

Ana Claver Lacasa

Caracterización bioquímica y
molecular de la biosíntesis de
aceite y de ácido graso erúcico en
germoplasma de origen europeo
de la brasicácea *Thlaspi arvense*
(Pennycress)

Departamento

Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Director/es

Alfonso Lozano, Miguel

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

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR
DE LA BIOSÍNTESIS DE ACEITE Y DE ÁCIDO
GRASO ERÚCICO EN GERMOPLASMA DE
ORIGEN EUROPEO DE LA BRASICÁCEA THLASPI
ARVENSE (PENNYCRESS)

Autor

Ana Claver Lacasa

Director/es

Alfonso Lozano, Miguel

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2019

Caracterización bioquímica y molecular de la biosíntesis de aceite y de ácido graso erúcico en germoplasma de origen europeo de la brasicácea *Thlaspi arvense* (Pennycress)



TESIS DOCTORAL

Ana Claver Lacasa

Zaragoza, 2018



**Universidad
Zaragoza**



1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 LÍPIDOS VEGETALES.....	8
1.1.1. Estructura y función de los lípidos.....	8
1.1.2. Clasificación de los lípidos.....	10
1.1.3. Los ácidos grasos.....	11
1.1.3.1. Tipos y nomenclatura de los ácidos grasos.....	11
1.1.3.2. Biosíntesis de los ácidos grasos.....	14
1.1.3.3. Regulación de la biosíntesis de ácidos grasos.....	17
1.1.4. Los lípidos de membrana.....	18
1.1.4.1. Clasificación de los lípidos de membrana.....	18
1.1.4.2. Biosíntesis de los lípidos de membrana.....	21
1.1.4.3. Desaturación de los ácidos grasos.....	24
1.1.5. Síntesis de VLCFAs: la elongasa FAE1.....	25
1.1.5.1. Mecanismo de elongación de ácidos grasos.....	26
1.1.5.2. FAE1 es una proteína de membrana.....	28
1.1.5.3. Residuos catalíticos y topología estructural de FAE1.....	29
1.1.6. Biosíntesis de lípidos de almacenamiento en las semillas: el triacilglicerol.....	31
1.1.6.1. La <i>ruta de Kennedy</i> o biosíntesis <i>de novo</i>	33
1.1.6.2. El ciclo de modificación de ácidos grasos en PC o <i>acyl editing cycle</i>	36
1.1.6.3. Biosíntesis de TAG derivada de PC.....	38
1.1.6.4. Combinación de las diferentes vías de biosíntesis de TAG.....	39
1.2 EL ACEITE DE CULTIVOS OLEAGINOSOS COMO MATERIA PRIMA PARA APLICACIONES INDUSTRIALES.....	41
1.2.1. Aumento del contenido de aceite de las semillas oleaginosas.....	41
1.2.2. Mejora de la calidad del aceite de las semillas oleaginosas.....	43
1.2.2.1. Modificación de la composición total de ácidos grasos del aceite.....	43
1.2.2.2. Modificación de la distribución de ácidos grasos en TAG.....	45
1.2.3. Influencia de la estructura química de los ácidos grasos en el aceite.....	47
1.2.4. Criterios de selección de los aceites vegetales para aplicaciones industriales...	50

1.3. PENNYCRESS, UN CULTIVO ALTERNATIVO CON APLICACIONES INDUSTRIALES Y ENERGÉTICAS.....	53
1.3.1. Pennycress (<i>Thlaspi arvense L.</i>).....	54
1.3.2. Características morfológicas de Pennycress.....	55
1.3.3. Características agronómicas de Pennycress.....	57
1.3.4. Pennycress como cultivo de cubierta y de rotación.....	59
1.3.5. Aceite y perfil de ácidos grasos de Pennycress.....	60
1.3.6. Domesticación de Pennycress y recursos genéticos.....	60
1.3.7. Propiedades biotecnológicas del aceite de Pennycress.....	64
1.3.7.1. Obtención de biocombustibles.....	64
1.3.7.2. Obtención de erucamida para la obtención de plásticos.....	65
1.3.7.3. Revalorización de la torta de extracción de Pennycress como biofumigante..	67
1.3.7.4. Otras aplicaciones industriales del aceite de Pennycress.....	68
2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.....	69
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	71
3.1. ESPECIES VEGETALES UTILIZADAS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	72
3.1.1. Especies vegetales utilizadas.....	72
3.1.2. Cultivo de plantas de Pennycress.....	73
3.1.2.1. Cultivo de plantas de Pennycress en cámara de cultivo.....	73
3.1.2.2. Cultivo de plantas de Pennycress en ensayos de campo.....	75
3.1.3. Cultivo de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	80
3.1.4. Propagación y almacenamiento de semillas.....	82
3.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	83
3.2.1. Extracción de DNA genómico.....	83
3.2.2. Extracción de RNA total.....	84

3.2.3. Determinación de la concentración y pureza de ácidos nucleicos.....	85
3.2.4. Síntesis de cDNA.....	85
3.2.5. Técnicas de PCR.....	87
3.2.5.1. PCR semicuantitativa.....	87
3.2.5.2. PCR de genotipado y caracterización genética de mutantes de <i>A. thaliana</i> ...	89
3.2.5.3. PCR en colonia.....	90
3.2.5.4. RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends).....	90
3.2.5.5. Cebadores utilizados.....	92
3.2.6. Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa y cuantificación relativa..	94
3.2.7. Extracción y purificación de ácidos nucleicos en geles de electroforesis.....	95
3.2.8. Clonación de productos amplificados por PCR en <i>Escherichia coli</i>	95
3.2.8.1. Ligación de productos de PCR.....	95
3.2.8.2. Preparación de células quimiocompetentes de <i>Escherichia coli</i> . Método del cloruro de rubidio.....	96
3.2.8.3. Transformación de células quimiocompetentes de <i>Escherichia coli</i>	97
3.2.9. Extracción de DNA plasmídico y digestión con enzimas de restricción.....	98
3.2.10. Secuenciación de ácidos nucleicos.....	98
3.2.11. Conservación de las construcciones génicas.....	99
3.2.12. Generación de la construcción génica para la expresión funcional de <i>TaFAEI</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>	99
3.2.12.1. Clonación del gen <i>TaFAEI</i> en el vector pGEM®-T Easy.....	99
3.2.12.2. Clonación del gen <i>TaFAEI</i> en el vector de expresión pFGC5941-proOLE2 mediante enzimas de restricción.....	100
3.3. Obtención de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	101
3.3.1. Cultivos bacterianos de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	101
3.3.1.1. Preparación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> electrocompetentes.....	101
3.3.1.2. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> por electroporación.....	102
3.3.2. Transformación estable de <i>Arabidopsis thaliana</i>	102
3.3.3. Selección y segregación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> transformadas...	103
3.4. ANALÍISIS LIPÍDICO.....	105
3.4.1. Extracción de lípidos totales.....	105
3.4.2. Determinación de la cantidad de aceite por peso seco de semilla de	

Pennycress.....	105
3.4.3. Obtención de ésteres metílicos de ácidos grasos totales.....	106
3.4.4. Separación de lípidos mediante cromatografía en capa fina.....	106
3.4.5. Análisis de la composición de ácidos grasos mediante cromatografía gas-líquido.....	108
3.4.6. Determinación del contenido graso usando un patrón interno.....	109
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	109
4. RESULTADOS.....	110
4.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FENOLÓGICA DE VARIEDADES DE ORIGEN EUROPEO DE PENNYCRESS.....	111
4.1.1. Obtención y propagación de las semillas de Pennycress.....	111
4.1.2. Estudio de la germinación de las semillas: análisis de la existencia de dormancia.....	111
4.1.3. Tamaño y morfología de las plantas.....	112
4.1.4. Peso, número y color de las semillas.....	114
4.1.5. Contenido total de aceite y de ácido erúxico en las semillas de Pennycress....	116
4.2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS PROCESOS IMPLICADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE ÁCIDO ERÚCICO EN PENNYCRESS.....	117
4.2.1. Composición de ácidos grasos del aceite de Pennycress en diferentes condiciones de cultivo.....	117
4.2.2. Contenido de aceite en las semillas de Pennycress durante su maduración....	118
4.2.3. Contenido de ácido erúxico en las semillas de Pennycress durante su maduración.....	119
4.2.4. Contenido de ácido linoleico y linolénico en las semillas de Pennycress durante su maduración.....	120
4.2.5. Composición de ácidos grasos de las fracciones TAG y DAG del aceite de las semillas de Pennycress durante su maduración.....	122

4.3. IDENTIFICACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA BIOSINTESIS DE ACEITE Y ERUCICO EN PENNYCRESS	126
4.3.1. Caracterización del gen <i>TaFAEI</i> de ambas variedades de Pennycress.....	126
4.3.1.1. Análisis de la secuencia proteica de FAE1 de ambas variedades de Pennycress y comparación con las secuencias de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Brassica napus</i>	127
4.3.1.2. Análisis filogenético de <i>TaAEI</i>	129
4.3.2. Caracterización de los genes <i>TaDGATI</i> y <i>TaWRII</i> de Pennycress.....	131
4.3.2.1. Alineamiento proteico y análisis filogenético de <i>TaDGATI</i>	132
4.3.2.2. Alineamiento proteico y análisis filogenético de <i>TaWRII</i>	134
4.3.3. Análisis de la expresión de genes involucrados en la acumulación de ácido erúxico en las semillas de Pennycress durante su maduración.....	136
4.3.4. Análisis funcional del gen <i>TaFAEI</i> en plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i>	139
4.3.4.1. Caracterización genotípica del mutante de <i>A. thaliana fae1-1</i>	139
4.3.4.2. Caracterización fenotípica del mutante de <i>A. thaliana fae1-1</i>	140
4.3.4.3. Composición de ácidos grasos del aceite de semillas del mutante <i>fae1-1</i> de <i>A. thaliana</i>	142
4.3.4.4. Caracterización genotípica y fenotípica de las líneas transgénicas Col0 y <i>fae1-1</i> de <i>A. thaliana</i>	144
4.3.4.5. Composición de ácidos grasos del aceite de semillas de las líneas transgénicas Col0 y <i>fae1-1</i> de <i>A. thaliana</i>	147
4.4 CARACTERIZACIÓN AGRONÓMICA DE PENNYCRESS EN ENSAYOS DE CAMPO	150
4.4.1. Número de plantas, altura alcanzada y tiempo de floración.....	150
4.4.1.1. Campaña 2015-2016.....	150
4.4.1.2. Campaña 2016-2017.....	153
4.4.2. Aparición y maduración de silicuas y semillas.....	155
4.4.2.1. Campaña 2015-2016.....	155
4.4.2.2. Campaña 2016-2017.....	157
4.4.3. Progresión del cultivo.....	158

4.4.3.1. Campaña 2015-2016.....	158
4.4.3.2. Campaña 2016-2017.....	160
4.4.3 Cosecha del cultivo.....	161
4.4.3.1 Campaña 2015-2016.....	161
4.4.3.2 Campaña 2016-2017.....	162
4.4.4. Rendimiento del cultivo.....	163
4.4.4.1. Campaña 2015-2016.....	163
4.4.4.2. Campaña 2016-2017.....	165
5. DISCUSIÓN.....	168
5.1 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA BIOSÍNTESIS DE ACEITE Y ÁCIDO GRASO ERÚCICO EN PENNYCRESS.....	169
5.1.1. Influencia de determinados residuos de la proteína FAE1 en la actividad de elongación y la especificidad de sustrato.....	169
5.1.2. Regulación de la biosíntesis de ácido graso erúcico y TAG en las semillas de Pennycress.....	175
1.5.3. Análisis funcional de <i>TaFAEI</i> en Arabidopsis.....	178
5.2 PERSPECTIVAS AGRONÓMICAS DE PENNYCRESS.....	180
5.2.1 Primera experiencia de cultivo de Pennycress en España.....	180
5.2.2 Posibles estrategias de cultivo sostenible con Pennycress.....	182
6. CONCLUSIONES.....	185
7. BIBLIOGRAFÍA.....	189
8. ANEXO: PUBLICACIONES.....	213

INTRODUCCIÓN

1.1. LÍPIDOS VEGETALES.

1.1.4. Estructura y función de los lípidos.

En términos químicos, los lípidos son un grupo estructuralmente heterogéneo de compuestos orgánicos que comparten la característica común de mostrar un alto grado de insolubilidad siendo, por el contrario, solubles en disolventes orgánicos no polares (benceno, cloroformo, éter, hexano, etc.). Aunque químicamente heterogéneos, todos presentan un denominador común estructural: la totalidad o una parte significativa de su molécula es de naturaleza hidrocarbonada, y por ello, apolar. Su composición consta principalmente de átomos de carbono, hidrógeno y en menor medida oxígeno; aunque algunas clases de lípidos pueden presentar también átomos de fósforo, nitrógeno y azufre (Somerville et al., 2000).

Los lípidos son componentes esenciales de las células vegetales y constituyen entre el 5-10% de su peso seco, sobretudo como parte de las membranas celulares (Ohlrogge y Browse, 1995). Incluyen una amplia variedad de compuestos derivados de los ácidos grasos, además de pigmentos y compuestos secundarios como algunas vitaminas u hormonas. Cada célula vegetal contiene una diversa colección de lípidos, localizados en estructuras específicas y, además, tejidos vegetales diferentes contienen lípidos distintos.

En cuanto a sus funciones biológicas, los lípidos de plantas, de igual manera que en el resto de seres vivos, están implicados en numerosos procesos biológicos (Harwood, 1996; 2007). Una de las funciones más relevantes es el *papel estructural* ya que son componentes básicos de las membranas celulares, que actúan como barreras hidrofóbicas delimitando tanto a las células como a los compartimentos celulares. La compartimentación celular depende de una bicapa lipídica que impide la difusión libre de moléculas hidrofílicas entre orgánulos y entre el interior y exterior celular. Esta función implica más de 10 clases de lípidos de membrana, incluidos los fosfolípidos, galactolípidos y esfingolípidos, y dentro de cada clase las variaciones en la composición de la cadena de acilo, amplía el número de estructuras a varios cientos de posibles especies moleculares (Li-Beisson et al., 2013). Por otro lado, los lípidos de superficie como las ceras, cutina o suberina, son componentes de la cutícula o de la corteza y constituyen una cubierta protectora en la superficie de muchas plantas, su principal barrera de defensa. En *Arabidopsis*, la capa de cutina y ceras cuticulares cubren toda la superficie aérea restringiendo la pérdida de agua y proporcionando protección contra las invasiones de patógenos y otros estreses. La suberina y las ceras asociadas se localizan en las raíces, en la superficie de las semillas y en zonas de abscisión (Li-Beisson et al., 2013).

Además, ciertos lípidos están implicados en procesos biológicos fundamentales, como la transducción de señal, actuando como *precursores en la síntesis de hormonas* como el ácido jasmónico y de *segundos mensajeros* como el fosfatidilinositol (Somerville et al., 2000). Además están implicados en la fotoprotección, la modificación post-traducciona de proteínas, el reconocimiento celular, la especificidad de especie, la inmunidad de los tejidos y la adaptación al frío.

Otra de las principales funciones de los lípidos es la de constituir la principal *reserva energética*, principalmente en las semillas. Los triacilgliceroles representan el 35% del peso de las semillas de *Arabidopsis* y la forma principal de carbono y almacenamiento de energía (Figura 1.1) (Li et al., 2006). La movilización y catabolismo de los triacilgliceroles, mediante la β -oxidación en los peroxisomas, proporciona energía y carbono para el crecimiento de la plántula tras la germinación.

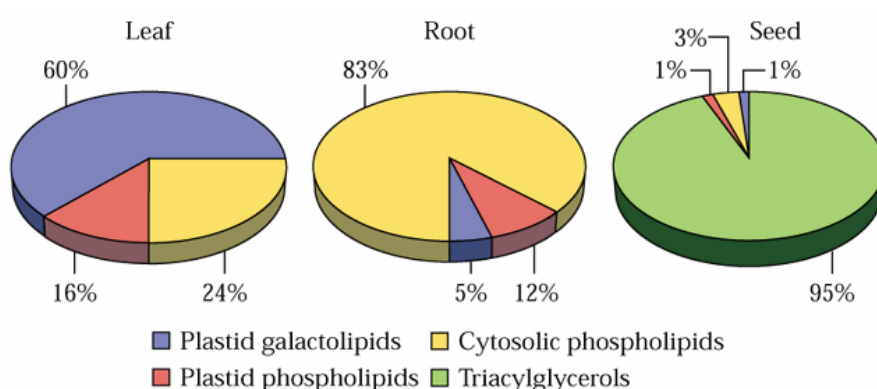


Figura 1.1 Distribuciones relativas de galactolípidos plastidiales, fosfolípidos plastidiales y citosólicos y triacilgliceroles en hojas, raíces y semillas de las plantas superiores. Los diferentes tejidos vegetales albergan una amplia variedad de composición de glicerolípidos. Figura de Ohlrogge and Browse (1995).

A pesar de que, el metabolismo de los lípidos vegetales comparte muchos rasgos con el de otros organismos, las rutas de biosíntesis en plantas son complejas y, en algunos aspectos, todavía no se conocen en su totalidad. Esto se debe a la compartimentalización de las rutas y al intercambio de los lípidos entre dichos compartimentos. Además, las plantas superiores contienen más de 200 tipos de ácidos grasos distintos, lo que supone un problema añadido para el estudio de las enzimas que intervienen en su síntesis y sobre todo, para el estudio de la regulación de las mismas (Somerville et al., 2000). Las reacciones del metabolismo de lípidos en *Arabidopsis*

thaliana requieren al menos 120 reacciones enzimáticas y más de 600 genes para codificar las proteínas y los factores reguladores involucrados (Li-Beisson et al., 2013).

1.1.5. Clasificación de los lípidos.

La enorme diversidad de los lípidos existentes dificulta cualquier clasificación sistemática. Los criterios de clasificación empleados varían de tal forma que se hace necesaria una continua revisión de los mismos.

Dado su carácter heterogéneo, existen múltiples formas de clasificar los lípidos en función de diferentes parámetros. Históricamente, una de las clasificaciones más comunes dividía a los lípidos en lípidos saponificables e insaponificables. Los **lípidos saponificables** contienen ácidos grasos unidos a algún otro componente, generalmente mediante un enlace tipo éster (acilglicéridos, ceras, fosfoglicéridos, glucolípidos y esfingolípidos). Estos pueden ser hidrolizados en presencia de una solución alcalina pudiendo llevar a cabo reacciones de saponificación. Los **lípidos no insaponificables** no contienen ácidos grasos, aunque también incluyen algunos derivados importantes de éstos (terpenos, esteroides e icosanoides). A su vez, los lípidos saponificables se pueden dividir en base a su estructura molecular en lípidos simples, de estructura exclusivamente hidrocarbonada (acilglicéridos y ceras); y lípidos complejos, cuya estructura hidrocarbonada presenta además otros grupos funcionales que contienen átomos de nitrógeno, fósforo, azufre, e incluso glúcidos (fosfoglicéridos, glucolípidos y esfingolípidos).

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

1.1.6. Los ácidos grasos.

1.1.3.1. Tipos y nomenclatura de los ácidos grasos.

Los ácidos grasos son los lípidos más sencillos y los componentes básicos estructurales de los lípidos saponificables. Están formados por una cadena hidrocarbonada de tipo alifático, compuestas por un número par de átomos de carbono y en cuyo extremo se encuentra un grupo carboxilo. Esto se debe a que su síntesis tiene lugar mediante la adición sucesiva de unidades de dos átomos de carbono (Harwood, 1997). Los ácidos grasos con un número impar de carbonos o con cadenas ramificadas no representan más del 1 o 2% del total de los ácidos grasos presentes en lípidos.

La estructura de los ácidos grasos puede variar según el número total de átomos de carbono, es decir, la longitud de la cadena hidrocarbonada; la presencia o no de dobles enlaces en su cadena; o la posición de estos dobles enlaces.

La longitud de la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos puede variar entre 4 y 36 carbonos, pero en plantas los más comunes presentan entre 16 y 18 átomos de carbono. Según la longitud de su cadena los ácidos grasos se clasifican en ácidos grasos de cadena corta (C_4 - C_{10}), media (C_{14} - C_{16}), larga (C_{16} - C_{18}) y muy larga ($C_{\geq 20}$, Very Long Chain Fatty Acids, VLCFAs). Cada átomo de carbono está unido a los átomos colindantes mediante enlaces covalentes simples o dobles. En función de la presencia o no de dobles enlaces, se diferencian **AG saturados** (ausencia de dobles enlaces), con conformación lineal (figura 1.2 A); y AG insaturados (figura 1.2 B), los cuales pueden presentar entre uno (**AG monoinsaturados**, MUFAs) y seis dobles enlaces (**AG poliinsaturados**, PUFAs). Dentro de los ácidos grasos poliinsaturados, los más comunes en las plantas son los que presentan dos o tres dobles enlaces, conocidos como ácidos grasos dienoicos o trienoicos, respectivamente. Los AG insaturados presentan, a su vez, isomería geométrica en la que se diferencian dos tipos en función de si los dos átomos de hidrógeno se encuentran en el mismo plano espacial que el doble enlace (conformación *cis*) o en distinto plano (conformación *trans*) (figura 1.2 B). 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 insaturados *trans* que presentan una estructura lineal. En los ácidos grasos vegetales, la conformación *cis* es la más habitual, aunque existen algunas excepciones como la del ácido *trans*-palmitoleico sintetizado en el cloroplasto (Somerville et al., 2000).

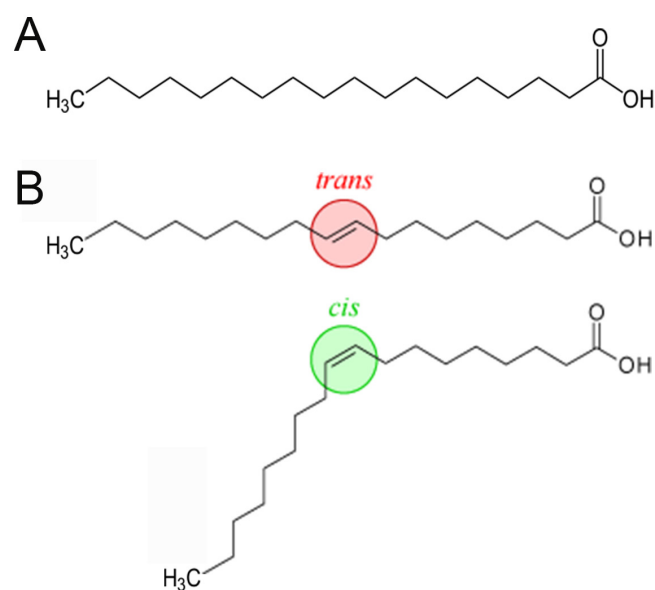


Figura 1.2 Esquemas de las moléculas de ácidos grasos. A. Ácido graso saturado (ácido esteárico). B. Ácidos grasos monoinsaturados (ácido oleico) con conformaciones *trans* y *cis*. Imagen adaptada de wikipedia.

En la tabla 1.1 se muestran los principales ácidos grasos presentes en plantas. También se indican los ácidos grasos que constituyen los lípidos de las membranas. La insaturación de los ácidos grasos de los glicerolípidos de membrana es esencial para el correcto funcionamiento de las membranas biológicas, ya que determina las propiedades fisicoquímicas de las mismas. A temperaturas fisiológicas, los lípidos polares que sólo contienen ácidos grasos saturados no pueden formar la bicapa lipídica fundamental de la estructura de las membranas (Stubbs y Smith, 1984). La introducción de un número apropiado de enlaces insaturados en los ácidos grasos disminuye la temperatura necesaria para la transición de la fase de gel a la fase de líquido-cristalino y da lugar a membranas con la fluidez adecuada (Russell, 1984; Hazel, 1995).

	Nombre común	Abreviatura
Ácidos grasos saturados	Ácido láurico	12:0
	Ácido palmítico	16:0
	Ácido esteárico	18:0
	Ácido araquidónico	20:0
	Ácido behénico	22:0
	Ácido lignocérico	24:0
Ácidos grasos insaturados	Ácido oleico	18:1 ^{Δ9}
	Ácido petroselénico	18:1 ^{Δ6}
	Ácido linoleico	18:2 ^{Δ9,12}
	Ácido α-linolénico	18:3 ^{Δ9,12,15}
	Ácido γ-linolénico	18:3 ^{Δ6,9,12}
	Ácido rougánico	16:3 ^{Δ7,10,13}
	Ácido erúcico	22:1 ^{Δ13}

Tabla 1.1 Principales ácidos grasos en plantas. Los ácidos grasos sombreados son los principales constituyentes de los lípidos de membrana, el resto se encuentran fundamentalmente en lípidos de reserva. Tabla adaptada de Somerville et al., 2015.

Los ácidos grasos se pueden denominar de diferentes formas, según su nombre común (ej. ácido oleico), según su nombre sistemático de la IUPAC (ej. ácido cis-9-octadecenoico) o según la notación abreviada (ej. 18:1^{Δ9}). Según esta notación, la primera cifra representa el número de átomos de carbono (18), la segunda el número de dobles enlaces (1) y el superíndice (Δ9) la posición del doble enlace, contando desde el carbono del grupo carboxilo (carbono Δ1). Como la mayoría de los ácidos grasos son isómeros cis, no se especifica la conformación en su nomenclatura, excepto si son trans (ej. 16:1^{Δ3t}).

La composición de ácidos grasos entre especies vegetales es ampliamente variable. Por lo general, los ácidos grasos más comunes son el 16:0, el 18:1, el 18:2 y, en menor medida, el 18:3. Algunas especies, además, acumulan ácidos grasos de cadena larga o muy larga con función de reserva (Robles-Medina et al., 2009). Actualmente, las plantas oleaginosas tienen un creciente interés agronómico e industrial, ya que el aceite de sus semillas puede ser utilizado tanto en la alimentación humana, como puede ser el caso del girasol o la oliva, o bien, con finalidad industrial en la fabricación de lubricantes, barnices, biodiesel... como puede ser el Pennycress, la colza, la jatrofa o la camelina.

1.1.3.2. Biosíntesis de los ácidos grasos.

A diferencia de otros organismos eucariotas, en las plantas, la biosíntesis *de novo* de los ácidos no ocurre en el citosol sino en el plastidio (Ohlrogge y Browse, 1995). Esta biosíntesis no está restringida a tejidos u órganos específicos sino que tiene lugar en cada célula de la planta y consiste en una serie de reacciones sucesivas de condensación de grupos acilo que, generalmente, finaliza al obtenerse ácidos grasos de 16 o 18 carbonos. Este proceso se desarrolla mediante la acción combinada de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y el complejo enzimático sintasa de ácidos grasos (FAS). Este proceso requiere gran cantidad de poder reductor que se obtiene del NADPH procedente de la fotosíntesis o de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato en condiciones de oscuridad (Somerville et al., 2000). La figura 1.3 muestra un esquema detallado de la síntesis de ácidos grasos en plantas.

La molécula precursora para la síntesis de los ácidos grasos es el acetil-CoA (Ohlrogge y Browse, 1995; Somerville et al., 2000). Como no hay transporte de acetil-CoA entre compartimentos subcelulares, probablemente el acetil-CoA plastidial es el único componente utilizado para la producción de ácidos grasos. Los estudios realizados en espinacas y hojas de guisantes demuestran que la concentración de esta molécula es baja en los cloroplastos pero suficiente para suplir las necesidades de la síntesis de ácidos grasos (Post-Beittenmiller et al., 1992) y, además, bastante constante (Ohlrogge y Browse, 1995). 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 con la descarboxilación de una molécula de acetil-CoA por acción de la enzima ACC, obteniendo una molécula de malonil-CoA en un proceso que requiere ATP (Konishi et al. 1996, Somerville et al. 2000). Como en la levadura, animales y bacterias, la enzima ACC de plantas está altamente regulada y es un punto clave de control sobre el flujo de carbono en ácidos grasos (Nikolau et al. 2003). Tras la descarboxilación, el complejo enzimático FAS, formado por una serie de enzimas monofuncionales, realiza la elongación del ácido graso mediante la adición de dos carbonos cedidos por la molécula de malonil-CoA (Brown et al. 2006). La primera enzima del complejo FAS es la malonil-CoA:ACP aciltransferasa o malonil transferasa (MCMT) que transfiere el grupo malonilo a la proteína transportadora de acilos (ACP). El ácido graso permanece unido a la proteína ACP durante todo el proceso de elongación, a través de un ciclo de 4 reacciones en las que se alarga la cadena 2 carbonos cada ciclo.

Parte de los 16:0-ACP y 18:0-ACP sintetizados pueden entrar en la ruta procariota, en la envuelta interna de los plastidios, donde son usados directamente por las aciltransferasas plastidiales para producir glicerolípidos a partir de PA y DAG (Ohlrogge y Browse, 1995; Dörmann, 2005). Sin embargo, el resto de 16:0-ACP y 18:0-ACP son hidrolizados por las acil-ACP tioesterasas de tipo A o B (FATA o FATB) (Jones et al., 1995; Salas y Ohlrogge, 2002; Bonaventure et al., 2003), y los ácidos grasos libres resultantes son exportados fuera de los plastidios. En la envuelta externa plastidial, los ácidos grasos son re-esterificados para formar acil-CoAs a través de la acción catalítica de la acil-CoA sintetasa (LACS) (Ohlrogge y Browse, 1995; Li-Beisson et al., 2010). Aunque parte del 18:0-ACP puede ser liberado fuera del plastidio, la mayoría es eficientemente desaturado a través de la acción catalítica de la Δ^9 estearoil:ACP desaturasa (SAD) plastidial, también conocida como FAB2 en Arabidopsis, que produce 18:1-ACP (McKeon y Stumpf, 1982; Li-Beisson et al., 2010). SAD es considerada una desaturasa única en el reino vegetal por ser soluble y estar localizada en el estroma del plastidio ya que la mayoría de las desaturasas son proteínas de membrana (Ohlrogge y Browse, 1995). El 18:1-ACP resultante puede a su vez ser hidrolizado por la acción de las tioesterasas y re-esterificado por LACS para formar 18:1-CoA, el cual es posteriormente exportado al citoplasma, o bien, entra en la ruta procariota plastidial (Li-Beisson et al., 2010). Una vez en el citoplasma, 16:0-CoA, 18:0-CoA y 18:1-CoA son incorporados principalmente en el RE para formar parte del pool de acil-CoAs, que es el sustrato para la ruta eucariota en la que se produce el ensamblaje de los glicerolípidos (Li-Beisson et al., 2010). Todos estos procesos se muestran en la figura 1.4.

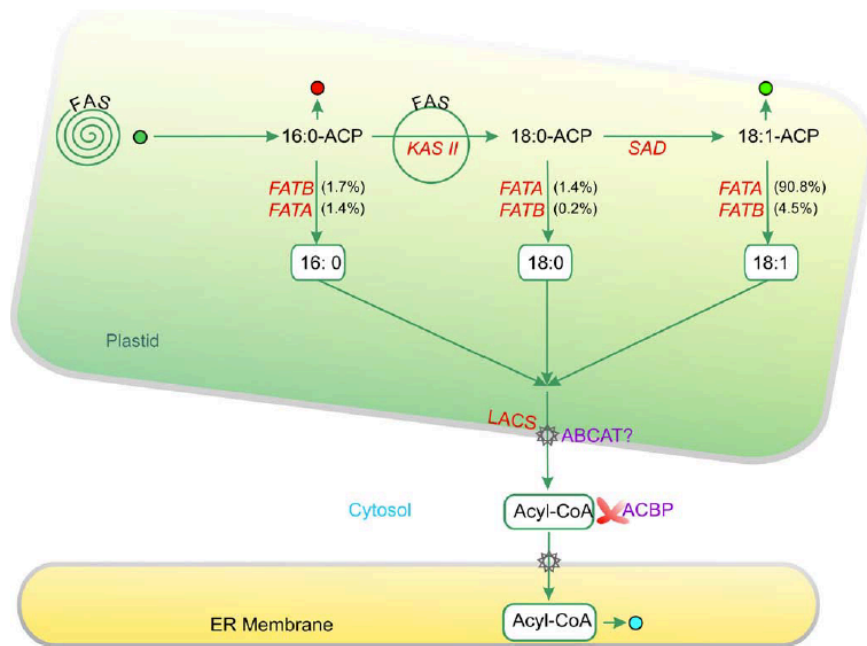


Figura 1.4 Los ácidos grasos de 16 carbonos sintetizados en el plastidio pueden entrar en tres reacciones posibles. Primero, pueden ser elongados por un ciclo adicional del ciclo de biosíntesis de ácidos grasos por la acción de KASII. Alternativamente, los ácidos grasos 16:0 pueden ser hidrolizados por la tioesterasa FATA y FATB para liberar ácidos grasos libres que son exportados fuera del plastidio. La mayoría de 18:0-ACP producidos por la elongación son desaturados por SAD. Los 18:1-ACP resultantes pueden entrar también en la ruta procariota o ser hidrolizados por FATA para la exportación desde el plastidio. Figura de Li-Beisson et al., 2013.

1.1.3.3. Regulación de la biosíntesis de ácidos grasos.

Aunque la actividad de algunas enzimas como ACC es determinante en la acumulación de ácidos grasos, poco se conoce acerca de los elementos reguladores de su expresión y de otras enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos en plantas (Ohlrogge y Jaworski, 1997). Las reacciones del metabolismo de lípidos en *Arabidopsis thaliana* requieren al menos 120 reacciones enzimáticas y más de 600 genes para codificar las proteínas y los factores reguladores involucrados (Li-Beisson et al., 2013). Sin embargo, diferentes estudios realizados en semillas y en tejidos embrionarios han establecido que los genes centrales que codifican enzimas de la síntesis de ácidos grasos presentan una importante regulación temporal de carácter transcripcional (Fawcett et al., 1994; O'Hara et al., 2002; Baud y Graham, 2006, Mentzen et al., 2008), de manera que, son inducidos coordinadamente en el inicio de la

maduración de la semilla en tejidos embrionarios que almacenan altos niveles de aceite (Girke et al., 2000; Ruuska et al., 2002; Baud y Lepiniec, 2009). Estos cambios transcripcionales pueden estar controlados por factores de transcripción o por proteínas que regulan los niveles de mRNA. El uso de mutantes deficientes en la síntesis de ácidos grasos, ha permitido identificar el factor de transcripción WRINKLED1 (WRI1) de la ruta biosintética de ácidos grasos, perteneciente a la familia APETALA 2/etileno (APETALA2-ethylene responsive element-binding protein, AP2-EREBP), 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). WRI1 controla la expresión de al menos 15 enzimas incluyendo la piruvato deshidrogenasa, ACC y miembros de la síntesis de ácidos grasos y de vías glucolíticas (Baud y Lepiniec, 2010). Por tanto, la expresión de WRI1 es fundamental para dirigir el flujo de carbono en la síntesis de ácidos grasos.

1.1.4. Los lípidos de membrana.

1.1.4.1. Clasificación de los lípidos de membrana.

Las membranas biológicas son bicapas lipídicas, flexibles y dinámicas, que actúan como barreras naturales delimitando el contorno de las células y de los orgánulos subcelulares y controlando la composición del espacio que delimitan. Además, las membranas actúan también como matriz donde diversas proteínas ejercen su función (Singer y Nicolson, 1972). No sólo son importantes por delimitar la célula y sus compartimentos, sino que la composición lipídica de la membrana afecta a la forma de la planta y a muchas funciones celulares. Así, la fotosíntesis, y particularmente las reacciones de recambio de determinados componentes del Fotosistema II, se ven afectadas en plantas pobres en lípidos de membrana con ácidos grasos poliinsaturados (Alfonso et al., 2014). Del mismo modo, tanto la composición lipídica (contenido en fosfatidilglicerol, PG) como el grado de insaturación afectan a la sensibilidad de las plantas al frío e influyen en las respuestas de la planta a la congelación. Por último, pero no menos importante, algunos lípidos de membrana actúan en rutas de transducción de señales y en procesos defensivos, bien como segundos mensajeros (fosfatidilinositol, PI) o como precursores de determinadas hormonas (jasmonatos) implicadas en la respuesta de defensa de las plantas frente al ataque por patógenos.

Los glicerolípidos (fosfolípidos, galactolípidos y sulfolípidos) son los principales constituyentes de las membranas biológicas, ya que representan hasta un 50% de los lípidos de las hojas (Benning y Ohta, 2005). Los galactolípidos y sulfolípidos se encuentran principalmente en las membranas cloroplásticas y los fosfolípidos en las membranas extraplastidiales (Somerville et al., 2000). Otros lípidos, como los esfingolípidos, también forman parte de las membranas y pueden llegar a suponer hasta el 40% de los lípidos de la membrana plasmática celular, pero no se encuentran en las membranas plastidiales o mitocondriales (Sperling et al., 2005); o la cardiolipina, que es exclusiva de la mitocondria y puede llegar a suponer un 30% de la composición de sus membranas (Darwish et al., 2009).

Los **galactolípidos** se componen de dos ácidos grasos esterificados al esqueleto de glicerol en las posiciones *sn-1* y *sn-2* (tabla 1.2, panel final). En la posición *sn-3* se encuentran unidas covalentemente una o dos moléculas de galactosa, dando lugar a monogalactosildiacilglicerol (MGDG) y digalactosildiacilglicerol (DGDG), respectivamente. A diferencia de las membranas de animales y hongos, las membranas vegetales contienen galactolípidos (Somerville y Browse, 1991) y pueden llegar a representar el 50% de los lípidos en hojas (Benning y Ohta, 2005) y hasta un 75% de los lípidos cloroplásticos (Dörmann y Benning, 2002). Entre los lípidos polares de *Arabidopsis thaliana*, se encuentra aproximadamente un 35% de MGDG y un 17% de DGDG (Browse et al., 1986; McConn et al., 1994). Los galactolípidos están formados, en su mayoría, por ácidos grasos poliinsaturados, siendo el ácido graso α -linolénico (18:3) el ácido graso mayoritario, pudiendo llegar a constituir un 90% de los ácidos grasos en los galactolípidos (Somerville et al., 2000).

Los **fosfolípidos** son glicerolípidos que se componen de dos ácidos grasos esterificados en el glicerol en las posiciones *sn-1* y *sn-2*, y en los que el grupo polar se une a través de un grupo fosfato a la posición *sn-3*. Los fosfolípidos se pueden diferenciar por la naturaleza del grupo polar: ácido fosfatídico (PA), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) y fosfatidilinositol (PI) (tabla 1.2, panel intermedio). De todos ellos, PC y PE son los fosfolípidos vegetales más abundantes, llegando a representar aproximadamente el 50% de los glicerolípidos extraplastidiales. Tanto PA, como PG y PC, se pueden encontrar en membranas plastidiales y extraplastidiales (Browse et al., 1986; Dorne y Heinz, 1989; Moreau et al., 1998; Andersson et al., 2001). El resto de los fosfolípidos sólo se encuentra en las membranas extraplastidiales. Los fosfolípidos están compuestos mayoritariamente por los ácidos grasos 16:0, 18:2 y 18:3, y en menor medida por 18:0 y 18:1. En cambio, los fosfolípidos no contienen 16:2, ni 16:3. Como se ha mencionado anteriormente, únicamente PG contiene el ácido graso 16:1 ^{Δ^3} . Este ácido graso se encuentra esterificado en la posición *sn-2* del PG y en un alto porcentaje de 33% (Miquel y Browse, 1992).

Glycerophospholipid (general structure)			
			<p>Saturated fatty acid (e.g., palmitic)</p> <p>Unsaturated fatty acid (e.g., oleic)</p>
Substituent			Name of lipid
Formula of Y	Name of X—OH	Formula of X	
	Water	—H	Phosphatidic acid (PA)
	Choline	—CH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	Phosphatidylcholine (PC)
	Ethanolamine	—CH ₂ CH ₂ NH ₃ ⁺	Phosphatidylethanolamine (PE)
	Serine		Phosphatidylserine (PS)
	Glycerol	—CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	Phosphatidylglycerol (PG)
	Phosphatidylglycerol		Diphosphatidylglycerol (cardiolipin)
	<i>myo</i> -Inositol		Phosphatidylinositol (PI)
None	Sulfoquinovose		Sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQD), also called sulfolipid (SL)
	Galactose		Monogalactosyldiacylglycerol (MGD)
	Digalactose		Digalactosyldiacylglycerol (DGD)

Tabla 1.2 Clases principales de glicerolípidos de membrana. Tabla adaptada de Somerville et al., 2000.

En cuanto a los **sulfolípidos**, en la posición *sn*-3 del esqueleto de glicerol también puede unirse un grupo sulfoquinovosil, dando lugar al único sulfolípido encontrado en plantas: el sulfoquinovosildiacylglicerol (SQ) (tabla 1.2, panel final). Entre los lípidos polares de *Arabidopsis thaliana*, se encuentra entre un 2-4% de SQ (Browse et al., 1986; McConn et al., 1994).

1.1.4.2. Biosíntesis de los lípidos de membrana.

La síntesis de los lípidos de membrana en plantas tiene lugar, principalmente, en el cloroplasto y en el retículo endoplasmático, aunque algunos lípidos (PA, PG) pueden ser sintetizados en la envuelta interna de la mitocondria (Moreau et al., 1998). La síntesis de lípidos sigue dos rutas: las denominadas *ruta procariota* y la *ruta eucariota* (Roughan y Slack, 1982). La ruta procariota hace referencia a la síntesis de glicerolípidos que transcurre íntegramente en los plastidios, denominada así por su homología con la ruta que tiene lugar en bacterias. En cambio, la ruta eucariota transcurre en los plastidios y en el retículo endoplasmático, y 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 en los plastidios (Somerville et al., 2000).

Como se ha comentado anteriormente, los ácidos grasos sintetizados en el cloroplasto, 16:0-, 18:0- y 18:1-ACP, pueden incorporarse directamente a los glicerolípidos cloroplásticos de membrana y por lo tanto a la ruta procariota, o ser exportados al citoplasma en forma de acil-CoA, para ser incorporados a los lípidos del RE por las aciltransferasas de la ruta eucariota. Además, puede darse un retorno de lípidos sintetizados en la ruta eucariota hacia el plastidio. Se muestra un esquema abreviado de la síntesis de lípidos en la figura 1.5. La cantidad relativa de glicerolípidos sintetizados por cada una de estas dos vías varía en diferentes tejidos y en distintas especies de plantas.

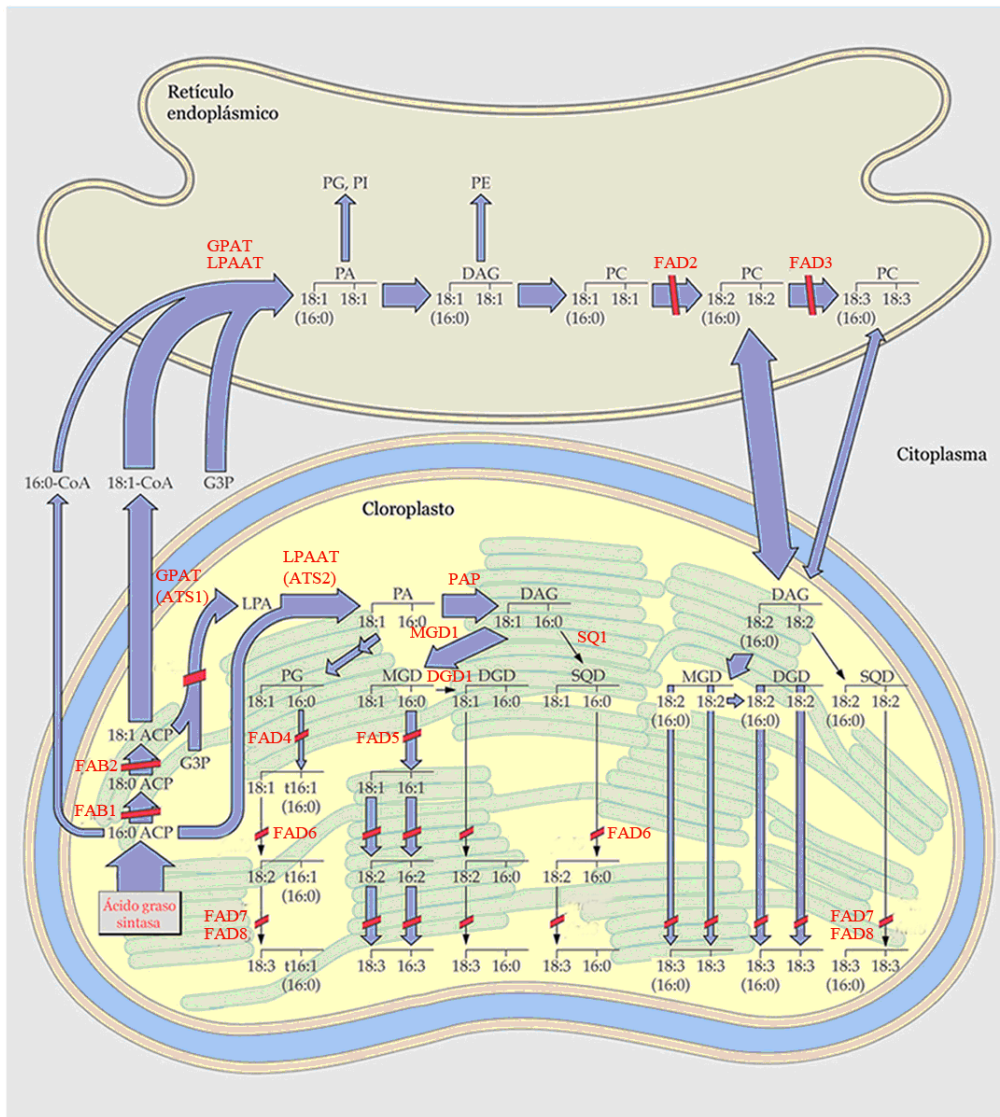


Figura 1.5 Esquema de la síntesis de lípidos de membrana en hojas de Arabidopsis: rutas procariota, en el plastidio, y eucariota, en el retículo endoplasmático. En rojo se indican las enzimas implicadas en la biosíntesis lipídica. Las barras rojas corresponden a enzimas de las cuales se han obtenido mutantes en Arabidopsis. Imagen adaptada de Somerville et al., 2000.

La *ruta procariota* se lleva a cabo en la envuelta interna del cloroplasto. Los ácidos grasos sintetizados en el cloroplasto, unidos a la proteína ACP, se incorporan a una molécula de glicerol-3-fosfato (G3P), mediante la enzima plastidial *sn*-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT), también denominada ATS1 en Arabidopsis (Chen et al., 2011). Esta enzima es soluble y se encuentra en el estroma del cloroplasto (Xu et al., 2006). Debido a su especificidad por sustrato, se esterifica, preferiblemente, una molécula de 18:1 en la posición *sn*-1 del glicerol. El producto, el ácido lisofosfatídico (LPA), se incorpora a las membranas, donde será convertido en ácido fosfatídico (PA) mediante a la esterificación de un segundo ácido graso, 16:0 en este caso, a la posición *sn*-2, por la acción de la enzima lisofosfatidil aciltransferasa (LPAAT). Esta

enzima se localiza en la envuelta interna del cloroplasto (Li-Beisson et al., 2013). En *Arabidopsis*, la enzima LPAAT también se denomina ATS2. El PA puede ser, posteriormente, transformado en PG o en diacilglicerol (DAG). La transformación en DAG, por eliminación de grupo fosfato, la lleva a cabo la enzima ácido fosfatídico fosfatasa (PAP), localizada en la envuelta interna del cloroplasto (Ohlrogge et al., 1991). El DAG puede ser transformado en MGDG o en SQ, mediante las enzimas MGDG- y SQ-sintasas (MGDG-S, SQ-S), respectivamente. El DGDG puede ser sintetizado por galactosilación del MGDG mediante la DGDG-sintasa (DGDG-S), o por transferencia directa de una molécula de galactosa entre dos moléculas de MGDG (van Besouw y Wintermans, 1978; Siebertz et al., 1980), mediante una galactolípido galactosil transferasa (Benning y Ohta, 2005). Todas estas enzimas han sido localizadas en la envuelta del cloroplasto (Froehlich et al., 2001; Xu et al., 2005; Benning, 2008). Además de transformarse en DAG, PA puede reaccionar con citidina 5'-trifosfato (CTP) formando la forma de nucleótido activado CDP-DAG. CDP-DAG reacciona con G3P para formar fosfatidil glicerol fosfato (PG) (Ohlrogge y Browse, 1995).

En la *ruta eucariota*, los ácidos grasos procedentes del cloroplasto en forma de acil-CoA, se incorporan a una molécula de G3P mediante un proceso muy similar al de la ruta procariota, pero con alguna diferencia debida a la alta especificidad por sustrato de las aciltransferasas. La GPAT reticular, enzima asociada a la membrana, esterifica un ácido graso 18:0, o en menor medida 16:0, a la posición *sn*-1 del glicerol (Li-Beisson et al., 2013). Como se ha mencionado anteriormente, en *Arabidopsis* existe una isoforma plastidial (ATS1) y, además, cuatro isoformas reticulares (GPAT4-7) y tres mitocondriales (GPAT1-3) con distinta especificidad por sustrato, localización subcelular y tisular (Chen et al., 2011a). Posteriormente, la LPAAT esterifica un segundo ácido graso de 18 átomos de carbono (18:0 o 18:1) a la posición *sn*-2 del LPA, para dar lugar a PA. En el RE, el PA es transformado en DAG, que es precursor de PC y PE; o en citidina difosfato-diacilglicerol (CDP-DAG), precursor de PG, PI y PS (Wallis y Browse, 2002). El PE y PS se pueden transformar uno en otro, de manera que PE se transforma en PS cuando una serina desplaza a la etanolamina (Yamaoka et al., 2011), y la reacción contraria ocurre mediante una descarboxilación de la serina (Nerlich et al., 2007).

1.1.4.3. Desaturación de los ácidos grasos.

La mayoría de los ácidos grasos de los lípidos de membrana son desaturados por enzimas desaturasas de unión a membrana. Las desaturasas de ácidos grasos (FADs, del inglés Fatty Acid Desaturases) realizan la conversión de un enlace simple a un enlace doble o enlace insaturado en la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos esterificados en lípidos de membrana. En plantas, específicamente en Arabidopsis, los PUFAs dienoicos y trienoicos constituyen más del 70% de los ácidos grasos de las hojas (Somerville et al., 2000).

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 codificantes de las diferentes desaturasas y aportaron datos específicos sobre su contribución, número, especificidad de sustrato y su localización celular (Wallis y Browse, 2002). Así, en Arabidopsis se han identificado 8 desaturasas diferentes, de las cuales solo FAB2 (o SAD, apartado 1.1.3.1) es una acil-ACP desaturasa soluble localizada en el estroma del cloroplasto (Somerville et al., 2000). Los cloroplastos contienen las desaturasas de unión a membrana FAD4, FAD5, FAD6 y FAD7/8 y el RE FAD 2 y FAD3. De las desaturasas plastidiales dos presentan una alta especificidad por sustrato. La desaturasa FAD4 actúa específicamente sobre ácidos grasos de 16 carbonos asociados al PG plastidial y FAD5 sobre ácidos grasos de 16 carbonos asociados a MGD y posiblemente DGD (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) introducen una tercera insaturación en la posición ω_3 del ácido graso, por lo que reciben el nombre de ω_3 desaturasas. Mientras que las desaturasas reticulares FAD2 y FAD3 actúan ácidos grasos esterificados a fosfolípidos reticulares, las desaturasas plastidiales FAD4, FAD5, FAD6, FAD7 y FAD8 actúan principalmente sobre galactolípidos, sulfolípidos y el PG plastidial (Somerville et al., 2000).

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).

1.1.5. Síntesis de VLCFAs: la elongasa FAE1.

Los ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA, del inglés Very Long Chain Fatty Acids) son ácidos grasos de más de 18 carbonos de longitud, imprescindibles para la supervivencia de las plantas con tienen diversos roles a lo largo del desarrollo de las mismas. Los VLCFAs son requeridos en todas las células vegetales para la producción de esfingolípidos (Lynch, 1993; Merrill et al., 1997) y en tipos celulares específicos para la síntesis de otros derivados de VLCFA tales como ceras cuticulares, polen, y suberina (Post-Beittenmiller, 1996). Además, las plantas de la familia Brassicaceae y jojoba (*Simmondsia chinensis*) también acumulan VLCFAs como compuestos de almacenamiento en el aceite de las semillas (triacilgliceroles y cera, respectivamente), que constituyen una enorme inversión de energía por parte de toda la planta (Downey y Röbbelen, 1989). Sin embargo, en la mayoría de las células vegetales, los VLCFAs representan una pequeña fracción del pool total de ácidos grasos, ya que todas las células deben producir grandes cantidades de ácidos grasos de 16 y 18 carbonos para la síntesis de los lípidos que constituyen las membranas celulares.

La biosíntesis y la elongación de los ácidos grasos comparten un mecanismo básico que consiste en cuatro reacciones secuenciales en las que tiene lugar la adición de dos unidades de carbono a un molécula sustrato. En primer lugar, una molécula acilo iniciadora se condensa con un grupo malonilo, que puede ser activado por conjugación con la proteína transportadora de acilo (ACP) o con coenzima A (CoA). Esta reacción de condensación produce un β -cetoacil que es dos carbonos más largo que el sustrato inicial. Posteriormente, se reduce a alcohol, es deshidratado y reducido de nuevo para formar un producto acilo n+2 (Fig. 1). Más allá de esta secuencia central de reacciones, hay diferencias en la regulación, en la activación del sustrato, localización, especificidad de sustrato y producto, y en la(s) enzima(s) involucrada(s) en la síntesis *de novo* y elongación (Haslam y Kunst, 2013). Además, los primeros trabajos destinados a aislar las enzimas requeridas para la producción de VLCFAs en plantas revelaron que la elongación de VLCFAs difiere notablemente de la síntesis *de novo* de ácidos grasos. A partir de células epidérmicas de puerro (*Allium porrum*) productoras de cera cuticular, se

observó que la actividad elongasa está presente en la fracción microsomal celular (Cassagne et al., 1978), utiliza como sustratos malonil-CoA y acil-CoA, NADPH como poder reductor (Agrawal et al., 1984), y los productos de elongación se liberan de la maquinaria elongasa como ésteres-CoA (Lessire et al., 1985a). En los primeros análisis, el uso de inhibidores químicos en puerro provocó diversos efectos en la actividad elongasa, lo que sugirió la existencia de múltiples elongasas (Lessire et al., 1985b). Además, el análisis genético de la producción de cera cuticular en cebada demostró que debían existir varios sistemas elongasa en una misma planta, ya que la mutagénesis, el tratamiento de tejidos con inhibidores químicos o la exposición a diferentes condiciones ambientales tenían efectos variados en la distribución de monómeros de cera cuticular con diferentes longitudes de cadena (von Wettstein-Knowles et al., 1982). Los enfoques bioquímicos fueron cruciales para la comprensión de la naturaleza de las enzimas involucradas, de manera que, la purificación parcial del sistema elongasa de puerro resultó en el enriquecimiento de, al menos, tres proteínas, por lo que se concluyó que no se trataba de una unidad proteica multifuncional, sino de múltiples componentes de proteína (Bessoule et al., 1989).

1.1.5.1. Mecanismo de elongación de ácidos grasos.

La biosíntesis de VLCFAs es llevada a cabo por un complejo de elongación de ácidos grasos, denominado FAE (del inglés, Fatty Acid Elongase), que consta de cuatro reacciones similares al complejo sintasa de ácido graso (FAS), mecanismo reflejado en la figura 1.6. La primera reacción de elongación implica la condensación de un malonil-CoA, producido por la ACC citosólica, con una molécula acil-CoA de cadena larga, llevada a cabo por la cetoacil-CoA sintasa (KCS), produciendo una molécula β -cetoacil-CoA. El β -cetoacil-CoA es reducido por una β -cetoacil-CoA reductasa (KCR) para producir β -hidroxiacil-CoA, que a su vez, es deshidratado por β -hidroxiacil-CoA deshidratasa (HCD) para producir un enoil-CoA. La molécula de enoil-CoA es reducida por una enoil-CoA reductasa (ECR) para dar lugar a un acil-CoA de dos carbonos más que el acil-CoA inicial (Fehling y Mukherjee, 1991). El producto acil-CoA resultante puede ser usado como sustrato para las mismas reacciones secuenciales, permitiendo continuar con la elongación con dos unidades de carbono más.

La reacción de condensación inicial es el paso limitante del proceso y, además, KCS regula la especificidad de sustrato de ácidos grasos en el términos de longitud de la cadena y grado de insaturación (Millar y Kunst, 1997).

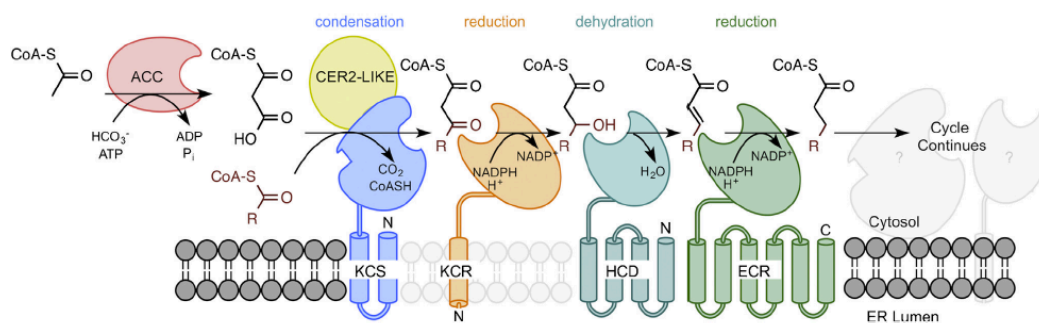


Figura 1.6 Esquema del complejo elongasa de ácidos grasos. KCS lleva a cabo una condensación de un malonil-CoA con una molécula acil-CoA. El β-cetoacil-CoA producido es reducido por la acción de KCR. Posteriormente, se da una deshidratación por parte de HCD y una última reducción por ECR, dando lugar a un acil-CoA de dos carbonos más que el acil-CoA inicial. Imagen de Haslam y Kunst, 2013. La figura no pretende realizar ninguna afirmación en cuanto a la estructura proteica.

El primer componente del complejo elongasa en ser genéticamente identificado y caracterizado en plantas fue el enzima FAE1 en semillas de *Arabidopsis thaliana*. FAE1, también conocida como 3-ketoacyl CoA sintasa 18 (KCS18), se expresa exclusivamente en las semillas y cataliza el paso de condensación inicial en la ruta de elongación (James et al., 1990, 1995; Lemieux et al., 1990; Kunst et al., 1992; Millar y Kunst, 1997). Posteriormente, se identificaron y caracterizaron ortólogos de FAE1 en otras especies como *Brassica napus* o colza (Barret et al., 1995), *Simmondsia chinensis* o jojoba (Lassner et al., 1996), *Brassica juncea* (Venkateswari et al., 1999), *Brassica campestris*, *Brassica oleracea* (Das et al., 2002) y *Thlaspi arvense* (Claver et al., 2017).

Como se ha comentado anteriormente, KCS regula la especificidad de sustrato en la elongación de ácidos grasos. Estudios de los perfiles de ácidos grasos de plantas transgénicas de *Arabidopsis*, tabaco (*Nicotiana benthamiana*) y levaduras determinaron que FAE1 de *Arabidopsis* tiene preferencia de sustrato para el ácido graso oleico (18:1), produciendo ácido eicosenoico (20:1) como el principal producto y ácido erúcico (22:1) como un producto minoritario (Millar y Kunst, 1997). Todas las enzimas FAE1 de plantas son específicas para ácidos grasos saturados y monoinsaturados, pero no poliinsaturados.

Una única mutación nuclear semi-dominante en *FAE1* en el mutante de *A. thaliana* AC56 fue suficiente para bloquear la elongación de 18:0 a 20:0, de 18:1 a 20:1 y de 20:1 a 22:1 en las semillas, con un incremento concomitante de 18:1 (Kunst et al., 1992). La clonación del gen

FAE1 reveló que codifica una proteína con similitud de secuencia a la chalcona sintasa, involucrada en la síntesis de policétidos (Martin, 1993), y a la 3-cetoacil sintasa III (KASIII) (Tai y Jaworski, 1993), catalizadora de la primera reacción de condensación de la síntesis de ácidos grasos en la que se condensa acetil-CoA con malonil-ACP (James et al., 1995). La caracterización de *FAE1* sugirió que usa un mecanismo similar a estas enzimas condensadoras (Ghanevati y Jaworski, 2001; Ghanevati y Jaworski, 2002).

1.1.5.2. *FAE1* es una proteína de membrana.

Una característica destacada de las *FAE1* involucradas en la elongación de ácidos grasos es su naturaleza de unión a la membrana, que las hace diferentes de todas las demás enzimas condensadoras estudiadas hasta la fecha, enzimas solubles bien caracterizadas como KAS III y las chalcona sintasas. A diferencia de las enzimas de condensación solubles, la información sobre la estructura, el mecanismo de reacción y la cinética de las enzimas de membrana es muy limitada. Esto se debe principalmente a las dificultades asociadas a la solubilización y purificación de las mismas, que causan que la mayoría de estudios enzimáticos se lleven a cabo utilizando membranas microsomales o solubilizadas, impidiendo cualquier análisis del mecanismo enzimático de reacción (Lessire et al., 1985b, 1989; Fehling et al., 1992; Imai et al., 1994; Evenson et al., 1995). Actualmente, solo hay un informe de una *FAE1* ligada a membrana totalmente purificada, la de *jojoba* (Lassner et al., 1996), y su caracterización se limitó a la especificidad de sustrato.

Una manera de superar este inconveniente fue, mediante ingeniería genética, expresar *FAE1* de *Arabidopsis* en levaduras, unida a His6-tag para facilitar su purificación. Además, la expresión de esta enzima en levadura brindó la oportunidad de analizar en profundidad *FAE1* usando mutagénesis dirigida. De esta manera, fue posible comparar *FAE1* con las enzimas de condensación solubles (Ghanevati y Jaworski, 2002). La expresión del gen en *Saccharomyces cerevisiae* (Ghanevati y Jaworski, 2002), junto con el alineamiento de *FAE1* con otras KCS de *Arabidopsis* (Ghanevati et al., 2001) y el análisis con el algoritmo TMAP (Persson et al., 1994) predijeron dos dominios transmembrana N-terminal. El primer dominio transmembrana corresponde a los residuos de aminoácidos 9-36, y el segundo abarca los residuos 48-76 (Persson et al., 1994). Además, *FAE1* y otras enzimas elongasas carecen de cualquier secuencia de señalización conocida para enzimas vegetales (Emanuelsson et al., 2000), lo cual sugiere que estas proteínas microsomales de membrana están dirigidas al RE.

1.1.5.3. Residuos catalíticos y topología estructural de FAE1.

Como se ha comentado anteriormente, algunos dominios de las enzimas elongasas tienen cierta similitud a enzimas de condensación solubles de plantas, las chalcona sintetas (Martin, 1993) y la KAS III (Tai y Jaworski, 1993), cuyo mecanismo de acción se ha estudiado extensamente y es extrapolable al mecanismo propuesto para FAE1. Este mecanismo implica, en primer lugar, la transferencia de un acil-CoA a un residuo conservado de cisteína del sitio activo, concretamente C223 (Lassner et al., 1996; Ghanevati y Jaworski, 2001; Ghanevati y Jaworski, 2002).

Una molécula de malonil-CoA es descarboxilada (figura 1.7 paso 2), produciendo un intermediario acetil carbanión (figura 1.7 paso 3) que lleva a cabo un ataque nucleofílico sobre el átomo de carbono del carbonilo del acilo esterificado a la cisteína (figura 1.7 paso 3), produciendo una molécula β -cetoacil-CoA activada (figura 1.7 paso 4). Por tanto, el residuo C223 es catalítico ya que se une al sustrato acilo durante la elongación de los ácidos grasos y, además, está conservado entre las enzimas de condensación (Lassner et al., 1996). Por otro lado, Ghanevati y Jaworski confirmaron la importancia de C223 mediante un ensayo con mutantes dirigidos, demostrando que la mutación C223A anula la actividad de condensación (Ghanevati y Jaworski, 2001) e inhibe la descarboxilación de malonil-CoA (Ghanevati y Jaworski, 2002).

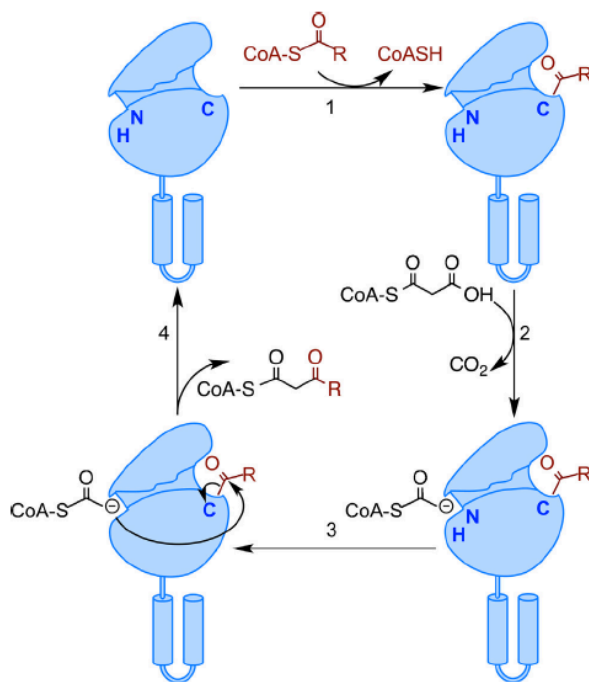


Figura 1.7 Modelo sugerido del mecanismo catalítico de cetooacil-CoA sintasa (KCS) o FAE1. (1) un grupo acil es transferido desde el acil-CoA (marrón) a un residuo de cisteína de KCS. (2) el malonil-CoA (negro) es descarboxilado, liberando dióxido de carbono y un intermediario carbanión acetil-CoA activado que puede ser estabilizado por residuos de histidina y asparagina de KCS. (3) el carbanión ataca nucleofílicamente el carbono carbonilo del acil unido a la cisteína. (4) un nuevo enlace carbono-carbono se forma entre el carbanión acetil-CoA y el grupo acilo, liberando el grupo acilo desde la cisteína de KCS y regenerando la apoenzima. Imagen de Haslam y Kunst, 2013.

Además del residuo C223 del sitio activo, los residuos H391 y N424, se conservan ampliamente en las enzimas de condensación chalconas sintasas y KAS III, y actúan facilitando la descarboxilación del malonil-CoA. Mediante mutagénesis dirigida y análisis estructural de estas enzimas solubles, se determinó que la reacción de condensación involucra una tríada catalítica compuesta por Cys, His, His (Huang et al. 1998; Olsen et al., 1999) o Cys, His, Asn (Ferrer et al. 1999; Davies et al., 2000). Los residuos H391 y N424 tienen gran importancia en la descarboxilación del malonil-CoA, ya que estabilizan el intermediario carbanión derivado de la descarboxilación (Jez et al., 2000; Ghanevati y Jaworski, 2002).

Asimismo, se han identificado otros residuos cruciales para la actividad de FAE1 como las cisteínas C85, C312, C389, C460, y las histidinas H302, H387, H420 (Ghanevati y Jaworski, 2001, 2002). Estos residuos encuentran conservados en gran parte de las especies Brassicaceae y no son responsables de la especificidad de sustrato por 18:0-CoA o 20:0-CoA (Sun et al.,

2013). Por el contrario, mutaciones en S282 se han asociado al fenotipo de bajo contenido en ácido erúxico (LEA, del inglés Low Erucic Acid) (Han et al., 2001), pero parece no ser un requisito para la funcionalidad de FAE1 (Katavic et al., 2004). Además, diversos estudios han sugerido que existe una correlación entre varios motivos de secuencia y el contenido de ácido erúxico en las semillas (Blacklock y Jaworski, 2002; Sun et al., 2013). Para localizar los residuos mencionados de FAE1 acudir a la figura 4.11 del apartado Resultados.

En cuanto a la estructura de las enzimas condensadoras KCS, el estudio más profundo se realizó sobre KCS1, una enzima de condensación con papel en la biosíntesis de cera cuticular. Los resultados de este estudio se extrapolaron a toda la familia KCS de Arabidopsis. Este análisis estructura-función demostró que tienen una estructura de plegamiento α_a - β_b - α_c - α_d (Joubès, et al., 2008). El primer plegamiento α_a en la región N-terminal consiste en una o dos α -hélices que sirve como anclaje a la membrana. Las estructuras β_b - α_c - α_d , forman la parte soluble de KCS. Todos los residuos catalíticos están en el plegamiento α_c de la proteína. Por superposición de los residuos catalíticos involucrados en la formación del enlace tioéster en el acilo (C223) y en la descarboxilación del malonil-CoA (H391 y N424), se compararon los tamaños y formas de las regiones de unión a sustrato de las diferentes KCS y se obtuvo una correlación general entre el tamaño de dicha región y la longitud de la cadena del sustrato acilo (Joubès, et al., 2008).

