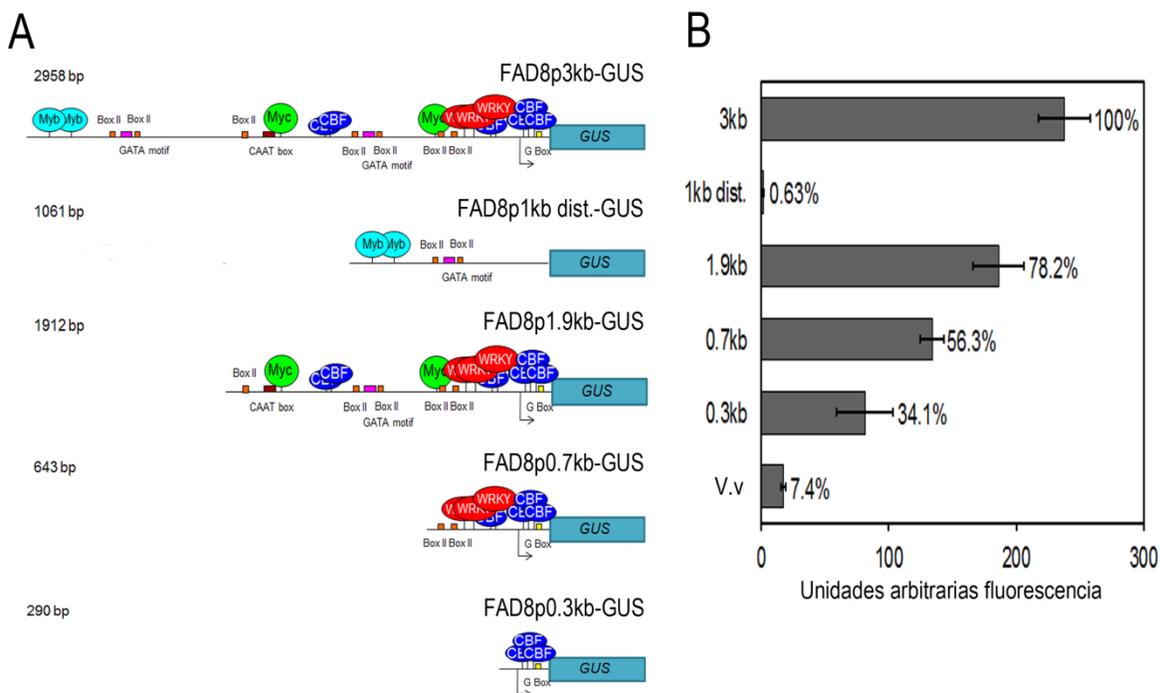


Figura 4.18 (A) Representación esquemática de los diferentes fragmentos del promotor de *AtFAD8* **(B)** Comparación de la actividad en las diferentes deleciones del promotor de *AtFAD8* mediante análisis fluorométrico GUS en hojas de roseta de dos semanas en las plantas transgénicas promotor::GUS de *Arabidopsis*. Los datos proceden de la media de tres réplicas biológicas junto con tres réplicas técnicas.

En tejidos no fotosintéticos, las plantas transgénicas con el promotor íntegro de 2958 pb de *AtFAD8* presentaban una elevada actividad GUS en el tejido vascular de las regiones de elongación y diferenciación celular de la raíz (ver Fig. 4.19 A). Los niveles de actividad GUS en el tejido vascular de la raíz se mantenían al analizar el fragmento proximal de 1912 pb (ver Fig. 4.19 C). Sin embargo, la actividad GUS en el tejido vascular de la raíz decaía considerablemente en el caso del fragmento proximal de 643 pb (ver Fig. 4.19 D), siendo prácticamente indetectable en el caso del fragmento proximal de 290 pb (ver Fig. 4.19 E). No se detectó actividad GUS en la punta de la raíz en ninguna de las construcciones analizadas (ver Fig. 4.19 G-L). En flores, las plantas con el promotor íntegro de 2958 pb de *AtFAD8*, presentaban niveles altos de actividad GUS tanto en sépalos como en el estigma (ver Fig. 4.19 M). Al analizar el fragmento proximal de 1912 pb, se observó que aunque la actividad GUS en sépalos se mantenía, la actividad en el estigma era prácticamente indetectable (ver Fig. 4.19 O). En el fragmento proximal de 633 pb, se produjo una reducción de la actividad GUS en sépalos (ver Fig. 4.19 P), desapareciendo completamente en el

caso del fragmento proximal de 290 pb (ver Fig. 4.19 Q). En el caso del fragmento distal de 944 pb no se detectó actividad GUS tanto en raíces como en flores de manera similar a lo observado en hojas (ver Fig. 4.19 B, H y N).

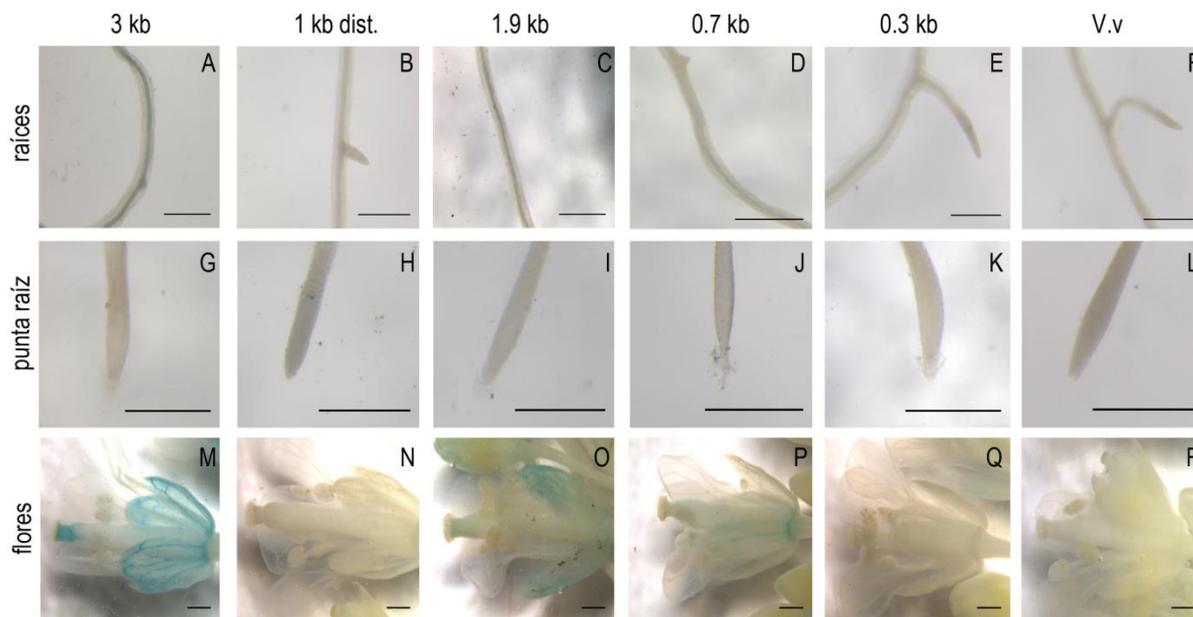


Figura 4.19 Comparación de la actividad en las diferentes deleciones del promotor de *AtFAD8* mediante histoquímica GUS en (A-F) raíces de dos semanas; (G-L) punta de raíz; (M-R) flores de cuatro semanas de las plantas promotor::GUS de *Arabidopsis* después de 3 horas de tinción: (A, G, M) fragmento de 3 Kpb; (B, H, N) fragmento de 1 Kpb distal; (C, I, O) fragmento de 1,9 Kpb; (D, J, P) fragmento de 0,7 Kpb; (E, K, Q) fragmento de 0,3 Kpb; (F, L, R) vector vacío (V.v). Las barras representan 500 µm.

4.1.5.2 Identificación de elementos reguladores implicados en la respuesta a las bajas temperaturas de *AtFAD8*

En *Arabidopsis*, las bajas temperaturas producen la inducción de *AtFAD8* (McConn et al., 1994; Shi et al., 2011; Román et al., 2015). Sin embargo, el mecanismo molecular que controla esta respuesta es completamente desconocido. Por ello, se decidió estudiar los elementos reguladores en cis implicados en la respuesta transcripcional de *AtFAD8* desencadenada por las bajas temperaturas mediante el análisis de las diferentes líneas transgénicas que expresaban el gen GUS bajo el control de los fragmentos delecionados de su promotor.

En primer lugar, se decidió comparar la actividad de los promotores íntegros de *AtFAD7* y *AtFAD8* en respuesta al frío en plantas transgénicas promotor::GUS. En las plantas crecidas a temperatura control, se detectó actividad GUS en hojas cotiledóneas y en hojas de roseta tanto en las plantas que expresaban el gen testigo bajo el control del promotor *AtFAD7* (ver Fig. 4.20 B y D) como bajo el control del promotor *AtFAD8* (ver Fig. 4.20 F y H). Tras la exposición de las plantas que expresaban el gen GUS bajo el control del promotor de *AtFAD7* a una temperatura de 6°C durante 1 semana, se observó una disminución de la actividad GUS tanto en hojas cotiledóneas como en hojas de roseta respecto a las plantas crecidas a 22°C (ver Fig. 4.20 A y C). Por el contrario, en el caso de las plantas que expresaban el gen GUS bajo el control del promotor de *AtFAD8*, tras la exposición a una temperatura de 6°C durante 1 semana se observó un claro incremento de la actividad GUS tanto en hojas cotiledóneas como en hojas de roseta respecto a las plantas crecidas a 22°C (ver Fig. 4.20 E y G).

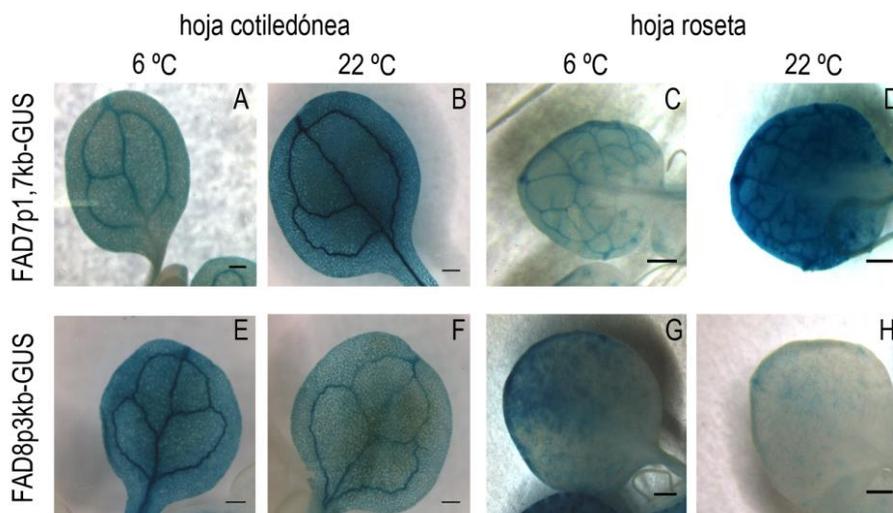


Figura 4.20 Comparación de la actividad de los promotores (A-D) *AtFAD7* y (E-F) *AtFAD8* mediante tinción histoquímica GUS en respuesta a las bajas temperatura en (A, B, E, F) hojas cotiledóneas y en (C, D, G, H) hojas de roseta expuestas a (A, C, E, G) 6°C y (B, D, F, H) 22°C durante 7 días. Los tiempos de tinción fueron de 1 hora para *AtFAD7* y de 3 horas para *AtFAD8*. Las barras representan 500µm.

El comportamiento diferencial de *AtFAD7* y *AtFAD8* en respuesta a las bajas temperaturas fue validado mediante qPCR realizada en hojas de roseta. Los resultados obtenidos revelaron que tras la exposición a 6°C, *AtFAD8* experimentaba un incremento en sus niveles de expresión de cerca de 2,5 veces respecto a las plantas crecidas a 22°C, mientras que los niveles de expresión de *AtFAD7* se reducían prácticamente a la mitad tras la exposición al frío (ver Fig. 4.21). Estos datos confirmaban

la respuesta diferencial de ambos genes a la temperatura, tal y como se observó previamente en la tinción histoquímica GUS.

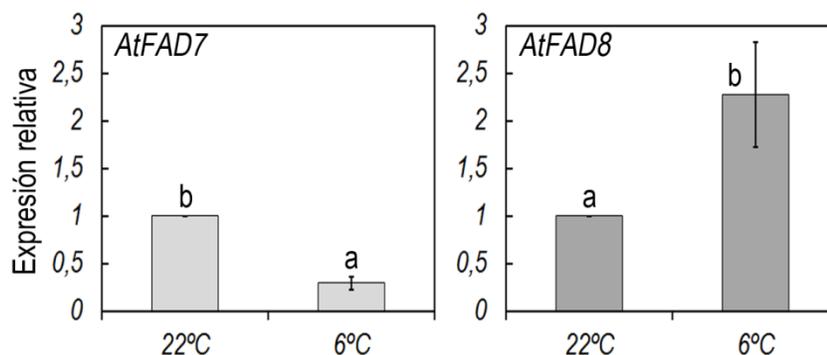


Figura 4.21 Análisis de expresión de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8* en hojas de roseta mediante qPCR en respuesta a las bajas temperaturas. Los datos proceden de la media de tres réplicas biológicas junto con tres réplicas técnicas.

Para identificar los elementos reguladores en cis implicados en la respuesta a las bajas temperaturas de *AtFAD8*, se estudiaron los cambios de la actividad GUS en las diferentes líneas transgénicas que expresaban el gen GUS bajo el control de las diferentes delecciones de su promotor en hojas. Los resultados mostrados se centran en hojas cotiledóneas debido a que es más fácil detectar la actividad GUS en estas hojas que en las de roseta. Sin embargo, los mismos resultados se obtuvieron también en hojas de roseta. Las plantas con el promotor íntegro de 2958 pb de *AtFAD8* presentaban un claro incremento en la actividad GUS tras la exposición a 6°C respecto a las plantas control crecidas a 22°C (ver Fig. 4.22 A y E). Un incremento similar se detectó al analizar el fragmento proximal de 1912 pb (ver Fig. 4.22 B y F). Sin embargo, el incremento se reducía drásticamente al analizar el fragmento proximal de 633 pb, siendo la actividad GUS en plantas expuestas a bajas temperaturas muy similar a la de las plantas control (ver Fig. 4.22 C y G). Las plantas con el fragmento proximal de 290 pb tampoco presentaban un incremento en la actividad GUS tras la exposición al frío (ver Fig. 4.22 D y H). Estos resultados sugieren que los elementos de regulación en cis encargados de la respuesta a las bajas temperaturas se encuentran localizados entre la región 1912 pb y 633 pb del promotor de *AtFAD8* donde, según el análisis bioinformático, se encuentran las dos secuencias consenso para la unión de factores de transcripción de tipo MYC.

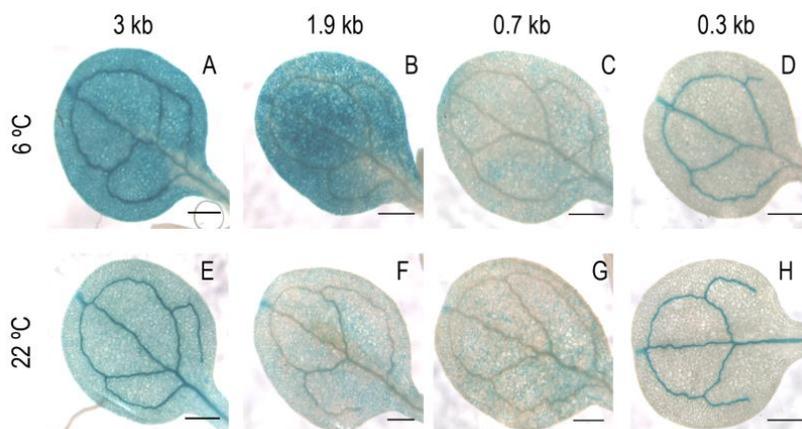


Figura 4.22 Tinción histoquímica GUS en hojas de plantas de *Arabidopsis* con los fragmentos de (A) 3 Kpb, (B) 1,9 Kpb, (C) 0,7 Kpb y (D) 0,3 Kpb del promotor de *AtFAD8* para la identificación de los elementos reguladores de respuesta a las bajas temperaturas. El tiempo de tinción fue de 3 horas. Las barras representan 500 μ m.

Los datos obtenidos a partir de las deleciones del promotor *AtFAD8* sugieren que los elementos reguladores reconocidos por factores de transcripción de tipo MYC podrían ser funcionales. Se comprobó que las secuencias reconocidas por factores de transcripción de tipo MYC encontradas en el promotor de *AtFAD8* coincidían con la secuencia reconocida por el factor de transcripción *AtICE1* (Chinnusamy et al., 2003). ICE1 es un factor de transcripción de tipo MYC implicado en la activación de genes en respuesta al frío mediante una ruta independiente de ABA (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2005, 2006). De este modo, se consideró a ICE1 como un posible candidato para la regulación de *AtFAD8* desencadenada por las bajas temperaturas. Para evaluar esta hipótesis, se comprobó la respuesta transcripcional del gen *AtFAD8* mediante qPCR en hojas de roseta sometidas a bajas temperaturas durante 1 semana utilizando el mutante de pérdida de función *ice1-1*. Los resultados de qPCR revelaron que aunque la expresión basal de *AtFAD8* en el mutante *ice1* era similar a la de la línea Col-0, en el mutante no había inducción de este gen tras la exposición a 6°C (ver Fig. 4.23). Estos resultados sugieren que ICE1 es necesario en la regulación de *AtFAD8* desencadenada por las bajas temperaturas.

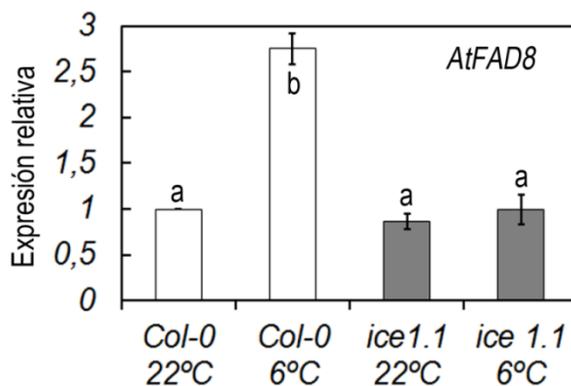


Figura 4.23 Análisis de la expresión génica de *AtFAD8* en hojas de roseta del mutante *ice1-1* y de Col-0 mediante qPCR en respuesta a las bajas temperaturas. Los datos proceden de la media de tres réplicas biológicas junto con tres réplicas técnicas.

3.1.6 Análisis de la actividad de los promotores de *AtFAD7* y *AtFAD8* en respuesta a hormonas

4.1.6.1 Estudio del efecto del jasmonato y el ácido abscísico en la regulación de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8*

En plantas, muchas de las respuestas a estreses bióticos y abióticos están reguladas por hormonas, las cuales actúan como segundos mensajeros en las cascadas de señalización. Los JAs son hormonas clave en la respuesta de defensa frente a patógenos como a la herida (Devoto y Turner, 2003; Farmer et al, 2003; Lorenzo y Solano, 2005). Por otro lado, el ABA es la hormona principal en la señalización de procesos relacionados con la respuesta a sequía, salinidad y frío (Zhu, 2002; Vishwakarma et al., 2017). Dado el perfil de actividad de los promotores de *AtFAD7* y *AtFAD8* observado en respuesta a herida y a las bajas temperaturas, se decidió analizar el efecto del JA y del ABA en la actividad de los promotores de dichos genes. Para asegurar que el tratamiento hormonal se realizaba correctamente, se utilizaron como controles positivos los genes *AtLOX2* y *AtABII*, genes marcadores de la respuesta a JA y ABA respectivamente, y se comprobó su expresión mediante PCR semicuantitativa. Tras un tratamiento de 2 horas con 100 μ M de MeJA o ABA, se produjo una inducción considerable de los genes *AtLOX2* y *AtABII*, por lo que se concluyó que el tratamiento hormonal era efectivo (ver Fig. 4. 24).



Figura 4.24 Análisis de expresión de los genes *AtABI1* y *AtLOX2* mediante PCR semicuantitativa como controles positivos de los tratamientos con ABA y MeJA respectivamente.

Tras el tratamiento con MeJA, no se observaron diferencias en la actividad GUS de las plantas transgénicas que expresaban este gen testigo bajo el control del promotor de *AtFAD7* respecto a las plantas control (ver Fig. 4.25A paneles A-C y G-I). En el caso de las plantas transgénicas que contenían el promotor de *AtFAD8*, tampoco se observaron cambios aparentes en la actividad GUS en las hojas cotiledóneas respecto a las plantas control (ver Fig. 4.25B paneles A y G). Sin embargo, en este caso se observaba un fuerte incremento de la actividad GUS en hojas de roseta y en raíces tras el tratamiento con MeJA (ver Fig. 4.25A paneles B, C, G e I). Sorprendentemente, en presencia de MeJA, el promotor de *AtFAD8* era muy activo en los haces vasculares de hojas de roseta y también en la punta de la raíz, mimetizando el patrón de actividad mostrado por el promotor de *AtFAD7* en condiciones normales. De ese modo, los resultados sugieren que el MeJA no afecta al promotor del gen *AtFAD7*, pero es un regulador positivo de la actividad del promotor de *AtFAD8*.

Por otro lado, los tratamientos con ABA revelaron una pérdida considerable de actividad GUS en plantas transgénicas que contenían el promotor de *AtFAD7* tanto en cotiledones, hojas de roseta como en raíces (ver Fig. 4.25A paneles D-F y G-I). Sin embargo, en el caso del promotor de *AtFAD8*, tras el tratamiento con ABA no se observaron diferencias aparentes en la actividad GUS respecto a las plantas control (ver Fig. 4.25B paneles D-F y G-I). De ese modo, el ABA parece ejercer un control negativo muy fuerte sobre el promotor de *AtFAD7*. Por el contrario, el promotor del gen *AtFAD8* parece ser insensible a la acción de el ABA.

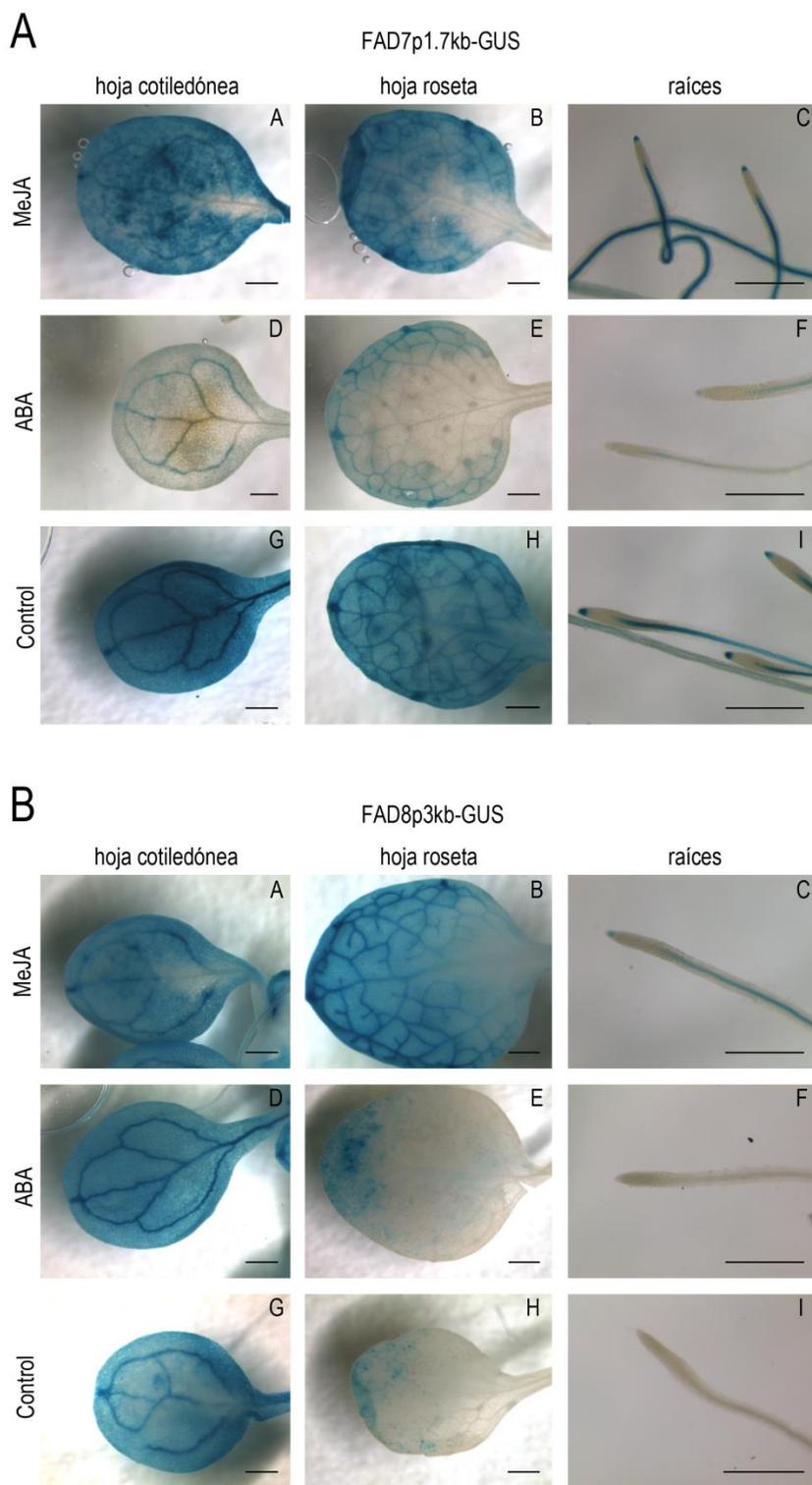


Figura 4.25 Estudio del efecto de las hormonas en la actividad de los promotores de *AtFAD7* y *AtFAD8*. **(A)** Tinción histoquímica GUS en plantas transgénicas de *Arabidopsis* con el promotor de *AtFAD7* en (A, D, G) cotiledones, (B, E, F) hojas de roseta y en (C, F, I) raíces, tras 2 horas de exposición a 100 μ M de (A-C) MeJA o (D-F) ABA, o bien (G-I) sin tratamiento hormonal. El tiempo de tinción GUS fue de 1 hora. **(B)** Tinción histoquímica GUS en plantas transgénicas con el promotor de *AtFAD8* en (A, D, G) cotiledones, (B, E, F) hojas de roseta y en (C, F, I) raíces, tras 2 horas de exposición a 100 μ M de (A-C) MeJA o (D-F) ABA, o bien (G-I) sin tratamiento hormonal. El tiempo de tinción GUS fue de 3 horas. Las barras representan 500 μ m.

Los resultados de la tinción histoquímica GUS fueron validados mediante qPCR. El tratamiento con MeJA provocó un ligero aumento, aunque significativo, de la expresión de *AtFAD7* en hojas de roseta, concretamente de 1,7 veces respecto al control, mientras que en raíces apenas se produjeron cambios en sus niveles de expresión (ver Fig. 4.26A). Respecto al ABA, esta hormona provocó una fuerte represión de *AtFAD7* tanto en hojas de roseta como en raíces, ya que los niveles de expresión de este gen tras el tratamiento hormonal se correspondían con menos de la mitad de los niveles del control (ver Fig. 4.26A). En el caso de *AtFAD8*, el tratamiento con MeJA provocó una fuerte inducción de la expresión del gen, superior a 2,5 veces respecto al control, tanto en hojas de roseta como en raíces (ver Fig. 4.26B). Sin embargo, los niveles de expresión de *AtFAD8* no se vieron alterados ni en hojas ni en raíces tras la exposición al ABA (ver Fig. 4.26B). Los datos de qPCR confirmaban los resultados obtenidos en la tinción histoquímica GUS en ambos genes, tanto en hojas como en raíces.

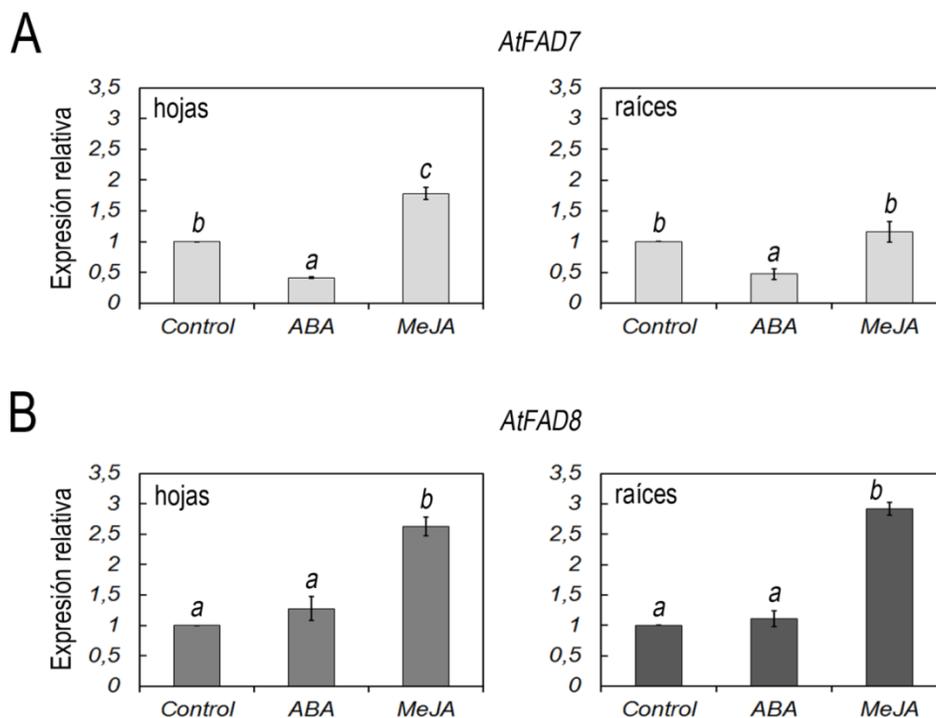


Figura 4.26 Análisis de expresión de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8* tanto en hojas de roseta como en raíces tras un tratamiento con ABA o MeJA. Se utilizaron concentraciones 100 μ M de hormona y las plantas se trataron durante 2 horas. Los datos proceden de la media de tres réplicas biológicas junto con tres réplicas técnicas.

4.1.6.2 Identificación de elementos reguladores responsables de la respuesta específica a hormonas de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8*

Dado el perfil de actividad del promotor del gen *AtFAD8* en respuesta al MeJA, se decidió investigar la región del promotor implicada en dicha regulación mediante el uso de las líneas transgénicas que expresaban el gen GUS bajo el control de los diferentes fragmentos deleccionados del promotor. Las plantas transgénicas que contenían el promotor íntegro de 2958 pb de *AtFAD8*, tras la exposición al MeJA mostraban un fuerte incremento de la actividad GUS en cotiledones y en hojas de roseta en comparación con las plantas control (ver Fig 4.27A paneles A y E). Sin embargo, este efecto desaparecía en el caso de los fragmentos de 1912, 643 y 290 pb respectivamente, donde los niveles de actividad GUS tras la exposición a la hormona eran similares a los del control (ver Fig 4.27A paneles B-C y F-H). En raíces, el análisis del promotor íntegro de de 2958 pb de *AtFAD8* tras la exposición al MeJA también reveló un incremento considerable de la actividad GUS en el tejido vascular en comparación con las plantas control, además de detectarse actividad GUS en la punta de la raíz (ver Fig 4.27B paneles A y E). No obstante, los análisis de la actividad GUS en las raíces en el caso los fragmentos de 1912, 643 y 290 pb mostraron unos niveles de actividad similares a los de las plantas control (ver Fig 4.27A paneles B-C y F-H) del mismo modo que lo sucedido en hojas. Estos resultados sugieren que los elementos de regulación en cis encargados de la respuesta a MeJA se encuentran localizados en el fragmento entre 2958 y 1912 pb del promotor de *AtFAD8*, donde según el análisis bioinformático se encuentran las dos secuencias consenso para la unión de factores de transcripción de tipo MYB.

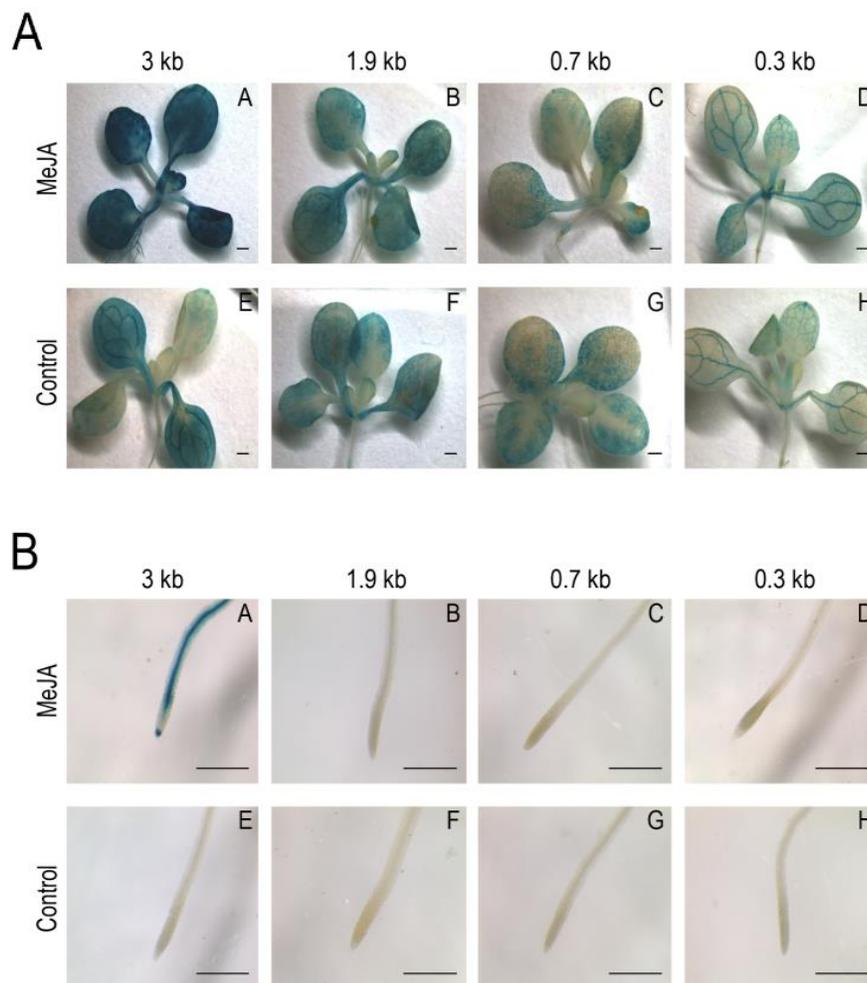


Figura 4.27 Tinción histoquímica GUS para la identificación de los elementos reguladores de respuesta al JA en el promotor de *AtFAD8*. **(A)** Hojas de plantas transgénicas de *Arabidopsis* con los fragmentos de (A, E) 3 Kpb, (B, F) 1,9 Kpb, (C, G) 0,7 Kpb y (D, H) 0,3 Kpb tras el tratamiento con (A-D) MeJA o (E-H) sin tratamiento hormonal. **(B)** Raíces de plantas transgénicas de *Arabidopsis* con los fragmentos de (A, E) 3 Kpb, (B, F) 1,9 Kpb, (C, G) 0,7 Kpb y (D, H) 0,3 Kpb tras el tratamiento con (A-D) MeJA o (E-H) sin tratamiento hormonal. El tiempo de tinción GUS fue de 3 horas. Las barras representan 500 μm .

Paralelamente, la fuerte represión de la actividad del promotor *AtFAD7* ejercida por el ABA, hizo que también se intentase determinar la región del promotor implicada en dicha regulación mediante el uso de los fragmentos delecionados del promotor. Las plantas transgénicas que contenían el promotor íntegro de 1682 pb de *AtFAD7* mostraban una disminución considerable de la actividad GUS en hojas respecto a las plantas control tras la exposición al ABA (ver Fig 4.28 A y D). Esta fuerte represión también se daba en el caso de los fragmentos de 703 pb y 499 pb tras el tratamiento

hormonal (ver Fig 4.28 B, C, E y F). En raíces también se observó el mismo efecto. Estos resultados sugieren que los elementos de regulación en cis encargados de la represión de la actividad del promotor de *AtFAD7* se encuentran en la región comprendida entre el ATG y 499 pb del promotor donde, según el análisis bioinformático, se encuentran las dos secuencias de represión por ABA muy cercanas al ATG del gen.

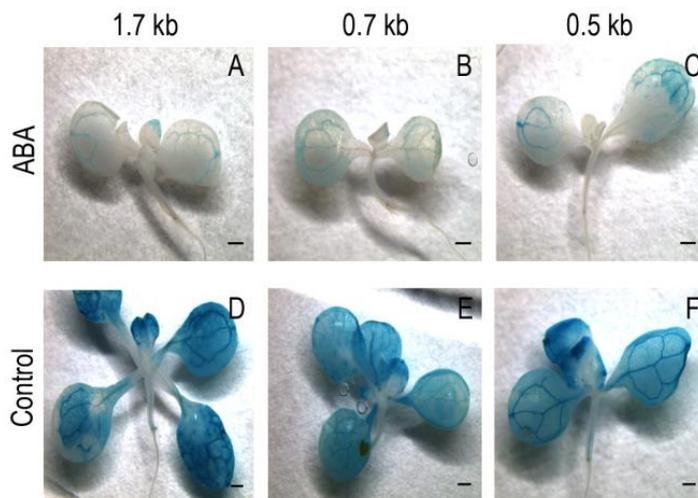


Figura 4.28 Tinción histoquímica GUS para la identificación de los elementos reguladores de respuesta al ABA en el promotor de *AtFAD7*. Hojas de plantas transgénicas de *Arabidopsis* con los fragmentos de (A, E) 3 Kpb, (B, F) 1,9 Kpb, (C, G) 0,7 Kpb y (D, H) 0,3 Kpb tras el tratamiento con (A-D) MeJA o (E-H) sin tratamiento hormonal. El tiempo de tinción GUS fue de 1 hora. Las barras representan 500 μ m.

4.2 ESTUDIO DE LA ABUNDANCIA RELATIVA Y DE LA DISTRIBUCIÓN Y LA ORGANIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS *AtFAD7* Y *AtFAD8* EN LAS MEMBRANAS PLASTIDIALES

4.2.1 Análisis de la abundancia relativa de las proteínas *AtFAD7* y *AtFAD8* en diferentes tejidos

En trabajos anteriores realizados en nuestro grupo, se analizó la localización tanto de *AtFAD7* como de *AtFAD8* mediante el análisis de líneas sobreexpresoras de ambas proteínas fusionadas a GFP o YFP (Román et al., 2015). Sin embargo, estos estudios no eran válidos para analizar la abundancia relativa o la posible existencia de componentes traduccionales en la regulación de ambas proteínas. Dado que en el capítulo anterior se comprobó que los promotores de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8* eran funcionales, se decidió utilizar estos promotores en fusiones con *AtFAD7*-GFP o *AtFAD8*-GFP con el objetivo de expresar ambas proteínas bajo control de sus promotores endógenos y estudiar su abundancia relativa en diferentes tejidos de la planta y su respuesta a diferentes estímulos ambientales. Los promotores de *AtFAD7* y *AtFAD8*, de 1682 pb y 2958 pb respectivamente, se fusionaron mediante MultiSite Gateway® a los genes que codificaban para sus respectivas proteínas fusionadas a GFP. Finalmente, se obtuvieron plantas transgénicas estables que se analizaron mediante microscopía confocal y detección inmunológica por Western blot usando el anticuerpo anti-GFP.

En primer lugar, se evaluaron los niveles de las proteínas *AtFAD7* y *AtFAD8* en tejidos fotosintéticos, donde el análisis de los promotores reveló que los genes que codifican las $\omega 3$ desaturasas plastidiales, especialmente *AtFAD7*, eran muy activos. Las plantas transgénicas transformadas con la fusión *AtFAD7*-GFP bajo el control del promotor de 1682 pb de *AtFAD7* mostraron una fuerte señal fluorescente de GFP asociada a los cloroplastos, tanto en hojas cotiledóneas como en hojas de roseta (ver Fig. 4.29 A-C). En todos los casos, la señal fluorescente apareció como un halo o “tonel” bordeando completamente la superficie del cloroplasto, indicando que la señal fluorescente es específica del cloroplasto y compatible con la localización en la envuelta cloroplástica interna de FAD7. No se detectó señal fluorescente en plantas transformadas con el vector vacío (Ver Fig. 4.29 G-I), lo que indicaba que la señal fluorescente asociada a *AtFAD7*-GFP observada anteriormente era genuína. Otro resultado interesante del análisis de las líneas promotor::*AtFAD7*-GFP fue la observación de que la señal fluorescente GFP era muy abundante tanto en hojas cotiledóneas como en hojas jóvenes y hojas maduras de roseta, no

observándose un incremento de la fluorescencia con la edad de la planta (ver Fig. 4.29 A-C). Este patrón es compatible con los datos obtenidos anteriormente en el análisis funcional del promotor mediante la tinción histoquímica GUS y con los datos de expresión génica mediante qPCR. Sin embargo, en hojas jóvenes de roseta, sí se pudo observar una fuerte señal fluorescente GFP asociada a *AtFAD7* en cloroplastos pequeños e inmaduros (ver Fig. 4.29 B).

Cuando se analizaron las plantas transgénicas transformadas con la fusión *AtFAD8-GFP* bajo el control del promotor de 2958 pb de *AtFAD8*, se observó una señal fluorescente GFP de baja intensidad asociada a los cloroplastos de las hojas cotiledóneas (ver Fig. 4.29 D). Sin embargo, en hojas de roseta tanto jóvenes como maduras no se observó señal fluorescente GFP o ésta era prácticamente indetectable (ver Fig. 4.29 E y F). Estos resultados parecen consistentes con los datos obtenidos anteriormente en el análisis funcional del promotor mediante la tinción histoquímica GUS y con los datos de expresión génica mediante qPCR, que indicaban que el gen *AtFAD8* se expresaba mucho menos que *AtFAD7* en hojas de *Arabidopsis*. De este modo, los datos de abundancia relativa de la proteína *AtFAD8* estarían corelacionados con sus datos de expresión génica.

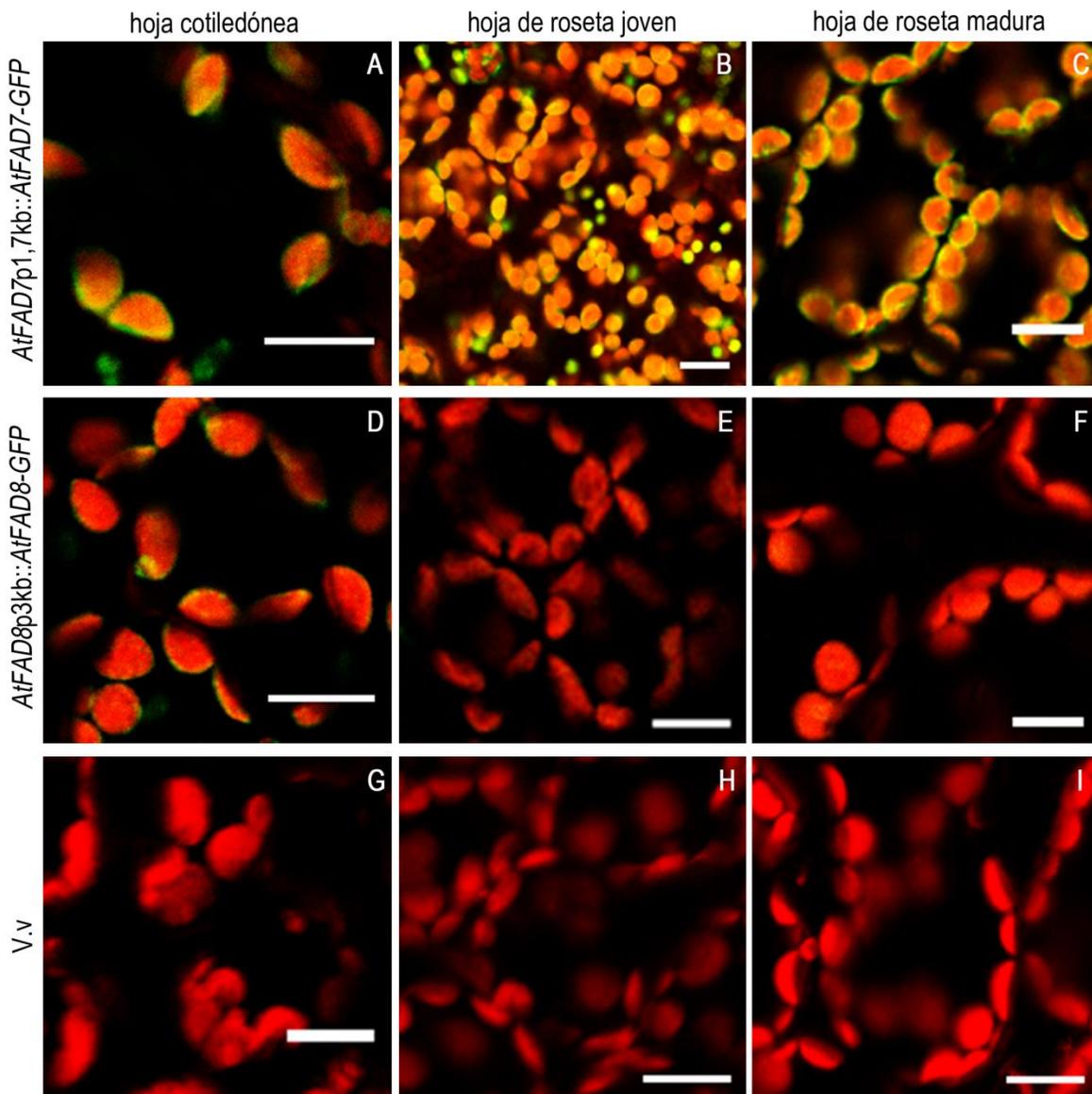


Figura 4.29 Abundancia relativa de las proteínas *AtFAD7* y *AtFAD8* en hojas de plantas de 2 semanas de *Arabidopsis*. Superposición de canales de fluorescencia correspondientes a plantas transformadas con (A-C) *AtFAD7*-GFP, (D-F) *AtFAD8*-GFP y (G-I) el vector vacío en (A, D, G) hojas cotiledóneas, (B, E, H) hojas de rosetas jóvenes y (C,F, I) hojas de roseta maduras. El canal de fluorescencia verde se corresponde con la señal emitida por la GFP y el canal de fluorescencia roja se corresponde con la señal emitida por la clorofila. Las barras se corresponden con 10 μm .