1.1.6. Biosíntesis de lípidos de almacenamiento en las semillas: el triacilglicerol.

En plantas superiores, el triacilglicerol o TAG es el componente predominante del aceite de las semillas y de los frutos de las plantas oleaginosas, como la aceituna, pero también se acumulan en otros tejidos como el polen y el tejido vegetativo (Kaup et al., 2002; Kim et al., 2002). La molécula de TAG está compuesta por tres grupos acilo de ácidos grasos esterificados a una cadena principal de glicerol en las posiciones *sn*-1, *sn*-2 y *sn*-3. Debido a su estado altamente reducido, el TAG representa una molécula compacta para almacenar energía y carbono y apoyar el crecimiento de las plántulas jóvenes durante las primeras etapas de la germinación (AOCS Lipid Library).

El TAG es una parte importante de nuestra bioeconomía, ya que proporciona una fuente de carbono muy reducido para aplicaciones tanto alimentarias como no alimentarias, como por ejemplo aportar materia prima para la producción de alternativas petroquímicas (Bates et al., 2000). La función y el valor de los aceites vegetales depende de la composición de ácidos

grasos del TAG. Los principales cultivos de aceite vegetal (soja, palma, canola, girasol) tienen composiciones de FA limitadas a cinco FA: saturados 16:0 y 18:0, monoinsaturados 18:1^{Δ9} y poliinsaturados (PUFA) 18:2^{Δ9,12} y 18:3^{Δ9,12,15}. Sin embargo, dentro del reino vegetal hay más de 300 estructuras de FA que difieren en longitud de cadena, número y posición de dobles enlaces, o que contienen diferentes grupos funcionales tales como hidroxilo, epoxi, etc. (Badami y Patil, 1980).

Las vías bioquímicas que producen triacilglicerol en las semillas involucran múltiples orgánulos celulares, lo cual requiere un extenso tráfico de lípidos. La fosfatidilcolina juega un papel central en estas vías como sustrato para modificaciones de los ácidos grasos y, probablemente, como portador en el tráfico de ácidos grasos entre orgánulos y dominios de membrana. Aunque se ha aclarado mucho con respecto a las enzimas y a las vías responsables del flujo de ácidos grasos, todavía hay importantes incógnitas, como la identidad de varias enzimas clave, el control del tráfico entre las diferentes vías y la biología celular especializada implicada (Bates et al., 2013).

La biosíntesis del aceite de la semilla comienza en el plastidio ya que es donde se sintetizan los ácidos grasos (Figura 1.3). En *Arabidopsis* y muchas otras especies de semillas oleaginosas, el ácido oleico (18:1^{Δ9}) es el producto principal de la síntesis de ácidos grasos plastidiales. Después de la exportación desde el plastidio, los ácidos grasos se reesterifican a coenzima A para formar acil-CoA por la acción de LACS en la membrana externa del plastidio. Llegado este punto, como se ha comentado anteriormente, puede producirse una elongación adicional del acil-CoA en el RE. Por ejemplo, en la colza de alto contenido en ácido erúico (*Brassica napus*), el oleoil-CoA (18:1^{Δ9}-CoA) se alarga secuencialmente para formar eicosenoil (20:1^{Δ11}-CoA) y erucoil (22:1^{Δ13}-CoA). Los acil-CoA exportados desde el plastidio, elongados y no elongados, constituyen el pool acil-CoA, que puede modificarse aún más a través del ciclo de modificación de acilos en el RE. El pool de acil-CoA proporciona el sustrato de FA para las reacciones de ensamblaje de triacilglicerol en el RE (Chapman y Ohlrogge, 2012; Chapman et al., 2012; Liu et al., 2012, Huang, 1992).

Una vez formadas, las moléculas de triacilglicerol se fusionan y se acumulan en la cara externa del RE para formar estructuras conocidas como cuerpos de aceite o gotas lipídicas, de 0.5 a 2.5 micrómetros de diámetro. Estos orgánulos consisten de un núcleo TAG rodeado de una monocapa de fosfolípidos con varias proteínas, como oleosinas, caleosinas y esteroleinas (Jolivet et al., 2004).

1.1.6.1. La ruta de Kennedy o biosíntesis de novo.

La forma más sencilla de producir TAG es utilizar directamente los ácidos grasos exportados desde el plastidio para su síntesis *de novo* en la denominada *ruta de Kennedy*. La ruta, que se caracterizó por primera vez en animales hace más de 50 años (Weiss y Kennedy, 1956; Weiss et al., 1960) y posteriormente en plantas (Barron y Stumpf, 1962), queda reflejada en la figura 1.8. Como se ha comentado anteriormente, la síntesis de FA hasta 18 carbonos y un doble enlace tiene lugar dentro del plastidio (Li-Beisson et al., 2010). En la mayoría de las plantas, los FA 18:1^{Δ9}>>16:0>18:0 son los principales FA exportados desde el plastidio para la síntesis de glicerolípidos en el retículo endoplásmico (RE).

Primero tiene lugar una acilación de G3P por la glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) en la posición *sn*-1 del esqueleto de glicerol, produciendo ácido liso-fosfatídico (LPA). *Arabidopsis thaliana* presenta hasta ocho isoformas plastidiales (GPAT1-8) relacionadas con la síntesis de cutina y suberina (Li-Beisson et al., 2010; Yang et al., 2012), y se cree haber encontrado una novena isoforma presumiblemente microsomal (GPAT9) y, por consiguiente, relacionada directamente con la biosíntesis de TAG (Gidda et al., 2009).

La segunda acilación, en la posición *sn*-2 del esqueleto de glicerol, es realizada por la ácido lisofosfatídico aciltransferasa (LPAAT) y se genera ácido fosfatídico (PA). Se han identificado cinco genes LPAAT en *Arabidopsis* en base a la similitud de secuencia con LPAATs de otros organismos (Kim y Huang, 2004). En cuanto a la especificidad por sustrato, las LPAATs han mostrado una gran variabilidad (Knutzon et al., 1995; Lassner et al., 1995; Brown et al., 2002a, 2002b). En general, LPAAT presenta mayor especificidad por oleil-CoA y linoleil-CoA y no incorpora FAs saturados. Además, los VLCFAs, como eicosenoil-CoA, erucoil-CoA y nervonil-CoA, son generalmente excluidos de la posición *sn*-2 (Frentzen, 1993; Voelker et al., 1996). No obstante, en aquellas especies vegetales cuyos aceites poseen ciertas cantidades de FAs inusuales en la posición *sn*-2 del TAG, existen LPAATs adicionales con preferencia por estos sustratos (Cao et al., 1990; Laurent y Huang, 1992; Brown et al., 1995; Frentzen, 1998).

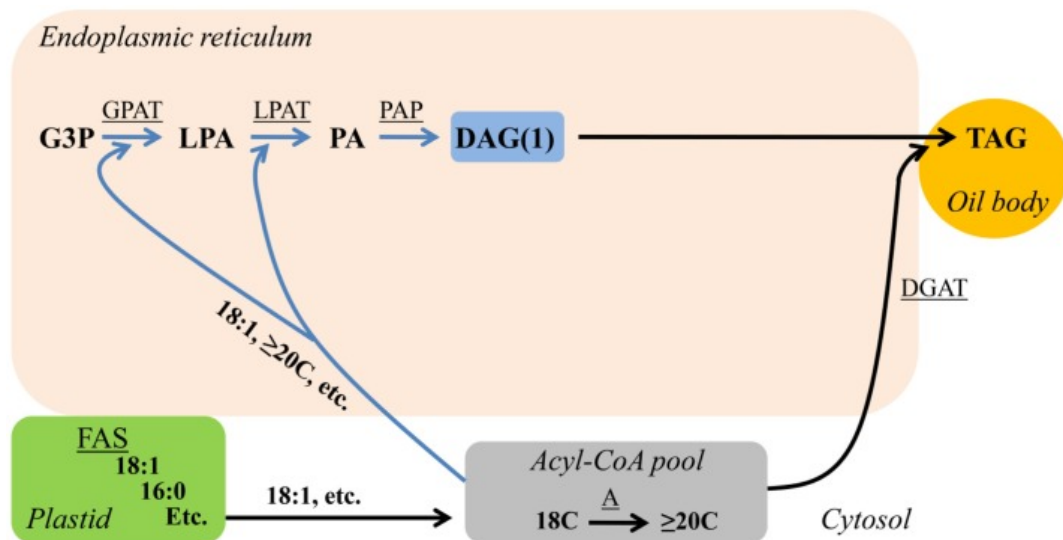


Figura 1.8 Síntesis *de novo* de TAG o *ruta de Kennedy*. Las flechas azules indican reacciones involucradas en la síntesis *de novo* de DAG y las reacciones enzimáticas están subrayadas. Imagen de Bates y Browse, 2012.

Después de la segunda acilación, actúa la ácido fosfatídico fosfatasa (PAP) desfosforilando el PA para formar DAG *de novo*. Arabidopsis contiene al menos 11 genes como posibles PAP responsables de la síntesis *de novo* de DAG (Figura 1.8). Un doble knockout de dos de estos genes (*PAH1* y *PAH2*) resultó en una reducción de un 15% en los niveles de FA en semilla (Eastmond et al., 2010) por lo que otras isoenzimas deben estar contribuyendo a la síntesis de TAG.

La tercera acilación es conducida por la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT). Hoy día se han clonado numerosos genes *DGAT* a partir de una gran variedad de organismos, poniéndose de manifiesto la existencia de al menos tres familias evolutivamente diferentes: DGAT1, DGAT2 y DGAT3 (Kroon et al., 2006; Lung y Weselake, 2006). DGAT1 y DGAT2 se localizan en la membrana del RE pero parecen estar localizadas en diferentes áreas de ésta (Shockey et al., 2006) y, además, difieren en su secuencia, topología estructural y en la especificidad de sustrato (Lung y Weselake, 2006). La manipulación genética de DGAT1 ha demostrado que es la principal enzima que cataliza la producción de TAG en Arabidopsis (Katavik et al., 1995; Zou et al., 1999; Zhang et al., 2009). La función de DGAT2 en Arabidopsis permanece poco clara (Zhang et al., 2009) pero en algunas plantas como *Ricinus communis* y *Vernicia fordii*, DGAT2 se encuentra altamente expresada durante la maduración de la semilla y parece ser la enzima responsable de la mayoría de la síntesis de TAG (Shockey et al., 2006; Kroon et al. 2006).

En cuanto a la especificidad por sustrato, DGAT1 posee un amplio rango de afinidad por distintos FAs, jugando un papel principal en la biosíntesis de TAG durante el desarrollo de la semilla (Lung y Weselake, 2006), mientras que DGAT2, relegada en ocasiones a un segundo plano, parece tener un papel clave en la incorporación de FAs inusuales a TAGs en aquellas plantas que los acumulan (Kroon et al., 2006; Yen et al., 2008; Liu et al., 2012). Así, la contribución relativa de estas enzimas a la formación de lípidos de reserva en semillas varía entre especies e incluso entre tejidos de un mismo organismo (Cases et al., 1998; Shockey et al., 2006; Chen et al., 2007; Li et al., 2010a).

Por último, DGAT3, a diferencia de las dos anteriores, es soluble y se localiza en el citosol (Saha et al., 2006). En cuanto al papel que pudiera desempeñar en la producción de lípidos de reserva, parece estar claro que no es crucial (Cahoon et al., 2007; Cao et al., 2013).

En general, al ser responsable del último paso de la biosíntesis de TAG y no estar implicada en la de lípidos de membrana, DGAT es considerada la enzima clave en el control de la tasa de síntesis de TAG en semillas (Ichihara et al., 1988; Cahoon et al., 2007; Napier, 2007; Venegas-Calderón et al., 2010). Además, las distintas especificidades por sustrato la convierten en responsable directa de la distribución de los distintos FAs en TAGs, por lo que su caracterización resulta fundamental en la modificación de determinados aceites.

La síntesis de TAG *de novo* también puede utilizar FA inusuales producidos en los plastidios con longitudes de cadena más cortas, como ácido láurico (12:0) encontrado en coco (*Cocos nucifera*) (Dyer et al., 2008) o FA inusuales con variaciones en la ubicación del doble enlace, como el ácido petroselinico (18:1^{Δ6}) que se encuentra en el cilantro (*Coriandrum sativum*) (Cahoon y Ohlrogge, 1994). Además, la *ruta de Kennedy* puede utilizar acil-CoAs elongados 20 o más carbonos en el citosol y RE (Figura 1.8), como el ácido erúxico (22:1^{Δ13}), que se encuentra en la colza (*Brassica napus*) (Dyer et al., 2008) y en Pennycress (*Thlaspi arvense*) (Claver et al., 2017).

A pesar de considerarse a la ruta de Kennedy como la vía central de biosíntesis de TAG en semillas, existen además otras rutas interconectadas a ésta en la que están implicadas diversas enzimas (Chapman y Ohlrogge, 2011; 2012; Li-Beisson et al., 2013). Las contribuciones de estas rutas alternativas a la composición final del TAG pueden ser sustancialmente diferentes entre sí y, además, pueden variar en función no sólo del tejido o especie en cuestión, sino también por cambios en las condiciones ambientales y/o estadios de desarrollo (Bates y Browse, 2012; Banaś et al., 2010). En general, tan sólo una pequeña porción de los acil-CoAs y DAG sintetizados están implicados en la ruta de Kennedy: el 60% de los acil-CoAs son directamente

acilados a lisofosfatidilcolina (LPC) para formar el denominado pool de PC a través del cual los acil-CoAs son modificados (Bates et al., 2009), mientras que la mayoría del DAG es convertido nuevamente a PC (Vogel y Browse, 1996).

1.1.6.2. El ciclo de modificación de ácidos grasos en PC o *acyl editing cycle*.

PC funciona como un intermediario central en el flujo de acil-CoAs, ya que su posición *sn*-2 es el sitio principal en el que tienen lugar las modificaciones de ácidos grasos en el RE (desaturación, hidroxilación, etc.) (Ohlrogge y Jaworski, 1997). La gran mayoría de las semillas oleaginosas se basan en enzimas que desaturan o modifican los acil-CoAs esterificados en PC para producir TAG con una composición diversa de ácidos grasos. Por ejemplo, los ácidos grasos comunes modificados en PC que se encuentran en los lípidos de membrana y de almacenamiento, 18:2 y 18:3, son producidos por desaturasas localizadas en RE que utilizan PC como sustrato (Stymne y Stobart, 1987; Sperling et al., 1993). Además, PC es el sitio para la producción de FA atípicos con grupos funcionales inusuales o posiciones poco frecuentes de los dobles enlaces. Por ejemplo, el ácido ricinoleico (ácido 12-hidroxi-9-*cis*-octadecenoico) se produce a partir de 18:1-PC en ricino (*Ricinus communis*) por una FA hidroxilasa (Moreau y Stumpf, 1981; Bafor et al., 1991; Vandeloos et al., 1995).

El ácido graso recién sintetizado en el plastidio puede ser incorporado a PC para su modificación mediante la síntesis de PC a partir de DAG *de novo*, o mediante su incorporación directa a PC (Bates et al., 2007; Bates et al., 2009; Li-Beisson et al., 2010). Se trata de un ciclo de desacilación-reacilación de PC que intercambia el acil-CoA de PC con el pool de acil-CoA sin síntesis neta ni degradación de PC. El ciclo comienza con la liberación de un acil-CoA modificado en PC, generando liso-fosfatidilcolina (LPC) por la acción inversa de la lisofosfatidilcolina aciltransferasa (LPCAT) (Stymne y Stobart, 1984) o por una fosfolipasa A (Chen et al., 2011b). La posterior esterificación de un acil-CoA a LPC por LPCAT genera PC y completa el ciclo. Este ciclo permite que un acil-CoA procedente del plastidio se incorpore a PC mientras que un acil-CoA ya modificado en PC se libere al pool donde pueden participar en la producción de DAG *de novo* (Stymne y Stobart, 1987; Bafor et al., 1991; Bates et al., 2007; Bates et al., 2009). Sin embargo, no todos los acil-CoA que ingresan en PC están destinados a modificaciones (Cahoon y Ohlrogge, 1994). El ciclo de modificación de ácidos grasos en PC o *acyl editing cycle* está representado en la figura 1.9.

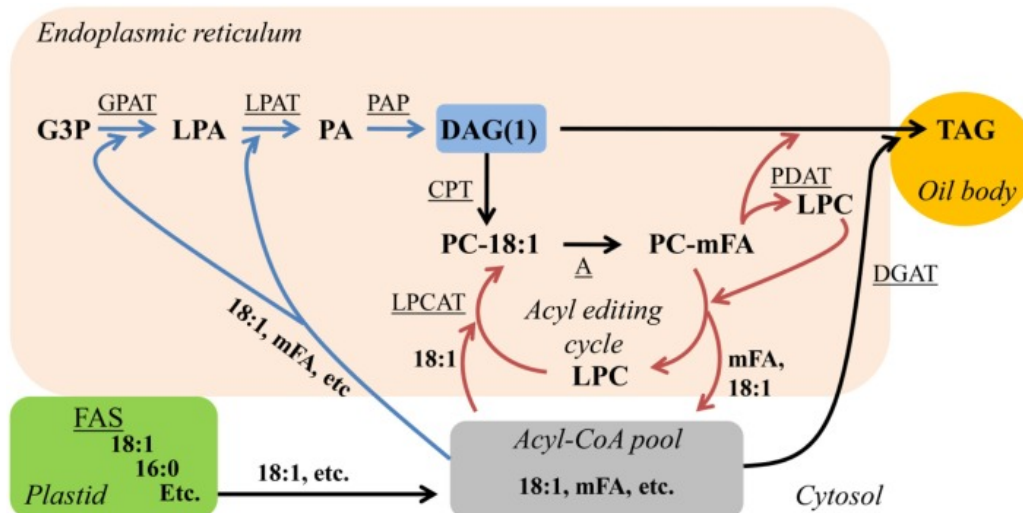


Figura 1.9 El ciclo de modificación de ácidos grasos en PC y su contribución a la síntesis *de novo* de DAG/TAG. Las flechas azules indican reacciones involucradas en la síntesis *de novo* de DAG y las flechas rojas indican reacciones del ciclo de modificación de ácidos grasos en PC. Las reacciones enzimáticas están subrayadas. Imagen de Bates y Browse, 2012.

También puede tener lugar la transferencia directa de un acil-CoA desde la posición *sn*-2 de PC a la posición *sn*-3 de DAG para producir TAG y LPC, mediante la fosfolípido:diacilglicerol aciltransferasa (PDAT) (Dahlqvist et al., 2000). LPC puede ser reacilado por LPCAT y producir PC (Xu et al., 2012) de nuevo.

El flujo de acil-CoAs en la posición *sn*-3 de TAG a través de las actividades DGAT o PDAT está poco claro en la mayoría de las plantas oleaginosas. En el mutante *dgat1* de *Arabidopsis* solo se redujo el contenido de aceite en un 20-30% (Katavik et al., 1995; Zou et al., 1999) y en el mutante *pdat1* no hubo efecto sobre la acumulación de TAG (Mhaske et al., 2005). Un doble knockout es letal y iRNA específico de semillas para PDAT en mutantes *dgat1* redujo el 80% del aceite (Zhang et al., 2009). Por tanto, estos resultados sugieren que hay una superposición de las funciones de DGAT y PDAT, permitiendo a PDAT compensar parcialmente un knockout DGAT, y a DGAT compensar completamente la falta de PDAT. Por otro lado, PDAT parece tener alta actividad con PC que contiene acil-CoAs inusuales (Stahl et al., 2004; Kim et al., 2011), lo que sugiere que puede estar involucrado en la eliminación de acil-CoAs dañados o inusuales de la membrana y canalizarlos hacia la producción de TAG.

Por lo tanto, la composición de ácidos grasos del TAG producido por la ruta de Kennedy depende de los flujos relativos de exportación de acil-CoAs del plastidio, la elongación de estos

y su modificación en PC para producir un pool de acil-CoA variado para la síntesis de DAG y TAG a través de DGAT o PDAT.

1.1.6.3. Biosíntesis de TAG derivada de PC.

Además de la ruta de Kennedy y la contribución del *acyl editing cycle* a la misma, también puede tener lugar la síntesis de DAG derivada de PC. Este mecanismo comienza con la producción de PC a partir de DAG sintetizado *de novo* (lo denominaremos en este apartado DAG (1)) por la acción de la enzima CDP-colina:diacilglicerol colinofosfotransferasa (CPT) (Li-Beisson et al., 2010) o, bien, por la acción de fosfatidilcolina:diacilglicerol colinofosfotransferasa (PDCT), que intercambia la fosfocolina entre PC y DAG generando nuevas especies moleculares de ambos y, por tanto, no conduce a una acumulación neta de PC o DAG (Lu et al., 2009) (Figura 1.10).

Una vez que se forma PC a partir de DAG (1) por la acción de CPT o de PDCT, los acil-CoAs esterificados en PC están disponibles para su modificación en el *acyl editing cycle*, generándose nuevas especies moleculares de PC. A partir de estas nuevas especies de PC pueden generarse a su vez nuevas especies de DAG (las denominaremos DAG (2)) por la eliminación del grupo fosfocolina. DAG (2) derivado de PC puede ser producido simultáneamente a la producción de PC a partir de DAG (1), gracias a la actividad simétrica de PDCT (Lu et al., 2009) (Figura 1.10). además, la producción de DAG (2) derivado de PC también puede tener lugar por la acción inversa de CPT (Slack et al., 1983; 1985). Por otro lado, reacciones mediadas por la fosfolipasa C o fosfolipasa D (Lee et al., 2011) y la ácido fosfatídico fosfatasa (PAP) también pueden contribuir a la producción de DAG (2) derivado de PC. Tanto DGAT como PDAT pueden utilizar DAG (2) derivado de PC para la producción final de TAG.

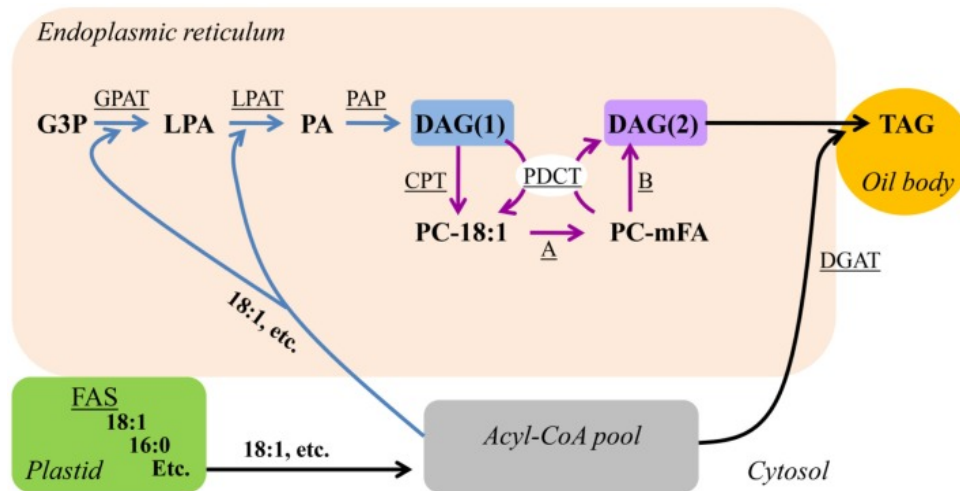


Figure 1.10 Síntesis de TAG a partir de DAG (2) derivado de PC. Las flechas moradas indican reacciones involucradas en la síntesis de DAG (2) derivado de PC y las flechas azules indican la síntesis *de novo* de DAG (1). Las reacciones enzimáticas están subrayadas. Imagen de Bates y Browse, 2012.

Por tanto, la síntesis de DAG (2) derivado de PC requiere la producción de DAG dos veces: la síntesis *de novo* de DAG (1), su posterior conversión a PC y la síntesis de DAG (2) derivada de PC (Figura 1.10). Dado que PC es el sitio de modificación de acil-CoAs en el *acyl editing cycle*, las especies moleculares de DAG (2) derivado de PC son significativamente diferentes a las especies moleculares de DAG (1) sintetizado *de novo*, utilizadas para producir PC. Por ello, la síntesis de DAG (2) derivado de PC puede ser un mecanismo para producir un sustrato DAG para TAG con un incremento de acil-CoAs modificados en PC, más de lo que podría producirse únicamente mediante el *acyl editing cycle* y síntesis de DAG (1) *de novo* (Figura 1.9).

1.1.6.4. Combinación de las diferentes vías de biosíntesis de TAG.

Es probable que diferentes tipos plantas utilicen diferentes combinaciones de las vías anteriores del flujo de acil-CoAs a través de PC. Por ejemplo, en *Arabidopsis* se demostró que la modificación de acil-CoAs en el *acyl editing cycle* y el DAG (2) derivado de PC son los responsables de, por lo menos, 2/3 del flujo de PUFA desde PC al TAG en las semillas (Bates et al., 2012). Por otro lado, el análisis del flujo de ácidos grasos en soja determinó que alrededor de un 90% de todos los acil-CoAs del TAG fluyen a través de PC, ya sea por el *acyl editing cycle* o por el uso predominante de DAG (2) derivado de PC, estén modificados o no (Bates et al., 2009). Conclusiones similares se han obtenido en *Arabidopsis*, que contiene altas tasas de

modificación de acil-CoAs en PC (Tjellstrom et al., 2012; Bates et al., 2012) y utiliza predominantemente DAG (2) derivado de PC durante la síntesis de TAG (Bates y Browse, 2011). El hecho de presentar altas tasas de flujo del *acyl editing cycle* sin las modificaciones correspondientes en los ácidos grasos presentes en el TAG final, sugiere la importancia del ciclo como un mecanismo para la exportación de los ácidos grasos del plastidio, siendo LPC el posible principal aceptor de estos (Tjellström et al., 2012), y para el tráfico de lípidos mediado por PC a sitios específicos de RE para la síntesis de TAG u otros procesos celulares, tales como el mantenimiento de la homeostasis de la membrana (Bates et al., 2007).

Por otro lado, los análisis *in vivo* de los flujos metabólicos sugieren que DAG (1) sintetizado *de novo* y DAG (2) derivado de PC son reservorios distintos que no se entremezclan (Bates et al., 2009). Una evidencia de ello es la acumulación en TAG de ácidos grasos inusuales modificados en PC que tiene lugar en la mayoría de las especies de plantas, mientras que esta acumulación es mínima en los lípidos de membrana (Stahl et al., 1995; Millar et al., 2000). El funcionamiento de esa canalización es desconocido, pero puede involucrar enzimas específicas para acil-CoAs inusuales (Kim et al., 2011; Li et al., 2010b; Bursal et al., 2008; Hu et al., 2012) y, además, una separación en diferentes subdominios de la membrana RE de las diferentes actividades biosintéticas de lípidos (Shockey et al., 2006; Gidda et al., 2011). Si hay una separación espacial en la membrana de la ruta de Kennedy y de la síntesis de DAG derivado de PC, entonces PC podría actuar como una molécula de tráfico de DAG a través de la membrana.

En cuanto a la regulación la biosíntesis de TAG, numerosos factores de transcripción están involucrados en un complejo sistema que integra la producción de TAG con otros aspectos del desarrollo de semillas (Santos-Mendoza et al., 2008; Suzuki y McCarty, 2008). Como se ha comentado anteriormente, el factor de transcripción WRINKLED1 funciona downstream (“aguas abajo”) (Cernac y Benning, 2004; Baud et al., 2007; Mu et al., 2008) regulando la expresión de genes importantes para la glucólisis y para la síntesis de ácidos grasos, pero no hay evidencias de que controle la expresión de cualquiera de las aciltransferasas y demás enzimas necesarias para el ensamblaje del TAG (To et al., 2012; Ruuska et al., 2002; Baud et al., 2007).

1.2. EL ACEITE DE CULTIVOS OLEAGINOSOS COMO MATERIA PRIMA PARA APLICACIONES INDUSTRIALES.

Los aceites vegetales (TAG) son una importante parte de nuestra bioeconomía, ya que realizan una enorme contribución a la nutrición humana y ganadera, pero además proporcionan materia prima para la producción de diversos productos químicos industriales, incluido el biodiesel (Durrett et al., 2008; Dyer et al., 2008). El volumen de aceite vegetal producido a nivel mundial ha aumentado sustancialmente en las últimas décadas y sobrepasa los 150 millones toneladas métricas por año (van Erp et al., 2014). Además de la creciente producción de aceite vegetal, la preocupación por el desarrollo sostenible y el deseo de utilizar las plantas como materias primas para productos industriales también han llevado a iniciativas para manipular la calidad y cantidad del mismo (Murphy, 2005).

Se han conseguido progresos gracias a las técnicas convencionales de mejora vegetal en combinación con una mejor gestión de los cultivos (Weselake et al., 2009). Sin embargo, es necesario un enfoque biotecnológico que explore el potencial de las tecnologías de manipulación genética y, así, impulsar el flujo metabólico de carbono hacia la producción de aceite dentro de semillas en desarrollo (Weselake et al., 2009), entre otras modificaciones como lograr una determinada composición de ácidos grasos en los aceites. Desafortunadamente, las rutas metabólicas implicadas en la síntesis de aceite y su propia regulación son complejas y no del todo conocidas (Würschum et al., 2012), lo que ha limitado en muchos casos la intervención biotecnológica (Ohlrogge y Jaworski, 1997).

Por lo tanto, la modificación del metabolismo lipídico en los cultivos oleaginosos se centra en dos aspectos fundamentales: el aumento del contenido de aceite de las semillas y la modificación de la composición de ácidos grasos del aceite, es decir, de la calidad del aceite producido.

1.2.1. Aumento del contenido de aceite de las semillas oleaginosas.

La mejora en el contenido de aceite de las semillas está encaminada a incrementar el rendimiento de aceite por unidad de superficie, disminuyendo consigo los costes de producción (Frentzen, 1998; Dyer y Mullen 2005; Lung y Weselake, 2006). Incluso un pequeño porcentaje de aumento en el rendimiento de aceite por hectárea en un cultivo como la soja puede aumentar más de mil millones de dólares el valor mundial anual de la cosecha.

El incremento de aceite en la semilla se centra en el control del flujo de carbono hacia la producción de aceite (Weselake et al., 2009; Baud y Lepiniec, 2010). Las contribuciones a la mejora del contenido de aceite se han producido principalmente a través de técnicas clásicas de mejora vegetal en plantas oleaginosas de gran interés como colza y soja (Weselake et al., 2009). Actualmente, el uso de técnicas de ingeniería genética ha permitido abordar esta mejora desde otro punto de vista. Inicialmente, la atención se centró en la modificación de los primeros pasos de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos. Ejemplos de ello, fueron el aumento de aceite que se obtuvo en semillas de colza al sobreexpresar una variante ACC citosólica (Töpfer et al., 1995) o en semillas de *Arabidopsis* al expresar la ACC citosólica en el plastidio (Roesler et al., 1997). También ha habido un considerable interés en modificar la acción de factores de transcripción que pueden regular reacciones bioquímicas del flujo de carbono, interactuando con las regiones promotoras de los genes que codifican enzimas involucradas. Como se ha comentado anteriormente, los factores de transcripción identificados parecen regular la expresión de las enzimas involucradas en la biosíntesis de los ácidos grasos y en otros aspectos del flujo de carbono, pero no en el ensamblaje de triacilglicerol, como es el caso de WR11 (To et al., 2012; Ruuska et al., 2002; Baud et al., 2007). No obstante, algunos estudios muestran que el contenido de aceite se redujo un 80% en mutantes *wri1* y la sobreexpresión de WR11 aumentó el contenido de aceite en embrión de maíz en más del 30% (Shen et al., 2010).

Sin embargo, la tendencia actual es modificar los pasos finales de la biosíntesis de TAG, ya que así no se producen moléculas intermediarias que puedan estar involucradas en otras rutas metabólicas. Por esa razón, se están estudiando las aciltransferasas y sus mecanismos de regulación y, entre ellas, cabe destacar el papel de DGAT. Algunos estudios han demostrado que el nivel de actividad DGAT determina el contenido en aceite de la semilla, por lo que parece ser crucial tanto en aspectos cuantitativos como cualitativos de la síntesis de aceite. Por ejemplo, la sobreexpresión de DGAT1 de *Arabidopsis* incrementa la acumulación de aceite en semilla (Jako et al., 2001), la expresión de DGAT1 de *Arabidopsis* o colza en colza incrementa la acumulación de aceite y el peso de la semilla (Ohlrogge y Jaworski, 1997; Weselake et al., 2007, 2008; Taylor et al., 2009), de la misma manera que la sobreexpresión de DGAT1 de *Jatropha curcas* en *Arabidopsis* también incrementa el contenido de aceite (Misra et al., 2013).

A pesar de que hay docenas de informes de manipulaciones genéticas que aumentan el aceite de semilla (Weselake et al., 2009), hasta ahora hay pocos ejemplos donde tales aumentos se hayan demostrado en ensayos de campo. Uno de ellos fue el ensayo realizado con cultivo de colza transgénica, sobreexpresora del gen *DGATI*. El resultado fue un aumento en el contenido de aceite, tanto en condiciones de invernadero como en condiciones de campo (Weselake et al.,

2008). Este fue el primer ejemplo de cómo la sobreexpresión de *DGATI* puede ser útil si el objetivo es aumentar el contenido de aceite en un cultivo oleaginoso (AOCS Lipid Library).

1.2.2. Mejora de la calidad del aceite de las semillas oleaginosas.

1.2.2.1. Modificación de la composición total de ácidos grasos del aceite.

Además del contenido de aceite, el otro posible aspecto a mejorar es su calidad. La calidad de un aceite vegetal y sus propiedades físico-químicas dependen principalmente del uso a que se destine dicho aceite y están determinadas por la composición de ácidos grasos (Frentzen, 1998) y su distribución en las moléculas de TAG (Gunstone y Harwood, 2007). La modificación de la composición de ácidos grasos del aceite mediante técnicas de ingeniería genética recae sobre la actividad de determinadas enzimas que se citarán a continuación.

Los **ácidos grasos poliinsaturados** predominantes en aceites vegetales son por lo general el ácido linoleico (18:2) y linolénico (18:3). La síntesis de 18:2 está controlada por la actividad FAD2, enzima reticular que utiliza 18:1-PC como sustrato y es responsable de su desaturación a 18:2-PC. La síntesis de ácido 18:3 es controlada por la actividad FAD3, enzima también reticular que actúa sobre 18:2-PC para formar 18:3-PC. Estos ácidos grasos confieren a los aceites cierta inestabilidad tecnológica, por lo que la tendencia general es reducir su contenido. Las modificaciones se centran principalmente sobre la actividad de FAD2, ya que la cantidad de ácido 18:3 también está regulada por esta enzima (Hitz et al., 1995; Liu et al., 2002a; Haun et al., 2012). Por lo general, un descenso de estos PUFAs lleva consigo un aumento de los niveles de ácido oleico (18:1) sin ninguna otra modificación apreciable (Chapman et al., 2001).

De los **ácidos grasos monoinsaturados**, el mayoritario en aceites vegetales es el ácido oleico (18:1). La cantidad de 18:1 está controlada por SAD, enzima que utiliza 18:0-ACP desaturándolo a 18:1-ACP. No obstante, las modificaciones del contenido de 18:1 por ingeniería genética se centran principalmente sobre la actividad de la ya mencionada FAD2 y/o de las tioesterasas FATA y FATB, responsables de su liberación de desde el plastidio para su incorporación a TAG (Hitz et al., 1995; Lacombe et al., 2009).

Otros ácidos grasos monoinsaturados interesantes para ciertas aplicaciones industriales son los

de cadena larga o VLCFAs, como el ácido erúxico (22:1), producto de la enzima elongasa FAE1. Las modificaciones de los niveles de 22:1 se centran principalmente en la actividad de FAD2, FATA y FATB, ya que controlan los niveles del 18:1 disponible para FAE1 y, como no podía ser de otra manera, en la actividad de la propia FAE1 (Lassner et al., 1996; Katavic et al., 2001; Mietkiewska et al., 2004, 2007; Barret et al., 1998; Han et al., 2001; Zebarjad et al., 2006) (Figura 1.11). Generalmente, un aumento en VLCFAs monoinsaturados únicamente lleva consigo un descenso de los niveles de PUFAs.

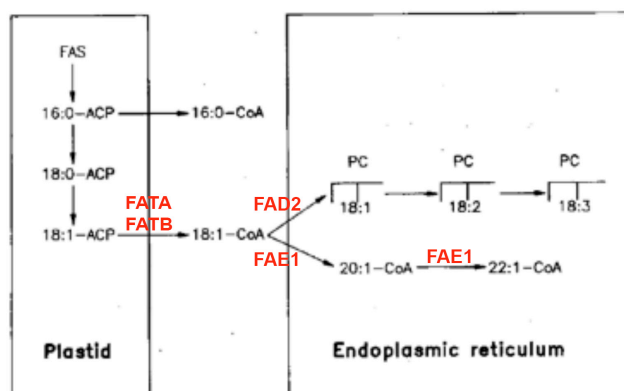


Figura 1.11 Rutas involucradas en la síntesis de VLCFAs y PUFAs en semillas en desarrollo de Brassicaceae. En rojo se muestran las enzimas diana de las modificaciones de los niveles de 22:1. Imagen adaptada de Kunst et al., 1992.

Además de la composición del pool de acil-CoAs, las especificidades de sustrato de FAE1 juegan un papel decisivo en la determinación de la longitud de la cadena y del grado de insaturación de los productos elongados (Lassner et al., 1996; Millar and Kunst, 1997; Millar et al., 1998; Cahoon et al., 2000). Por ejemplo, las FAE1 de jojoba y Arabidopsis usan preferentemente acilos saturados y monoinsaturados, pero la FAE1 de jojoba difiere de la de Arabidopsis en su habilidad de utilizar VLCFA, como 22:1-CoA (Lassner et al., 1996; Millar and Kunst, 1997). Estas diferencias en las propiedades enzimáticas se reflejan en la diferente composición VLCFA del aceite. Por ello, si el objetivo es aumentar la síntesis de 22:1 será necesaria la sobreexpresión de genes codificantes de FAE1 con una especificidad por 18:1- y 20:1-CoA.

En cuanto a los **ácidos grasos saturados** encontrados en aceites vegetales son, por lo general, el ácido palmítico (16:0) y esteárico (18:0). La cantidad de 16:0 está controlada por el balance de las actividades de KASI, KASII, FATA y FATB. El nivel de 18:0, además, es también controlado por la actividad de SAD. Las modificaciones, por tanto, recaen principalmente sobre

la actividad de dichas enzimas (Knutzon et al., 1992; Liu et al., 2002a, 2002b; Pantalone et al., 2002; Aghoram et al., 2006; Pérez-Vich et al., 2006; Zhang et al., 2008). Un aumento de 18:0 lleva consigo un descenso de los niveles de 18:1. Por el contrario, un incremento en el contenido de 16:0 suele ir asociado con un incremento en ácido palmitoleico (16:1) y ascléptico (18:1^{Δ11}).

1.2.2.2. Modificación de la distribución de ácidos grasos en TAG.

Con el fin de mejorar la calidad del aceite vegetal, también pueden realizarse alteraciones en la distribución de los ácidos grasos en las moléculas de TAG. Para ello, hay que tener en consideración los flujos relativos de la síntesis de TAG, que puede ser predominantemente a través de la síntesis *de novo* o a partir de DAG derivado de PC. En líneas generales, los ácidos grasos insaturados están presentes principalmente en la posición *sn-2* del TAG, siendo los VLCFAs generalmente excluidos de esta, mientras que las especies saturadas quedan relegadas a las posiciones *sn-1* y *sn-3* (Miquel y Browse, 1995). A pesar de que ciertas especies moleculares suelen predominar (Brockerhoff, 1971; Fatemi et al., 1977), en los aceites vegetales existe un grupo heterogéneo de moléculas de TAG difícil de caracterizar. Esta distribución depende de la especificidad de sustrato de las aciltransferasas de la *ruta de Kennedy* GPAT, LPAAT y DGAT. Por ello, las modificaciones pueden lograrse introduciendo el gen codificante de la enzima que presente la especificidad de sustrato deseada, procedente de otra fuente vegetal si así es requerido.

Por ejemplo, la selectividad de LPAAT influye en la distribución estereoespecífica de los ácidos grasos en TAGs y su caracterización ha sido clave a la hora de modificar la composición de determinados aceites. Un gran obstáculo para producir ácidos grasos industrialmente útiles en semillas oleaginosas de Brassicaceae es la incapacidad de LPAAT de incorporarlos en la posición *sn-2* de TAG (Frentzen, 1993; Voelker et al., 1996). La colza proporciona un claro ejemplo para este caso. El ácido erúico es el VLCFA mayoritario en el aceite de colza, con cantidades de 45-60% del total de ácidos grasos. Debido a sus efectos nutricionales negativos, un aceite con niveles tan altos de 22:1 no es adecuado como aceite comestible. Este hándicap propició la aparición de una variedad de colza de bajo contenido en erúico (LEAR, del inglés low-erucic-acid Rapeseed) por técnicas clásicas de cruzamiento y selección vegetal, la cual no presenta prácticamente 22:1 en su aceite (Harvey and Downey, 1964; Lühs et al., 1999; Stefansson et al., 1961; Lööf y Appleqvist, 1972). Sin embargo, la variedad de alto contenido en

ácido erúxico (HEAR, del inglés high-erucic-acid rapeseed) ha ganado interés últimamente para propósitos industriales. El 22:1 es exclusivamente esterificado en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 de TAG debido a que LPAAT no incorpora 22:1 a la posición *sn*-2, lo cual limita el contenido en erúxico a un 67% (Frentzen, 1993). Para superar este límite y mejorar todavía más sus propiedades oleoquímicas, se combinaron las técnicas clásicas de cruzamiento vegetal con la ingeniería genética. Al expresar la LPAAT de *Limnanthes douglasii*, específica de 22:1-CoA, en semillas HEAR, se produjo una canalización de 22:1 en la posición *sn*-2 de TAG dando lugar a trierucoil glicerol. No obstante, esta modificación no causó un aumento en el contenido total de 22:1 en el aceite (Lassner et al., 1995; Brough et al., 1996; Weier et al., 1997). Por ello, además de expresar dicha LPAAT, puede ser necesario un aumento de la actividad FAE1 para obtener un incremento del pool de 22:1-CoA y lograr altos niveles de 22:1 en aceite de colza transgénica.

Para modificar los niveles de ciertos ácidos grasos inusuales en TAG, debe considerarse la contribución del DAG derivado de PC. Estos ácidos grasos inusuales son modificados en PC y tienen gran potencial como materias primas industriales para la producción de lubricantes, polímeros, resinas, detergentes, etc. Con pocas excepciones (Knutzon et al., 1999; Nguyen et al., 2010), los intentos de diseñar plantas oleaginosas que acumulen ácidos grasos inusuales han originado bajos rendimientos de estos en TAG, especialmente si son sintetizados en lípidos de membrana (Cahoon et al., 2007; Dyer et al., 2008; Lu et al., 2011). Ello es debido a que muchas plantas transgénicas presentan **cuellos de botella metabólicos** entre el sitio de producción del ácido graso modificado y su acumulación en TAG (Cahoon et al., 2007). La causa es que la planta transgénica no utiliza de manera eficiente el ácido graso inusual en cualquier parte de la ruta biosintética de TAG, como puede ser su eliminación de PC. Recientemente se ha demostrado que el flujo de síntesis de TAG a través de DAG derivado de PC es un cuello de botella en plantas que expresan la hidroxilasa de ácidos grasos de ricino (Bates y Browse, 2011). Una manera de mejorar el flujo de los ácidos grasos inusuales de PC a TAG en plantas transgénicas es la coexpresión de enzimas de síntesis de TAG (DGAT, PDAT, CPT o PDCT) selectivas para ácidos grasos modificados en PC, junto con las enzimas que modifican el ácido graso en cuestión mientras está esterificado a PC (Burgal et al., 2008; Li et al., 2010b; Kim et al., 2011; van Erp et al., 2011; Li et al., 2012).

Otra alternativa puede ser el uso de plantas huésped que utilicen principalmente una vía de biosíntesis *de novo*, de manera que el DAG que contenga los ácidos grasos modificados estará directamente disponible para la síntesis de TAG. La estrategia ideal para obtener aceites con ciertos ácidos grasos modificados en PC sería identificar o diseñar una planta que presente una alta tasa de *acyl editing cycle*, para eliminarlos fácilmente de PC, y que utilice principalmente la

síntesis *de novo* (Bates y Browse, 2012). Desgraciadamente, los flujos relativos de la síntesis de TAG *de novo* o a partir de DAG derivado de PC son desconocidos en la mayoría de las especies de plantas. Sin embargo, gracias a estudios de marcaje radioactivo se ha observado que parece existir una correlación entre un alto contenido alto de PUFA ($\geq 48\%$) en el aceite con una predominancia de la síntesis de TAG a partir de DAG derivado de PC, y entre un bajo contenido de PUFA ($\leq 16\%$) con una vía de síntesis *de novo*. En cuanto a las especies que acumulan cantidades intermedias de PUFA (20-40%) en el aceite, no está claro si este nivel de acumulación de PUFA se debe únicamente a la modificación en PC y síntesis *de novo*, o si se da una combinación de ambas rutas (Bates y Browse, 2012).

Se han propuesto algunas especies de la familia Brassicaceae con esta finalidad, ya que al estar emparentadas con *Arabidopsis* se pueden utilizar los recursos genéticos disponibles y, además, son cultivos oleaginosos no alimentarios. Según el contenido de ácidos grasos modificados en PC de 52% (Zubr y Matthäus, 2002), cabría esperar que *Camelina sativa* utilice una ruta de síntesis derivada de PC similar a la de *Arabidopsis*. Sin embargo, *Crambe abyssinica*, tiene un contenido ácidos grasos modificados en PC del 15% (Dyer et al. 2008), por lo que posiblemente haya una mayor contribución de la *ruta de Kennedy*. Curiosamente, en el mutante *pdct* de *Arabidopsis* (deficiente en la ruta de síntesis de DAG derivado de PC) se redujo significativamente el flujo de DAG derivado de PC y mostró en TAG un 29% de ácidos grasos modificados en PC (Lu et al., 2009). Este porcentaje representa lo que las especies Brassicaceae pueden lograr mediante la *ruta de Kennedy* en combinación con *acyl editing cycle*. Las plantas con niveles endógenos de ácidos grasos modificados en PC similares al mutante *pdct* de *Arabidopsis* incluyen *B. napus*, tanto la variedad LEAR como HEAR. No obstante, son necesarios más estudios para determinar la vía predominante de síntesis de TAG en estas y otras especies, y para dilucidar qué contenido de ácidos grasos modificado en PC corresponde a los flujos relativos de la síntesis *de novo* de TAG y a DAG derivado de PC.

1.2.3 Influencia de la estructura química de los ácidos grasos en el aceite.

Como ya se ha comentado anteriormente, las propiedades del aceite vegetal están fuertemente determinadas por la composición de ácidos grasos, lo que puede orientar la búsqueda y la mejora de cultivos con una composición óptima y, así, obtener un producto industrial con las mejores propiedades posibles. Las propiedades físico-químicas de los ácidos grasos derivan de la presencia de un grupo carboxilo terminal hidrofílico y de una cadena hidrocarbonada

hidrofóbica, lo cual convierte a los ácidos grasos en moléculas débilmente anfipáticas. El carácter anfipático es mayor cuanto menor es la longitud de la cadena hidrocarbonada.

Las propiedades que se ven afectadas directamente por la composición del aceite vegetal son la fluidez en frío, la estabilidad oxidativa, la viscosidad cinemática y el índice de cetano (Knothe, 2005, 2008, 2009; Moser, 2009, 2012).

La fluidez en frío del aceite está determinada por la longitud de la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos, su grado de saturación y la isomería de los dobles enlaces. En general, cuanto mayor es la longitud de la cadena hidrocarbonada, mayor es el punto de fusión del ácido graso (C12:0, MP 4,3 °C; C18:0, MP 37,7 °C) (Moser, 2012.). Por el contrario, la presencia de dobles enlaces hace que el punto de fusión disminuya (C18:0, MP 37,7 °C; C18:1, MP -20,1 °C; C18:2 -43,1 °C y C18:3, MP -52 °C) (Moser, 2012.). Además, el punto de fusión puede variar en función del tipo de isomería que presenten los dobles enlaces. Cuando los dobles enlaces presentan isomería cis- se produce la formación de “codos” en las cadenas hidrocarbonadas que hacen que disminuya la capacidad de unión entre las cadenas adyacentes y, consecuentemente, el punto de fusión. En cuanto los dobles enlaces trans-, que únicamente introducen un pequeño ángulo en la cadena, asemejándose más a las propiedades físico-químicas de los ácidos grasos saturados, con mayores puntos de fusión que la conformación cis-. Por ejemplo, el ángulo que produce el doble enlace cis del ácido oleico (18:1^{Δ9}) hace que su punto de fusión baje de 68,8°C del 18:0 a 15,2°C; sin embargo, el doble enlace trans- del ácido elaídico (18:1^{Δ9t}) no distorsiona tanto su estructura, por lo que el punto de fusión se mantiene en 44 °C. Así pues, en general, los puntos de fusión de los ácidos grasos insaturados son menores que los de sus homólogos saturados y trans (Tabla 1.3, primera columna).

Fatty acid	MP (°C)	KV (mm ² /s)	CN
C12:0	4.3	2.43	67
C12:0	-1.8	2.63	#
C14:0	18.1	3.30	#
C14:0	12.5	3.52	#
C16:0	28.5	4.38	86
C16:0	23.2	4.57	93
C16:1	-34.1	3.67	51
C16:1	-36.7	#	#
C18:0	37.7	5.85	101
C18:0	33.0	5.92	97
C18:0	25.6	7.59	92
C18:1	-20.1	4.51	59
C18:1	-20.3	4.78	68
C18:1	-34.8	5.69	62
C18:2	-43.1	3.65	38
C18:2	-56.7	4.25	40
C18:3	-52	3.14	23
C18:3	-61.7	3.42	27

Tabla 1.3 Propiedades físico-químicas de los ácidos grasos presentes en el biodiesel. Tabla adaptada de Moser, 2012.

La longitud de la cadena y el grado de insaturación afectan también a la viscosidad cinemática (KV) del aceite. Este parámetro aumenta conforme aumenta la longitud de la cadena, de manera que, ácidos grasos saturados como ácido láurico (12:0), palmítico (16:0) y esteárico (18:0) tienen KVs de 2,43, 4,38 y 5,85 mm²/s, respectivamente. Además, se observan bajos valores conforme incrementa el contenido en dobles enlaces: 18:0 con 5,85 mm²/s, 18:1 con 4,51 mm²/s, 18:2 con 3,65 mm²/s y 18:3 con 3,14 mm²/s (Knothe y Steidley, 2005) (Tabla 1.3, segunda columna).

La estabilidad oxidativa del aceite está influenciada por el grado de insaturación, por la localización de los dobles enlaces y por la isomería. La autooxidación comienza con la producción de radicales alquílicos causada por un iniciador que puede ser calor, luz, metales y peróxidos (Porter et al., 1995). Se observa una gran estabilidad oxidativa en aceites con un contenido relativamente alto de ácidos grasos saturados y/o relativamente bajo de insaturados. Además, los isómeros trans- son termodinámicamente más estables que sus correspondientes formas cis-, lo cual explica su mayor estabilidad oxidativa (Holman et al., 1947).

Otro parámetro importante para algunas aplicaciones industriales, como la producción de biodiesel, es el índice de cetano (CN). Se trata de una medida adimensional que determina el tiempo transcurrido entre la inyección del combustible y el comienzo de su combustión. Una

combustión de calidad ocurre cuando se produce una ignición rápida, seguida de un quemado total y uniforme del carburante. Un alto CN significa un corto tiempo de encendido y una mayor duración de la combustión, lo que finalmente da como resultado menores emisiones de partículas (Bart et al., 2010). Un factor que influye el número de cetano es la longitud de la cadena hidrocarbonada, de manera que, se observan altos valores para cadenas largas: para el 12:0 se observa un CN de 67, para 16:0 de 86 y para 18:0 de 101. Además, se ha demostrado la influencia de la insaturación en CN, disminuyendo a medida que aumenta el número de dobles enlaces: para 18:0 se observa un CN de 101, para 18:1 de 59, para 18:1 de 38 y para 18:2 de 23 (Knothe et al., 2003) (Tabla 1.3, tercera columna).

Por tanto, los ácidos grasos monoinsaturados juegan un papel muy importante en las propiedades de fluidez en frío, estabilidad oxidativa, viscosidad cinemática y número de cetano. En cambio, la presencia de ácidos grasos poliinsaturados da como resultado problemas con la estabilidad oxidativa y los ácidos grasos altamente saturados pueden dar lugar a una capacidad deficiente de fluidez en frío (Moser, 2012).

1.2.4. Criterios de selección de los aceites vegetales para aplicaciones industriales.

Los principales criterios de selección de los aceites vegetales son: disponibilidad, coste, calidad del aceite (composición de ácidos grasos) y vida del producto. Hay más de 350 plantas oleaginosas identificadas que pueden cultivarse con el fin de las aplicaciones industriales como la producción de biocombustibles, pinturas, barnices, materiales plásticos... Por ejemplo, la productividad de las plantas perennes es mayor, evitan la erosión, pueden cultivarse en zonas de montaña y algunas especies pueden cosecharse más de una vez al año. Las posibilidades de muchos aceites vegetales (ricino, semilla de uva, maíz, camelina, las semillas de haya, colza, altramuz, cacahuete, guisante, semillas de amapola, lino, girasol, cáñamo, castaño, palma, olivo, soja, algodón, manteca de karité) se tuvieron en consideración ya en la década de 1930s (Walton, 1938).

En cuanto a la producción de biodiesel, más del 95% de los aceites utilizados son aceites comestibles, por su disponibilidad fácil e inmediata en muchas regiones del mundo. Además, confieren propiedades adecuadas al biodiesel que le permiten ser utilizados como sustituto del diesel convencional (Borugadda y Goud, 2012). Sin embargo, el uso de los aceites comestibles con finalidades industriales puede crear algunos problemas de competencia entre el mercado de la alimentación y el mercado energético e industrial que, a su vez, provoca un encarecimiento de

la materia prima vegetal. Además, los cultivos oleaginosos convencionales, en muchos casos, no presentan una composición favorable de ácidos grasos y, en algunos casos, los lípidos no son obtenidos en buenos rendimientos. Con el fin de vencer estos problemas, se está incrementando el interés en aceites no comestibles, es decir, no adecuados para el consumo humano por la presencia de algunos compuestos tóxicos (Balat y Balat, 2008; Qian et al., 2010). Sin embargo, hay siempre una competición entre los cultivos aceitosos comestibles y no comestibles en cuanto al terreno de cultivo, por lo que el foco debe centrarse en fuentes no comestibles y, además, que puedan crecer en terrenos no dedicados a cultivos convencionales, en terrenos abandonados (Banković-Ilić et al., 2012).

Las ventajas de los aceites no comestibles son su naturaleza líquida, la disponibilidad inmediata, el factor renovable, la baja cantidad en sulfuros y compuestos aromáticos, la biodegradabilidad, la no competencia con la industria alimentaria, la posibilidad de cultivarse en terrenos no destinados a cultivos convencionales y la reducción de las concentraciones de CO₂ en la atmósfera gracias al crecimiento de estas plantas (Karmakar et al, 2010). En cuanto a los inconvenientes pueden citarse su alta viscosidad, baja volatilidad, el alto porcentaje en residuo de carbono, la reactividad de las cadenas hidrocarbonadas insaturadas así como un alto contenido de ácidos grasos libres, que pueden incrementar el coste del producto final. Además, los aceites de estas fuentes son, por lo general, inadecuados para el consumo humano y animal debido a la presencia de componentes tóxicos (No, 2011; Leung et al., 2010; Gui et al., 2008).

Las características ideales de los cultivos alternativos de semillas oleaginosas son la adaptabilidad a las condiciones locales de cultivo (precipitaciones, tipo de suelo y latitud), preferiblemente en climas templados ya que la mayoría de la energía consumida por la población humana, junto con el colectivo de infraestructuras, residen principalmente dentro de las zonas de clima templado. También es de gran importancia la disponibilidad regional, compatibilidad con las infraestructuras y prácticas ya implementadas para otros cultivos convencionales, requerimiento de inputs agrícolas mínimos (agua, fertilizantes y pesticidas), temporada de crecimiento definida, ratio de maduración de las semillas uniforme, salidas comerciales de los subproductos generados, adaptabilidad a terrenos de barbecho y tierras no adecuadas para la agricultura convencional, no competición con la cadena alimenticia, no desplazamiento de los cultivos convencionales ya existentes y posibilidad de rotación fuera de temporada con los cultivos alimentarios. En cuanto al aceite de las semillas, es de primordial importancia que las semillas contengan un alto contenido en aceite y con una composición favorable de ácidos grasos (Moser, 2009; Moser et al., 2009a). En la tabla 1.4 se muestran algunos cultivos no comestibles y el contenido de aceite de sus semillas.

Botanical name	Local name	Oil content, %
		Seed, wt.%
<i>Jatropha curcas</i>	Jatropha, ratanjyot	20–60
<i>Pongamia pinnata</i>	Karanja, pungam	25–50
<i>Azadirachta indica</i>	Neem	20–30
<i>Madhuca indica</i>	Mahua	35–50
<i>Schleichera triguga</i>	Kusum	10.65
<i>Ricinus communis</i>	Castor	45–50
<i>Linum usitatissimum</i>	Linseed	35–45
<i>Cerbera odollam (Cerbera manghas)</i>	Sea mango	54
<i>Gossypium sp.</i>	Cotton	17–25
<i>Nicotiana tabaccum</i>	Tobacco	36–41
<i>Argemone mexicana</i>	Mexican prickly poppy	22–36
<i>Hevea brasiliensis</i>	Rubber tree	40–60
<i>Melia azedarach</i>	Persian lilac	10
<i>Simmondsia chinensis</i>	Jojoba	45–55
<i>Thevetia peruviana</i>	Yellow oleander	8.41
<i>Moringa oleifera</i>	Moringa	33–41
<i>Thlaspi arvense</i>	Field pennycress	20–36
<i>Euphorbia lathyris</i>		48
<i>Sapium sebiferum</i>		12–29
<i>Pistacia chinensis</i>		30
<i>Datura stramonium</i>		10.3–23.2

Tabla 1.4 Cultivos no comestibles y su correspondiente porcentaje de contenido de aceite en las semillas en peso seco. Imagen adaptada de Banković-Ilić et al., 2012.

3.3. PENNYCRESS, UN CULTIVO ALTERNATIVO CON APLICACIONES INDUSTRIALES Y ENERGÉTICAS.

Con algunas excepciones, la mayoría de los aceites vegetales producidos en el mundo son utilizados para uso alimentario, tanto como aditivos alimentarios o para su uso directo. Sin embargo, ciertos aceites vegetales alternativos tienen el potencial para servir como fuente renovable y sostenible de aceites o productos para innumerables usos industriales. Entre esos usos podríamos destacar la presencia de aceites vegetales para la elaboración de pinturas y barnices, el desarrollo de fluidos hidráulicos utilizados en máquinas y motores, su papel en la elaboración de plásticos y también siendo un uso particularmente interesante para la obtención de biocombustibles. Estos usos se ven limitados fundamentalmente por la composición de ácidos grasos de dichos aceites. Sin embargo, determinadas aplicaciones que requieren aceites con gran estabilidad a la oxidación (para su uso en lubricantes) o por el contrario fácilmente oxidables (para barnices y pinturas) se ven dificultadas por el hecho de que algunas de estas propiedades están ausentes en una gran mayoría de aceites vegetales naturales.

En los últimos años, se ha dirigido un esfuerzo considerable a la manipulación biotecnológica del aceite de cultivos ya establecidos, como girasol, colza y soja, con el fin de modificar las propiedades de sus aceites con fines biotecnológicos. Sin embargo, estos intentos han chocado con los cuellos de botella metabólicos mencionados anteriormente. Por otro lado, y como alternativa a los métodos transgénicos, se ha explorado la biodiversidad vegetal en un intento de localizar nuevas especies vegetales con composiciones de ácidos grasos favorables que pudiesen ser de interés industrial y biotecnológico. Fruto de una estrategia de este tipo nuestro Grupo inició hace unos años una nueva línea de investigación que explora las propiedades de Pennycress como especie de alto valor industrial y biotecnológico.

Pennycress es una planta invernal anual de la familia de las brasicáceas, nativa de Eurasia y distribuída por todo el mundo como mala hierba. Está altamente adaptada a gran variedad de condiciones climáticas, es tolerante a tierras de barbecho y con pocos requerimientos en cuanto a inputs agronómicos (fertilizantes, pesticidas y agua). Debido a un alto contenido en aceite en semilla (20-36%) y a sus características agronómicas favorables, el cultivo de Pennycress es un buen candidato para aplicaciones industriales y energéticas. El ácido erúico (22:1) es el principal componente que otorga al producto final buenas propiedades de operabilidad en frío (Moser et al., 2009a; Moser et al., 2009b; Isbell, 2009).

Asimismo, utilizar un cultivo de rotación de Pennycress puede aliviar problemas de calidad de agua y de suelo y servir como una fuente adicional de ingresos para los agricultores. El potencial económico es lo que distingue a Pennycress de otros cultivos alternativos. Su aceite se puede utilizar con fines industriales y energéticos para ayudar a cumplir las demandas de la creciente población y, además, se puede cultivar en rotación con el cultivo tradicional de maíz y soja sin requerir terreno adicional ni desplazar a otros cultivos con fines alimentarios, lo que ha demostrado ser una gran preocupación con otros cultivos convencionales con fines industriales (Boateng et al., 2010; Pimentel et al., 2009).

3.3.1. Pennycress (*Thlaspi arvense* L.).

El nombre científico de Pennycress es *Thlaspi arvense* (Figura 1.12). Es una planta que pertenece a la familia *Brassicaceae*, tribu *Thlaspideae* y género *Brassica* (linaje II) (Best y McIntyre, 1975; Warwick et al., 2002; Franzke et al., 2011). Es una planta autopolinizante y diploide ($2n=14$) con un tamaño de genoma 1X de 539 Mbps (en comparación con *Arabidopsis* 157 Mbp y maíz 2.300 Mbp) (Johnston et al., 2005; Best & McIntyre, 1975; Schnable et al., 2009). Está relacionado con colza (*Brassica napus*), con camelina (*Camelina sativa*) y con verduras crucíferas como, entre otras, brócoli y coliflor (plantas domesticadas de *Brassica oleracea*) (Franzke et al., 2011). Además de su nombre común, Pennycress, es conocida con otras denominaciones como hierba apestosa (stinkweed), hierba abanico (fanweed) y hierba francesa (frenchweed) (Best & McIntyre, 1975). Se ha observado presencia de Pennycress en todos los continentes incluida la Antártida (Best & McIntyre, 1975; USDA NPGS), no obstante, Pennycress es originaria de Eurasia.

En la década de 1940, hubo un breve interés en el aceite de Pennycress como alternativa al aceite de colza (Clopton & Triebold, 1944) y en 1993 como cultivo oleaginoso con posibles aplicaciones industriales (Carr, 1993). Las publicaciones anteriores a 1993, se centraron principalmente en su persistencia como mala hierba, por lo que el impacto económico de Pennycress fue considerado como perjudicial. No fue hasta 2009 cuando se investigó por primera vez dicha especie como una materia prima potencial para la producción de biocombustibles (Moser et al., 2009a). No obstante, los primeros esfuerzos por domesticar Pennycress son más recientes (Sedbrook et al., 2014; Claver et al., 2017).



Figura 1.12 Ilustraciones de *Thlaspi arvense* L. (izquierda) y *Thlaspi perfoliatum* L. Figura del libro Deutschlands flora in Abbildungen en <http://www.biolib.de>. Johann Georg Sturm y Jacob Sturm.

1.3.2. Características morfológicas de Pennycress.

Pennycress es una planta anual que puede presentar crecimiento de tipo primaveral o invernal, aunque existen poblaciones silvestres que incluyen ambos tipos. Tanto en las plantas de tipo invernal como primaveral, la morfología general de las plantas de Pennycress es similar. Durante la floración se da el alargamiento del tallo seguido del marchitamiento de las hojas basales. Las flores son blancas y posicionadas en racimos, cada una con cuatro pétalos y seis estambres, una morfología típica de las plantas de la familia *Brassicaceae* (Figura 1.13 D) (Best y McIntyre, 1975; Sedbrook et al., 2014). Las vainas de semillas son silículas con dos lóculos que contienen 5-8 semillas en cada uno y se vuelven amarillentas al madurar (Best y McIntyre, 1975) (Figura 1.13 F). Las semillas presentan forma ovoide y crestas concéntricas en su superficie. Además, la coloración de las semillas puede variar de marrón rojizo a negro, según la variedad, la madurez y las condiciones de almacenamiento (Hume, 1984; Best y McIntyre, 1975) (Figura 1.13 A). El peso de una semilla individual es 0.80-2,39 mg y debido a su pequeño

tamaño, germinan mejor cuando se colocan justo debajo o sobre la superficie del sustrato (Sedbrook et al., 2014; Boyd y Van Acker, 2003). En cuanto al rango de altura de la planta de *Pennycress* puede variar de 40-90 cm en los tipos primaverales (Sedbrook et al. 2014), y 29-79 cm en tipos invernales (Johnson et al., 2015). Best y McIntyre (1975) observaron los patrones de altura y ramificación de las plantas están fuertemente influenciados por las condiciones ambientales. Así, en condiciones de suelo seco e infértil, las plantas pueden no ramificarse y pueden permanecer bajas. En cambio, en ambientes de alta fertilidad y baja competencia, las plantas pueden producir múltiples ramas con flores (Best y McIntyre, 1975). Las flores de *Pennycress* son cleistógamas, lo que significa que la polinización se produce dentro de la flor cerrada, autopolinizándose y autofecundándose (Warwick et al., 2002).



Figura 1.13 Imágenes de los diferentes estadios de crecimiento de *Pennycress*. A. Semillas de *Pennycress*. B. Estadio de roseta basal anterior a la vernalización. C. Elongación del tallo justo antes de la floración. D. Flores. E. Silicuas inmaduras. F. Silicuas maduras. Imágenes obtenidas en el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Las semillas de *Pennycress* muestran un período de dormancia posterior a la cosecha (Sedbrook et al., 2014), una estrategia beneficiosa como mala hierba, pero un obstáculo en el contexto agrícola. Se han propuesto dos métodos en la literatura para superar la dormancia: las semillas pueden ser tratadas con giberelina A4+A7 0,01 mM ya que induce la germinación (Saini et al., 2016); o almacenado las semillas durante varios meses para permitir la maduración de las

mismas (Sedbrook et al., 2014). Por otro lado, se ha observado que las semillas de plantas de campo son más inactivas que las plantas cultivadas en invernadero y que, en general, exhiben tasas de germinación más lentas (Hume, 1984). Como Pennycress exhibe un crecimiento semi-indeterminado, teóricamente las semillas cercanas a la zona basal son más maduras que las de la parte apical.

Pennycress es considerada como una mala hierba que crece expansivamente en todo el mundo y sobrevive en gran variedad de altitudes, por lo que su crecimiento no está restringido por la variabilidad climática (Best y McIntyre, 1975). Además, Pennycress aparece en terrenos recientemente alterados como una especie importante en las etapas principales de la sucesión ecológica (Best y McIntyre, 1975). Se trata de plantas de alta producción y pueden desarrollar un banco de semillas prolífico que puede permanecer viable en el suelo durante 5-9 años (Toole y Brown 1946; Thompson y Hodgson, 1993).

1.3.3. Características agronómicas de Pennycress.

Pennycress germina en otoño y forma una primera fase vegetativa caracterizada por una roseta de crecimiento lento que la protege de las bajas temperaturas y de la sequedad provocada por los vientos invernales, como si se tratara de una hibernación. La planta florece en primavera, dando semillas que se cosechan antes de la siembra de los cultivos típicos de verano, como la soja. El tipo invernal de Pennycress puede ser sembrado a finales de agosto o comienzos de septiembre y cosechado en mayo. En cambio, el tipo primaveral puede sembrarse en diciembre o enero y ser cosechado en mayo. Algunos estudios indican que el rendimiento de semilla de Pennycress es mayor cuando se siembra en agosto o principios de septiembre (Johnson et al., 2015).

Se trata de un cultivo que crece con facilidad en ausencia o con mínimos inputs agrícolas como agua, fertilizantes y pesticidas y, además, es tolerante a terrenos abandonados, no adecuados para la producción agrícola y compatible con las infraestructuras ya existentes. De hecho, puede ser cosechada con una cosechadora tradicional (Fan et al., 2013). La formación de las silicuas comienza a una altura de 25 cm, lo que da lugar a un espacio libre suficiente para una cosechadora mecánica tradicional (Sedbrook et al., 2014).