De manera complementaria al análisis realizado en hojas, también se evaluaron los niveles de proteína *AtFAD7* y *AtFAD8* en tejidos no fotosintéticos, concretamente en raíces, donde el análisis de los promotores reveló que los genes que codifican las $\omega 3$ desaturasas plastidiales presentaban un patrón de expresión muy específico, especialmente *AtFAD7*. El análisis mediante microscopía confocal detectó la fluorescencia GFP, en verde, asociada a *AtFAD7* y *AtFAD8*. En este caso, la pared celular de las células de la raíz se marcó con yoduro de propidio cuya fluorescencia se detectó en rojo. Los datos de fluorescencia GFP indicaban que *AtFAD7* se concentraba en la punta y a lo largo del tejido vascular de las regiones de maduración y elongación de la raíz (ver Fig. 4.30 A y D). El patrón de acumulación de *AtFAD7* en raíces se correspondía con el perfil de expresión tisular de su respectivo gen observado anteriormente. Sin embargo, *AtFAD8* se detectaba difícilmente tanto en la punta como en el tejido vascular de la raíz (ver Fig. 4.30 B y E), indicando que su abundancia relativa respecto a *AtFAD7* era considerablemente menor en este tejido. Estos resultados coinciden con la baja expresión del gen *AtFAD8* en raíces observada anteriormente. Finalmente, no se detectó fluorescencia específica de la proteína GFP en las raíces de las plantas transformadas con el vector vacío (ver Fig. 4.30 C y F), indicando que la señal fluorescente GFP era genuina.

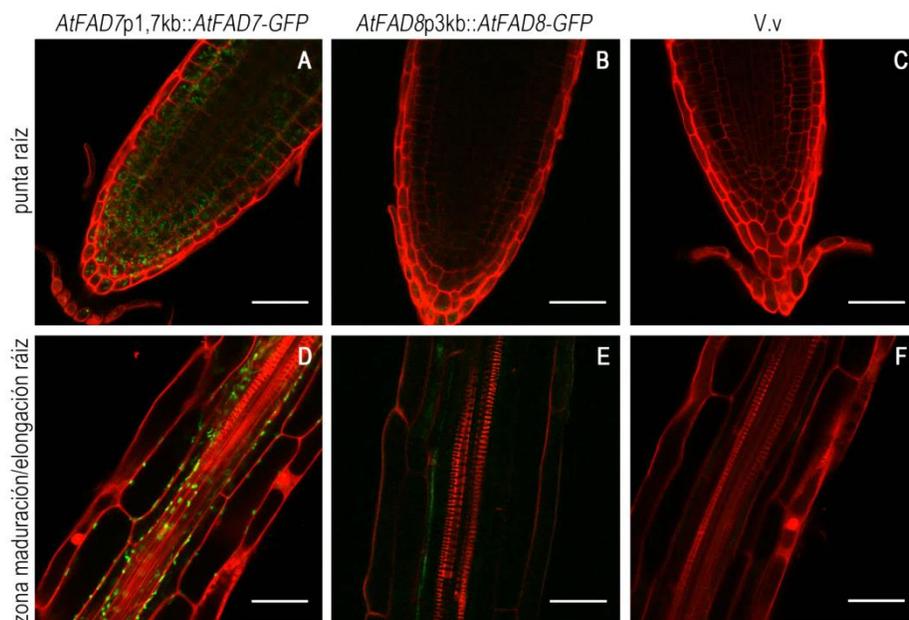


Figura 4.30 Abundancia relativa de las proteínas *AtFAD7* y *AtFAD8* en raíces de plantas de 2 semanas de *Arabidopsis*. Superposición de canales de fluorescencia correspondientes a plantas transformadas con (A, D) *AtFAD7*-GFP, (B, E) *AtFAD8*-GFP y (C, F) el vector vacío en la (A-C) punta de la raíz y en la (D-F) región de maduración/elongación de la raíz. El canal de fluorescencia verde se corresponde con la señal emitida por la GFP y el canal de fluorescencia roja se corresponde con la señal emitida por el yoduro de propidio (PI). Las barras se corresponden con 100 μ m.

Los datos obtenidos a partir de la fluorescencia emitida por la GFP se validaron mediante detección inmunológica, utilizando anticuerpos contra la GFP. Primeramente se comparó la abundancia relativa de las proteínas *AtFAD7* y de *AtFAD8* en hojas de roseta. En el extracto correspondiente a las plantas *AtFAD7-GFP* se detectó una banda muy intensa de 72 KDa compatible con la suma de los 50 KDa de *AtFAD7* y los 22 KDa de la GFP (ver Fig. 4.31). Sin embargo, no se detectó ninguna banda en las plantas *AtFAD8-GFP* (ver Fig. 4.31). Estos resultados indican que *AtFAD7* es mucho más abundante que *AtFAD8*, confirmando los resultados obtenidos mediante el análisis de microscopía confocal. Otro dato interesante, es la presencia de una banda de alto peso molecular (>120 KDa) observada en el extracto correspondiente a las plantas *AtFAD7-GFP* (ver Fig. 4.31). Esta banda podría ser compatible con la formación de agregados de alto peso molecular en los que *AtFAD7* estaría presente.

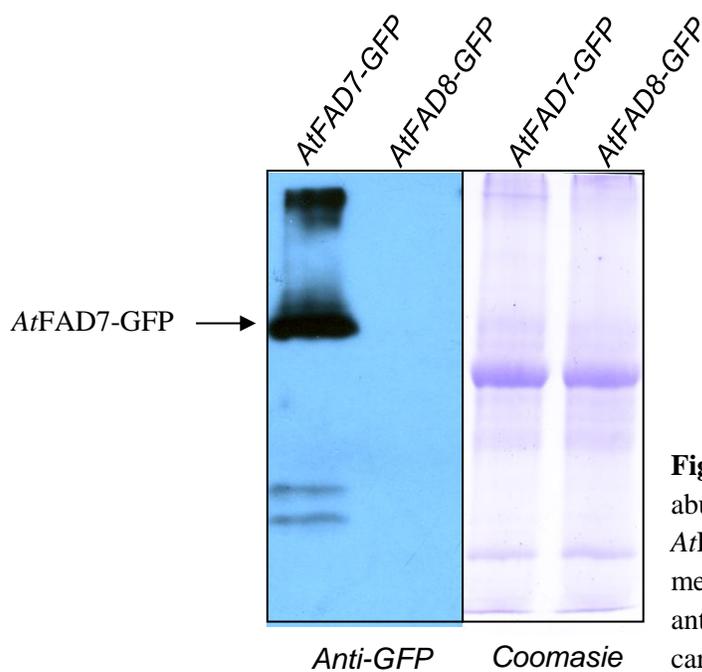


Figura 4.31 Comparación de la abundancia relativa de *AtFAD7* y *AtFAD8* en hojas de roseta de 2 semanas mediante detección inmunológica con el anticuerpo anti-GFP. En cada pocillo de cargaron 20 μ g de proteína total.

Posteriormente, también se llevó a cabo la inmuno-detección de las ω 3 desaturasas plastidiales en hojas y raíces, así como durante el desarrollo de la hoja. Sólo los niveles de *AtFAD7-GFP* pudieron ser analizados, debido a que *AtFAD8-GFP* no era detectada por esta técnica en plantas a temperatura control. Los datos de detección inmunológica confirmaron que *AtFAD7* también se encuentra presente en raíces, aunque con una abundancia relativa considerablemente menor que en hojas (ver Fig. 4.32A). Tampoco se observaron cambios aparentes en el estado de agregación de *AtFAD7* en hojas al añadirse el agente reductor β -Mercaptoetanol (ver Fig. 4.32A), lo que sugiere

que los grupos tiol de las tres Cys presentes en la secuencia de aminoácidos de *AtFAD7* no estarían implicadas en la formación de homodímeros. La detección inmunológica confirmó que los niveles de *AtFAD7* se mantenían constantes en los diferentes tipos de hojas y a lo largo del desarrollo de las hojas de la roseta (ver Fig. 4.32B), tal y como se había observado en el análisis de estas líneas transgénicas mediante microscopía confocal.

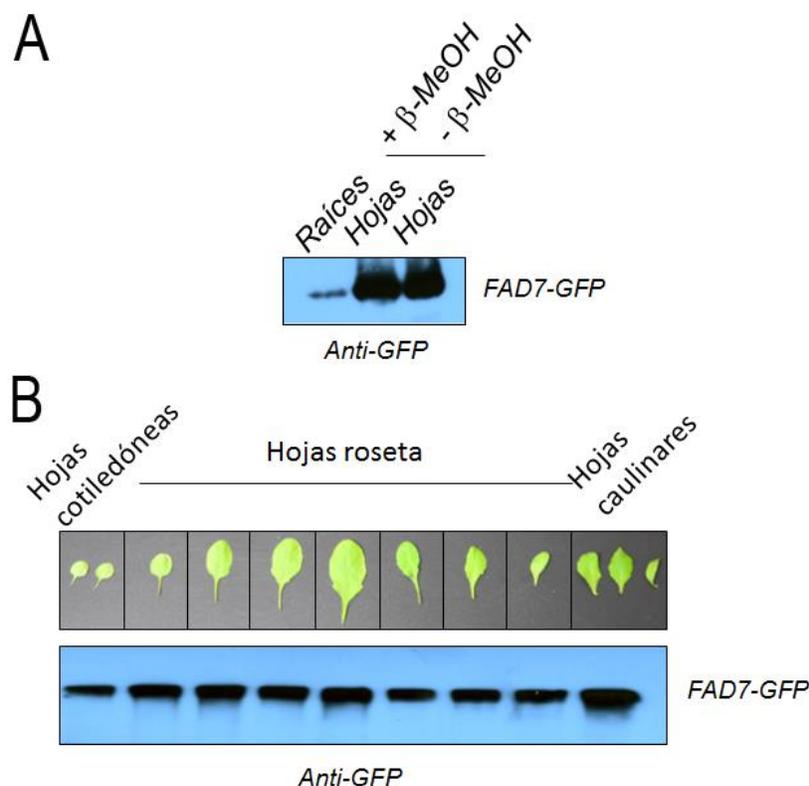


Figura 4.32 Comparación de la abundancia relativa de *AtFAD7* en (A) diferentes tejidos y (B) con del desarrollo de la hoja mediante detección inmunológica con el anticuerpo anti-GFP. En cada pocillo de cargaron 20 μ g de proteína total.

4.2.2 Análisis de la abundancia relativa de las proteínas *AtFAD7* y *AtFAD8* en respuesta a estímulos ambientales

Anteriormente, se demostró que los genes *AtFAD7* y *AtFAD8* presentaban una respuesta diferencial a la herida, las bajas temperaturas y frente a hormonas como el ABA o el JA. Por ello, se decidió evaluar si estos estímulos afectaban a las proteínas *AtFAD7* y *AtFAD8* respectivamente de la misma

manera que se observó a nivel de expresión génica y actividad del promotor. El análisis mediante microscopia confocal reveló una disminución considerable de los niveles de *AtFAD7* tras una incubación de 48 horas con ABA respecto a las plantas que no recibieron tratamiento hormonal (ver Fig. 4. 33A paneles A y B). Al mismo tiempo, también se detectó un aumento en los niveles de *AtFAD8* después de una exposición de 1 semana a 6°C respecto las plantas crecidas a temperatura control (ver Fig. 4. 33B paneles A y B). Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos a partir del análisis funcional de los promotores y de expresión de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8*.

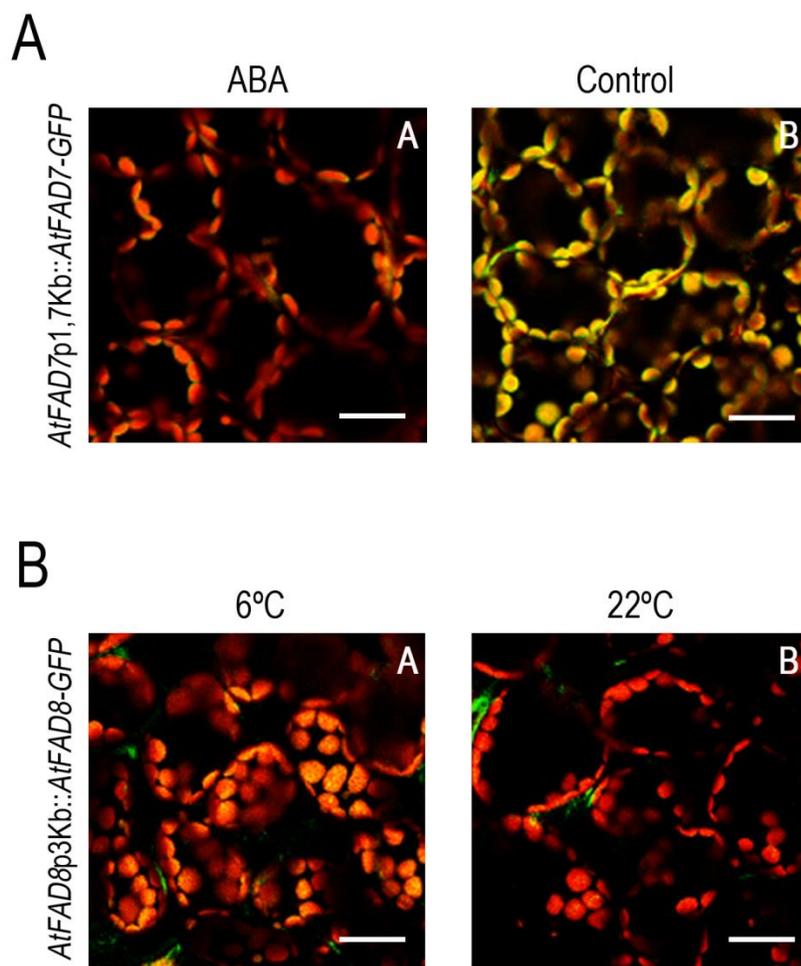


Figura 4.33 Comparación de la abundancia relativa de *AtFAD7* y *AtFAD8* tras la exposición a determinados estímulos en hojas de 2 semanas de *Arabidopsis*. Superposición de canales de fluorescencia correspondientes a (A) plantas *AtFAD7-GFP* (A) tras 48 horas de exposición a ABA y (B) en plantas sin tratamiento hormonal, y a (B) plantas *AtFAD8-GFP* crecidas a (A) 6°C y a (B) 22°C durante 1 semana. El canal de fluorescencia verde se corresponde con la señal emitida por la GFP y el canal de fluorescencia roja se corresponde con la señal emitida por la clorofila. Las barras se corresponden con 20 μm .

4.2.3 Estudio de interacción entre las ω 3 desaturasas plastidiales *AtFAD7* y *AtFAD8* y con la ω 6 desaturasa plastidial *AtFAD6*

Se ha demostrado que la ω 3 desaturasa reticular *AtFAD3* puede formar heterodímeros funcionales con la ω 6 desaturasa reticular *AtFAD2* cuando se expresan en levaduras (Lou et al., 2014). Además, resultados obtenidos recientemente en nuestro grupo indican que las ω 3 desaturasas plastidiales *AtFAD7* y *AtFAD8* co-localizan en los cloroplastos de *Arabidopsis*, así como también con la ω 6 desaturasa plastidial *AtFAD6*, lo que sugiere que estas proteínas se localizan muy próximas entre sí. Por todo ello, se decidió estudiar la organización de las ω 3 desaturasas plastidiales, intentando averiguar si éstas pueden formar homodímeros o heterodímeros, o si interaccionan con la ω 6 desaturasa plastidial *FAD6*. De este modo, se desarrolló un ensayo de complementación biomolecular de fluorescencia (BIFC) basado el ensamblaje de la proteína fluorescente YFP en protoplastos de *Arabidopsis*. Los genes que codifican cada desaturasa plastidial (*AtFAD6*, *AtFAD7* y *AtFAD8*) se clonaron en los vectores pUC-SPYNE o pUC-SPYCE, de modo que expresaban las proteínas fusionadas con el fragmento N-terminal (SPYNE) o C-terminal (SPYCE) de la YFP (Walter et al., 2004). Sólo en caso de interacción entre ambas proteínas, se produciría el ensamblaje de la YFP obteniendo la correspondiente señal fluorescente amarilla. En este estudio se utilizaron protoplastos transformados con el vector pEarly 101, que expresaba *AtFAD8* fusionada con la YFP íntegra, como control positivo (ver Fig. 4.34 A) y protoplastos cotransformados con los vectores SPYNE y SPYCE vacíos como control negativo (ver Fig. 4.34 B).

El análisis de BIFC mostró una fuerte interacción entre la ω 6 desaturasa *AtFAD6* y la ω 3 desaturasa *AtFAD7*, obteniendo resultados similares independientemente del fragmento de YFP fusionado a cada una de las proteínas estudiadas (ver Fig. 4.34 C y D). Cuando se analizó la posible interacción entre *AtFAD6* y *AtFAD8*, de nuevo se detectó señal fluorescente YFP, aunque se obtuvieron mejores resultados cuando *AtFAD6* estaba fusionada al fragmento N-terminal de la YFP y *AtFAD8* al fragmento C-terminal (ver Fig. 4.34 E y F).

La posibilidad de formar heterodímeros entre *AtFAD7* y *AtFAD8* también fue analizada. En este caso se obtuvo una señal fluorescente YFP prácticamente indetectable, sugiriendo que esta interacción es débil (ver Fig. 4.34 G y H). Sin embargo, los resultados obtenidos al analizar la posible interacción *AtFAD7* / *AtFAD7* y *AtFAD8* / *AtFAD8* sugiere que estas proteínas son capaces de formar homodímeros (ver Fig. 4.34 I y J). La formación de estos homodímeros es consistente con la banda de alto peso molecular observada anteriormente en la inmunodetección de la proteína *AtFAD7*-GFP expresada bajo control de su promotor endógeno.

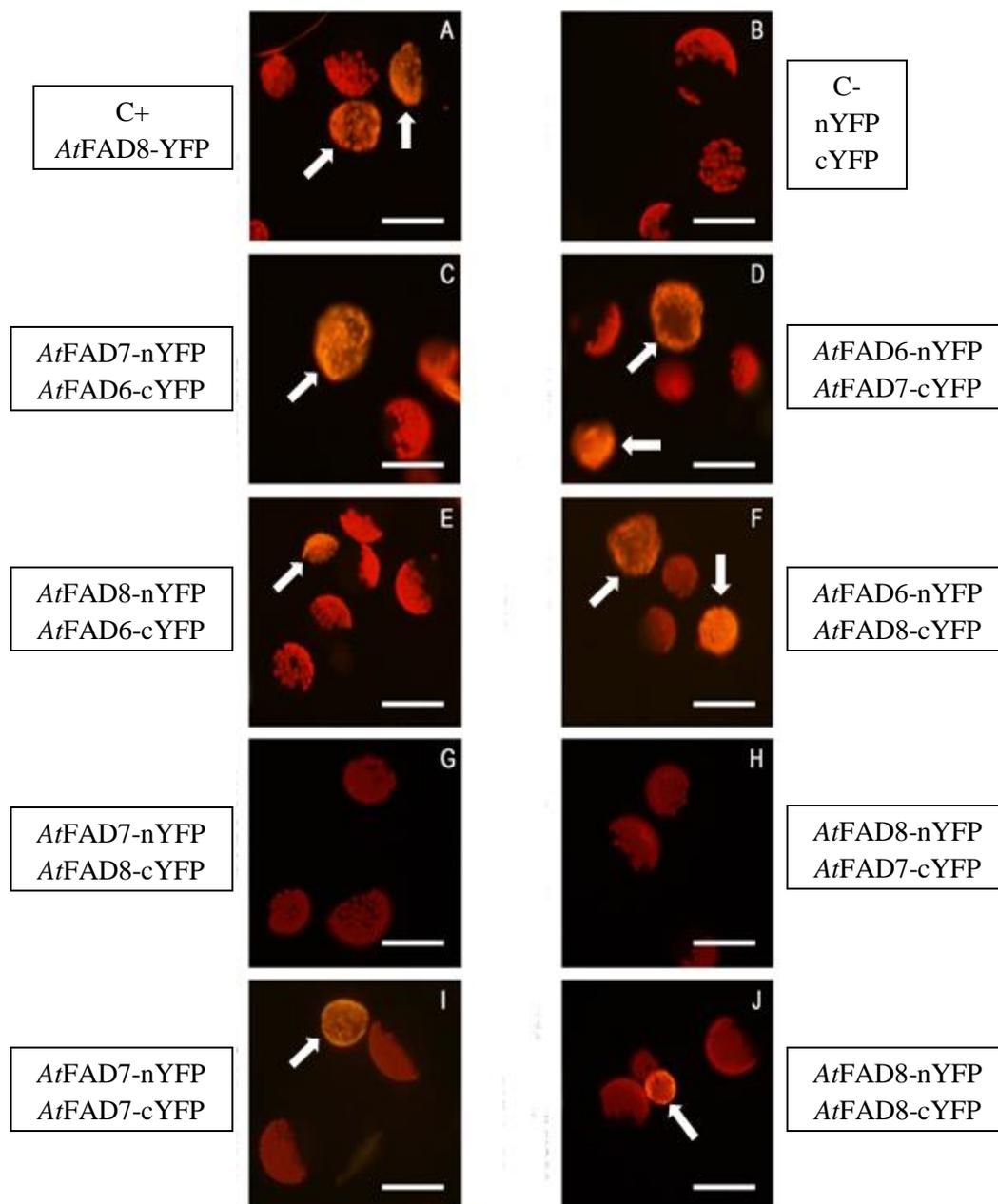


Figura 4.34 Estudio de la interacción de las ω 3 desaturasas plastidiales mediante BIFC. Las flechas blancas indican protoplastos de *Arabidopsis* co-transformados con (C,D) *AtFAD7*-*AtFAD6*, (E,F) *AtFAD8*-*AtFAD6*, (G,H) *AtFAD7*-*AtFAD8*, (I) *AtFAD7*-*AtFAD7* y (J) *AtFAD8*-*AtFAD8*. También se utilizó un (A) control positivo basado en la transformación con *AtFAD8* fusionada con la YFP íntegra, y un (B) control negativo basado en la co-transformación con vectores de BIFC vacíos. El canal de fluorescencia amarilla se corresponde con la señal emitida por la YFP y el canal de fluorescencia roja se corresponde con la señal emitida por la clorofila. Las barras se corresponden con 100 μ m.

5. DISCUSIÓN

5.1 IDENTIFICACIÓN DE LOS ELEMENTOS REGULADORES EN *CIS* IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES QUE CODIFICAN LAS ω 3 DESATURASAS PLASTIDIALES *AtFAD7* y *AtFAD8*

Los ácidos grasos son los principales componentes de las membranas biológicas, siendo los ácidos grasos trienoicos los más abundantes (Somerville et al., 2000). Las ω 3 desaturasas plastidiales FAD7 y FAD8 son las enzimas responsables de la síntesis de ácidos grasos trienoicos en los plastidios. FAD7 es la principal responsable de la síntesis de ácidos grasos trienoicos en hojas (Browse et al., 1986; Somerville et al., 2000), mientras que FAD8 se identificó como una ω 3 desaturasa inducible por frío (Gibson et al., 1994; McConn et al., 1994). Por eso, tradicionalmente se ha considerado que FAD8 sólo era activa a temperaturas bajas, siendo la responsable del incremento de ácidos grasos trienoicos provocado por el frío. Sin embargo, un análisis funcional realizado recientemente mediante el estudio de la composición de ácidos grasos totales y en clases de lípidos en diferentes líneas mutantes de pérdida de la función ω 3 desaturasa, ha demostrado, en primer lugar, que FAD7 y FAD8 son activas a temperatura ambiente, y que, además, difieren en su especificidad por sustrato respecto a la cabeza polar del glicerolípido y a la longitud de los ácidos grasos de los lípidos que reconocen (Román et al., 2015) (ver apartado 1.3.2). Estos resultados sugieren que a pesar de su elevada homología, su localización en el mismo compartimiento celular y realizar una función biológica similar ejercen una función no redundante y especializada.

El papel no redundante ejercido por las dos ω 3 desaturasas plastidiales implica necesariamente un alto grado de coordinación entre ambas que, como demuestran algunos de los resultados obtenidos en esta Tesis doctoral, se ejerce mediante el control de sus niveles de expresión génica. Se conoce que la expresión de los genes que codifican las ω 3 desaturasas responde de manera diferencial a una gran variedad de estímulos ambientales (ver apartado 1.3.2). Concretamente, en el caso de las ω 3 desaturasas plastidiales, se ha observado que el gen *AtFAD7* es sensible a la herida (Hamada et al., 1996; Nishiuchi et al., 1997), mientras que *AtFAD8* se induce tras la exposición a las bajas temperaturas (McConn et al., 1994; Román et al., 2015). Actualmente, únicamente se ha descrito la intervención del factor de transcripción bZIP67 en la acumulación de ácidos grasos trienoicos en semillas mediante la activación del gen *AtFAD3*, que codifica la ω 3 desaturasa reticular (Mendes et al., 2013) (ver apartado 1.3.2). Sin embargo, la combinación de secuencias reguladoras en *cis* y de factores de transcripción implicados en la coordinación y en la regulación transcripcional de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8* son a día de hoy desconocidos. En esta Tesis doctoral, se ha abordado la

identificación de varios elementos reguladores que intervienen en el control transcripcional de estos genes. Además, se ha evaluado si los elementos de regulación identificados eran comunes o específicos de cada gen, y hasta que punto éstos eran similares a otros elementos de regulación presentes en la respuesta a estrés biótico o abiótico. Finalmente, se ha estudiado cómo intervienen estos elementos en la coordinación de la actividad de las ω 3 desaturasas plastidiales durante el desarrollo de la planta o la respuesta a determinados factores ambientales. Para ello, se han utilizado líneas transgénicas estables de *Arabidopsis* que expresaban el gen testigo *GUS* bajo el control de varios fragmentos de longitud variable de los promotores de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8* respectivamente. La actividad *GUS* de estas líneas transgénicas se analizó en diferentes tejidos y en presencia de diferentes estímulos ambientales.

5.1.1 *AtFAD7* es la ω 3 desaturasa más expresada en hojas

El patrón de expresión tisular de *AtFAD7* y *AtFAD8* no difería substancialmente entre ambos genes, tal y como mostró el análisis de la actividad *GUS* en plantas transgénicas que contenían las construcciones génicas promotor::*GUS*. Se detectó actividad *GUS* en los tejidos fotosintéticos de la planta, concretamente en hojas cotiledóneas, de roseta, caulinares y también en los sépalos de la flor, tanto en plantas transgénicas que contenían el promotor de *AtFAD7* como en las que contenían el promotor de *AtFAD8* (ver Figura 4.2). Sin embargo, sí que se observaron diferencias evidentes en los niveles de actividad de los promotores de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8* tras realizar la tinción histoquímica *GUS* en plantas transgénicas promotor::*GUS*, demostrando que el promotor de *AtFAD7* era mucho más activo que el promotor de *AtFAD8* en todos los tejidos fotosintéticos. En el caso del promotor de *AtFAD8*, la actividad *GUS* no era homogénea en estos tejidos, ya que era claramente superior en hojas cotiledóneas. Aunque no se sabe a qué es debida esta diferencia, se conoce que las hojas cotiledóneas presentan un programa de desarrollo diferente respecto al resto de hojas (Tsukaya, 1995), lo que podría explicar estas diferencias en el patrón de expresión. Apoyando estos datos, el análisis cuantitativo de la expresión génica por qPCR, reveló que *AtFAD7* era el gen de ω 3 desaturasa con mayores niveles de transcripción en hojas, expresándose hasta 5 veces más que *AtFAD8* (ver Figura 4.3). Además, los datos de actividad del promotor y de expresión génica de *AtFAD7* y *AtFAD8* en hojas también se correspondían con los niveles de sus respectivas proteínas, al observarse que los niveles de fluorescencia asociada a la proteína *AtFAD7* eran considerablemente superiores a los de la proteína *AtFAD8* en las hojas de las plantas transgénicas con las construcciones promotor::proteína-GFP (ver Figura 4.29).

Estos resultados indican que FAD7 es la ω 3 desaturasa que presenta un mayor nivel de expresión en hojas, sugiriendo que esta proteína es la principal responsable de la síntesis de ácidos grasos trienoicos en los tejidos fotosintéticos. De este modo, las diferencias en la actividad de los promotores, y en la expresión génica y proteica de ambas ω 3 desaturasas plastidiales, reflejan la abundancia relativa de los diferentes lípidos en las membranas plastidiales y su distinta especificidad de sustrato. Esta observación es coherente con el papel esencial de FAD7 en la síntesis de 18:3 y 16:3 asociados a galactolípidos (Browse et al., 1986), que representan más del 50% del total de los lípidos en hojas y del 75% de los que constituyen las membranas plastidiales (Dörmann y Benning, 2002). El elevado nivel de expresión del gen *AtFAD7* durante el desarrollo de la planta (ver Figura 4.3) y el fuerte control transcripcional ejercido por la luz (ver Figura 4.4) apoyan la importancia de la función de FAD7 asociada a los galactolípidos del cloroplasto. De forma similar, en el caso de FAD8, los menores niveles en la actividad de su promotor o en su expresión génica y proteica respecto a FAD7, también se corresponden con su función, ya que FAD8 está especializada en la síntesis de 18:3 asociada principalmente a PG (Román et al., 2015), el cual es un lípido minoritario en las membranas plastidiales (Miquel y Browse, 1992).

5.1.2 Las ω 3 desaturasas plastidiales también se expresan en tejidos no fotosintéticos

Paralelamente, se observó que los promotores de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8* eran activos en tejidos no fotosintéticos, mostrando además un patrón de expresión muy específico (ver Figura 4.5). En las plantas transgénicas que contenían el promotor de *AtFAD7*, se detectó actividad GUS en el tejido vascular de la zona de elongación y diferenciación celular y también en la punta de la raíz principal y de las secundarias, así como también en el pistilo (estigma) y en los estambres de las flores. Es importante remarcar que en un estudio anterior realizado en tabaco por Nisiuchi et al. (1995) con un fragmento de 825 pb del promotor *AtFAD7* (mucho más corto que el fragmento de 1682 pb utilizado en este trabajo) no se detectó actividad del promotor en raíces. De nuevo, la actividad del promotor de *AtFAD8* era considerablemente menor que la del promotor de *AtFAD7*, tal como sucedía en los tejidos fotosintéticos, no detectándose actividad en la punta de la raíz, con la excepción del tratamiento con MeJA, ni tampoco en los estambres de las flores. La menor actividad de *AtFAD8* respecto a *AtFAD7* en raíces fue confirmada mediante el análisis cuantitativo de

su expresión génica por qPCR, demostrándose también que la ω 3 desaturasa reticular FAD3 era la más expresada en este tejido (ver Figura 4.6).

La presencia de un patrón de expresión tisular específico mostrado por ambos genes en los tejidos no fotosintéticos sugiere que el papel ejercido por FAD7 y FAD8 va más allá de su contribución en la formación de membranas plastidiales. Tanto las flores como las raíces no actúan como reservorios naturales de ácidos grasos trienoicos, siendo éstos considerablemente inferiores a los presentes en hojas (Li et al., 2006; Beaudoin et al., 2009) (ver tabla 1.3). Sin embargo, los ácidos grasos trienoicos tanto en la raíz como en la flor tienen una función clara en relación a su papel como precursores de la biosíntesis de JAs. Se ha comprobado que el JA es un efector negativo del crecimiento de la raíz (Staswick et al., 1992), además de ser vital para el correcto reconocimiento y maduración del polen (McConn y Browse, 1996). De este modo, la función principal de las ω 3 desaturasas plastidiales en los tejidos no fotosintéticos podría estar relacionada con la formación de ácidos grasos trienoicos, que actuarían como precursores en la síntesis de JAs (Vick y Zimmerman, 1984). La expresión de *AtFAD7* en la punta de la raíz principal y de las raíces secundarias coincide con el patrón de expresión de otros genes implicados en la síntesis de JAs, como por ejemplo varias isoformas de lipoxigenasas (LOXs) o de Aleno Óxido ciclasas (AOCs) (Vellosillo et al., 2007; Stenzel et al., 2012). De esta forma, FAD7 podría intervenir en el control de la elongación de la raíz. Esta hipótesis fue comprobada mediante el análisis de la longitud de la raíz principal en diferentes mutantes de pérdida de función ω 3 desaturasa (ver Figura 4.7). Sorprendentemente, aunque FAD3 sea la ω 3 más expresada en raíces, la mayor longitud de la raíz mostrada por los diferentes mutantes de pérdida de función ω 3 desaturasa plastidial, indica que tanto FAD7 y como FAD8, y no la reticular FAD3, intervienen en la inhibición de la elongación radicular mediante la síntesis de ácidos grasos trienoicos precursores para la síntesis de JA. Del mismo modo, el triple mutante *fad3 fad7 fad8*, el cuál es incapaz de sintetizar JA, presenta esterilidad masculina salvo que se le suministre JA de forma exógena. Por eso, la presencia de expresión de *AtFAD7* en el estigma del pistilo es consistente con el papel de los ácidos grasos trienoicos como precursores en la síntesis de JAs durante el proceso de reconocimiento y maduración del polen.

5.1.3 Elementos reguladores en *cis* de tipo WRKY intervienen en el mantenimiento de la expresión basal del gen *AtFAD7* en hojas

El análisis mediante PLACE y PLANTCARE de las secuencias de los promotores de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8*, permitió la identificación de posibles elementos reguladores en *cis* involucrados en la regulación de su actividad. Varios fueron los elementos identificados, si bien algunos presentaban unas características más llamativas. Así, este análisis detectó en ambos promotores tres elementos reguladores en *cis* reconocidos por factores de transcripción de tipo WRKY, todos ellos situados en la región cercana al ATG (ver Figura 4.1). El análisis de la actividad GUS asociada a diferentes deleciones realizadas sobre los promotores de *AtFAD7* y *AtFAD8* permitió comprobar la funcionalidad de estos elementos reguladores.

El fragmento delecionado de 703 pb del promotor de *AtFAD7*, que conservaba las tres secuencias reconocidas por factores de transcripción de tipo WRKY, presentaba una actividad GUS asociada al promotor de *AtFAD7* similar a la del fragmento íntegro de 1682 pb del promotor en hojas, conservando hasta un 90% de su actividad según el análisis cuantitativo. Sin embargo, el fragmento delecionado de 499 pb del promotor de *AtFAD7*, que sólo conservaba una de las tres secuencias reconocidas por factores de transcripción de tipo WRKY, presentaba una clara disminución de la actividad GUS respecto a la del fragmento íntegro de 1682 pb del promotor en hojas lo que, según el análisis cuantitativo, suponía una disminución de más de un 35% de su actividad (Ver Figuras 4.9 y 4.10). Esta pérdida de actividad GUS asociada a la supresión de los elementos reguladores en *cis* reconocidos por factores de transcripción de tipo WRKY, indica una importante contribución de estos factores de transcripción en el mantenimiento de los niveles de expresión basal del gen *AtFAD7* en hojas.

En el caso del promotor de *AtFAD8*, el fragmento de 290 pb, que no conservaba ninguna de las tres secuencias reconocidas por factores de transcripción de tipo WRKY, también presentaba una clara disminución de la actividad GUS respecto a la del fragmento íntegro de 2958 pb del promotor en hojas, conservando un 34% de su actividad según el análisis cuantitativo. Sin embargo, el fragmento de mayor longitud de 643 pb del promotor de *AtFAD8*, que conservaba las tres secuencias reconocidas por factores de transcripción de tipo WRKY, aunque presentaba mayor actividad que el fragmento de 290 pb al conservar hasta un 56% de su actividad según el análisis cuantitativo, también mostraba una clara disminución de su actividad respecto a la del fragmento íntegro del promotor (ver Figuras 4.17 y 4.18). Esta pérdida más progresiva de la actividad GUS

asociada a las diferentes deleciones del promotor de *AtFAD8* indica que, aunque los factores de transcripción de tipo WRKY también podrían ejercer una función importante en la regulación de la expresión basal de *AtFAD8*, no pueden por si solos mantener los mismos niveles de actividad que el promotor íntegro, a diferencia de lo sucedido con el promotor de *AtFAD7*.

Curiosamente, en flores y raíces, no se observó una disminución de la actividad GUS asociada al promotor de *AtFAD7* debida a la pérdida de los elementos de regulación en *cis* reconocidos por WRKYs (ver Figura 4.11), lo que indica que estos factores de transcripción no son los encargados del mantenimiento de la expresión basal de los genes que codifican las ω 3 desaturasas plastidiales en estos tejidos. Este hecho, sugiere además la existencia de una regulación diferencial del control transcripcional de FAD7 y FAD8 en estos tejidos respecto a las hojas, lo que podría deberse a la diferente función biológica de estas proteínas en los tejidos no fotosintéticos, consistente en la síntesis de ácidos grasos trienoicos como precursores en la síntesis de JAs, tal y como se ha comentado anteriormente (ver apartado 6.1.2).

Los factores de transcripción de tipo WRKY constituyen una de las principales familias de factores de transcripción presentes exclusivamente en plantas y algas (Rushton et al., 2010). Aunque el papel de muchos de estos factores de transcripción se ha asociado a la respuesta al estrés biótico, muchos estudios han confirmado que desempeñan otros papeles adicionales relacionados con el control de la expresión génica durante desarrollo, en procesos como la formación de tricomas (Johnson et al., 2002), senescencia (Miao et al., 2004), germinación (Jiang y Yu, 2009) y el desarrollo de la raíz (Grunewald et al., 2012), y en la respuesta al estrés abiótico, concretamente, en procesos relacionados con la sequía o el frío (Rushton et al., 2010), demostrando que estas proteínas ejercen una gran cantidad de funciones reguladoras en plantas. En *Arabidopsis*, también se ha observado que los promotores de muchos de los genes nucleares que codifican proteínas cloroplásticas, como es el caso de *AtFAD7* y *AtFAD8*, presentan varias regiones reconocidas por factores de transcripción de tipo WRKY, y que estos son capaces interaccionar con los promotores de los genes que codifican las proteínas cloroplásticas LHCB2.4 y HEMA1 (Van Aken et al., 2013). Sin embargo, en *Arabidopsis* se han descrito más de 70 factores de transcripción de tipo WRKY, con funciones diversas y parcialmente redundantes (Rushton et al., 2010), dificultando la identificación de los factores de transcripción de tipo WRKY que participan en la regulación transcripcional de las ω 3 desaturasas plastidiales. No obstante, es importante destacar que tanto en el promotor de *AtFAD7* como en el de *AtFAD8*, el número de secuencias reguladoras de tipo WRKY (tres en cada gen) y su posición relativa muy cercana al ATG se encuentra conservada. Esto sugiere que la actividad de los factores de transcripción de tipo WRKY podría estar relacionada con

la síntesis de ácidos grasos trienoicos mediante la regulación de los genes que codifican las ω 3 desaturasas plastidiales, y que además, esta regulación ya estaba presente en el ancestro común antes de la duplicación de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8*.

5.1.4 Elementos reguladores en *cis* de tipo MYB regulan la expresión de las ω 3 desaturasas plastidiales en procesos relacionados con la herida y el JA

El análisis mediante PLACE y PLANTCARE de las secuencias de los promotores de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8* detectó, dos elementos reguladores en *cis* reconocidos por factores de transcripción de tipo MYB, tanto en el promotor *AtFAD7* como en el de *AtFAD8*. Sin embargo, a diferencia de las secuencias de unión a WRKY descritas anteriormente, los elementos reguladores reconocidos por factores de transcripción de tipo MYB se detectaron en la región distal respecto al ATG de estos promotores (ver Figura 4.1).

La eliminación de la región distal del promotor de *AtFAD7* comprendida entre -1682 y -703 pb que contenía las dos secuencias reconocidas por factores de transcripción de tipo MYB, no produjo una disminución drástica de la actividad GUS asociada al promotor en hojas, donde según el análisis cuantitativo la eliminación de esta región solo disminuía un 10% la actividad respecto al promotor íntegro de 1682 pb (ver Figuras 4.9 y 4.10). En el caso del promotor de *AtFAD8*, la eliminación de la región distal comprendida entre -2958 y -1912 pb que contenía las dos secuencias reconocidas por factores de transcripción de tipo MYB, tampoco produjo una disminución drástica de la actividad GUS asociada al promotor en hojas, conservando hasta un 78% de su actividad según el análisis cuantitativo (ver Figuras 4.17 y 4.18). Estos resultados indican que los factores de transcripción de tipo MYB no son fundamentales para el mantenimiento de la expresión basal de estos genes en hojas, función atribuida a los factores de transcripción de tipo WRKY, tal como se ha comentado anteriormente (ver apartado 5.1.3).

Sin embargo, la eliminación del fragmento distal de los promotores de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8* que contenían las dos secuencias diana reconocidas por factores de transcripción de tipo MYB, sí que afectó a la actividad GUS asociada al promotor tanto en flores como en raíces. En el caso del promotor de *AtFAD7*, la eliminación de este fragmento dio como resultado una pérdida completa de la actividad GUS detectada en la punta de la raíz, en el pistilo y en los estambres de la flor (ver

Figura 4.11). Lo mismo sucedió en el caso de *AtFAD8*, donde la eliminación de este fragmento de su promotor dio como resultado una pérdida completa de la actividad GUS detectada en el pistilo de la flor (ver Figura 4.19). Además, la eliminación de este fragmento provocaba la pérdida completa de la inducción por herida observada en el fragmento íntegro de 1682 pb del promotor de *AtFAD7* (ver Figura 4.14), y de la inducción por MeJA observada en el fragmento íntegro de 2958 pb del promotor de *AtFAD8* (ver Figura 4.27). De este modo, estos resultados indican que los factores de transcripción de tipo MYB podrían ser los responsables del perfil de expresión específico mostrado por las ω 3 desaturasas plastidiales en los tejidos no fotosintéticos, donde su función biológica estaría relacionada con la síntesis de JA (ver apartado 6.1.2), y con la intervención en las respectivas respuesta a herida y al JA de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8*.

Tradicionalmente, la regulación por la respuesta a herida y al JA se ha asociado con factores de transcripción de tipo MYC, siendo MYC2 el más conocido. MYC2 desempeña un papel central en varios de los procesos desencadenados por el JA, como por ejemplo la respuesta a la herida, patógenos o estrés oxidativo, la inhibición de la elongación de la raíz o la comunicación con las rutas de señalización de otras hormonas como el SA, el ABA o las auxinas (Lorenzo et al., 2004; Dombrecht et al., 2007; Wasternack y Hause, 2013). Otros factores de transcripción como MYC3 y MYC4 ejercen funciones redundantes respecto a MYC2 y ayudan a modular su actividad (Fernández-Calvo et al., 2011). Sin embargo, a la vista de los resultados obtenidos en esta Tesis doctoral, la regulación transcripcional de las ω 3 desaturasas plastidiales en los procesos vinculados con el JA o en la respuesta a herida no estaría mediada por proteínas de tipo MYC, sino por factores de transcripción de tipo MYB. El hecho de que los factores de transcripción de tipo MYB pertenezcan a una familia multigénica con funciones redundantes y compensatorias relacionadas con procesos de desarrollo o de respuesta a estrés biótico o abiótico, junto con el hecho de que sean capaces de asociarse con otros factores de transcripción o proteínas de señalización celular para modular su actividad (Dubos et al., 2010; Zhu, 2016), dificulta mucho la identificación de factores de transcripción específicos que regulen la expresión de *AtFAD7* y *AtFAD8*.

Un estudio transcriptómico realizado en *Arabidopsis* demostró que los factores de transcripción MYB21 y MYB24 intervenían en la formación de los estambres (Mandaokar et al., 2006). Además se ha observado observado que el doble mutante *myb21 myb24* presentaba esterilidad masculina, y que la sobreexpresión del factor de transcripción MYB21 era capaz de recuperar esta esterilidad en plantas *coi1*, insensibles al JA, aunque no se consiguió recuperar el control de la elongación de la raíz mediado por JA (Song et al., 2011). De este modo, MYB21 y MYB24 podrían ser posibles candidatos para regular los niveles de expresión de *AtFAD7* en flores, permitiendo la síntesis de JA

para el correcto desarrollo de las anteras, y el reconocimiento y maduración del polen. Sin embargo, no es fácil llevar a cabo una identificación precisa de la proteína o proteínas MYB a cargo del proceso.