El establecimiento del cultivo de Pennycress depende y es muy sensible a la profundidad de siembra. Las parcelas perforadas a 1 cm de profundidad tuvieron un establecimiento mayor en

comparación con parcelas sembradas en la superficie, probablemente debido a un contacto insuficiente entre la semilla y el suelo (Phippen et al., 2010). Con respecto a la densidad de cultivo, Pennycress presenta un alto nivel de plasticidad fenotípica de manera que, conforme menor sea la densidad de plantas mayor será el rendimiento de semilla por planta y menor la altura media de las plantas (Phippen et al., 2010; Matthies, 1990). A mayor densidad de plantas, aparecen plantas más altas pero no necesariamente con mayores rendimientos en semilla (Johnson et al., 2015). Además, a medida que aumenta la densidad de cultivo, disminuyen significativamente los componentes reproductivos: número de yemas, la proporción de brotes:flores, flores:frutas, óvulo:fruta, óvulos:semillas en desarrollo y el peso de las semillas (Matthies, 1990).

Pennycress es una productora de semillas prolífica, con rendimientos de hasta 1,5 toneladas por hectárea en ensayos de campo en Dakota del Norte (Carr, 1993). En Illinois, se observaron rendimientos con una alta variabilidad en ensayos con variedades silvestres, entre valores de 900 kg/ha a 2352 kg/ha (Isbell et al., 2015a). Las variedades comerciales presentan mejoras genéticas y superan, en algunos casos, los 2463 kg/ha, lo cual indica que son posibles mayores rendimientos con técnicas de mejora vegetal (Phippen et al., 2010). No obstante, el rendimiento típico los cultivos silvestres es 1420 kg semillas/ha, aunque se espera un rango de 1120-2240 kg semillas/ha debido a la variabilidad climática, disponibilidad de agua, tipo de suelo y de la competencia con los cultivos coexistentes (Moser, 2012; Johnson et al., 2015) (Tabla 1.5).

Common name	Latin binomial	Oil content/seed (wt%)	Seed yield (kg ha ⁻¹ year ⁻¹)	Oil yield (kg ha ⁻¹ year ⁻¹)
Camelina	<i>Camelina sativa</i>	36–47	1500–3000	540–1410
Field pennycress	<i>Thlaspi arvense</i>	20–36	1120–2240	224–806
Jatropha	<i>Jatropha curcas</i>	27–40	2000–5000	540–2000
Oil palm	<i>Elaeis guineensis</i>			4000–10,000
Rapeseed	<i>Brassica napus</i>	40–44	2680–3390	965–1342
Soybean	<i>Glycine max</i>	18–22	2140–2840	347–562

Tabla 1.5 Rendimientos de los cultivos de camelina, Pennycress, jatrofa, palma, colza y soja en cuanto al contenido de aceite en semilla en peso seco, el rendimiento de semilla y el rendimiento de aceite por unidad de superficie y año. Tabla de Moser, 2012.

En Estados Unidos son muy habituales los estudios y ensayos de campo de Pennycress, especialmente en la región del Medio Oeste: Dakota del Norte, Dakota del Sur, Illinois, Iowa, Minnesota, etc. No obstante, en la actualidad, Pennycress no se cultiva en Aragón ni en ninguna otra región de España o de Europa y esta Tesis Doctoral ha pretendido aportar los primeros datos europeos al respecto.

1.3.4. Pennycress como cultivo de cubierta y de rotación.

Durante el periodo de barbecho de los cultivos, el suelo es más susceptible a la escorrentía de nitratos y a la pérdida de suelo debido a la erosión por la acción del viento y del agua. El exceso de nitrato ingresa en las vías fluviales provocando una disminución de la calidad del agua superficial y subterránea. Se estima que los campos de maíz y soja de los estados Iowa, Illinois, Ohio y Minnesota suministran aproximadamente el 46% de la carga de nitrato que contribuye a la hipoxia en el Golfo de México (Alexander et al., 2008; Robertson et al., 2009). Está ampliamente constatado en la literatura que la integración de cultivos de cubierta puede reducir las pérdidas de nitrato (Kladivko et al., 2004, 2014; Kaspar et al., 2007, 2012; Strock et al., 2004). Además, los cultivos de cubierta son conocidos por proporcionar protección contra la erosión del suelo, aumentar la materia orgánica, suprimir las malezas, capturar carbono y proporcionar hábitat y recursos alimenticios para los polinizadores (Lal et al., 1991; Sindelar et al., 2015; Eberle et al., 2015).

Para incentivar el uso de cultivos de cubierta, los investigadores han buscado formas de cultivo económicamente viables y que brinden servicios ambientales. Es el caso del cultivo de Pennycress, que puede utilizarse como cultivo de rotación en los cultivos tradicionales de maíz y soja de manera que puede cubrir el suelo hasta principios de la primavera, no desplazando a los cultivos comerciales, para posteriormente ser cosechado y comercializado como materia prima para productos industriales, y convertirse en una fuente adicional de ingresos para los agricultores (Evangelista et al., 2012). En Estados Unidos, se cultivan al año aproximadamente 16,2 millones de hectáreas con Pennycress bajo dicha estrategia que no tiene impacto en la industria alimentaria ni influye en los hábitats naturales (Johnsen, 2012).

Se ha estudiado el efecto del cultivo de rotación con Pennycress en el crecimiento de las plantas, la floración y la formación de silicuas de soja (Phippen y Phippen, 2012). Los rendimientos de cosecha fueron ligeramente mayores en la soja tras Pennycress con respecto al control, posiblemente por una retención de humedad en el suelo por el cultivo de cubierta. No hubo cambios significativos en el contenido de aceite o perfil proteico entre ambas sojas. Entonces, se asume que Pennycress no presenta ningún tipo de peligro sobre la seguridad alimentaria ni hay efecto negativo en el cambio de uso del terreno.

1.3.5. Aceite y perfil de ácidos grasos de Pennycress.

Las semillas de Pennycress tienen un alto contenido de aceite entre el 20 y 36%, similar a otros aceites comerciales renovables. El alto contenido en aceite y una composición de ácidos grasos adecuada (Tabla 1.6), hacen del aceite de Pennycress una buena materia prima para productos con aplicaciones industriales y energéticas. Se compone en un 55.6% de ácidos grasos monoinsaturados (16:1, 18:1, 20:1, 22:1, 24:1), en un 38% de ácidos grasos poliinsaturados (18:2, 18:3, 20:2, 20:3, 22:2, 22:3), y en un 4,6% de ácidos grasos saturados (14:0, 16:0, 18:0, 20:0, 22:0) (Moser et al., 2009b). Los ácidos grasos predominantes son el ácido erúxico, linoleico y linolénico con 32.8, 22.4 y 11.8%, respectivamente (Moser et al., 2009b). Otros ácidos grasos a destacar son el ácido oleico, eicosenoico y nervónico con una presencia de 11.1, 8.6 y 2.9%, respectivamente (Moser et al., 2009b).

Fatty acid	Camelina	Field pennycress	Canola	Palm	Soybean
C16:0	6.8	3.1	4.6	41.9	10.5
C18:0	2.7	0.5	2.1	4.6	4.1
C18:1 9c	18.6	11.1	64.3	41.2	22.5
C18:2 9c, 12c	19.6	22.4	20.2	10.3	53.6
C18:3 9c, 12c, 15c	32.6	11.8	7.6	0.1	7.7
C20:1 11c	12.4	8.6	Trace	None	Trace
C22:1 13c	2.3	32.8	None	None	None
Others	5.0	9.7	1.2	1.9	1.6

Tabla 1.6 Composición de ácidos grasos de los aceites de camelina, Pennycress, canola, palma y soja. C18:1 9c significa que en la cadena de ácido graso de 18 carbonos, el doble enlace se encuentra en el carbono 9. Tabla de Moser, 2012.

1.3.6. Domesticación de Pennycress y recursos genéticos.

Pennycress se ajusta a los requisitos para considerarse una materia prima alternativa para aplicaciones industriales y energéticas que no compite con cultivos alimentarios ni los desplaza, tiene un perfil de ácidos grasos adecuado, puede cultivarse en tierras marginales y puede proporcionar servicios ambientales en forma de un cultivo de cubierta (Moser et al., 2009a; Boateng et al., 2010). Considerando estos beneficios, se han establecido varios programas de domesticación del cultivo de Pennycress.

La domesticación es el proceso de selección de cambios genéticos en un organismo que, con el tiempo, se acumulan para dar lugar a un conjunto de rasgos mejor adaptados para el uso humano. Los cambios a realizar son una disminución de la dormancia de las semillas, disminución de la dispersión de las semillas como consecuencia de la fragmentación de las silicuas o un raquis menos frágil (alteraciones en las zonas de dehiscencia o abscisión), cambios en la sensibilidad al fotoperiodo y la floración sincronizada, entre otros aspectos (Doebley et al., 2006). Las plantas domesticadas probablemente han acumulado estos rasgos debido a la selección consciente por parte de los humanos (por ejemplo, elegir propagar semillas que son más grandes) y como resultado de presiones selectivas asociadas con las prácticas agrícolas (por ejemplo, el enriquecimiento natural de las semillas de las plantas que germinaron y crecieron mejor o no dispersaron sus semillas antes de la cosecha) (Doebley et al., 2006).

Aunque que Pennycress represente una promesa agronómica las variedades domesticadas apenas han comenzado a desarrollarse. Las variedades silvestres de Pennycress presentan una germinación de semillas inconsistente que resulta en un establecimiento deficiente del cultivo debido a la dormancia de las mismas. Una de las principales razones por las cuales Pennycress es considerada una mala hierba es que solo un pequeño porcentaje de sus semillas germina, resultando en un gran banco de semillas que permanece en el suelo. La dormancia de Pennycress puede ser eliminada recubriendo las semillas con giberelina A4 + 7 antes de la siembra, puede resultar prohibitivamente caro a gran escala. Por ello, la máxima prioridad en la domesticación de Pennycress es identificar los genes que eliminen las capas de latencia de la semilla y, así, conseguir una germinación más uniforme y mejorar el establecimiento del cultivo (Finkelstein et al., 2008; Graeber et al., 2012).

Además de eliminar la dormancia, es necesario conseguir la uniformidad en la floración y en la maduración de las plantas en una determinada zona de crecimiento. Para Pennycress, el momento de la floración y la maduración es de especial importancia, dado el pequeño margen de tiempo entre el deshielo invernal y la siembra de soja, en el caso de cultivos rotacionales. Las plantas silvestres de Pennycress por lo general florecen y maduran en sincronía. Sin embargo, el margen de tiempo mencionado varía con la latitud geográfica y, por tanto, las mejoras genéticas deben hacerse adaptando los tiempos de floración y maduración a una zona de crecimiento determinada con el fin de ampliar geográficamente la utilidad de Pennycress (Irwin et al., 2012; Tadege et al., 2001).

Otro aspecto interesante es reducir la pérdida de cosecha debido a la fácil ruptura de las silicuas cuando se encuentran secas. La ruptura de las silicuas maduras antes o durante la cosecha

supone una importante de pérdida de semillas de cultivos oleaginosos, resultando en un 10-25% de pérdida durante la cosecha y un 50% de pérdida de semilla durante las inclemencias del tiempo (Price et al., 1996). La pérdida de semilla relacionada con la rotura de las vainas podrían reducirse a través de mejoras genéticas.

También son interesantes mejoras asociadas al contenido de glucosinolatos. Después de la extracción de aceite mediante el prensado, aproximadamente 30% del peso mojado de la semilla Pennycress queda como una torta de prensa. La harina de Pennycress contiene el glucosinolato sinigrina. Cuando las semillas son prensadas, la sinigrina se degrada por la mirosinasa dando lugar a los compuestos tóxicos isotiocianato e isotiocianato de alilo, que pueden funcionar como biocidas, como productos contra plagas (Vaughn et al., 2005). De hecho, estos compuestos dan el olor característico a Pennycress y por el que se le conoce también como “hierba apesosa”. A escala comercial, estos compuestos tóxicos no se forman en la harina de semillas ya que las semillas son tratadas térmicamente para desactivar la mirosinasa antes de la trituración. Sin embargo, para evitar cualquier riesgo de toxicidad de la harina de semillas y para mejorar la palatabilidad, sería interesante reducir el contenido de glucosinolato en semillas de Pennycress (Fahey et al., 2000; Vaughn et al., 2006).

Otra posible modificación estaría relacionada con la calidad del aceite, es decir, con perfil de ácidos grasos. El ácido erúico, aunque es una materia industrial muy valiosa, es indeseable en los aceites comestibles ya que se ha asociado con efectos negativos para la salud. Además, el 22:1 (Nesi et al., 2008). Un ejemplo de esta modificación sería la variedad LEAR de *B. napus* mencionada anteriormente, o también conocida como canola. Dos genes diana para esta modificación serían *FAEI* (Wu et al., 2008) y *FAD2* (Li-Beisson et al., 2013).

Un tamaño de semilla de Pennycress más grande y un contenido de aceite mayor podría conferir muchos beneficios. Una semilla en desarrollo más grande proporcionaría un mayor almacén para los fotoasimilados, aumentando así los rendimientos de Pennycress. Además, semillas más grandes podrían mejorar el establecimiento de las plántulas ya que dispondrían de mayores reservas energéticas, dando lugar a plántulas más robustas. Además, semillas de mayor tamaño son más fáciles de cosechar. Se sabe que varios genes de *Arabidopsis* afectan el tamaño de la semilla y/o la acumulación de aceite de semilla, como *WR11*, por lo que sería cuestión de extrapolarlo a Pennycress (Fatihi et al., 2013; Liu et al., 2010).

En la tabla 1.7 se muestran los genes identificados ya caracterizados en *Arabidopsis* y otras brasicáceas que podrían ser dianas atractivas para las modificaciones deseadas.

Attractive natural traits	Traits to domesticate/Possible genes to target	
Small diploid genome (2N= 14)	Seed dormancy: reduce to improve stand establishment and curtail weediness	<i>DOG1, ABI3, 4, 5</i>
Self-fertile		
Compact, upright stature	Seed size: increase to improve seed yields as well as seedling establishment	<i>WR1, DGAT1, IKU2, KLU, GL2, MUM4</i>
Compatible with existing machinery		
Rapid life cycle		
Copious seed production	Seed glucosinolate content: abolish to make meal palatable	<i>HAG1, GTR1, GTR2</i>
High seed oil content	Erucic acid content of oil: abolish to improve biodiesel cold flow properties and to make oil edible	<i>FAE1</i>
High seed protein content		
Fallow land-tolerant		
Extreme cold-tolerant	Linoleic/linolenic acid content of oil: reduce to improve oxidative stability	<i>FAD2</i>
Crowding-tolerant		
Minimal agricultural inputs required (fertilizer, pesticides, water)	Pod shatter: reduce to lower harvest loss	<i>SHP1, SHP2, IND, ALC, RPL, FUL</i>
Soil erosion control		
Biofumigant (suppresses pests)	Time to maturation: optimize for a given growth zone	<i>FLC, FRI</i>

Tabla 1.7 Lista de las características naturales de *Pennycress* silvestre que son atractivas para el consumo humano y aquellas características a domesticar, con los genes diana indicados en cada caso. Tabla de Sedbrook et al., 2014

Hay que tener en consideración que la base de conocimiento de biología vegetal está en continuo crecimiento y pueden aparecer nuevos objetivos genéticos. Además, algunas de estas alteraciones genéticas podrían conferir fenotipos no deseados, que podrían impedir su uso comercial o podría requerir manipulaciones genéticas compensatorias adicionales para subsanarlo.

Los intentos de mejorar *Pennycress* son recientes pero diversos e incluyen la caracterización de germoplasma, la mejora de la germinación (Isbell et al., 2015a), una edición dirigida del genoma (Sedbrook et al., 2014) y mutantes de metanosulfonato de etilo (EMS) con mutaciones locales y específicas inducidas en el genoma (TILLING) (Sedbrook et al., 2014). Por otro lado, la similitud genética de *Pennycress* con la especie modelo *Arabidopsis thaliana* y la secuenciación reciente del transcriptoma y del genoma ayudarán y agilizarán el proceso de mejora (Dorn et al., 2013; Dorn et al., 2015). El germoplasma *Pennycress* disponible actualmente se considera silvestre y no domesticado y para cuantificar la variabilidad genética debe caracterizarse el germoplasma disponible de *Pennycress* y, así, identificar individuos superiores para llevar a cabo la reproducción.

Además, en base a la estrecha similitud genética entre *Pennycress*, *Arabidopsis* y otras especies Brassicaceae bien estudiadas, puede aprovecharse la información ya disponible de estas especies para identificar genes y comprender el control genético de las características más importantes (Sedbrook et al., 2014). Actualmente, hay información limitada acerca de los mecanismos de producción de aceite en *Pennycress*. Por ejemplo, es interesante el gen

wrinkled1 (*WRI1*) (Focks y Benning, 1998), ya que es el regulador principal de la biosíntesis del aceite. Por tanto, teniendo en cuenta la similitud genética con especies bien estudiadas, esta garantiza un análisis minucioso de los genes importantes en la producción de aceite.

1.3.7. Propiedades biotecnológicas del aceite de Pennycress.

1.3.7.1. Obtención de biocombustibles.

Químicamente, el biodiesel es la mezcla de ésteres de ácidos grasos, metil o etil ésteres (FAMEs y FAAEs, respectivamente), obtenidos de la alcoholisis de los triacilgliceroles (TAGs) de los aceites vegetales, en este caso. La reacción de transesterificación es el método más utilizado para producir biodiesel. Se trata de un proceso químico en el que, en presencia de un alcohol, los triglicéridos se convierten en ésteres de ácidos grasos, liberando glicerol como co-producto. Este proceso reduce la viscosidad a un valor comparable al del diesel, mejorando la combustión (Banković-Ilić et al., 2012; Basha et al., 2009).

El aceite de Pennycress puede convertirse fácilmente en biodiesel usando la reacción de transesterificación, proceso mediante el cual el aceite de Pennycress puede producir 82% en peso de biodiesel usando metanol y un catalizador de metóxido de sodio a 60 °C (Moser et al., 2009a). El aceite de Pennycress y los metilésteres resultantes tienen numerosas cualidades que lo convierten en una materia prima adecuada para producir biodiesel, que incluyen un bajo contenido de azufre, un alto índice de cetano (CN) y una excelente operabilidad a baja temperatura, como por ejemplo, un punto de turbidez de -10 °C (Moser et al., 2009a).

La propiedad del biodiesel de Pennycress (Tabla 1.8) de fluidez en frío es significativamente mejor que en el biodiesel de camelina o de otros cultivos convencionales. Puede tener buenas aplicaciones para utilizarse como biodiesel en climas templados en los meses de invierno, donde la temperatura ambiente suele ser 0 °C o menor (Moser et al., 2009a). Sin embargo, el alto contenido en metil erucato (C22:1 13c) en el biodiesel de Pennycress provoca una mayor viscosidad cinemática de 5,24 mm²/s a 40 °C (Tabla 1.8) que aquellos FAMEs de cultivos convencionales, cuyos valores están entre 4,10-4,50 mm²/s a 40 °C (Moser et al., 2012). Existen métodos para disminuir la viscosidad cinemática como la reducción del contenido de metil

erucato a través de modificaciones genéticas, técnicas de mejora vegetal o simplemente a través de mezcla con FAMEs menos viscosos (Moser, 2011).

	Camelina	Field pennycress	Canola	Palm	Soybean
Cloud point (°C)	3	-10	0	17	0
Pour point (°C)	-4	-18	-9	15	-3
Cold filter plugging point (°C)	-3	-17	-7	12	-4
Induction period, 110°C (h)	2.5	4.4	6.4	10.3	5.0
Kinematic viscosity, 0°C (mm ² /s)	4.15	5.24	4.42	4.58	4.12

Tabla 1.8 Propiedades físico-químicas del biodiesel producido a partir de aceites vegetales de camelina, Pennycress, canola, palma y soja. Tabla de Moser, 2012.

En cuanto al índice de cetano (CN), los ésteres metílicos del aceite de Pennycress tienen un alto CN, de 59.8, muy por encima del mínimo de 47 establecido por el estándar ASTM D6751 (Moser et al., 2009b; ASTM D6751) (Tabla 1.8). El alto CN es debido su alto porcentaje de metilésteres de cadena larga e insaturados, es decir, de ácidos erúcicos y eicosenoicos (Moser et al., 2009a). En general, el biodiesel tiene poca operabilidad a baja temperatura en comparación con petrodiesel, no obstante, los metilésteres de Pennycress exhiben mejor operabilidad a menor temperatura incluso en comparación con otros biocombustibles, lo que puede ser atribuido al bajo nivel de ácidos grasos saturados (Moser et al., 2009a; Moser, 2008; Moser et al., 2009a).

1.3.7.2. Obtención de erucamida para la obtención de plásticos.

En la actualidad, existe una gran demanda de películas de polipropileno de todo tipo de características: monocapas, multicapas, materiales barrera, materiales para atmósfera controlada, etc. Sus aplicaciones abarcan desde la industria del envasado de productos alimenticios hasta la del envasado y embalaje de forma general. Estas películas, en sus diferentes formulaciones, aparte de cumplir una serie de requisitos intrínsecos y otros extrínsecos para su preparación, manejo y aplicación, tienen que satisfacer dos funciones fundamentales. En primer lugar, que en las cadenas de envasado o embalaje, puedan ser fácilmente manipulados por la maquinaria correspondiente y que no se presenten fenómenos de electrización, adhesión, etc., entre la película y el producto, entre película y película o entre la película y alguna parte de la maquinaria. Por tanto, son necesarias unas buenas propiedades de deslizamiento y antibloqueo que puedan cuantificarse. Para ello, durante la fabricación del filme e incorporación a las materias primas se le agregan los aditivos conocidos como de

deslizamiento y antibloqueo. Los aditivos de deslizamiento más comúnmente utilizados son las amidas de ácidos grasos de cadena larga. Las amidas utilizadas como agentes de deslizamiento reducen también el bloqueo entre las superficies de las películas. Como regla general, puede decirse que el mejor agente de deslizamiento no es necesariamente el mejor agente antibloqueo.

La erucamida es uno de estos aditivos de deslizamiento y antibloqueo que está sustituyendo a la oleamida por su mayor punto de fusión y su mayor resistencia al calor. Se trata de una amida primaria, para ser usada en polietileno de baja y alta densidad y en polipropileno, que confiere buena estabilidad a la oxidación, baja volatilidad, efecto deslizante, características antibloqueantes. Es efectiva a alta temperatura con excelente estabilidad térmica, debido a las amidas secundarias que incluye.



STRUKTOL® TR 131

SLIP AGENT

LUBRICANT

DISPERSANT

MOLD RELEASE AGENT

COMPOSITION: Unsaturated primary amide derived from erucic acid.

Figura 1.14 Imagen de Struktol ® producto antideslizante, lubricante, dispersante, agente desmoldante. Compuesto por amidas primarias insaturadas de ácido erúico.

Las erucamidas son muy eficaces como agentes deslizantes en películas de poliolefinas y otros polímeros, además tienen aplicaciones antibloqueo y son frecuentemente formuladas con aditivos antibloqueo inorgánicos, tales como talco o sílica, cuando la película presenta aspectos de opacidad mejorando la claridad de la película y las propiedades de deslizamiento. En la fase de fusión, la erucamida es distribuida a través del polímero, cuando el polímero empieza a enfriarse las moléculas de erucamida migran a la superficie y forman una película muy delgada de lubricante, provocando la reducción del coeficiente de fricción entre las superficies y evitando cualquier adhesión entre estas mismas. La experiencia muestra que la erucamida puede ser fácilmente incorporada al polímero, en la etapa de procesamiento. Un simple mezclado manual antes del procesamiento del polímero dará normalmente una dispersión aceptable, usando medios mecánicos preferentemente.

1.3.7.3. Revalorización de la torta de extracción de Pennycress como biofumigante.

Un factor importante de las fuentes vegetales para la producción de biocombustibles es la utilidad segura y rentable que presentan las torta de prensado, es decir, el coproducto obtenido a partir de las semillas tras la extracción del aceite. Por ejemplo, en el caso de la canola y la soja, la harina de las semillas es comercializada como una fuente de alto valor proteico para la alimentación de ganado. Como se ha comentado con anterioridad contienen altas concentraciones de glucosinolatos, una clase de compuestos secundarios que obstaculizan su uso como alimento o fuente de alimento.

Los productos de su hidrólisis son responsables del sabor y aroma a mostaza de muchas especies vegetales y se cree que juegan un papel en la defensa frente a organismos herbívoros y microbianos (Fenwick et al., 1983). La sinigrina es el único glucosinolato presente en Pennycress (Daxenbichler et al., 1991; Vaughn et al., 2006), carente de toxicidad por si mismo (Hojilla-Evangelista et al., 2015), pero que da lugar a compuestos tóxicos al ser hidrolizada por la enzima mirosinasa (Shofran et al., 1998). El alil-tiocianato (ATC) y alil-isotiocianato (AITC) son compuestos resultantes son muy tóxicos para los animales (Warwick et al., 2002) ya que, entre otros síntomas, causan problemas gástricos y cardiacos (Smith y Crowe, 1987), provocando también un sabor desagradable en los productos derivados, como la leche y la carne (Warwick et al., 2002).

Para que fuera posible utilizar la torta de prensado como alimento para el ganado y, así, aumentar la rentabilidad de Pennycress, sería necesario reducir o eliminar el contenido de sinigrina en las semillas de Pennycress o, bien, desnaturalizar la enzima mirosinasa. La desnaturalización de la mirosinasa se lleva a cabo colocando las semillas de Pennycress en un acondicionador de semillas en el que se someten a temperaturas de 85 °C durante un periodo de tiempo de alrededor de 24 horas. Una ventaja adicional del acondicionamiento de semillas de Pennycress es que se obtiene un mayor rendimiento de aceite al prensar semillas acondicionadas, porque al aumentar el área de superficie de las semillas, aumenta la eficiencia de extracción (Fahey et al., 2000; Vaughn et al., 2006).

A pesar de los obstáculos que presentan los glucosinolatos en la alimentación animal, las tortas ricas en glucosinolatos pueden ser muy útiles como biofumigantes volátiles para reducir las malas hierbas en sistemas agrícolas convencionales y ecológicos (Vaughn et al., 2005). Se ha comprobado que la harina de semillas de Pennycress es efectiva en la inactivación de la

germinación de semillas de malas hierbas, por la actividad inhibidora del crecimiento de AITC. Cuando se incorpora a 1 wt% en el suelo, la harina de Pennycress inhibe completamente la aparición de malas hierbas. La capacidad de Pennycress para reducir la presión de las malas hierbas puede servir como una estrategia adicional al reducir la necesidad de herbicidas (Johnson et al., 2015). Además, los compuestos ATC y AITC figuran en el listado europeo de regulación de productos biocidas (No. 1451/2007). Conocidos como METAM, son comercializados en España como TAMIFUN® (número de registro: 24.729) o LAISOL® (número de registro: 12.467).

Se han investigado otras posibles aplicaciones de la torta de Pennycress para garantizar la integridad económica del cultivo y, para ello, se cuantificó la proteína en las semillas obteniendo un rango 23-50% y en la torta de Pennycress 23-50% (Selling et al., 2013). La mayoría de proteínas presentes en las semillas de Pennycress son solubles en agua y en sales, y por lo general, muestran buenas propiedades emulsionantes y espumantes que pueden ser requeridas en la producción de espumas presurizadas y emulsiones (Hojilla-Evangelista et al., 2013), por lo que las proteínas derivadas de la torta de Pennycress pueden tener utilidad en aplicaciones industriales. Además, la torta resultante de Pennycress tiene gran cantidad de energía, alrededor de 22,2 MJ/kg en peso seco, muy adecuada para una combustión directa, gasificación para la producción de energía y aceite de pirolisis (Boateng et al., 2010).

1.3.7.4. Otras aplicaciones industriales del aceite de Pennycress.

El perfil de ácidos grasos del aceite de Pennycress es diverso en el sentido de que no hay ningún ácido graso altamente dominante. Puede ser la razón por la cual las aplicaciones para el aceite de Pennycress todavía no se han investigado adecuadamente. El ácido graso más concentrado es el ácido erúxico y se han propuesto métodos para aumentarlo, lo que puede resultar en aplicaciones adicionales para el aceite (Isbell et al., 2015b). Se ha demostrado que estas estrategias de enriquecimiento pueden aumentar el contenido de ácido erúxico en el aceite de Pennycress del 36% a más del 70% usando destilación o cristalización (Isbell et al., 2015b). El aceite con alto contenido en ácido erúxico tiene utilidad como aditivo para lubricantes, solventes, suavizantes y en la fabricación de polímeros, surfactantes, revestimientos superficiales y productos farmacéuticos (Leonard, 1994). Para ser competitivo en este mercado y para limitar los costes de purificación, el aceite debe contener como mínimo un 45% de ácido erúxico (Sovero, 1993). La demanda de estas industrias ha provocado la investigación del enriquecimiento de ácido erúxico y su biosíntesis en Pennycress (Isbell et al., 2015b; Claver et al., 2017).

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

Pennycress (*T. arvense*), es una planta de elevado potencial tanto biotecnológico como agronómico. A pesar de este interés, algunos aspectos básicos de la biología de Pennycress no han sido estudiados en profundidad o son simplemente desconocidos. Desde un punto de vista bioquímico, no se disponen de datos referentes a la síntesis de aceite o a la acumulación de ácido graso erúcico en esta especie. No obstante, la identificación de genes o procesos responsables del alto contenido en aceite y/o en ácido graso erúcico en Pennycress podrían aportar elementos clave para la manipulación eficiente del aceite en otras especies vegetales. Desde un punto de vista agronómico, y a pesar de la existencia de abundante registro botánico, Pennycress no se cultiva en Europa y los únicos datos de los que disponemos son los procedentes de experiencias de cultivo en USA con variedades norteamericanas. El objetivo fundamental de esta Tesis Doctoral ha sido llevar a cabo un primer análisis bioquímico y molecular de la biosíntesis de aceite en Pennycress y evaluar su potencial agronómico en Aragón, zona representativa de la región mediterránea europea.

El estudio de este objetivo principal se ha desarrollado a partir de los siguientes sub-objetivos:

- 1.- Caracterización bioquímica y molecular de la biosíntesis de aceite y ácido graso erúcico en semillas de Pennycress .
- 2.- Análisis funcional de la elongasa *TaFAEI* de Pennycress en *Arabidopsis thaliana*: identificación de cuellos de botella metabólicos que limitan la producción de VLCFAs en brasicáceas y en otras especies vegetales.
- 3.- Evaluación del comportamiento agronómico de variedades de origen europeo de Pennycress.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ESPECIES VEGETALES UTILIZADAS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

3.1.1. Especies vegetales utilizadas.

En este trabajo se ha realizado con dos especies de plantas diferentes.

Arabidopsis thaliana, conocida simplemente como Arabidopsis, es una especie vegetal que pertenece a la familia de las crucíferas o brasicáceas (*Brassicaceae*). Es endémica de Europa, Asia y el noreste de África. Se trata de una pequeña planta herbácea, de fecundación autógama y de ciclo vital corto (generalmente de 5 meses en condiciones normales y 6-8 semanas en condiciones experimentales). Arabidopsis es una planta diploide que presenta uno de los genomas más pequeños de todas las plantas conocidas (135 Mb), empaquetado en 5 cromosomas. Su genoma está completamente secuenciado. Por todas estas características y por el hecho de que es fácilmente transformable mediante la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, es utilizada como planta modelo para la investigación fitobiológica.

Thlaspi Arvense, también denominada Pennycress, es una planta perteneciente a la familia de las crucíferas y, por tanto, emparentada con la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Es originaria de las regiones templadas de Eurasia pero actualmente extendida también por las de Norte América. Se trata de una especie vegetal anual de crecimiento invernal y de fecundación autógama.

En la figura 3.1 se muestra una comparación fenotípica de ambas especies, a nivel de tamaño de las semillas, forma y tamaño de las rosetas, flores y porte de las plantas. Las variedades y ecotipos utilizados para la realización de este trabajo se detallan en los apartados correspondientes.

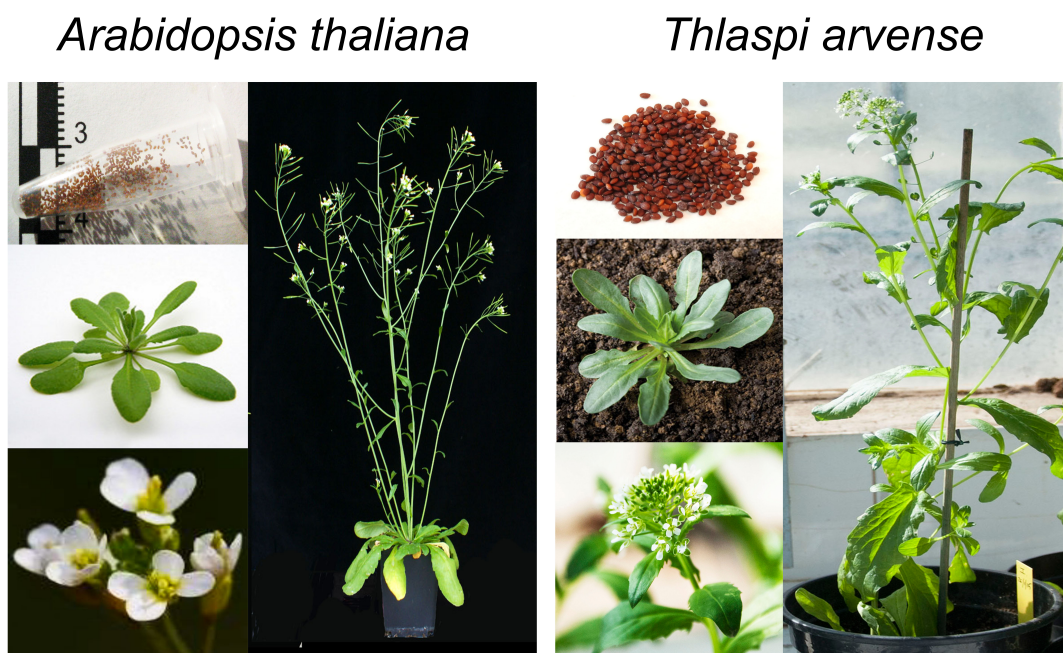


Figura 3.1 Semillas, rosetas, flores y plantas de *Arabidopsis thaliana* (izquierda) y *Thlaspi arvense* (derecha).

3.1.2. Cultivo de plantas de Pennycress.

En este trabajo se han utilizado tres variedades diferentes de plantas Pennycress, obtenidas de diferentes fuentes. Las semillas de la variedad NASC fueron obtenidas del banco de semillas Nottingham Arabidopsis Stock Centre, UK (NASC) y las semillas de la variedad FRENCH fueron obtenidas de la empresa B&T World Seeds company (France). Ambas variedades se utilizaron durante todo el trabajo. Otras dos variedades de origen norteamericano, denominadas BEECHER y ELIZABETH, fueron suministradas por el Dr. Phippen (Western Illinois University, USA).

3.1.2.1. Cultivo de plantas de Pennycress en cámara de cultivo.

Las semillas de *T. arvense* fueron germinadas en placas de Petri con papel Whatman humedecido con agua destilada sin ningún otro suplemento adicional (Figura 3.2). Transcurridos entre 7 y 10 días, se pudo observar la aparición de los dos cotiledones u hojas

embrionarias y una raíz incipiente, indicadoras de la germinación. Una vez germinadas, las semillas fueron transferidas a macetas con ayuda de unas pinzas de plástico con una mezcla compuesta por turba (Kekkila):vermiculita 3:1 (v/v). La germinación tuvo lugar a temperatura ambiente y con luz solar natural y el posterior crecimiento en sustrato tuvo lugar en una cámara bioclimática (Fitoclima 10000 EHHF, Aralab) bajo determinadas condiciones controladas como la intensidad de la luz ($120\text{--}150\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$) con un fotoperiodo de 16/8 h de luz/oscuridad (correspondiente a día largo), una temperatura oscilante de 22/18°C que simulaba el día/noche y una humedad relativa del 45%.



Figura 3.2 Germinación de semillas de Pennycress en placas de Petri con papel Whatman humedecido, al quinto día.

En el caso de la variedad FRENCH, fue necesario llevar a cabo un tratamiento adicional de vernalización para el completo desarrollo de las plantas en flores y semillas. Para ello, una vez habían aparecido las dos primeras hojas verdaderas en la cámara de cultivo, se transfirieron a una cámara bioclimática de vernalización (GER-700 ESP, Radiber) y se mantuvieron a 6 °C durante 5 semanas con una intensidad de luz de $120\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo de 10/14 h de luz/oscuridad, respectivamente. Tras el tratamiento de vernalización, las plantas se colocaron de nuevo en la cámara de cultivo en condiciones normales, completando así su desarrollo.

3.1.2.2. Cultivo de plantas de Pennycress en ensayos de campo.

Pennycress fue también cultivada en pequeños terrenos experimentales de 10 m², también denominados semilleros (Figura 3.3), localizados en la finca de ensayo de la Estación Experimental de Aula Dei (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), en Aragón (NE Spain) (41°44'N, 0°46'W, 259 m alt.). La siembra se realizó a finales del mes de septiembre con una densidad de 6–8 kg ha⁻¹. Se trata de una zona de clima mediterráneo continental, con una precipitación media anual de 355 mm y una temperatura media anual del aire de 14,5°C. Estas características climáticas son representativas de las zonas de cultivo de cereal del centro del Valle del Ebro y de la Meseta Central de la Península Ibérica. Además, el suelo de dichos terrenos experimentales es representativo de los suelos semiáridos de Aragón con una textura media, alcalina y, generalmente, con bajo contenido en carbono orgánico. Específicamente, para los primeros 0-40 cm de profundidad, el suelo es fértil (23% arena, 53% limo y 24% arcilla) con pH = 8.3, 13.6 g kg⁻¹ de contenido de materia orgánica y 345 g kg⁻¹ de CaCO₃. El contenido medio de los nutrientes del suelo (0–40 cm de profundidad) fueron 11, 130, 28 y 193 mg kg⁻¹ para P, K, N, y Mg, respectivamente. No se aplicaron tratamientos herbicidas o biocidas durante el crecimiento del cultivo y se llevaron a cabo riegos esporádicos según las necesidades del cultivo. Se determinó el peso y el tamaño de las semillas, el número de semillas por vaina, el número de vainas por planta, y el número de semillas por planta, a partir de por lo menos 10 plantas diferentes de cada variedad de Pennycress. También se determinó la cantidad de aceite por peso seco de semilla por el método explicado en el apartado 3.4.2. Las semillas fueron manualmente cosechadas a finales del mes de mayo.



Figura 3.3 Fotografía tomada en marzo de 2016 de los semilleros de la Estación Experimental de Aula Dei con cultivo de Pennycress, a la izquierda cultivo de BEECHER y a la derecha de NASC (A). Detalle de la variedad BEECHER (B).

Además de los ensayos en los semilleros, se realizó otro a mayor escala en la Finca Experimental de la EEAD-CSIC de 850 m² aproximadamente de terreno con idénticas características edafoclimáticas que los semilleros. En este caso, además de cultivar las variedades NASC y FRENCH, se cultivó la variedad norteamericana BEECHER. Estos ensayos de campo se llevaron a cabo bajo la supervisión de la Dra. M^a Victoria López del Departamento de Suelo y Agua de la EEAD-CSIC.

En la primera campaña de cultivo, comprendida entre el mes de octubre de 2015 y mayo de 2016, se partió de una pequeña cantidad de semilla de las variedades europeas que se propagó en la Estación Experimental de Aula Dei (EEAD-CSIC) y, en el caso de la variedad BEECHER se dispuso del material importado desde USA suministrada por el Dr. Phippen (Western Illinois University, USA). Debido a la baja disponibilidad de semillas NASC y FRENCH, sólo se sembraron dos parcelas de cada variedad con una densidad de siembra de 10 kg ha⁻¹. Por el contrario, con la semilla BEECHER se sembraron un total de 40 parcelas, 20 a una densidad de 10 kg ha⁻¹ y las otras 20 a 15 kg ha⁻¹, tal y como se observa en el esquema de la figura 3.4.

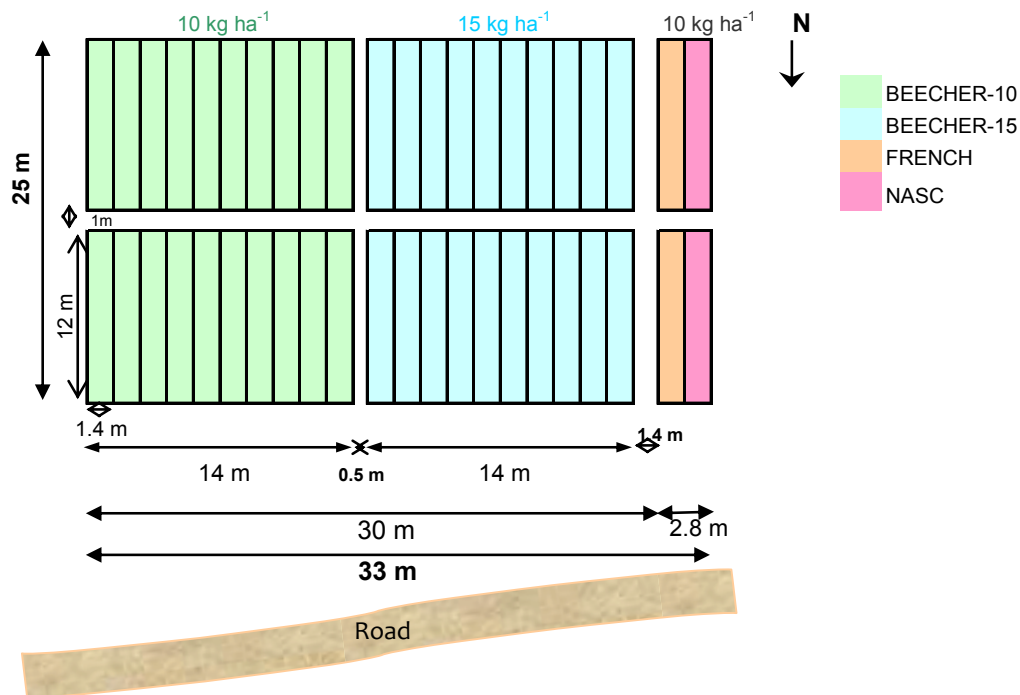


Figura 3.4 Distribución de las parcelas sembradas con las variedades NASC, FRENCH y BEECHER de Pennycress y las respectivas densidades de siembra, durante la campaña 2015-2016. Esquema de siembra elaborado por la Dra. M^a Victoria López (EEAD-CSIC).

En la segunda campaña, comprendida entre noviembre de 2016 y mayo de 2017, se cultivó una cuarta variedad, la variedad norteamericana ELIZABETH. En el caso de las variedades europeas, también se partió de una pequeña cantidad de semilla propagada en la Estación Experimental de Aula Dei (EEAD-CSIC). En el caso de variedades norteamericanas, ésta es la primera y la segunda campaña de cultivo en EEAD de ELIZABETH y de BEECHER, respectivamente. En esta ocasión, se sembraron 12 parcelas de cada variedad y todas ellas a una densidad de siembra de 10 kg ha^{-1} , tal y como se muestra en el esquema de la figura 3.5.

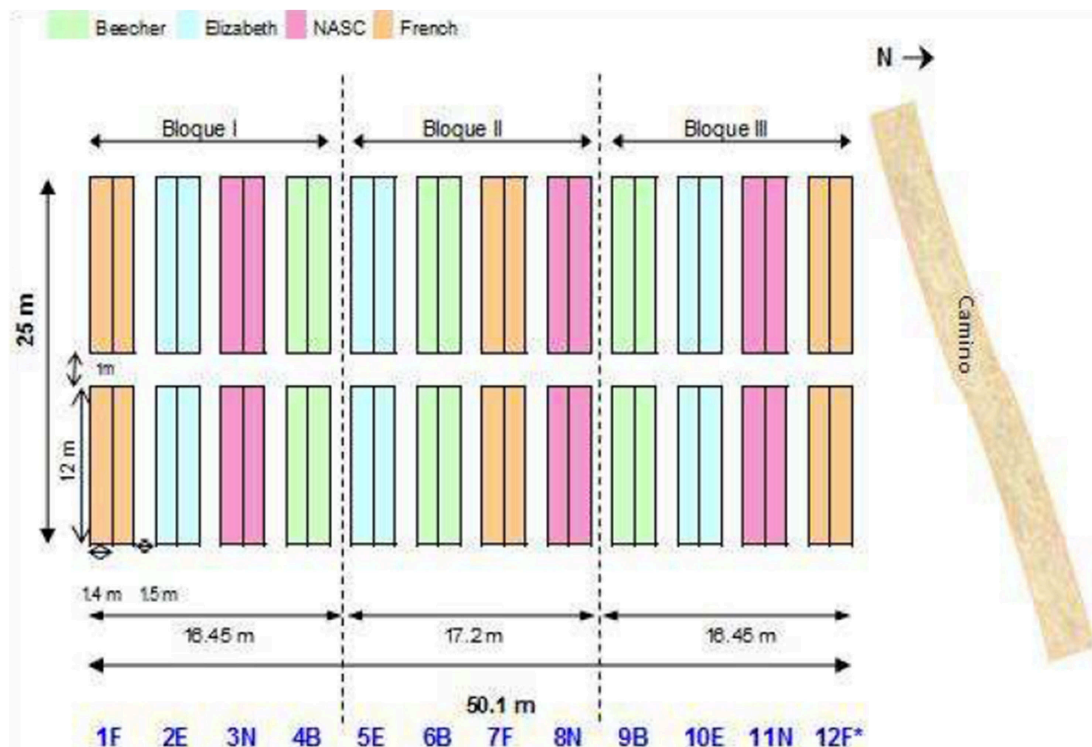


Figura 3.5 Distribución de las parcelas sembradas con las variedades NASC, FRENCH, BEECHER y ELIZABETH de Pennycress, durante la campaña 2016-2017. Esquema de siembra elaborado por la Dra. M^a Victoria López (EEAD-CSIC).

La preparación del terreno consistió, en primer lugar, en labores de vertedera, un laboreo primario con volteo del suelo con el fin de formar un canal que permita la aireación y la circulación del agua de lluvia hasta las capas más profundas (Figura 3.6 A). Posteriormente, se llevó a cabo un abonado de fondo con un fertilizante NPK 8-24-8 en la primera campaña y NPK 8-12-24 en la segunda, ambos en septiembre y a una densidad de 500 kg ha⁻¹. El 26 de octubre de 2015 y el 15 de noviembre de 2016, se preparó la cama de siembra con un cultivador y un molón y se colocaron varillas para delimitar las zonas de la parcela (Figura 3.6 B). Las siembras se realizaron ese mismo día con la sembradora de EEAD-CSIC (Figura 3.6 C) y, tras ello, se colocaron los sistemas de riego por aspersión (Figura 3.6 D). Los riegos se realizaron en base a las necesidades del cultivo. En la campaña 2015-2016, se aplicaron 6 riegos entre octubre y noviembre y, en la segunda campaña, se aplicaron 11 riegos, 2 en noviembre y 9 entre marzo y abril. En el mes de marzo de ambas campañas, al comienzo de la floración, se realizó un abonado con nitrato amónico NAC 27%. No se aplicó ningún herbicida por incompatibilidad con el cultivo de Pennycress, así que se optó por retirar las malas hierbas manualmente y se limpiaron los pasillos y las zonas adyacentes con un rotovator, un molón y una picadora. Hay que destacar que en la segunda campaña la presencia de malas hierbas fue mayor, sobretodo de

la brassicácea *Capsella bursa-pastoris*, también conocida como bolsa de pastor, que tiene un ciclo similar al del cultivo pero con una maduración más temprana. No obstante, no hubo indicios de que las malas hierbas produjeran ningún efecto supresor del cultivo. Además, durante la primera campaña, surgió la necesidad de utilizar un producto anti-hormigas debido a su abundante presencia y, evitar así, la consiguiente desaparición de semilla. Para paliar dicho problema se utilizó acético al 30% y Fipronil 0,02%. En la segunda campaña, no se observó ningún problema destacable en cuanto a plagas. Durante el ciclo de cultivo se realizó un seguimiento del número de plantas por metro cuadrado, de la altura de las plantas, del momento de la floración y de la maduración de las semilla. Una vez llegado el momento de la cosecha, en la primera campaña, se probaron dos velocidades diferentes, aumentándose el número de revoluciones con el fin de obtener una semilla más limpia. No obstante, la velocidad más elevada provocó una mayor pérdida de semilla cosechada. Teniéndolo en cuenta, la cosecha en la segunda campaña fue a la velocidad más baja, manteniéndola constante.



Figura 3.6 Fotografías de la evolución del cultivo de Pennycress durante la campaña 2016-2017. Preparación de la cama de siembra (A). Colocación de varillas que delimitan las zonas de la parcela (B). Siembra del cultivo con la sembradora de EEAD-CSIC (C). Riego por aspersión (D).

3.1.3. Cultivo de plantas de *Arabidopsis thaliana*.

En este trabajo se han utilizado plantas de *A. thaliana* silvestres (ecotipo Columbia o Col-0), así como un mutante obtenido del banco de semillas Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC). Se trata de un mutante *fae1-1* inducido químicamente por EMS, mutado en el gen de la elongasa *At4g34520*, por tanto, deficiente en la elongación de ácidos grasos (NASC ID: N6345). La caracterización genética de este mutante se detalla en el apartado de 3.2.5.2.

Para la siembra y posterior cultivo de *A. thaliana*, las semillas fueron sometidas previamente a un tratamiento de esterilización durante 3 min en una solución compuesta por lejía comercial al 50% (v/v) y una gota de Tween-20 (Bio Rad®). Seguidamente, fueron lavadas durante 1 min con una solución de etanol 70% y se realizaron hasta cinco lavados sucesivos con agua destilada ultrapura estéril. Una vez esterilizadas, las semillas fueron sembradas en placas Petri con medio nutritivo estéril. El medio base de cultivo utilizado fue el medio MS (Murashige-Skoog, 1962) sólido estándar complementado con sacarosa y ajustado a un pH de 5,7. Según las necesidades experimentales, también se complementaba con la adición del herbicida glufosinato de amonio (Basta®, Fluka) usado a modo de marcador selectivo. La composición del medio MS queda detallada en la tabla 3.1.

Nutriente	Concentración (g l ⁻¹)
MS (Sigma Aldrich®)	4
MES	9,76
Sacarosa	10
Plant Agar	9
Herbicida	Concentración (mg l ⁻¹)
Basta®, Fluka	25

Tabla 3.1 Composición del medio sólido MS, medio Murashige-Skoog (Murashige y Skoog, 1962) utilizado para el cultivo en placa de *A. thaliana*, el herbicida utilizado y su concentración.

Para la siembra de las semillas fueron sumergidas en una solución estéril de en agua destilada ultrapura + agarosa 0,1 % (p/v), y se depositaron sobre el medio sólido 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 de Petri fueron

selladas con cinta porosa (Leukopor®). Seguidamente, se llevó a cabo la estratificación de las semillas, almacenando las placas de Petri a 4°C durante un periodo de 3 días en oscuridad, sincronizando así su germinación. Transcurrido este tiempo, las placas fueron transferidas a la cámara bioclimática (Fitoclima 10000 EHHF, Aralab) bajo las mismas condiciones que Pennycress (Apartado 3.1.2.1). Tras 2-3 semanas de crecimiento en placa (Figura 3.7 A), las plantas se transfirieron a maceta con ayuda de unas pinzas de plástico. El sustrato utilizado, al igual que para Pennycress, fue una mezcla compuesta por turba (Kekkila):vermiculita 3:1 (v/v) con fertilizante Osmocote® (Ibercamp) a una concentración de 1,5 g/l. También se espolvoreó sobre la superficie del sustrato una pequeña cantidad del insecticida Chas 5G® (Cheminova Agro) con cloropirifos 5% (p/p), para evitar la aparición de larvas de dípteros u otros insectos. Las condiciones de crecimiento de las plantas de Arabidopsis en maceta fueron las mismas que en placa. El aporte de agua se realizó 1-2 veces por semana, dependiendo de las necesidades del cultivo (Figura 3.7 B).

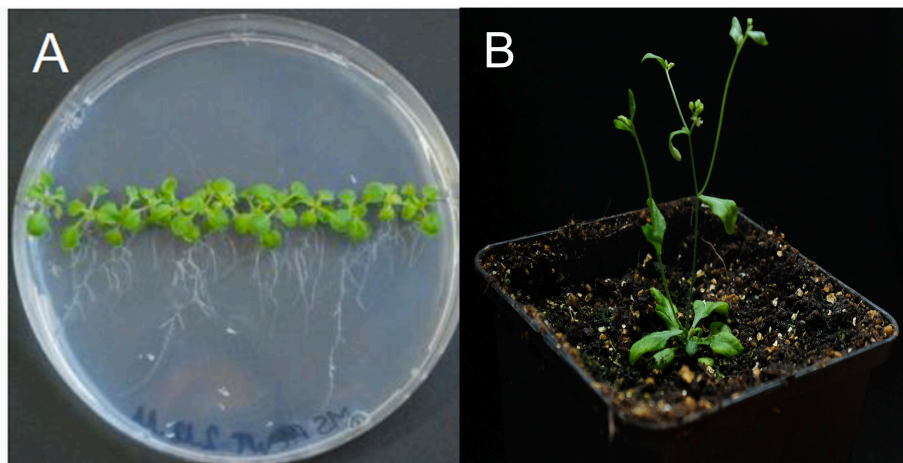


Figura 3.7 Platas de *A. thaliana*, en cultivo de en placa con medio MS tras 14 días (A), y cultivo con sustrato tras 3 semanas.

En determinadas ocasiones, cuando las plantas de Arabidopsis querían utilizarse para propagar semillas (apartado 3.1.4) o cuando plantas iban a ser empleadas para ser transformadas (apartado 3.3.2) el cultivo en placa con medio sólido fue omitido, sembrándose las semillas directamente en sustrato.

3.1.4. Propagación y almacenamiento de semillas.

La propagación de semillas consiste en permitir el completo desarrollo de la planta, es decir, la floración de la misma y el posterior desarrollo de las vainas con la finalidad de obtener semillas. Para llevarla a cabo, se cultivaron plantas de *T. arvense* y de *A. thaliana* en maceta hasta su completo desarrollo, es decir, la floración y el posterior desarrollo de las silicuas con semillas. En el momento en que las silicuas comenzaron a secarse se introdujo la parte aérea de la planta en bolsas de papel parafinado transpirable hasta que se produjo la apertura de las silicuas e modo que a medida que las silicuas se abrían las semillas caían al interior de la bolsa. El contenido de las bolsas se vertió sobre un colador y las semillas se separaron del resto de material vegetal seco por tamización. Finalmente las semillas se almacenaron a una temperatura de 4°C para su posterior utilización.

3.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

3.2.1. Extracción de DNA genómico.

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

Para ello, se utilizaron muestras de tejido foliar (< 0,5 g) congeladas previamente que fueron trituradas en mortero de cerámica con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino. Éste fue transferido a tubos de 1,5 ml a los que se añadieron 500 µl de tampón CTAB (4 % CTAB, 100 mM TrisHCl pH 8, 20 mM EDTA pH 8, 1.4 M NaCl, 1 % PVP) previamente precalentado a 60 °C y la mezcla se incubó a 60 °C durante 30 min, agitando suavemente por inversión cada 5 min. Tras la incubación, se realizó una centrifugación a 14000 g durante 5 min para eliminar los restos celulares. Los sobrenadantes fueron transferidos a nuevos tubos a los que se añadió 400 µl de cloroformo – isoamil alcohol 24:1 (v/v), mezclando posteriormente por inversión durante 2 min. Para separar de nuevo las fases se centrifugó a 14000 g durante 5 min y se recuperó la fase acuosa. Llegados a este punto y de manera opcional, se consideró oportuno eliminar cualquier posible contaminación por RNA mediante un tratamiento RNAsa. Para ello, se añadió 1 µl de RNAsa A 10 µg/ml (Roche) y se incubó la muestra durante 30 min a 37 °C. Tras el tratamiento RNAsa, se añadieron 300 µl de isopropanol, se agitó suavemente por inversión y se incubó a – 20 °C durante 2 horas para que tuviera lugar la precipitación del DNA genómico.

Tras las 2 horas, la muestra se centrifugó a 14000 g durante 3 min y se descartó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados sucesivos del precipitado con etanol 75% (v/v) y se dejó secar al aire durante aproximadamente 15 min. Seguidamente, el gDNA se resuspendió con 50 µl de agua destilada estéril ultrapura. Por último, las muestras se almacenaron a -20 °C para su posterior utilización.

3.2.2. Extracción de RNA total.

Extraer RNA de alta calidad a partir de semillas ricas en contenido lipídico siempre ha supuesto un desafío. Esto es debido a que los lípidos interfieren con la ruptura del tejido vegetal y provocan una barrera entre las células y el tampón de extracción, de manera que los polisacáridos, polifenoles y otros metabolitos secundarios pueden adherirse al RNA y coprecipitar con él. Por esta razón, se probaron varios protocolos de extracción sin éxito, como el método de Trizol, método utilizado habitualmente para extraer RNA vegetal. Finalmente, se llegó a la conclusión de que el método idóneo para extraer RNA de semillas de *Pennycress* es el basado en CTAB.

Se partió de muestras de material vegetal (< 0,3 g) que fueron trituradas en mortero de cerámica con nitrógeno líquido. El polvo resultante fue transferido a tubos de 1,5 ml a los que se añadieron 500 µl de tampón CTAB (precalentado previamente a 60 °C) y 10 µl de β-mercaptoetanol. La mezcla se agitó vigorosamente en un vórtex durante 1 min. Seguidamente, se realizó una incubación a 55 °C durante 15 min en un bloque seco, invirtiendo cada 5 min para conseguir una buena mezcla entre el tampón y las células. Después, se añadieron 500 µl de cloroformo – isoamil alcohol 24:1 (v/v), mezclando posteriormente por inversión durante 2 min. Se centrifugó a 14000 durante 5 min a 4 °C. Para mejorar la precipitación de los polisacáridos, se colocó la muestra en hielo durante 10-20 min tras la centrifugación. La fase acuosa resultante fue transferida a un tubo nuevo al que se añadieron 300 µl de cloroformo – isoamil alcohol 24:1 (v/v), invirtiendo para homogeneizar la mezcla. Se realizó una segunda centrifugación en las mismas condiciones, se colocó la muestra 10 min en hielo y se recuperó de nuevo la fase acuosa en un tubo nuevo. Después, se añadió un volumen de LiCl 4 M mezclando suavemente, y se dejó precipitar a - 20 °C de 2-24 h.

Transcurrido ese tiempo, se centrifugaron los tubos durante 20 min a 14000 g y a 4 °C. El RNA quedó en el precipitado que fue posteriormente lavado con LiCl 0,8 M para diluir el DNA contaminante. Se realizó otra centrifugación a 14000 durante 5 min y 4 °C. Después, se realizó otro lavado del precipitado con etanol 75% (v/v) y se dejó secar al aire durante 15 min. Por último, el sedimento se resuspendió en 20-40 µl de agua DEPC estéril. Por último, las muestras se almacenaron a -20 °C para su posterior utilización.

3.2.3. Determinación de la concentración y pureza de ácidos nucleicos.

La concentración y pureza de los ácidos nucleicos extraídos se analizó mediante la medida de la absorbancia (A) en un microespectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™). Para el cálculo de la concentración, se tuvo en consideración la absorbancia medida a 260 nm, de forma que cada unidad de absorbancia se consideró como 50 µg/ml de DNA y 40 µg/ml de RNA. La pureza de la muestra se estimó mediante el coeficiente Abs_{260}/Abs_{280} de forma que las muestras con una relación superior a 1,8-2 se consideraron suficientemente libres de proteínas, y las muestras con una relación superior a 2-2,2 para el coeficiente Abs_{260}/Abs_{280} se consideraron suficientemente libres de sales. La determinación se realizó a partir de 1,5 µl de muestra y utilizando como blanco el tampón en el que la muestra de ácidos nucleicos estuviera disuelta.

Adicionalmente, la pureza e integridad del gDNA y RNA se determinaron mediante electroforesis de agarosa, como se describe en el apartado 3.2.6. En el caso del RNA, es necesario desnaturalizar previamente la muestra de RNA (1 µg) a 65 °C durante 5 min en tampón de carga (EDTA 5 mM, formamida 95% v/v, azul de bromofenol 0,1% p/v y xilencianol 0,1% p/v).

3.2.4. Síntesis de cDNA.

La hebra de DNA complementario (cDNA) se sintetizó utilizando como cebador un oligonucleótido compuesto por desoxirribonucleótidos de timina, el Oligo (dT)₁₂₋₁₈, que hibrida con la secuencia de poli(A) que se encuentra en el extremo 3' del RNA. Se utilizaron diferentes enzimas transcriptasas reversas, dependiendo de la disponibilidad, en los casos de M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) y ThermoScript Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies™), y SuperScriptIII con un fin específico como es el caso de la técnica RACE (procedimiento explicado en el apartado 3.2.5.4), siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. En todos los casos, se partió de 3 µg de RNA total extraído (apartado 3.2.2) al que se le realizó un tratamiento DNasa para evitar la posible contaminación de DNA genómico. Para ello, el RNA se disolvió con agua destilada ultrapura con DEPC 0,1% (v/v) en un volumen de 10 µl, al que se añadieron 0,2 µl de enzima DNasa I recombinante 10 U/µl (Roche) y 1 µl de tampón DNasa I 10x. Se realizó una incubación a 37 °C durante 15 min y, posteriormente, la enzima se inactivó añadiendo 0,5 µl de EDTA 0,2 M e incubando a 75 °C durante 10 min, quedando así purificado el RNA.

La retrotranscriptasa utilizada con mayor asiduidad fue la M-MLV Reverse Transcriptase, de Promega. Así pues, el cDNA se sintetizó a partir de 3 µg de RNA total purificado empleando 0,68 µl de Oligo dT 50 µM (Isogen) por cada µg de RNA y agua destilada ultrapura con DEPC 0,1% (v/v) hasta un volumen de 15 µl. Se incubó a 70 °C durante 5 min y se mantuvo posteriormente en hielo durante 5 min para evitar la formación de estructuras secundarias en el RNA. Seguidamente, se añadió 5 µl de tampón de retrotranscripción (Promega) 5x, 1,25 µl de una mezcla de dNTPs 10 mM, 0,6 µl de enzima RNasa OUT (Invitrogen, Life Technologies™) 40 U/µl, 1 µl de M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) 200 U/µl y agua destilada ultrapura con DEPC 0,1 % (v/v) hasta un volumen total de 10 µl. Esta mezcla se incubó a 42 °C durante 1 h. Para eliminar el híbrido cDNA-mRNA se realizó un tratamiento con 0,4 µl de RNasa H (Thermo Scientific™) 5 U/µl a 37 °C durante 20 min.

También se utilizó la enzima retrotranscriptasa ThermoScript® Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies™), indicada para sintetizar cDNA a partir de RNA rico en estructuras secundarias. A los 3 µg de RNA total purificado y tratado con DNasa I, se añadió 1 µL de Oligo dT 50 µM (Isogen), 2 µL de una mezcla de dNTPs 10 mM y agua destilada ultrapura hasta completar un volumen total de 12 µl. Para provocar la desnaturalización del RNA se incubaron las muestras a 65 °C durante 5 min y se mantuvieron posteriormente en hielo otros 5 min. A la mezcla se añadió 4 µL del tampón de retrotranscripción (Invitrogen Life Technologies™) 5x, 1 µL de la enzima RNasa OUT (Invitrogen, Life Technologies™) 40 U/µl, 1 µL de DTT 0,1 M y 1 µL de la enzima ThermoScript RT 15 U/µl. Seguidamente se realizaron incubaciones de 50 °C durante 1 h y de 85 °C durante 5 min. Finalmente, fue añadido 1 µL de RNasa H (Thermo Scientific™) 5 U/µl y se incubó durante 20 min a 37 °C.

El cDNA obtenido se diluyó añadiendo agua destilada ultrapura hasta un volumen de 100 µl y las muestras se almacenaron a -20 °C para su posterior utilización. La integridad del cDNA sintetizado se comprobó mediante la amplificación por PCR del gen constitutivo *TaACTIN* (Código acceso GenBank: JQ435880.1).

3.2.5. Técnicas de PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) consiste en un primer paso de activación de la enzima polimerasa a 95-98 °C durante 5 min, seguida de un número de ciclos, entre 25 y 40, dependiendo del tamaño del fragmento a amplificar. Los ciclos se componen de tres etapas: una primera etapa de desnaturalización a 95-98 °C durante 10-30 s dependiendo de la enzima polimerasa, otra de hibridación de los cebadores al DNA molde durante 30 s y otra de extensión a 72 °C durante 30 s/kb. Todos los programas finalizaron con una etapa de extensión a 72 °C durante 10 min. La temperatura de hibridación (Th) es específica de cada pareja de cebadores y depende de su temperatura de fusión (Tm). Por otro lado, el tiempo de extensión depende de la longitud del fragmento que se quiere amplificar. La amplificación in vitro del cDNA se realizó mediante PCR en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Thermo Scientific) o en el C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad).

3.2.5.1. PCR semicuantitativa.

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó para obtener las secuencias del gen *TaFAE1* de las dos variedades europeas NASC y FRENCH de Pennycress, a partir de la secuencia depositada *TaFAE1* (código acceso GenBank: KF664164.1). Además, se obtuvieron las secuencias completas de los genes de Pennycress *TaWR11* y *TaDGAT1*, desconocidas hasta el momento. La técnica PCR también se utilizó para estudiar la expresión relativa tisular de los tres genes citados anteriormente, de *TaFAD2* y de *TaACTIN* como control de la expresión (códigos acceso GenBank: DQ518324.1 y JQ435880.1, respectivamente). Por otro lado, se amplificó el gen *AtFAE1* de *A. thaliana* (código acceso GenBank: AF053345.1) para proceder al genotipado del mutante *fae1-1* (apartado 3.2.5.2) y, por supuesto, para otras amplificaciones rutinarias. El listado de cebadores con sus respectivas Tm utilizadas se puede consultar en la tabla 3.3.

Se utilizaron diferentes enzimas polimerasas según el objetivo final de la PCR, siguiendo siempre las instrucciones del fabricante. Para la amplificación rutinaria se utilizaron las Taq polimerasas estándar BIOTAQ™ Red DNA Polimerasa (Bioline) y Biotools DNA Polymerase, en cambio, para una amplificación más fiable (como es el caso de fragmentos destinados a

secuenciación o clonación del fragmento amplificado en un vector) se utilizó la Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Thermo Scientific). Dicha polimerasa presenta actividad 5'→3' exonucleasa por lo que permite una amplificación más fiable y precisa debido a su actividad correctora de errores.

Para una amplificación fiable pero con el objetivo de clonar en el vector pGEM®-T Easy (Promega), que necesita extremos cohesivos (necesita la introducción de una base de adenina en el extremo 3' del fragmento amplificado, ver apartado 3.2.8.1) se utilizó también BIOTAQ™ Red DNA Polimerasa (Bioline), Biotools DNA Polymerase o Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Thermo Scientific) llevando a cabo un tratamiento previo de A-tailing que queda detallado en el apartado 3.2.8.1. En la tabla 3.2 se detallan los componentes y concentraciones de la mezcla de reacción para cada enzima polimerasa utilizada.

	BIOTAQ™ Red DNA Polimerasa, Bioline	Biotools DNA Polymerase	Phusion® High Fidelity DNA Polymerase
Reactivo	Volumen (µl)		
cDNA, gDNA	1	1	1
Tampón polimerasa	2	2	4
	(10x MgCl ₂ Free, Bioline)	(10x MgCl ₂ Free, Biotools)	(5x Phusion HF, Thermo Scientific)
MgCl ₂	2	2	-
	(MgCl ₂ 50 mM, Bioline)	(MgCl ₂ 50 mM, Biotools)	
dNTP mix 10 mM	1	1	0,4
cebador 5' 10 mM	1	1	1
cebador 3' 10 mM	1	1	1
DMSO*	-	-	0,6
DNA polimerasa	1	1	0,4
H ₂ O hasta	20	20	20

Tabla 3.2 Mezcla de reacción de PCR para cada enzima polimerasa utilizada. Además de cDNA y gDNA se utilizaron como molde colonias individuales transformadas de *E. coli* (apartado 3.2.5.3). *Opcional, según condiciones experimentales.

En el caso de la polimerasa Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Thermo Scientific) la temperatura de desnaturalización era de 98 °C, el tiempo de extensión de 15 s/kb y

para calcular la Th se utilizó el programa ofrecido por la casa comercial <http://www.thermoscientificbio.com/webtools/tmc/>, ya que esta polimerasa necesita unas consideraciones especiales de Th.

3.2.5.2. PCR de genotipado y caracterización genética de mutantes de *A. thaliana*.

Para verificar y localizar la mutaciones puntuales del mutante de EMS *fae1-1* de *A. thaliana* se llevaron a cabo PCR convencionales con la Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Thermo Scientific) a partir de DNA genómico, tanto de plantas Col0 de *A. thaliana* como mutantes *fae1-1*. Los cebadores que amplifican el gen *AtFAE1* (código acceso GenBank: AF053345.1) aparecen en la tabla 3.3. Los productos así obtenidos, fueron posteriormente clonados en el vector pGEM-T-easy (ver apartado 3.2.8.1) y secuenciados (ver apartado 3.2.10). Por último, se compararon ambas secuencias para identificar y localizar las mutaciones puntuales de la línea mutante *fae1-1*.

Además, se realizó un genotipado de todas las líneas transgénicas de *A. thaliana* generadas en esta Tesis Doctoral con la finalidad de comprobar la presencia del transgen en cuestión. En este caso, 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. La temperatura de desnaturalización utilizada es de 98 °C y el tiempo de extensión de 20 s/Kpb. El kit también incluye un punzón/émbolo de 0,5 mm Ø para cortar el material vegetal e introducirlo en el tubo de PCR. La mezcla de PCR contiene 10 µl tampón Phire® Plant 2x (con MgCl₂ y dNTPs) (Finnzymes, Thermo Scientific), 1 µl de cada cebador a 10 mM, 0,4 µl Phire® Hot Start II DNA Polymerase (Finnzymes, Thermo Scientific), un disco de hoja de 0,5 mm Ø extraído con el punzón y agua destilada ultrapura hasta 20 µl.

Como se verá posteriormente, para la generación de las líneas transgénicas de *A. thaliana* se utilizó el vector pFGC5941-proOLE2 (ver apartado 3.2.12.2). Con el fin de detectar la inserción de T-DNA en las líneas transgénicas se utilizaron los cebadores flanqueantes del gen que confiere resistencia al herbicida de glufosinato de amonio Basta® (Fluka) de dicho vector.

También se verificó la homocigosis del mutante de *A. thaliana fae1-1* ya que, en el caso de que

fuese homocigoto, la presencia del T-DNA insertado en el gen impediría la amplificación y, en consecuencia, no se detectaría ningún producto de PCR.

3.2.5.3. PCR en colonia.

Se trata de una metodología rápida para comprobar colonias bacterianas transformadas. Al realizar transformaciones de *Escherichia coli* con el vector ligado al fragmento de DNA de interés (como se describe en el apartado 3.2.8.3) se verificaron las colonias transformadas positivas mediante la realización de una PCR en la que el molde fueron las colonias bacterianas. Para ello, se picaron colonias individuales con una punta de pipeta estéril y, tras hacer una resiembra de la colonia seleccionada en una nueva placa con medio sólido, se introdujo directamente en la mezcla de reacción de PCR. Se utilizó la Taq polimerasa estándar bajo las mismas condiciones de reacción que las especificadas en la tabla 3.2. La única diferencia era el primer paso de desnaturalización del programa de PCR, que consistía en 30 min de desnaturalización a 95 °C para asegurar la lisis térmica de las bacterias.

3.2.5.4. RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends).

La obtención de la secuencia completa de un cDNA a partir de una secuencia parcial previamente conocida se llevó a cabo mediante la técnica RACE empleando para ello el protocolo descrito en el kit comercial Gene Racer™ (Invitrogen). Esta técnica se utilizó para obtener las secuencias de los genes *TaWR11* y *TaDGAT1*, desconocidas hasta el momento. La técnica PCR RACE engloba dos sistemas diferentes, 5'-RACE y 3'-RACE, no obstante, en este trabajo únicamente se utilizó el segundo sistema para obtener el extremo 3' de ambos genes. Se utilizaron 3 µg de RNA extraído de semillas de Pennycress del estadio verde-amarillo, previamente purificado y tratado con DNasa I recombinante 10 U/µl (Roche) (apartado 3.2.4). Para la síntesis de la hebra de cDNA se añadió al RNA 1 µl de oligo (dT) GeneRacer, 1 µl de una mezcla de dNTPs 10 mM y agua destilada ultrapura hasta completar 13 µl finales. Se realizó una incubación a 65 °C durante 5 min y, después, en hielo durante 1 min. Seguidamente, se añadieron 4 µl tampón de retrotranscripción (Invitrogen, Life Technologies™) 10x, 1 µL de DTT 0,1 M, 1 µL de la enzima RNasa OUT (Invitrogen, Life Technologies™) 40 U/µl y 1 µL de la enzima SuperScript® III RT 200 U/µl. Seguidamente se realizaron incubaciones de 60 °C durante 1 h, de 70 °C durante 15 min y en hielo durante 2 min. Finalmente, fue añadido 1 µL de

RNasa H (Thermo Scientific™) 5 U/μl y se incubó durante 20 min a 37 °C.

La secuencia de las regiones 3' de ambos genes se obtuvieron mediante la técnica PCR-RACE, utilizando cebadores 5' internos de ambos genes (F1_WRI1 y F1_DGAT1) y los cebadores 3' incluidos en el kit comercial Gene Race™ (Invitrogen). Se realizó una primera PCR-RACE (con R_RACE 3') y una PCR-RACE adicional (con R_RACE 3' nested), o PCR anidada, utilizando como molde el producto de amplificación de la primera reacción. Finalmente, los productos de PCR RACE se clonaron en el vector pGEM®-T Easy (Promega) (ver apartado 3.2.8.1) y se secuenciaron en el Servicio de Secuenciación del CNIO (ver apartado 3.2.10). Una vez obtenidas las secuencias de los extremos 3' de ambos genes, se diseñaron cebadores específicos tras el codón de fin de la traducción en ambos casos.

Para obtener las secuencias completas de *TaWRI1* y *TaDGAT1*, se procedió al diseño de cebadores 5' degenerados desde el codón de inicio de la traducción, ATG. Para ello, se realizó un alineamiento múltiple de proteínas WRI1 y DGAT1 de diferentes especies y, afortunadamente, la región inicial de ambos genes se encontraba suficientemente conservada como para poder diseñar dichos cebadores degenerados. Posteriormente, se procedió a realizar reacciones de RT-PCR con los cebadores degenerados del inicio y con los cebadores previamente diseñados tras el codón de stop. Los productos de PCR también se clonaron en el vector pGEM®-T Easy (Promega) y se secuenciaron en el Servicio de Secuenciación del CNIO. Las PCR-RACE y RT-PCR pertinentes se realizaron a partir de cDNA obtenido de semillas de Pennycress. Los cebadores utilizados en las reacciones de amplificación se indican en la tabla 3.3 y el proceso de obtención de las secuencias se muestra esquematizado en la figura 3.8.

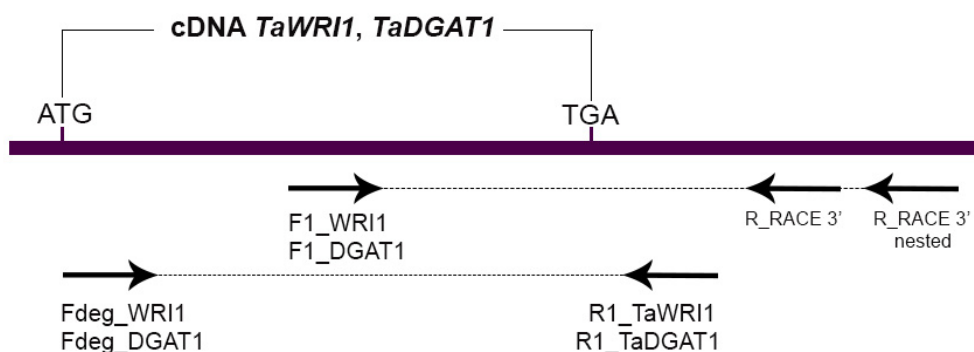


Figura 3.8 Esquema del procedimiento de obtención de las secuencias génicas de *TaWRI1* y *TaDGAT1* por PCR-RACE y RT-PCR.

3.2.5.5. Cebadores utilizados.

El diseño de parejas de cebadores específicos de los genes objeto de estudio se realizó de acuerdo con las necesidades experimentales, forma manual o mediante la utilización del programa primer3. Para el cálculo de la temperatura de fusión (T_m) se utilizó el programa T_m calculator en la página web de Thermo Scientific (citado en el apartado 3.2.5.1), ya que el programa discrimina entre la T_m utilizada por una Taq polimerasa estándar y la T_m utilizada por Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Thermo Scientific). El resto de propiedades de los cebadores, como el % en GC o la formación de estructuras secundarias, se comprobaron con el programa NetPrimer (PREMIER Biosoft) (página web: <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>). De la síntesis de los cebadores se encargó la casa comercial Isogen Life Science. Todos los cebadores utilizados durante el desarrollo de este trabajo se detallan a continuación en la tabla 3.3.

Gen	Cebador	Secuencia 5' → 3'	T_m (°C)
<i>TaFAE1</i>	F1_TaFAE1	ATGACGTCCGTTAACGTTAAGCT	58,9
	F2_TaFAE1	GTGGTGAGCACAGAGAACATCA	60,3
	F3_TaFAE1	TGCTGGTGATAACAGATCCATGA	58,9
	R1_TaFAE1	TTAGGACCGACCGTTTTGGACACGA	64,6
	R2_TaFAE1	TGATGTTCTCTGTGCTCACCAC	60,3
	R3_TaFAE1	GTCTCTGACTTACCCGAATCA	57,9
<i>TaFAD2</i>	F_TaFAD2	GATGCCTTAAAGCGTGTGCC	59,4
	R_TaFAD2	CAGAAGCGGAACTCCGTAGA	59,4
<i>TaACTIN</i>	F_TaACTIN	CATGTATGTCGCCATCCAAGCTGTTCTC	66,6
	R_TaACTIN	CAGCAGCTTCCATTCCCACGAAC	64,2
Obtención de secuencia de <i>TaWRI1</i> y expresión tisular			
<i>WRI1</i>	Fdeg_WRI1	ATGAAGARRCSCTTAACCACTTCT	58,9
	F1_WRI1	CGCGTTACGAATTCGACA	55,5

	F1_TaWRI	ATGAAGAAGCCCTTAACCACT	55,9
<i>TaWRII</i>	R1_TaWRII	TCAGACAGAATAGTTACATGAAACAGAGG	62,4
Obtención de secuencia de <i>TaDGAT1</i> y expresión tisular			
	Fdeg_DGAT1	ATGGMGATTTTGGATTCTGSWGGCGT	64,0
<i>DGAT1</i>	F1_DGAT1	GGGTTGGGTGGCTCGTCA	60,5
	F1_TaDGAT1	ATGGAGATTTTGGATTCTGCTGGCGT	64,0
<i>TaDGAT1</i>	R1_TaDGAT1	TTAGCATCGGAACAGATAAGAAGGTCC	63,4
Cebadores utilizados del GeneRacer™ Kit			
	R_RACE 3'	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG	76
	R_RACE 3' nested	CGCTACGTAACGGCATGACAGTG	72
Clonación de <i>TaFAE1</i> en vector pFGC5941-proOLE2			
	F_TaFAE1_NcoI	GGGGCCATGGATGACGTCCGTTAACGTTA	69,5
<i>TaFAE1</i>	R_TaFAE1_BamHI	GGGGGGATCCTTAGGACCGACCGTTTTGGACA	69,5
	F_OLE2	CCCGAATTCGCAAATAAAAAGTGGTCGAAC	65,4
	R_OLE2	TTCCATGGTGTAAGCTAATGAGAAATTGT	61,3
pFGC5941	F2_OLE2	CAATTTCTCATTAGCTTACACCATGGAAA	61,0
-proOLE2	R_OCS	GCAAATATCATGCGATCATAGGCGTCTC	65,1
	F_BASTA	GCACCATCGTCAACCACTACA	59,8
	R_BASTA	GCTGAAGTCCAGCTGCCAGAAA	62,1
Genotipado mutante <i>fae1-1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>			
	F_AtFAE1	ATGACGTCCGTTAACGTTAAGCT	58,9
<i>AtFAE1</i>	R_AtFAE1	GTGGTGAGCACAGAGAACATCA	60,3

Tabla 3.3 Listado de cebadores utilizados en las reacciones de PCR, junto con sus respectivas temperaturas de fusión (T_m).

3.2.6. Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa y cuantificación relativa.

La electroforesis en gel de agarosa se utilizó para el análisis de productos amplificados por PCR, para la separación de fragmentos de DNA tras una digestión enzimática y para comprobar la integridad de gDNA y RNA extraídos. Los productos amplificados por PCR fueron analizados mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa. La concentración de agarosa utilizada depende del tamaño del fragmento de DNA que se desee analizar, siendo la concentración mínima de 0,8% para fragmentos de > 2 kb y la concentración máxima 2% para fragmentos de < 200 pb. Rutinariamente se prepararon geles de agarosa 1% en tampón TBE (Tris-HCl 90 mM, pH 8,0, H₃BO₃ 90 mM y EDTA 2 mM). Para preparar el gel la agarosa se fundió con el tampón TBE en un microondas y posteriormente se agitó suavemente. Una vez enfriada la disolución de agarosa, se añadió 1 µl del agente intercalante SYBR® Safe DNA Gel Stain (Life Technologies), necesario para la posterior visualización de los ácidos nucleicos bajo luz UV, por cada 10 ml de tampón TBE. La mezcla resultante se vertió en un molde previamente sellado, se colocó el peine y se dejó polimerizar durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo de solidificación, se retiró el peine y el gel se colocó en una en una cubeta (BioRad) con tampón TBE. Antes de cargar las muestras en los pocillos del gel, se le añadió tampón de carga (Orange G 0,25% p/v, Sigma-Aldrich y glicerol 30% p/v), con una relación de 1 µl por cada 5 µl de muestra, excepto a las muestras amplificadas con la polimerasa de Bioline, que contiene el colorante incorporado en la mezcla de reacción. Del tampón se cargaron de 5-20 µl de producto de PCR por pocillo según el objetivo de la electroforesis (visualización e identificación del producto de PCR, purificación del mismo, etc.). Además, se cargaron 5 µl de marcador de masa molecular comercial 1 kb GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific™).

La electroforesis se desarrolló a 100 V (voltaje constante) durante 30-45 min. Las imágenes de los geles se obtuvieron con bajo luz UV en un equipo de captura de imagen Gel Doc™ (BioRad) utilizando el programa de análisis de imagen Quantity One (BioRad). El tamaño de los fragmentos amplificados fue estimado por comparación con el marcador de masa molecular y la cuantificación relativa de la intensidad de las bandas separadas en la electroforesis se realizó utilizando el programa Quantity One anteriormente citado. Posteriormente, en los análisis de expresión relativa de los genes se realizó una normalización de los datos respecto a un gen de referencia (actina).

3.2.7. Extracción y purificación de ácidos nucleicos en geles de electroforesis.

La extracción y purificación de los productos de PCR de geles de agarosa se realizó cuando el objetivo era su clonación en un vector plasmídico o su secuenciación. Finalizada la electroforesis, y visualizándolo bajo la luz UV del Gel DocTM (BioRad), se extrajo el fragmento de agarosa que contenía la banda a purificar. Seguidamente, se eluyó y purificó con el kit GeneJETTM Gel Extraction (Fermentas, Thermo ScientificTM) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.8. Clonación de productos amplificados por PCR en *Escherichia coli*.

El DNA amplificado por PCR se introdujo en un vector plasmídico de entrada, generalmente de origen comercial, para desde allí poder ser transferido a otro vector de destino, que puede ser también comercial, o bien diseñado y suministrado por grupos de investigación. En este apartado se detalla el protocolo de ligación general con el vector pGEM®-T Easy (Promega), la preparación de células quimiocompetentes de las diferentes cepas de *E. coli* y su posterior transformación y cultivo.

3.2.8.1. Ligación de productos de PCR.

Para la ligación de productos de PCR en el vector pGEM®-T Easy (Promega), mostrado en la figura 3.9, es necesario que el fragmento en cuestión presente extremos cohesivos y, por ello, es necesaria la introducción de una base de adenina en el extremo 3' del mismo. La razón es que el vector pGEM®-T Easy presenta una base de timina en el extremo 5', lo que permite la clonación de los extremos cohesivos mediante la utilización de la enzima T4 ligasa (Promega). Para la adición de dicha adenina en el fragmento, se utilizó la enzima BIOTAQTM Red DNA Polimerasa (Bioline) que introduce dicho residuo directamente por PCR. En determinadas ocasiones en las que la amplificación requería una polimerasa más fiable, se empleó la enzima Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Thermo Scientific), y debido a que no introduce el residuo de adenina por sí sola se realizó un tratamiento previo de A-tailing. Para ello, se partió de 8 µl del producto de PCR purificado a ligar (apartado 3.2.7), 1 µl de tampón

polimerasa 10x con MgCl₂, 0,3 µl dATP 0,2 mM y 1 µl de BIOTAQ™ Red DNA Polimerasa (Bioline), y se incubó a 70 °C durante 25 min. Posteriormente, se procedió a la ligación del fragmento. La enzima T4 ligasa también se utilizó para la ligación por extremos cohesivos de vectores e insertos cortados con enzimas de restricción (ver apartado 3.2.12).

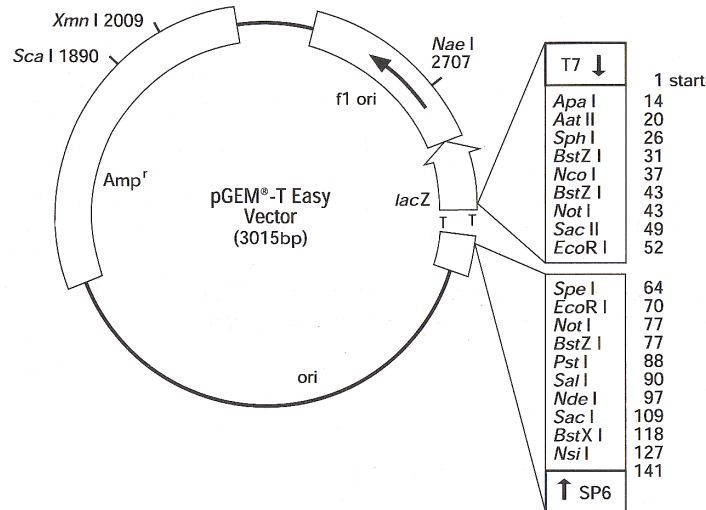


Figura 3.9 Organización de las regiones del vector pGEM®-T-easy.

3.2.8.2. Preparación de células quimiocompetentes de *Escherichia coli*. Método del cloruro de rubidio.

Distintas cepas de *E. coli* han sido utilizadas dependiendo del objetivo final de la transformación. Para la clonación de productos amplificados por PCR se utilizaron las cepas DH5α o JM109 (Promega). Las células JM109 comerciales eran ya competentes, mientras que las células DH5α se prepararon en el laboratorio mediante el método descrito a continuación (Gietz y Woods, 1994). El proceso de preparación de células competentes se llevó a cabo en condiciones estériles. Todos los cultivos se realizaron en medio LB, pH 7,2 (de sus siglas en inglés Lysogeny Broth, Bertani, 1951), modificado por Miller (1972), cuya composición se detalla en la tabla 3.4.

Componente	Concentración (g l ⁻¹)
Triptona	10
NaCl	10
Extracto de levadura	5
Agar bacteriológico	15

Tabla 3.4 Composición del medio LB modificado (Bertani, 1951; Miller, 1972) líquido y sólido (al medio sólido se le añade agar bacteriológico antes de autoclavar).

En primer lugar, se sembraron las células en medio LB sólido y se cultivaron toda la noche a una temperatura de 37 °C. Al día siguiente las colonias individuales fueron sembradas en medio LB líquido (precultivo) y se cultivaron a 37 °C durante toda la noche con agitación constante a 200 rpm. Al día siguiente se añadieron 500 µl del precultivo en dos matraces Erlenmeyer que contenían 50 ml de LB líquido y se cultivaron a 37 °C hasta que la absorbancia medida a 600 nm alcanzó 0,5-0,6. A partir de este momento los pasos sucesivos tuvieron lugar a una temperatura de 4 °C. Las bacterias de *E. coli* fueron centrifugadas a 2200g durante 5 min y el precipitado resultante fue resuspendido muy suavemente con 15 ml de tampón de transformación (acetato de potasio 30 mM, MnCl₂·4H₂O 50 mM, RbCl₂ 100 mM, CaCl₂·2H₂O 10 mM y glicerol 15% p/v, pH 5,8). Una segunda centrifugación fue llevada a cabo en las mismas condiciones y, esta vez, se resuspendió suavemente el precipitado con 2 ml de tampón de transformación 2 (MOPS 10 mM, CaCl₂·2H₂O 75 mM, RbCl₂ 10 mM y glicerol 15% p/v, pH 7,0). Posteriormente, se prepararon alícuotas de 100 µl que fueron congeladas inmediatamente en N₂(l) y se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

3.2.8.3. Transformación de células quimiocompetentes de *Escherichia coli*.

Las células quimiocompetentes de *E. coli* se transformaron mediante el método de choque térmico. En primer lugar, se descongelaron las células competentes en hielo durante 5 min. Posteriormente, se les añadieron entre 1 y 20 µl de la reacción de ligación preparada previamente (ver apartado 3.2.8.1) y se incubaron en hielo durante 30 min. Seguidamente, se aplicó un choque térmico a 42 °C durante 1 min y se realizó una segunda incubación en hielo durante 15 min. Se añadieron 900 µl de medio LB y se cultivaron las bacterias a 37 °C durante 1 h 30 min. Transcurrido ese tiempo, se centrifugaron los cultivos a 6500 rpm durante 5 min, se eliminó parte de los sobrenadantes y se resuspendieron los pellets sembrándose en placas Petri

con medio LB sólido selectivo. Por último, se cultivaron a 37 °C durante toda la noche. Según el vector utilizado variaba el marcador selectivo añadido al medio LB. Los vectores pGEM®-T Easy y pYES-2.1 confieren resistencia a ampicilina y el vector pFGC5941 a kanamicina. La concentración final de antibiótico en el medio era de 50 µg/ml. Tras la transformación, las colonias de *E. coli* transformadas con el vector ligado al fragmento de DNA de interés fueron verificadas mediante PCR en colonia o mediante digestión enzimática (tal y como queda descrito en los apartados 3.2.5.3 y 3.2.9).

3.2.9. Extracción de DNA plasmídico y digestión con enzimas de restricción.

Para extraer el DNA plasmídico de colonias individuales crecidas en medio LB sólido se cultivaron en 5 ml de medio LB líquido con marcador selectivo (dependiendo del vector utilizado) a 37 °C, durante toda la noche y con agitación (200 rpm). Al día siguiente, entre 3-5 ml de cultivo fueron centrifugados a 14000 g para precipitar las células y extraer el DNA plasmídico. La extracción fue mediante el método de lisis alcalina y la purificación en columna, utilizando el kit comercial GenJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Thermo Scientific™), siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA plasmídico obtenido se cuantificó espectrofotométricamente (apartado 3.2.3). Se obtuvieron rendimientos de 100-700 ng/µl. Las muestras obtenidas fueron seguidamente utilizadas o almacenadas a -20 °C hasta su utilización.

Una vez extraído el DNA plasmídico, se realizó su digestión mediante el uso de enzimas de restricción (Fermentas, Thermo Scientific). Todas las digestiones se realizaron partiendo de 1 µg de DNA y utilizando un volumen de enzima equivalente a 5-20 U/µg de DNA, según las condiciones determinadas por el programa DoubleDigest Calculator, en la página web de la casa Thermo Scientific™. Generalmente las digestiones se realizaron a 37 °C durante 1 h 30 min. Las enzimas utilizadas se especifican en cada apartado determinado.

3.2.10. Secuenciación de ácidos nucleicos.

Con la finalidad de comprobar la identidad e integridad de los genes o fragmentos nucleicos de interés, fueron secuenciados en el Servicio de Secuenciación del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Para ello, se enviaron productos de PCR, productos

extraídos de geles de electroforesis (descrito en el apartado 3.2.7) o DNA plasmídico (productos clonados en el vector pGEM®-T Easy, apartado 3.2.8).

3.2.11. Conservación de las construcciones génicas.

Los clones positivos obtenidos en las clonaciones realizadas se almacenaron añadiendo 200 µl de glicerol 100% (p/v) a 800 µl de cultivo de *E. coli* transformado positivamente con el vector de interés. Esta mezcla se congeló rápidamente en N₂ (l) y se almacenó a -80 °C. De esta manera, podía recurrirse a ella si se precisara la construcción génica en otro momento, creciendo un cultivo líquido en medio LB y realizando una extracción de DNA plasmídico (ver apartado 3.2.9)

3.2.12. Generación de la construcción génica para la expresión funcional de *TaFAE1* en *Arabidopsis thaliana*.

En este apartado se describe la generación de la construcción por el método habitual de clonación mediante enzimas de restricción, con la que plantas de *Arabidopsis thaliana* serán transformadas. Para ello se utilizó, en primer lugar, el vector pGEM®-T Easy como vector de entrada y, como vector de destino, el vector pFGC5941-proOLE2. El vector pFGC5941-proOLE2 es un vector tradicional con una región MCS (del inglés, MultiCloning Sites) que presenta gran cantidad de dianas de restricción para poder ligar el inserto gracias a los extremos cohesivos generados tras la digestión.

3.2.12.1. Clonación del gen *TaFAE1* en el vector pGEM®-T Easy.

En primer lugar, se amplificó la región codificante del gen de la elongasa FAE1 de Pennycress, *TaFAE1* (código acceso GenBank: KF664164.1) por PCR utilizando una DNA polimerasa con actividad correctora de errores (Pfu) y los cebadores que se especifican en la tabla 3.3. Al cebador 5' se le añadió el sitio de restricción de la enzima NcoI y al cebador 3' el sitio de la enzima BamHI para permitir la ligación direccional. El tamaño de dicho fragmento obtenido por

PCR era de 1521 bp, correspondiente al tamaño del gen objeto de estudio. Posteriormente, se identificó por PCR con los cebadores propios del gen *TaFAE1* (tabla 3.3) y mediante digestión con la enzima HindIII, como ya se ha comentado anteriormente en el apartado 3.2.13.2. La identidad e integridad del gen se verificó por secuenciación (apartado 3.2.10) y el fragmento amplificado por PCR fue clonado en el vector pGEM®-T Easy como se detalla en el apartado 3.2.8.

3.2.12.2. Clonación del gen *TaFAE1* en el vector de expresión pFGC5941-proOLE2 mediante enzimas de restricción.

El vector de expresión en *Arabidopsis* elegido fue el vector pFGC5941-OLE2 (Figura 3.10), cedido por el Dr. Fabian Vastij (CNAP-University of York, UK). Se trata de un vector binario pFGC5941 en el cual el promotor constitutivo 35S ha sido sustituido por el promotor OLE2, tejido-específico de la expresión en semillas, de aproximadamente 1,8 kb, en los sitios EcoRI/NcoI.

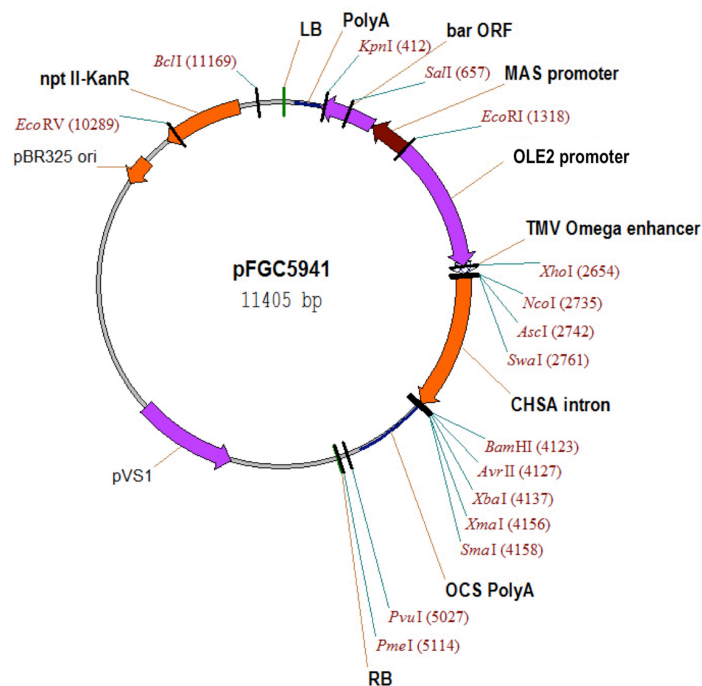


Figura 3.10 Organización de las regiones del vector pFGC5941-proOLE2.

Los genes clonados en el vector pGEM®-T Easy se digirieron con las enzimas de restricción

NcoI y BamHI y se ligaron, con la enzima T4 ligasa, al vector de destino pFGC5941-proOLE2, previamente digerido con las mismas enzimas. Con este plásmido se transformaron células competentes de *E. coli*, proceso que se describe en el apartado 3.3.2. Una vez comprobadas las secuencias mediante secuenciación se transformaron células de *Agrobacterium tumefaciens* como se describe en el apartado siguiente.

3.3. Obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*.

3.3.1. Cultivos bacterianos de *Agrobacterium tumefaciens*.

Una vez obtenida la construcción génica pFGC5941-proOLE2-TaFAE1, tal y como se explica en el apartado 3.2.12, se procedió a la transformación de células de *Agrobacterium tumefaciens* con el objetivo de transformar posteriormente plantas de *Arabidopsis thaliana*. En este apartado se detallan la preparación de *A. tumefaciens* electrocompetentes y su transformación.

Se utilizó la cepa de *A. tumefaciens* GV3101 que 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 de los constructos génicos e interés a la planta.

3.3.1.1. Preparación de *Agrobacterium tumefaciens* electrocompetentes.

En primer lugar, se cultivó *A. tumefaciens* en medio LB/gentamicina (25 µg/ml) sólido a 28 °C durante 48 h. Posteriormente, se inocularon algunas colonias en 10 ml de medio LB/gentamicina líquido y se incubaron con agitación (200 rpm) a 28 °C durante 24 h. A partir de 5 ml de este precultivo se inocularon 100 ml de medio LB y se cultivaron a 28 °C durante 4-5 h, hasta que la A_{600} fue de 0,5. En ese momento, se centrifugaron las células en dos tubos Falcon a 3000 g a 4 °C durante 15 min y se resuspendieron en 25 ml de HEPES pH 7,5, 1 mM. Se realizó una segunda centrifugación en las mismas condiciones y una resuspensión en 25 ml de HEPES pH 7,5, 1 mM y glicerol 10% v/v. Tras centrifugar una tercera vez, las células fueron resuspendidas en 400 µl de la segunda solución y congeladas en alícuotas de 50 µl a una

temperatura de -80 °C.

3.3.1.2. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación.

En primer lugar, se descongelaron las células competentes de *A. tumefaciens* y, seguidamente, se les añadió 1 µl de una dilución 1/10 del DNA plasmídico de la construcción deseada o del vector vacío (control). Se mezclaron vigorosamente con la punta de la pipeta y se transfirieron al fondo de una cubeta de electroporación previamente esterilizada con etanol 70%. La cubeta se introdujo en el electroporador habiendo fijado los siguientes parámetros previamente: capacitancia a 25 µF, voltaje a 1,8 kV y resistencia eléctrica a 400 Ω durante 5-10 ms. Inmediatamente después se añadió 1 ml de medio LB frío a la cubeta, las células transformadas fueron transferidas a otro tubo y se incubaron a 28 °C durante 1 h con agitación (200 rpm). Pasado este tiempo se sembraron 100-200 µl del cultivo anterior en placa de Petri con medio LB/gentamicina (25 µg/ml)/kanamicina (50 µg/ml) y se cultivaron a 30 °C durante 48 h. La gentamicina es la resistencia que confiere el vector de ayuda pMP90 y la kanamicina la del vector pFGC5941-proOLE2 que contiene el gen de interés *TaFAE1*.

3.3.2. Transformación estable de *Arabidopsis thaliana*.

En este trabajo se transformaron plantas de *A. thaliana* Col-0 y plantas mutantes *fae1-1* con *A. tumefaciens* transformados con la construcción pFGC5941-proOLE2-*TaFAE1* o con el vector vacío siguiendo el protocolo simplificado de inmersión floral o “Floral dip” (Clough y Bent, 1998) con alguna modificación (Figura 3.11). Se cultivaron plantas de *A. thaliana* tal como se describe en el apartado 3.1.3. Cuando empezaron a desarrollarse las primeras inflorescencias (5 semanas de crecimiento), se inició el procedimiento. La transformación es un proceso que dura 5 días a partir de este momento. En el día 1 del procedimiento se sembraron las células de *A. tumefaciens* que contenían las construcciones de interés en placas LB/gentamicina (25 µg/ml)/kanamicina (50 µg/ml) y se cultivaron durante 48 h a 28 °C. El día 3 se inocularon 5 ml de medio líquido LB/gentamicina/kanamicina con colonias individuales de la placa anterior y se cultivaron a 28 °C toda la noche. El cuarto día se inocularon 500 ml de LB/gentamicina/kanamicina con 2,5 ml del precultivo anterior y se cultivaron de nuevo a 28 °C toda la noche. El día 5 se midió la A600 de los cultivos, y cuando se alcanzaron valores 1 – 1,2 se centrifugaron a 4300 g durante 10 min y, seguidamente, las células se resuspendieron

cuidadosamente con un pincel en 500 ml de tampón de transformación (sacarosa 5% y Silwett L-77 0,05%, Lehle Seeds). La solución con las bacterias se mezclaba constante y suavemente con una vara agitadora a la vez que se sumergían las inflorescencias de las plantas a transformar durante 20-30 s (Figura 3.11 A). Tras la inmersión, se colocaron unas guías de madera alrededor de la maceta, y las plantas se envolvieron con plástico durante 48 h con el fin de conservar la humedad y de favorecer la entrada de las bacterias al interior de las inflorescencias (Figura 3.11 B). Finalmente, las plantas transformadas se cultivaron con normalidad hasta la recolección de las semillas, como se ha descrito en el apartado 3.1.4.

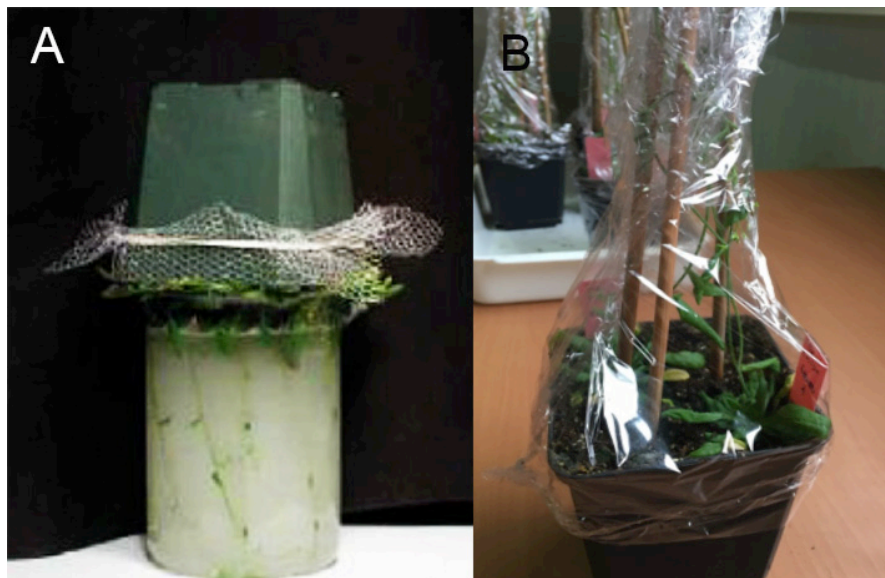


Figura 3.11 Proceso de inmersión floral en plantas de *Arabidopsis thaliana* de 5 semanas. Imagen obtenida de Zhang et al., 2006 (A). Plantas envueltas en plástico tras la inmersión durante una de las transformaciones de esta Tesis Doctoral (B).

3.3.3. Selección y segregación de plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas.

Las plantas de *Arabidopsis* fueron transformadas con el vector pFGC5941-proOLE2 que confiere resistencia al herbicida de glufosinato de amonio Basta® (Fluka). Se sembraron aproximadamente 1000 semillas T1 (0,1 g) en placa con medio MS y Basta® 25 mg/l (medio selectivo), de las cuales sólo crecieron entre el 0,5 – 1%, las semillas que habían incorporado la construcción génica. Cada una de las plántulas resistentes al herbicida se consideró como un evento de transformación independiente y se transfirieron a maceta, creciendo hasta la

recolección de las semillas T2. Posteriormente, se cultivaron 100 semillas T2 (0,01 g) de cada evento de transformación en medio selectivo 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 en este caso. De nuevo, se sembraron 100 semillas T3 (0,01 g) de cada línea seleccionada, y se buscaron líneas en las que se obtuviese un porcentaje de germinación cercano al 100%. Estas líneas se consideraron homocigotas para el transgen y fueron empleadas posteriormente para los siguientes experimentos. La presencia del transgen también se comprobó por PCR tal y como se detalla en el apartado 3.2.5.2. El proceso de selección y segregación queda esquematizado en la figura 3.12. Además, como controles se cultivaron las semillas de las plantas transgénicas en medio MS no selectivo, de modo que todas debían germinar, y semillas de la línea Col-0 en medio selectivo, en cuyo caso ninguna debía germinar.

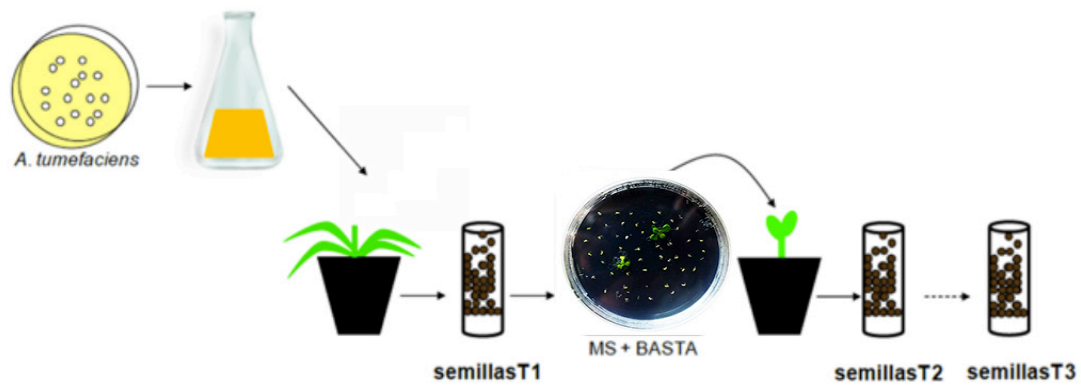


Figura 3.12 Esquema del proceso de transformación estable en *A. thaliana*. Imagen adaptada de la Dra. Diana Sancho.

3.4. ANALÍISIS LIPÍDICO.

3.4.1. Extracción de lípidos totales.

Los lípidos totales fueron extraídos de semillas de Pennycress en cuatro fases de maduración sucesivas (verde, verde-amarillo, amarillo-verde y seco) tal y como está descrito por Bligh y Dyer (1959). En primer lugar, se homogeneizaron 0,5 g de material vegetal fresco en mortero de cerámica con N₂ líquido y seguidamente se realizó la extracción o se congeló el material a una temperatura de -80 °C hasta su uso. A cada muestra se le añadieron 2 ml de cloroformo:metanol 1:2 (v/v), y se agitó vigorosamente. Este proceso se repitió hasta tres veces. Posteriormente, se añadieron 3 ml de KCl 0,7% (p/v), se agitó y centrifugó a 150 g, durante 5 min. La fase inferior lipídica se recogió con ayuda de una pipeta Pasteur. A partir de la fase superior acuosa se realizó una segunda extracción del mismo modo con 3 ml de cloroformo y se volvió a recoger la fase inferior lipídica con una pipeta Pasteur mezclándola con la obtenida anteriormente. Los lípidos se evaporaron a sequedad, bajo una corriente de N₂ (g) y se disolvieron en 1 ml de cloroformo. Se tomaron dos alícuotas de 150 µl (duplicados analíticos) para el análisis de ácidos grasos totales (apartado 3.4.1). El resto (700 µl) se evaporó a sequedad y se almacenó a -20 °C para usos posteriores (cromatografía en capa fina TLC, apartado 3.4.4).

3.4.2. Determinación de la cantidad de aceite por peso seco de semilla de Pennycress.

Para determinar el contenido de aceite por peso seco de semillas se utilizó el método gravimétrico de Li et al. (2006). En primer lugar se procedió a realizar el secado de 1 g de semillas de cada variedad europea, haciendo dos duplicados por cada una. Dicho tratamiento consistió en colocar las semillas en una estufa a 80 °C e ir realizando pesajes sucesivos cada hora, hasta 4 en total, eliminando así el agua existente del interior de las semillas y obteniendo el peso seco de estas. Posteriormente, a partir de las semillas secas, se realizó la extracción de los lípidos totales, tal y como queda explicado en el apartado 3.4.1. Una vez en disposición de los lípidos totales evaporados en sequedad con N₂ (g), se diluyeron en 500 µl de cloroformo y se separaron en cantidades de 100 µl que fueron sometidas a una temperatura de 80 °C. Posteriormente y durante cada hora, se fueron realizando medidas gravimétricas en una báscula

de precisión, hasta 5 medidas diferentes por cada muestra. Por último se calcularon los mg finales de aceite por cada g seco de semilla.

3.4.3. Obtención de ésteres metílicos de ácidos grasos totales.

Para analizar la composición de los ácidos grasos totales, fueron transformados en sus correspondientes ésteres metílicos mediante una reacción de transesterificación. Para ello, se utilizó el método de transesterificación ácido catalizada descrito anteriormente por Garcés y Mancha (1993). Mediante esta reacción se consigue la metilación tanto de los ácidos grasos libres (FFA, del inglés Free Fatty Acids) como de los ácidos grasos que forman parte de los glicerolípidos. Las alícuotas de lípidos totales se evaporaron a sequedad bajo una corriente de N_2 (g) y se añadieron 3 ml de mezcla de metilar (metanol:tolueno: H_2SO_4 , 88:10:2 v/v/v). En algunos casos se añadieron 40 μ l de ácido heptadecanoico (17:0), 0,1 μ g/ μ l en metanol:tolueno (1:1 v/v) como patrón interno (apartado 3.4.6). Las muestras fueron incubadas en tubos de vidrio herméticamente cerrados, a 80 °C durante 1 h y posteriormente se dejaron enfriar. Para la extracción de los ésteres metílicos formados se añadieron 5 ml de Na_2SO_4 6,7 % (p/v) y 1 ml de heptano. Tras agitar vigorosamente, las muestras fueron centrifugadas a 1500 g durante 2 min y se recogió la fase superior (de 1 ml aproximadamente). Este paso se repitió 2 ó 3 veces y se mezclaron las fases superiores en otro tubo para evaporar a sequedad bajo corriente de N_2 (g). Esta fracción, conteniendo los ésteres metílicos de los ácidos grasos, se disolvió en 50-100 μ l de heptano y se introdujo en viales con inserto de vidrio para ser analizado por cromatografía de gases (apartado 3.4.5).

3.4.4. Separación de lípidos mediante cromatografía en capa fina.

El análisis de glicerolípidos incluye la separación de los dos tipos, los glicerolípidos polares y los neutros, y para ello se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina (TLC). Una vez separadas las clases individuales lipídicas pueden ser cuantificadas y analizar su composición en ácidos grasos por conversión directa en ésteres metílicos. Por tanto, la cromatografía en capa fina (TLC) es una técnica que permite la separación de mezclas complejas de lípidos en sus diferentes componentes en base a la distinta adsorción de los mismos en un soporte sólido (fase estacionaria) y a la diferente solubilidad en la fase líquida móvil. Se utilizó esta metodología para analizar la composición de ácidos grasos de las fracciones de triacilglicerol (TAG),

diacilglicerol (DAG) y lípidos polares (PL) del aceite de las semillas. El desarrollo de la cromatografía se llevó a cabo en cubetas de vidrio cerradas, donde el disolvente ascendía por capilaridad por la placa de TLC, separando así las diferentes fracciones lipídicas en función de su polaridad.

En primer lugar, se activaron las placas TLC, placas de cristal cubiertas por gel de sílice (20x20, G60 Merck), por calor a 110°C para eliminar la humedad, durante por lo menos una hora antes del análisis. Se tomaron las alícuotas de residuo seco de la extracción de lípidos totales de las semillas (ver apartado 3.4.1), se resuspendieron en 200 µl de heptano y se tomaron 100 µl para cada duplicado analítico, cargándose en la placa TLC. Las fracciones lipídicas se separaron al desarrollar la placa con una mezcla de hexano:dietileter:ácido acético (70:30:1, v/v/v) siguiendo el método descrito por Li-Beisson et al. (2013) y las muestras migraron hasta que el frente alcanzó el borde superior de la placa (transcurridas aproximadamente 2,5 h). La detección de las fracciones, es decir, el revelado de la placa, se llevó a cabo con una corta exposición a vapor de yodo de 1 hora debido a que el yodo se une a los dobles enlaces de los ácidos grasos que componen los lípidos. Una vez revelada, se identificaron las bandas de las distintas fracciones (TAG, DAG y PL, Figura 3.13) por comparación con imágenes de referencia en las que se mostraba la movilidad relativa (Rf) de patrones comerciales.

Una vez identificadas, las bandas de las diferentes fracciones se marcaron con lápiz y se separó la sílice que contenía los lípidos de la placa con ayuda de un bisturí o espátula y se recogió cada clase lipídica en un tubo de vidrio para la posterior metilación-extracción con una solución de metanol:cloroformo:agua (100:50:40, v/v/v). La fase orgánica resultante de dicha extracción fue depositada en un nuevo tubo y sometida a una separación adicional con una mezcla de cloroformo:agua (50:50, v/v). La fase orgánica de esta segunda extracción fue depositada en un nuevo tubo y evaporada a sequedad bajo corriente de N₂(g). Se utilizó como patrón estándar interno 17:0 para propósitos cuantitativos (apartado 3.4.6). Los ésteres metílicos obtenidos de las distintas fracciones lipídicas (ver apartado 3.4.3) fueron analizados.

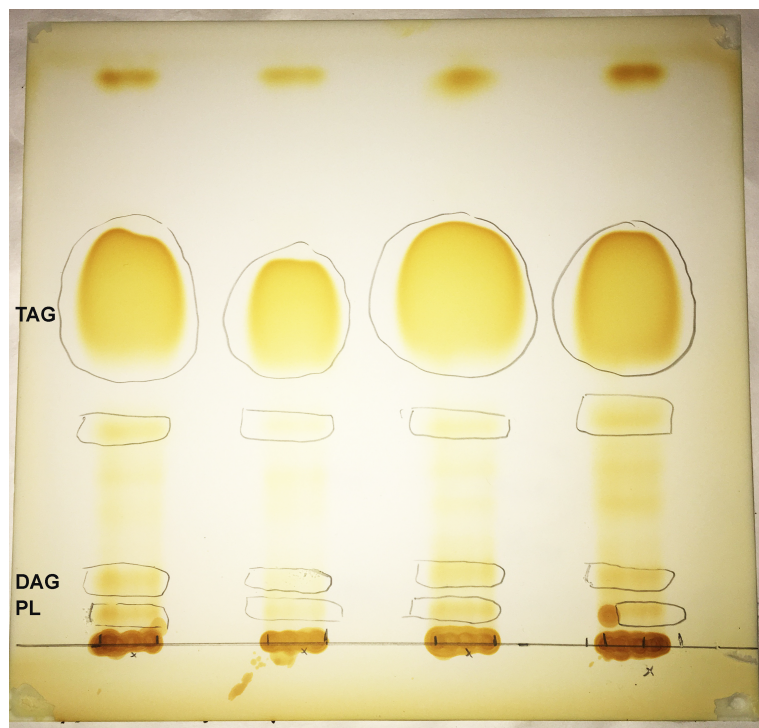


Figura 3.13 Cromatografía en capa fina. Tinción con vapores de I₂. En la imagen se muestran cuatro muestras de semillas de *Arabidopsis thaliana* en las que se identifican 3 clases de lípidos (TAG, DAG y PL).

3.4.5. Análisis de la composición de ácidos grasos mediante cromatografía gas-líquido.

Como ya se ha explicado en el apartado 3.4.3, los ésteres metílicos de ácidos grasos de los lípidos totales o de las diferentes clases de lípidos fueron obtenidos por transmetilación ácido catalizada y, posteriormente, fueron analizados por cromatografía de gases (GC).

En esta técnica los compuestos que se quieren separar deben ser volatilizados y transportados por una corriente de gas inerte (fase móvil) a través de una columna que contiene la fase estacionaria líquida unida a un soporte sólido (Christie, 1982). El residuo seco de los ésteres metílicos de ácidos grasos totales, o de cada clase de lípido, se disolvió en 50-100 μ l de heptano y se introdujo en viales con inserto de vidrio. Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases modelo 7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA USA) equipado con una columna capilar (60m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno, 0,5 μ m de espesor de película) de sílice

fundida (Supelco, Bellafonte, PA USA) y con un detector de ionización de llama (FID). El gas portador utilizado fue el helio, con un flujo lineal de $1,2 \text{ ml min}^{-1}$ y una relación de Split de 1/100. La temperatura del inyector fue $250 \text{ }^\circ\text{C}$ y la temperatura del detector fue $260 \text{ }^\circ\text{C}$. La temperatura del horno fue modificada de tal manera: $170 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min, la temperatura subió a $5 \text{ }^\circ\text{C/min}$ hasta $200 \text{ }^\circ\text{C}$. Para la identificación de los picos del cromatograma, se utilizaron patrones que contenían diferentes ácidos grasos conocidos, previamente transesterificados, como el aceite de girasol, el aceite de lino alto oleico o un extracto de espinaca y se compararon los tiempos de retención de los picos de las muestras con los identificados anteriormente con los patrones.

3.4.6. Determinación del contenido graso usando un patrón interno.

Para poder determinar el contenido graso de una muestra o la cantidad neta de un determinado ácido graso, en algunos experimentos se utilizó el ácido heptadecanoico (17:0) como patrón interno, ya que se trata de un ácido graso que no se encuentra presente en las grasas de forma natural. Se añadió un volumen adecuado de 17:0 $0,1 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l}$ en metanol:tolueno (1:1, v/v) a la muestra (aproximadamente un 20% del total de ácidos grasos) antes de ser procesada. Tras la extracción y la metilación de los lípidos, se analizó la composición de ácidos grasos mediante cromatografía de gases (ver apartado 3.4.5). El 17:0 presentó un tiempo de retención comprendido entre el 16:1 y el 16:2. A partir de la cantidad de muestra añadida inicialmente y del porcentaje de 17:0 obtenido se puede determinar la cantidad neta de cada uno de los ácidos grasos presentes y el contenido de lípidos totales de la muestra.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos del análisis de ácidos grasos fueron obtenidos de tres experimentos biológicos en el caso de plantas crecidas en cámara de cultivo y dos experimentos biológicos independientes para plantas procedentes de los ensayos de campo. 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.

RESULTADOS

4.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FENOLÓGICA DE VARIEDADES DE ORIGEN EUROPEO DE PENNYCRESS.

4.1.1. Obtención y propagación de las semillas de Pennycress.

Como ya se ha mencionado anteriormente en el apartado 3.1 de Materiales y Métodos, en este trabajo se han utilizado dos variedades de origen europeo de germoplasma de Pennycress. Por un lado, las semillas de la variedad NASC fueron obtenidas del banco de semillas Nottingham Arabidopsis Stock Centre, UK (NASC) y las semillas de la variedad FRENCH fueron obtenidas de la empresa B&T World Seeds company (France). Ambas variedades se utilizaron durante todo el trabajo.

Las semillas obtenidas de las dos variedades citadas anteriormente fueron germinadas, en primer lugar, en placas de Petri con papel Whatman humedecido con agua destilada sin ningún otro suplemento adicional. Una vez germinadas, las semillas fueron transferidas a macetas con sustrato para su propagación en cámara de cultivo bajo condiciones de crecimiento controladas.

4.1.2. Estudio de la germinación de las semillas: análisis de la existencia de dormancia.

Como primer paso para la caracterización fenológica de Pennycress se estudió la capacidad de germinación de las semillas. Para ello, se cultivaron semillas de ambas variedades, tanto de la variedad NASC como FRENCH, en placas Petri sobre papel Whatman humedecido, en ausencia de hormonas que pudieran mejorar o alterar el rendimiento de la germinación.

Los ratios de germinación fueron obtenidos a partir de semillas que habían sido almacenadas alrededor de 10-12 meses desde que tuvo lugar su cosecha y resultaron cercanos al 100% (Figura 4.1). No obstante, al cultivar semillas recientemente cosechadas, el ratio de germinación resultó ser menor del 10%. Este fenómeno, que tiene lugar en las semillas, se denomina dormancia y consiste en un periodo del ciclo biológico en el que el crecimiento y el desarrollo se suspenden temporalmente y, que por tanto, impide la germinación. Por otro lado, un estudio ha revelado que las semillas de variedades invernales, presentan un bajo rendimiento de

germinación relativa, incluso al ser tratadas con la fitohormona natural ácido giberélico (GA) (Sedbrook et al., 2014). Este problema fue solventado almacenando las semillas a temperatura ambiente durante 10-12 meses tras su cosecha y, entonces, se obtuvo un rendimiento de germinación del 100% sin necesidad de utilizar ninguna fitohormona de crecimiento. Estos resultados indican que la dormancia es muy alta en las variedades europeas NASC y FRENCH.

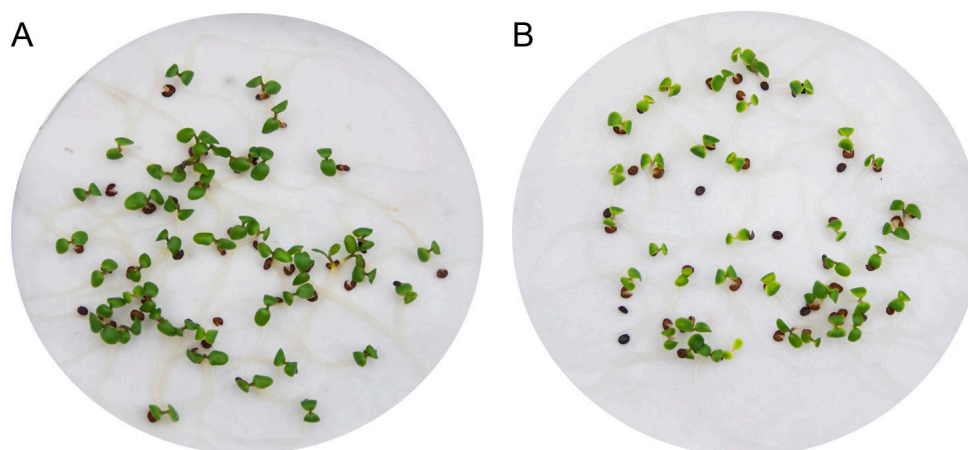


Figura 4.1 Ensayo de germinación de semillas de Pennycress de las variedades NASC (A) y FRENCH (B), respectivamente. Las semillas fueron germinadas sobre papel Whatman húmedo con ausencia de aditivos químicos.

4.1.3. Tamaño y morfología de las plantas.

Otros parámetros estudiados fueron el tamaño y altura de ambas variedades europeas de Pennycress, así como el desarrollo y la morfología de la planta. Para ello, se cultivaron plantas de ambas variedades bajo condiciones controladas en la cámara de cultivo. Las plantas crecieron rápidamente durante 5-6 semanas, produciendo flores y, por lo tanto, generando silicuas con semillas. En el momento de la floración, se observaron grandes diferencias entre ambas variedades europeas (Figura 4.2 y 4.3). Así, la variedad NASC produjo flores en todos los casos, desarrollando siempre silicuas con semillas. Por el contrario, en el caso de la variedad francesa, un tercio de las plantas cultivadas no produjo flores, ni por tanto semillas, manteniéndose en un estado de roseta (Figura 4.2, izquierda). Este comportamiento sugirió la existencia de la necesidad de vernalización en la variedad FRENCH, es decir, la necesidad de frío para desarrollar flores y ser productiva. Por tanto, para que todas las plantas FRENCH florecieran y generaran semillas, fueron sometidas a un tratamiento de vernalización en las

primeras fases de la germinación hasta la aparición de, por lo menos, 4 hojas. Para ello, como ya se ha comentado en el apartado 3.1.2.1 de Materiales y Métodos, las macetas se colocaron en una cámara de cultivo a una temperatura de 6 grados durante 5 semanas. De esta manera, todas las plantas de la variedad francesa se desarrollaron con normalidad, produciendo flores y posteriormente semillas. Estos resultados sugieren que, al ser necesaria la vernalización para el completo desarrollo de la variedad FRENCH, se trata de una *variedad invernada o invernada facultativa*.

En el caso de las plantas Pennycress de variedad NASC, no fue necesario realizar un tratamiento de vernalización para que tuviera lugar la floración ni para la producción de semillas, lo cual sugiere que se trata de una *variedad primaveral*. Esta característica es relevante desde el punto de vista agronómico ya que las semillas de esta variedad pueden ser utilizadas en un cultivo de ciclo corto, sembrándose en invierno (enero/febrero) y cosechándose al final de la primavera (mayo), mientras que las plantas de variedad francesa requieren un cultivo invernada en ciclo largo, sembrándose al final del verano (septiembre) y cosechándose al fin de la primavera/inicio del verano siguiente (mayo/junio).



Figura 4.2 Comparación de plantas Pennycress de ambas variedades cultivadas simultáneamente. En primer lugar aparecen las plantas FRENCH que no han completado su desarrollo, en forma de gran roseta. En segundo lugar, las plantas FRENCH que se han desarrollado por completo dando lugar a flores y semillas. Y por último, se muestran las plantas de variedad NASC, de mayor altura que las anteriores y con mayor floración.

Como se observa en la figura 4.2, la altura difiere mucho entre ambas variedades, siendo mayor en las plantas NASC (Figura 4.2, derecha) que en FRENCH (Figura 4.2, centro).

Otra de las diferencias importantes entre las dos variedades es el momento de la floración, más tardío en la variedad FRENCH (Figura 4.3). Es importante mencionar que esta diferencia se observó tanto bajo condiciones controladas en la cámara de cultivo como bajo condiciones de campo, lo que sugirió la existencia de un mecanismo de control genético del proceso.



Figura 4.3 Flor de plantas de Pennycress de la variedad NASC (A) y FRENCH (B), respectivamente, cultivadas simultáneamente durante 35 días. Como puede observarse, la floración en NASC es más temprana.

4.1.4. Peso, número y color de las semillas.

Una vez fueron cosechadas las semillas de ambas variedades se compararon características como el color, el tamaño, la producción y el contenido en aceite.

Como se observa en la tabla 4.1, el peso de las semillas de la variedad NASC fue un 22% mayor que la variedad FRENCH (1,23 mg frente a 1,01 mg, respectivamente), una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Es importante señalar que ambos valores están dentro del rango de los datos previamente publicados para variedades estadounidenses, un rango comprendido entre 0,4 - 1,3 mg (Sedbrook et al., 2014), e incluso, los valores obtenidos en las variedades europeas están más cercanos al máximo valor de dicho rango.

	Peso semilla (g) ^a	Silicuas/planta ^b	Semillas/silicua ^b	Semillas/planta ^c
NASC	0,123 ± 0,003 ^d	349 ± 23,06 ^d	9,32 ± 1,88	3253
FRENCH	0,101 ± 0,004 ^d	490 ± 27,96 ^d	9,21 ± 1,64	4513

Tabla 4.1 Diferencias morfológicas con respecto a las semillas en ambas variedades de Pennycress.

^a Datos obtenidos del peso de 100 semillas y a partir de 10 determinaciones independientes.

^b Datos obtenidos de 10 plantas diferentes.

^c Datos calculados a partir del resultado de semillas/silicua y silicuas/planta.

^d Diferencias estadísticamente significativas a $p < 0,05$.

En cuanto al número de semillas encontradas por vaina, ambas variedades presentaron un promedio similar de semillas en el interior de cada silicua, 9,32 y 9,21 para NASC y FRENCH, respectivamente. No obstante, al realizar el recuento de silicuas presentes en cada planta resultó mayor el promedio en la variedad FRENCH, 490 silicuas frente a 349 encontradas en la variedad NASC, diferencia también estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Al ser mayor el número de silicuas en la variedad FRENCH causa que el promedio de semillas totales por planta sea también mayor para las plantas FRENCH, con un promedio de 4513 semillas totales respecto a las plantas NASC con 3253. Sin embargo, el menor peso de las semillas FRENCH es compensado con el mayor número de semillas por planta. Es necesario mencionar que no se detectaron problemas de dispersión de semilla por ruptura de la silicua durante la manipulación de las plantas, lo que indica que Pennycress no presenta problemas de deshiscencia.

Además del peso y número de semillas por vaina, se detectaron otras diferencias fenotípicas a nivel de la semilla. En cuanto al color de las semillas, se observó que las semillas FRENCH son de un color marrón rojizo, mientras que las semillas NASC son de un color marrón oscuro (Figura 4.4).

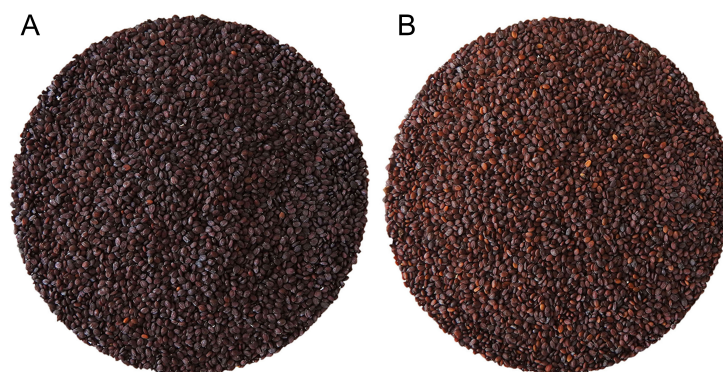


Figura 4.4 Comparación del color de semillas de las variedades NASC (A) y FRENCH (B).

4.1.5. Contenido total de aceite y de ácido erúcico en las semillas de Pennycress.

Se analizó también el contenido de aceite en las semillas y, tal y como se muestra en la tabla 4.2, el contenido total de aceite en las semillas era 39,08% para las plantas NASC y 41,18% para FRENCH. Estos datos no presentaron diferencias estadísticamente significativas, lo cual sugiere que las diferencias entre el peso y la producción de semillas se compensan para dar una producción de aceite similar en ambas variedades. Estos resultados son similares a los obtenidos en variedades estadounidenses acumuladoras de aceite (Sedbrook et al., 2014), indicando que las variedades europeas NASC y FRENCH también acumulan gran cantidad de aceite. También se comparó la composición de ácidos grasos del aceite de las semillas de ambas variedades cultivadas en la cámara de cultivo. El ácido erúcico (22:1^{Δ13}) fue el ácido graso mayoritario en el aceite de las semillas de ambas variedades, con un porcentaje promedio de 35,12% para las semillas NASC y 36,34% para las FRENCH. Este alto porcentaje de ácido erúcico también está dentro del rango previamente publicado para las variedades estadounidenses (Sedbrook et al., 2014). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en este parámetro entre ambas variedades.

	% aceite ^a	% 22:1 ^{Δ13} ^b
NASC	39,08 ± 5,08	35,12 ± 2,08
FRENCH	41,18 ± 7,61	36,34 ± 5,03

Tabla 4.2 Diferencias en la cantidad y composición de aceite de las semillas de ambas variedades de Pennycress. ^aCalculado como cantidad total de aceite por peso seco de semilla. ^bDatos obtenidos a partir de 3 réplicas biológicas.

4.2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS PROCESOS IMPLICADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE ÁCIDO ERÚCICO EN PENNYCRESS.

4.2.1. Composición de ácidos grasos del aceite de Pennycress en diferentes condiciones de cultivo.

Se compararon las características del aceite extraído de plantas Pennycress cultivadas tanto en cámara de cultivo como en condiciones de campo. Una vez completada la fase de crecimiento, es decir, los meses comprendidos entre septiembre y mayo, se cosecharon las semillas y se analizó la composición de ácidos grasos. Tal y como se muestra en la tabla 4.3, la composición lipídica de las semillas NASC cultivadas en condiciones de campo fue muy similar a la obtenida en condiciones de controladas en la cámara de cultivo. El ácido erúcico fue el ácido graso mayoritario en todos los casos. El porcentaje de éste en las plantas de Pennycress cultivadas en condiciones de campo fue de 37,23% y 39,68% para NASC y FRENCH, respectivamente (tabla 4.3). A pesar de que estos valores parezcan algo mayores a aquellos obtenidos bajo condiciones controladas (35,12 y 36,34 % para NASC y FRENCH, respectivamente), no se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas condiciones de cultivo. Este análisis sugiere que las plantas crecidas en cámara de cultivo pueden ser utilizadas como buen modelo de las plantas crecidas en condiciones de campo, o lo que puede ser de gran utilidad para extrapolar los resultados obtenidos a partir de plantas cultivadas ambos tipos de condiciones.

Ácido graso	NASC cámara	NASC campo	FRENCH cámara	FRENCH campo
16:0	4,26 ± 0,76	3,61 ± 0,05	4,09 ± 0,13	3,23 ± 0,07
16:1	0,37 ± 0,05	0,34 ± 0,001	0,4 ± 0,04	0,33 ± 0,007
18:0	0,68 ± 0,023	0,52 ± 0,001	0,61 ± 0,12	0,48 ± 0,001
18:1	13,14 ± 1,94	11,64 ± 0,07	13,16 ± 3,01	11,39 ± 0,05
18:2	20,26 ± 0,51	19,54 ± 0,25	20,71 ± 1,34	19,54 ± 0,01
18:3	13,02 ± 1,47	11,17 ± 0,26	13,14 ± 0,76	11,69 ± 0,04
20:0	0,22 ± 0,09	0,24 ± 0,007	0,18 ± 0,01	0,23 ± 0,001
20:1	10,26 ± 1,08	11,09 ± 0,007	8,94 ± 0,6	9,83 ± 0,07
22:0	0,42 ± 0,16	0,13 ± 0,007	0,42 ± 0,19	0,15 ± 0,007
22:1	35,12 ± 2,08	37,23 ± 0,55	36,34 ± 5,02	39,68 ± 0,08
24:0	0,15 ± 0,03	0,09 ± 0,001	0,11 ± 0,04	0,07 ± 0,007
24:1	3,87 ± 0,69	4,18 ± 0,07	3,36 ± 0,03	3,17 ± 0,03

Tabla 4.3 Datos (porcentaje del total de ácidos grasos) obtenidos de 4 determinaciones biológicas diferentes para los experimentos de cámara de cultivo y 2 para los experimentos de campo.

4.2.2. Contenido de aceite en las semillas de Pennycress durante su maduración.

Otro aspecto muy interesante a determinar con respecto a las características lipídicas de las dos variedades de Pennycress es la cantidad de aceite presente en sus semillas durante el proceso madurativo de las mismas. Para determinar estos datos se monitorizó la cantidad de lípidos totales durante la maduración de las semillas de ambas variedades en condiciones controladas en cámara de cultivo. En primer lugar se recolectaron las semillas del interior de silicuas en 4 estadios de desarrollo diferentes. A estos estadios se les asignó el nombre correspondiente al color de la cubierta de la silicua: verde/green (G), verde-amarillo/green-yellow (GY), amarillo-verde/yellow-green (YG) y silicuas secas/dry (D). Como se muestra en la figura 4.5, ambas variedades muestran un incremento prácticamente lineal de los lípidos totales por peso fresco de semilla conforme la semilla va madurando.

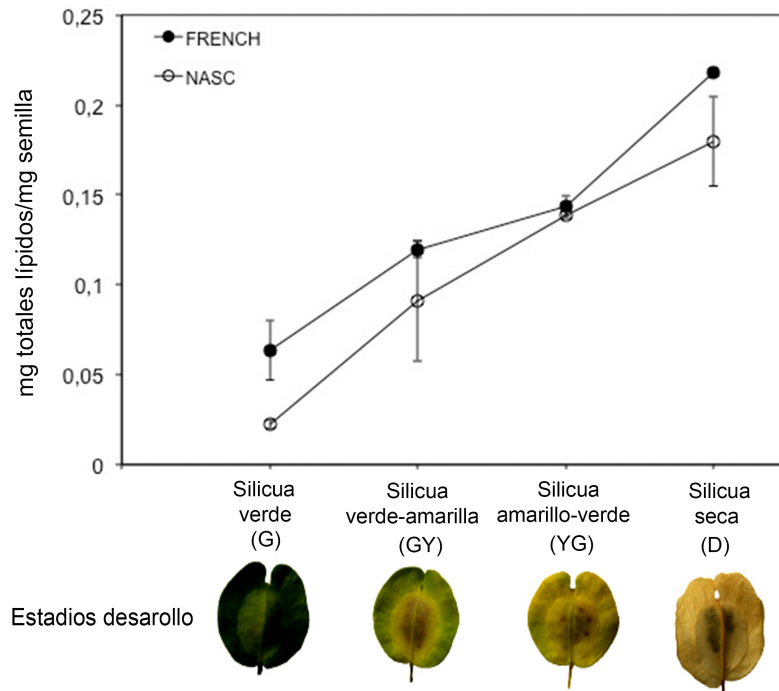


Figura 4.5 Cantidad de lípidos totales (mg) por peso fresco de semilla (mg) durante la maduración de la semilla de ambas variedades de Pennycress. Datos obtenidos de dos experimentos biológicos independientes.