Se han realizado diversos análisis transcriptómicos de genes sensibles a la herida y/o al JA en *Arabidopsis*, se han identificado varios factores de transcripción de tipo MYB que responden a estos estímulos, como por ejemplo MYB4, MYB15, MYB34, MYB44, MYB47 y MYB75 (Devoto et al., 2005; Taki et al., 2006). De entre estos candidatos, MYB44 interviene en la regulación de varios genes sensibles a herida y a patógenos mediante la modulación antagónica de las rutas metabólicas dependientes de JA y de SA. Además, se ha determinado que MYB44 es capaz de unirse a la secuencia CNGTTA del promotor del gen que codifica para el factor de transcripción WRKY70 (Shim et al., 2013). La secuencia complementaria reversa de dicha secuencia se encuentra en la región -927/-922 respecto al ATG del promotor de *AtFAD7* (ver apartado 4.1.1), por lo que se valoró a *AtMYB44* como posible candidato para la regulación de *AtFAD7* en respuesta a la herida. El análisis cuantitativo de la expresión génica en el mutante *myb44*, mostró una pérdida parcial de la inducción de *AtFAD7* provocada por la herida (ver Figura 4.15), lo que sin eliminar otras posibilidades, hace a este factor de transcripción un buen candidato para estudios futuros que necesariamente habrán de incluir un estudio de la respuesta a la herida del gen *FAD7* así como un análisis detallado de la composición de ácidos grasos de los lípidos de membrana.

5.1.5 El factor de transcripción ICE1 interviene en la regulación de la respuesta del gen *AtFAD8* a las bajas temperaturas

Diversos estudios genéticos, han establecido que el gen *AtFAD8* incrementa su expresión en respuesta a las bajas temperaturas tanto en *Arabidopsis* (Gibson et al., 1994; Shi et al., 2011; Roman et al., 2015) como en el resto de especies vegetales analizadas (Berberich et al., 1998 en maíz; Wang et al., 2006 en arroz; Martz et al., 2006 en abedul; Roman et al., 2012 en soja). De acuerdo con esto, en esta Tesis doctoral se ha observado un incremento de la actividad GUS asociada al promotor del gen *AtFAD8* en hojas tras la exposición a 6°C (ver Figura 4.20), lo que según datos de qPCR se tradujo en una inducción de alrededor de 2,5 veces respecto a los niveles de expresión a temperatura control (ver Figura 4.21).

El análisis mediante PLACE y PLANTCARE del promotor del gen *AtFAD8* identificó la presencia de dos elementos reguladores reconocidos por factores de transcripción de tipo MYC, que sin embargo, no estaban presentes en el promotor de *AtFAD7* (ver Figura 4.1). Los datos de actividad GUS asociados al promotor de *AtFAD8*, revelaron que el fragmento de 1912 pb, que contenía las dos secuencias de unión a factores de transcripción de tipo MYC, presentaba un incremento de la actividad GUS en respuesta a las bajas temperaturas similar al observado en el fragmento íntegro de 2958 pb del promotor. Sin embargo, al analizar la actividad GUS del fragmento de 643 pb, donde las dos secuencias de unión a factores de transcripción de tipo MYC no estaban presentes, se observó que el incremento de actividad GUS asociado al promotor de *AtFAD8* en respuesta a las bajas temperaturas era inapreciable (ver Figura 4.22). Estos resultados sugieren que elementos reguladores reconocidos por factores de transcripción de tipo MYC podrían ser los encargados de regular la respuesta al frío del gen *AtFAD8*.

Los factores de transcripción de tipo MYC reconocen la secuencia consenso CANNTG (Chinnusamy et al., 2003). En el caso del promotor de *AtFAD8*, existen dos secuencias CACATG en las regiones -1503/-1498 y -652/-647 respecto al ATG, las cuales se ha comprobado mediante estudios de interacción *in vitro*, que son reconocidas por el factor de transcripción ICE1 en el promotor del gen que codifica para el factor de transcripción CBF3 (Chinnusamy et al., 2003). De ese modo, se valoró a *AtICE1* como posible candidato para la regulación de *AtFAD8* en respuesta al frío. El análisis cuantitativo de los niveles de expresión de *AtFAD8* en el mutante *ice1-1* realizado en esta Tesis doctoral, reveló que la inducción de los niveles de expresión de *AtFAD8* en respuesta al frío quedaba completamente anulada en ausencia de este factor de transcripción (ver Figura 4.23). Este resultado indica que ICE1 interviene en la regulación de la respuesta de *AtFAD8* a las bajas temperaturas. Además, la presencia en su promotor de varios elementos de regulación reconocidos por factores de transcripción de tipo CBF/DREB (ver Figura 4.1) junto con el hecho de que el ABA no afecta a la expresión de *AtFAD8* (ver Figuras 4.25 y 4.26), apoyan este resultado.

ICE1 es un factor de transcripción inducible por frío que regula la expresión de diversos genes en la respuesta a las bajas temperaturas, como por ejemplo los genes que codifican las proteínas COR15a y RD29a, mediante la activación y la acción conjunta de factores de transcripción de tipo CBF/DREB en una ruta independiente de ABA (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005, 2006). La función de estas proteínas de estrés por frío está directamente relacionada con la estabilización y protección de las membranas contra el daño por congelación (Thomashow, 1999). ICE1 forma parte de una ruta de señalización bien caracterizada en la que también intervienen las proteínas HOS1 y MYB15 (Kim et al, 2013). HOS1 es una E3 ubiquitin ligasa inducible por frío encargada de atenuar

la respuesta a las bajas temperaturas mediante la degradación directa de ICE1 (Dong et al., 2006). MYB15 es un factor de transcripción inducible por frío que reprime la expresión del gen que codifica para el factor de transcripción CBF3, y cuya expresión se ve reprimida por ICE1 (Agarwal et al., 2006).

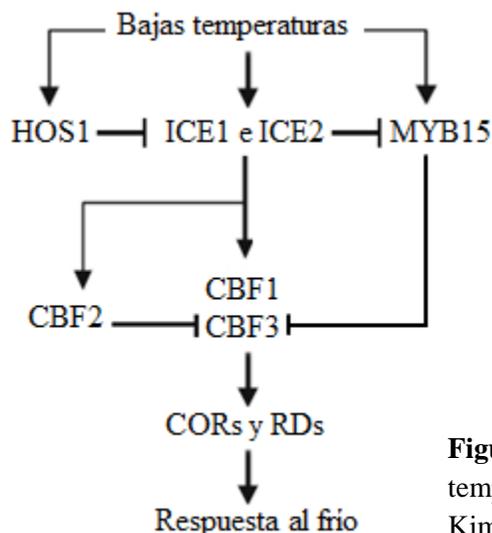


Figura 5.1 Ruta de señalización en respuesta a las bajas temperaturas mediada por ICE1. Figura adaptada a partir de Kim et al., 2013.

De este modo, FAD8 formaría parte de la misma ruta de respuesta al frío que COR15A y RD29A, ejerciendo un papel similar al de estas proteínas de estrés por frío en la estabilización de membranas. Se ha demostrado que FAD8 presenta especificidad por PG (Román et al., 2015). PG es el único fosfolípido presente en tilacoides (Joyard et al., 1998), y aunque no es un lípido de membrana mayoritario, se sabe que juega un papel fundamental en la formación de las membranas tilacoidales, el correcto ensamblaje y estabilización de los complejos fotosintéticos, y la adaptabilidad de las membranas al frío (Hagio et al., 2002; Sakamoto et al., 2004; Wada y Murata, 2007) (ver apartados 1.1.3.2 y 1.3.2.2).

5.1.6 Los genes *AtFAD7* y *AtFAD8* presentan una respuesta diferencial y coordinada a la herida y a las bajas temperaturas

Tanto los datos de tinción histoquímica y actividad GUS asociados al promotor, como el análisis cuantitativo de los niveles de expresión génica realizados en esta Tesis doctoral han confirmado que

el gen *AtFAD7* se induce en respuesta a la herida en *Arabidopsis* (ver Figuras 4.12 y 4.13). Resultados similares fueron obtenidos en soja analizando la expresión de los dos genes *GmFAD7* (Andreu et al., 2010). La respuesta herida de *AtFAD7* era independiente de JA, ya que tanto la actividad de su promotor, como sus niveles de expresión génica permanecían inalterados tras el tratamiento con esta hormona (ver Figuras Figuras 4.25 y 4.26). Por el contrario, los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que el gen *AtFAD8* era insensible a la herida (ver Figuras 4.12 y 4.13) pero se inducía en respuesta al JA (ver Figuras 4.25 y 4.26), mostrando el efecto contrario que *AtFAD7*.

El análisis transcriptómico de genes con expresión diferencial en respuesta a la herida y al jasmónico, ha demostrado que existe un grupo de genes que responden a la herida independientemente de jasmónico y, de manera similar, que presentan respuesta a jasmónico pero no responden a herida (Devoto et al., 2005; Taki et al., 2005). Sin embargo, hay que señalar que ni *AtFAD7* ni *AtFAD8* han sido identificados previamente en estudios transcriptómicos por su respuesta a herida o a jasmónico. Esto puede deberse a que en estos análisis transcriptómicos se utilizó la matriz ATH1 de affimetrix que incluye la sonda para el gen *AtFAD7* pero no la de *AtFAD8*. Además, en estos estudios sólo se consideraron genes que se inducían un mínimo de 3 veces tras el tratamiento con JA, mientras que los resultados de este trabajo indican que *AtFAD8* se induce entre 2 y 2,5 veces en presencia de JA (ver Figura 4.26). En cualquier caso, la inducción de *AtFAD8* en respuesta al JA es considerable, ya que prácticamente mimetiza la expresión de *AtFAD7* incluso en tejidos como la punta de la raíz, donde hasta el momento no se había detectado actividad del promotor de *AtFAD8*. Además, el análisis de la actividad GUS asociada a diferentes fragmentos del promotor de *AtFAD8*, permitió identificar los elementos reguladores encargados de la respuesta al JA. El fragmento de 1912 pb del promotor de *AtFAD8*, que no contenía las dos secuencias reconocidas por factores de transcripción de tipo MYB, no mostró el incremento de la actividad GUS en respuesta al JA observado con el fragmento íntegro de 2958 pb del promotor (ver Figura 4.27). Estos resultados sugieren que los elementos de regulación reconocidos por los MYBs podrían ser los encargados de la respuesta de *AtFAD8* al JA.

Por otro lado, tal como se ha comentado en el apartado 5.1.5, la respuesta del gen *AtFAD8* a las bajas temperaturas estaría mediada por el factor de transcripción ICE1, formando FAD8 parte de la misma ruta de respuesta al frío que las proteínas de estrés COR15A y RD29A. Es importante destacar que la respuesta a las bajas temperaturas mediada por ICE1 es independiente de ABA (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006). En concordancia con esto, los datos de actividad GUS asociados al promotor junto con el análisis cuantitativo de la expresión génica, indican que el ABA

no tiene ningún efecto en la actividad del promotor ni en los niveles de expresión de *AtFAD8* (ver Figuras 4.25 y 4.26). Sin embargo, se ha observado que el ABA provoca una fuerte represión en la actividad del promotor y de los niveles de expresión de *AtFAD7* (ver Figuras 4.25 y 4.26), lo que de nuevo muestra un comportamiento diferencial de ambos genes frente a las mismas señales ambientales u hormonales. Al igual que en el caso de los elementos MYB o ICE1, se intentó determinar qué elementos reguladores del promotor de *AtFAD7* intervenían en la regulación de la respuesta al ABA. Los elementos reguladores de tipo ABRE (del inglés, ABA Response Elements) son los elementos de respuesta a ABA más comunes, y se encuentran en los promotores de más del 50% de los genes inducibles por esta hormona (Wang et al., 2011). No obstante, el análisis bioinformático realizado en esta Tesis doctoral no detectó elementos ABREs en el promotor de *AtFAD7* (tampoco en el caso del promotor de *AtFAD8*). Este análisis sí que detectó las secuencias CAACTTG y GAAGTTG en las posiciones -278/-267 y -203/-197 respecto al ATG del promotor de *AtFAD7* (ver Figura 4.1). Se ha comprobado que estas secuencias se encuentran presentes en aproximadamente el 80% de los promotores de los genes reprimidos por ABA (Wang et al., 2011), como por ejemplo en los de los genes que codifican las proteínas KAT2 y MYB60, comúnmente usados como marcadores de la represión por ABA (Leonhardt et al., 2004; Kim et al., 2010). Además, estas secuencias no se detectaron en el promotor de *AtFAD8*, lo que concuerda con la insensibilidad de este gen al ABA.

La funcionalidad de las secuencias de represión por ABA fue confirmada mediante el análisis de la actividad GUS asociada a diferentes fragmentos del promotor de *AtFAD7*. El fragmento de 499 pb del promotor de *AtFAD7*, que contenía dichas secuencias, presentaba una represión de la actividad GUS en respuesta al ABA similar a la mostrada por el fragmento íntegro de 1682 pb, lo que indica que las dos secuencias de represión por ABA identificadas en la región proximal del promotor de *AtFAD7* son plenamente funcionales. El hecho de que estas secuencias se encuentren entre una secuencia TATA y el TSP apoyan su efecto represor de la actividad del promotor. Sin embargo, debido a la poca información disponible en las bases de datos respecto a estas secuencias, no ha sido posible determinar la naturaleza de los factores de transcripción que las reconocen. Por último, otra observación interesante es el hecho de que las bajas temperaturas también disminuyan la actividad del promotor y los niveles de expresión de *AtFAD7* (ver Figuras 4.20 y 4.21), lo que sugiere que este gen pueda ser sensible a las bajas temperaturas mediante una ruta dependiente de ABA.

El análisis funcional de los promotores de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8*, indica que las ω 3 desaturasas plastidiales responden de una manera diferencial y coordinada tanto al estrés biótico

(herida y JA) como abiótico (bajas temperaturas y ABA), volviendo a poner de manifiesto el papel no redundante de FAD7 y FAD8 ya identificado cuando se estudió la diferente especificidad de sustrato de ambas enzimas (Román et al., 2015). Los resultados obtenidos indican que estas rutas de señalización por estrés convergen en la regulación de las ω3 desaturasas plastidiales, lo que sugiere un posible alto grado de interacción y comunicación entre la respuesta a la herida, al frío y a las hormonas clave en la respuesta a ambas situaciones de estrés. A continuación, se muestra un modelo integrativo de la respuesta de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8*, así como de los diferentes elementos, identificados en este estudio, que pueden intervenir en el diálogo entre estas rutas de señalización.

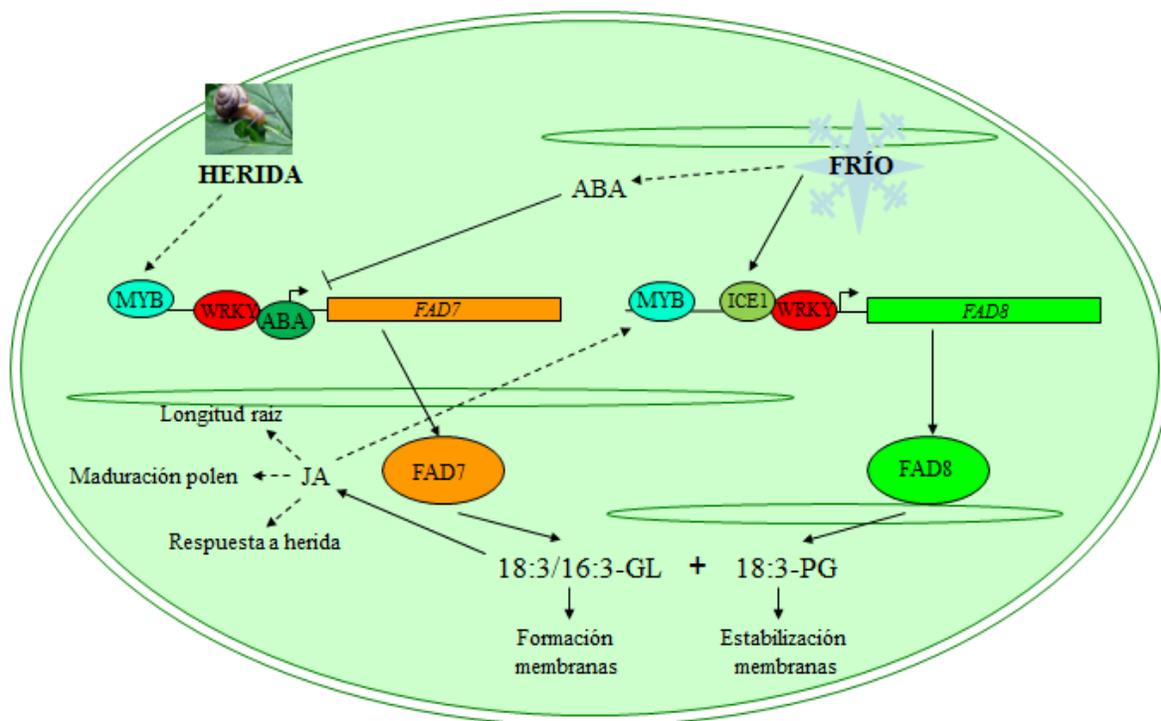


Figura 5.2 Modelo integrativo de regulación y coordinación transcripcional de los genes que codifican las ω3 desaturasas plastidiales en respuesta a la herida y a las bajas temperaturas.

De este modo, a raíz de los resultados obtenidos, se ha confirmado que *AtFAD7* es sensible a la herida mediante una ruta independiente de JA. Esto es coherente con el papel de los ácidos grasos trienoicos como precursores para la síntesis de los JAs (Vick et al., 1983), los cuales son compuestos claves en la respuesta de la planta a la herida (Lorenzo y Solano, 2005) (ver apartado 1.2.3). De este modo, la respuesta temprana a la herida se produciría localmente en la zona cercana

al estímulo y se centraría en la producción de ácidos grasos trienoicos asociados a galactolípidos mediante la inducción de *AtFAD7*, los cuales se utilizarían como sustrato para la síntesis de JAs. Posteriormente, el JA como principal hormona reguladora de la respuesta a herida, induciría la expresión de *AtFAD8*, cuya función podría ser contribuir a la síntesis de un reservorio extra de JAs mediante el aporte extra de los ácidos grasos trienoicos asociados al PG. Esta regulación transcripcional de la respuesta de las ω 3 desaturasas plastidiales al estrés biótico estaría mediada por factores de transcripción de tipo MYB. Por otro lado, las bajas temperaturas activarían una ruta de señalización independiente de ABA en la que intervendría el factor de transcripción ICE1, que conjuntamente con otros factores de transcripción de la familia CBF/DREB, inducirían la expresión de *AtFAD8*. Paralelamente, las bajas temperaturas también inducirían la producción de ABA, el cual mediante una ruta de señalización dependiente de esta hormona reprimiría la expresión de *AtFAD7*. El objetivo de la coordinación de las ω 3 desaturasas plastidiales en respuesta a las bajas temperaturas, posiblemente sea regular los niveles de ácidos grasos trienoicos en los lípidos de membrana más abundantes (MGDG y DGDG) sobre los que actúa principalmente FAD7. De este modo, se favorecería la actividad de FAD8, que actúa más específicamente sobre PG, el cual está directamente relacionado con el mantenimiento de la estabilidad de los complejos fotosintéticos.

La identificación en el futuro de los factores de transcripción específicos que reconozcan las regiones reguladoras en *cis* de los promotores, y su grado de interacción con otras rutas de señalización serán clave para comprender en su totalidad cómo se establece esta coordinación de la actividad ω 3 desaturasa en respuesta al estrés en plantas.

5.2 ESTUDIO DE LA ABUNDANCIA RELATIVA Y ORGANIZACIÓN EN LA MEMBRANA DE LAS ω 3 DESATURASAS PLASTIDIALES

Diversos trabajos han estudiado y correlacionado los cambios en la expresión de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8* con cambios en la composición de ácidos grasos en respuesta a diferentes factores ambientales (McConn et al., 1994; Falcone et al., 2004; Shi et al., 2011; Roman et al., 2015) o durante el desarrollo de la planta (Horiguchi et al., 1996, 1998; Lagunas et al., 2013). Sin embargo, el conocimiento de aspectos básicos para el análisis de la función de cualquier proteína, tales como su abundancia relativa y su distribución en los diferentes tejidos de la planta, sus parámetros enzimáticos o su distribución, organización y grado de interacción con otros miembros de su misma ruta metabólica son prácticamente desconocidos en el caso de las desaturasas, entre las que se incluyen las ω 3 desaturasas plastidiales FAD7 y FAD8. Varias son las razones que pueden explicar la ausencia de datos. En primer lugar, el alto grado de homología que hay entre FAD7 y FAD8 dificulta el diseño de anticuerpos específicos que permitan la detección inmunológica de estas proteínas. Del mismo modo, el alto grado de homología junto con su carácter hidrofóbico por tratarse de proteínas integrales de membrana, dificultan su purificación y análisis enzimático por métodos tradicionales.

Una alternativa a la ausencia de anticuerpos específicos que permitiesen diferenciar tanto FAD7 como FAD8 de forma específica, ha sido la utilización de plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresaban las proteínas quiméricas *AtFAD7-GFP* y *AtFAD8-GFP*, bajo control de sus promotores endógenos. De este modo, la detección de la fluorescencia o la utilización de anticuerpos contra la proteína GFP ha permitido detectar indirectamente a las ω 3 desaturasas plastidiales siguiendo una regulación genuina.

5.2.1 *AtFAD7* es la principal ω 3 desaturasa en *Arabidopsis*

El estudio de la abundancia relativa de las ω 3 desaturasas plastidiales mediante microscopía confocal e inmunodetección en plantas que expresaban las proteínas quiméricas, ha revelado que los niveles de proteína *AtFAD7* eran mucho más abundantes que los de *AtFAD8* tanto en hojas (ver Figuras 4.29 y 4.31) como en raíces (ver Figura 4.30). De hecho, los niveles de proteína *AtFAD8*

eran prácticamente indetectables, excepto en hojas cotiledóneas donde sí se pudo detectar señal fluorescente asociada a *AtFAD8*. Estos datos indican que *FAD7* es la $\omega 3$ desaturasa plastidial principal en *Arabidopsis*. Las diferencias en la abundancia relativa entre ambas proteínas podrían explicarse por la diferente afinidad de sustrato que presentan, en el caso de *FAD7* por galactolípidos, muy abundantes en el tejido fotosintético, y en el caso de *FAD8* por PG, un lípido minoritario en las membranas del cloroplasto. De igual modo, también se observó que los niveles de *AtFAD7* en hojas eran muy superiores a los niveles detectados en raíces (ver Figura 4.32). El contenido en ácidos grasos trienólicos de la raíz es menor que en la hoja, lo que sería consistente con una menor necesidad de actividad $\omega 3$ desaturasa y por tanto, un menor contenido en proteína *FAD7*.