4.2.3. Contenido de ácido erúico en las semillas de Pennycress durante su maduración.

Seguidamente, y dado que el ácido graso erúico es el mayoritario en las semillas de ambas variedades de Pennycress en las dos condiciones de cultivo estudiadas, se procedió a caracterizar la biosíntesis de dicho ácido graso en las 4 etapas de desarrollo de las semillas ya descritas. Para ello, se monitorizó la composición lipídica del aceite de las semillas durante la maduración de estas, en ambas variedades y bajo condiciones controladas de crecimiento. Como se observa en la figura 4.6, ya en las primeras fases de la maduración (verde, G), las semillas de Pennycress se caracterizan por presentar altos niveles de erúico, siendo este el ácido graso mayoritario presente en el análisis, con un contenido medio de 28-29% en ambas variedades. Con la maduración de la semilla, los niveles de ácido erúico incrementan de 28-29% a 32-35% en semillas de silicuas en estadios GY y YG. En las semillas de la variedad FRENCH, el pico de máximo contenido en ácido erúico es en el estadio de maduración YG con un 37%, mientras que en la variedad NASC, los niveles de 22:1 son muy similares tanto en la fase GY y YG, llegando a un máximo de 36% una vez la semilla ya está seca (D). Sin embargo, al compararse

los la composición de ácidos grasos de los aceites de ambas variedades no se vieron diferencias estadísticamente significativas en los valores relativos de contenido de erúxico. El contenido medio de 22:1 a lo largo de todo el desarrollo de las semillas es de un 33% para ambas variedades de Pennycress.

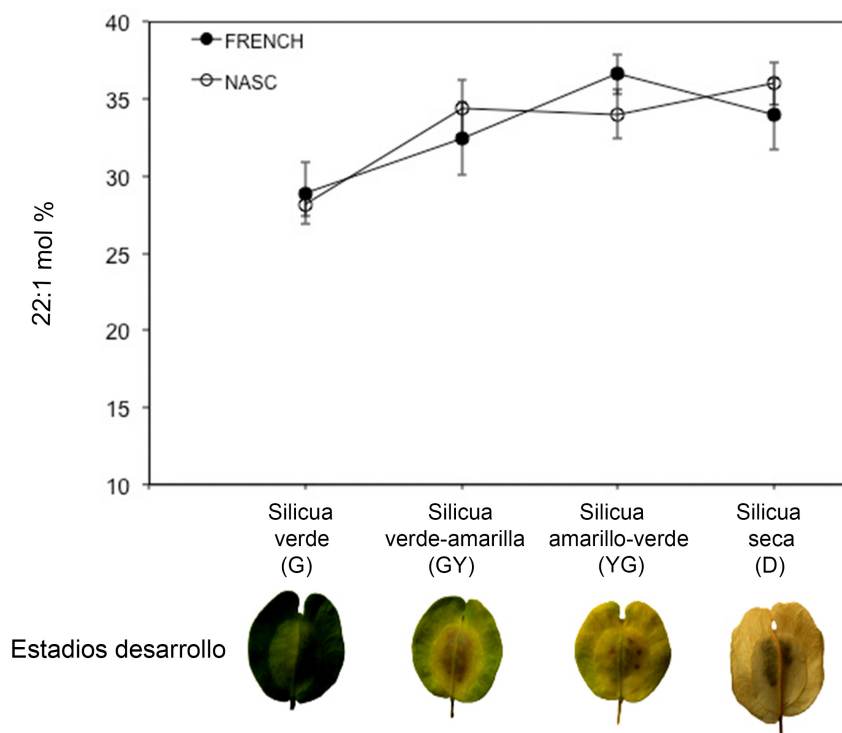


Figura 4.6 Tendencia de la acumulación de ácido erúxico en las semillas de ambas variedades de Pennycress durante la maduración de la semilla. Datos expresados en porcentajes molar obtenidos de tres experimentos biológicos independientes.

4.2.4. Contenido de ácido linoleico y linolénico en las semillas de Pennycress durante su maduración.

Además, se encontraron altos niveles de otros dos ácidos grasos en las semillas de ambas variedades cuya presencia decrecía concomitantemente con el incremento del ácido erúxico. El ácido linoleico (18:2) está presente con un porcentaje medio de 21-22%, con un máximo de 24% en la variedad FRENCH y un 23% en la variedad NASC, ambos en la primera fase de desarrollo (G). Por otro lado, el ácido linolénico (18:3) está presente con un promedio del 16%

y con un pico de acumulación de 23% también en la fase verde (G). La tendencia decreciente de la presencia de ambos ácidos grasos conforme la semilla queda representada en la figura 4.7.

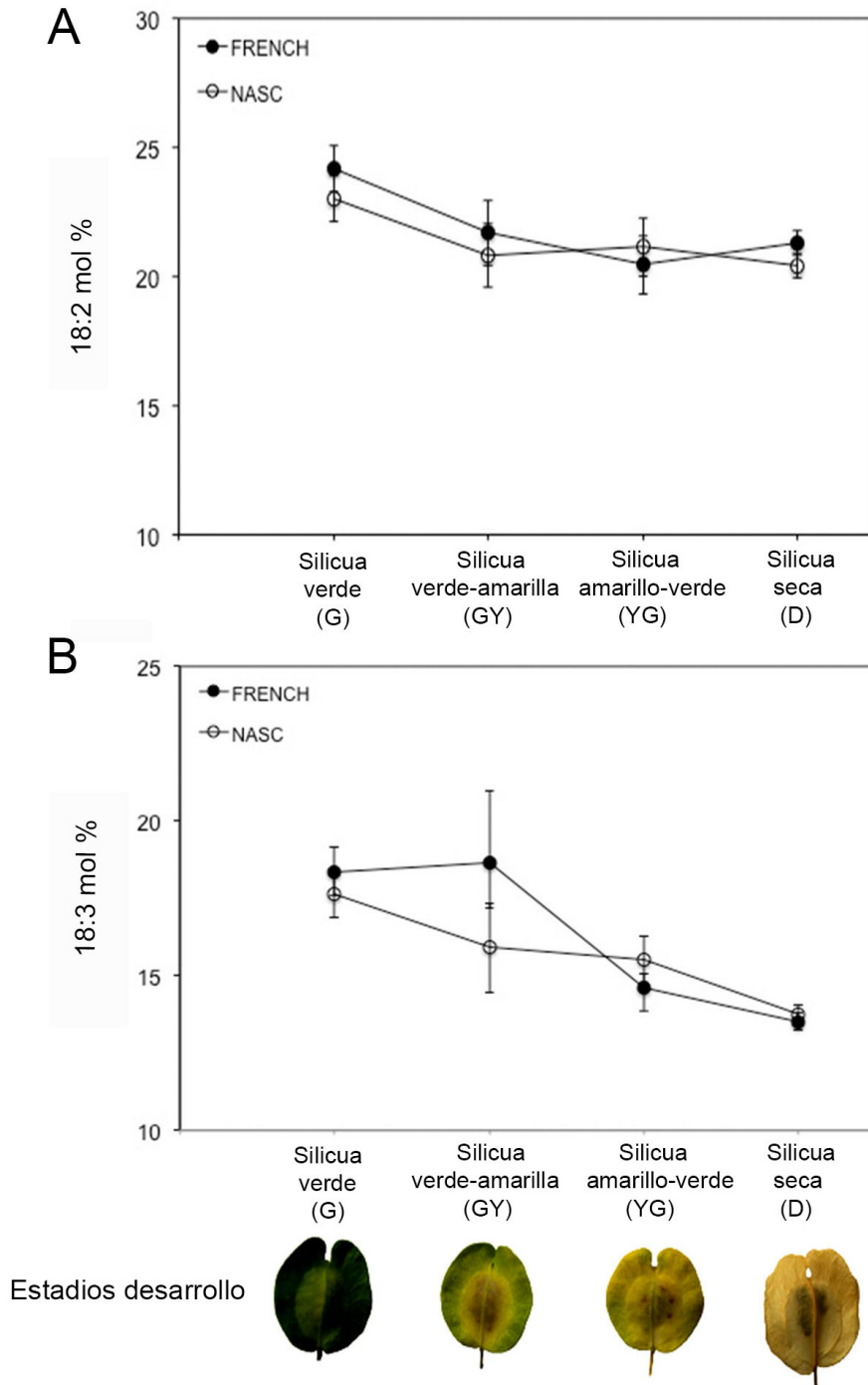


Figura 4.7 Tendencia de la presencia de ácido linoleico (18:2) (A) y linolénico (18:3) (B) en las semillas de ambas variedades de Pennycress durante la maduración de la semilla. Datos expresados en porcentajes molar obtenidos de tres experimentos biológicos independientes.

4.2.5. Composición de ácidos grasos de las fracciones TAG y DAG del aceite de las semillas de Pennycress durante su maduración.

En las semillas en desarrollo, el aceite es acumulado en forma de triacilglicerol (TAG), que es la fracción mayoritaria presente en los lípidos totales de las semillas (Bates et al., 2013). El precursor lipídico directo del triacilglicerol es el diacilglicerol (DAG) que representa un paso intermediario muy importante en la síntesis entre el TAG y la membrana lipídica (Li-Beisson et al., 2013). Para caracterizar la biosíntesis del aceite en las semillas de Pennycress, se monitorizó la composición de ácidos grasos en las fracciones TAG y DAG de las semillas de Pennycress en desarrollo. Para ello, se cultivaron por lo menos 5 plantas de cada variedad bajo condiciones controladas de cultivo, se extrajeron los lípidos totales de todas ellas y se separaron las fracciones TAG y DAG mediante la técnica explicada anteriormente de TLC en el apartado 3.4.4 de Materiales y Métodos. Ambas fracciones fueron posteriormente analizadas para determinar su composición en ácidos grasos.

Como podemos comprobar en la figura 4.8, el ácido erúcico también fue el mayoritario en la fracción de triacilglicerol de las semillas de Pennycress. En la primera fase de maduración del desarrollo de las semillas, correspondiente a silicuas verdes (G), los niveles del ácido graso 22:1 ya representan un 34% y 35% del total de ácidos grasos de la fracción TAG en plantas de la variedad FRENCH y NASC, respectivamente. Además, en ambas variedades y de manera muy similar, los niveles de erúcico incrementan con el desarrollo de la semilla. Así, en las semillas FRENCH, se determinó que el ácido erúcico incrementa desde un 34% en la fase verde (G) al mayor nivel en la fase amarillo-verde (YG) con un porcentaje de 41%. De igual manera, en las plantas de la variedad NASC, el 22:1 incrementó desde un 35% en la fase G hasta un máximo de 41% en la fase YG. El contenido de 22:1 en la fracción TAG de ambas variedades fue consistente con los niveles obtenidos en sus lípidos totales (Figura 4.6 y tablas 4.2 y 4.3).

Por otro lado, en la figura 4.8 se puede apreciar que también en el caso de la fracción TAG, el incremento de ácido erúcico es concomitante con la disminución de ácido linoleico (18:2) y linolénico (18:3) durante el desarrollo de las semillas en ambas variedades. De esta manera, y para ambas variedades, en el ácido linoleico presente en la fracción de TAG disminuye desde un 21-22% en la fase G a un 17% en la fase YG, recuperando un poco en la fase D hasta un 18%. En cuanto al contenido de ácido linolénico en TAG, disminuye desde un 13-14% en la fase G a un 11% en la fase YG volviendo aumentar ligeramente hasta el 12% en la fase D, de manera muy similar en ambas variedades.

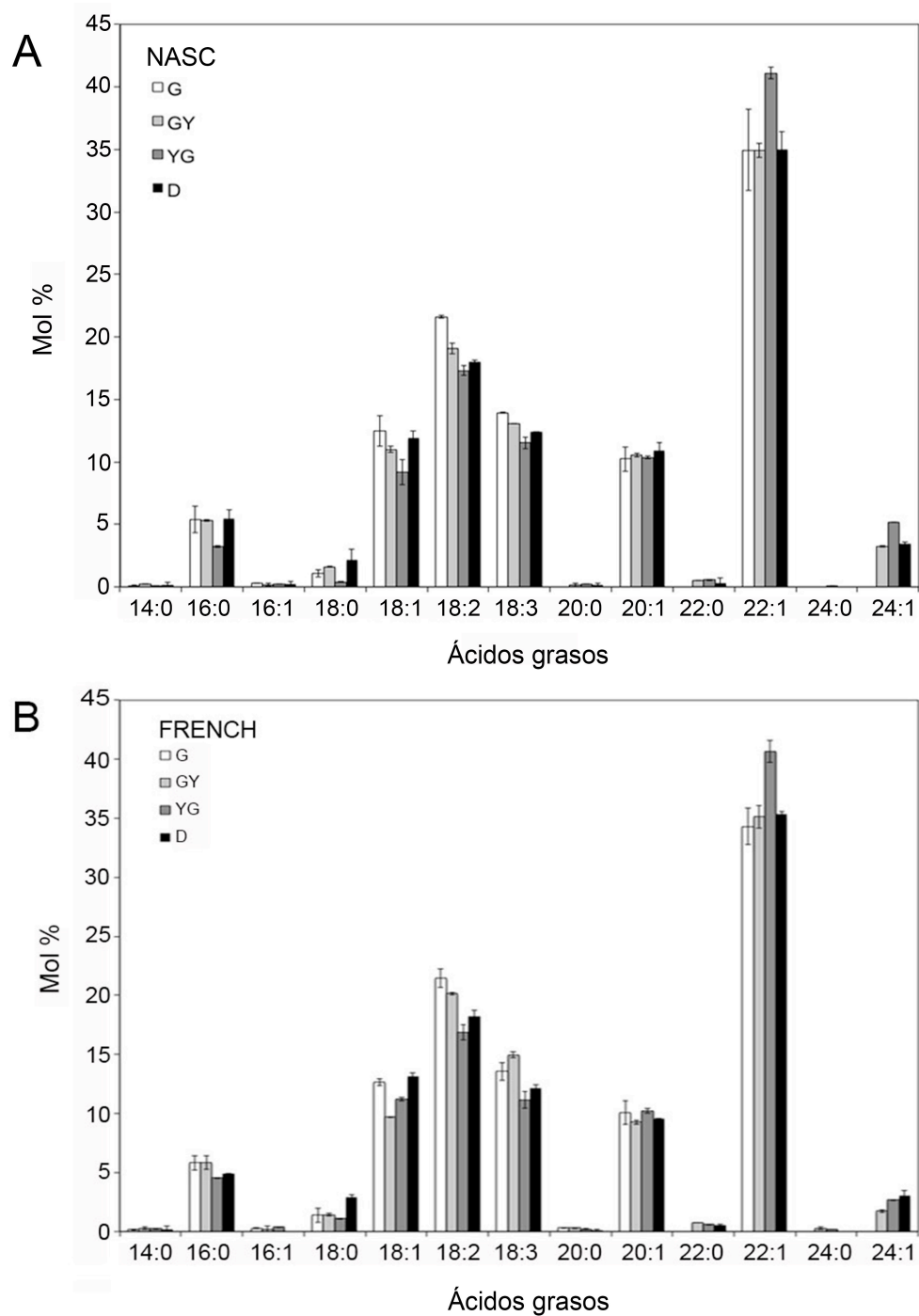


Figura 4.8 Composición de ácidos grasos de la fracción TAG del aceite de semillas de Pennycress de la variedad NASC (A) y FRENCH (B). Fases de desarrollo de las semillas: G, semillas verdes, GY, semillas verde-amarillas, YG, semillas amarillo-verde y D, semillas secas. Datos expresados en porcentajes molar obtenidos de dos experimentos biológicos independientes.

Además de la fracción de triacilglicerol (TAG), también se analizó la composición de ácidos grasos de su precursor, el diacilglicerol (DAG), durante el desarrollo de las semillas (Figura

4.9). Al contrario de lo que ocurre en el TAG, los niveles de 22:1 son sólo ligeramente mayores con respecto a otros ácidos grasos. En la fase inicial del desarrollo de las semillas (G), los niveles de 22:1 alcanzan el 16% en la variedad FRENCH y 22% en NASC. En este caso, la tendencia del erúcico es algo diferente en ambas variedades, de forma que la variedad NASC presenta un 22% de erúcico en DAG en la fase G que seguidamente disminuye en las fases GY y YG a un 11-13% y vuelve a aumentar hasta un máximo de 26% en la fase D. En cambio, las semillas FRENCH en la primera fase de maduración muestran un 16% que disminuye a 14% en la fase siguiente (GY) llegando a un pico máximo de 25% en la fase YG.

En cuanto al ácido linoleico (18:2) y linolénico (18:3), la tendencia de acumulación en la fracción del diacilglicerol en ambas variedades ocurre de manera muy similar entre si y de manera inversa a lo que ocurre en el triacilglicerol y en los lípidos totales, ya que sus niveles incrementan durante el desarrollo entre las fases verde (G) y la verde-amarilla (GY), llegando al máximo en dicha fase. En la variedad NASC, el 18:2 aumenta desde un 20% en G a un máximo de 32% en GY, y en FRENCH desde un 13% a un 24%. De similar manera, el ácido 18:3 incrementa su nivel en DAG desde 11% a 16% entre G-GY en las semillas NASC, y de un 9% a un 14% en FRENCH. Tras la fase verde-amarilla, los niveles de ambos ácidos disminuyen de manera progresiva en las dos variedades de una manera también muy similar, aumentando sólo ligeramente el linolénico en la fase D de las semillas NASC.

Este incremento de ácido linoleico y linolénico es concomitante con una reducción del nivel de ácido erúcico, lo cual indica que el cambio de flujo de los sustratos aciles a favor de la elongación que tiene lugar en la fracción del TAG durante el desarrollo de las semillas, ocurre de manera inversa en la fracción de DAG propiciando la desaturación.

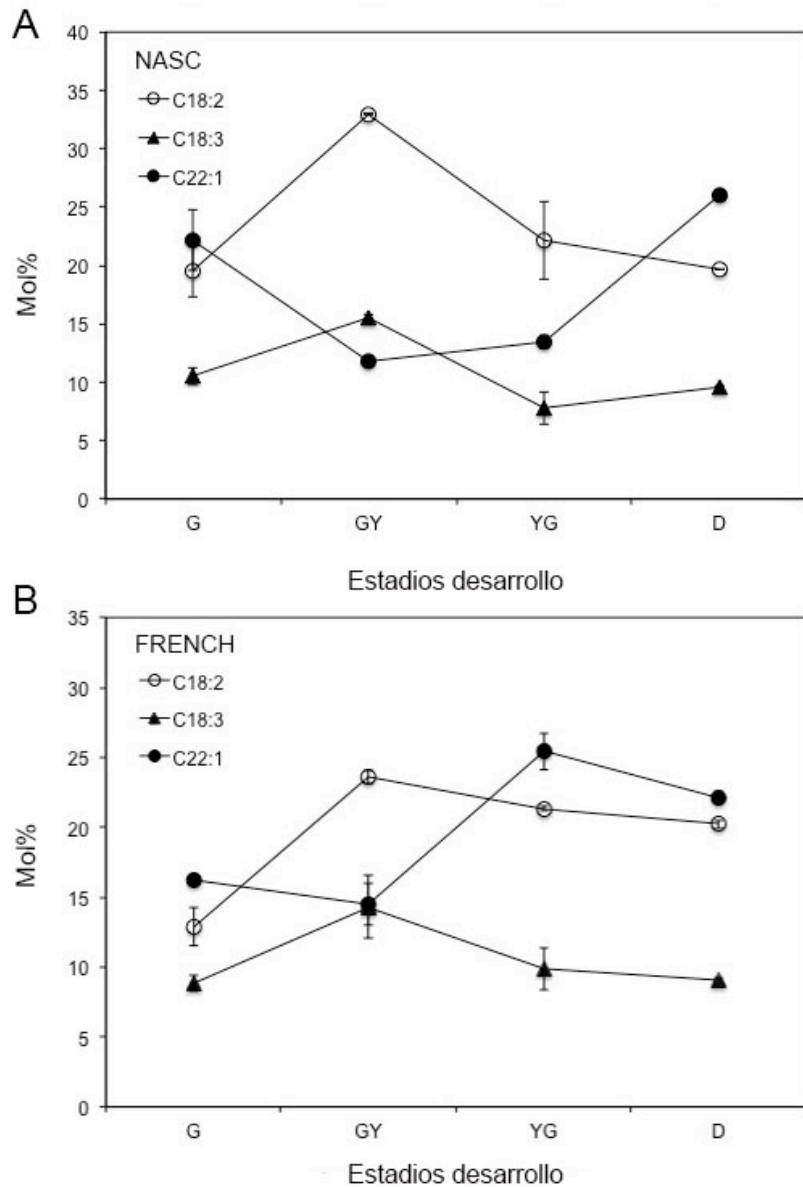


Figura 4.9 Composición de ácidos grasos de la fracción DAG del aceite de semillas de Pennycress de la variedad NASC (A) y FRENCH (B). Los círculos negros representan el ácido erúxico 22:1, los círculos blancos el ácido linolénico 18:3 y los triángulos el ácido linoleico 18:2. Datos expresados en porcentajes molar obtenidos de dos experimentos biológicos independientes.

4.3. IDENTIFICACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE ACEITE Y ERUCICO EN PENNYCRESS.

4.3.1. Caracterización del gen *TaFAE1* de ambas variedades de Pennycress.

La biosíntesis de los ácidos grasos de cadena larga (VLCFAs) como el ácido erúxico 22:1 es llevada a cabo en las plantas por un complejo enzimático microsomal que provoca la elongación de los ácidos grasos codificado por el gen *FAE1*. Dicha elongación tiene lugar al catalizar adiciones secuenciales de fracciones de malonil CoA a ácidos grasos de 18 carbonos. Cada ciclo de elongación comprende 4 actividades diferentes: la condensación del malonil CoA con una cadena larga de acil CoA; la reducción del 13-ceto-acil-CoA resultante del primer paso; la deshidratación de este a un enoil-CoA; y, la reducción del enoil CoA resultando finalmente en un acil CoA elongado (James et al., 1995). A pesar del hecho de que estas 4 actividades son requeridas para la elongación (Von Wettstein-Knowles, 1982), se han realizado experimentos de expresión ectópica del gen *FAE1* en *Arabidopsis* que, junto con experimentos de expresión heteróloga en levaduras, confirman que la actividad de la enzima FAE1 es el paso crítico y limitante de la reacción de elongación (Millar y Kunst, 1997; Katavic et al., 2001).

Los datos precedentes tanto del análisis de lípidos totales como de TAG del aceite de semilla de Pennycress (apartados 4.2.3 y 4.2.5) indicaron que el ácido erúxico es rápidamente sintetizado e incorporado al aceite de las semillas de Pennycress. Como primer paso para caracterizar a nivel molecular la biosíntesis de 22:1 en las semillas de Pennycress, se procedió a la caracterización del gen *FAE1*, tanto de la variedad NASC como de la variedad FRENCH.

Para obtener la secuencia génica del gen *TaFAE1* de las variedades NASC y FRENCH de Pennycress, se diseñaron cebadores a partir de una secuencia ya depositada del gen *TaFAE1* (código acceso GenBank: KF664164.1) que amplificaran el gen entero. Se realizaron RT-PCR del cDNA obtenido de semillas de Pennycress de ambas variedades resultando en la amplificación de una banda de 1518 bp en ambos casos (figura 4.10).

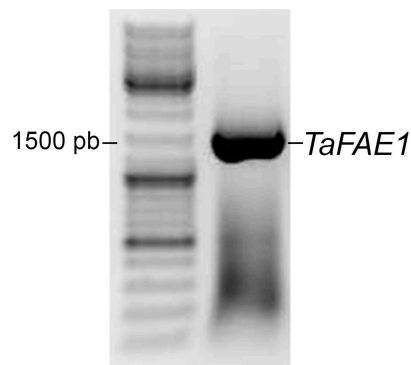


Figura 4.10 Banda correspondiente al gen *TaFAE1* (derecha), obtenida a partir de RT-PCR de cDNA de semillas de Pennycress. Marcador de peso molecular 1 kb GeneRuler DNA Ladder Mix de Thermo Scientific™ (izquierda).

Dicha banda fue clonada y secuenciada confirmando que se trataba de la secuencia completa del gen *TaFAE1*. Los mismos cebadores se utilizaron para amplificar el gen *TaFAE1* a partir de DNA genómico de ambas variedades. La secuenciación del fragmento obtenido a partir de DNA genómico confirmó los resultados a partir de cDNA. Tanto los análisis por RT-PCR, como los realizados sobre DNA genómico, mostraron siempre una sola banda y los resultados de secuenciación una sola secuencia, lo que sugiere que únicamente existe un gen *TaFAE1* en el genoma de las variedades NASC y FRENCH de Pennycress. Es importante destacar que no se detectaron intrones en la amplificación genómica del gen *TaFAE1*. Esta característica es compartida con otros genes *FAE1* de plantas brasicáceas como *Arabidopsis thaliana* (Katavic et al., 2002; Mietkiewska et al., 2004). Las secuencias *TaFAE1* de las variedades NASC y FRENCH fueron depositadas en la base de datos Genbank con los números de accesión KT223024 y KT223025, respectivamente.

4.3.1.1. Análisis de la secuencia proteica de FAE1 de ambas variedades de Pennycress y comparación con las secuencias de *Arabidopsis thaliana* y *Brassica napus*.

La figura 4.11 muestra un alineamiento de las secuencias proteicas deducidas a partir de la secuencia del gen *TaFAE1* para ambas variedades. Se incluyó en el análisis la secuencia de la proteína de *Arabidopsis thaliana*, especie que apenas acumula ácido erúxico en las semillas, y de la proteína FAE1 de *Brassica napus*, que a diferencia de *Arabidopsis* y de forma similar a Pennycress es productora de altos niveles de ácido erúxico.

H420, formando así parte del sitio activo del enzima FAE1 (Ghanevati y Jaworski, 2002). Todos los residuos citados están presentes en las secuencias de ambas variedades de Pennycress, pero únicamente los residuos C223, H391 y N424 (Ghanevati y Jaworski, 2001, 2002) están conservados en las 4 secuencias alineadas. Por otro lado, se han asociado mutaciones en el residuo S282 con el fenotipo de bajo contenido en erúcico (LEAR, del inglés Low Erucic Acid Rapeseed) en *Brassica napus* (Han et al., 2001; Katavic et al., 2002). Sin embargo, tal y como se muestra en la figura 4.11, dicho residuo S282 está conservado en las plantas de Pennycress y de *B. napus* (HEAR, del inglés High Erucic Acid Rapeseed), pero también en *Arabidopsis*, que acumula cantidades menores de ácido graso erúcico. Esta observación concuerda con estudios que sugieren que el residuo S282 por si mismo no es un requisito fundamental para una enzima FAE1 funcional (Katavic et al., 2004).

4.3.1.2. Análisis filogenético de *TaFAE1*.

Con el fin de caracterizar el gen *TaFAE1*, se construyó un árbol filogenético con 19 secuencias proteicas completas de FAE1 de varias especies. Estas secuencias incluían 8 especies acumuladoras de ácido erúcico (más de un 25%), incluyendo *T. arvensis*, así como 11 especies que no acumulan cantidades significativas de erúcico en las semillas. El árbol filogenético está representado en la figura 4.12.

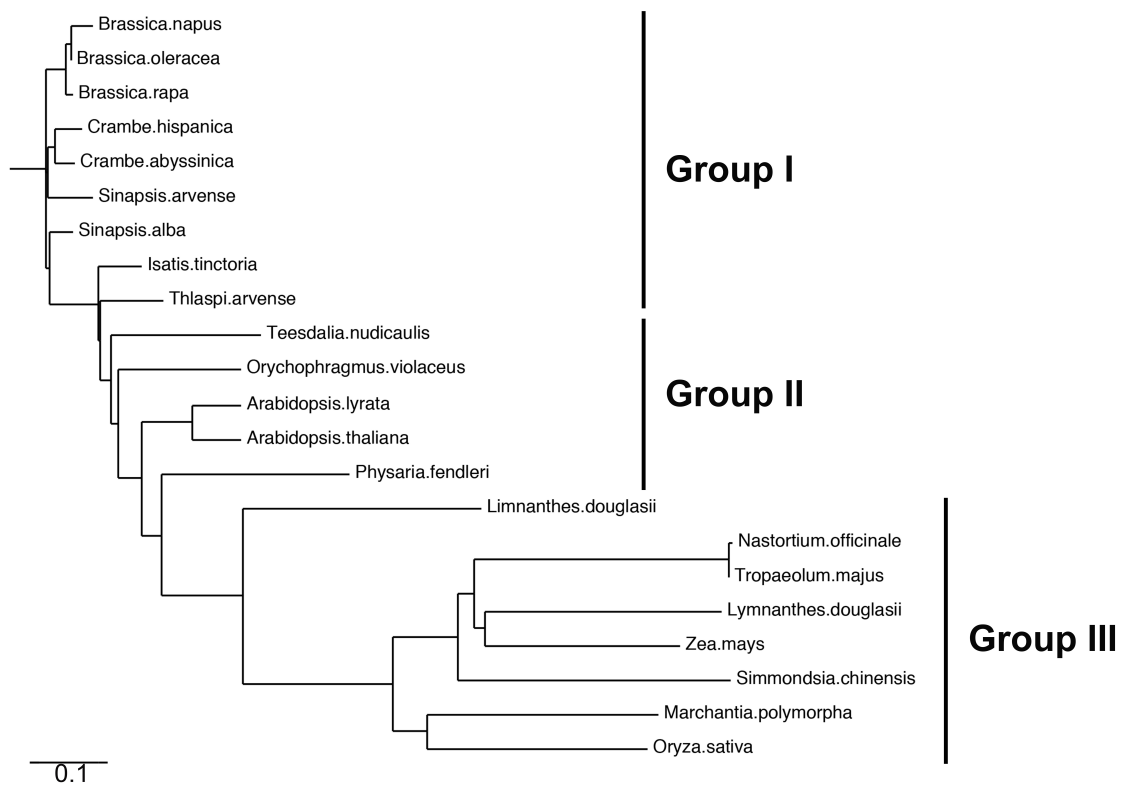


Figura 4.12 Árbol filogenético de proteínas FAE1 procedentes de diferentes especies de plantas. Los nombres y los números de accesoión de las secuencias utilizadas en el análisis son: *Arabidopsis thaliana* (U29142.1); *Brassica napus* (U50771.1); *Brassica oleracea* (GU325726.1); *Brassica rapa* (GU325723.1); *Crambe hispanica* (KF664157); *Crambe abyssinica* (KC565738); *Isatis tinctoria* (AY888038.1); *Lepidium campestre* (FJ907545.1); *Limnanthes douglasii* (AF247134); *Marchantia polymorpha* (AY308831); *Nastortium officinale* (AY0826190); *Orychophragmus violaceus* (AY888042.1); *Simmondsia chinensis* (U37088); *Sinapsis arvense* (AY888041.1); *Sinapsis alba* (AY888040.1); *Teesdalia nudicaulis* (EF186003.1); *Thlaspi arvense* (KT223024); *Tropaeolum majus* (AY082610); *Zea mays* (AJ29770).

Tal y como se observa en el árbol filogenético de la figura 4.12, la proteína FAE1 de Pennycress aparece agrupada en el mismo clado que otras proteínas elongasas pertenecientes a otras plantas brasicáceas que, de manera similar a Pennycress, acumulan altos contenidos de ácido erúcico en el aceite de sus semillas. Sin embargo, y a pesar de que la proteína FAE1 de *Arabidopsis* se agrupa en un clado distinto, la distancia filogenética entre ambas no parece ser muy grande. En cualquier caso, el análisis filogenético parece agrupar los genes *FAE1* de plantas acumuladoras de 22:1, lo que sugiere elementos en la estructura de la proteína que podrían ser responsables de esta mayor actividad elongasa.

4.3.2. Caracterización de los genes *TaDGAT1* y *TaWRI1* de Pennycress.

Además de caracterizar el gen codificante de la enzima elongasa FAE1 de Pennycress, se seleccionaron otros genes implicados en los procesos de biosíntesis de aceite y de ácido erúcico en las semillas de Pennycress, cuyas secuencias eran también desconocidas.

La enzima diacilglicerol acil-transferasa DGAT1 interviene en el paso final de la *ruta de Kennedy* y cataliza la acilación de la posición *sn-3* de diacilglicerol (DAG) para producir triacilglicerol (TAG). Por tanto, en el aceite de las semillas de Pennycress, la proteína DGAT1 presumiblemente tiene una gran participación en la presencia de ácido graso erúcico esterificado al esqueleto de glicerol del TAG en la posición *sn-3*, por lo que el gen *TaDGAT1* fue incluido en el estudio genético de Pennycress.

Por otro lado, la identificación de elementos de control implicados en la propia regulación de los genes podría ser extremadamente útil para manipular el contenido de erúcico no sólo en Pennycress sino en otras especies vegetales. Por ello, también se decidió incluir el gen *WRI1* en el análisis genético. Este gen codifica un factor transcripcional de la familia de elementos de respuesta al etileno/APETALA2 que dirige el flujo de carbono a través de la glucólisis y la biosíntesis de ácidos grasos en semillas en desarrollo. De esta manera, *WRI1* realiza la función de control mediante la regulación de la expresión de ciertos genes que codifican enzimas involucradas en las rutas metabólicas nombradas (Baud et al., 2007; To et al., 2012), como pueden ser *FAEI* y *DGAT1*.

Tal y como se observa en la figura 4.13 se obtuvieron dos bandas suficientemente marcadas a partir de DNA genómico y a partir de RT-PCR con cDNA de semillas de Pennycress. La secuencia obtenida del gen *TaDGAT1* a partir de cDNA de semillas de Pennycress resultó ser de 1569 pb y la del gen *TaWRI1* de 1308 pb. Sin embargo, las bandas obtenidas a partir de DNA genómico fueron de un tamaño superior, alrededor de 3000 pb ambas, lo que sugiere la existencia de intrones en ambos genes.

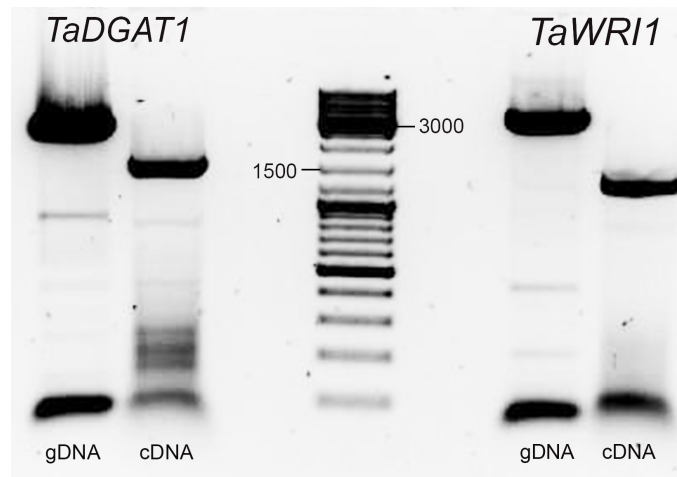


Figura 4.13 Bandas correspondiente a los genes *TaDGAT1* (derecha) y *TaWRI1*, obtenidas a partir de DNA genómico y a través de RT-PCR con cDNA de semillas de Pennycress. Marcador de peso molecular 1 kb GeneRuler DNA Ladder Mix de Thermo Scientific™ (izquierda).

4.3.2.1. Alineamiento proteico y análisis filogenético de *TaDGAT1*.

El gen *TaDGAT1* codifica una proteína de 522 aminoácidos. A continuación, en la figura 4.14, se muestra un alineamiento múltiple de la proteína DGAT1 deducida de Pennycress con otras proteínas DGAT1 pertenecientes a varias especies, entre las cuales hay varias especies de la familia Brassicaceae como *Arabidopsis thaliana*, *Camelina sativa* y *Brassica napus*, y otras especies pertenecientes a otras familias, como *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae), *Zea Mays* (Poaceae) y *Ricinus communis* (Euphorbiaceae).

O. sativa	MVGSDDGGGGGEAHA-----PAAPAHHRPPFRPRGGSGAIVEGFAALRRIRISGA AAAAASFGGDSGDEAASGEPSSSSS---SSPSRRRGGD-SNGAE--ASSAAGGGGGRG	108
Z. mays	MA-----LNHSSLRPPFMA-----PPF-SMPAASDRAGPG-----RDAGDSSSLR-----LRRAPSADAGLADGSGGLRENGPSPFNPPFPQE	63
G. max	MATSDPEPTVAT-----SSATSDDLML-SLRRRRTSNDG-GALA-DLASKF-DDDD-----VRSDSAEVLIEDS-----GGDD-----SI-S--SDAANSQPQKQDT	68
R. communis	MTILEPPTLGTV---SATSDDLML-SLRRRRTSNDG-GALA-DLASKF-DDDD-----VRSDSAEVLIEDS-----VAVTELATAKSN-GKDVANSRDKIDSHG	94
J. curcas	MTILEPPTLGTV---VAESSDDLNV-SLRRRRKGTSDG-GALP-ELTSMI-VELSES-----ES-GGVVMD-----PCHVTEPETEKIN-GDKCGDKRDKIDRNR	89
T. majus	NAVAESSQN-----TTMSGHGSDLNNFRRRKPSVSIPESSS-GFTS-T-NGVPA-----T--GHVAENRQDRV-----GAMENATGVSNL-IG-NGGGVIVNGEKQV	90
B. napus	NAVLDGGG---VAVPTENG---ADLDRLRHRKSRSDSSNGLIS-DT-----SPS-----DDVGA AAAEADARDRVDSAVEEQAQTANLAGGDE--TRE-----SGCRGGG	88
B. oleracea	NAVLDGGG---VAVPTENG---ADLDRLRHRKSRSDSSNGLIS-DT-----SPS-----DDVGA AAAEADARDRVDSAVEEQAQTANLAGGDE--TRE-----SGCRGGG	82
B. rapa	METLDGGG---VMPRTENGGA---DLDLTLRHRKSRSDSSNGLP-DS-----SPS-----DDVGA AAAEADARDRVDSAVEEQAQTANLAGGDE--TRE-----SGCRGGG	88
T. arvense	MEILDAGG---VMPRTENGGA---DLDLTLRHRKSRSDSSNGLP-DS-----SPS-----DDVGA AAAEADARDRVDSAVEEQAQTANLAGGDE--TRE-----SGCRGGG	82
A. thaliana	MAILDAGG---VMPRTENGGA---DLDLTLRHRKSRSDSSNGLP-DS-----SPS-----DDVGA AAAEADARDRVDSAVEEQAQTANLAGGDE--TRE-----SGCRGGG	100
C. sativa	MAILDGGGGVSTATATENGGEFVLDLRR---RKSRSDSN-GVL--C--G-S-DNPS-----DDVG--APADVRDRIDSVVNDDAQGTAN-LAGDN--DTEIRRTGGGGGGEAR	98
O. sativa	QQQSFATFRAAAPVHRKAKESPLSSDAIFKQSHAGLFLNLCIVLVAVNSRLI IENLMKYGLLIRAGWFNDKSLRDWPLMCLSLPAPLAFGAVEKLAFLNVIIDAVATCLHIFLST	228
Z. mays	GOHEMLYRASAPAHRRVKEKESPLSSDAIFRQSHAGLFLNLCIVLVAVNSRLI IENLMKYGLLIRAGWFNDKSLRDWPLMCLSLPAPLAFGAVEKLAFLNVIIDAVATCLHIFLST	183
G. max	DFSVLKFAYRSPVAHRKAKESPLSSDAIFRQSHAGLFLNLCIVLVAVNSRLI IENLMKYGLLIRAGWFNDKSLRDWPLMCLSLPAPLAFGAVEKLAFLNVIIDAVATCLHIFLST	184
R. communis	GSDDFKLAYSVPVAHRKAKESPLSSDAIFRQSHAGLFLNLCIVLVAVNSRLI IENLMKYGLLIRAGWFNDKSLRDWPLMCLSLPAPLAFGAVEKLAFLNVIIDAVATCLHIFLST	218
J. curcas	GRSDIKFTYRSPVAHRKAKESPLSSDAIFRQSHAGLFLNLCIVLVAVNSRLI IENLMKYGLLIRAGWFNDKSLRDWPLMCLSLPAPLAFGAVEKLAFLNVIIDAVATCLHIFLST	210
T. majus	GETDIRFTYRSPVAHRKAKESPLSSDAIFRQSHAGLFLNLCIVLVAVNSRLI IENLMKYGLLIRAGWFNDKSLRDWPLMCLSLPAPLAFGAVEKLAFLNVIIDAVATCLHIFLST	209
B. napus	NGGDVFTYRSPVAHRKAKESPLSSDAIFRQSHAGLFLNLCIVLVAVNSRLI IENLMKYGLLIRAGWFNDKSLRDWPLMCLSLPAPLAFGAVEKLAFLNVIIDAVATCLHIFLST	208
B. oleracea	NGGDVFTYRSPVAHRKAKESPLSSDAIFRQSHAGLFLNLCIVLVAVNSRLI IENLMKYGLLIRAGWFNDKSLRDWPLMCLSLPAPLAFGAVEKLAFLNVIIDAVATCLHIFLST	208
B. rapa	NGGDVFTYRSPVAHRKAKESPLSSDAIFRQSHAGLFLNLCIVLVAVNSRLI IENLMKYGLLIRAGWFNDKSLRDWPLMCLSLPAPLAFGAVEKLAFLNVIIDAVATCLHIFLST	202
T. arvense	GDADRTYRSPVAHRKAKESPLSSDAIFRQSHAGLFLNLCIVLVAVNSRLI IENLMKYGLLIRAGWFNDKSLRDWPLMCLSLPAPLAFGAVEKLAFLNVIIDAVATCLHIFLST	220
A. thaliana	GNADRTYRSPVAHRKAKESPLSSDAIFRQSHAGLFLNLCIVLVAVNSRLI IENLMKYGLLIRAGWFNDKSLRDWPLMCLSLPAPLAFGAVEKLAFLNVIIDAVATCLHIFLST	218
C. sativa	GNADRTYRSPVAHRKAKESPLSSDAIFRQSHAGLFLNLCIVLVAVNSRLI IENLMKYGLLIRAGWFNDKSLRDWPLMCLSLPAPLAFGAVEKLAFLNVIIDAVATCLHIFLST	218
O. sativa	TEIYVPLVILKCDASAVLSGFLIFACIWLKLVSAHTNHDRLQIMSGKVDNELSTVDMNLQPTLGNLIYFMMAPTLCYQPSYRPTSCVRKGLRILQIILYIFLQGLFII EQ	348
Z. mays	SAIYVPLVILKCDASAVLSGFLIFACIWLKLVSAHTNHDRLQIMSGKVDNELSTVDMNLQPTLGNLIYFMMAPTLCYQPSYRPTSCVRKGLRILQIILYIFLQGLFII EQ	303
G. max	ASLFPYVILKCDASAVLSGFLIFACIWLKLVSAHTNHDRLQIMSGKVDNELSTVDMNLQPTLGNLIYFMMAPTLCYQPSYRPTSCVRKGLRILQIILYIFLQGLFII EQ	308
R. communis	AAVLYPASVILKCDASAVLSGFLIFACIWLKLVSAHTNHDRLQIMSGKVDNELSTVDMNLQPTLGNLIYFMMAPTLCYQPSYRPTSCVRKGLRILQIILYIFLQGLFII EQ	333
J. curcas	TAVLYPASVILKCDASAVLSGFLIFACIWLKLVSAHTNHDRLQIMSGKVDNELSTVDMNLQPTLGNLIYFMMAPTLCYQPSYRPTSCVRKGLRILQIILYIFLQGLFII EQ	329
T. majus	AAVLYPASVILKCDASAVLSGFLIFACIWLKLVSAHTNHDRLQIMSGKVDNELSTVDMNLQPTLGNLIYFMMAPTLCYQPSYRPTSCVRKGLRILQIILYIFLQGLFII EQ	320
B. napus	TEVLYPVYVTRCDSAVLSGFLIFACIWLKLVSAHTNHDRLQIMSGKVDNELSTVDMNLQPTLGNLIYFMMAPTLCYQPSYRPTSCVRKGLRILQIILYIFLQGLFII EQ	331
B. oleracea	TEVLYPVYVTRCDSAVLSGFLIFACIWLKLVSAHTNHDRLQIMSGKVDNELSTVDMNLQPTLGNLIYFMMAPTLCYQPSYRPTSCVRKGLRILQIILYIFLQGLFII EQ	321
B. rapa	TEVLYPVYVTRCDSAVLSGFLIFACIWLKLVSAHTNHDRLQIMSGKVDNELSTVDMNLQPTLGNLIYFMMAPTLCYQPSYRPTSCVRKGLRILQIILYIFLQGLFII EQ	315
T. arvense	TEVLYPVYVTRCDSAVLSGFLIFACIWLKLVSAHTNHDRLQIMSGKVDNELSTVDMNLQPTLGNLIYFMMAPTLCYQPSYRPTSCVRKGLRILQIILYIFLQGLFII EQ	333
A. thaliana	TEVLYPVYVTRCDSAVLSGFLIFACIWLKLVSAHTNHDRLQIMSGKVDNELSTVDMNLQPTLGNLIYFMMAPTLCYQPSYRPTSCVRKGLRILQIILYIFLQGLFII EQ	331
C. sativa	TEVLYPVYVTRCDSAVLSGFLIFACIWLKLVSAHTNHDRLQIMSGKVDNELSTVDMNLQPTLGNLIYFMMAPTLCYQPSYRPTSCVRKGLRILQIILYIFLQGLFII EQ	331
O. sativa	YINPIVNSQHPKGGDLLYAIERVLKLSVNLVYVWLCMFYCFHLLWLNIAELLRFGDRE FYKDWNNAKTVEYWRWNNMPVHKWVHRHIFPCLRRKIPRGVALLIAFFLSAVFHELICV	428
Z. mays	YINPIVNSQHPKGGDLLYAIERVLKLSVNLVYVWLCMFYCFHLLWLNIAELLRFGDRE FYKDWNNAKTVEYWRWNNMPVHKWVHRHIFPCLRRKIPRGVALLIAFFLSAVFHELICV	463
G. max	YINPIVNSQHPKGGDLLYAIERVLKLSVNLVYVWLCMFYCFHLLWLNIAELLRFGDRE FYKDWNNAKTVEYWRWNNMPVHKWVHRHIFPCLRRKIPRGVALLIAFFLSAVFHELICV	428
R. communis	YINPIVNSQHPKGGDLLYAIERVLKLSVNLVYVWLCMFYCFHLLWLNIAELLRFGDRE FYKDWNNAKTVEYWRWNNMPVHKWVHRHIFPCLRRKIPRGVALLIAFFLSAVFHELICV	453
J. curcas	YINPIVNSQHPKGGDLLYAIERVLKLSVNLVYVWLCMFYCFHLLWLNIAELLRFGDRE FYKDWNNAKTVEYWRWNNMPVHKWVHRHIFPCLRRKIPRGVALLIAFFLSAVFHELICV	449
T. majus	YINPIVNSQHPKGGDLLYAIERVLKLSVNLVYVWLCMFYCFHLLWLNIAELLRFGDRE FYKDWNNAKTVEYWRWNNMPVHKWVHRHIFPCLRRKIPRGVALLIAFFLSAVFHELICV	450
B. napus	YINPIVNSQHPKGGDLLYAIERVLKLSVNLVYVWLCMFYCFHLLWLNIAELLRFGDRE FYKDWNNAKTVEYWRWNNMPVHKWVHRHIFPCLRRKIPRGVALLIAFFLSAVFHELICV	441
B. oleracea	YINPIVNSQHPKGGDLLYAIERVLKLSVNLVYVWLCMFYCFHLLWLNIAELLRFGDRE FYKDWNNAKTVEYWRWNNMPVHKWVHRHIFPCLRRKIPRGVALLIAFFLSAVFHELICV	441
B. rapa	YINPIVNSQHPKGGDLLYAIERVLKLSVNLVYVWLCMFYCFHLLWLNIAELLRFGDRE FYKDWNNAKTVEYWRWNNMPVHKWVHRHIFPCLRRKIPRGVALLIAFFLSAVFHELICV	441
T. arvense	YINPIVNSQHPKGGDLLYAIERVLKLSVNLVYVWLCMFYCFHLLWLNIAELLRFGDRE FYKDWNNAKTVEYWRWNNMPVHKWVHRHIFPCLRRKIPRGVALLIAFFLSAVFHELICV	435
A. thaliana	YINPIVNSQHPKGGDLLYAIERVLKLSVNLVYVWLCMFYCFHLLWLNIAELLRFGDRE FYKDWNNAKTVEYWRWNNMPVHKWVHRHIFPCLRRKIPRGVALLIAFFLSAVFHELICV	453
C. sativa	YINPIVNSQHPKGGDLLYAIERVLKLSVNLVYVWLCMFYCFHLLWLNIAELLRFGDRE FYKDWNNAKTVEYWRWNNMPVHKWVHRHIFPCLRRKIPRGVALLIAFFLSAVFHELICV	451
O. sativa	AVPCRLKFWAFGLGIMFQVPLVITNYLQERFG-SMVGNMIFWFFICFGQPMCVLYYHDLNMRKGSMS--	538
Z. mays	AVPCRLKFWAFGLGIMFQVPLVITNYLQERFG-SMVGNMIFWFFICFGQPMCVLYYHDLNMRKGSMS--	494
G. max	AVPCRLKFWAFGLGIMFQVPLVITNYLQERFG-SMVGNMIFWFFICFGQPMCVLYYHDLNMRKGSMS--	498
R. communis	AVPCRLKFWAFGLGIMFQVPLVITNYLQERFG-SMVGNMIFWFFICFGQPMCVLYYHDLNMRKGSMS--	521
J. curcas	AVPCRLKFWAFGLGIMFQVPLVITNYLQERFG-SMVGNMIFWFFICFGQPMCVLYYHDLNMRKGSMS--	521
T. majus	AVPCRLKFWAFGLGIMFQVPLVITNYLQERFG-SMVGNMIFWFFICFGQPMCVLYYHDLNMRKGSMS--	518
B. napus	AVPCRLKFWAFGLGIMFQVPLVITNYLQERFG-SMVGNMIFWFFICFGQPMCVLYYHDLNMRKGSMS--	510
B. oleracea	AVPCRLKFWAFGLGIMFQVPLVITNYLQERFG-SMVGNMIFWFFICFGQPMCVLYYHDLNMRKGSMS--	510
B. rapa	AVPCRLKFWAFGLGIMFQVPLVITNYLQERFG-SMVGNMIFWFFICFGQPMCVLYYHDLNMRKGSMS--	504
T. arvense	AVPCRLKFWAFGLGIMFQVPLVITNYLQERFG-SMVGNMIFWFFICFGQPMCVLYYHDLNMRKGSMS--	522
A. thaliana	AVPCRLKFWAFGLGIMFQVPLVITNYLQERFG-SMVGNMIFWFFICFGQPMCVLYYHDLNMRKGSMS--	520
C. sativa	AVPCRLKFWAFGLGIMFQVPLVITNYLQERFG-SMVGNMIFWFFICFGQPMCVLYYHDLNMRKGSMS--	520

Figura 4.14 Alineamiento múltiple de la secuencia proteica deducida de DGAT1 de Pennycres con otras proteínas DGAT1. Los nombres y los números de accesión de las secuencias utilizadas en el análisis son: *Oryza sativa* (AAW47581), *Zea mays* (ABV91586), *Glycine max* (AAS578662), *Ricinus communis* (AAR11479), *Jatropha curcas* (ARB84383), *Tropaeolum majus* (AAM03340), *Brassica napus* (AFM31262.1), *Brassica oleracea* (XP013606585.1), *Brassica rapa* (XP009102155.1), *Arabidopsis thaliana* (NP179535) y *Camelina sativa* (XP010415368.1).

Con el fin de profundizar en la caracterización del gen *TaDGAT1*, se construyó un árbol filogenético con las 12 secuencias proteicas de DGAT1 de varias especies utilizadas anteriormente en el alineamiento múltiple. El árbol filogenético está representado en la figura 4.15.

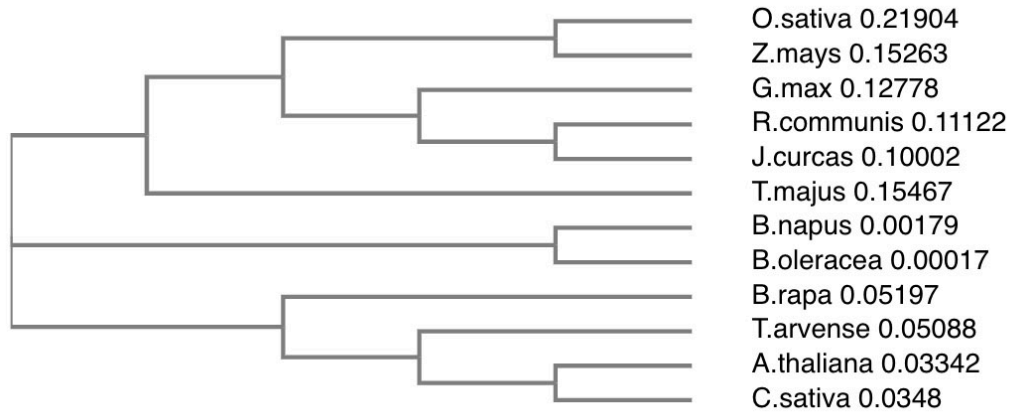


Figura 4.15 Árbol filogenético de proteínas DGAT1 procedentes de diferentes especies de plantas entre las cuales está la proteína DGAT1 deducida de Pennycress. Los nombres y los números de accesoión de las secuencias utilizadas en el análisis son los mismos a los utilizados en la figura 4.14.

En el árbol filogenético de DGAT1 (figura 4.15) se puede observar como DGAT1 de Pennycress está posicionada junto a la de otras brasicáceas, tal y como es el caso de *Arabidopsis thaliana* o *Camelina sativa*. En este caso, parece que el agrupamiento respondió más a su parentesco entre especies que al contenido en aceite o en ácidos grasos de cadena larga, ya que *Arabidopsis*, a diferencia de *Camelina* o *Pennycress*, no acumula un alto contenido de aceite en las semillas. De hecho *Camelina* y *Pennycress*, a pesar de acumular un alto contenido en aceite, superior al 38%, acumulan ácidos grasos muy diferentes, siendo en *Camelina* el 18:3 el ácido graso mayoritario. Por otro lado, el gen *TaDGAT1* muestra una identidad con el gen de *Arabidopsis* del 90%.

4.3.2.2. Alineamiento proteico y análisis filogenético de *TaWRI1*.

El gen *TaWRI1* codifica una proteína de 435 aminoácidos. De la misma manera que para la proteína DGAT1 de Pennycress, se realizó un alineamiento múltiple de la proteína WRI1 deducida de Pennycress con otras proteínas WRI1 de otras especies, entre las cuales hay también varias especies de la familia Brassicaceae como *Arabidopsis thaliana*, *Eutrema salsugineum* y *Brassica napus*, y otras especies pertenecientes a otras familias, como *Glycine soja* (Fabaceae), *Citrus sinensis* (Rutaceae) y *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae). El alineamiento proteico se muestra en la figura 4.16.

```

Z.mays      MESSGMLVKEIESEYCPGSAAP-----SVVIGGAPDVGEGHRRHVRRR-----REPPLAPIGGGGIGKPLPSITVRRSSFRGVSRHRWT 88
G.max      -----MKRSPASSCSSTSSVG-----FEVHH-----P-----IEKRRPKHPRN-----NLKSQKCKQ-----NQTTGGRRSSIRYGVTRHRWT 66
G.soja     -----MKRSPASSCSSTSSVG-----FE-----A-----P-----IEKRRPKHPRN-----NLKSQKCKQ-----NQTTGGRRSSIRYGVTRHRWT 64
A.thaliana -----MKRRLTT-----STCSSP-----SSSVSSSTTS-----SPIQS-----EAPRPKRA-----KR-----AKSS-----PSGDKSHNPTS-----PASTRRSSIRYGVTRHRWT 75
C.sativa   -----MKRRLTNSSSSP-----SSSVSSSTTS-----SPIQS-----EAPRPKRA-----KR-----AKSS-----PSGDKSHNPTS-----PASTRRSSIRYGVTRHRWT 77
B.oleracea -----MKRPLTTPSS-----SSSTSSSACI-----LPTQS-----EAPRPKRA-----KR-----AKSS-----PSGDKSHNPTS-----PASTRRSSIRYGVTRHRWT 72
B.rapa     -----MKRPLTTPSS-----SSSTSSSACI-----LPTQS-----EAPRPKRA-----KR-----AKSS-----PSGDKSHNPTS-----PASTRRSSIRYGVTRHRWT 72
B.napus    -----MKRPLTTPSS-----SSSTSSSACI-----LPTQS-----EAPRPKRA-----KR-----AKSS-----PSGDKSHNPTS-----PASTRRSSIRYGVTRHRWT 80
T.arvense  -----MKRPLTTPSS-----SSSV-----SSSTSSSACI-----LPTQS-----EAPRPKRA-----KR-----AKSS-----PSGDKSHNPTS-----PASTRRSSIRYGVTRHRWT 80
E.salsugineum -----MKRPLTTPSS-----SSSV-----SSSTSSSACI-----LPTQS-----EAPRPKRA-----KR-----AKSS-----PSGDKSHNPTS-----PASTRRSSIRYGVTRHRWT 79
C.sinensis -----MKRSPASSCSSTSSSVFGSE-----IVIVPHHDDHHRVQEKPKIKRPRKNDQPNKKEKCRQKQNVTT-----SNNNSISNNNNNSRRSSIRYGVTRHRWT 97
J.curcas   -----MKRSPASSCSSTSSSPSSSSSACSSSSCLDSVSPMHH-----QLRSEKSKRIRKI-----QTKQKQCTTA-----TTPSPGCGRRSSIRYGVTRHRWT 93
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Z.mays      GRFEAHLWKSNNWNTQRKKGQVYLGAIDEEEAARAYDLAALKYWGPTTYTNFPV-MDYEKELKVMENITKEEYLAASLRSSGFSRGSVSKYRGVARRHHNGRWEARI GRVFGNKYLY 207
G.max      GRFEAHLWKSNNWNIQSKGGQVYLGAIDEEEAARAYDLAALKYWGKDATLNFPF-ETYTELEEMDKVRSREYLAASLRSSGFSRGSVSKYRGVARRHHNGRWEARI GRVCGNKYLY 185
G.soja     GRFEAHLWKSNNWNIQSKGGQVYLGAIDEEEAARAYDLAALKYWGKDATLNFPF-ETYTELEEMDKVRSREYLAASLRSSGFSRGSVSKYRGVARRHHNGRWEARI GRVCGNKYLY 180
A.thaliana GRFEAHLWKSNNWNIQKGGQVYLGAIDEEEAARAYDLAALKYWGPTTYTNFPV-ETYTELEEMDKVRSREYLAASLRSSGFSRGSVSKYRGVARRHHNGRWEARI GRVFGNKYLY 194
C.sativa   GRFEAHLWKSNNWNIQKGGQVYLGAIDEEEAARAYDLAALKYWGPTTYTNFPV-ETYTELEEMDKVRSREYLAASLRSSGFSRGSVSKYRGVARRHHNGRWEARI GRVFGNKYLY 197
B.oleracea GRFEAHLWKSNNWNIQKGGQVYLGAIDEEEAARAYDLAALKYWGPTTYTNFPV-ETYTELEEMDKVRSREYLAASLRSSGFSRGSVSKYRGVARRHHNGRWEARI GRVFGNKYLY 191
B.rapa     GRFEAHLWKSNNWNIQKGGQVYLGAIDEEEAARAYDLAALKYWGPTTYTNFPV-ETYTELEEMDKVRSREYLAASLRSSGFSRGSVSKYRGVARRHHNGRWEARI GRVFGNKYLY 191
B.napus    GRFEAHLWKSNNWNIQKGGQVYLGAIDEEEAARAYDLAALKYWGPTTYTNFPV-ETYTELEEMDKVRSREYLAASLRSSGFSRGSVSKYRGVARRHHNGRWEARI GRVFGNKYLY 199
T.arvense  GRFEAHLWKSNNWNIQKGGQVYLGAIDEEEAARAYDLAALKYWGPTTYTNFPV-ETYTELEEMDKVRSREYLAASLRSSGFSRGSVSKYRGVARRHHNGRWEARI GRVFGNKYLY 195
E.salsugineum GRFEAHLWKSNNWNIQKGGQVYLGAIDEEEAARAYDLAALKYWGPTTYTNFPV-ETYTELEEMDKVRSREYLAASLRSSGFSRGSVSKYRGVARRHHNGRWEARI GRVFGNKYLY 216
C.sinensis GRFEAHLWKSNNWNIQKGGQVYLGAIDEEEAARAYDLAALKYWGPTTYTNFPV-ETYSKELEEMQKSKREYLAASLRSSGFSRGSVSKYRGVARRHHNGRWEARI GRVFGNKYLY 212
J.curcas   ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Z.mays      LGTYSTQEEAARAYDIAAIEYRGVNAVTFNFDLSRYITLWPKSAPPAA-FN-----REALVAQAA-----PAEQQLHHPAETAQMLPRGNPFLI-----DHMTSS-----GGGQESMSTV 308
G.max      LGTYTQEEAARAYDIAAIEYRGVNAVTFNFDLSRYMDKIKKNDQTLQOQTEVQTEVTPNSSDSEAEVEQ-----QHTTTITTPPF-----ENLHMLPQEHVOVY-----THHV 287
G.soja     LGTYTQEEAARAYDIAAIEYRGVNAVTFNFDLSRYMDKIKKNDQTLQOQTEVQTEVTPNSSDSEAEVEQ-----QHTTTITTPPF-----ENLHMPFQOHVOY-----TPHV 280
A.thaliana LGTYNTQEEAAAADMAAIEYRGANAVTFNFDLSYIDRLKKGVPFPVQANHOBI-LVE-----AKQEVETREAKEEPREVEVQVVEEPQEBEKEEBEABQAEIIVGVSE-EEAV 309
C.sativa   LGTYNTQEEAAAADMAAIEYRGANAVTFNFDLSYIDRLKKGVPFPVQANHOEALAE-----AKQEI-----EAKPEETEVVQCVVEEPQVQV-----EBAEQCEBVEVQKKEEAAV 308
B.oleracea LGTYNTQEEAAAADMAAIEYRGANAVTFNFDLSYIDRLKKGVPFPVQANHOEA-VLAE-----TKQEVE-----AKEEPTTEEVQCVVEEAK-----EE-KT-----EKKQQE-VEEAV 293
B.rapa     LGTYNTQEEAAAADMAAIEYRGANAVTFNFDLSYIDRLKKGVPFPVQANHOEA-VLAE-----AKQEVE-----AKEEPTTEEVQCVVEEAK-----EA-KEEETKQOQOQ-VEEAV 297
B.napus    LGTYNTQEEAAAADMAAIEYRGANAVTFNFDLSYIDRLKKGVPFPVQANHOEA-VLAE-----AKQEVE-----AKEEPTTEEVQCVVEEAK-----EA-KEEETKQOQOQ-VEEAV 297
T.arvense  LGTYNTQEEAAAADMAAIEYRGANAVTFNFDLSYIXRLKKGVPFPVQANHOEA-VLAE-----AKQEIE-----AKEEPTTEEVQCVVEEAK-----EKEETKQOQOQ-VEEAV 305
E.salsugineum LGTYNTQEEAAAADMAAIEYRGANAVTFNFDLSYIDRLKKGVPFPVQANHOEA-VLAE-----AKQEI-----AKEEPTTEEVQCVVEEAK-----EKEETKQOQOQ-VEEAV 305
C.sinensis LGTYNTQEEAAAADMAAIEYRGANAVTFNFDLSYIDRLKKGVPFPVQANHOEA-VLAE-----AKQEI-----AKEEPTTEEVQCVVEEAK-----EKEETKQOQOQ-VEEAV 305
J.curcas   LGTYNTQEEAAAADMAAIEYRGANAVTFNFDLSYIDRLKKGVPFPVQANHOEA-VLAE-----AKQEI-----AKEEPTTEEVQCVVEEAK-----EKEETKQOQOQ-VEEAV 316
          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Z.mays      SPGMR-----GSST-----ALSLLKSS-MFRQLV-EKNSDAEAGGDEAAAAAGSGHPGPDAYEYHNFQGEA-PPDMCD-LFSSGGGGGGHAGVAGF-HRDIAACYD-EG 411
G.max      TPDEESSLVTIMHVLEQDLPWSPMYTG-----LSQFQ-DPNLA-----LSKG-DDLAGMFDGAG-FEEDIDFLSTQPGDHETESDVNNMSAVLDSVECCD-TMG 382
G.soja     SPREESSLVTIMHVLEQDLPWSPMYTG-----LSQFQ-DPNLA-----FCG-DDLVGMFDSAG-FEEDIDFLSTQPGD-ETESDVNNMSAVLDSVECCD-TMG 374
A.thaliana VNCCIDSSAIMEMDRGDNELAWNFCMMDT-GFSPFLTDQMLA-----NENPIE--YPFLFNELA-FEDNIDFMFDGK-HECLNL-EN-----LDCG-----392
C.sativa   VNCCIDSSAIMEMDRGDNELAWNFCMMDS-GTFPFLTDQMLA-----NENPIE--YPFLFNELA-FEENIDFMFEKG-NECLGL-EN-----LDCCEV-----393
B.oleracea VTCCIDSS-----ESNELAWDFCMMDS-GFAPFLTDSNLS-----SENPIE--YPFLFNEMG-FEDNIDFMFEKG-QDCLSL-EN-----LDCDGV-----371
B.rapa     VTCCIDSS-----ESNELAWDFCMMDS-GFAPFLTDSNLS-----SENPIE--YPFLFNEMG-FEDNIDFMFEKG-QDCLSL-EN-----LDCDGV-----375
B.napus    VTCCIDSS-----ESNELAWDFCMMDS-GFAPFLTDSNLS-----SENPIE--YPFLFNEMG-FEDNIDFMFEKG-QDCLSL-EN-----LDCDGV-----375
T.arvense  VTCCIDSSAIMEMDRGDNELAWNFCMMDS-GFAPFLTDQMLA-----NENPIE--YPFLFNEMG-FEDNIDFMFEKG-TDCLSL-DN-----LDCDGV-----394
E.salsugineum VSCCIDSSAIMEMDRGDNELAWNFCMMDS-GFAPFLTDSNLS-----NENPIE--YPFLFNEMG-FEDNIDFMFEKG-TDCLSL-EN-----LDCDGV-----391
C.sinensis LPSMCMDA-SVMA-ATDEHELTWSFCLDTAVGLTPLT-PDPDP-----IGN--AGELPDLFNTGLFEDNIDFMFEVEEYSKYINENN-----HGGNDNYTG 406
J.curcas   HPPCMDA-SVMA-PIEHELTWSFCLDS--GLVPL-VPDLP-----LAN--GCELPDLDGTF-FEDNIDFLDACCYGNDA-----N-----385
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Z.mays      LDGWS-----GFG-----NMPSLQ-----: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
G.max      AGGRSMVYHHVNNKQKMLLS-----FASSSPSTTTTSSCDYALDL 426
G.soja     AGGSMHV-----DN-----KOKIVS-----FAS-----PSSTTTVSCDYALDL 409
A.thaliana VVGR-----ESPTS-----SSSPLSCLSTDSASSTTT-----TTTSSVSCNYLV-- 430
C.sativa   VVGR-----ESPTS-----SSSPLSCLSTDSASSTTTTATTSSVSCNYSV-- 434
B.oleracea VVGR-----ESPTLSLSSPLSCLSTDSASSTTTTATTSSVSCNYSV-- 413
B.rapa     VVGR-----ESPTLSLSSPLSCLSTDSASSTTT-----TTTSSVSCNYSV-- 415
B.napus    VVGR-----ESPTLSLSSPLSCLSTDSASSTTT-----TTTSSVSCNYSV-- 435
T.arvense  VVGR-----ESPTS-----SSSPLSCLSTDSASSTTTTATTSSVSCNYSV-- 432
E.salsugineum VVGR-----ESPTS-----SSSPLSCLSTDSASSTTTTATTSSVSCNYSV-- 432
C.sinensis NIEEEEEEDNGKLVPRLLSASSTSNASSPSSSTTTSSVSCNYSV-- 453
J.curcas   -----PADENGRE-----RLSS-----ASTSPSCSTTSSVSCNYSV-- 417
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

```

Figura 4.16 Alineamiento múltiple de la secuencia proteica deducida de WR11 de *Pennyces* con otras proteínas WR11. Los nombres y los números de acceso de las secuencias utilizadas en el análisis son: *Zea mays* (XP023156675.1), *Glycine max* (XP006585696.1), *Glycine soja* (KHN10130.1), *Arabidopsis thaliana* (NP001030857.1), *Camelina sativa* (XP010427124.1), *Brassica oleracea* (XP013600367.1), *Brassica rapa* (XP009103913.1), *Brassica napus* (ADO16346.1), *Eutrema salsugineum* (XP006403588.1), *Citrus sinensis* (XP_006471344.1) y *Jatropha curcas* (AEO22131.1).