La exposición a determinados estímulos ambientales también alteraba los niveles de abundancia relativa de *FAD7* y *FAD8*. Del mismo modo que lo observado anteriormente con la actividad de sus promotores y su expresión génica, los resultados de microscopía confocal permitieron observar que el ABA disminuía considerablemente los niveles de proteína *AtFAD7*, mientras que las bajas temperaturas incrementaban los niveles de *AtFAD8* (ver Figura 4.33). Estos resultados sugieren que la base del mecanismo que controla la respuesta de *AtFAD7* al ABA o en el caso de *FAD8* a las bajas temperaturas, es fundamentalmente transcripcional. Sin embargo no se puede descartar la existencia de puntos de control adicionales. Así, se ha demostrado que la proteína *AtFAD8* se desestabiliza y se degrada a temperaturas superiores a 30°C (Matsuda et al., 2005). Del mismo modo, en el caso de la $\omega 3$ desaturasa reticular *FAD3*, experimentos llevados a cabo en levaduras con la *FAD3* de *Arabidopsis* o de soja han demostrado que su estabilidad disminuye al incrementarse la temperatura, produciendo en consecuencia un descenso de su actividad (O'Quin et al., 2010; Román et al., 2012). En el caso de *FAD7*, en este momento no se tienen evidencias de alteraciones de su estabilidad en respuesta a la temperatura. No obstante, teniendo en cuenta la respuesta antagónica de la expresión del gen *AtFAD7* en respuesta a las bajas temperaturas respecto a *AtFAD8*, es posible especular que los cambios en la estabilidad frente a la temperatura, en caso de producirse, sean diferentes a los observados para *FAD8* o *FAD3*.

5.2.2 El estudio de la interacción entre las ω 3 y ω 6 desaturasas plastidiales sugiere la existencia de complejos cuaternarios

Uno de los objetivos principales abordados en esta Tesis doctoral, es el modo en que las ω 3 desaturasas plastidiales se organizan para llevar a cabo su función. Diversos estudios realizados en nuestro laboratorio mediante microscopía confocal con plantas sobreexpresoras han demostrado que FAD7 y FAD8 co-localizan en las envueltas del cloroplasto, mostrando también un patrón de co-localización claro con la ω 6 desaturasa plastidial FAD6 (Lagunas, Tesis Doctoral, 2013). Estos datos sugerían una posible interacción entre ellas. Para confirmar esta posible interacción entre las diversas desaturasas plastidiales, en esta Tesis doctoral se llevó a cabo un ensayo de complementación bimolecular BIFC en protoplastos de *Arabidopsis*. Los resultados obtenidos revelaron que la señal fluorescente se restablecía al co-transformar tanto a los protoplastos con las proteínas AtFAD7 y AtFAD8 con ellas mismas como con AtFAD6, respectivamente (ver Figura 4.34). Estos resultados sugieren que las ω 3 desaturasas plastidiales FAD7 y FAD8, serían capaces de formar heterodímeros con la ω 6 desaturasa plastidial FAD6 *in vivo*, e incluso homodímeros con ellas mismas. Sin embargo, no se obtuvo fluorescencia al co-transformar AtFAD7 con AtFAD8 (ver Figura 4.34), lo que indica que estas dos proteínas no interactúan entre sí pese a su co-localización, elevada homología y similar función biológica.

La existencia de complejos cuaternarios formados por las ω 3 y ω 6 desaturasas, es una hipótesis atractiva que podría explicar el alto grado de eficiencia de la reacción de desaturación para producir ácidos grasos trienoicos, siendo los intermediarios (18:2 o 16:2) mucho menos abundantes. Al tratarse de una reacción secuencial que transforma el 18:1 (o 16:1) en 18:3 (o 16:3), el menor nivel de 18:2 (o 16:2) sugiere una alta eficiencia de la reacción de desaturación que, entre otras razones podría explicarse por la existencia de estos complejos supramoleculares. Esta hipótesis podría ser consistente con el hecho de que tanto la ácido graso sintasa (FAS) y como la ácido graso elongasa (FAE), que respectivamente catalizan el conjunto de reacciones encargadas de la síntesis y elongación de los ácidos grasos, son complejos multiproteicos (Ohlrogge y Jaworski, 1997; Haslam y Kunst, 2013). Además, se sabe que FAB2, la única desaturasa soluble cuya estructura tridimensional y modelo catalítico se conocen, es capaz de formar homodímeros para llevar a cabo su función (Lindqvist et al., 1996).

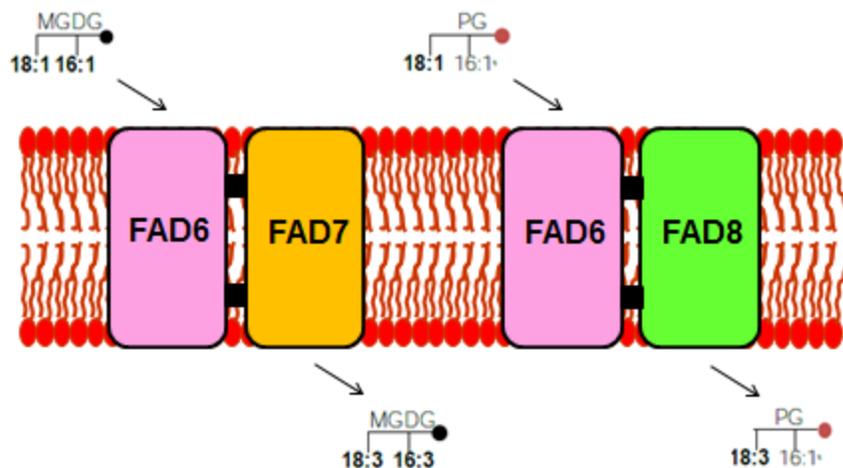


Figura 5.3 Modelo de organización propuesto para las ω 3 desaturasas plastidiales en las envueltas del cloroplasto.

Desgraciadamente, la técnica de BIFC se basa en la sobreexpresión de las proteínas co-transformadas, por lo que es imposible saber la naturaleza de estas interacciones y bajo qué condiciones se producen. Un estudio realizado en levaduras basado en el marcaje radioactivo de ácidos grasos, demostró que el complejo formado por las desaturasas reticulares *AtFAD2* y *AtFAD3* era funcional, al ser capaz de sintetizar una parte (aunque en una proporción menor de lo esperado) del 18:3 directamente a partir de 18:1 (Lou et al., 2014). La funcionalidad de los complejos proteicos *AtFAD6/AtFAD7* y *AtFAD6/AtFAD8* no ha sido demostrada todavía. Al tratarse de proteínas plastidiales no es posible analizar su actividad a través de su expresión heteróloga en levaduras, debido a las diferencias existentes entre las desaturasas plastidiales y reticulares en referencia al donador de electrones que interviene en la reacción de desaturación (ver apartado 1.3.1.2).

Aunque se ha confirmado que las ω 3 desaturasas plastidiales se localizan en el cloroplasto, su distribución y organización a lo largo de las membranas cloroplásticas es desconocida a día de hoy. Hasta el momento la localización de estas enzimas se limita a las envueltas del cloroplasto (Ferro et al., 2003; Froehlich et al., 2003; Román et al., 2015). En concordancia con esto, los resultados de microscopía confocal de este trabajo mostraron que la señal fluorescente asociada tanto a *AtFAD7* como a *AtFAD8* se detectaba en la superficie del cloroplasto (ver Figura 4.29), lo cual es compatible con la localización en las envueltas de estas proteínas. La gran mayoría del producto de desaturación de estas enzimas, los ácidos grasos 16:3 y 18:3, se localiza en los tilacoides, donde los lípidos MGDG, DGDG, SQDG y PG son muy abundantes. De este modo, probablemente sean

necesarios procesos de transporte lipídico entre las envueltas y los tilacoides del cloroplasto. Algunas evidencias sugieren que este transporte podría llevarse a cabo mediante vesículas durante la generación de los tilacoides (Morre et al., 2001; Benning, 2009), de las cuales las más caracterizadas son las que involucran a la proteína VIPP1 (Kroll et al., 2001) (ver apartado 1.2.2.3). Otra hipótesis, aunque no demostrada todavía, sería la existencia de puntos de contacto entre la envuelta interna y la membrana tilacoidal en los polos del cloroplasto, tal como suele observarse en las imágenes de microscopía electrónica de cloroplastos. Sin embargo, no es descartable que las ω 3 desaturasas plastiales también puedan localizarse en las membranas tilacoidales, lo que sería comprobable mediante técnicas de inmunodetección por microscopía electrónica, ya que el microscopio confocal carece de tanta resolución.

Otro interrogante acerca de estos complejos proteicos de tipo desaturasa, es si estos se distribuyen homogéneamente o bien, se concentran en dominios especializados de las envueltas cloroplásticas. Aunque la resolución del microscopio confocal no permite extraer conclusiones definitivas, se ha podido observar que el patrón de distribución en las envueltas de la ω 3 desaturasa plastidial *AtFAD7* está estrechamente relacionado con el estadio de desarrollo de los cloroplastos. En cloroplastos jóvenes, es decir, en proceso de crecimiento y maduración, esta proteína no se distribuye homogéneamente a lo largo de las envueltas, sino que se acumula en regiones concretas llamadas *foci*. Sin embargo, cuando los cloroplastos son maduros, *AtFAD7* presenta una distribución más homogénea en forma de halo o tonel a lo largo de las envueltas, aunque todavía pueden detectarse regiones con mayor acumulación de proteína (ver Figura 4.29). El patrón de distribución en *foci*, es compartido por otras proteínas cloroplásticas que intervienen en los procesos de división y desarrollo de estos orgánulos (Haswell y Meyerowitz, 2006; Ruppel et al., 2011; Yang et al., 2011), de modo que las ω 3 desaturasas plastidiales también podrían intervenir en estos procesos.

En resumen, los datos de localización, distribución y organización sugieren la existencia de complejos proteicos encargados de la desaturación en cadena de los lípidos de membrana. Estos complejos podrían tener un papel determinante durante el crecimiento y maduración de los cloroplastos, etapa en la que se forman gran parte de las membranas plastidiales.

6. CONCLUSIONES

- 6.1** La obtención de líneas transgénicas de *Arabidopsis* que expresaban el gen testigo GUS bajo el control de los promotores de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8*, junto con el análisis cuantitativo de la expresión génica (qPCR), han permitido la realización de un análisis funcional de los promotores de ambos genes, confirmando el papel no redundante y especializado ejercido por las dos $\omega 3$ desaturasas plastidiales, *AtFAD7* y *AtFAD8*. Así, en las hojas, se detectó actividad GUS asociada a los promotores de ambos genes. Sin embargo, la expresión de *AtFAD7* es mucho más abundante que la de *AtFAD8*. Esto podría estar directamente relacionado con la mayor especificidad de FAD7 por los galactolípidos MGDG y DGDG, que son los lípidos mayoritarios de las membranas del cloroplasto, mientras que FAD8 presenta una mayor afinidad por lípidos minoritarios como PG.
- 6.2** Se ha detectado expresión de los genes *AtFAD7* y *AtFAD8* en tejidos no fotosintéticos, concretamente en raíces y en flores. Los bajos niveles de ácidos grasos trienoicos en estos tejidos, junto con el patrón de expresión específico de *AtFAD7* en la punta de la raíz y en los tejidos reproductivos de la flor, podrían estar relacionados con el papel de los ácidos grasos trienoicos como precursores de la biosíntesis de JAs y con el papel que esta hormona ejerce tanto en el control de la elongación y desarrollo de la raíz como en la maduración del polen.
- 6.3** Se ha comprobado que los genes *AtFAD7* y *AtFAD8* presentan una respuesta diferencial a determinados estímulos ambientales (luz, herida y temperatura) y a hormonas (ABA y JA). Mientras que *AtFAD7* se induce por luz y herida (sin efecto sobre *AtFAD8*), la expresión de *AtFAD8* se incrementa tras la exposición a bajas temperaturas (con un descenso de la expresión de *AtFAD7*). Este análisis se ha completado con un estudio de hormonas, el cual ha revelado que el ABA es un fuerte represor de la expresión de *AtFAD7*, mientras que el JA induce la expresión de *AtFAD8*.
- 6.4** El análisis funcional de los promotores *AtFAD7* y *AtFAD8* mediante el estudio de su actividad en diversos fragmentos deleccionados, ha permitido identificar diversos elementos de regulación en *cis* funcionales que son compatibles con los patrones de expresión de *AtFAD7* y *AtFAD8* observados con anterioridad. Concretamente, se han identificado tres elementos de regulación reconocidos por factores de transcripción de tipo WRKY tanto en el promotor de

AtFAD7 como en el de *AtFAD8* involucrados en el mantenimiento de los niveles de expresión basal en hojas, especialmente en el caso de *AtFAD7*. Además se ha podido comprobar que existe un elevado grado de coordinación en la regulación transcripcional de *AtFAD7* y *AtFAD8* en procesos tales como la respuesta a herida o a las bajas temperaturas. En el promotor de *AtFAD7*, se han identificado dos elementos de regulación de unión a MYBs implicados en la regulación de la respuesta a herida y a procesos relacionados con la síntesis de JAs en raíces y flores. También se han identificado dos elementos de represión por ABA en este promotor. En el promotor de *AtFAD8*, se han identificado dos elementos de regulación de tipo MYC implicados en la inducción de *AtFAD8* en frío y que son reconocidos el factor de transcripción ICE1. El análisis de la expresión de *AtFAD8* en el mutante *ice1-1* indica que la respuesta a las bajas temperaturas de este gen está mediada por ICE1 en un proceso independiente de ABA. También se han identificado en este promotor dos elementos de regulación de unión a MYBs implicados en la inducción por JA. Estos datos sugieren que *AtFAD8* formaría parte del grupo de proteínas que se expresan en respuesta al estrés por frío con el objetivo de estabilizar proteínas clave para el metabolismo celular vegetal.

- 6.5** Los resultados de detección inmunológica, así como de microscopía confocal en líneas transgénicas que expresaban las proteínas quiméricas *AtFAD7-GFP* y *AtFAD8-GFP* bajo control de sus respectivos promotores, indican que la abundancia relativa de la proteína *AtFAD7* es muy superior a la de *AtFAD8*, tanto en hojas como en raíces. Además, se detectó una reducción considerable de los niveles de la proteína *AtFAD7* en presencia de ABA y un incremento de la abundancia de la proteína *AtFAD8* en frío. De este modo, se observa una correlación entre la acumulación de proteína y la expresión génica de las $\omega 3$ desaturasas plastidiales, lo que sugiere la existencia de mecanismos de control transcripcional en la base de la regulación del contenido de ácidos grasos trienólicos en plantas.
- 6.6** El estudio de interacción mediante BIFC sugiere que las $\omega 3$ desaturasas plastidiales *AtFAD7* y *AtFAD8* serían capaces de formar heterodímeros con la $\omega 6$ desaturasa plastidial *AtFAD6* *in vivo*. Asimismo también se detectaron homodímeros *AtFAD7/AtFAD7* y *AtFAD8/AtFAD8*. Sin embargo, no se detectó interacción entre *AtFAD7* y *AtFAD8*. Estos resultados sugieren que las desaturasas plastidiales se organizarían en la membrana a través de la formación de complejos

supramoleculares o cuaternarios que podrían explicar la elevada eficiencia de la desaturación secuencial de los ácidos grasos constituyentes de los lípidos de membrana.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, I. F. y Farmer, E. E.** (2010). Jasmonates. The American Society of Plant Biologists.
- Agarwal, M., Hao, Y., Kapoor, A., Dong, C. H., Fujii, H., Zheng, X. y Zhu, J. K.** (2006). A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. *J Biol Chem*, 281(49), 37636-37645.
- 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(4), 573-582.
- Andersson M. X. y Dormann, P.** (2008). Chloroplast membrane lipid biosynthesis and transport. Sandelius A. y Aronsson H. The Chloroplast: Interactions with the Environment. Berlin: Springer. 125-159.
- Andersson, M. X., Goksoy, M. y Sandelius, A. S.** (2007). Optical manipulation reveals strong attracting forces at membrane contact sites between endoplasmic reticulum and chloroplasts. *J Biol Chem*, 282(2), 1170-1174.
- Andersson, M. X., Stridh, M. H., Larsson, K. E., Liljenberg, C. y Sandelius, A. S.** (2003). Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *FEBS Lett*, 537(1-3), 128-132.
- 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 enzyme involved in desaturase activity. *J Exp Bot*, 61(12), 3371-3384.
- Andrews, J. y Mudd, J. B.** (1985). Phosphatidylglycerol synthesis in pea chloroplasts: pathway and localization. *Plant Physiol*, 79(1), 259-265.
- Aronsson, V. V., Vergnolle, C., Cantrel, C. y Kader, J.** (2000). Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in Arabidopsis thaliana. *Plant Sci*, 157(1), 1-12.
- Awai, K., Marechal, E., Block, M. A., Brun, D., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, K., Ohta, H. y Joyard, J.** (2001). Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(19), 10960-10965.
- Babychuk, E., Muller, F., Eubel, H., Braun, H. P., Frentzen, M. y Kushnir, S.** (2003). Arabidopsis phosphatidylglycerophosphate synthase 1 is essential for chloroplast differentiation, but is dispensable for mitochondrial function. *Plant J*, 33(5), 899-909.
- Baud, S. y Graham, I. A.** (2006). A spatiotemporal analysis of enzymatic activities associated with carbon metabolism in wild-type and mutant embryos of Arabidopsis using in situ histochemistry. *Plant J*, 46(1), 155-169.
- Baud, S., Mendoza, M. S., To, A., Harscoet, E., Lepiniec, L. y Dubreucq, B.** (2007). WRINKLED1 specifies the regulatory action of LEAFY COTYLEDON2 towards fatty acid metabolism during seed maturation in Arabidopsis. *Plant J*, 50(5), 825-838.

- Baud, S., Wuillemé, S., To, A., Rochat, C. y Lepiniec, L.** (2009). Role of WRINKLED1 in the transcriptional regulation of glycolytic and fatty acid biosynthetic genes in Arabidopsis. *Plant J*, 60(6), 933-947.
- Beaudoin, F., Wu, X., Li, F., Haslam, R. P., Markham, J. E., Zheng, H., Napier, J. A. y Kunst, L.** (2009). Functional characterization of the Arabidopsis beta-ketoacyl-coenzyme A reductase candidates of the fatty acid elongase. *Plant Physiol*, 150(3), 1174-1191.
- Behrouzian, B. y Buist, P. H.** (2002). Fatty acid desaturation: variations on an oxidative theme. *Curr Opin Chem Biol*, 6(5), 577-582.
- Benga, G. y Holmes, R. P.** (1984). Interactions between components in biological membranes and their implications for membrane function. *Prog Biophys Mol Biol*, 43(3), 195-257.
- Benning, C.** (2008). A role for lipid trafficking in chloroplast biogenesis. *Prog Lipid Res*, 47(5), 381-389.
- Benning, C.** (2009). Mechanisms of lipid transport involved in organelle biogenesis in plant cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 25, 71-91.
- Benning, C. y Ohta, H.** (2005). Three enzyme systems for galactoglycerolipid biosynthesis are coordinately regulated in plants. *J Biol Chem*, 280(4), 2397-2400.
- Berberich, T., Harada, M., Sugawara, K., Kodama, H., Iba, K. y Kusano, T.** (1998). Two maize genes encoding omega-3 fatty acid desaturase and their differential expression to temperature. *Plant Mol Biol*, 36(2), 297-306.
- Bertani, G.** (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli. *J Bacteriol*, 62(3), 293-300.
- Bessoule, J. J., Testet, E. y Cassagne, C.** (1995). Synthesis of phosphatidylcholine in the chloroplast envelope after import of lysophosphatidylcholine from endoplasmic reticulum membranes. *Eur J Biochem*, 228(2), 490-497.
- 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(5), 1833-1838.
- 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 chloroplasts. II. Biochemical characterization. *J Biol Chem*, 258(21), 13281-13286.
- Bonaventure, G., Salas, J. J., Pollard, M. R. y Ohlrogge, J. B.** (2003). Disruption of the FATB gene in Arabidopsis demonstrates an essential role of saturated fatty acids in plant growth. *Plant Cell*, 15(4), 1020-1033.
- Bracha-Drori, K., Shichrur, K., Katz, A., Oliva, M., Angelovici, R., Yalovsky, S. y Ohad, N.** (2004). Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J*, 40(3), 419-427.

- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Brown, A. P., Affleck, V., Fawcett, T. y Slabas, A. R.** (2006). Tandem affinity purification tagging of fatty acid biosynthetic enzymes in *Synechocystis* sp. PCC6803 and *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, 57(7), 1563-1571.
- Browse, J., Kunst, L., Anderson, S., Hugly, S. y Somerville, C.** (1989). A mutant of *Arabidopsis* deficient in the chloroplast 16:1/18:1 desaturase. *Plant Physiol*, 90(2), 522-529.
- Browse, J., McCourt, P. y Somerville, C.** (1986a). A mutant of *Arabidopsis* deficient in c(18:3) and c(16:3) leaf lipids. *Plant Physiol*, 81(3), 859-864.
- Browse, J. y Somerville, C.R.** (1994). Glycerolipids. Meyerowitz E. M. y Somerville C. R. *Arabidopsis*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 881-936.
- Browse, J., Warwick, N., Somerville, C. R. y Slack, C. R.** (1986b). Fluxes through the prokaryotic and eukaryotic pathways of lipid synthesis in the '16:3' plant *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J*, 235(1), 25-31.
- Caiveau, O., Fortune, D., Cantrel, C., Zachowski, A. y Moreau, F.** (2001). Consequences of omega -6-oleate desaturase deficiency on lipid dynamics and functional properties of mitochondrial membranes of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 276(8), 5788-5794.
- Carvalho, A., Teodoro, C. E., Da Cunha, M., Okorokova-Façanha, A. L., Okorokov, L. A., Fernandes, K. V. S. y Gomes, V. M.** (2004). Intracellular localization of a lipid transfer protein in *Vigna unguiculata* seeds. *Physiologia Plantarum*, 122(3), 328-336.
- Cernac, A. y Benning, C.** (2004). WRINKLED1 encodes an AP2/EREB domain protein involved in the control of storage compound biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J*, 40(4), 575-585.
- Chapman, D.** (1975). Fluidity and phase transitions of cell membranes. *Biomembranes*, 7, 1-9.
- Chaturvedi, R., Krothapalli, K., Makandar, R., Nandi, A., Sparks, A. A., Roth, M. R., Welti, R. y Shah, J.** (2008). Plastid omega3-fatty acid desaturase-dependent accumulation of a systemic acquired resistance inducing activity in petiole exudates of *Arabidopsis thaliana* is independent of jasmonic acid. *Plant J*, 54(1), 106-117.
- 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 Dev*, 17(8), 1043-1054.
- Chomczynski, P. y Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1), 156-159.
- Clark, J. M.** (1988). Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*, 16(20), 9677-9686.
- Clough, S. J. y Bent, A. F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 16(6), 735-743.