En este caso, también se procedió a un análisis filogenético (Figura 4.17) del gen *TaWR11* con las 12 secuencias proteicas de WR11 utilizadas anteriormente en el alineamiento múltiple.

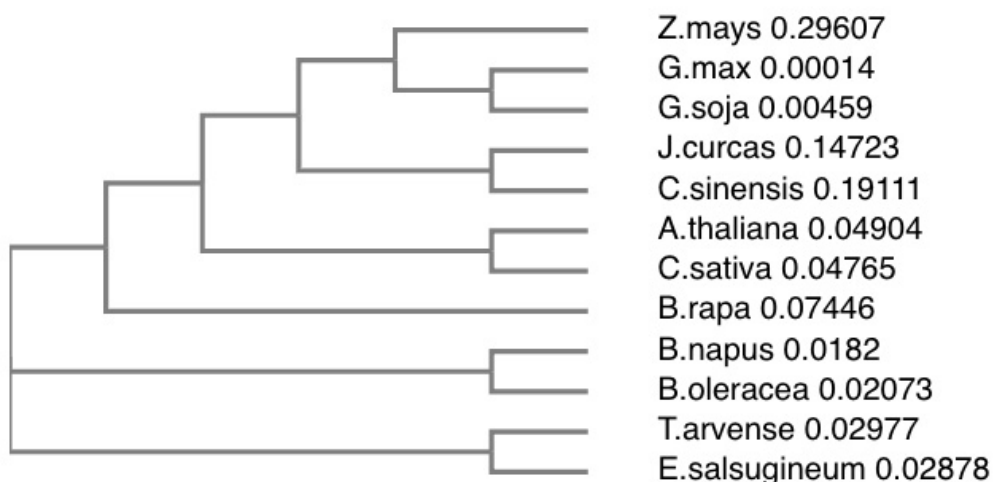


Figura 4.17 Árbol filogenético de proteínas WRI1 procedentes de diferentes especies de plantas, entre las cuales está la proteína WRI1 deducida de Pennycress. Los nombres y los números de accesoión de las secuencias utilizadas en el análisis son los mismos a los utilizados en la figura 4.16.

En este caso, el gen *TaWR11* parece que también tiene una tendencia a agruparse según su parentesco filogenético, al contrario de lo que ocurre con *TaFAE1* que parece agruparse según el contenido en aceite o en ácidos grasos de cadena larga. En este caso la identidad con el gen correspondiente de *Arabidopsis thaliana* es de 87%.

4.3.3. Análisis de la expresión de genes involucrados en la acumulación de ácido erúxico en las semillas de Pennycress durante su maduración.

Como primer paso para comprender el mecanismo molecular que controla la acumulación de aceite y ácido erúxico en las semillas de Pennycress, se monitorizó la expresión de varios genes que codifican enzimas participantes en ambos procesos.

Por una parte, se estableció el gen *TaFAE1* como primera diana, ya que codifica la elongasa de ácidos grasos y es responsable de la elongación de $18:1^{\Delta 13}$ -CoA a $20:1^{\Delta 13}$ -CoA y a su vez a $22:1^{\Delta 13}$. Por otra parte, el enzima microsomal desaturasa FAD2, cuya secuencia ya es conocida (número de accesoión Genbank: DQ518324.1), que utiliza como sustrato $18:1$ esterificado a la posición sn-2 de PC para la biosíntesis de $18:2$, fue la segunda elección. El estudio comparado de la expresión de ambos genes *TaFAE1* y *TaFAD2*, que codifica la desaturasa microsomal, puede ayudarnos a analizar, a nivel molecular, los cambios en el flujo de acilos entre la

elongación y la desaturación que parece tener lugar durante la maduración de la semilla, tal y como ha quedado reflejado en el estudio de la composición de los lípidos totales y de la fracción de TAG de ambas variedades. El gen *TaDGAT1*, responsable del último paso de la biosíntesis de triacilglicerol, y el gen *TaWR11*, elemento transcripcional regulador, también fueron incluidos en el análisis de la expresión génica.

A continuación, se analizó la expresión de estos genes mediante RT-PCR en ambas variedades y durante las diferentes etapas de maduración de las semillas. Los resultados se muestran en la figura 4.18.

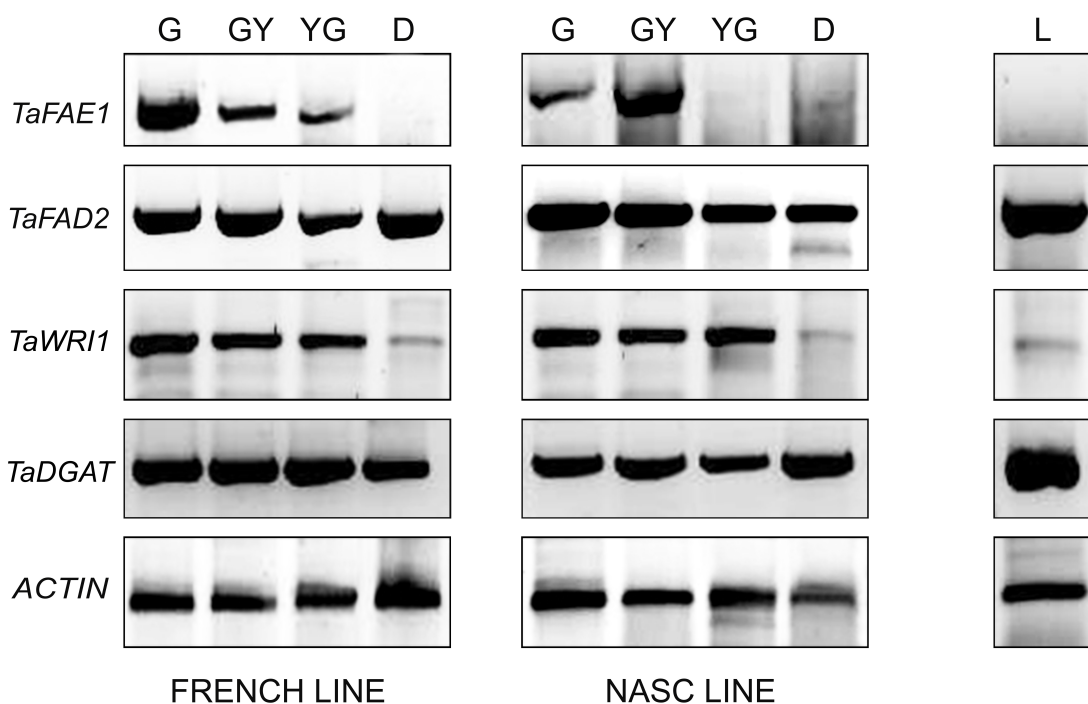


Figura 4.18 Expresión de los genes *TaFAE1*, *TaFAD2*, *TaDGAT1* and *TaWR11* durante la maduración de las semillas en ambas variedades de Pennycress en los diferentes estadios de desarrollo: G, semillas verdes, GY, semillas verde-amarillas, YG, semillas amarillo-verde y D, semillas secas. “L” muestra la expresión de los genes en las hojas. El gen actina (*ACTIN*) fue utilizado como gen constitutivo. Todas las PCRs fueron llevadas a cabo bajo condiciones no saturantes.

Los niveles de mRNA de *TaFAE1* fueron elevados en las primeras fases del desarrollo de las semillas en ambas variedades (G y GY), pero decrecían en las fases posteriores (YG y D). De hecho, el mRNA de *TaFAE1* fue indetectable en semillas procedentes de silicuas secas (D) tanto en la variedad NASC como en la variedad FRENCH. Tampoco fue detectado en hojas, lo cual

es consistente con el papel específico de FAE1 en semillas. Aunque el patrón de expresión fue muy similar en ambas variedades, las plantas FRENCH mostraron mayor acumulación de transcrito *TaFAE1* en semillas de silicuas verdes, mientras que las plantas NASC mostraron mayor cantidad de transcrito en la fase verde-amarilla con menor mRNA en la verde. Sin embargo, el perfil de expresión del gen *TaFAE1* fue consistente con el análisis lipídico realizado y representado en las figuras 4.6 y 4.8, indicando que la elongasa actúa en las fases tempranas del desarrollo de la semilla sobre los reservorios de 18:1-CoA proporcionando rápidamente 22:1-CoA para su incorporación a la fracción de TAG. Este resultado es consistente con la presencia de mRNA de *TaDGATI* en las fases G o GY, indicando que el TAG es rápidamente sintetizado durante la maduración de la semilla. Puede apreciarse que no hay cambios en la expresión del gen *TaDGATI* durante la maduración en ambas variedades, lo que sugiere que su expresión está controlada principalmente de manera post-transcripcional. Este patrón de expresión de *DGATI* es consistente con lo publicado en *Arabidopsis* (Lu et al. 2003, Li et al. 2010), vernicia (Shockey et al., 2006) o ricino (Kroon et al., 2006). Todos estos resultados indican que cualquier incremento de la actividad de la enzima FAE1 resulta en un incremento de la cantidad de ácido erúico en las semillas, independientemente de la disponibilidad de los reservorios de acil-CoA. La composición de ácidos grasos de los lípidos totales (Tabla 4.3, figura 4.6, figura 4.7) y del triacilglicerol (Figura 4.8), así como el patrón de expresión del gen *FAE1* sugieren que la actividad elongasa de FAE1 es muy alta en las primeras fases del desarrollo de la semilla.

Nuestros datos indican que únicamente en la fracción de diacilglicerol tiene lugar un incremento del ácido graso 18:2 (Figura 4.9). Debido a que un aumento de la actividad elongasa puede provocar un cambio de flujo de los sustratos acilos hacia la elongación, propiciando que haya menos 18:1-CoA disponible para su incorporación a PC y, por tanto, para su desaturación por la desaturasa microsomal FAD2, se decidió monitorizar la expresión de *TaFAD2* durante la maduración de las semillas. Tal y como se muestra en la figura 4.18, los niveles de mRNA de *TaFAD2* permanecen inalterados durante todas las fases del desarrollo. Esta observación sugiere que la coordinación de la desaturasa durante la maduración también está controlada a nivel post-transcripcional.

Cuando se analizó la expresión de *TaWR11* se encontró un patrón de expresión similar a *TaFAE1* (Figura 4.18), una gran acumulación de mRNA de *TaWR11* en las fases tempranas del desarrollo de las semillas. Este resultado sugiere que, así como ocurre en *Arabidopsis*, el gen *TaWR11* es el mayor factor transcripcional que controla de biosíntesis de aceite en las semillas de Pennyress. Estos datos sugieren que tanto *TaWR11* como *TaFAE1* están fuertemente

controlados a nivel transcripcional en las semillas de Pennycress y que el propio *TaWRII* podría ser el factor transcripcional responsable de dicho control.

4.3.4. Análisis funcional del gen *TaFAE1* en plantas transgénicas de *A. thaliana*.

Para llevar a cabo el estudio funcional de la enzima elongasa FAE1 de Pennycress, se generaron líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* en las que se introdujo el gen *TaFAE1* bajo el control del promotor OLE2, específico de la expresión en semillas. La transformación se realizó en plantas de *A. thaliana* silvestres (ecotipo Columbia o Col0) y en plantas mutantes *fae1-1*, es decir, deficientes de la elongación de ácidos grasos. En las primeras, analizaremos el efecto de la elongasa de Pennycress aún en presencia de la elongasa endógena de *Arabidopsis* mientras que en el segundo caso toda la actividad elongasa provendría de Pennycress.

4.3.4.1. Caracterización genotípica del mutante de *A. thaliana fae1-1*.

El mutante de *A. thaliana fae1-1* inducido químicamente por EMS y procedente del NASC, fue caracterizado genética y fenotípicamente. Para verificar las mutaciones puntuales de *fae1-1*, se llevaron a cabo reacciones de PCR del gen *AtFAE1* a partir de gDNA. Las amplificaciones tuvieron lugar con normalidad, obteniéndose bandas de 1500 pb como era lo esperado. En este punto, se decidió secuenciar el gen *AtFAE1* en este mutante y se encontraron algunas mutaciones puntuales y un codón prematuro de finalización de la traducción (Figura 4.19). En el nucleótido 143 de la secuencia de gDNA del gen *AtFAE1* se encontró un cambio de timina (T) por cisteína (C), lo que resultó en un cambio de leucina (L) por fenilalanina (P). En el nucleótido 302 se observó el mismo cambio de nucleótido, apareciendo treonina (T) en el lugar de isoleucina (I). También hubo una modificación en el nucleótido 302, de adenina (A) por guanina (G), que provocó la mutación de ácido glutámico por glicina. En la posición 848 se observó que había tenido lugar una delección causante de un cambio en el marco de lectura y, a su vez, causante de la aparición de un codón STOP prematuro en la posición 884. Esta mutación daría lugar finalmente a una proteína truncada. Todas las mutaciones puntuales encontradas eran homocigotas.

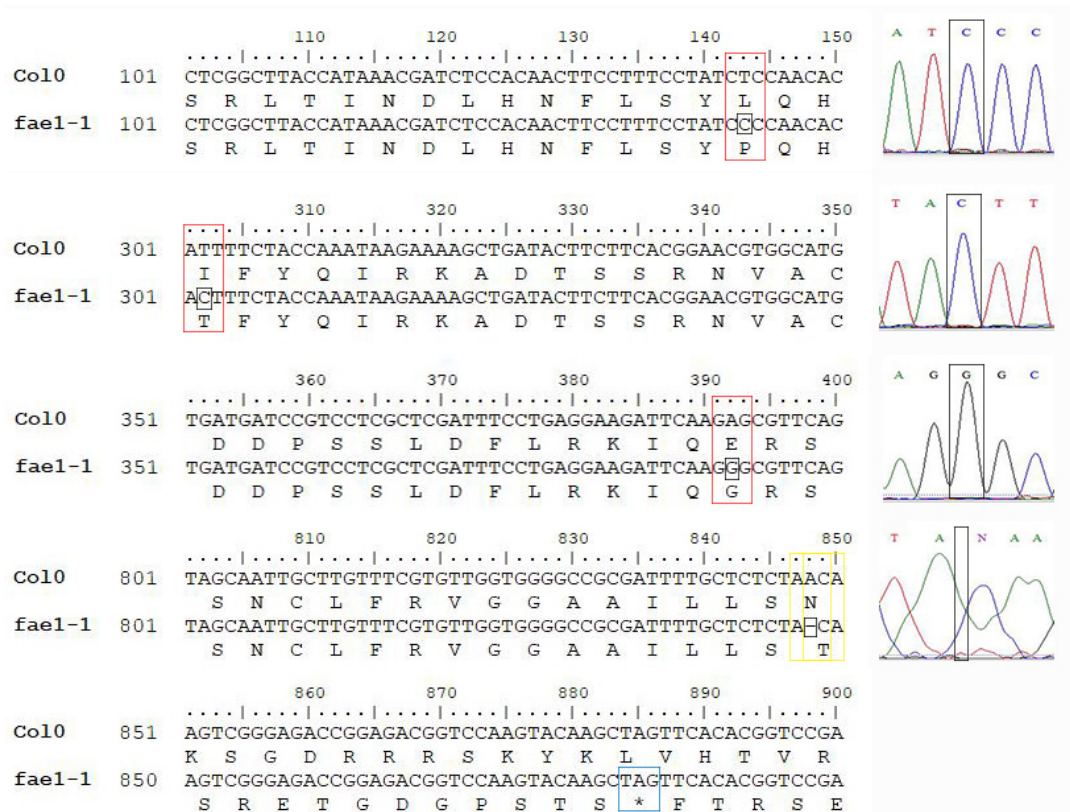


Figura 4.19 Caracterización genotípica del mutante *fae1-1* de *Arabidopsis thaliana*. En la imagen se muestra el alineamiento de las secuencias de gDNA del gen FAE1 de la variedad Col0 y *fae1-1*. Marcado en color rojo se muestran los cambios nucleotídicos que provocan cambio de aminoácido; en color amarillo se muestra una delección causante del cambio de marco de lectura; y en color azul la aparición de un codón STOP prematuro. También se muestran los cromatogramas de las mutaciones puntuales encontradas.

4.3.4.2. Caracterización fenotípica del mutante de *A. thaliana fae1-1*.

En cuanto a la caracterización fenotípica del mutante *fae1-1*, no se observaron deficiencias en la germinación de las semillas ya que germinaron todas las que fueron sembradas en placa MS. Sin embargo, transcurridos 10 días desde la siembra se observó que las plantas emergentes mostraban un tamaño considerablemente inferior a las plantas Col0 (Figura 4.20 A). Después de 12 días tras la siembra en placa, las plántulas Col0 presentaban un mayor crecimiento y vigor con respecto a la imagen obtenida a los 10 días, en cambio, las plántulas *fae1-1* se habían desarrollado mínimamente desde entonces (Figura 4.20 B). Una vez se cumplieron los 20 días, algunas de las plantas mutantes *fae1-1* mostraban un color amarillento, característico de la

clorosis, y un tamaño notablemente inferior a las plantas silvestres, tanto a nivel de las hojas como de las raíces (Figura 4.20 C), lo cual pone de manifiesto la relación entre ciertas alteraciones en la composición de ácidos grasos y ciertas alteraciones morfológicas. En este caso concreto se había descrito que la sobreexpresión de *FAE1* en *Arabidopsis* provocaba plantas más grandes, pero no había datos acerca del efecto fenotípico de la eliminación del gen *FAE1*.

Al trasplantar las plántulas a maceta, las plantas *fae1-1* de *A. thaliana* que mostraban una apariencia saludable se desarrollaron, produciendo flores y semillas, aunque de una manera significativamente inferior a las plantas silvestres Col0. Las plantas mutantes mostraban similar número de tallos por planta, sin embargo, la altura de estos era aproximadamente la mitad de longitud y, por tanto, el número de silicuas y semillas resultantes fue muy reducido con respecto a las plantas silvestres, tal y como puede observarse en la figura 4.20 D.

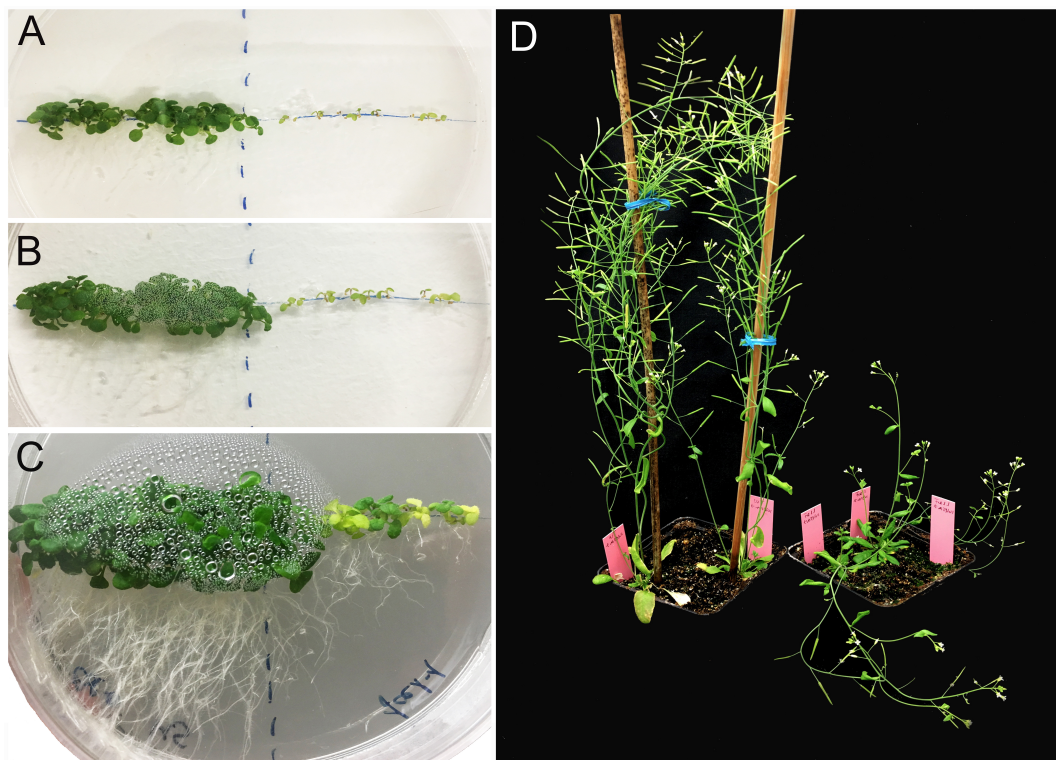


Figura 4.20 Comparación de las plantas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 y del mutante deficiente *fae1-1*. A. Germinación en placa MS tras 10 días de la siembra. B. Germinación en placa MS tras 12 días de la siembra. C. Germinación en placa MS tras 20 días de la siembra. D. Crecimiento en sustrato. Las fotos muestran una considerable diferencia de tamaño entre las plantas Col-0 y las mutantes *fae1-1*.

4.3.4.3. Composición de ácidos grasos del aceite de semillas del mutante *fae1-1* de *A. thaliana*.

Para continuar con la caracterización del mutante *fae1-1* se analizó la composición de ácidos grasos de los lípidos totales y se comparó con la de la variedad Col-0, tal y como se observa en la figura 4.21.

Los mutantes deficientes en la elongación de ácidos grasos contenían únicamente un 0,4% de ácido graso eicosenoico (20:1), 53 veces menos que la variedad silvestre de *A. thaliana* que mostró un 21,23%. En cuanto al ácido graso erúxico, la variedad mutante mostró una reducción de 70 veces con respecto a Col0 con un contenido ínfimo de 0,04% de 22:1 frente a un 2,79% en Col0. La síntesis de 20:0 también se vio reducida en el mutante, aunque el efecto fue menos dramático que en los ácidos grasos monoinsaturados anteriormente citados. De esta manera, se determinó que la composición de ácidos grasos del aceite de las semillas del mutante *fae1-1* estaba desprovista prácticamente de ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA), como ácido eicosenoico (20:1) y erúxico (22:1). Por el contrario, el ácido graso oleico (18:1), sustrato del enzima FAE1, se acumuló considerablemente en la variedad mutante aumentando en más del doble (22,13%) con respecto a la silvestre (11,7%). También se observó cierto incremento en los ácidos grasos poliinsaturados linoleico (18:2) y linolénico (18:3) en la variedad mutante con respecto a Col0. Estos resultados son similares a los ya existentes en la literatura (Lemieux et al., 1990; Katavic et al. 1995).

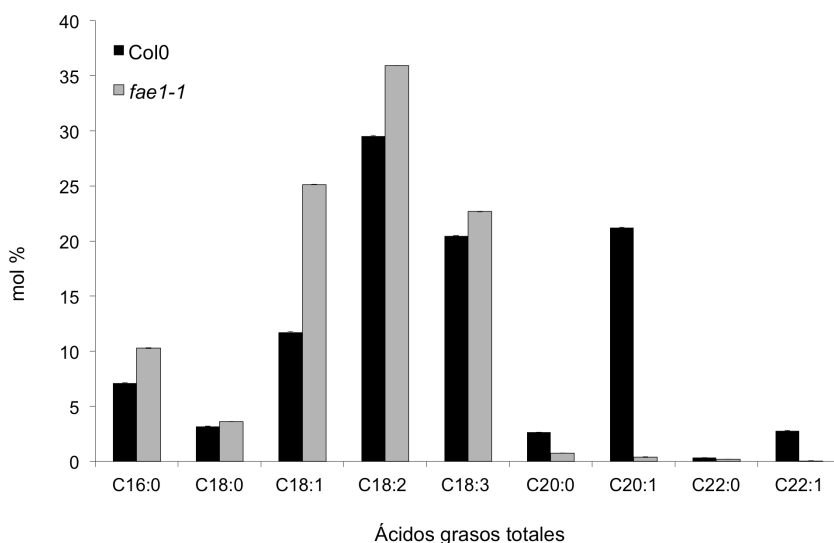


Figura 4.21 Composición de ácidos grasos del aceite de semillas de las variedades de *Arabidopsis thaliana* Col-0 y *fae1-1*. La composición de ácidos grasos está expresada en porcentaje molar (mol %). Los datos proceden de la media de dos repeticiones biológicas.

Para investigar con más detalle el efecto de la inactivación del gen *AtFAEI*, se separaron las diferentes fracciones lipídicas (triacilglicerol, diacilglicerol y lípidos polares) mediante cromatografía en capa fina (TLC) y se determinó su composición de ácidos grasos mediante cromatografía de gases (GC), tanto en la variedad Col-0 como en la mutante *fae1-1*.

En cuanto a la distribución de ácidos grasos en la fracción de triacilglicerol del aceite de las semillas, en la figura 4.22 se puede observar que en ambas variedades de *Arabidopsis* se da una tendencia muy similar a la composición de ácidos grasos totales. En la variedad mutante se observa un aumento muy significativo de 18:1 en TAG (33%) con respecto a Col0 (13%). Por el contrario, el contenido en 20:1 en TAG en la variedad silvestre es de 23% con respecto a 0,5% en *fae1-1*. El contenido en 22:1 en TAG también fue superior en Col0 (3%) con respecto a la variedad mutante (0,2%).

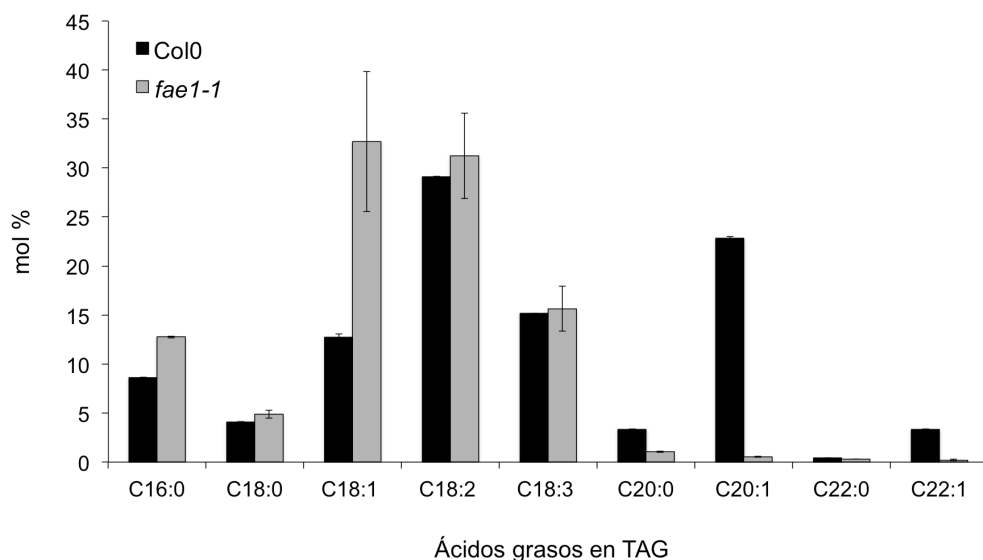


Figura 4.22 Composición de ácidos grasos de la fracción lipídica de TAG en semillas de las variedades de *Arabidopsis thaliana* Col-0 y *fae1-1*. La composición de ácidos grasos está expresada en porcentaje molar (mol %). Los datos proceden de la media de dos repeticiones biológicas.

4.3.4.4. Caracterización genotípica y fenotípica de las líneas transgénicas Col0 y *fae1-1* de *A. thaliana*.

Una vez caracterizado el mutante *fae1-1* de *A. thaliana*, se generaron líneas estables transgénicas de *A. thaliana* Col0 y *fae1-1* que sobreexpresaban, bajo control del promotor específico de semillas OLE2, el gen *TaFAE1* de Pennycress. Las plantas transformadas fueron cultivadas con normalidad hasta la recolección de las semillas. Las distintas líneas fueron segregadas mediante crecimiento en un medio selectivo (glufosinato de amonio), hasta la obtención de una generación T3 homocigota, tal y como se ha explicado en el apartado 3.3.3 de Materiales y Métodos. En primer lugar, se seleccionaron plantas de la generación T1 a partir de las plantas transformadas, obteniéndose un porcentaje de plantas resistentes al glufosinato de amonio de 1-4%. Por el contrario, al seleccionar posteriormente las líneas T2 se observó una alta resistencia al herbicida, comprendida entre 84-100%. Finalmente, la resistencia mostrada por las líneas homocigotas T3 procedentes de plantas Col0 fue 69-100%. Sin embargo, en las líneas transgénicas procedentes del mutante *fae1-1* se obtuvieron unos porcentajes de resistencia mucho menor a lo esperado, probablemente por una mala segregación del transgen. Los datos de segregación pueden observarse en la tabla 4.4.

Línea de origen	Plantas resistentes	Semillas totales	% plantas resistentes	Plantas resultantes resistentes al trasplante
Col0_control	0	100	0	
fae1-1_control	0	100	0	

Segregación generaciones pFGC5941-proOLE2- <i>TaFAE1</i>					
Col0_T0					Col0_T1
Col0_T0_7	1	100	1	1	7.1
Col0_T0_8	4	100	4	2	8.1, 8.2
fae1-1_T0					fae1-1_T1
fae1-1_T0_4	6	200	3	4	4.1, 4.2, 4.3, 4.4
Col0_T1					Col0_T2
Col0_T1_7.1	100	100	100	4 → 1	7.1.1
Col0_T1_8.1	100	100	100	4 → 2	8.1.1, 8.1.2
Col0_T1_8.2	100	100	100	4 → 2	8.2.1, 8.2.2

fae1-1_T1					fae1-1_T2
fae1-1_T1_4.1	5	100	5	3	4.1.1*, 4.1.2*, 4.1.3*
fae1-1_T1_4.3	87	100	87	4 → 2	4.3.1 ⁺
fae1-1_T1_4.4	84	100	84	4 → 2	4.4.1 ⁺
Col0_T2					Col0_T3
Col0_T2_7.1.1	87	100	87	4 → 3	7.1.1.1, 7.1.1.2, 7.1.1.4
Col0_T2_8.1.1	96	100	96	4 → 4	8.1.1.1, 8.1.1.2, 8.1.1.3, 8.1.1.4
Col0_T2_8.1.2	75	100	75	4 → 4	8.1.2.1, 8.1.2.2, 8.1.2.3, 8.1.2.4
Col0_T2_8.2.1	72	100	72	4 → 4	8.2.1.1, 8.2.1.2, 8.2.1.3, 8.2.1.4
Col0_T2_8.2.2	69	100	69	4 → 4	8.2.2.1, 8.2.2.2, 8.2.2.3, 8.2.2.4
fae1-1_T2					fae1-1_T3
fae1-1_T2_4.1.1*	3	100	3	3	4.1.1.1, 4.1.1.2, 4.1.1.3
fae1-1_T2_4.1.2*	4	67	16,75	3	4.1.2.1, 4.1.2.2, 4.1.2.3
fae1-1_T2_4.1.3*	3	100	3	3	4.1.3.1, 4.1.3.2, 4.1.3.3

Tabla 4.4 Segregación de las generaciones T1, T2 y T3 de tres líneas transgénicas independientes transformadas con pFGC5941-proOLE2-*TaFAE1* (Col0_7, Col0_8 y fae1-1_4). La segregación se realizó mediante medida de la resistencia a glufosinato de amonio. Líneas* en las que se obtuvo un porcentaje de resistencia mucho menor de lo esperado. Líneas⁺ que no sobrevivieron al segregar para obtener líneas T3.

Una vez se obtuvieron las líneas estables homocigotas T3 se procedió al genotipado de las mismas utilizando oligonucleótidos que amplificaban el gen codificante de la resistencia al glufosinato de amonio. Todas las líneas T3 analizadas resultaron ser positivas, tal y como se muestra en la tabla 4.5. Además se analizaron los fenotipos de dichas plantas de la generación T3 y se obtuvieron tres tipos diferentes de porte de la planta: tipo normal, intermedio y tipo *fae1-1*.

Generación T3 pFGC5941-proOLE2-TaFAE1

Col0_T3	Genotipo	Fenotipo	fae1-1_T3	Genotipo	Fenotipo
					Normal
7.1.1.1	+	Intermedio	4.1.1.1	+	
7.1.1.2	+	Intermedio	4.1.1.2	+	Normal
7.1.1.4	+	Normal	4.1.1.3	+	Normal
8.1.1.1	+	Normal	4.1.2.1	+	Medio
8.1.1.2	+	Normal	4.1.2.3	+	Normal
8.1.1.3	+	Intermedio	4.1.3.1	+	Normal
					/Intermedio
8.1.1.4	+	Normal	4.1.3.2	+	Normal
					/Intermedio
8.1.2.1	+	Normal	4.1.3.3	+	<i>fae1-1</i>
8.1.2.2	+	Normal			
8.1.2.3	+	Normal			
8.1.2.4	+	Normal			
8.2.1.1	+	Normal			
8.2.1.2	+	Normal			
8.2.1.3	+	Normal			
8.2.1.4	+	Normal			
8.2.2.1	+	Normal			
8.2.2.2	+	<i>fae1-1</i>			
8.2.2.3	+	Intermedio			
8.2.2.4	+	Intermedio			

Tabla 4.5 Líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* de la generación T3, silvestres Col0 y mutantes *fae1-1*, positivas en el genotipado para el constructo pFGC5941-proOLE2-TaFAE1. En cada línea se indica el fenotipo mostrado: tipo normal, intermedio y tipo *fae1-1*.

En la figura 4.23 pueden observarse las diferencias entre los tres tipos de fenotipo establecidos para las plantas transgénicas *TaFAE1*. Las plantas tipo Col0 (Figura 4.23 A) muestran el máximo tamaño de porte, número de ramificaciones de los tallos, de silicuas y de flores. La

mayoría de las plantas Col0 transgénicas mostraron este fenotipo y, también algunas plantas *fae1-1* como 4.1.1.1, 4.1.1.2, 4.1.1.3 y 4.1.2.3, sugiriendo que tuvo lugar una restauración del fenotipo al introducir el gen de la enzima elongasa de Pennycress. Las plantas que presentaron el fenotipo de tipo *fae1-1* (Figura 4.23 C) mostraron el mínimo tamaño de porte, número de ramificaciones, silicuas y flores. La planta Col0 8.2.2.2 y la planta *fae1-1* 4.1.3.3 mostraron este fenotipo. Además, pudo observarse un fenotipo intermedio entre los dos ya mencionados (Figura 4.23 B). Este fenotipo lo mostraron algunas plantas Col0 (7.1.1.1, 7.1.1.2, 8.1.1.3, 8.2.2.3, 8.2.2.4) y *fae1-1* (4.1.3.1 y 4.1.3.2).



Figura 4.23 Tipos de fenotipos observados en las plantas transgénicas *Arabidopsis thaliana* de la generación T3. A. Tipo normal. B. Tipo intermedio. C. Tipo *fae1-1*.

4.3.4.5. Composición de ácidos grasos del aceite de semillas de las líneas transgénicas Col0 y *fae1-1* de *A. thaliana*.

Una vez en disposición de las líneas transgénicas T3 Col0 y *fae1-1* expresando el gen *TaFAE1* bajo el control del promotor OLE2, se comprobó si la transformación con el gen de la enzima elongasa de Pennycress tuvo efectos a nivel metabólico. Para ello y en primer lugar, se analizó la composición de ácidos grasos del aceite de las semillas de varias líneas transgénicas y se comparó con los perfiles de los controles sin transformar, tal y como se muestra en la figura 4.24.

Se analizó la composición de ácidos grasos de cuatro líneas transgénicas Col0. No se observaron grandes diferencias en cuanto al contenido del ácido graso oleico (18:1) y linoleico (18:2). En cuanto al ácido linolénico (18:3), si que se observó cierta reducción en la línea 7.1.1.4 (18%) con respecto a Col0 (20,5%). Las líneas 7.1.1.4 y 8.1.1.1 mostraron una ligera reducción de ácido eicosenoico (20:1) (17,5 y 18%, respectivamente) con respecto al control (21%) y también con respecto a las líneas 8.2.1.1 y 8.2.2.1 (21%). Lo que sugirió que en 7.1.1.4 y 8.1.1.1, la enzima FAE1 de Pennycress está actuando utilizando el 20:1 para elongarlo y producir 22:1. De hecho, en ambas líneas el contenido en ácido erúxico (22:1) experimentó un aumento (8,5% en 7.1.1.4 y 7,5% en 8.1.1.1) con respecto a Col0, 8.2.1.1 y 8.2.2.1 (3%); un aumento de 3 veces más en la línea 7.1.1.4 y 2,7 en 8.1.1.1.

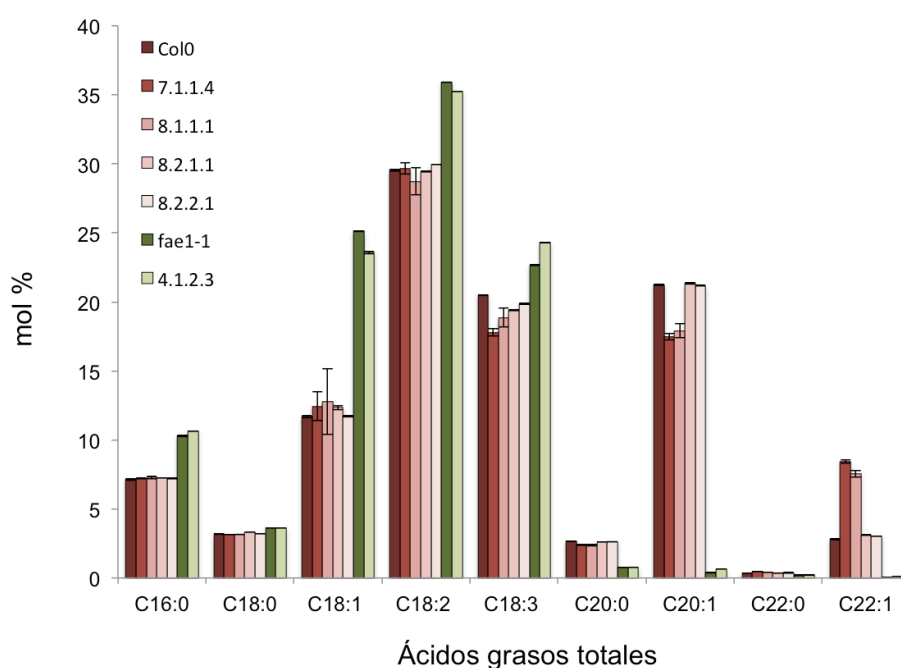


Figura 4.24 Composición de ácidos grasos del aceite de semillas de las líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 7.1.1.4, 8.1.1.1, 8.2.1.1 y 8.2.2.1; y de *fae1-1* 4.1.2.3. También se muestra la composición de los controles Col0 y *fae1-1* anteriormente mostrada en la figura 4.21. La composición de ácidos grasos está expresada en porcentaje molar (mol %). Los datos proceden de la media de dos repeticiones biológicas.

Para ahondar en el efecto de la transformación con el gen *TaFAE1*, también se separaron las diferentes fracciones lipídicas (triacilglicerol, diacilglicerol y lípidos polares) en algunas líneas transgénicas, tanto en la variedad Col-0 como en la mutante *fae1-1*.

La distribución de ácidos grasos en la fracción de triacilglicerol del aceite de las semillas de las líneas 7.1.1.4 y 4.1.2.3 se muestran en la figura 4.25. El TAG de la línea transgénica 7.1.1.4 experimenta un ligero aumento en su contenido en ácido oleico (15%) con respecto a Col0 (13%), en cambio, el contenido en ácido eicosenoico (20:1) en TAG se ve disminuido ligeramente en la línea transgénica (18% frente a 23% en Col0). La mayor diferencia se observa en el contenido en ácido erúrico (22:1) en TAG, de manera que en la línea 7.1.1.4 se observó un incremento de casi 3 veces mayor (9%) en comparación con Col0 (3,3%). Al analizar la composición de ácidos grasos del TAG de la línea transgénica mutante 4.1.2.3, se obtuvo una disminución en 18:1 (27% en 4.1.2.3 y 33% en *fae1-1*), un ligero aumento en 18:2 (33,5% frente a 31%) y en 18:3 (21% frente 16%). Los niveles de 20:1 en TAG no experimentaron variación (0,5% en ambos casos), mientras que los de 22:1 una ligera disminución (0,15% frente 0,21%).

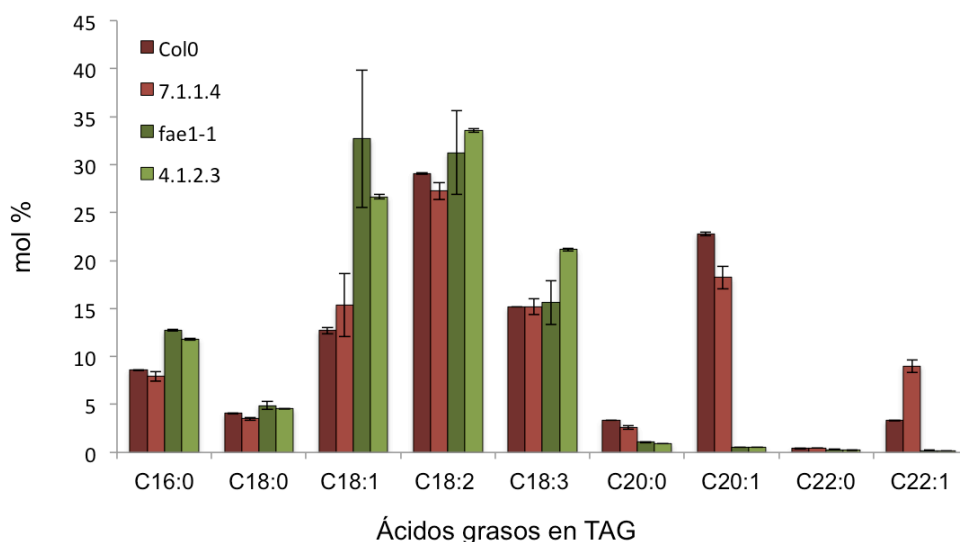


Figura 4.25 Composición de ácidos grasos del TAG del aceite de semillas de las líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 7.1.1.4 y de *fae1-1* 4.1.2.3. También se muestra la composición de los controles Col0 y *fae1-1* anteriormente mostrada en la figura 4.22. La composición de ácidos grasos está expresada en porcentaje molar (mol %). Los datos proceden de la media de dos repeticiones biológicas.

4.4 CARACTERIZACIÓN AGRONÓMICA DE PENNYCRESS EN ENSAYOS DE CAMPO.

Para los ensayos de campo, además de utilizarse las variedades europeas NASC y FRENCH, también se utilizaron dos variedades de origen norteamericano, la variedad BEECHER y ELIZABETH, que fueron adquiridas con posterioridad a las dos variedades europeas. La utilización de ambos tipos de germoplasma, con diferente origen geográfico, permitió llevar a cabo un estudio comparado del comportamiento agronómico de ambos tipos de variedades bajo las mismas condiciones de cultivo.

En la campaña 2015-2016 se utilizaron las variedades NASC y FRENCH, y también la variedad BEECHER. En la campaña 2016-2017, se utilizaron las variedades NASC, FRENCH, BEECHER y ELIZABETH. Estas dos últimas suministrada por el Dr. Phippen (Western Illinois University, USA). La variedad ELIZABETH se diferencia de BEECHER en su mayor porte en altura, tamaño (Tabla 4.7 y figura 4.28) y producción (Figura 4.35).

4.4.1. Número de plantas, altura alcanzada y tiempo de floración.

4.4.1.1. Campaña 2015-2016.

En la primera campaña, la siembra tuvo lugar el día 26 de octubre de 2015, fecha determinada por condiciones climáticas de luz, temperatura y precipitaciones. Tal y como ha sido explicado en el apartado 3.1.2.2 de Materiales y Métodos, la siembra fue realizada a diferentes densidades, siguiendo el esquema de la figura 3.4. Debido a la baja disponibilidad de semillas NASC y FRENCH, se sembraron dos parcelas de cada variedad a una densidad de 10 kg ha⁻¹ y con la semilla BEECHER se sembraron 40 parcelas, 20 a una densidad de 10 kg ha⁻¹ y las otras 20 a 15 kg ha⁻¹. El día 6 de noviembre ya comenzó a observarse emergencia, por tanto, aproximadamente 11 días después de la siembra. En las primeras etapas del cultivo se hizo un seguimiento del número de plantas por metro cuadrado y posteriormente de la altura de la planta, de la floración y de la maduración de la semilla, que queda reflejado en la tabla 4.6 y en la figura 4.26.

Variedad	Altura planta (cm)^a	Número plantas m⁻²	Fecha 100% floración
NASC-10	38,75	42	17/03/16
FRENCH-10	33,25	36	29/03/16
BEECHER-10	21,50	106	29/03/16
BEECHER-15	19,75	100	01/04/16

Tabla 4.6 Datos de altura de la planta (cm), número de plantas por superficie (m²) y fecha en la que tiene lugar la completa floración del cultivo, en las diferentes variedades de Pennycress y densidades de siembra utilizadas durante la campaña 2015-2016. El guión tras el nombre de la variedad indica la densidad de siembra utilizada (kg ha⁻¹). ^aDeterminada el día 17 de marzo de 2016.

Los datos de la tabla 4.6 revelan un menor establecimiento de plantas de las variedades europeas NASC y FRENCH que de la variedad estadounidense BEECHER, siendo esta más del doble. Por otro lado, la diferente densidad de siembra en BEECHER, 10 y 15 kg ha⁻¹, no pareció afectar finalmente al número de plantas establecidas, siendo mínima la diferencia en el número de plantas por unidad de superficie, 106 plantas a una densidad de 10 kg ha⁻¹ frente a 100 plantas a una densidad de 15 kg ha⁻¹.

Otro dato interesante observado en los ensayos de campo y gracias a las medidas de altura de la planta y de floración de la tabla 4.6, es que la variedad NASC se desarrolló y floreció más rápidamente que las otras dos variedades, alrededor de 2 semanas antes. Como ya se ha descrito en el apartado 4.1.3, el crecimiento temprano de las plantas NASC se repitió en cultivo en cámara bajo condiciones controladas, lo que sugiere que hay factores genéticos detrás de esta propiedad y puede estar relacionada con el carácter primaveral de la variedad. Por el contrario, y a pesar de que tuvo lugar un establecimiento de mayor número de plantas, las plantas BEECHER necesitaron más tiempo que las plantas europeas NASC y FRENCH para alcanzar la altura máxima, tal y como se puede apreciar en la gráfica de la figura 4.26.

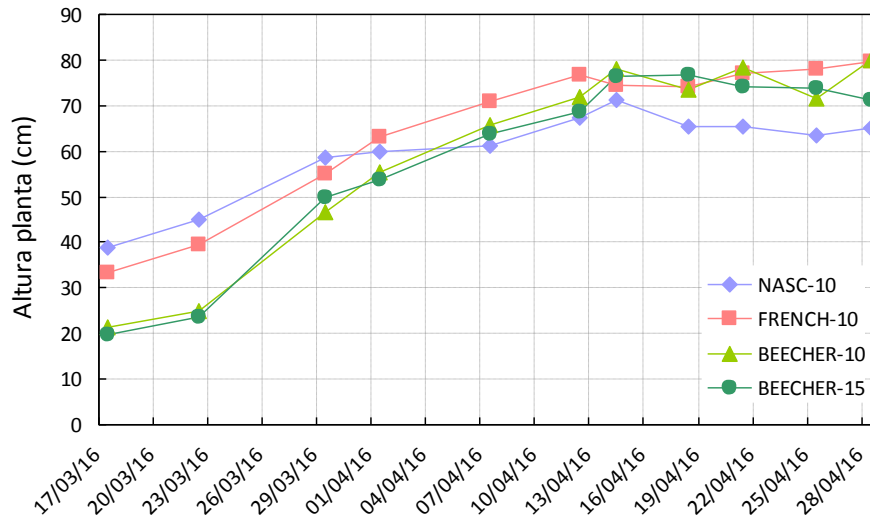


Figura 4.26 Crecimiento en altura de la planta (cm) durante el ciclo de cultivo de las diferentes variedades de Pennycress y densidades de siembra utilizadas durante la campaña 2015-2016. Medidas realizadas cada 3 días durante aproximadamente un mes.

En la siguiente figura, la figura 4.27, puede observarse la diferencia de altura de las plantas de las 3 variedades el día 23 de marzo de 2016, la fecha correspondiente al segundo punto en la gráfica de la figura 4.26. Las variedades NASC y FRENCH presentan una altura muy similar de entre 40-45 cm, en cambio, las plantas de la variedad BEECHER muestran una altura menor, de aproximadamente 25 cm.

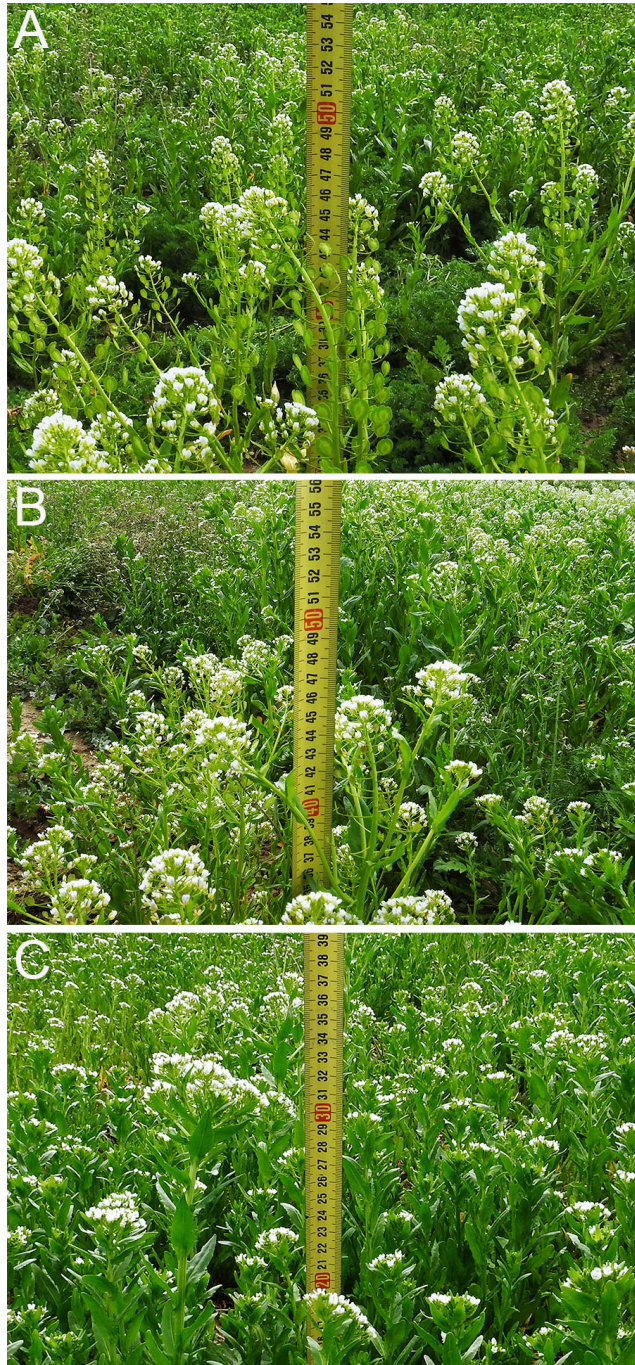


Figura 4.27 Altura alcanzada el día 23 de marzo de 2016 de las plantas Pennycress de la variedad NASC (A), FRENCH (B) y BEECHER (C).

4.4.1.2. Campaña 2016-2017.

Como ya se ha mencionado anteriormente, en la segunda campaña, se cultivó una cuarta variedad, la variedad norteamericana ELIZABETH. En el caso de las variedades europeas, también se partió de una pequeña cantidad de semilla que se propagó en la Estación Experimental de Aula Dei (EEAD-CSIC). En el caso de variedades norteamericanas, ésta fue la primera y la segunda campaña de cultivo en EEAD de ELIZABETH y de BEECHER, respectivamente.

La siembra tuvo lugar el 16 de noviembre de 2016, y se sembraron 12 parcelas de cada variedad a una densidad de 10 kg ha⁻¹. El día 11 de enero de 2017, casi dos meses tras la siembra, se empezó a apreciar emergencia, posiblemente porque el mes de diciembre fue frío y húmedo con muchas nieblas. De la misma manera que en la primera campaña, durante los primeros meses se realizó un seguimiento del número de plantas por unidad de superficie, de la altura alcanzada y del momento de la floración (Tabla 4.7 y figura 4.28).

Variedad	Altura planta (cm) ^a	Número plantas m ⁻² ^b	Fecha 100% floración
NASC	66,5	84	20/03/17
FRENCH	67,5	114	13/03/17
BEECHER	73,4	162	20/03/17
ELIZABETH	79,5	140	20/03/17

Tabla 4.7 Datos de altura de la planta (cm), número de plantas por superficie (m²) y fecha en la que tiene lugar la completa floración del cultivo, en las diferentes variedades de Pennycress durante la campaña 2016-2017. ^a Determinada el día 20 de febrero de 2016. ^b Máxima altura el 20 de abril de 2017.

Los datos de la tabla 4.7 revelan un menor establecimiento de plantas de variedades europeas, especialmente de NASC con aproximadamente la mitad de plantas que la BEECHER. Las curvas de crecimiento en altura de las plantas siguen una dinámica paralela en las cuatro variedades pero destaca la ELIZABETH por un mayor porte hasta el final del ciclo (Figura 4.28).

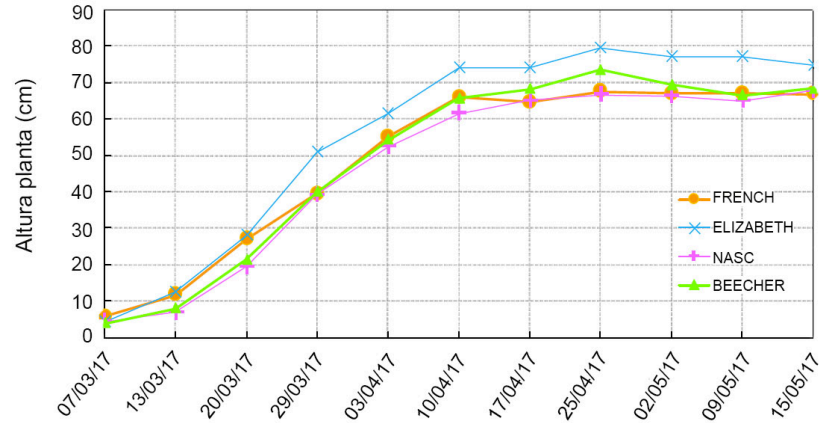


Figura 4.28 Crecimiento en altura de la planta (cm) durante el ciclo de cultivo de las diferentes variedades de Pennycress durante la campaña 2016-2017.

A diferencia de lo observado durante la campaña 2015-2016, la variedad NASC no mostró un desarrollo más temprano que el resto (Tabla 4.7 y figura 4.28). En todo caso, sería la variedad FRENCH la que floreció antes, aproximadamente una semana.

4.4.2. Aparición y maduración de silicuas y semillas.

4.4.2.1. Campaña 2015-2016.

Las diferencias encontradas en la primera campaña en el desarrollo de la planta también se detectaron durante la aparición y maduración de las silicuas. Las silicuas de las plantas NASC en la primera fecha de observación, el 18 de abril de 2016, ya presentaban un tono verde amarillento (green-yellow/GY), mientras que las silicuas de FRENCH y BEECHER continuaban completamente verdes (green/G). El día de la última observación, el 28 de abril, las silicuas NASC mostraban un color totalmente amarillo (yellow/Y), en las silicuas FRENCH predominaba el color amarillo con todavía resquicios verdes (yellow-green/YG) y en las BEECHER predominaba todavía el color verde (green-yellow/GY). Por lo tanto, la maduración de silicuas fue más temprana en las plantas de la variedad inglesa NASC y, por el contrario, más tardía en BEECHER, tal y como se observa en la tabla 4.8.

Variedad	Color de la silicua			
	18/04/16	21/04/16	25/04/16	28/04/16
NASC	GY	GY	YG	Y
FRENCH	G	G	GY	YG
BEECHER	G	G	G	GY

Tabla 4.8 Estimación de los estadios de maduración de la semilla a través del color de la cubierta de la silicua: verde/green (G), verde-amarillo/green-yellow (GY), amarillo-verde/yellow-green (YG) y amarillo/yellow (Y). Todas las observaciones van acompañadas de la fecha en la que fueron realizadas.

Además de observar los cambios en el color de la cubierta de las silicuas de las tres variedades, también se observó que había diferencias en el cambio de color, y por tanto de maduración, de las propias semillas, tal y como se observa en los datos de la tabla 4.9. De esta manera, el día 18 de mayo el 100% de las semillas de la variedad NASC ya habían adquirido el color marrón característico de las semillas secas. El 100% de las semillas FRENCH adquirieron este tono algo más tarde, el día 20 de mayo. Como era de suponer gracias a los datos ya obtenidos anteriormente, fueron las semillas de la variedad BEECHER las últimas en madurar, adquiriendo todas el color marrón el día 23 de mayo.

Variedad	% semillas secas					
	03/05/16	10/05/16	13/05/16	18/05/16	20/05/16	23/05/16
NASC	30	30	80	100	100	100
FRENCH	10	10	30	80	100	100
BEECHER	0	0	0	40	70	100

Tabla 4.9 Estimación del porcentaje de semillas secas en las diferentes variedades durante la campaña 2015-2016. Las observaciones van acompañadas de la fecha en la que fueron realizadas.

4.4.2.2. Campaña 2016-2017.

En la segunda campaña, la maduración de las semillas fue bastante simultánea en todas las variedades, siendo la variedad FRENCH la que mostró una maduración de semilla ligeramente más temprana que el resto. Esta observación también se realizó tanto en cuanto al cambio de color de la silicua (tabla 4.10) como a la aparición del totalidad de semillas secas (tabla 4.11).

Variedad	Color de la silicua				
	23/03/17	03/04/17	10/04/17	25/04/17	02/05/17
NASC	P	G	G	GY	Y
FRENCH	P	G	G	YG	Y
BEECHER	-	G ^b	G	GY	Y
ELIZABETH	P ^b	G	G	GY	Y

Tabla 4.10 Estimación de los estadios de maduración de la semilla a través del color de la cubierta de la silicua en la campaña 2016-2017: verde/green (G), verde-amarillo/green-yellow (GY), amarillo-verde/yellow-green (YG) y amarillo/yellow (Y). Todas las observaciones van acompañadas de la fecha en la que fueron realizadas.

^a P: Aparición de algunas silicuas. ^b Todavía en fase inicial.

Variedad	% semillas secas		
	09/05/17	15/05/17	23/05/17
NASC	52	93	100
FRENCH	58	95	100
BEECHER	43	94	100
ELIZABETH	58	94	100

Tabla 4.11 Estimación del porcentaje de semillas secas en las diferentes variedades durante la campaña 2016-2017. Las observaciones van acompañadas de la fecha en la que fueron realizadas.

4.4.3. Progresión del cultivo.

4.4.3.1. Campaña 2015-2016.

A continuación, se muestran algunas fotografías del seguimiento del cultivo de Pennycress a lo largo de la campaña 2015-2016. En la figura 4.29, aparecen las tres variedades el día 17 de marzo, fecha en la que las plantas ya habían emergido tras el invierno, y algunas ya estaban florecidas, las plantas de la variedad FRENCH y sobretodo NASC (Figura 4.29 C).



Figura 4.29 Cultivo de Pennycress el 17 de marzo. A. Cultivo de variedad BEECHER con una densidad de siembra de 10 kg ha⁻¹. B. Cultivo de variedad BEECHER con una densidad de siembra de 15 kg ha⁻¹. C. Cultivo de la variedad NASC (izquierda) y FRENCH (derecha); se observa una gran diferencia en la floración de ambas.

Una vez las plantas de las tres variedades habían florecido, se continuó con el seguimiento exhaustivo del cultivo. Como se observa en la figura 4.30, a finales del mes de marzo las plantas BEECHER ya presentaban flores y a mediados del mes de abril habían desaparecido. Un mes más tarde el cultivo ya presentaba un color amarillento, indicando que estaba listo para ser cosechado. Es importante señalar la presencia de malas hierbas en el interior del cultivo, lo cual supuso un problema al no disponer de un herbicida compatible con el cultivo. Del mismo modo, también se detectaron problemas con la presencia de hormigas, tanto en el momento de la siembra como en el de la cosecha, que pudo provocar pérdidas significativas de la producción.

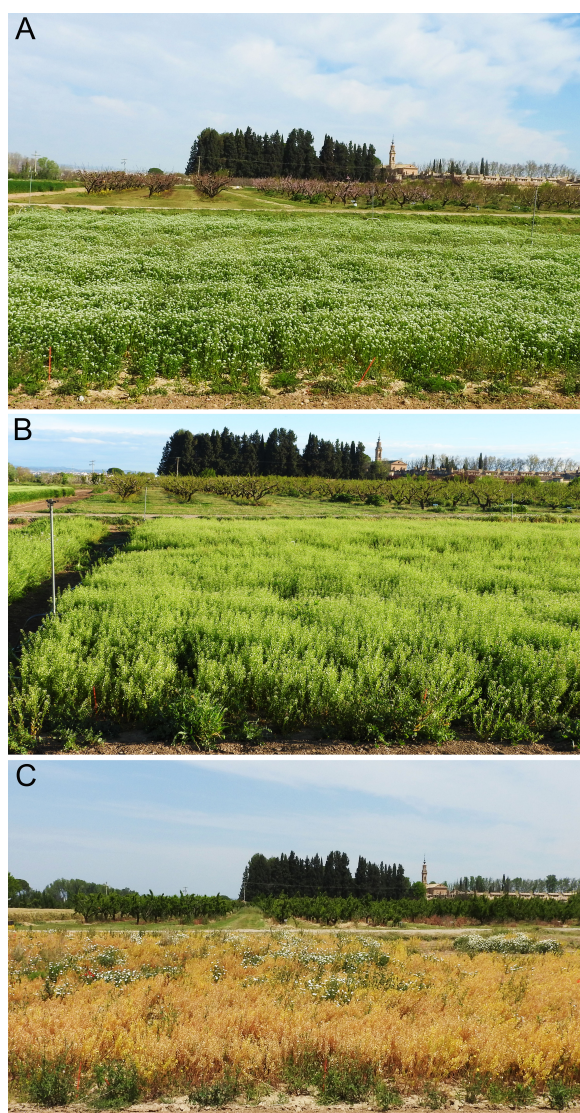


Figura 4.30 Progresión del cultivo de la variedad BEECHER de Pennycress (A) Plantas florecidas el día 30 de marzo. B. Foto del 13 de abril, momento en el que ya han desaparecido las flores (en las tres variedades). C. Foto del 18 de mayo, justo antes de la cosecha del cultivo y donde se aprecia claramente la presencia de malas hierbas (plantas verdes).

4.4.3.2. Campaña 2016-2017.

Las siguientes fotografías de la figura 4.31 muestran el seguimiento del cultivo de Pennycress a lo largo de la campaña 2016-2017.

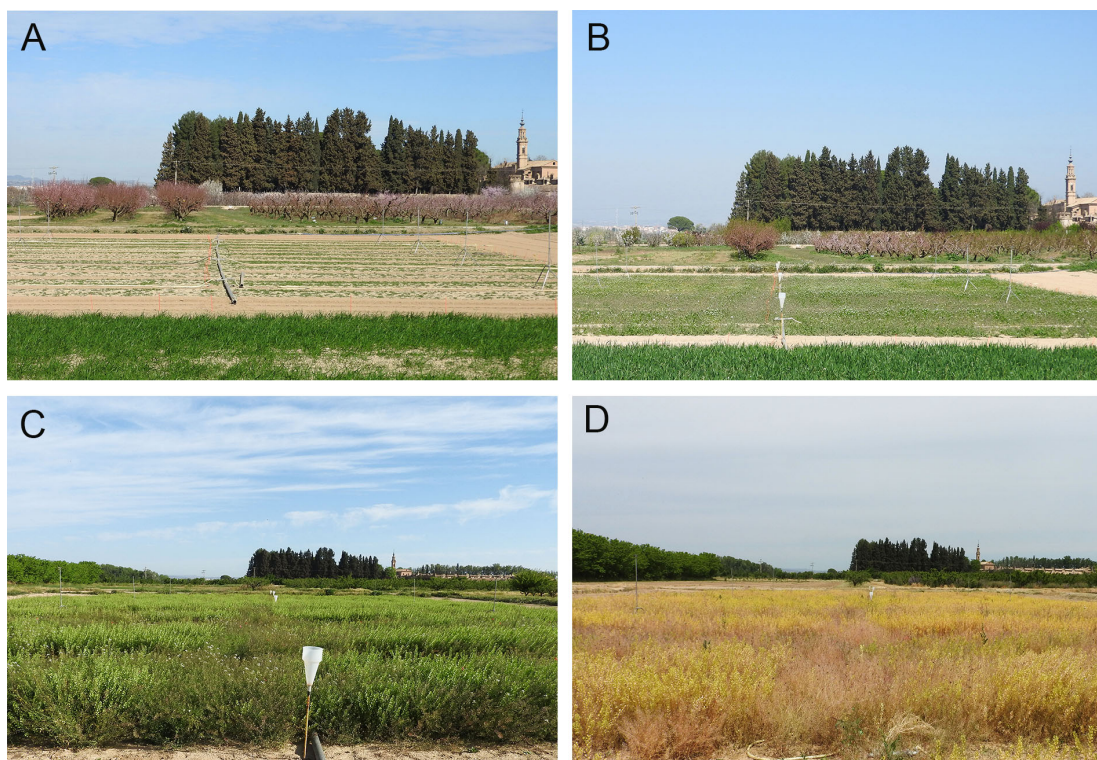


Figura 4.31 Progresión del cultivo de las 4 variedades de Pennycress en la campaña 2016-2017. A. Momento en que las plantas comienzan a crecer tras el paso del invierno, foto de 2 de marzo. B. Foto del 30 de marzo cuando el cultivo se observa en plena floración. C. Las flores ya han desaparecido y todas variedades muestran silicuas verdes, el día 17 de abril. D. El día 9 de mayo el cultivo ya está completamente amarillo y casi listo para ser cosechado.

4.4.3. Cosecha del cultivo.

4.4.3.1. Campaña 2015-2016.

Debido a la diferente fecha de maduración de cada variedad de Pennycress, la cosecha se llevó a cabo en tres días diferentes. Por un lado, las plantas NASC y FRENCH se cosecharon manualmente el 16 y 24 de mayo de 2016 (Figura 4.32 A), respectivamente. La cosecha fue manual debido a la escasa disponibilidad inicial de semillas y para evitar en la medida de lo posible pérdidas en la producción. El día 25 del mismo mes se cosechó la variedad BEECHER usando una cosechadora de ensayos, tal y como se muestra en la figura 4.32 C y 4.32 D.

En el transcurso de la cosecha de la variedad BEECHER, se probaron dos velocidades diferentes. En la cosecha de las plantas sembradas a una densidad de 10 kg ha⁻¹ se aumentó el número de revoluciones de la cosechadora con el fin de obtener una semilla más limpia y evitar el atascamiento de la cosechadora por la alta presencia de malas hierbas (Figura 4.32 B). No obstante, implicó una mayor pérdida de semilla, hecho que hay que tener en cuenta a la hora de comparar los datos de rendimiento de cultivo. Una vez cosechadas, las semillas resultantes se almacenaron en sacos de papel (Figura 4.32 E) y, posteriormente, se colocaron en bandejas para su secado. Por último, se realizaron tareas de limpieza de las semillas utilizando cribas manuales (Figura 4.32 F).



Figura 4.32 Detalles de la cosecha de Pennycress de la campaña 2015-2016. A. Cosecha manual de las variedades NASC y FRENCH. B. Cultivo de la variedad BEECHER con alta presencia de malas hierbas. C. Parte frontal de la cosechadora de ensayos utilizada para la cosecha de la variedad BEECHER. D. Parte trasera de la cosechadora de ensayos descartando el material vegetal inservible. Recolección de la semilla de Pennycress. E. Resultado de la cosecha de la variedad BEECHER. F. Tareas de limpieza de semilla de Pennycress utilizando una criba manual.