- 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 Lett*, 580(20), 4934-4940.
- Coulon, D., Faure, L., Salmon, M., Wattlelet, V. y Bessoule, J. J.** (2012). Occurrence, biosynthesis and functions of N-acylphosphatidylethanolamines (NAPE): not just precursors of N-acylethanolamines (NAE). *Biochimie*, 94(1), 75-85.
- Curtis, M. D. y Grossniklaus, U.** (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol*, 133(2), 462-469.
- Debono, A., Yeats, T. H., Rose, J. K., Bird, D., Jetter, R., Kunst, L. y Samuels, L.** (2009). Arabidopsis LTPG is a glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein required for export of lipids to the plant surface. *Plant Cell*, 21(4), 1230-1238.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J. F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J. M. y Gascuel, O.** (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res*, 36(Web Server issue), 465-469.
- Devoto, A. y Turner, J. G.** (2003). Regulation of jasmonate-mediated plant responses in arabidopsis. *Ann Bot*, 92(3), 329-337.
- Diz, M. S., Carvalho, A. O., Ribeiro, S. F., Da Cunha, M., Beltramini, L., Rodrigues, R., Nascimento, V. V., Machado, O. L. y Gomes, V. M.** (2011). Characterisation, immunolocalisation and antifungal activity of a lipid transfer protein from chili pepper (*Capsicum annuum*) seeds with novel alpha-amylase inhibitory properties. *Physiol Plant*, 142(3), 233-246.
- Dombrecht, B., Xue, G. P., Sprague, S. J., Kirkegaard, J. A., Ross, J. J., Reid, J. B., Fitt, G. P., Sewelam, N., Schenk, P. M., Manners, J. M. y Kazan, K.** (2007). MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in Arabidopsis. *Plant Cell*, 19(7), 2225-2245.
- Dong, C. H., Agarwal, M., Zhang, Y., Xie, Q. y Zhu, J. K.** (2006). The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(21), 8281-8286.
- Dormann P.** (2005). Membrane Lipids. Murphy D. J. *Plant Lipids – Biology, Utilization and Manipulation*. Blackwell Publishing. 123-163.
- Dormann, P. y Benning, C.** (2002). Galactolipids rule in seed plants. *Trends Plant Sci*, 7(3), 112-118.
- Dormann, P., Hoffmann-Benning, S., Balbo, I. y Benning, C.** (1995). Isolation and characterization of an Arabidopsis mutant deficient in the thylakoid lipid digalactosyl diacylglycerol. *Plant Cell*, 7(11), 1801-1810.
- Doyle, J. J. y Doyle, J. L.** (1990). Isolation of fresh DNA from fresh tissue. *Focus*(12), 13-15.

- Dubacq, J.P. y Tremolieres, A.** (1983). Occurrence and function of phosphatidylglycerol containing delta 3-trans-hexadecenoic acid in photosynthetic lamellae. *Physiologie Vegetale*, 21(2), 293-312.
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C. y Lepiniec, L.** (2010). MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci*, 15(10), 573-581.
- Dunn, T. M., Lynch, D. V., Michaelson, L. V. y Napier, J. A.** (2004). A post-genomic approach to understanding sphingolipid metabolism in Arabidopsis thaliana. *Ann Bot*, 93(5), 483-497.
- Dyer, J. M. y Mullen, R. T.** (2001). Immunocytological localization of two plant fatty acid desaturases in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett*, 494(1-2), 44-47.
- Ellinger, D., Stingl, N., Kubigsteltig, H., Bals, T., Juenger, M., Pollmann, S., Berger, S., Schuenemann, D. y Mueller, M. J.** (2010). DONGLE and DEFECTIVE IN ANTHHER DEHISCENCE1 lipases are not essential for wound- and pathogen-induced jasmonate biosynthesis: redundant lipases contribute to jasmonate formation. *Plant Physiol*, 153(1), 114-127.
- Essigmann, B., Guler, S., Narang, R. A., Linke, D. y Benning, C.** (1998). Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of SQD1, a gene required for sulfolipid biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(4), 1950-1955.
- Falcone, D. L., Ogas, J. P. y Somerville, C. R.** (2004). Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of Arabidopsis with alterations in membrane lipid composition. *BMC Plant Biol*, 4, 17.
- Fan, J. y Zhai, Z.** (2015). Arabidopsis TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL5 Interacts with TGD1, TGD2, and TGD4 to Facilitate Lipid Transfer from the Endoplasmic Reticulum to Plastids. 27(10), 2941-2955.
- Farmer, E. E., Almeras, E. y Krishnamurthy, V.** (2003). Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr Opin Plant Biol*, 6(4), 372-378.
- Fawcett, T., Simon, W. J., Swinhoe, R., Shanklin, J., Nishida, I., Christie, W. W. y Slabas, A. R.** (1994). Expression of mRNA and steady-state levels of protein isoforms of enoyl-ACP reductase from Brassica napus. *Plant Mol Biol*, 26(1), 155-163.
- Fernandez-Calvo, P., Chini, A., Fernandez-Barbero, G., Chico, J. M., Gimenez-Ibanez, S., Geerinck, J., Eeckhout, D., Schweizer, F., Godoy, M., Franco-Zorrilla, J. M., Pauwels, L., Witters, E., Puga, M. I., Paz-Ares, J., Goossens, A., Reymond, P., De Jaeger, G. y Solano, R.** (2011). The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell*, 23(2), 701-715.
- Ferro, M., Salvi, D., Brugiére, S., Miras, S., Kowalski, S., Louwagie, M., Garin, J., Joyard, J. y Rolland, N.** (2003). Proteomics of the chloroplast envelope membranes from Arabidopsis thaliana. *Mol Cell Proteomics*, 2(5), 325-345.

- Feussner, I. y Wasternack, C.** (2002). The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol*, 53, 275-297.
- Focks, N. y Benning, C.** (1998). wrinkled1: A novel, low-seed-oil mutant of Arabidopsis with a deficiency in the seed-specific regulation of carbohydrate metabolism. *Plant Physiol*, 118(1), 91-101.
- Frentzen, M.** (2004). Phosphatidylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol: anionic membrane lipids and phosphate regulation. *Curr Opin Plant Biol*, 7(3), 270-276.
- Froehlich, J. E., Benning, C. y Dormann, P.** (2001). The digalactosyldiacylglycerol (DGDG) synthase DGD1 is inserted into the outer envelope membrane of chloroplasts in a manner independent of the general import pathway and does not depend on direct interaction with monogalactosyldiacylglycerol synthase for DGDG biosynthesis. *J Biol Chem*, 276(34), 31806-31812.
- 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. *J Proteome Res*, 2(4), 413-425.
- 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 Physiol*, 106(4), 1615-1621.
- Gietz R. D. y Woods R. A.** (1994). High-efficiency transformation in yeast: practical approaches. Johnson J. A. Oxford University Press. 121-134.
- Grunewald, W., De Smet, I., Lewis, D. R., Lofke, C., Jansen, L., Goeminne, G., Vanden Bossche, R., Karimi, M., De Rybel, B., Vanholme, B., Teichmann, T., Boerjan, W., Van Montagu, M. C., Gheysen, G., Muday, G. K., Friml, J. y Beeckman, T.** (2012). Transcription factor WRKY23 assists auxin distribution patterns during Arabidopsis root development through local control on flavonol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(5), 1554-1559.
- Guschina, I. A. y Harwood, J. L.** (2006). Mechanisms of temperature adaptation in poikilotherms. *FEBS Lett*, 580(23), 5477-5483.
- Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A. y Saenger, W.** (2009). Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nat Struct Mol Biol*, 16(3), 334-342.
- Hagio, M., Sakurai, I., Sato, S., Kato, T., Tabata, S. y Wada, H.** (2002). Phosphatidylglycerol is essential for the development of thylakoid membranes in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol*, 43(12), 1456-1464.
- Hamada, T., Nishiuchi, T., Kodama, H., Nishimura, M. e Iba, K.** (1996). cDNA cloning of a wounding-inducible gene encoding a plastid omega-3 fatty acid desaturase from tobacco. *Plant Cell Physiol*, 37(5), 606-611.

- Hartley, J. L., Temple, G. F. y Brasch, M. A.** (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res*, 10(11), 1788-1795.
- Haslam, T. M. y Kunst, L.** (2013). Extending the story of very-long-chain fatty acid elongation. *Plant Sci*, 210, 93-107.
- Haswell, E. S. y Meyerowitz, E. M.** (2006). MscS-like proteins control plastid size and shape in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol*, 16(1), 1-11.
- Heilmann, I., Mekhedov, S., King, B., Browse, J. y Shanklin, J.** (2004). Identification of the *Arabidopsis* palmitoyl-monogalactosyldiacylglycerol delta7-desaturase gene FAD5, and effects of plastidial retargeting of *Arabidopsis* desaturases on the fad5 mutant phenotype. *Plant Physiol*, 136(4), 4237-4245.
- Heinz, E. y Roughan, P. G.** (1983). Similarities and differences in lipid metabolism of chloroplasts isolated from 18:3 and 16:3 plants. *Plant Physiol*, 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 Physiol*, 110(1), 311-319.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M. y Korenaga, T.** (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Res*, 27(1), 297-300.
- Hobe, S., Prytulla, S., Kuhlbrandt, W. y Paulsen, H.** (1994). Trimerization and crystallization of reconstituted light-harvesting chlorophyll a/b complex. *Embo j*, 13(15), 3423-3429.
- Horiguchi, G., Fuse, T., Kawakami, N., Kodama, H. e Iba, K.** (2000). Temperature-dependent translational regulation of the ER omega-3 fatty acid desaturase gene in wheat root tips. *Plant J*, 24(6), 805-813.
- Horiguchi, G., Kawakami, N., Kusumi, K., Kodama, H. e Iba, K.** (1998). Developmental Regulation of Genes for Microsome and Plastid ω -3 Fatty Acid Desaturases in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant and Cell Physiology*, 39(5), 540-544.
- Horiguchi, G., Kodama, H., Nishimura, M. e Iba, K.** (1996). Role of omega-3 fatty acid desaturases in the regulation of the level of trienoic fatty acids during leaf cell maturation. *Planta*, 199(3), 439-442.
- Hugly, S., Kunst, L., Browse, J. y Somerville, C.** (1989). Enhanced thermal tolerance of photosynthesis and altered chloroplast ultrastructure in a mutant of *Arabidopsis* deficient in lipid desaturation. *Plant Physiol*, 90(3), 1134-1142.
- Hurlock, A. K., Roston, R. L., Wang, K. y Benning, C.** (2014). Lipid trafficking in plant cells. *Traffic*, 15(9), 915-932.
- Iba, K.** (2002). Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annu Rev Plant Biol*, 53, 225-245.

- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I. y Okada, K.** (2001). The DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis. *Plant Cell*, 13(10), 2191-2209.
- Jarvis, P., Dormann, P., Peto, C. A., Lutes, J., Benning, C. y Chory, J.** (2000). Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the Arabidopsis MGD synthase 1 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(14), 8175-8179.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. y Bevan, M. W.** (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *Embo j*, 6(13), 3901-3907.
- Jia, L., Clegg, M. T. y Jiang, T.** (2004). Evolutionary dynamics of the DNA-binding domains in putative R2R3-MYB genes identified from rice subspecies indica and japonica genomes. *Plant Physiol*, 134(2), 575-585.
- Jiang, W. y Yu, D.** (2009). Arabidopsis WRKY2 transcription factor mediates seed germination and postgermination arrest of development by abscisic acid. *BMC Plant Biol*, 9, 96.
- Johnson, C. S., Kolevski, B. y Smyth, D. R.** (2002). TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a trichome and seed coat development gene of Arabidopsis, encodes a WRKY transcription factor. *Plant Cell*, 14(6), 1359-1375.
- Johnston, M. L., Luethy, M. H., Miernyk, J. A. y Randall, D. D.** (1997). Cloning and molecular analyses of the Arabidopsis thaliana plastid pyruvate dehydrogenase subunits. *Biochim Biophys Acta*, 1321(3), 200-206.
- Jones, M. R.** (2007). Lipids in photosynthetic reaction centres: structural roles and functional holes. *Prog Lipid Res*, 46(1), 56-87.
- Jouhet, J., Marechal, E., Baldan, B., Bligny, R., Joyard, J. y Block, M. A.** (2004). Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *J Cell Biol*, 167(5), 863-874.
- Joyard, J., Teyssier, E., Miege, C., Berny-Seigneurin, D., Marechal, E., Block, M. A., Dorne, A. J., Rolland, N., Ajlani, G. y Douce, R.** (1998). The biochemical machinery of plastid envelope membranes. *Plant Physiol*, 118(3), 715-723.
- Kalisch, B., Dormann, P. y Holzl, G.** (2016). DGDG and Glycolipids in Plants and Algae. *Subcell Biochem*, 86, 51-83.
- Kargiotidou, A., Deli, D., Galanopoulou, D., Tsiftaris, A. y Farmaki, T.** (2008). Low temperature and light regulate delta 12 fatty acid desaturases (FAD2) at a transcriptional level in cotton (*Gossypium hirsutum*). *J Exp Bot*, 59(8), 2043-2056.
- Kazachkov, M., Chen, Q., Wang, L. y Zou, J.** (2008). Substrate preferences of a lysophosphatidylcholine acyltransferase highlight its role in phospholipid remodeling. *Lipids*, 43(10), 895-902.

- Kearns, E. V., Hugly, S. y Somerville, C. R.** (1991). The role of cytochrome b5 in delta 12 desaturation of oleic acid by microsomes of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Arch Biochem Biophys*, 284(2), 431-436.
- Kern, J. y Guskov, A.** (2011). Lipids in photosystem II: multifunctional cofactors. *J Photochem Photobiol B*, 104(1-2), 19-34.
- Kilaru, A., Blancaflor, E. B., Venables, B. J., Tripathy, S., Mysore, K. S. y Chapman, K. D.** (2007). The N-acyl ethanolamine-mediated regulatory pathway in plants. *Chem Biodivers*, 4(8), 1933-1955.
- Kim, H. U. y Huang, A. H.** (2004). Plastid lysophosphatidyl acyltransferase is essential for embryo development in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 134(3), 1206-1216.
- Kim, S., Yamaoka, Y., Ono, H., Kim, H., Shim, D., Maeshima, M., Martinoia, E., Cahoon, E. B., Nishida, I. y Lee, Y.** (2013). AtABCA9 transporter supplies fatty acids for lipid synthesis to the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(2), 773-778.
- Kim, T. H., Bohmer, M., Hu, H., Nishimura, N. y Schroeder, J. I.** (2010). Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annu Rev Plant Biol*, 61, 561-591.
- Kim, Y. S., Lee, M., Lee, J. H., Lee, H. J. y Park, C. M.** (2015). The unified ICE-CBF pathway provides a transcriptional feedback control of freezing tolerance during cold acclimation in Arabidopsis. *Plant Mol Biol*, 89(1-2), 187-201.
- Kirsch, C., Takamiya-Wik, M., Reinold, S., Hahlbrock, K. y Somssich, I. E.** (1997). Rapid, transient, and highly localized induction of plastidial omega-3 fatty acid desaturase mRNA at fungal infection sites in *Petroselinum crispum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(5), 2079-2084.
- Kobayashi, K., Kondo, M., Fukuda, H., Nishimura, M. y Ohta, H.** (2007). Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(43), 17216-17221.
- Kobayashi, K., Nakamura, Y. y Ohta, H.** (2009). Type A and type B monogalactosyldiacylglycerol synthases are spatially and functionally separated in the plastids of higher plants. *Plant Physiol Biochem*, 47(6), 518-525.
- Kodama, H., Horiguchi, G., Nishiuchi, T., Nishimura, M. e Iba, K.** (1995). Fatty Acid Desaturation during Chilling Acclimation Is One of the Factors Involved in Conferring Low-Temperature Tolerance to Young Tobacco Leaves. *Plant Physiol*, 107(4), 1177-1185.
- Konishi, T., Shinohara, K., Yamada, K. y Sasaki, Y.** (1996). Acetyl-CoA carboxylase in higher plants: most plants other than gramineae have both the prokaryotic and the eukaryotic forms of this enzyme. *Plant Cell Physiol*, 37(2), 117-122.
- Kroll, D., Meierhoff, K., Bechtold, N., Kinoshita, M., Westphal, S., Vothknecht, U. C., Soll, J. y Westhoff, P.** (2001). VIPP1, a nuclear gene of Arabidopsis thaliana essential for thylakoid membrane formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(7), 4238-4242.

- Kruse, O., Hankamer, B., Konczak, C., Gerle, C., Morris, E., Radunz, A., Schmid, G. H. y Barber, J.** (2000). Phosphatidylglycerol is involved in the dimerization of photosystem II. *J Biol Chem*, 275(9), 6509-6514.
- Kunst, L., Browse, J. y Somerville, C.** (1989). A mutant of Arabidopsis deficient in desaturation of palmitic Acid in leaf lipids. *Plant Physiol*, 90(3), 943-947.
- Lagunas, B., Roman, A., Andreu, V., Picorel, R. y Alfonso, M.** (2013). A temporal regulatory mechanism controls the different contribution of endoplasmic reticulum and plastidial omega-3 desaturases to trienoic fatty acid content during leaf development in soybean (*Glycine max cv Volania*). *Phytochemistry*, 95, 158-167.
- Landy, A.** (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem*, 58, 913-949.
- Lee, B. H., Henderson, D. A. y Zhu, J. K.** (2005). The Arabidopsis cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *Plant Cell*, 17(11), 3155-3175.
- Lemieux, B., Miquel, M., Somerville, C. y Browse, J.** (1990). Mutants of Arabidopsis with alterations in seed lipid fatty acid composition. *Theor Appl Genet*, 80(2), 234-240.
- Leonhardt, N., Kwak, J. M., Robert, N., Waner, D., Leonhardt, G. y Schroeder, J. I.** (2004). Microarray expression analyses of Arabidopsis guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. *Plant Cell*, 16(3), 596-615.
- Lescot, M., Dehais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Rouze, P. y Rombauts, S.** (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res*, 30(1), 325-327.
- Leung, K. C., Li, H. Y., Mishra, G. y Chye, M. L.** (2004). ACBP4 and ACBP5, novel Arabidopsis acyl-CoA-binding proteins with kelch motifs that bind oleoyl-CoA. *Plant Mol Biol*, 55(2), 297-309.
- Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M. X., Arondel, V., Bates, P. D., Baud, S., Bird, D., Debono, A., Durrett, T. P., Franke, R. B., Graham, I. A., Katayama, K., Kelly, A. A., Larson, T., Markham, J. E., Miquel, M., Molina, I., Nishida, I., Rowland, O., Samuels, L., Schmid, K. M., Wada, H., Welti, R., Xu, C., Zallot, R. y Ohlrogge, J.** (2013). Acyl-lipid metabolism. *Arabidopsis Book*, 11: 161.
- Li, Y., Beisson, F., Pollard, M. y Ohlrogge, J.** (2006). Oil content of Arabidopsis seeds: the influence of seed anatomy, light and plant-to-plant variation. *Phytochemistry*, 67(9), 904-915.
- Li, N., Gugel, I. L., Giavalisco, P., Zeisler, V., Schreiber, L., Soll, J. y Philippar, K.** (2015). FAX1, a novel membrane protein mediating plastid fatty acid export. *PLoS Biol*, 13(2), e1002053.
- Li, L., Wang, X., Gai, J. y Yu, D.** (2007). Molecular cloning and characterization of a novel microsomal oleate desaturase gene from soybean. *J Plant Physiol*, 164(11), 1516-1526.

- Lindqvist, Y., Huang, W., Schneider, G. y Shanklin, J.** (1996). Crystal structure of delta9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other di-iron proteins. *Embo j*, 15(16), 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), 402-408.
- Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A. y Biesiadka, J.** (2007). Lipids in photosystem II: interactions with protein and cofactors. *Biochim Biophys Acta*, 1767(6), 509-519.
- 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. *Curr Opin Plant Biol*, 8(5), 532-540.
- Los, D. A. y Murata, N.** (1998). Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochim Biophys Acta*, 1394(1), 3-15.
- Lou, Y., Schwender, J. y Shanklin, J.** (2014). FAD2 and FAD3 desaturases form heterodimers that facilitate metabolic channeling in vivo. *J Biol Chem*, 289(26), 17996-18007.
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K. A., Dangl, J. L. y Dietrich, R. A.** (2000). The transcriptome of Arabidopsis thaliana during systemic acquired resistance. *Nat Genet*, 26(4), 403-410.
- Mandaokar, A., Thines, B., Shin, B., Lange, B. M., Choi, G., Koo, Y. J., Yoo, Y. J., Choi, Y. D., Choi, G. y Browse, J.** (2006). Transcriptional regulators of stamen development in Arabidopsis identified by transcriptional profiling. *Plant J*, 46(6), 984-1008.
- Martz, F., Kiviniemi, S., Palva, T. E. y Sutinen, M. L.** (2006). Contribution of omega-3 fatty acid desaturase and 3-ketoacyl-ACP synthase II (KASII) genes in the modulation of glycerolipid fatty acid composition during cold acclimation in birch leaves. *J Exp Bot*, 57(4), 897-909.
- Matsuda, O., Sakamoto, H., Hashimoto, T. e Iba, K.** (2005). A temperature-sensitive mechanism that regulates post-translational stability of a plastidial omega-3 fatty acid desaturase (FAD8) in Arabidopsis leaf tissues. *J Biol Chem*, 280(5), 3597-3604.
- Matsuda, O., Sakamoto, H., Nakao, Y., Oda, K. e Iba, K.** (2009). CTD phosphatases in the attenuation of wound-induced transcription of jasmonic acid biosynthetic genes in Arabidopsis. *Plant J*, 57(1), 96-108.
- McConn, M. y Browse, J.** (1996). The critical requirement for Linolenic Acid is pollen development, not photosynthesis, in an Arabidopsis Mutant. *Plant Cell*, 8(3), 403-416.
- McConn, M., Creelman, R. A., Bell, E., Mullet, J. E. y Browse, J.** (1997). Jasmonate is essential for insect defense in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(10), 5473-5477.

- McConn, M., Hugly, S., Browse, J. y Somerville, C.** (1994). A Mutation at the *fad8* Locus of *Arabidopsis* Identifies a Second Chloroplast [omega]-3 Desaturase. *Plant Physiol*, 106(4), 1609-1614.
- McKeon, T. A. y Stumpf, P. K.** (1982). Purification and characterization of the stearyl-acyl carrier protein desaturase and the acyl-acyl carrier protein thioesterase from maturing seeds of safflower. *J Biol Chem*, 257(20), 12141-12147.
- Medina, J., BARGUES, M., Terol, J., Perez-Alonso, M. y Salinas, J.** (1999). The *Arabidopsis* CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiol*, 119(2), 463-470.
- Meier, I., Hahlbrock, K. y Somssich, I. E.** (1991). Elicitor-inducible and constitutive in vivo DNA footprints indicate novel cis-acting elements in the promoter of a parsley gene encoding pathogenesis-related protein 1. *Plant Cell*, 3(3), 309-315.
- Meijer, H. J. y Munnik, T.** (2003). Phospholipid-based signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 54, 265-306.
- Mendes, A., Kelly, A. A., van Erp, H., Shaw, E., Powers, S. J., Kurup, S. y Eastmond, P. J.** (2013). bZIP67 regulates the omega-3 fatty acid content of *Arabidopsis* seed oil by activating fatty acid desaturase3. *Plant Cell*, 25(8), 3104-3116.
- Miao, Y., Laun, T., Zimmermann, P. y Zentgraf, U.** (2004). Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 55(6), 853-867.
- Miller, J. H.** (1972). Experimentes in molecular genetics *Cold Spring Harbor Laboratory*.
- Miquel, M. y Browse, J.** (1992). *Arabidopsis* mutants deficient in polyunsaturated fatty acid synthesis. Biochemical and genetic characterization of a plant oleoyl-phosphatidylcholine desaturase. *J Biol Chem*, 267(3), 1502-1509.
- Mongrand, S., Bessoule, J. J., Cabantous, F. y Cassagne, C.** (1998). The C16:3\C18:3 fatty acid balance in photosynthetic tissues from 468 plant species. *Phytochemistry*, 49(4), 1049-1064.
- Moreau, P., Bessoule, J. J., Mongrand, S., Testet, E., Vincent, P. y Cassagne, C.** (1998). Lipid trafficking in plant cells. *Prog Lipid Res*, 37(6), 371-391.
- Morre, D. J., Morre, J. T., Morre, S. R., Sundqvist, C. y Sandelius, A. S.** (1991). Chloroplast biogenesis. Cell-free transfer of envelope monogalactosylglycerides to thylakoids. *Biochim Biophys Acta*, 1070(2), 437-445.
- Murakami, Y., Tsuyama, M., Kobayashi, Y., Kodama, H. e Iba, K.** (2000). Trienoic fatty acids and plant tolerance of high temperature. *Science*, 287(5452), 476-479.
- Murashige, T. y Skoog, F.** (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.

- 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. y Wada, H.** (1995). Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. *Biochem J*, 308 (1), 1-8.
- Murata, N. y Yamaya, J.** (1984). Temperature-dependent phase behavior of phosphatidylglycerols from chilling-sensitive and chilling-resistant plants. *Plant Physiol*, 74(4), 1016-1024.
- Nakamura, Y.** (2013). Phosphate starvation and membrane lipid remodeling in seed plants. *Prog Lipid Res*, 52(1), 43-50.
- Nishida, I. y Murata, N.** (1996). Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: The crucial contribution of membrane lipids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 47, 541-568.
- Nishiuchi, T., Hamada, T., Kodama, H. e Iba, K.** (1997). Wounding changes the spatial expression pattern of the arabidopsis plastid omega-3 fatty acid desaturase gene (FAD7) through different signal transduction pathways. *Plant Cell*, 9(10), 1701-1712.
- Nishiuchi, T. e Iba, K.** (1998). Roles of plastid omega-3 fatty acid desaturases in defense response of higher plants. *Journal of Plant Research*, 111(4), 481-486.
- Nishiuchi, T., Kodama, H., Yanagisawa, S. e Iba, K.** (1999). Wound-induced expression of the FAD7 gene is mediated by different regulatory domains of its promoter in leaves/stems and roots. *Plant Physiol*, 121(4), 1239-1246.
- Nishiuchi, T., Nakamura, T., Abe, T., Kodama, H., Nishimura, M. e Iba, K.** (1995). Tissue-specific and light-responsive regulation of the promoter region of the Arabidopsis thaliana chloroplast omega-3 fatty acid desaturase gene (FAD7). *Plant Mol Biol*, 29(3), 599-609.
- O'Hara, P., Slabas, A. R. y Fawcett, T.** (2002). Fatty acid and lipid biosynthetic genes are expressed at constant molar ratios but different absolute levels during embryogenesis. *Plant Physiol*, 129(1), 310-320.
- O'Quin, J. B., Bourassa, L., Zhang, D., Shockey, J. M., Gidda, S. K., Fosnot, S., Chapman, K. D., Mullen, R. T. y Dyer, J. M.** (2010). Temperature-sensitive post-translational regulation of plant omega-3 fatty-acid desaturases is mediated by the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway. *J Biol Chem*, 285(28), 21781-21796.
- Ogata, K., Kanei-Ishii, C., Sasaki, M., Hatanaka, H., Nagadoi, A., Enari, M., Nakamura, H., Nishimura, Y., Ishii, S. y Sarai, A.** (1996). The cavity in the hydrophobic core of Myb DNA-binding domain is reserved for DNA recognition and trans-activation. *Nat Struct Biol*, 3(2), 178-187.
- Ohlrogge, J. y Browse, J.** (1995). Lipid biosynthesis. *The Plant Cell*, 7(7), 957-970.
- Ohlrogge, J. B. y Jaworski, J. G.** (1997). Regulation of fatty acid synthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48, 109-136.

- Ponce de Leon, I., Hamberg, M. y Castresana, C.** (2015). Oxylipins in moss development and defense. *Front Plant Sci*, 6, 483.
- Pluthero, F. G.** (1993) Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase. *Nucleic Acids Research* 20(21), 4850-4851.
- Raghothama, K. G.** (1999). Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50, 665-693.
- Reboud, X. y Zeyl, C.** (1994). Organelle inheritance in plants. *Heredity*(72), 132–140.
- Remy, R., Ambard-Bretteville, F., Dubacq, J. P. y Tremolieres, A.** (1984). Lipid Induced Transformation of the Monomeric to Oligomeric Form of the LHCP. In C. Sybesma (Ed.), *Advances in Photosynthesis Research: Proceedings of the VIth International Congress on Photosynthesis, Brussels, Belgium, August 1–6, 1983* (pp. 133-136). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M. y Farmer, E. E.** (2000). Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in Arabidopsis. *Plant Cell*, 12(5), 707-720.
- Robles-Medina, A., González-Moreno, P. A., Esteban-Cerdán, L. y Molina-Grima, E.** (2009). Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. *Biotechnology Advances*, 27(4), 398-408.
- Roman, A., Andreu, V., Hernandez, M. L., Lagunas, B., Picorel, R., Martinez-Rivas, J. M. y Alfonso, M.** (2012). Contribution of the different omega-3 fatty acid desaturase genes to the cold response in soybean. *J Exp Bot*, 63(13), 4973-4982.
- Roman, A., Hernandez, M. L., Soria-Garcia, A., Lopez-Gomollon, S., Lagunas, B., Picorel, R., Martinez-Rivas, J. M. y Alfonso, M.** (2015). Non-redundant Contribution of the Plastidial FAD8 omega-3 Desaturase to Glycerolipid Unsaturation at Different Temperatures in Arabidopsis. *Mol Plant*, 8(11), 1599-1611.
- Romero, I., Fuertes, A., Benito, M. J., Malpica, J. M., Leyva, A. y Paz-Ares, J.** (1998). More than 80R2R3-MYB regulatory genes in the genome of Arabidopsis thaliana. *Plant J*, 14(3), 273-284.
- Roston, R. L., Gao, J., Murcha, M. W., Whelan, J. y Benning, C.** (2012). TGD1, -2, and -3 proteins involved in lipid trafficking form ATP-binding cassette (ABC) transporter with multiple substrate-binding proteins. *J Biol Chem*, 287(25), 21406-21415.
- Roughan, P.G. y Slack, C.R.** (1982). Cellular-organization of glycerolipid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 33, 97-132.
- Ruelland, E. y Zachowski, A.** (2010). How plants sense temperature. *Environmental and Experimental Botany*, 69(3), 225-232.
- Ruppel, N. J., Logsdon, C. A., Whippo, C. W., Inoue, K. y Hangarter, R. P.** (2011). A mutation in Arabidopsis seedling plastid development1 affects plastid differentiation in embryo-derived tissues during seedling growth. *Plant Physiol*, 155(1), 342-353.

- Rushton, P. J. y Somssich, I. E.** (1998). Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Curr Opin Plant Biol*, 1(4), 311-315.
- Rushton, P. J., Somssich, I. E., Ringler, P. y Shen, Q. J.** (2010). WRKY transcription factors. *Trends Plant Sci*, 15(5), 247-258.
- Ruuska, S. A., Girke, T., Benning, C. y Ohlrogge, J. B.** (2002). Contrapuntal networks of gene expression during Arabidopsis seed filling. *Plant Cell*, 14(6), 1191-1206.
- Sakamoto, A., Sulpice, R., Hou, C. X., Kinoshita, M., Higashi, S. I., Kanaseki, T., Nonaka, H., Moon, B. Y. y Murata, N.** (2004). Genetic modification of the fatty acid unsaturation of phosphatidylglycerol in chloroplasts alters the sensitivity of tobacco plants to cold stress. *Plant, Cell & Environment*, 27(1), 99-105.
- Salas, J. J. y Ohlrogge, J. B.** (2002). Characterization of substrate specificity of plant FatA and FatB acyl-ACP thioesterases. *Arch Biochem Biophys*, 403(1), 25-34.
- Schaller, F.** (2001). Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. *J Exp Bot*, 52(354), 11-23.
- Schaller, A. y Stintzi, A.** (2009). Enzymes in jasmonate biosynthesis - structure, function, regulation. *Phytochemistry*, 70(13-14), 1532-1538.
- Schlame, M., Rua, D. y Greenberg, M. L.** (2000). The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog Lipid Res*, 39(3), 257-288.
- Schmidt, H. y Heinz, E.** (1990a). Desaturation of oleoyl groups in envelope membranes from spinach chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(23), 9477-9480.
- Schmidt, H. y Heinz, E.** (1990b). Involvement of ferredoxin in desaturation of lipid-bound oleate in chloroplasts. *Plant Physiol*, 94(1), 214-220.
- Shanklin, J. y Cahoon, E. B.** (1998). Desaturation and related modifications of fatty acids1. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49, 611-641.
- 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.
- Shi, Y., An, L., Li, X., Huang, C. y Chen, G.** (2011). The octadecanoid signaling pathway participates in the chilling-induced transcription of omega-3 fatty acid desaturases in Arabidopsis. *Plant Physiol Biochem*, 49(2), 208-215.
- Shim, J. S., Jung, C., Lee, S., Min, K., Lee, Y. W., Choi, Y., Lee, J. S., Song, J. T., Kim, J. K. y Choi, Y. D.** (2013). AtMYB44 regulates WRKY70 expression and modulates antagonistic interaction between salicylic acid and jasmonic acid signaling. *Plant J*, 73(3), 483-495.
- Shimajima, M.** (2011). Biosynthesis and functions of the plant sulfolipid. *Prog Lipid Res*, 50(3), 234-239.

- Shimajima, M. y Ohta, H.** (2011). Critical regulation of galactolipid synthesis controls membrane differentiation and remodeling in distinct plant organs and following environmental changes. *Prog Lipid Res*, 50(3), 258-266.
- Shockey, J. M., Fulda, M. S. y Browse, J. A.** (2002). Arabidopsis contains nine long-chain acyl-coenzyme a synthetase genes that participate in fatty acid and glycerolipid metabolism. *Plant Physiol*, 129(4), 1710-1722.
- Siberil, Y., Doireau, P. y Gantet, P.** (2001). Plant bZIP G-box binding factors. Modular structure and activation mechanisms. *Eur J Biochem*, 268(22), 5655-5666.
- Singer, S. J. y Nicolson, G. L.** (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023), 720-731.
- Somerville, C. y Browse, J.** (1991). Plant lipids: metabolism, mutants, and membranes. *Science*, 252(5002), 80-87.
- Somerville C., Browse J., Jaworski J. G. y Ohlrogge J. B.** (2000). Lipids. Buchanan B. B., Gruissem W. y Jones R. L. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plants Physiologists. 456-527.
- Song, S., Qi, T., Huang, H., Ren, Q., Wu, D., Chang, C., Peng, W., Liu, Y., Peng, J. y Xie, D.** (2011). The Jasmonate-ZIM domain proteins interact with the R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect Jasmonate-regulated stamen development in Arabidopsis. *Plant Cell*, 23(3), 1000-1013.
- Sperling, P., Franke, S., Luthje, S. y Heinz, E.** (2005). Are glucocerebrosides the predominant sphingolipids in plant plasma membranes? *Plant Physiol Biochem*, 43(12), 1031-1038.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(15), 6837-6840.
- Stelmach, B. A., Muller, A., Hennig, P., Gebhardt, S., Schubert-Zsilavecz, M. y Weiler, E. W.** (2001). A novel class of oxylipins, sn1-O-(12-oxophytodienoyl)-sn2-O-(hexadecatrienoyl)-monogalactosyl Diglyceride, from Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem*, 276(16), 12832-12838.
- Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Kurz, T., Maucher, H., Weichert, H., Ziegler, J., Feussner, I. y Wasternack, C.** (2003). Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol*, 51(6), 895-911.
- Stenzel, I., Otto, M., Delker, C., Kirmse, N., Schmidt, D., Miersch, O., Hause, B. y Wasternack, C.** (2012). ALLENE OXIDE CYCLASE (AOC) gene family members of Arabidopsis thaliana: tissue- and organ-specific promoter activities and in vivo heteromerization. *J Exp Bot*, 63(17), 6125-6138.
- Taki, N., Sasaki-Sekimoto, Y., Obayashi, T., Kikuta, A., Kobayashi, K., Ainai, T., Yagi, K., Sakurai, N., Suzuki, H., Masuda, T., Takamiya, K., 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 Physiol*, 139(3), 1268-1283.

- Tang, S., Guan, R., Zhang, H. y Huang, J.** (2007). Cloning and expression analysis of three cDNAs encoding omega-3 fatty acid desaturases from *Descurainia sophia*. *Biotechnol Lett*, 29(9), 1417-1424.
- Tasseva, G., de Virville, J. D., Cantrel, C., Moreau, F. y Zachowski, A.** (2004). Changes in the endoplasmic reticulum lipid properties in response to low temperature in *Brassica napus*. *Plant Physiol Biochem*, 42(10), 811-822.
- Testerink, C. y Munnik, T.** (2011). Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. *J Exp Bot*, 62(7), 2349-2361.
- Thomashow, M. F.** (1999). Plant Cold Acclimation: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50, 571-599.
- 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.
- Tremolieres, A., Dubacq, J. P., Ambard-Bretteville, F. y Remy, R.** (1981). Lipid composition of chlorophyll-protein complexes. *FEBS Lett*, 130(1), 27-31.
- Tsukaya, H.** (1995). Developmental genetics of leaf morphogenesis in dicotyledonous plants. *Journal of Plant Research*, 108(4), 407-416.
- Upchurch, R. G.** (2008). Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnol Lett*, 30(6), 967-977.
- Upchurch, R. G. y Ramirez, M. E.** (2011). Effects of temperature during soybean seed development on defense-related gene expression and fungal pathogen accumulation. *Biotechnol Lett*, 33(12), 2397-2404.
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, S. y Shinozaki, K.** (1993). An Arabidopsis myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell*, 5(11), 1529-1539.
- Van Aken, O., Zhang, B., Law, S., Narsai, R. y Whelan, J.** (2013). AtWRKY40 and AtWRKY63 modulate the expression of stress-responsive nuclear genes encoding mitochondrial and chloroplast proteins. *Plant Physiol*, 162(1), 254-271.
- Vellosillo, T., Martinez, M., Lopez, M. A., Vicente, J., Cascon, T., Dolan, L., Hamberg, M. y Castresana, C.** (2007). Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in Arabidopsis regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plant Cell*, 19(3), 831-846.
- Vick, B. A. y Zimmerman, D. C.** (1984). Biosynthesis of jasmonic Acid by several plant species. *Plant Physiol*, 75(2), 458-461.
- Vijayan, P., Shockey, J., Levesque, C. A., Cook, R. J. y Browse, J.** (1998). A role for jasmonate in pathogen defense of Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(12), 7209-7214.

- Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R. K., Kumar, V., Verma, R., Upadhyay, R. G., Pandey, M. y Sharma, S.** (2017). Abscisic Acid Signaling and Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Review on Current Knowledge and Future Prospects. *Front Plant Sci*, 8, 161.
- Vitha, S., Beneš, K., Michalová, M. y Ondřej, M.** (1993). Quantitative β -glucuronidase assay in transgenic plants. *Biologia Plantarum*, 35(1), 151-155.
- Vrinten, P., Hu, Z., Munchinsky, M. A., Rowland, G. y Qiu, X.** (2005). Two FAD3 desaturase genes control the level of linolenic acid in flax seed. *Plant Physiol*, 139(1), 79-87.
- Wada, H. y Murata, N.** (2007). The essential role of phosphatidylglycerol in photosynthesis. *Photosynth Res*, 92(2), 205-215.
- Wallis, J. G. y Browse, J.** (2002). Mutants of Arabidopsis reveal many roles for membrane lipids. *Prog Lipid Res*, 41(3), 254-278.
- Walter, M., Chaban, C., Schutze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Nake, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K. y Kudla, J.** (2004). Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J*, 40(3), 428-438.
- Wang, Z., Anderson, N. S. y Benning, C.** (2013). The phosphatidic acid binding site of the Arabidopsis trigalactosyldiacylglycerol 4 (TGD4) protein required for lipid import into chloroplasts. *J Biol Chem*, 288(7), 4763-4771.
- Wang, J., Ming, F., Pittman, J., Han, Y., Hu, J., Guo, B. y Shen, D.** (2006). Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) gene encoding a temperature-dependent chloroplast omega-3 fatty acid desaturase. *Biochem Biophys Res Commun*, 340(4), 1209-1216.
- Wang, R. S., Pandey, S., Li, S., Gookin, T. E., Zhao, Z., Albert, R. y Assmann, S. M.** (2011). Common and unique elements of the ABA-regulated transcriptome of Arabidopsis guard cells. *BMC Genomics*, 12, 216.
- Wang, Z., Xu, C. y Benning, C.** (2012). TGD4 involved in endoplasmic reticulum-to-chloroplast lipid trafficking is a phosphatidic acid binding protein. *Plant J*, 70(4), 614-623.
- Wasternack, C. y Hause, B.** (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in Annals of Botany. *Ann Bot*, 111(6), 1021-1058.
- Woodward, F. I.** (1988). Temperature and the distribution of plant species. *Symp Soc Exp Biol*, 42, 59-75.
- Wu, F. H., Shen, S. C., Lee, L. Y., Lee, S. H., Chan, M. T. y Lin, C. S.** (2009). Tape-Arabidopsis Sandwich - a simpler Arabidopsis protoplast isolation method. *Plant Methods*, 5, 16.
- Xiao, S., Li, H. Y., Zhang, J. P., Chan, S. W. y Chye, M. L.** (2008). Arabidopsis acyl-CoA-binding proteins ACBP4 and ACBP5 are subcellularly localized to the cytosol and ACBP4 depletion affects membrane lipid composition. *Plant Mol Biol*, 68(6), 571-583.

- Xu, C., Fan, J., Cornish, A. J. y Benning, C.** (2008). Lipid trafficking between the endoplasmic reticulum and the plastid in Arabidopsis requires the extraplastidic TGD4 protein. *Plant Cell*, 20(8), 2190-2204.
- 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., Yu, B., Cornish, A. J., Froehlich, J. E. y Benning, C.** (2006). Phosphatidylglycerol biosynthesis in chloroplasts of Arabidopsis mutants deficient in acyl-ACP glycerol-3-phosphate acyltransferase. *Plant J*, 47(2), 296-309.
- Yadav, N. S., Wierzbicki, A., Aegerter, M., Caster, C. S., Perez-Grau, L., Kinney, A. J., Hitz, W. D., Booth, J. R., Jr., Schweiger, B., Stecca, K. L., Allen, S. M., Blackwell, M., Reiter, R. S., Carlson, T. J., Rusell, S. H., Feldmann, K. A., Pierce, J. y Browse, J.** (1993). Cloning of higher plant omega-3 fatty acid desaturases. *Plant Physiol*, 103(2), 467-476.
- Yaeno, T., Matsuda, O. e Iba, K.** (2004). Role of chloroplast trienoic fatty acids in plant disease defense responses. *Plant J*, 40(6), 931-941.
- Yahata, K., Kishine, H., Sone, T., Sasaki, Y., Hotta, J., Chesnut, J. D., Okabe, M. e Imamoto, F.** (2005). Multi-gene gateway clone design for expression of multiple heterologous genes in living cells: conditional gene expression at near physiological levels. *J Biotechnol*, 118(2), 123-134.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K.** (2005). Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci*, 10(2), 88-94.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K.** (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol*, 57, 781-803.
- Yamamoto, K. T., Mori, H. e 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.
- Yamaoka, Y., Yu, Y., Mizoi, J., Fujiki, Y., Saito, K., Nishijima, M., Lee, Y. y Nishida, I.** (2011). PHOSPHATIDYLSERINE SYNTHASE1 is required for microspore development in Arabidopsis thaliana. *Plant J*, 67(4), 648-661.
- Yang, Y., Sage, T. L., Liu, Y., Ahmad, T. R., Marshall, W. F., Shiu, S. H., Froehlich, J. E., Imre, K. M. y Osteryoung, K. W.** (2011). CLUMPED CHLOROPLASTS 1 is required for plastid separation in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(45), 18530-18535.
- Yeagle, P. L.** (1989). Regulation of membrane function through composition, structure, and dynamics. *Ann N Y Acad Sci*, 568, 29-34.
- Yoo, S. D., Cho, Y. H. y Sheen, J.** (2007). Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc*, 2(7), 1565-1572.

- Yu, B. y Benning, C.** (2003). Anionic lipids are required for chloroplast structure and function in Arabidopsis. *Plant J*, 36(6), 762-770.
- Yu, B., Xu, C. y Benning, C.** (2002). Arabidopsis disrupted in SQD2 encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(8), 5732-5737.
- Zhang, L. y Sakamoto, W.** (2015). Possible function of VIPP1 in maintaining chloroplast membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1847(9), 831-837.
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S.-S., Niu, Q.-W. y Chua, N.-H.** (2006). Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method. *Nat. Protocols*, 1(2), 641-646.
- Zheng, Z., Xia, Q., Dauk, M., Shen, W., Selvaraj, G. y Zou, J.** (2003). Arabidopsis AtGPAT1, a member of the membrane-bound glycerol-3-phosphate acyltransferase gene family, is essential for tapetum differentiation and male fertility. *Plant Cell*, 15(8), 1872-1887.
- Zhou, M. Q., Shen, C., Wu, L. H., Tang, K. X. y Lin, J.** (2011). CBF-dependent signaling pathway: a key responder to low temperature stress in plants. *Crit Rev Biotechnol*, 31(2), 186-192.
- Zhu, J. K.** (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 53, 247-273.
- Zou, J., Rodriguez-Zas, S., Aldea, M., Li, M., Zhu, J., Gonzalez, D. O., Vodkin, L. O., DeLucia, E. y Clough, S. J.** (2005). Expression profiling soybean response to Pseudomonas syringae reveals new defense-related genes and rapid HR-specific downregulation of photosynthesis. *Mol Plant Microbe Interact*, 18(11), 1161-1174.