4.4.3.2. Campaña 2016-2017.

El día 22 de mayo de 2017 se cosecharon todas las parcelas con la misma cosechadora de ensayos que en la campaña anterior, tal y como se muestra en la figura 4.33. La cosecha se llevó a cabo sin ningún problema, manteniendo bajo y constante el número de revoluciones (velocidad de la cosecha) para no perder mucha semilla.

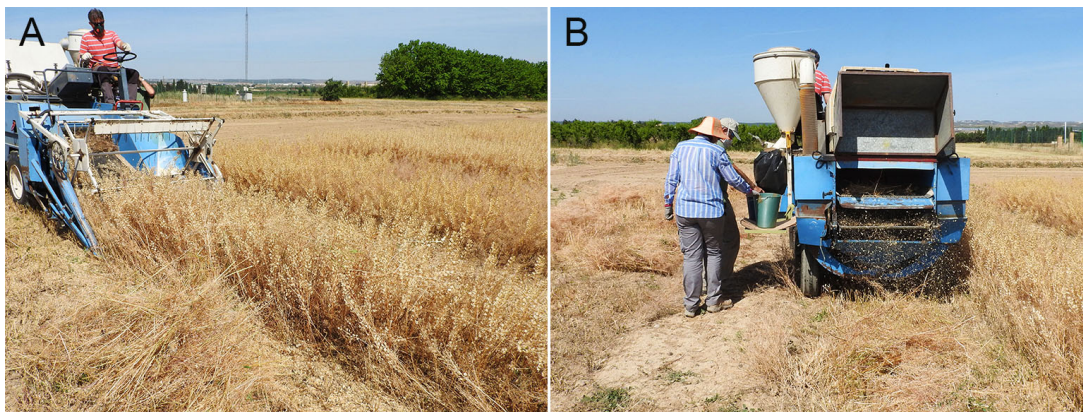


Figura 4.33 Detalles de la cosecha de Pennycress de la campaña 2016-2017. A. Parte frontal de la cosechadora de ensayos utilizada para la cosecha. B. Parte trasera de la cosechadora de ensayos descartando el material vegetal inservible.

4.4.4. Rendimiento del cultivo.

4.4.4.1. Campaña 2015-2016.

En cuanto al rendimiento de la cosecha y antes de realizar comparaciones entre variedades y densidades de siembra, debe tenerse en consideración que las variedades *NASC* y *FRENCH* se cosecharon a mano, método que supone una menor pérdida de semilla, y *BEECHER* con una cosechadora. También tenemos que tener presente que en el caso de *BEECHER*, hubo una mayor pérdida de semilla durante la cosecha de las plantas sembradas a menor densidad, debido al aumento de la velocidad o revoluciones de la cosechadora. En la figura 4.34 se muestran los datos de producción de semilla obtenidos en la campaña 2015-2016.

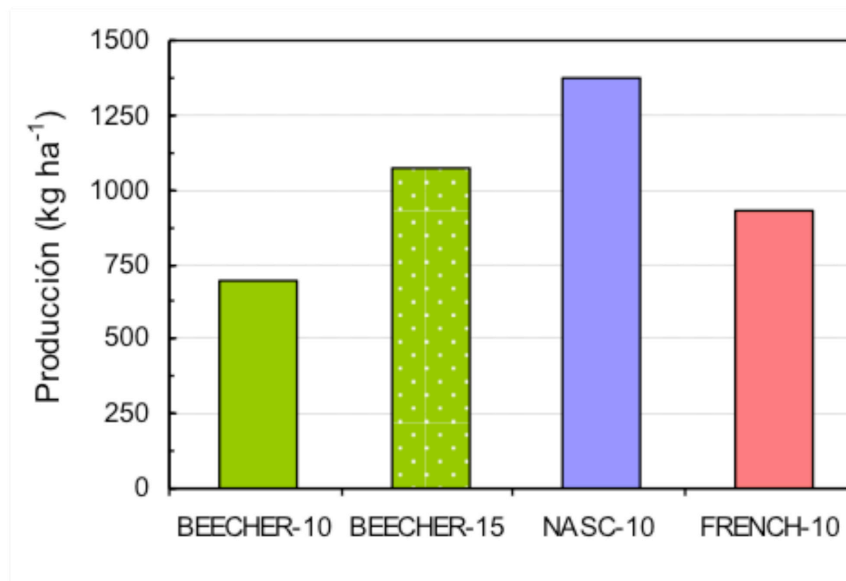


Figura 4.34 Producción de semilla de Pennycress según la variedad y la densidad de siembra (10 y 15 kg ha⁻¹).

Tal y como se observa en la figura 4.34, la variedad BEECHER sembrada a una densidad de 10 kg ha⁻¹ tuvo un rendimiento de casi 700 kg ha⁻¹ y sembrada a una densidad de 15 kg ha⁻¹ alrededor de 1060 kg ha⁻¹, por tanto, la mayor densidad de siembra, junto con la menor velocidad de cosecha, supuso un incremento en rendimiento de un 54%. Por otro lado, la cosecha de la variedad NASC sembrada a una densidad de 10 kg ha⁻¹ produjo 1375 kg ha⁻¹, y la variedad FRENCH sembrada a la misma densidad, 940 kg ha⁻¹. Por tanto, la variedad NASC fue la más productiva con un rendimiento medio de aproximadamente un 50% mayor que FRENCH y BEECHER.

Los datos de rendimiento de cultivo de Pennycress obtenidos en este ensayo fueron muy similares a los descritos en las experiencias de cultivo en USA (Moser et al., 2012), que establecen un rendimiento para variedades no domesticadas o silvestres en el rango de 1120-2240 kg ha⁻¹, dependiendo de localizaciones y campañas, y estimando un rendimiento medio de 1345 kg ha⁻¹.

Llama la atención la menor producción de la variedad BEECHER con respecto a las otras dos variedades, especialmente con respecto a NASC, ya que el establecimiento de plantas fue significativamente más del doble (tabla 4.6). Este hecho seguramente es debido a la diferente forma de cosechar la semilla, tal y como se ha explicado anteriormente, pero también puede deberse a una estrategia del cultivo de las variedades NASC y FRENCH, compensando el menor número de plantas por metro cuadrado con un mayor ahijamiento, con una mayor

producción de inflorescencias y/o de semillas, etc. Así, aunque se trata de datos muy puntuales, los valores de ahijamiento y de inflorescencia que hemos registrado, podrían confirmar este hecho, tal y como se muestra en la tabla 4.12.

Variedad	% plantas con ahijamiento	Hijuelos planta⁻¹	Inflorescencias planta⁻¹ ^a
NASC-10	100	6-9	6-7
FRENCH-10	80	6-9	6
BEECHER-10	100	5-6	4-6
BEECHER-15	80	4-6	5-6

Tabla 4.12 Producción de hijuelos e inflorescencias de plantas de Pennycress según variedades y densidades de siembra. Las determinaciones se han realizado sobre un conjunto de 10 plantas.

^aIncluyendo el tallo principal.

4.4.4.2, Campaña 2016-2017.

En la figura 4.35 se muestran los datos de producción de semilla obtenidos en la campaña 2016-2017. Las cifras, comprendidas en un rango de 510-740 kg ha⁻¹, son inferiores a las de la campaña anterior (700-1400 kg ha⁻¹) lo que puede explicarse por las condiciones climáticas ya que en el momento de la nascencia hubo muchas nieblas y, debido a unas intensas lluvias, el suelo estuvo algo encharcado, lo que posiblemente explique el menor establecimiento del cultivo con respecto a la campaña anterior. Asimismo, en primavera las lluvias fueron más escasas que en la primavera anterior.

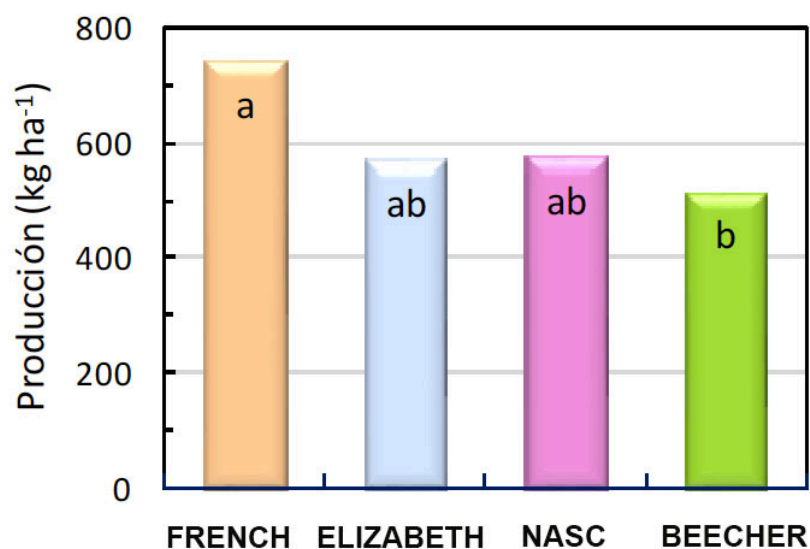


Figura 4.35 Producción de semilla de Pennycress según variedad. Letras diferentes entre variedades indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

La variedad FRENCH destacó por una producción un 30-40% superior que el resto aunque sólo se diferenció estadísticamente de la variedad BEECHER ($P < 0.05$). En esta comparación hay que tener en cuenta que hay un efecto bloque con una producción significativamente mayor en el Bloque II que en el resto (Figura 4.36). Quizá, este efecto sea debido a un riego desigual o a un diferente ataque de hormigas.

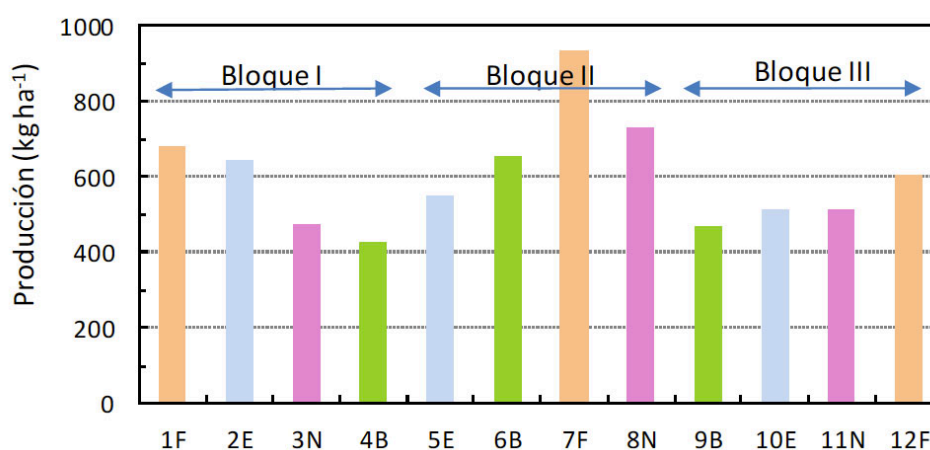


Figura 4.36 Producción de semilla de Pennycress según variedad y bloque experimental.

Del mismo modo que en la campaña anterior, no se observa una relación directa entre el número de plantas y la producción de semilla (tabla 4.7 y figura 4.35). En esta segunda campaña, las mismas condiciones de ensayo y de manejo en las cuatro variedades permiten afirmar que se

debe a una estrategia del cultivo y, así, el menor establecimiento del cultivo de las variedades europeas (especialmente de NASC), se compensa con un mayor número de hijuelos, inflorescencias y/o semillas (Tabla 4.13).

Variedad	% plantas con ahijamiento	Hijuelos planta⁻¹	Inflorescencias planta^{-1 a}
NASC	40	1,9 (0-7)	6,3 (1-15)
FRENCH	50	2,5 (0-8)	8,8 (1-36)
BEECHER	48	1,4 (0-8)	4,6 (1-15)
ELIZABETH	43	1,1 (0-5)	4,3 (1-13)

Tabla 4.13 Producción de hijuelos e inflorescencias de plantas de Pennycress según variedades (determinaciones sobre un conjunto de 10 plantas por parcela elemental). ^a Incluyendo el tallo principal.

De hecho, el 85% de la variabilidad encontrada en la producción de semilla se explica por el número de inflorescencias por planta. La variedad FRENCH es la variedad que este año muestra una estrategia de este tipo con un porcentaje de ahijamiento similar a BEECHER pero con un mayor número de hijuelos por planta y, sobre todo, casi el doble de inflorescencias por planta (Tabla 4.13).

DISCUSIÓN

5.1 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA BIOSÍNTESIS DE ACEITE Y ÁCIDO GRASO ERÚCICO EN SEMILLAS DE PENNYCRESS.

5.1.1. Influencia de determinados residuos de la proteína FAE1 en la actividad de elongación y la especificidad de sustrato.

En esta Tesis Doctoral se ha caracterizado el gen *TaFAE1* de Pennycress, responsable de la elongación de ácidos grasos. El análisis comparado de las secuencias de *TaFAE1* en las variedades objeto de este estudio, NASC y FRENCH, que resultaron ser idénticas, como en otras especies vegetales, permitió concluir que la proteína FAE1 presenta un alto grado de homología en las diferentes especies vegetales. Así, la secuencia proteica de FAE1 de Pennycress presenta un 86% de identidad con respecto a la secuencia FAE1 de *Arabidopsis thaliana*, pertenecientes ambas a la misma familia, Brassicaceae, pero con diferente contenido tanto de aceite como de ácido graso erúcico. A pesar de este alto grado de homología, se observaron diferencias en algunos residuos de la proteína que han sido identificados como cruciales para la actividad elongasa y por tanto parecen formar parte del sitio activo enzimático. Es el caso de las cisteínas C85, C223, C312, C389 y C460 y las histidinas H302, H387, H391 y H420 (Ghanevati y Jaworski, 2002). Todos los residuos citados están presentes en la secuencia FAE1 de Pennycress, pero únicamente C223, H391 y N424 (Ghanevati y Jaworski, 2001, 2002) están en *Arabidopsis*. Ambas enzimas elongan 18:1-CoA a 20:1-CoA, y 20:1-CoA a 22:1-CoA; sin embargo, lo hacen en proporciones muy diferentes. En la tabla 5.1 pueden observarse los niveles de cada ácido graso mencionado encontrado en los lípidos totales del aceite de ambas plantas.

	18:1	20:1	22:1
Arabidopsis	11,70 % ¹	21,23 % ¹	2,79 % ¹
Pennycress	14,22 % ²	9,85 % ³	36,60 % ⁴

Tabla 5.1 Cantidades en % molar de los ácidos grasos oleico (18:1), eicosenoico (20:1) y erúcico (22:1) presentes en los aceites de Arabidopsis y Pennycress. ¹ Datos obtenidos de la caracterización de la composición de ácidos grasos de la variedad Col0 de *A. thaliana*, figura 4.21. ² Máximo % encontrado en Pennycress, correspondiente al estadio de maduración D o seco de la variedad FRENCH. ³ Máximo % encontrado en Pennycress, correspondiente al estadio de maduración D o seco de la variedad NASC. ⁴ Máximo % encontrado en Pennycress, correspondiente al estadio de maduración YG o amarillo-verde de la variedad FRENCH.

La producción de 36,6% de 22:1 por parte de Pennycress sugiere que su enzima FAE1 muestra alta afinidad por sustratos de 20 carbonos que no muestra la enzima de Arabidopsis, ya que la elongación de 20:1-CoA a 22:1-CoA es sustancialmente inferior, produciendo un 2,79% de 22:1 (Tabla 5.1). Además, en Arabidopsis se encontró un 21,23% de 20:1 frente un 9,85% en Pennycress (Tabla 5.1), lo cual refuerza la hipótesis de que la enzima FAE1 de Arabidopsis tiene mayor afinidad por sustratos de 18 carbonos que de 20, mientras que la FAE1 de Pennycress es capaz de realizar la segunda elongación de 20:1-CoA a 22:1 CoA con alta eficiencia. Varios factores pueden estar detrás de estas diferencias. En primer lugar existen diferencias en residuos clave que podrían explicar la diferente actividad.

Un profundo estudio de la estructura de las proteínas de la familia KCS se llevó a cabo por Joubès et al. (2008), que utilizó el modelo de homología para predecir la estructura 3D de KCS1, una enzima de condensación con papel en la biosíntesis de cera cuticular, demostrando que tienen un plegamiento de tipo α_a - β_b - α_c - α_d . El primer plegamiento α_a consiste en una o dos alfa hélices que sirve como anclaje a la membrana, mientras que β_b - α_c - α_d forman la parte soluble. El modelo tridimensional puede observarse en la figura 5.1. Todos los residuos catalíticos están en el plegamiento α_c de la proteína (Joubès et al, 2008). Por superposición del residuo catalítico involucrado en la formación del enlace tioéster con el sustrato acil, la cisteína C223, y los involucrados en

la descarboxilación del malonil-CoA, la histidina H391 y la asparagina N424, se compararon los tamaños y las formas de los compartimentos o bolsillos enzimáticos responsables de la unión a sustrato en los diferentes miembros de la familia KCS (Joubès et al, 2008). En este estudio se observó una correlación general entre el tamaño del compartimento de unión y la longitud de la cadena hidrocarbonada del sustrato acilo a elongar (Joubès et al, 2008). Por tanto, los residuos catalíticos presentes en la secuencia de FAE1 de *Pennycress*, que no están presentes en la de *Arabidopsis*, podrían ser los responsables de una determinada forma y tamaño del bolsillo de unión a sustrato que permitiese la elongación de sustratos más largos, concretamente de 20 carbonos, de forma más eficiente.

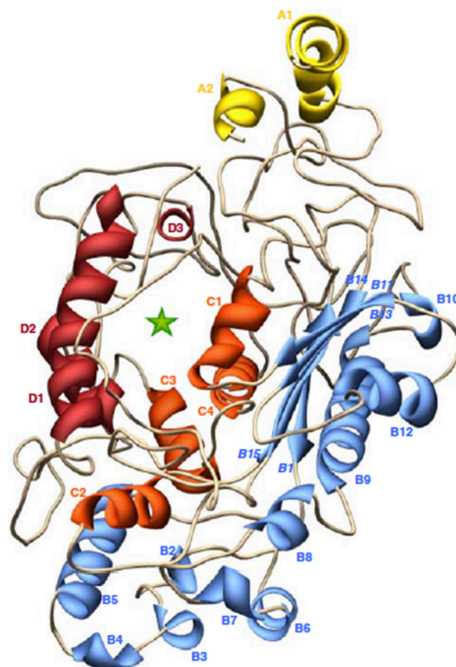


Figura 5.1 Análisis estructural tridimensional de la proteínas KCS1 por Joubès et al, 2008. La estrella verde muestra la posición del bolsillo de unión al sustrato. Los elementos secundarios están marcados y coloreados de la siguiente manera: dominios transmembrana (A, amarillo), el núcleo estructural de la proteína (B, azul), el bolsillo que contiene los residuos catalíticos (C, naranja) y la cubierta que cierra el bolsillo de unión a sustrato (D, rojo). Las láminas β están marcados en cursiva y las hélices α normal, numeradas del extremo N-terminal al C-terminal.

Para identificar elementos adicionales que contribuyan a la especificidad de sustrato de FAE1, en otro estudio se compararon las enzimas FAE1 de *B. napus* y *A. thaliana*.

También en este caso, ambas enzimas elongan 18:1-CoA a 20:1-CoA y 20:1-CoA a 22:1-CoA, pero en proporciones muy diferentes (Blacklock y Jaworski, 2002). El análisis del contenido de VLCFA de los aceites de semillas de *A. thaliana* y *B. napus* revela diferencias en el contenido de ácido eicosenoico (20:1) y erúcico (22:1). Como se ha comentado anteriormente, en *A. thaliana*, un 22,79% del aceite son VLCFA 20:1 y un 2,79% 22:1 (Tabla 5.1). En *B. napus*, el 62% del aceite de las semillas son VLCFA monoinsaturados, 10% como 20:1 y 52% como 22:1 (Downey y Robbelen, 1989). Como FAE1 es la responsable de la producción de VLCFA en las semillas, esta diversidad en el contenido de VLCFA también sugirió que las enzimas de *A. thaliana* y *B. napus* tienen distintas especificidades de sustrato. La identidad entre ambas secuencias también es de 86%, lo cual sugiere que los determinantes de la especificidad son concretos e identificables.

Al igual que ocurre con la elongasa de Pennycress, la FAE1 *B. napus* presenta una alta identidad con respecto a la proteína de Arabidopsis (86%) pero, al contrario que Arabidopsis y de manera similar a Pennycress, *B. napus* es una especie acumuladora de ácido erúcico. Esto sugiere que las especificidades de sustrato difieren con respecto a la longitud de la cadena acilo y que, FAE1 de *B. napus* tiene preferencia por sustratos de mayor longitud que la de *A. thaliana*. Tanto en los ensayos *in vitro* como los ensayos *in vivo* realizados con levaduras, la enzima FAE1 de *A. thaliana* presentó más actividad hacia sustratos de 18 carbonos que hacia sustratos de 20 carbonos, mientras que la de *B. napus* mostró la misma especificidad hacia ambos sustratos. Los datos demuestran que tienen diferentes especificidades y que la diferencia en la composición de sus aceites se basa en las diferencias en la especificidad (Blacklock y Jaworski, 2002).

El análisis de la estructura secundaria de las enzimas FAE1 reveló dos dominios transmembrana en la región N-terminal y confirmó que este extremo está involucrado en el anclaje de la enzima a la membrana (Ghanevati y Jaworski, 2002). En el estudio de los motivos de la secuencia responsables de dicha especificidad de sustrato (Blacklock y Jaworski, 2002), los autores identificaron otra región en el dominio N-terminal de la proteína, inmediatamente después de los dominios transmembrana, como posible responsables de la especificidad por sustrato. La región identificada es la comprendida entre los residuos 74 y 173, después del dominio transmembrana N-terminal. Como cabría esperar, el dominio transmembrana no está involucrado en la

especificidad de sustrato ni por tanto en la unión con el mismo, ya que están presentes en el citosol y disponibles en la interfaz de la membrana. En los modelos de estructura terciaria de miembros FAE1, esta región carece de estructuras secundarias repetitivas y es especialmente heterogénea en comparación con el resto de la secuencia proteica, que suele estar más conservada entre la familia de enzimas elongasas vegetales.

Los residuos catalíticos C223, H391 y N424 se encuentran en regiones de alta homología y son distantes de la región identificada como importante en la especificidad del sustrato, comprendida entre los residuos 74 y 173. Sin embargo, se identificó el residuo 92 como un residuo con un papel especialmente importante en la especificidad de sustrato de FAE1 (Blacklock y Jaworski, 2002). En la figura 5.2, se muestra el alineamiento realizado en esta Tesis Doctoral, previamente mostrado en la figura 4.11 de los Resultados, en el que se han marcado las regiones transmembrana N-terminal (azul), la región posterior a estas como posible determinante de la especificidad de sustrato (rojo) y el residuo 92 (verde). Como puede observarse en la región comprendida entre los residuos 74 y 173 (rojo), muchos residuos coinciden en *Pennycress* y *B. napus*, mientras que son diferentes en *Arabidopsis*. Es el caso del residuo 92 (verde), siendo una arginina en *Pennycress* y *B. napus* y una lisina en *Arabidopsis*.

entre varias secuencias y el contenido de ácido erúcico en las semillas (Blacklock y Jaworski, 2002; Sun et al., 2013). Siete secuencias determinadas por Sun et al. (2013) han sido asociadas con la acumulación de ácido erúcico en las semillas y todas ellas están presentes en ambas secuencias de *TaFAEI* mientras la secuencia *AtFAEI* no presenta ninguna (Figura 5.2). También se han encontrado similitudes en la región identificada como responsable de la acumulación de 22:1 por Blacklock y Jaworski (2002) entre Pennycress y *B. napus*, y no presentes en *Arabidopsis*.

5.1.2. Regulación de la biosíntesis de ácido graso erúcico y TAG en las semillas de Pennycress.

En este trabajo hemos estudiado la expresión de ciertos genes involucrados en la acumulación de ácido graso erúcico y de aceite en las semillas de Pennycress durante su maduración. Los resultados mostraron que los niveles de mRNA de *TaFAEI* fueron elevados en las primeras fases del desarrollo de las semillas pero decrecían en las fases posteriores. Este perfil de expresión del gen *TaFAEI* fue consistente con el análisis lipídico, indicando que la elongasa actúa en las fases tempranas del desarrollo de la semilla sobre los reservorios de 18:1-CoA proporcionando rápidamente 22:1-CoA para su incorporación al TAG.

Este resultado fue consistente con la presencia de mRNA de *TaDGATI* en las fases tempranas, indicando que el TAG es rápidamente sintetizado durante la maduración de la semilla. Sin embargo, no hubo cambios en la expresión del gen *TaDGATI* durante la maduración en ambas variedades, lo que sugiere que su expresión está controlada principalmente de manera post-transcripcional. Por tanto, nuestro análisis de expresión sugiere que la actividad FAE1 durante la maduración de la semilla es controlada por lo menos a nivel transcripcional en las semillas de Pennycress. Se han realizado estudios en los que la sobreexpresión de *AtFAEI* provocó la acumulación de altos niveles de ácidos grasos de cadena larga (VLCFA) en *Arabidopsis* (Millar y Kunst, 1997). De manera similar, la expresión del gen *FAEI* de *N. officinale* o *T. nudicaulis* en semillas de *Arabidopsis* también resultó en una mayor acumulación de 22:1 y 20:1 en el aceite, respectivamente (Mietkiewska et al. 2004, 2007). Todos estos resultados indican que

cualquier incremento de la actividad de la enzima FAE1 resulta en un incremento de la cantidad de ácido erúcico en las semillas, independientemente de la disponibilidad de los reservorios de acil-CoA. La composición de ácidos grasos de los lípidos totales, así como el patrón de expresión del gen *TaFAE1* sugieren que la actividad elongasa de FAE1 es muy alta en las primeras fases del desarrollo de la semilla.

El ácido graso oleico, 18:1, es un sustrato común de la elongasa FAE1 y de la desaturasa FAD2, que sintetiza 18:2 a partir de 18:1 en el retículo endoplasmático. Cabe señalar que ambas enzimas no utilizan el 18:1 en la misma forma. Así, mientras la elongasa actúa sobre 18:1-CoA, FAD2 introduce el doble enlace cuando el ácido graso está esterificado al esqueleto de glicerol de PC. El análisis de la composición de ácidos grasos de las diferentes fracciones del aceite de semillas de Pennycress mostró que únicamente en la fracción de DAG se daba un incremento del ácido graso 18:2, por lo que se decidió monitorizar la expresión de *TaFAD2* durante la maduración de las semillas. Un aumento de la actividad FAE1 puede provocar un cambio de flujo de los sustratos acilos hacia la elongación, propiciando que haya menos 18:1 disponible para su desaturación por FAD2. Los niveles de mRNA de *TaFAD2* permanecieron inalterados durante todas las fases del desarrollo. Esta observación sugiere que la coordinación de la desaturasa durante la maduración y la coordinación con los flujos metabólicos que dirigen el 18:1 entre ambas rutas metabólicas (elongación versus desaturación) también está controlada a nivel post-transcripcional, lo cual no sorprende ya que la actividad desaturasa microsomal está controlada de esta modo en muchas especies (OíQuin et al., 2010).

Al analizarse la expresión de *TaWR11*, uno de los principales reguladores transcripcionales de la síntesis y acumulación de ácidos grasos en semillas, se encontró un patrón de expresión similar a *TaFAE1*, una gran acumulación de mRNA de *TaWR11* en las fases tempranas del desarrollo de las semillas. Este resultado sugiere que, así como ocurre en *Arabidopsis*, el gen *TaWR11* es el principal factor de transcripción que controla la biosíntesis de aceite en las semillas de Pennycress y que, la actividad elongasa puede estar regulada a través de *TaWR11*. Este resultado es consistente con datos transcriptómicos de mutantes *wri1* (Baud et al., 2007; To et al., 2012).

Desde el punto de vista molecular, el análisis de la expresión de *TaFAEI*, *TaDGATI*, *TaFAD2* y *TaWR11* ha demostrado la existencia de un complejo mecanismo de regulación de la síntesis de ácido graso erúcido y aceite durante la maduración de las semillas de Pennycress, que actúa sobre diferentes genes y a diferentes niveles (transcripcional para los genes *TaFAEI* y *TaWR11*, y post-transcripcional para *TaDGATI* y *TaFAD2*) durante las diferentes fases de desarrollo de las semillas. Estos genes, identificados en este estudio, serían candidatos potenciales para la manipulación genética con el fin de incrementar el contenido de aceite y/o de ácido erúcido en las semillas de plantas.

Desde el punto de vista metabólico, nuestros resultados sugieren una gran complejidad de la ruta de biosíntesis de aceite en las semillas de Pennycress. La acumulación de 22:1 en el aceite de las semillas de Pennycress es concomitante con la reducción de los niveles de 18:2 y 18:3, fenómeno que puede ser explicado con la biosíntesis del propio 22:1. El ácido graso erúcido es sintetizado fuera del plastidio por la acción de un complejo enzimático de membrana encargado de la elongación. Este complejo elongasa cataliza una serie de reacciones tomando como sustrato derivados del ácido oleico, 18:1-CoA, añadiéndole 2 carbonos más. Por tanto, se produce en primer lugar el ácido eicosenoico (20:1) y, posteriormente, el ácido erúcido (22:1). Este aumento de 22:1, simultáneo con la disminución de 18:2 y 18:3 en la maduración de las semillas de Pennycress, sugiere un cambio del flujo de los sustratos 18:1-CoA hacia la elongación, que provoca una reducción de la disponibilidad de estos para su incorporación en la posición sn-2 de la fosfatidilcolina (PC), donde podrían ser desaturados por el enzima microsomal FAD2 desaturasa.

En la fracción del TAG del aceite de las semillas de Pennycress, también observamos que el incremento de 22:1 es concomitante con la disminución 18:2 y 18:3 durante el desarrollo de las semillas en ambas variedades. Además, los elevados niveles de ácido graso erúcido detectados en la fracción de TAG en las fases iniciales del desarrollo de la semilla sugieren que los reservorios de 22:1-CoA están rápidamente disponibles para su incorporación en TAG en las plantas de Pennycress. De hecho, durante el análisis de la incorporación de 22:1 al TAG en *Crambe abyssinica*, otra especie con alto contenido en ácido erúcido, se observó que la incorporación de 22:1-CoA al TAG es rápidamente acelerada conforme las semillas se desarrollan (Furmanek et al., 2014). Esto indica una

alta disponibilidad de 22:1-CoA para su incorporación a TAG desde las etapas iniciales de la maduración, y que se mantiene durante la fase de llenado o carga de aceite de la semilla.

Al contrario de lo que ocurre en la fracción de TAG, en la fracción de DAG los niveles de 22:1 son sólo ligeramente mayores con respecto a otros ácidos grasos. En cuanto a 18:2 y 18:3, la tendencia de acumulación en DAG en ambas variedades ocurre de manera muy similar entre si y de manera inversa a lo que ocurre en TAG y en los lípidos totales, ya que sus niveles incrementan durante las primeras fases del desarrollo de las semillas. Este incremento es concomitante con una reducción del nivel de 22:1, lo cual indica que el cambio de flujo de los sustratos acilos a favor de la elongación en la fracción del TAG durante el desarrollo de las semillas, ocurre de manera inversa en la fracción de DAG propiciando la desaturación. Este cambio de flujo puede estar relacionado con el hecho de que la fracción DAG es canalizada hacia la producción de fosfatidilcolina por la acción del enzima PDCT, fosfatidil-colina:diacilglicerol colina fosfotransferasa, en lugar de hacia la biosíntesis de TAG (Lu et al., 2009). Esta fosfatidilcolina es incorporada a la membrana lipídica la cual requiere ácidos grasos poliinsaturados como 18:2.

1.5.3. Análisis funcional de *TaFAE1* en *Arabidopsis*.

Los resultados de complementación del gen *TaFAE1* en *Arabidopsis* demuestran que la expresión de *TaFAE1* en *Arabidopsis* consigue incrementar el contenido en 22:1 en los lípidos totales del aceite de las semillas transgénicas entre 2 y 3 veces (en las líneas 7.1.1.4 y 8.1.1.1) en comparación con las plantas control (Figura 4.24). Además los niveles de 20:1 en estas líneas transgénicas disminuyeron ligeramente con respecto a Col0, lo que reforzó la idea de que la enzima FAE1 de Pennycress está actuando utilizando el 20:1 para elongarlo y producir 22:1. Este incremento de los niveles de 22:1 se consiguió solo en las plantas transgénicas derivadas de Col0, y que por tanto, contienen el gen *AtFAE1* endógeno. Sin embargo, este incremento no se observó en las plantas transgénicas derivadas del mutante *fae1-1*, que no contienen actividad elongasa endógena, y en las que toda la actividad elongasa provendría del enzima de Pennycress.

Una primera conclusión que se puede extraer de estos resultados es que en las plantas transgénicas derivadas de Col0, hay 20:1 suficiente que es utilizado como sustrato para la elongación por parte de la enzima FAE1 de Pennycress. De esta manera, la FAE1 de Pennycress es capaz de realizar la segunda elongación de 20:1 a 22:1 de manera eficiente. Sin embargo, parece que en las plantas derivadas del mutante *fae1-1*, a pesar de estar transformadas con el gen *TaFAE1*, y disponer de grandes cantidades de 18:1 para poder efectuar tanto la primera como la segunda elongación, no ocurre de manera eficiente. En el mutante *fae1-1* no disponen de 20:1 suficiente como para que la elongasa de Pennycress realice la segunda elongación que daría como producto 22:1.

Estos resultados corroboran todavía más que es posible la existencia de distinta especificidad por sustrato en estas elongasas por 18:1 o 20:1-CoA entre Arabidopsis y Pennycress. Sin embargo, una incógnita que se nos plantea es por qué la enzima FAE1 de Pennycress sí es capaz de realizar ambas elongaciones en la propia planta y en Arabidopsis no. Detrás de esta contradicción puede haber a factores todavía desconocidos en la ruta de biosíntesis de ácido erúico en las semillas o en las diferentes contribuciones por parte de las distintas rutas de biosíntesis de TAG. Una hipótesis puede ser que estas diferencias no estén relacionadas con la ruta de elongación en sí, sino que pueden radicar en la incorporación del 22:1 a TAG. Por ejemplo, podrían existir enzimas DGAT1 que mostrasen diferente afinidad por sustratos VLCFAs 20:1 o 22:1, que explicarían esas diferencias en la incorporación. En esta hipótesis se podría plantear la existencia de isoformas de DGAT, no caracterizadas hasta el momento, con esa mayor afinidad por 22:1. A pesar de que el análisis genético en Arabidopsis no parece identificar esas nuevas isoformas, su posible existencia ha sido planteada en estudios de incorporación de ácidos grasos a TAG en otra especie acumuladora de ácido graso erúico como es *Crambe abyssinica* (Li et al; 2012). Como alternativa, no podemos descartar que una DGAT ya existente, y que en Arabidopsis muestre alta afinidad por 18:1 o 20:1, pueda ver afectada su afinidad en presencia de sustratos de mayor longitud. Un análisis de expresión de los diferentes genes *DGAT* en las plantas transgénicas de Arabidopsis generadas en este trabajo podría aportar información al respecto.

5.2 PERSPECTIVAS AGRONÓMICAS DE PENNYCRESS.

5.2.1. Primera experiencia de cultivo de Pennycress en España.

Como ya se ha comentado en la Introducción, Pennycress se ha cultivado en Estados Unidos de manera más intensa en los últimos cinco años, con el objetivo de utilizar su aceite para la producción sostenible de biodiesel. Sin embargo, a pesar de que hay registro botánico en Europa y se ha detectado la especie en varios lugares, Pennycress no se cultiva en Europa. Durante esta Tesis Doctoral se han realizado los primeros ensayos de campo con Pennycress en España. Nuestros resultados, aunque preliminares, sugieren que esta especie se puede cultivar en una zona semiárida como es Aragón. Los rendimientos de cultivo de Pennycress obtenidos en nuestros ensayos fueron sólo ligeramente inferiores a los descritos en experiencia de cultivo de Estados Unidos que establecen un rendimiento para variedades silvestres en el rango de 1120-2240 kg ha⁻¹, dependiendo de localizaciones y campañas, y estimando un rendimiento medio de 1345 kg ha⁻¹ (Moser et al., 2012). Durante la primera campaña, se trabajó con las dos variedades europeas NASC y FRENCH, y una de las variedades norteamericanas, la variedad BEECHER. Estas variedades muestran diferente nivel de producción y diferente ciclo de cultivo, ya que la variedad NASC es una variedad primaveral y FRENCH y BEECHER invernales. Para la variedad BEECHER sembrada a una densidad de 10 kg ha⁻¹ se obtuvo un rendimiento de casi 700 kg ha⁻¹ y, sembrada a una densidad de 15 kg ha⁻¹, de alrededor de 1060 kg ha⁻¹. Con ello concluimos que la mayor densidad de siembra, junto con la menor velocidad de cosecha, supone un incremento en rendimiento de la cosecha, concretamente de 54%. Por otro lado, la cosecha de la variedad NASC sembrada a una densidad de 10 kg ha⁻¹ produjo 1375 kg ha⁻¹, y la variedad FRENCH sembrada a la misma densidad, 940 kg ha⁻¹. La variedad NASC fue la más productiva con un rendimiento medio de aproximadamente un 50% mayor que FRENCH y BEECHER.

Llama la atención la menor producción de la variedad BEECHER con respecto a las otras dos variedades, especialmente con respecto a NASC, ya que el establecimiento de plantas fue significativamente más del doble. Este hecho seguramente es debido a la diferente forma de cosechar la semilla, ya que las variedades europeas fueron

cosechadas manualmente, evitando en la medida de lo posible la pérdida de semilla. Pero, además, puede deberse a una estrategia del cultivo de las variedades NASC y FRENCH, compensando el menor número de plantas por metro cuadrado con un mayor ahijamiento, con una mayor producción de inflorescencias y/o de semillas, etc.

En la siguiente campaña de cultivo, se incluyó la variedad norteamericana ELIZABETH, que se diferencia de la otra variedad americana, BEECHER, en su mayor porte en altura, tamaño y producción. Las cifras de producción obtenidas en la segunda campaña, están comprendidas en un rango de 510-740 kg ha⁻¹, inferiores a las de la campaña anterior (700-1400 kg ha⁻¹). Este menor establecimiento del cultivo con respecto a la campaña anterior puede explicarse por condiciones climáticas adversas. En el momento de la nascencia tuvieron lugar muchas nieblas y, debido a unas intensas lluvias, el suelo estuvo algo encharcado durante varios días. Asimismo, en primavera las lluvias fueron más escasas que en la primavera anterior. La variedad FRENCH destacó por una producción un 30-40% superior que el resto de variedades aunque sólo se diferenció estadísticamente de la variedad BEECHER ($P < 0.05$). Debe tenerse en consideración el efecto bloque, ya que hubo una producción significativamente mayor en el Bloque II que en el resto, debido quizá a un riego desigual o a un diferente ataque de hormigas.

De la misma manera que en la primera campaña, no se observa una relación directa entre el número de plantas y la producción de semilla. En esta segunda campaña, las mismas condiciones de ensayo y de manejo en las cuatro variedades permiten afirmar que se debe a una estrategia del cultivo. Por tanto, los resultados obtenidos en esta segunda campaña de cultivo en EEAD confirman lo que ya adelantábamos en la primera campaña sobre la comparación de variedades de origen europeo y americano. A pesar de que las plantas europeas tienen un peor establecimiento, o lo que es lo mismo, un menor éxito de nascencia, la mayor producción de hijuelos y/o de inflorescencias lo compensa en mayor o menor grado (especialmente en la variedad NASC), obteniéndose finalmente rendimientos similares. Todavía desconocemos si se trata de una característica varietal o de una estrategia de compensación que no depende de la variedad en sí. Sin embargo, observaciones de las plantas bajo condiciones controladas en cámara de cultivo parecen indicar que se trata del primer caso, una característica

varietal. El estudio de este fenómeno debe realizarse asimismo en cámaras de cultivo, donde no hay competencia entre las plantas ya que están separadas en tiestos diferentes.

5.2.2. Posibles estrategias de cultivo sostenible con Pennycress.

Como se ha comentado anteriormente, Pennycress es una planta invernal anual distribuida por todo el mundo. Es considerada como una mala hierba que crece expansivamente y sobrevive en gran variedad de altitudes y condiciones ambientales, por lo que su crecimiento no está restringido por la variabilidad climática (Best y McIntyre, 1975). Además de ello, presenta unas características agronómicas favorables ya que no muestra demasiados inputs agronómicos (fertilizantes, pesticidas y agua). Por ello, una estrategia sostenible para el cultivo de Pennycress es utilizarlo en un cultivo de rotación con otros cultivos convencionales como soja o maíz. De esta manera, se obtendrían beneficios directos de Pennycress en lo que respecta a las aplicaciones industriales y energéticas en las cuales utilizar el abundante aceite de sus semillas, sirviendo como una fuente adicional de ingresos, y además se aliviarían los problemas de la calidad del suelo y del agua originados durante el periodo de barbecho de los cultivos convencionales. Todo ello sin requerir terreno adicional ni desplazar a otros cultivos con fines alimentarios.

Como ya hemos comentado, durante esta Tesis Doctoral se han realizado ensayos de campo con dos variedades primaverales e invernales (FRENCH, BEECHER y ELIZABETH). El tipo invernal de Pennycress puede ser sembrado a finales de agosto o comienzos de septiembre, por lo que puede ser cultivado en cualquier sistema que permita sembrarlo durante ese tiempo, como por ejemplo el maíz. Un método propuesto sería la siembra de Pennycress de tipo invernal después de la cosecha de maíz en el otoño y su cosecha antes de la siembra de soja en primavera, lo cual es conocido como sistema secuencial de doble cultivo (Sindelar et al., 2015). Por otro lado, el tipo primaveral de Pennycress puede sembrarse y cosecharse en primavera, sin embargo, este sistema no brinda los beneficios de un cultivo de cubierta a finales de otoño e invierno. Algunos estudios indican que el rendimiento de semilla de Pennycress es mayor cuando se siembra en agosto o principios de septiembre (Johnson et al., 2015).

Por ello, si el cultivo de Pennycress va a destinarse a un cultivo de rotación lo ideal sería utilizar una variedad invernal, cultivándola en suelos inutilizados tras la cosecha del maíz y antes de la plantación de la soja en primavera. De esta manera, los agricultores podrían seguir cultivando maíz y soja de la forma tradicional pero añadiendo este cultivo en el invierno les permitiría tener unas ganancias adicionales en tierras subutilizadas y con un equipo e infraestructuras ya disponibles. En Estados Unidos, aproximadamente 16,2 millones de hectáreas son cultivadas al año con Pennycress para la producción invernal bajo esta estrategia que no tiene impacto en la industria alimentaria ni influye en los hábitats naturales. La estrategia de cultivo de Pennycress está siendo implementada por agricultores de Illinois como se muestra en la figura 5.3. En campañas futuras, ya que en la EEAD disponemos de superficie dedicada al cultivo de maíz, nos planteamos incluir al Pennycress en una posible rotación similar a la usada en Estados Unidos.

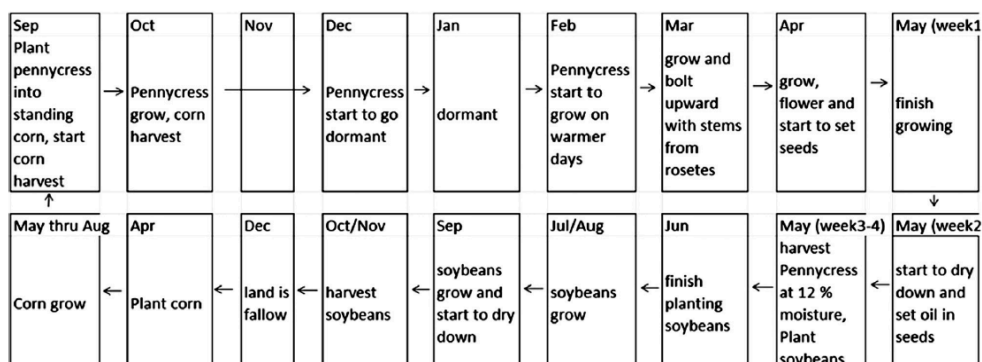


Figura 5.3 Esquema de cultivo de Pennycress entre el ciclo de cultivo del maíz y de la soja implementado por agricultores de Illinois. Pennycress es sembrado sobre el cultivo de maíz en el otoño, y cosechado en mayo tras la siembra de la soja. Esquema de Fan et al., 2013.

Un beneficio agronómico adicional de plantar Pennycress en un sistema de cultivo de rotación es su capacidad para suprimir las malas hierbas propias de la primavera. En la literatura se han encontrado casos en los que la biomasa de malezas se redujo en más del 80% en un sistema de cultivo de Pennycress, lo cual puede atribuirse a los glucosinolatos de la planta y/o a la competitividad provocada por su rápido crecimiento

a comienzos de la primavera (Johnson et al., 2015; Sindelar et al., 2015). La capacidad de Pennycress para reducir la presión de las malas hierbas puede servir como una estrategia adicional, pudiendo retrasar el desarrollo de resistencias a herbicidas y, por tanto, aumentando el suyo propio al reducir la necesidad de herbicidas (Johnson et al., 2015).

Además del doble cultivo con cultivos convencionales alimentarios, el cultivo de Pennycress puede ser utilizado en terrenos no adecuados para la producción agrícola, en terrenos marginales o abandonados con escaso valor productivo. En la cuenca mediterránea, al menos la mitad de los suelos presentan limitaciones para el cultivo debido a que se trata de suelos poco potentes, pedregosos y con escasos nutrientes. Pero además, una tierra marginal viene dada no sólo por sus condiciones innatas, sino porque las prácticas inadecuadas han llevado a muchos suelos mediterráneos a perder su horizonte orgánico, a reducir su profundidad, a modificar su estructura, etc. Estas prácticas agrícolas han sido en algunos casos un factor importante a la hora de abandonar algunas explotaciones (Cerdà, 1997). Sin embargo, un cultivo con Pennycress podría regenerar estos terrenos, protegerlos de la erosión, aumentar la materia orgánica, la captación de carbono y aportar un hábitat y recursos alimenticios para los polinizadores beneficiosos, teniendo en cuenta siempre que esta práctica brindaría un factor productivo a un terreno sin ninguna utilidad.

CONCLUSIONES

En esta Tesis Doctoral se ha estudiado la acumulación de aceite y de ácido graso erúcico en las semillas de *Thlaspi arvense* L. (Pennycress), perteneciente a la familia de las brasicáceas, como primer paso para el desarrollo de una nueva materia prima con fines industriales y energéticos en el territorio de la Unión Europea.

1. Se han **caracterizado dos líneas de origen europeo NASC y FRENCH**, cultivadas tanto bajo condiciones controladas de cultivo como en ensayos de campo: factores morfológicos, crecimiento, producción de semillas, características de aceite y acumulación de ácido graso erúcico. Durante este estudio se han encontrado algunas diferencias en ciertos factores agronómicos como es el hábito de crecimiento. La variedad FRENCH es una variedad invernal y que, por tanto, requiere un tratamiento de vernalización para su posterior desarrollo en flores y semillas. Sin embargo, la variedad NASC es una variedad primaveral y no requiere de un periodo de frío para su completo desarrollo. Una característica común observada fue que tanto la variedad FRENCH como NASC sufren de dormancia, solventada almacenando las semillas a temperatura ambiente durante 10-12 meses tras su cosecha. También se han encontrado diferencias en cuanto al tiempo de floración, más temprano en la variedad NASC, y en lo referido a la producción de semillas, mayor en la variedad FRENCH. Ambas variedades muestran un gran contenido en aceite (39% la variedad NASC y 41% la variedad FRENCH) ácido erúcico (35% la variedad NASC y 37% la variedad FRENCH) en el aceite de sus semillas.
2. A nivel genético, el gen *TaFAE1* es el responsable directo de la producción de ácido graso erúcico, ya que codifica la enzima elongasa FAE1. Se ha obtenido la secuencia de dicho gen de Pennycress (*TaFAE1*) para ambas variedades europeas y se ha realizado una comparación de la misma con respecto a la secuencia de *Arabidopsis thaliana* (brasicácea no acumuladora de 22:1) y *Brassica napus* (brasicácea acumuladora de 22:1), encontrándose ciertos polimorfismos en la secuencia del gen que podrían estar detrás de la mayor acumulación de 22:1 en Pennycress.
3. Se ha realizado una **caracterización bioquímica del aceite de las semillas** de las variedades NASC y FRENCH de Pennycress que indica que la fracción de triacilglicerol del aceite es el mayor reservorio de ácido graso erúcico. La incorporación de 22:1 al TAG tiene lugar en las fases tempranas de la maduración de las semillas, y es concomitante con una disminución de los niveles de 18:2 y 18:3, por tanto, con una disminución de la actividad desaturasa. Este cambio el flujo de sustratos acilos hacia la

elongación de los mismos, parece estar controlado por varios genes a diferentes niveles. Para ello se llevó a cabo un análisis de la **expresión de varios genes considerados clave en la biosíntesis de aceite y ácido graso erúcico**. El gen *TaFAE1* parece estar controlado a nivel transcripcional con una mayor expresión en las primeras fases del desarrollo de las semillas. De la misma manera sucede con el gen *TaWR11*, un factor transcripcional que controla la biosíntesis de aceite en las semillas. Por el contrario, el gen *TaFAD2*, codificante de una enzima desaturasa de ácidos grasos, o el gen *TaDGAT1*, que cataliza el último paso de la biosíntesis *de novo* de TAG, están controlados de manera post-transcripcional. Estos datos han conducido a la identificación de genes y procesos que pueden mejorar la manipulación biotecnológica de las semillas de Pennycress para obtener un aceite de alta calidad con fines industriales y energéticos.

4. Además se ha realizado una **caracterización funcional del gen *TaFAE1***, mediante la obtención de líneas transgénicas que expresaban el gen *TaFAE1* de Pennycress específicamente en la semilla bajo el control del promotor OLE2. Se utilizaron dos fondos genéticos diferentes; plantas silvestres Col0 y el mutante *fae1-1*, deficientes en la elongación por la inactivación del gen endógeno *AtFAE1*, y en las que toda la actividad elongasa provendría del gen *TaFAE1* de Pennycress. Los datos muestran que las plantas transgénicas *TaFAE1* derivadas de Col0, presentan incrementos significativos, de entre 2 y 3 veces, del contenido en 22:1 tanto en los lípidos totales como en la fracción de TAG del aceite de las semillas transgénicas. Sin embargo, este incremento no se observó en las plantas transgénicas *TaFAE1* derivadas del mutante *fae1-1*. Nuestros datos indican una diferente afinidad del enzima de FAE1 de Pennycress por los sustratos 18:1-CoA y 20:1-CoA en Arabidopsis. Sin embargo, esta diferencia no se da en la propia especie, lo que sugiere la existencia de diferentes factores, entre los que está la propia enzima elongasa, como determinantes del contenido en erúcico en el aceite de las semillas de plantas.
5. Se ha llevado a cabo un análisis comparado de la producción y comportamiento en **ensayos de campo** entre las dos variedades europeas objeto de este estudio, NASC y FRENCH, y dos variedades norteamericanas, BEECHER Y ELIZABETH, utilizadas en Estados Unidos. A pesar de que los datos obtenidos son preliminares, los resultados indican que la variedad FRENCH mostró una producción superior al resto de variedades sobre todo en la segunda campaña, donde las condiciones de siembra y metodología de cosecha fueron más homogéneas. Otro resultado interesante es que las

variedades europeas mostraron un comportamiento similar a las variedades norteamericanas cultivadas bajo nuestras condiciones de cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Aghoram K., Wilson R.F., Burton J.W. y Dewey R.E.** (2006) A mutation in a 3 - keto - acyl - ACP synthase II gene is associated with elevated palmitic acid levels in soybean seeds. *Crop Science* 46, 2453 - 2459.
- Agrawal, V.P., Lessire, R. y Stumpf, P.K.** (1984) Biosynthesis of very long chain fatty acids in microsomes from epidermal cells of *Allium porrum* L., *Arch. Biochem. Biophys.* 230: 580–589.
- Alexander, R. B., Smith, R. A., Schwarz, G. E., Boyer, E. W., Nolan, J. V., y Brakebill, J. W.** (2008). Differences in phosphorus and nitrogen delivery to the Gulf of Mexico from the Mississippi River Basin. *Environ. Sci. Technol.*, 42(3), 822–830.
- Alfonso M., Collados R., Yruela I. y Picorel R.** (2014) Photoinhibition and recovery in a herbicide-resistant mutant from *Glycine max* (L.) Merr. cell cultures deficient in fatty acid unsaturation. *Planta* 219: 428-439.
- Andersson M.X., Kjellberg J.M. y Sandelius A.S.** (2001) Chloroplast biogenesis. Regulation of Lipid transport to the thylakoid in chloroplasts isolated from expanding and fully expanded leaves of pea. *Plant Physiol*, 127 (1): 184-193.
- 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.
- AOCS Lipid Library** - <http://lipidlibrary.aocs.org/>
- ASTM - American Society for Testing and Materials** (2008). Standard specification for biodeisel fuel blend stock (B100) for middle distillate fuels, ASTM D6751-08. ASTM Annual Book of Standards; American Society for Testing and Materials. West Conshohocken, PA.
- Badami ,R. C. y Patil, K. B.** (1980). Structure and occurrence of unusual fatty acids in minor seed oils. *Prog. Lipid Res.* 19, 119–153.
- Bafor, M., Smith, M. A., Jonsson, L., Stobart, K., y Stymne, S.** (1991). Ricinoleic acid biosynthesis and triacylglycerol assembly in microsomal preparations from developing castor-bean (*Ricinus communis*) endosperm. *Biochem. J.* 280, 507–514.
- Balat M, Balat H**(2010) Progress in biodiesel processing. *Appl Energy* 87:1815–35.
- Banaś A., Dahlqvist A., Stahl U., Lenman M. y Stymne S.** (2000) The involvement of phospholipid:diacylglycerol acyltransferases in triacylglycerol production. *Biochemical Society Transactions* 28, 703–705.
- Banković-Ilić IB, Stamenković OS, Vlada B. Veljković VB.** (2012) Biodiesel production from non-edible plant oils. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16, 3621– 3647
- Barret, P., Delourme, R., Renard, M., Domergue, F., Lessire, R., Delseny, M. y Roscoe, T. J.** (1998). The rapeseed FAE1 gene is linked to the E1 locus associated with variation in the content of erucic acid. *Theor Appl Genet* 96:177–86.
- Barron, E.J. y Stumpf, P. K.** (1962) Fat metabolism in higher plants, XIX. The biosynthesis of triglycerides by avocado-mesocarp enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 60:329-337.
- Bart, J., Palmeri, J., y Natale Cavallaro, S.** (2010). Biodiesel science and technology:

From soil to oil. CRC Press.

- Basha SA, Gopal KR y Jebaraj S.** (2009) A review in biodiesel production, combustion, emissions and performance. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13:1628-34.
- Bates, P. D., Ohlrogge, J. B., y Pollard, M.** (2007). Incorporation of newly synthesized fatty acids into cytosolic glycerolipids in pea leaves occurs via acyl editing. *J. Biol. Chem.* 282, 31206–31216.
- Bates P.D., Durrett T. P., Ohlrogge J. B. y Pollard M.** (2009) Analysis of acyl fluxes through multiple pathways of triacylglycerol synthesis in developing soybean embryos. *Plant Physiology* 150, 55 - 72.
- Bates, P. D. y Browse J.** (2012) The significance of different diacylglycerol synthesis pathways on plant oil composition and bioengineering. *Front Plant Sci*, 3:147. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97:6487-6492.
- Bates P. D., Stymne S. y Ohlrogge, J.** (2013) Biochemical pathways in seed oil synthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 16, 358–364.
- 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., Santos-Mendoza, M., 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, 825–838.
- Baud, S., y Lepiniec, L.** (2009). Regulation of de novo fatty acid synthesis in maturing oilseeds of *Arabidopsis*. *Plant Physiol. and Biochem.* 47, 448–455. REVIEW
- Baud, S. y Lepiniec, L.** (2010) Physiological and developmental regulation of seed oil production. *Prog Lipid Res* 49:235-249.
- Blacklock, B. J. y Jaworski, J.G.** (2002) Studies into factors contributing to substrate specificity of membrane-bound 3-ketoacyl-CoA synthases, *Eur. J. Biochem.* 269: 4789–4798.
- Blacklock, B. J. y Jaworski, J. G.** (2006) Substrate specificity of *Arabidopsis* 3-ketoacyl-CoA synthases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346, 583–590.
- Benning, C. y Ohta, H.** (2005). Three enzyme systems for galactoglycerolipid biosynthesis are coordinately regulated in plants. *J Biol Chem*, 280(4), 2397-2400.
- Benning C.** (2008) A role for lipid trafficking in chloroplast biogenesis. *Prog Lipid Res*, 47 (5):381-389.
- Bessoule, J.-J., Lessire, R. y Cassagne, C.** (1989) Partial purification of the acyl-CoA elongase of *Allium porrum* leaves, *Arch. Biochem. Biophys.* 268:475–484.
- Best, K. F., y McIntyre, G. I.** (1975). The Biology of Canadian Weeds. *Can. J. Plant Sci.*, 55, 279–292.
- 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.

Bligh E.G. y Dyer W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37 (8): 911-917.

Boateng, A. A., Mullen, C. A., y Goldberg, N. M. (2010). Producing stable pyrolysis liquids from the oil-seed presscakes of mustard family plants: Pennycress (*Thlaspi arvense* L.) and Camelina (*Camelina sativa*). *Energy Fuels*.
<http://pubs.acs.org.ezp3.lib.umn.edu/doi/abs/10.1021/ef101223a>

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.

Borugada VB y Goud VV (2012) Biodiesel production from renewable feedstocks: Status and opportunities. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16, 4763-4784.

Boyd, N. S., y Van Acker, R. C. (2003). The effects of depth and fluctuating soil moisture on the emergence of eight annual and six perennial plant species. *Weed Science*, 51(5), 725–730.

Brockerhoff H. (1971) Stereospecific analysis of triglycerides. *Lipids* 6, 942–56.

Brough, C.L., Coventry, J.M., Christie, W.W., Kroon, J.T.M., Brown, A. R., Barsby, T.L. and Slabas, A.R. 1996. Towards the genetic engineering of triacylglycerols of defined fatty acid composition: major changes in erucic acid content at the sn-2 position affected by the introduction of a 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase from *Limnanthes douglasii* into oil seed rape. *Mol. Breed.* 2: 133–142.

Brown A.P., Brough C., Kroon J.T.M. y Slabas A.R. (1995) Identification of a cDNA that encodes a 1 - acyl sn - glycerol - 3 - phosphate acyltransferase from *Limnanthes douglasii*. *Plant Molecular Biology* 29, 267–278.

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.

Brown A.P., Carnaby S., Brough C., Brazier M. y Slabas A.R. (2002a) *Limnanthes douglasii* lysophosphatidic acid acyltransferases: immunological quantification, acyl selectivity and functional replacement of the *Escherichia coli* plsC gene. *Biochemical Journal* 364, 795–805.

Brown A.P., Slabas A.R. y Denton H. (2002) Substrate selectivity of plant and microbial lysophosphatidic acid acyltransferases. *Phytochemistry* 61, 493 - 501. (2002b)

Browse, J., McCourt, P. y Somerville, C. (1986). A mutant of *Arabidopsis* deficient in c(18:3) and c(16:3) leaf lipids. *Plant Physiol*, 81(3), 859-864.

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.

Burgal, J., Shockey, J., Lu, C. F., Dyer, J., Larson, T., Graham, I., y Browse, J. (2008). Metabolic engineering of hydroxy fatty acid production in plants: RcDGAT2 drives dramatic increases in ricinoleate levels in seed oil. *Plant Biotechnol. J.* 6, 819–831.

- Cahoon E. B., Ohlrogge J. B.** (1994). Apparent role of phosphatidylcholine in the metabolism of petroselinic acid in developing umbelliferae endosperm. *Plant Physiol.* 104, 845–855
- Cahoon, E.B., Marillia, E.F., Stecca, K.L., Hall, S.E., Taylor, D.C. y Kinney, A.J.** (2000) Production of fatty acid components of meadowfoam oil in somatic soybean embryos. *Plant Physiol.* 124: 243–251.
- Cahoon E.B., Shockey J.M., Dietrich C.R., Gidda S.T., Mullen R.T. y Dyer J.M.** (2007) Engineering oilseeds for sustainable production of industrial and nutritional feedstocks: solving bottlenecks in fatty acid flux. *Current Opinion in Plant Biology* 10, 236–244.
- Cao Y.Z., Oo K.C. y Huang A.H.C.** (1990) Lysophosphatidate acyltransferase in the microsomes from maturing seeds of meadowfoam (*Limnanthes alba*). *Plant Physiology* 94, 1199–1206.
- Cao H., Shockey J. M., Klasson K. T., Chapital D. C., Mason C. B. y Scheffler B. E.** (2013) Developmental Regulation of Diacylglycerol Acyltransferase Family Gene Expression in Tung Tree Tissues. *PLoS ONE*, 8, 1 - 15.
- Carr, P. M.** (1993). Potential of Fanweed and Other Weeds as Novel Industrial Oilseed Crops. (J. Janick & J. E. Smon, Eds.) *New Crops* (Vol. 1.2).
- Cases S., Smith S. J., Zheng Y. W., Myers H. M., Lear S. R., Sande E., Novak S., Collins C., Welch C. B., Lusic A. J., Erickson S. K. y Farese R. V.** (1998) Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 13018 - 13023.
- Cassagne, C. y Lessire, R.** (1978) Biosynthesis of saturated very long chain fatty acids by purified membrane fractions from leek epidermal cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 191: 146–152
- Cerdà, A.** (1997) “Soil erosion after land abandonment in a semiarid environment of Southeastern Spain”. *Arid Soil Research and Rehabilitation*, 11: 163-176.
- Chapman, K.D., Austin-Brown S., Sparace S.A., Kinney A.J., Ripp K.G., Pirtle I.L y Pirtle R.M.** (2001) Transgenic cotton plants with increased seed oleic acid content. *Journal of the American Oil Chemists’ Society* 78, 941-947.
- Chapman K. D. y J. Ohlrogge** (2011) TAG accumulation in plants. *Journal of Biological Chemistry* In press.
- Chapman, K. D., y Ohlrogge, J. B.** (2012) Compartmentation of triacylglycerol accumulation in plants. *Journal of Biological Chemistry* 287, 2288 - 2294.
- Chapman, K.D., Dyer, J.M. y Mullen R.T.** (2012) Biogenesis and functions of lipid droplets in plants: thematic review series: lipid droplet synthesis and metabolism: from yeast to man. *J Lipid Res*, 53:215-226.
- Christie W.W.** (1982) A simple procedure for rapid transmethylolation of glycerolipids and cholesteryl esters. *J Lipid Res*, 23 (7): 1072-1075.
- 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.

Chen G.Q., Turner C., He X., Nguyen T. y McKeon T.A. (2007) Expression profiles of genes involved in fatty acid and triacylglycerol synthesis in castor bean (*Ricinus communis* L.). *Lipids* 42, 263 - 274.

Chen X., Snyder C.L., Truksa M., Shah S. y Weselake R.J. (2011a) sn-Glycerol-3-phosphate acyltransferases in plants. *Plant Signal Behav*, 6 (11): 1695-1699.

Chen, G., Snyder, C. L., Greer, M. S., and Weselake, R. J. (2011b). Biology and biochemistry of plant phospholipases. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 30, 239–258.

Claver, A., Rey, R., López, M. V., Picorel, R., y Alfonso, M. (2017). Identification of target genes and processes involved in erucic acid accumulation during seed development in the biodiesel feedstock Pennycress (*Thlaspi arvense* L.). *Journal of Plant Physiology*, 208, 7–16.

Clopton, J. R., y Triebold, H. O. (1944). Fanweed Seed Oil Potential Substitute for Rapeseed Oil. *Industrial and Engineering Chemistry*, 36(3), 218–219.

Dahlqvist, A., Stahl, U., Lenman, M., Banas, A., Lee, M., Sandager, L., Ronne, H., y Stymne, H. (2000). Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase: An enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 6487–6492.

Darwish E., Testerink C., Khalil M., El-Shihy O. y Munnik T. (2009) Phospholipid signaling responses in salt-stressed rice leaves. *Plant Cell Physiol*, 50 (5): 986-997.

Das, S., Roscoe, T.J., Delsen, M., Srivastava, P. S. y Lakshmikumar, M. (2002) Cloning and molecular characterization of the Fatty Acid Elongase 1 (FAE 1) gene from high and low erucic acid lines of *Brassica campestris* and *Brassica oleracea*. *Plant Science* 162:245–50.

Davies, C., Heath, R.J., White, S.W. & Rock, C.O. (2000) The 1.8 Å crystal structure and active-site architecture of b-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) from *Escherichia coli*. *Structure* 8, 185–195.

Daxenbichler, M. E., Spencer, G. F., Carlson, D. G., Rose, G. B., Brinker, A. M., y Powell, R. G. (1991). Glucosinolate Composition of Seeds from 297 Species of Wild Plants. *Phytochemistry*, 30(8), 2623–2638.

Doebley, J. F., Gaut, B. S. y Smith, B.D. (2006) The molecular genetics of crop domestication, *Cell* 127, 1309–1321.

Dooner, H.K. (1995) Directed tagging of the Arabidopsis fatty acid elongation1 (FAE1) gene with maize transposon activator. *Plant Cel.* 7, 309–319.

Dörmann P. (2005). Membrane Lipids. Murphy D. J. *Plant Lipids – Biology, Utilization and Manipulation*. Blackwell Publishing. 123-163.

Dörmann P. y Benning C. (2002) Galactolipids rule in seed plants. *Trends Plant Sci*, 7 (3): 112-118.

Dorn, K. M., Fankhauser, J. D., Wyse, D. L., y Marks, M. D. (2013). De novo assembly of

the pennycress (*Thlaspi arvense*) transcriptome provides tools for the development of a winter cover crop and biodiesel feedstock. *The Plant Journal*, 75(6), 1028–1038.

- Dorn, K. M., Fankhauser, J. D., Wyse, D. L., y Marks, M. D.** (2015). A draft genome of field pennycress (*Thlaspi arvense*) provides tools for the domestication of a new winter biofuel crop. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 22(2), 121–31.
- Dorne A.J. y Heinz E.** (1989) Position and pairing of fatty-acids in phosphatidylglycerol from pea leaf chloroplasts and mitochondria. *Plant Sci.*, 60 (1): 39-46.
- Downey, R.K. y Röbbelen, G.** (1989) Brassica species. In *Oil Crops of the World* (Röbbelen, G., Downey, R.K and Ashri, A., eds) , pp. 339–362. McGraw-Hill, Inc, New York, NY.
- Doyle, J. J. y Doyle, J. L.** (19). Isolation of fresh DNA from fresh tissue. *Focus*(12), 13-15.
- Durrett TP, Benning C, Ohlrogge J** (2008) Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels. *Plant J* 54: 593–607
- Dyer J. M., Stymne S., Green A. G., Carlsson A. S.** (2008). High-value oils from plants. *Plant J.* 54, 640–655
- Dyer J.M. y Mullen R. T.** (2005) Development and potential of genetically engineered oilseeds. *Seed Science Research*, 15, 255-267.
- Eastmond, P.J., Quettier, A.L., Kroon, J.T., Craddock, C., Adams, N., y Slabas, A.R.** (2010). Phosphatidic acid phosphohydrolase 1 and 2 regulate phospholipid synthesis at the endoplasmic reticulum in Arabidopsis. *Plant Cell.* 22, 2796-2811.
- Eberle, C. a., Thom, M. D., Nemeč, K. T., Forcella, F., Lundgren, J. G., Gesch, R. W. y Eklund, J. J.** (2015). Using pennycress, camelina, and canola cash cover crops to provision pollinators. *Industrial Crops and Products*, 75, 20–25.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. & von Heijne, G.** (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 300, 1005–1016.
- Evenson, K.J. y Post-Beittenmiller, D.** (1995) Fatty acid-elongating activity in rapidly expanding leek epidermis. *Plant Physiol.* 109, 707–716.
- Evangelista, R. L., Isbell, T. A., y Cermak, S. C.** (2012). Extraction of pennycress (*Thlaspi arvense* L.) seed oil by full pressing. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 76–81.
- Fahey, J. W., Zalcmann, A. T., y Talalay, P.** (2000). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56, 5–51.
- Fan, J., Shonnard, D. R., Kalnes, T. N., Johnsen, P. B., y Rao, S.** (2013). A life cycle assessment of pennycress (*Thlaspi arvense* L.)-derived jet fuel and diesel. *Biomass and Bioenergy*, 55, 87–100.
- Fatemi S.H. y Hammond E.F.** (1977) Glyceride structure variation in soybean varieties: II silver ion chromatographic analysis. *Lipids* 12, 1037–1041.

- Fatihi, A., Zbierzak, A. M., y Dörmann, P.** (2013). Alterations in seed development gene expression affect size and oil content of Arabidopsis seeds. *Plant Physiology*, 163(2), 973–85.
- 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.
- Ferrer, J. L., Jez, J.M., Bowman, M.E., Dixon, R.A. & Noel, J.P.** (1999) Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nat. Struct. Biol.* 6, 775–784.
- Fehling, E. y Mukherjee, K. D.** (1991) Acyl-CoA elongase from a higher plant (*Lunaria annua*): metabolic intermediates of verylong-chain acyl-CoA products and substrate specificity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1082, 239–246.
- Fehling, E., Lessire, R., Cassagne, C. & Mukherjee, K.D.** (1992) Solubilization and Partial Purification of Constituents of Acyl-CoA Elongase from *Lunaria annua*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1126, 88–94.
- Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T., y Steber, C.** (2008) Molecular aspects of seed dormancy, *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 387–415.
- 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.
- Franzke, A., Lysak, M. a., Al-Shehbaz, I. a., Koch, M. a., y Mummenhoff, K.** (2011). Cabbage family affairs: The evolutionary history of Brassicaceae. *Trends in Plant Science*, 16(2), 108–116.
- Frentzen M.** (1993) Acyltransferases and triacylglycerols. In TS Moore, Jr, ed, *Lipid Metabolism in Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 195–231
- Frentzen M. y Wolter F.P.** (1998) Molecular biology of acyltransferases involved in glycerolipid synthesis. In: Harwood JL (ed) *Plant lipid biosynthesis*. Cambridge Univ Press, Cambridge, UK, pp 247-272
- 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.
- Frentzen M.** (1998). Acyltransferases from basic science to modified seed oils. *Fett - Lipid* 100, 161–166
- Fenwick, R., Heaney, R., Mullin, J., y VanEtten, C.** (1983). Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 18(2), 123–201.
- Furmanek, T., Demski, K., Banas, W., Haslam, R., Napier, J., Stymne, S. y Banas, A.** (2014) The utilization of the Acyl-CoA and the involvement PDAT and DGAT in the byosynthesis of erucic acid-rich tryacylglycerols in *Crambe* seed oil. *Lipids* 49, 327-333.

- Garcés R., Sarmiento C. y Mancha M.** (1992) Temperature regulation of oleate desaturase in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *Planta*, 186 (3): 461-465.
- 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.
- Gidda SK, Shockey JM, Rothstein SJ, Dyer JM, Mullen RT** (2009) *Arabidopsis thaliana* GPAT8 and GPAT9 are localized to the ER and possess distinct ER retrieval signals: functional divergence of the dilysine ER retrieval motif in plant cells. *Plant Physiol Biochem*, 47:867-879.
- Gidda, S. K., Shockey, J. M., Falcone, M., Kim, P. K., Rothstein, S. J., Andrews, D. W., Dyer, J. M., y Mullen, R. T.** (2011). Hydrophobic-domain-independent protein-protein interactions mediate the localization of GPAT enzymes to ER subdomains. *Traffic* 12, 452-472.
- Gietz R.D. y Woods R.A.** (1994) High-efficiency transformation in yeast, in molecular genetics of yeast: practical approaches. Johnson J.A. Oxford University Press. New York.: 121-134.
- Ghanevati, M., y Jaworski, J. G.** (2001) Active-site residues of a plant membrane-bound fatty acid elongase beta-ketoacyl-CoA synthase, FAE1 KCS. *Biochem. Biophys. Acta* 1530 77-85.
- Ghanevati, M. y Jaworski, J. G.** (2002) Engineering and mechanistic studies of the *Arabidopsis* FAE1 beta-ketoacyl-CoA synthase, FAE1 KCS, *Eur. J. Biochem.* 269 3531-3539.
- Girke, T., Todd, J., Ruuska, S., White, J., Benning, C., y Ohlrogge, J.** (2000). Microarray analysis of developing *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiol.* 124, 1570-1581.
- Graeber, K., Nakabayashi, K., Miatton, E., Leubner-Metzger, G. y Soppe, W.J.** (2012) Molecular mechanisms of seed dormancy, *Plant Cell Environ.* 35 (2012) 1769-1786.
- Gui MM, Lee KT, Bhatia S.** (2008) Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. Waste edible oil as biodiesel feedstock. *Energy*; 33:1646-53
- Gunstone F.D. y Harwood J.L.** (2007) Occurrence and characterisation of oils and fats. En *The Lipid Handbook*, 3ª Edición (Gunstone, F.D., Harwood, J.L. and Dijkstra, A.J., eds). Taylor & Francis Group (CRC Press), Boca Raton, pp. 37-142.
- Han, J., Lühs, W., Sonntag, K., Zähringer, U., Borchardt, D. S., Wolter, F. P., Heinz, E. y Frentzen, M.** (2001) Functional characterization of beta-ketoacyl-CoA synthase genes from *Brassica napus* L. *Plan. Mol. Biol.* 46, 229-239.
- Harvey, B.L. y Downey, R.K.** 1964. The inheritance of erucic acid content in rapeseed (*Brassica napus*). *Can. J. Plant Sci.* 44: 104-111.
- Harwood J.L.** (1996) Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochimica et Biophysica acta* 1301, 7 - 56.
- Harwood J.L.** (1997) Plant lipid metabolism. En *Plant Biochemistry* (Dey, P.M. y Harbone, J.B., eds). Academic Press, London, pps: 237 - 272.

- Harwood J.L.** (2007) Lipid Metabolism. En *The Lipid Handbook*, 3ª Edición (Gunstone, F.D., Harwood, J.L. and Dijkstra, A.J., eds). Taylor & Francis Group (CRC Press), Boca Raton, pp. 637 - 702.
- Haslam, T. M y Kunst, L.** (2013) Extending the story of very-long-chain fatty acid elongation. *Plant Science* 210, 93– 107.
- Haun W., Coffman A., Clasen B.M., Demorest Z.L., Lowy A., Ray E., Retterath A., Stoddard T., Juillerat A., Cedrone F., Mathis L., Voytas D.F. y Zhang F.** (2014) Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant Biotechnology Journal* 12, 934-940.
- Hazel J.R.** (1995) Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu Rev Physiol*, 57: 19-42
- Hitz W.D., Yadav N.S., Reiter R.J., Mauvis C.J. y Kinney A.J.** (1995) Reducing polyunsaturation in oils of transgenic canola and soybean. In: J.-C. Kader, P. Mazliak (Eds.), *Plant Lipid Metabolism*, 506-508. Kluwer Academic Publ., Netherlands.
- Hojilla-Evangelista, M. P., Evangelista, R. L., Isbell, T. A., y Selling, G. W.** (2013). Effects of cold-pressing and seed cooking on functional properties of protein in pennycress (*Thlaspi arvense* L.) seed and press cakes. *Industrial Crops and Products*, 45, 223–229.
- Hojilla-Evangelista, M. P., Selling, G. W., Berhow, M. A., y Evangelista, R. L.** (2015). Extraction, composition and functional properties of pennycress (*Thlaspi arvense* L.) press cake protein. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92(6), 905–914.
- Holman RT, Elmer OC.** The rates of oxidation of unsaturated fatty acids and esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 24, 127-129 (1947).
- Hu, Z., Ren, Z., y Lu, C.** (2012). The phosphatidylcholine diacylglycerol cholinephosphotransferase is required for efficient hydroxy fatty acid accumulation in transgenic Arabidopsis. *Plant Physiol.* 158, 1944–1954.
- Huang, A.H.C.** (1992). Oil bodies and oleosins in seeds. *Annu. Rev. Plant Phys.* 43, 177–200.
- Huang, W.J., Jia, J., Edwards, P., Dehesh, K., Schneider, G. y Lindqvist, Y.** (1998) Crystal structure of b-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II from *E. coli* reveals the molecular architecture of condensing enzymes. *EMBO J.* 17, 1183–1191.
- Hume, L.** (1984). The effect of seed maturity, storage on the soil surface, and burial on seeds of *Thlaspi arvense* L. *Canadian Journal of Plant Science*, 64, 961–969.
- Ichihara K., Takahashi T. y Fujii S.** (1988) Diacylglycerol acyltransferase in maturing safflower seeds: its influence on the fatty acid composition of triacylglycerol and on the rate of triacylglycerol synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 958, 125 - 129
- Imai, H., Hlousek-Radojic, A., Matthis, A. & Jaworski, J.** (1994) Elongation system involved in the biosynthesis of very long chain fatty acids in *Brassica napus* seeds: characterization and solubilization. In *Plant Lipids Metabolism* (Kader, J.-C & Mazliak, P., eds), pp. 118–120. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Irwin, J. A., Lister, C., Soumpourou, E., y Dean, C.** (2012) Functional alleles of the

flowering time regulator FRIGIDA in the Brassica oleracea genome, *BMC Plant Biol.* 12, 21.

- Isbell TA.** (2009) US efforts in the development of new crops (lesquerella, pennycress, coriander and cuphea). *Proc. J. Chevreul.* 16, 205-2010.
- Isbell, T. A., Cermak, S. C., Dierig, D. A., Eller, F. J., y Marek, L. F.** (2015a). Registration of Katelyn L. (Pennycress) with Improved Nondormant Traits. *Journal of Plant Registrations*, 9(2), 212.
- Isbell, T. A., Evangelista, R., Glenn, S. E., Devore, D. A., Moser, B. R., Cermak, S. C., y Rao, S.** (2015b). Enrichment of erucic acid from pennycress (*Thlaspi arvense* L.) Seed oil. *Industrial Crops and Products*, 66, 188–193.
- Jako C., Kumar A., Wei Y., Zou J., Barton D.L., Giblin E.M., Covello P.S. y Taylor D.C.** (2001) Seed-specific overexpression of an Arabidopsis cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight. *Plant Physiology* 126, 861–874.
- James, D.W. y Dooner, H.K.** (1990) Isolation of EMS-induced mutants in Arabidopsis altered in seed fatty acid composition, *Theor. Appl. Genet.* 80:241–245.
- James Jr., D. W., Lim, E., Keller, J., Plooy, I., Ralston, E. y Dooner, H. K.** (1995) Directed Tagging of the Arabidopsis FATTY ACID ELONGATION1 (FAEL) Gene with the Maize Transposon Activator *Plant Cell* 7:309–19.
- Jez, M., Ferrer, J. L., Bowman, M. E., Dixon, R. A. y Noel, J.P.** (2000) Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase, *Biochemistry* 39, 890–902.
- Johnsen P.** (2012) Creating a pennycress bioenergy Business [Internet]. USDA; <http://www.reeis.usda.gov/web/crisprojectpages/226419.html>.
- Johnston, J. S., Pepper y Alan., H.** (2005). Evolution of Genome Size in Brassicaceae. *Annals of Botany*, 95(1), 229–235.
- 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.
- Jolivet, P., Roux, E., d'Andrea, S., Davanture, M., Negroni, L., Zivy, M., y Chardot, T.** (2004). Protein composition of oil bodies in Arabidopsis thaliana ecotype WS. *Plant Physiol. Biochem.* 42, 501–509.
- Jones A., Davies H.M., Voelker T.A.** (1995) Palmitoyl - acyl carrier protein (ACP) thioesterase and the evolutionary origin of plant acyl - ACP thioesterases. *Plant Cell* 7, 359 - 371.
- Joubès, J., Raffaele, S., Bourdenx, B., Garcia, C., Laroche-Traineau, J., Moreau, P., Domerge, F. y Lessire, R.** (2008) The VLCFA elongase gene family in Arabidopsis thaliana: phylogenetic analysis. 3D modeling and expression profiling, *Plant Mol. Biol.* 67, 547–566.
- Katavic, V., Reed, D. W., Taylor, D. C., Giblin, E. M., Barton, D. L., Zou, J. T, Mackenzie, S. L., Covello, P. S. y Kunst, L.** (1995) Alteration of seed fatty-acid composition by an

ethyl methanesulfonate-induced mutation in *Arabidopsis-thaliana* affecting diacylglycerol acyltransferase activity. *Plant Physiol* 108:399-409.

- Katavic V, Friesen W, Barton DL, Gossen KK, Giblin EM, Luciw T, An J, Zou J, MacKenzie SL, Keller WA, Males D, Taylor DC** (2001). Improving erucic acid content in rapeseed through biotechnology: What can the *Arabidopsis* FAE1 and the yeast SLC1-1 genes contribute? *Crop Sci.* 41(3): 739-747.
- Katavic, V., Mietkiewska, E., Barton, D. L., Giblin, E. M., Reed, D. W. y Taylor, D. C.** (2002) Restoring enzyme activity in non-functional low erucic acid *Brassica napus* fatty acid elongase 1 by a single amino acid substitution. *Eur. J. Biochem.* 269, 5625-5631.
- Katavic, V., Barton, D. L., Giblin, M., Reed, D.W., Kumar A. y Taylor, D. C.** (2004) Gaining insight into the role of serine 282 in *B. napus* FAE1 condensing enzyme. *FEBS Lett.* 562, 118-124.
- Karmakar A, Karmakar S y Mukherjee S.** (2010) Properties of various plants and animals feedstocks for biodiesel production. *Bioresour Technol* 2010;101:7201–10.
- Kaspar, T. C., Jaynes, D. B., Parkin, T. B., y Moorman, T. B.** (2007). Rye Cover Crop and Gamagrass Strip Effects on NO Concentration and Load in Tile Drainage. *Journal of Environment Quality*, 36(5), 1503.
- Kaspar, T. C., Jaynes, D. B., Parkin, T. B., Moorman, T. B., y Singer, J. W.** (2012). Effectiveness of oat and rye cover crops in reducing nitrate losses in drainage water. *Agricultural Water Management*, 110(3), 25–33.
- Kaup, M.T., Froese, C.D., and Thompson, J.E.** (2002). A role for diacylglycerol acyltransferase during leaf senescence. *Plant Physiol.* 129, 1616–1626.
- Kim, H.U., Hsieh, K., Ratnayake, C., and Huang, A.H.C.** (2002). A novel group of oleosins is present inside the pollen of *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 277, 22677–22684.
- Kim, H.U., y Huang, A.H.C.** (2004). Plastid lysophosphatidyl acyltransferase is essential for embryo development in *arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134, 1206–1216.
- Kim, H. U., Lee, K.-R., Go, Y. S., Jung, J. H., Suh, M. C., y Kim, J. B.** (2011). Endoplasmic reticulumlocated PDAT1-2 from castor bean enhances hydroxy fatty acid accumulation in transgenic plants. *Plant Cell Physiol.* 52, 983–993.
- Kladivko, E. J., Frankenberger, J. R., Jaynes, D. B., Meek, D. W., Jenkinson, B. J., y Fausey, N. R.** (2004). Nitrate leaching to subsurface drains as affected by drain spacing and changes in crop production system. *Journal of Environmental Quality*, 33(5), 1803–1813.
- Knothe G, Matheaus AC y Ryan TW** (2003) Cetane numbers of branched and straight-chain fatty esters determined in an ignition quality tester. *Fuel* 82, 971-975.
- Knothe G.** Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Process Technol.* 86, 1059-1070 (2005).
- Knothe G.** “Designer” biodiesel: optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. *Energy fuels*, 22, 1358-1364 (2008)
- Knothe G.** Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty acid composition. *Energ.*

Environ. Sci. 2, 759-766 (2009).

- Knothe G, Steidley KR.** Kinematic viscosity of biodiesel fuel components and related compounds. Influence of compound structure and comparison to petrodiesel fuel components. *Fuel* 84, 1059-1065 (2005)
- Knutzon D.S., Lardizabal K.D., Nelsen J.S., Bleibaum J.L., Davies H.M. y Metz J.G.** (1995) Cloning of a coconut endosperm cDNA encoding a 1 - acyl - sn - glycerol - 3 - phosphate acyltransferase that accepts medium - chain - length substrates. *Plant Physiology* 109, 999 - 1006.
- Knutzon D.S., Thompson G.A., Radke S.E., Johnson W.B., Knauf V.C. y Kridl J.C.** (1992) Modification of Brassica seed oil by antisense expression of a stearyl - acyl carrier protein desaturase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 2624 - 2628
- Knutzon D. S., Hayes T. R., Wyrick A., Xiong H., Maelor Davies H., Voelker T. A.** (1999). Lysophosphatidic acid acyltransferase from coconut endosperm mediates the insertion of laurate at the sn-2 position of triacylglycerols in lauric rapeseed oil and can increase total laurate levels. *Plant Physiol.* 120, 739–746
- 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.
- Kroon J.T.M., Wei W., Simon W.J. y Slabas A.R.** (2006) Identification and functional expression of a type 2 acyl - CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT2) in developing castor bean seeds which has high homology to the major triglyceride biosynthetic enzyme of fungi and animals. *Phytochemistry* 67, 2541 - 2549.
- Kunst, L., Taylor, D.C. y Underhill, E.W.** (1992) Fatty acid elongation in developing sedes of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol. Biochem.* 30, 425–434.
- Lacombe S., Souyris I. y Bervillé A.J.** (2009) An insertion of oleate desaturase homologous sequence silences via siRNA the functional gene leading to high oleic acid content in sunflower seed oil. *Molecular Genetics and Genomics* 281, 43-54.
- Lal, R., Regnier, E., Eckert, D. J., Edwards, W. M., y Hammond, R.** (1991). Expectations of cover crops for sustainable agriculture. *Cover Crops for Clean Water*, (c), 1–11.
- Lassner M.W., Levering C.K., Davies H.M. y Knutzon D.S.** (1995) Lysophosphatidic acid acyltransferase from meadowfoam mediates insertion of erucic acid at the sn - 2 position of triacylglycerol in transgenic rapeseed oil. *Plant Physiology* 109, 1389 - 1394.
- Lassner, M. W., Lardizabal, K. y Metz, J.G.** (1996) A Jojoba P-Ketoacyl-CoA Synthase cDNA Complements the Canola Fatty Acid Elongation Mutation in Transgenic Plants. *Plant Cell* 8:281–92.
- Laurent P. y Huang A.H.C.** (1992) Organ - and development - specific acyl coenzyme A lysophosphatidate acyltransferases in palm and meadowfoam. *Plant Physiology* 99, 1711 - 1715.
- Lee, J., Welti, R., Schapaugh, W. T., y Trick, H. N.** (2011). Phospholipid and

triacylglycerol profiles modified by PLD suppression in soybean seed. *Plant Biotechnol. J.* 9, 359–372

- 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.
- Leonard, C.** (1994). Sources and commercial applications of high erucic vegetable oils. *Lipid Tech*, 79–83.
- Lessire, R., Juguelin, H., Moreau, P. y Cassagne, C.** (1985a) Nature of the reaction product of [1-14C]stearoyl-CoA elongation by etiolated leek seedling microsomes, *Arch. Biochem. Biophys.* 239 260–269.
- Lessire, R., Bessoule, J.-J. y Cassagne, C.** (1985b) Solubilization of C18-CoA and C20-CoA elongases from *Allium porrum* L. epidermal cell microsomes, *FEBS Lett.* 187:314–320.
- Lessire, R., Bessoule, J.-J. y Cassagne, C.** (1989) Involvement of a b-ketoacyl-CoA intermediate in acyl-CoA elongation by an acyl-CoA elongase purified from leek epidermal cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1006, 35–40.
- Leung DYC, Wu X, Leung MKH.** (2010) A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Appl Energy*; 87:1083–95.
- 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 R., Yu K. y Hildebrand D.F.** (2010a) DGAT1, DGAT2 and PDAT expression in seeds and other tissues of epoxy and hydroxy fatty acid accumulating plants. *Lipids* 45, 145– 157.
- Li, R., Yu, K., Hatanaka, T., y Hildebrand, D. F.** (2010b). *Vernonia* DGATs increase accumulation of epoxy fatty acids in oil. *Plant Biotechnol. J.* 8, 184–195
- Li R., Yu K., Wu Y., Tateno M., Hatanaka T., Hildebrand D. F.** (2012). *Vernonia* DGATs can complement the disrupted oil and protein metabolism in epoxygenase-expressing soybean seeds. *Metab. Eng.* 14, 29–38
- Li, X. , van Loo, E. N., Gruber, J., Fan, J., Guan, R., Frentzen, M., Stymne, S. y Zhu, L., H.** (2012) Development of ultra - high erucic acid oil in the industrial oil crop *Crambe abyssinica*. *Plant Biotechnology Journal* 10, 862-870.
- 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.** (2010) Acyl - lipid metabolism, in: Last, R. (ed.), *The Arabidopsis Book*, The American Society of Plant Biologists.
- 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.
- Liu Q., Singh S. y Green A.** (2002a) High-oleic and high-stearic cottonseed oils: Nutritionally

improved cooking oils developed using gene silencing. *Journal of the American College of Nutrition* 21, 205-211.

- Liu Q., Singh S. y Green A.** (2002) High - Stearic and High - Oleic Cottonseed Oils Produced by Hairpin RNA - Mediated Post - Transcriptional Gene Silencing. *Plant Physiology* 129, 1732–1743. (2002b)
- Liu, Q., Siloto, R.M.P., Lehner, R., Stone, S.J. y Weselake, R. J.** (2012) Acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase: molecular biology, biochemistry and biotechnology. *Prog Lipid Res*, 51:350-377.
- Liu, J., Hua, W., Zhan, G., Wei, F., Wang, X., Liu, G., y Wang, H.** (2010). Increasing seed mass and oil content in transgenic *Arabidopsis* by the overexpression of *wri1*- like gene from *Brassica napus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(1), 9–15.
- Lööf, B. y Appleqvist, L.** 1972. Plant breeding for improved yield and quality. In: L. Appleqvist and R. Ohlson (Eds.) *Rapeseed*, Elsevier, Amsterdam, pp. 101–122.
- Lu, C. L., Bayon de Noyer, S., Hobbs, D. H., Kang, J., Wen, Y., Krachtus, D. y Hills, M.** (2003) Expression pattern of diacylglycerol acyltransferase 1, an enzyme involved in triacylglycerol biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 52, 31-41.
- Lu, C., Xin, Z., Ren, Z., Miquel, M., y Browse, J.** (2009). An enzyme regulating triacylglycerol composition is encoded by the *ROD1* gene of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 18837–18842
- Lu C. F., Napier J. A., Clemente T. E., Cahoon E. B.** (2011). New frontiers in oilseed biotechnology: meeting the global demand for vegetable oils for food, feed, biofuel, and industrial applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 252–259
- Lung S.C. y Weselake R.J.** (2006) Diacylglycerol acyltransferase: a key mediator of plant triacylglycerol synthesis. *Lipids* 41, 1073–1088.
- Lühs, W.W, Voss, A., Han, J., Gräfin zu Münster, A., Weier, D., Wolter, F.P., Frentzen, M. and Friedt, W.** (1999) Genetic modification of erucic acid biosynthesis in *Brassica napus*. In: G.T.S. Mugnozza, E. Porceddu and M.A. Pagnotta (Eds.) *Genetics and Breeding for Crop Quality and Resistance (Developments in Plant Breeding Vol. 8)*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 323–330.
- Lynch, D.V.** (1993) Sphingolipids. In *Lipid Metabolism in Plants* (Thomas, S, Moore, J., eds), pp. 286–308. CRC Press, Inc, Boca Raton, FL.
- Martin, C.R.** (1993) Structure, function, and regulation of the chalcone synthase. *International Review of Cytology – a Survey of Cell Biology*, Vol. 147 (Jeon, K.W. & Jarvik, J., eds), pp. 233–284. Academic Press Inc, San Diego, CA, USA.
- Matthies, D.** (1990). Plasticity of reproductive at different stages components of development in the annual plant *Thlaspi arvense* L. *Oecologia*, 83(1), 105–116.
- McConn, M., Hugly, S., Browse, J. y Somerville, C.** (1994). A Mutation at the *fad8* Locus of *Arabidopsis* Identifies a Second Chloroplast [ω]-3 Desaturase. *Plant 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.

- Mentzen, W.I., Peng, J.L., Ransom, N., Nikolau, B.J., and Wurtele, E.S.** (2008). Articulation of three core metabolic processes in Arabidopsis: Fatty acid biosynthesis, leucine catabolism and starch metabolism. *BMC Plant Biol.* 8: 76.
- Merrill, A.H.J., Schmelz, E.M., Wang, E., Dillehay, D.L., Rice, L.G., Meredith, F. & Riley, R.T.** (1997) Importance of sphingolipids and inhibitors of sphingolipid metabolism as components of animal diets. *J. Nutrition* 127, 830S–833S.
- Mhaske, V., Beldjilali, K., Ohlrogge, J. y Pollard, M.** (2005) Isolation and characterization of an Arabidopsis thaliana knockout line for phospholipid: diacylglycerol transacylase gene (At5g13640). *Plant Physiol Biochem* 2005, 43:413-417.
- Mietkiewska E, Giblin EM, Wang S, Barton DL, Dirpaul J, Brost JM, Katavic V, Taylor DC** (2004). Seed specific heterologous expression of a nasturtium FAE gene in Arabidopsis results in a dramatic increase in the proportion of erucic acid. *Plant Physiol.* 136: 2665- 2675.
- Mietkiewska E, Brost JM, Giblin EM, Barton DL, Taylor DC** (2007). Cloning and functional characterization of the fatty acid elongase 1 (FAE1) gene from high erucic *Crambe abyssinica* cv. Prophet. *Plant Biotechnol.* 5(5): 636-645.
- Millar, A.A. y Kunst, L.** (1997) Very-long-chain fatty acid biosynthesis is controlled through the expression and specificity of the condensing enzyme. *Plant J.* 12, 121–131.
- Millar, A. A., Smith, M. A., y Kunst, L.** (2000). All fatty acids are not equal: discrimination in plant membrane lipids. *Trends Plant Sci.* 5, 95–101.
- Millar, A.A., Wrischer, M. and Kunst, L.** (1998) Accumulation of very-long-chain fatty acids in membrane glycerolipids is associated with dramatic alterations in plant morphology. *Plant Cell* 11: 1889–1902.
- Miller J.H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
- 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.
- Miquel M. y Browse J.** (1995) Lipid biosynthesis in developing seeds. In: Kigel J, Galili G, editors. Seed development and germination. New York: Marcel Dekker; 1995. p. 169–93.
- Misra A., Khan K., Niranjana A., Nath P. y Sane V.A.** (2013) Over-expression of JcDGAT1 from *Jatropha curcas* increases seed oil levels and alters oil quality in transgenic Arabidopsis thaliana. *Phytochemistry* 96, 37-45.
- Moreau, R. A., y Stumpf, P. K.** (1981). Recent studies of the enzymic synthesis of ricinoleic acid by developing castor beans. *Plant Physiol.* 67, 672–676.
- 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.

- Moser RB.** (2009) Biodiesel production, properties, and feedstocks. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant* 45, 229-266.
- Moser RB.** (2012) Biodiesel from alternative oilseed feedstocks: camelina and field pennycress. *Biofuels* 3(2), 193-209.
- Moser BR, Knothe G, Vaughn SF y Isbell TA.** (2009a) Production and evaluation of biodiesel from field pennycress (*Thlaspi arvense* L.). *Oil, Energy Fuel* 23:4149–55.
- Moser RB, Shah SN, Winkler-Moser JK, Vaughn SF, Evangelista RL.** (2009b) Composition and physical properties of cress (*Lepidium sativum* L.) and field pennycress (*Thlaspi arvense* L.) oils. *Ind. Crops Prod.* 30, 199-205.
- Mu, J., Tan, H., Zheng, Q., Fu, F., Liang, Y., Zhang, J., Yang, X., Wang, T., Chong, K., Wang, X., y Zuo, J.** (2008). LEAFY COTYLEDON1 is a key regulator of fatty acid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 148, 1042–1054.
- 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.
- Murphy DJ,** ed. 2005. *Plant lipids: biology, utilization and manipulation.* Oxford: Blackwell
- Napier J. A.** (2007) The production of unusual fatty acids in transgenic plants. *The Annual Review of Plant Biology* 58, 295 - 319
- Nerlich A., von Orlow M., Rontein D., Hanson A.D. y Dormann P.** (2007) Deficiency in phosphatidylserine decarboxylase activity in the psd1 psd2 psd3 triple mutant of Arabidopsis affects phosphatidylethanolamine accumulation in mitochondria. *Plant Physiol*, 144 (2): 904-914.
- Nesi, N., Delourme, R., Bregeon, M., Falentin, C. y Renard, M.** (2008) Genetic and molecular approaches to improve nutritional value of Brassica napus L. seed, *C.R. Biol.* 331, 763–771.
- Nguyen H. T., Mishra G., Whittle E., Bevan S. A., Merlo A. O., Walsh T. A., Shanklin J.** (2010). Metabolic engineering of seeds can achieve levels of ω -7 fatty acids comparable with the highest levels found in natural plant sources. *Plant Physiol.* 154, 1897–1904
- Nikolau B.J., Ohlrogge J.B. y Wurtele E.S.** (2003) Plant biotin - containing carboxylases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 414, 211 - 222.
- No SY.** (2011) Inedible vegetable oils and their derivatives for alternative diesel fuels in CI engines: a review. *Renew Sustain Energy Rev* 2011;15:131–49.
- 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.
- Ohlrogge J.B., Browse J. y Somerville C.R.** (1991) The genetics of plant lipids. *Biochim Biophys Acta*, 1082 (1): 1-26.
- 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.

- OiQuin, J. B., Bourassa, L., Zhang, D. Y., 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, 21781-21796.
- Olsen, J.G., Kadziola, A., von Wettstein-Knowles, P., Siggaard-Andersen, M., Lindquist, Y. y Larsen, S.** (1999) The X-ray crystal structure of b-ketoacyl [acyl carrier protein] synthase I. *FEBS Lett.* 460, 46–52.
- Pantalone V.R., Wilson R.F., Novitzky W.P. y Burton J.W.** (2002) Genetic regulation of elevated stearic acid concentration in soybean oil. *Journal Of The American Oil Chemists Society* 79, 549–553
- Pérez - Vich B., Leon A. J., Grondona M., Velasco L., y Fernández - Martínez J. M.** (2006) Molecular analysis of the high stearic acid content in sunflower mutant CAS - 14. *Theoretical and Applied Genetics* 112, 867–875.
- Persson, B. y Argos, P.** (1994) Prediction of transmembrane segments in proteins utilising multiple sequence alignments. *J. Mol. Biol.* 237, 182–192.
- Phippen, W., Gallant, J., y Phippen, M.** (2010). Evaluation of Planting Method and Seeding Rates with Field Pennycress (*Thlaspi arvense* L.). <http://www.wiu.edu/pennycress/current-experiments/Plant%20Density%202010.pdf> on January 24, 2017.
- Phippen, W. B., y Phippen, M. E.** (2012). Soybean Seed Yield and Quality as a Response to Field Pennycress Residue. *Crop Science*, 52(6), 2767.
- Pimentel, D., Marklein, A., Toth, M. A., Karpoff, M. N., Paul, G. S., McCormack, R., Krueger, T.** (2009). Food Versus Biofuels: Environmental and Economic Costs. *Human Ecology*, 37(1), 1–12.
- Porter NA, Caldwell Se y Mills KA.** Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* 30, 277-290 (1995).
- Post-Beittenmiller, D., Roughan, G., y Ohlrogge, J.B.** (1992). Regulation of plant fatty acid biosynthesis: Analysis of acyl-coenzyme A and acyl-acyl carrier protein substrate pools in spinach and pea chloroplasts.
- Post-Beittenmiller, D.** (1996) Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Ann. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* 47, 405–430.
- Price, J.S., Hobson, R.N., Neale, M.A. y Bruce, D.M.** (1996) Seed losses in commercial harvesting of oilseed rape, *J. Agr. Eng. Res.* 65, 183–191.
- Qian J., Shi H. y Yun Z.** (2010) Preparation of biodiesel from *Jatropha curcas* L. oil produced by two-phase solvent extraction. *Bioresource Technology* 101(18):7036-42
- Robertson, D. M., Schwarz, G. E., Saad, D. A., y Alexander, R. B.** (2009). Incorporating uncertainty into the ranking of SPARROW model nutrient yields from Mississippi/Atchafalaya River basin watersheds. *Journal of the American Water Resources Association*, 45(2), 534–549.

- 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.
- Roesler K., Shintani D., Savage L., Boddupalli S. y Ohlrogge J.** (1997) Targeting of the Arabidopsis homomeric acetyl-coenzyme A carboxylase to plastids of rapeseeds. *Plant Physiology* 113, 75–81.
- 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.
- 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.
- 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. *Plant Cell* 14, 1191–1206.
- Russell N.J.** (1984) Mechanisms of thermal adaptation in bacteria: blueprints for survival. *Trends In Biochemical Sciences*, 9 (3): 108-112.
- Saha S., Enugutti B., Rajakumari S. y Rajasekharan R.** (2006) Cytosolic triacylglycerol biosynthetic pathway in oilseeds. Molecular cloning and expression of peanut cytosolic diacylglycerol acyltransferase. *Plant Physiology* 141, 1533 - 1543.
- Saini, H. S., Bassi, P. K., Goudey, J. S., y Spencer, M. S.** (2016)., and Environmental Factors Linked references are available on JSTOR for this article : Breakage of Seed Dormancy of Field Pennycress (*Thlaspi arvense*) by Growth Regulators, Nitrate, and Environmental Factors, 35(6), 802–806.
- 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.
- Santos-Mendoza, M., Dubreucq, B., Baud, S., Parcy, F., Caboche, M., y Lepiniec, L.** (2008). Deciphering gene regulatory networks that control seed development and maturation in Arabidopsis. *Plant J.* 54, 608–620.
- Schnable, P. S., Ware, D., Fulton, R. S., Stein, J. C., Wei, F., Pasternak, S., ... Wilson, R. K.** (2009). The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics. *Science*, 326(5956), 1112–1115.
- Sedbrook, J. C., Phippen, W. B., y Marks, M. D.** (2014). Review: New approaches to facilitate rapid domestication of a wild plant to an oilseed crop: example pennycress (*Thlaspi arvense L.*). *Plant Science*, 227, 122
- Selling, G. W., Hojilla-Evangelista, M. P., Evangelista, R. L., Isbell, T., Price, N., y Doll, K. M.** (2013). Extraction of proteins from pennycress seeds and press cake. *Industrial Crops and Products*, 41, 113–119.
- Shen B, Allen WB, Zheng PZ, Li CJ, Glassman K, Ranch J, Nubel D y Tarczynski MC** (2010) Expression of ZmLEC1 and ZmWRI1 Increases Seed Oil Production in Maize. *Plant Physiol* 153:980-987.

- Shockey J. M., Gidda S. K., Chapital D. C., Kuan J. C., Dhanoa P. K., Bland J. M., Rothstein S. J., Mullen R. T. y Dyer J. M.** (2006) Tung tree DGAT1 and DGAT2 have nonredundant functions in triacylglycerol biosynthesis and are localized to different subdomains of the endoplasmic reticulum. *Plant Cell* 18, 2294 - 2313
- Shofran, B. G., Purrington, S. T., Breidt, F., y Fleming, H. P.** (1998). Antimicrobial Properties of Sinigrin and its Hydrolysis Products. *Journal of Food Science*, 63(4), 1996–1999.
- Siebertz H.P., Heinz E., Joyard J. y Douce R.** (1980) Labelling in vivo and in vitro of molecular species of lipids from chloroplast envelopes and thylakoids. *Eur J Biochem*, 108 (1): 177-185.
- Sindelar, A. J., Schmer, M. R., Gesch, R. W., Forcella, F., Eberle, C. A., y Sindelar, N.** (2015). Winter oilseed production for biofuel in the U.S. Corn Belt: Opportunities and limitations, 1–17.
- Singer, S. J. y Nicolson, G. L.** (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023), 720-731.
- Slack, C. R., Campbell, L. C., Browse, J. A., and Roughan, P. G.** (1983). Some evidence for the reversibility of the cholinephosphotransferase-catalysed reaction in developing linseed cotyledons in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 754, 10–20.
- Slack, C. R., Roughan, P. G., and Balasingham, N.** (1978). Labeling of glycerolipids in cotyledons of developing oilseeds by [1-C-14]acetate and [2-H-3]glycerol. *Biochem. J.* 170, 421–433.
- Smith, R. A., y Crowe, S. P.** (1987). Fanweed toxicosis in cattle: case history, analytical method, suggested treatment, and fanweed detoxification. *Veterinary and Human Toxicology*, 29(2), 155–156.
- 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., Grissem W. y Jones R. L. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plants Physiologists. 456-527.
- Sovero, M.** (1993). Rapeseed, a new oilseed crop for the United States. Wiley, New York.
- Sperling, P., Linscheid, M., Stocker, S., Muhlbach, H. P., y Heinz, E.** (1993). In-vivo desaturation of cis-delta-9-monounsaturated to cis-delta-9,12-diunsaturated alkenylether glycerolipids. *J. Biol. Chem.* 268, 26935–26940.
- 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.
- Stahl U, Carlsson AS, Lenman M, Dahlqvist A, Huang BQ, Banas W, Banas A y Stymne S** (2004) Cloning and functional characterization of a phospholipid: diacylglycerol acyltransferase from Arabidopsis. *Plant Physiol* 135:1324-1335.
- Strock, J. S., Porter, P. M., y Russelle, M. P.** (2004). Cover cropping to reduce nitrate loss through subsurface drainage in the northern U.S. corn belt. *Journal of*

Environmental Quality, 33(3), 1010–1016.

- Sun X., Pang H., Guo H., Yan Q. y Hang Y.** (2013) Evolutionary pattern of the FAE1 gene in Brassicaceae and its correlation with the erucic trait. *PLoS One* 8, 1-12.
- Suzuki, M., y McCarty, D.R.** (2008). Functional symmetry of the B3 network controlling seed development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 548–553.
- Stefansson, B.R., Hougen, F.W. and Downey, R.K.** (1961) Note on the isolation of rape plants with seed oil free from erucic acid. *Can. J. Plant Sci.* 41: 218–219.
- Stubbs C.D. y Smith A.D.** (1984) The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Reviews on Biomembranes*, 779 (1): 89-137.
- Stymne, S., y Stobart, A. K.** (1984). Evidence for the reversibility of the acyl-coA lysophosphatidylcholine acyltransferase in microsomal preparations from developing safflower (*Carthamus tinctorius* L) cotyledons and rat-liver. *Biochem. J.* 223, 305–314.
- Stymne, S., and Stobart, A.** (eds.). (1987). *Triacylglycerol Biosynthesis*. New York: Academic Press.
- Tadege M, Sheldon CC, Helliwell CA, Stoutjesdijk P, Dennis ES y Peacock WJ.** (2001) Control of flowering time by FLC orthologues in *Brassica napus*, *Plant J.* 28, 545–553.
- Tai, H. Y. y Jaworski, J. G.** (1993) 3-Ketoacyl-acyl carrier protein synthase-III from spinach (*Spinacia oleracea*) is not similar to other condensing enzymes of fatty acid synthase. *Plant Physiol.* 103, 1361–1367.
- Taylor, D. C. , Zhang, Y., Kumar, A., Francis, T., Giblin, E. M. y Barton, D. L.** (2009) Molecular modification of triacylglycerol accumulation by over-expression of DGAT1 to produce canola with increased seed oil content under field conditions. *Botany* 87: 533–43.
- Thompson, K., y Hodgson, J. G.** (1993). Seed size and shape predict persistence in soil. *British Ecological Society*, 7(2), 236–241.
- To, A., Joubès, J., Barthole, G., Lècureuil, A., Scagnelli, A., Jasinski, S., Lepiniec, L. Y Baud, S.** (2012) WRINKLED transcription factors orchestrate tissue-specific regulation of fatty acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 2012, 24:5007-5023.
- Toole, E. H., y Brown, E.** (1946). Final Results of the Duvel Buried Seed Experiment. *Journal of Agricultural Research*, 72, 201–10.
- Töpfer R., Martini N. y Schell J.** (1995) Modification of Plant Lipid Synthesis. *Science* 268, 681-686.
- USDA-ARS.** (n.d.). USDA-ARS U.S. National Plant Germplasm System; North Central Regional PI System; Regional Plant Introduction Station Ames, IA. Retrieved January 19, 2016. https://npgsweb.arsgrin.gov/gringlobal/view2.aspx?dv=web_site_taxon_accessionlist¶ms=:taxonomyid=105522;:siteid=16
- van Erp H., Kelly A.A., Menard G. y Eastmond P.J.** (2014) Multigene engineering of triacylglycerol metabolism boosts seed oil content in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*

165, 30-36.

- van Besouw A. y Wintermans J.F.** (1978) Galactolipid formation in chloroplast envelopes I. Evidence for two mechanisms in galactosylation. *Biochim Biophys Acta*, 529 (1): 44-53.
- Vandeloo, F.J., Broun, P., Turner, S., y Somerville, C.** (1995). Anoleate 12-hydroxylase from *Ricinus communis* L. is a fatty acyl desaturase homolog. *Proc. Natl.*
- Vaughn SF, Isbell TA, Weisleder D, Berhow MA.** (2005) Biofumigant compounds released by field pennycress (*Thlaspi arvense*) seedmeal. *J. Chem. Ecol.* 31, 167-177.
- Vaughn, S. F., Palmquist, D. E., Duval, S. M., y Berhow, M. A.** (2006). Herbicidal activity of glucosinolate-containing seedmeals. *Weed Science*, 54(4), 743–748.
- Venegas - Calerón M., Sayanova O. y Napier J.A.** (2010) An alternative to fish oils: metabolic engineering of oil - seed crops to produce omega - 3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Progress in Lipid Research* 49, 108 - 119.
- Venkateswari, J., Kanrar, S., Kirti, P. B., Malathi, V. G. y Chopra, V. L.** (1999) Molecular Cloning and Characterization of *FATTY ACID ELONGATION1 (BjFAE1)* Gene of *Brassica juncea*. *J Plant Biochem Biotech* 8:53–5.
- 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.
- Vogel G. y Browse J.** (1996) Cholinephosphotransferase and diacylglycerol acyltransferase. *Plant Physiology* 110, 923–931.
- Voelker T.A., Hayes T.R., Cranmer A.C. y Davies H.M.** (1996) Genetic engineering of a quantitative trait: metabolic and genetic parameters influencing the accumulation of laurate in rapeseed. *The Plant Journal* 9, 229–241
- von Wettstein-Knowles, P.** (1982) Elongases and epicuticular wax biosynthesis, *Physiol. Veg.* 20:797–809.
- Wallis J.G. y Browse J.** (2002) Mutants of Arabidopsis reveal many roles for membrane lipids. *Prog Lipid Res*, 41 (3): 254-278.
- Walton J.** The fuel possibilities of vegetable oils. *Gas Oil Power* 1938;33:167–8.
- Warwick, S. I., Francis, A., y Susko, D. J.** (2002). The biology of Canadian weeds. 9. *Thlaspi arvense* L. (updated). *Can. J. Plant Sci.*, 82, 803–823.
- Weier, D., Hanke, C., Eickelkamp, A., Lühs, W., Dettendorfer, J., Schaffert, E., Möllers, C., Friedt, W., Wolter, F.P. and Frentzen, M.** 1997. Trierucoylglycerol biosynthesis in transgenic plants of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Fett/Lipid* 99: 160–165.
- Weiss S. B., Kennedy E. P.** (1956). The enzymatic synthesis of triglycerides. *J. Am. Chem. Soc.* 78, 3550–3550
- Weselake R.J., Shah S., Taylor D.C., Zou J.-T., Laroche A., Moloney M.M., Rakow G., Raney J.P. y Harwood J.L.** (2007) Transformation of *Brassica napus* with diacylglycerol acyltransferase-1 results in increased seed oil content. In *Current*

Advances in the Biochemistry and Cell Biology of Plant Lipids, Proceedings of the 17th International Symposium on Plant Lipids. Edited by C. Benning and J. Ohlrogge. Aardvark Global Publishing Company, LLC, Salt Lake City, Utah. pp. 232–234.

- Weselake R.J., Shah S., Tang M., Quant P.A., Snyder C.L., Furukawa-Stoffer T.L., Zhu W., Taylor D.C., Zou J., Kumar A., Hall L., Laroche A., Rakow G., Raney P., Moloney M.M., y Harwood J.L.** (2008) Metabolic control analysis is helpful for informed genetic manipulation of oilseed rape (*Brassica napus*) to increase seed oil content. *The Journal of Experimental Botany* 59, 3543–3549.
- Weselake R.J., Taylor D.C., Rahman M.H., Shah S., Laroche A., McVetty P.B. y Harwood J.L.** (2009) Increasing the flow of carbon into seed oil. *Biotechnology Advances* 27, 866–878
- Wu, G., Wu, Y., Xiao, L., Li, X., y Lu, C.** (2008). Zero erucic acid trait of rapeseed (*Brassica napus* L.) results from a deletion of four base pairs in the fatty acid elongase 1 gene. *Theoretical and Applied Genetics*, 116(4), 491–499.
- Würschum T, Liu W, Maurer HP, Abel S, Reif JC** (2012) Dissecting the genetic architecture of agronomic traits in multiple segregating populations in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet* 124: 153–161
- 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.
- Xu, J., Carlsson, A., Francis, T., Zhang, M., Hoffmann, T., Giblin, M., y Taylor, D.** (2012). Triacylglycerol synthesis by PDAT1 in the absence of DGAT1 activity is dependent on reacylation of LPC by LPCAT2. *BMC Plant Biol.* 12, 4..
- 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.
- 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, W., Simpson, J. P., Li-Beisson, Y., Beisson, F., Pollard, M. y Ohlrogge, J. B.** (2012) A land plant-specific glycerol-3-phosphate acyltransferase family in *Arabidopsis*: substrate specificity, sn-2 preference, and evolution. *Plant Physiol* 2012, 160:638-652.
- Yen C.L., Stone S.J., Koliwad S., Harris C. y Farese R.V.Jr.** (2008) Thematic review series: Glycerolipids. Dgat enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *The Journal of Lipid Research* 49, 2283–2301.
- Zebarjad A, Javaran MJ, Karimzadeh G, Moeini A, Mousavi A, Salmanian AH** (2006). Transformation of rapeseed (*Brassica napus* L.) plants with sense and antisense constructs of the fatty acid elongase gene. *Iran J. Biotechnol.* 4(2): 79-87.

- 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.
- Zhang P., Burton J.W., Upchurch R.G., Whittle E., Shanklin J. y Dewey R.E.** (2008) Mutations in a D9 - stearoyl - ACP - desaturase gene are associated with enhanced stearic acid levels in soybean seeds. *Crop Science* 48, 2305–2313
- Zhang M, Fan J, Taylor DC, Ohlrogge JB** (2009) DGAT1 and PDAT1 Acyltransferases have overlapping functions in *Arabidopsis* triacylglycerol biosynthesis and are essential for normal pollen and seed development. *Plant Cell* 2009, 21:3885-3901.
- Zou, J. T., Wei, Y. D., Jako, C., Kumar, A., Selvaraj, G. y Taylor, D. C.** (1999) The *Arabidopsis thaliana* TAG1 mutant has a mutation in a diacylglycerol acyltransferase gene. *Plant J* 19:645-653.

ANEXO: PUBLICACIONES



Identification of target genes and processes involved in erucic acid accumulation during seed development in the biodiesel feedstock Pennycress (*Thlaspi arvense* L.)



Ana Claver^a, Raquel Rey^b, M. Victoria López^c, Rafael Picorel^a, Miguel Alfonso^{a,*}

^a Department of Plant Nutrition, Estación Experimental de Aula Dei-CSIC, Avda. Montañana 1005, 50059, Zaragoza, Spain

^b Laboratorio Agroambiental, Gobierno de Aragón, Avda. Montañana 1005, 50071, Zaragoza, Spain

^c Department of Soil and Water, Estación Experimental de Aula Dei-CSIC, Avda. Montañana 1005, 50059, Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 July 2016

Received in revised form 7 October 2016

Accepted 9 October 2016

Available online 18 November 2016

Keywords:

Thlaspi arvense

Erucic acid

Seed oil

TAG (triacylglycerol)

FAE1 (fatty acid elongase 1)

Biofuel

ABSTRACT

We studied erucic acid accumulation in the biodiesel feedstock Pennycress (*Thlaspi arvense* L.) as a first step towards the development of a sustainable strategy for biofuel production in the EU territory. To that end, two inbred Pennycress lines of European origin, “NASC” and “French,” were cultivated in a controlled chamber and in experimental field plots, and their growth, seed production and seed oil characteristics analyzed. Differences in some agronomical traits like vernalization (winter–French versus spring–NASC), flowering time (delayed in the French line) and seed production (higher in the French line) were detected. Both lines showed a high amount (35–39%) of erucic acid (22:1^{Δ13}) in their seed oil. Biochemical characterization of the Pennycress seed oil indicated that TAG was the major reservoir of 22:1^{Δ13}. Incorporation of 22:1^{Δ13} to TAG occurred very early during seed maturation, concomitant with a decrease of desaturase activity. This change in the acyl fluxes towards elongation was controlled by different genes at different levels. *TaFAE1* gene, encoding the fatty acid elongase, seemed to be controlled at the transcriptional level with high expression at the early stages of seed development. On the contrary, the *TaFAD2* gene that encodes the $\Delta 12$ fatty acid desaturase or *TaDGAT1* that catalyzes TAG biosynthesis were controlled post-transcriptionally. *TaWRI1*, the master regulator of seed-oil biosynthesis, showed also high expression at the early stages of seed development. Our data identified genes and processes that might improve the biotechnological manipulation of Pennycress seeds for high-quality biodiesel production.

© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

1. Introduction

Field Pennycress (*Thlaspi arvense* L.) is a winter annual that belongs to the Brassicaceae family. As many other members of this family, such as *Miscanthus* (Robson et al., 2013), Ethiopian mustard (*Brassica carinata*; Bouaid et al., 2009) and *Camelina sativa*, Frohlich and Rice, 2005), Pennycress has attracted the attention of researchers as a promising alternative oilseed feedstock for biodiesel production, that accomplishes the land use and sustainability criteria and displaces other plant species like *Jatropha curcas* or *Crambe* (*Crambe abyssinica*) that are not well adapted to the temperate climate conditions of Europe and North America (Moser, 2012). Native of Eurasia, Pennycress is widely distributed across temperate regions all around the world and is

highly adapted to a wide variety of climatic conditions (Warwick et al., 2002; Vaughn et al., 2005; Moser et al., 2009a). Because of its growth cycle, it can be successfully planted at the end of the summer and germinates in the fall developing a low-growing rosette that protects the plant from low temperatures and cold winds during the winter. Pennycress is an extreme cold tolerant plant (Sharma et al., 2007). The plant resumes its growth in the spring, sets seeds and is harvested at the beginning of the summer. Because of its culture cycle it can be used in rotations, not displacing existing agricultural production (Moser, 2012). It does not need any agricultural inputs like fertilizers or pesticides and has no specific water requirements. Furthermore, Pennycress could be planted in lands not otherwise suited for agricultural production (Moser, 2012). Therefore, it does not compete with food chain cultures. Pennycress has been signaled for its potential to produce biomass for renewable biofuel production (Moser et al., 2009a,b; Moser, 2012), being a prolific seed producer (Fan et al., 2013). Harvested Pennycress seeds contain around 36% oil (w/w), which is

* Corresponding author.

E-mail address: alfonso@eead.csic.es (M. Alfonso).

twice the amount present in other oil commodities like soybean or sunflower and very similar to that found in camelina (Moser, 2012). Because of its high oil content and fatty acid profile, with high amounts of unsaturated fatty acids, particularly erucic acid (22:1^{Δ13}), Pennycress oil can be used for biodiesel and biojet production with excellent characteristics like high cetane number of 59.8 and low temperature properties (Moser et al., 2009a; Moser, 2012; Fan et al., 2013). These results indicate that Pennycress oil could qualify as a biomass-derived diesel according to the Renewable Fuels Standard (Fan et al., 2013). Despite these interesting characteristics, Pennycress is still a wild plant that requires much research to evaluate its actual agronomical potential. In the USA, test plots from Illinois reported seed yields that varied from 900 to 2352 kg ha⁻¹ (Evangelista et al., 2012; Fan et al., 2013). In our first experimental campaign in Spain, productions around 1300 kg ha⁻¹ were obtained with European varieties. Several traits, including seed dormancy and size, erucic acid content, pot shatter and flowering time have been identified as potential targets of Pennycress breeding to improve its potential as a dedicated bioenergy crop (Sedbrook et al., 2014). To the best of our knowledge, although it is well adapted to the European climatic conditions, and there is botanical register of its presence all through the EU, very few experiments on Pennycress cultivation have been performed, all of them using Pennycress seeds of American origin, and the agronomic conditions required for its successful cultivation have not been still established (Groeneveld and Klein, 2014, 2015).

In addition to the research efforts to be held at the agronomical level, understanding the biochemical and molecular pathways involved in oil biosynthesis in Pennycress seeds is necessary to guide future crop improvement efforts directed towards an increase in oil yield and quality as well as other important agronomic traits (dormancy, vernalization, etc). At the molecular level, a transcriptome assembly of Pennycress genes has been reported that might provide tools for the breeding of Pennycress (Dorn et al., 2013). More recent studies have performed a metabolite profiling of Pennycress seed embryos to determine the biochemical pathways active during oil synthesis (Tsogetbaatar et al., 2015). However, although the enzymes (fatty acid elongases and desaturases) and compounds (TAG, DAG) that participate in seed oil biosynthesis have been characterized in other plant species, mainly *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana* (Von Wettstein-Knowles, 1982; James et al., 1995; Millar and Kunst, 1997; Katavic et al., 2001, 2004), this information is still lacking for Pennycress seeds. This knowledge is necessary to avoid metabolic bottlenecks that usually appear during the manipulation of seed oil biosynthetic pathways (Cahoon et al., 2007). An example of these bottlenecks related to erucic acid manipulation was detected in genetically engineered *Crambe abyssinica* (Guan et al., 2014).

As a first step for the introduction of Pennycress as an alternative feedstock for biofuel production in the Mediterranean regions of the EU, we studied erucic acid accumulation both at the biochemical and molecular levels in two different *Thlaspi arvense* L. strains of European origin that showed differences in some agronomically interesting traits such as vernalization, flowering time, and seed size and production. Our data showed a rapid accumulation of 22:1^{Δ13} into TAG in developing Pennycress seeds. At the molecular level, several genes involved in 22:1^{Δ13} biosynthesis like *TaFAE1*, *TaFAD2* or in the regulation of seed oil biosynthesis like *TaDGAT1* or *TaWRI1*, were also characterized. The *TaFAE1* gene from *T. arvense* showed a high phylogenetic correlation with other FAE1 enzymes from plants that also accumulated high amounts of erucic acid in their seed oil. The expression analysis of the *TaFAE1* gene suggested that the accumulation of 22:1^{Δ13} was controlled at the transcriptional level at the earlier stages of seed development and that a change in the acyl fluxes towards elongation versus desaturation took place to favor 22:1^{Δ13} accumulation in Pennycress seeds.

These data may help to improve its biotechnological manipulation for high-quality biodiesel production.

2. Materials and methods

2.1. Plant growth and characterization of plant lines

Pennycress seeds (*Thlaspi arvense* L.) were obtained from different sources. “NASC” seeds were obtained from the *Nottingham Arabidopsis Stock Centre*, UK (NASC). “French” seeds were obtained from the *B&T World Seeds* company (France). Seeds were germinated in plates on wet Whatman paper without addition of any other supplement. Once germinated, seeds were transferred to pots containing a 75:25 mixture of substrate (peat moss, Kekkila white 420W): vermiculite and grown in a bioclimatic chamber under a light intensity of 120–150 μmol m⁻² s⁻¹, with a 16 h/8 h light/dark photoperiod at 22 °C and a relative humidity of 45%. When grown in the culture chamber, French plants required a vernalization treatment to fully develop into flowers and seeds. To that end, upon emergence of the first pair of true leaves, the plants were transferred to a cold chamber at 6 °C for 5 weeks with a light intensity of 120 μmol m⁻² s⁻¹ and 10/14 h day/night cycle, respectively. The plants were then placed back into the growth chamber under normal growth conditions and allowed to fully develop.

Pennycress was also grown under field conditions in small experimental plots (10 m²) located at the research farm of the Estación Experimental de Aula Dei (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), in the Aragon region (NE Spain) (41°44'N, 0°46'W, 259 m alt.). Sowing was done at the end of September with a density of 6–8 kg ha⁻¹. The area is characterized by a semiarid Mediterranean climate with an average annual rainfall of 355 mm and an average annual air temperature of 14.5 °C. The soil of the experimental plots is representative of the soils in semiarid Aragon with a medium texture, alkaline and generally with low organic carbon content. Specifically, for the 0–40 cm depth, this soil is a loam soil (23% sand, 53% silt and 24% clay) with pH=8.3, 13.6 g kg⁻¹ of organic matter content and 345 g kg⁻¹ of CaCO₃. Mean soil nutrient contents (0–40 cm depth) were 11, 130, 28 and 193 mg kg⁻¹ for P, K, N, and Mg, respectively. No herbicide or biocide treatments were applied during the crop growth. Seeds were manually harvested at the end of May. The weight and size of seeds, number of seeds per pod, number of pods per plant, and number of seeds per plant were obtained from at least 10 different plants from each Pennycress lines. The amount of oil per seed dry weight basis was obtained gravimetrically by the method of Li et al. (2006) from 1 g of seeds.

2.2. Lipid and fatty acid composition analysis

Total lipids were extracted from *Thlaspi arvense* seeds (0.5 g) in four successive maturation phases (green, green-yellow, yellow-green and dry phase) with chloroform/methanol (2:1, v/v) as described by Bligh and Dyer (1959). Fatty acid methyl esters of total lipids or individual lipid classes were produced by acid-catalyzed transmethylation (Garcés and Mancha, 1993) and analyzed by gas chromatography (GC), using a 7890A (Agilent, Santa Clara, CA USA) fitted with a capillary column (60-m length; 0.25-mm inner diameter; 0.2-μm film thickness) of fused silica (Supelco, Bellefonte, PA, USA) and a FID detector. Helium was used as a carrier gas with a linear rate of 1.2 ml min⁻¹ and split ratio of 1/100. The injector temperature was 250 °C and the detector temperature was 260 °C. The oven temperature was modified as follows: 170 °C for 30 min, then raising the temperature by 5 °C/min to 200 °C. 17:0 was used as an internal standard. Data from fatty acid analysis were obtained from three biological experiments in the case of plants grown in culture chamber and two independent biological experiments for plants

grown in the field plots. Analysis of variance (ANOVA) was applied to compare treatments. Statistical analyses were carried out with the program Statgraphics Plus for Windows 2.1, using a level of significance of 0.05.

2.3. TAG and DAG analysis by TLC

TLC plates (Silica Gel 60, Merck) were activated by heating to 110°C for at least one hour prior to the analysis in order to drive off any moisture. Then, total lipids extracted from the seeds corresponding to the different stages of Pennycress seed development were loaded onto the TLC plates. TAG and DAG fractions were separated in TLC plates developed with a mixture of heptane:diethylether:acetic acid (70:30:1, v/v/v), following the method described by Li-Beisson et al. (2013). Detection of lipids was performed by short exposure to iodine vapor. Bands were marked, scraped and extracted with a Methanol:chloroform:water (100:50:40, v/v/v) solution followed by an additional separation in a chloroform:water (50:50, v/v) mixture. Commercial standards of TAG and DAG (Sigma) were used as a reference for band identification. 17:0 was used as an internal standard for quantification purposes. Fatty acid methyl esters of the different TAG and DAG fractions obtained were performed as described above.

2.4. RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was isolated from 0.1 g of *Thlaspi arvense* seeds from the four maturation stages analyzed (green, green-yellow, yellow-green and dry) using the CTAB-LiCl extraction method of Gasic et al. (2004). RNA concentration and integrity was measured in a Nanodrop 2000 UV-vis Spectrophotometer (Thermo Scientific). cDNAs were synthesized from 3 µg of total RNA using ThermoScript Reverse Transcriptase (Life Technologies) and oligo dT primer, according to the manufacturer's instructions.

2.5. Sequence analyses and manipulation

All sequences were obtained from GENBANK. Protein alignment was performed using the CLUSTALW2 multiple alignment tool. Phylogenetic trees were generated using the PHYML software (Guindon and Gascuel, 2003; www.atgc-montpellier.fr/PHYML), with bootstraps 500.

2.6. RT-PCR expression analysis

The expression patterns of *TaFAE1*, *TaFAD2*, *TaDGAT1*, *TaWRI1* and *ACTIN* genes were examined by reverse-transcription (RT)-PCR assay. Three primer pairs were designed with 5' and 3' flanking sequences of the genes, according to the gene sequences in the GenBank data (KF664164 for *TaFAE1*, DQ518324 for *TaFAD2* and JQ435880 for *ACTIN*, respectively). For the *TaDGAT1* and *TaWRI1* genes, degenerated primers were designed in conserved regions of the protein from other plant species and used for the amplification of a partial fragment of the gene. The fragments were cloned and sequenced to confirm its correspondence to the *TaDGAT1* and *TaWRI1* genes. The primers sequences were for the *TaFAE1* gene, F-FAE1: 5'- ATGACGTCCGTTAACGTTAAGCT-3'; R-FAE1: 5'- TTAGGACCGACCGTTTTGGACACGA-3'; for the *TaFAD2* gene, F-FAD2: 5'- TTCACGCTCGGAGAACT-GAAG; R-FAD2: 5'- AACTCCGTAGACGCAGATCA-3'; for the *TaDGAT1* gene, F-DGAT1: 5'- CGTATCGACCGTCGGTTCCA-3'; R-DGAT1: 5'- GAAGCAGTAGAATCGACAGGCCA-3'; for the *WRI1* gene, F-WRI1: 5'- GGAGTCACTAGACATAGATGGA-3'; R-WRI1: 5'- CGAAATTGGTAACCGCGTT-3'; for the *ACTIN*, F-ACTIN: 5'- CATGTATGTCGCCATCAAGCTGTTCTC; R-ACTIN: 5'-

CAGCAGCTTCCATTCCCACGAAC-3'. The PCR reactions were performed using a GeneAmp PCR system 9700 (Perkin Elmer, Applied Biosystems) and Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs). The PCR products were examined electrophoretically in 1% (w/v) agarose gels. The *TaFAE1*, *TaFAD2*, *TaDGAT1*, *TaWRI1* and *ACTIN* purified PCR products were sequenced after cloning into the pGEM-T-easy Vector (Promega), according to the manufacturer's instructions. The obtained sequences of *TaFAE1* from the two Pennycress lines used in this study have been deposited in the NCBI database with the accession numbers KT223024 and KT223025 for *TaFAE1* gene from NASC and French lines, respectively.

3. Results and discussion

3.1. Growth characteristics of two varieties of pennycress

Germination percentages near 100% were obtained for Pennycress seeds from either NASC or French lines in Petri dishes on a wet Whatman paper (Fig. 1D). It is worth mentioning that these germination rates were obtained with seeds that were stored from around 10–12 months since harvest. Germination of freshly harvested Pennycress seeds resulted in very low germination efficiencies (less than 10%). It has been reported that freshly harvested Pennycress seeds from winter varieties have relatively low germination rates unless treated with the plant hormone gibberellic acid (GA) (Sedbrook et al., 2014). Our results are consistent with this observation, indicating that seed dormancy is very high in these European lines as it seems to occur in the American ones (Sedbrook et al., 2014). Usually, 7–10 days were necessary from the sowing in the Petri dishes to the transfer to soil pots. Plants grew rapidly in the growth chamber producing flowers and generating pods with seeds. Several differences were encountered between both varieties at this stage. NASC line always produced flowers that further developed to seed pods. On the contrary, approximately one third of each batch of germinated French plants transferred to the growth chamber, did not develop flowers maintaining a big rosette for months (Fig. 1A). When French plants were subjected to vernalization at the earlier stages of germination (4–5 leaf stage), in a growth chamber at 6°C for 5 weeks, all French line plants produced flowers and seeds. These results might suggest that the French line is "winter or winter facultative" since vernalization was required for fully development. On the contrary, the fact that NASC plants did not require vernalization for flowering and seed development might suggest that NASC plants are representative of "spring" lines. This observation might be relevant from the agronomic point of view since NASC seeds could be used in short cycle cultivation (sowing in January/February and harvest in May) while those from the French line might require winter cultivation in a long cycle (sowing in September and harvest in May/June). In addition, other differences between lines were also observed. Thus, the NASC plants were taller and showed earlier flowering when compared to the French ones (Figs. 1A–C). It is important to note that these differences in flowering phenotype were observed in plants from both varieties cultivated either in the culture chamber or under field conditions. Seeds from both lines were harvested and their size and seed oil characteristics were compared. To that end, inbred lines by a single seed descent were obtained. As shown in Table 1, Pennycress seed weight was higher (22%) in the NASC line than in the French line (1.23 vs. 1.01 mg). These differences in seed weight were statistically significant ($p < 0.05$). These seed weights for both lines are within the range of previous data from USA Pennycress accessions that ranged between 0.4–1.3 mg (Sedbrook et al., 2014) and, even, closer to the top of the range. Differences in seed color were also detected, with the seeds from the French plants of a light red-brown color, while those from the NASC plants were dark brown

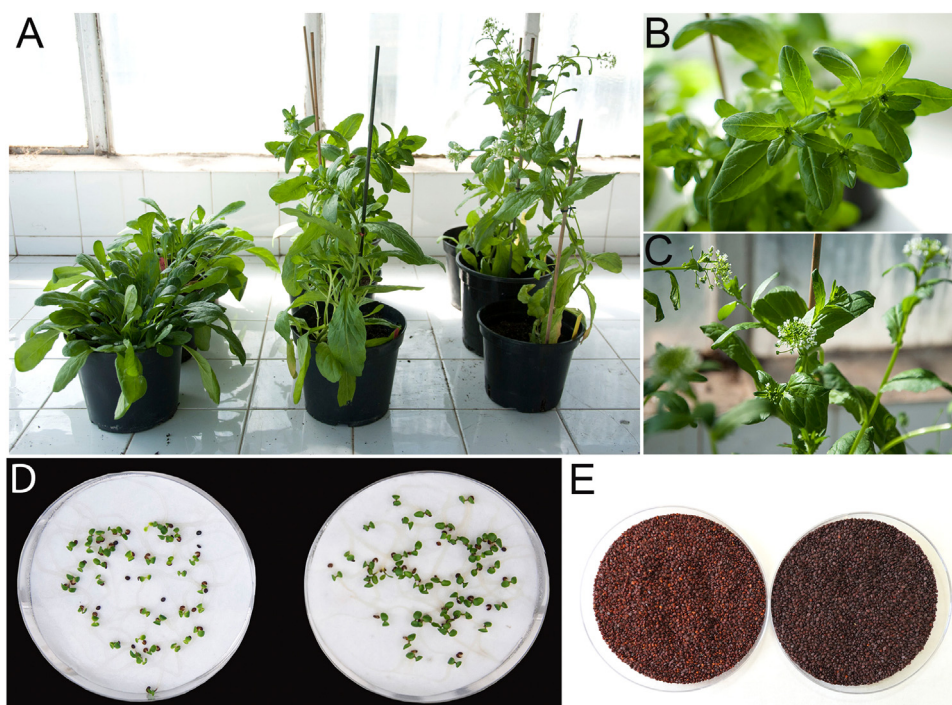


Fig. 1. Plant growth comparison of the different Pennycress accessions used in this work. (A) Pennycress plants grown in the culture chamber. Left, French line plants that did not develop flowers showing that vernalization was required; middle, French line plants showing normal growth but delayed flowering with respect to NASC plants; right, NASC plants. All Pennycress lines were sown at the same date. (B,C) Photographs showing the differences in flowering between both plant lines: (B) French plants and (C) NASC plants. Plants from both lines were sown at the same time and grown in a culture chamber, under controlled environment. (D) Germination assays of Pennycress seeds from both NASC and French plants. Seeds were germinated onto a wet Whatman paper in the absence of any chemical. Left plate, NASC seeds; Right plate, French seeds. (E) Seeds obtained from both Pennycress lines; left plate, French seeds; right plate, NASC seeds.

Table 1
Seed oil and size characteristics of two *Thlaspi arvense* L. lines.

	% oil ^a	% 22:1 ^b	Seed wt (g) ^c	Pods/plant ^d	Seeds/pod ^d	Seeds/plant ^e
NASC Line	39.08 ± 5.08	35.12 ± 2.08	0.123 ± 0.003 ^f	349 ± 23.06 ^f	9.32 ± 1.88	3253
French Line	41.18 ± 7.61	36.34 ± 5.03	0.101 ± 0.004 ^f	490 ± 27.96 ^f	9.21 ± 1.64	4513

^a Calculated as total amount of oil on a seed dry weight basis (dwb).

^b Data were obtained from three biological replicates.

^c 100 seeds were weighted. Data were obtained from 10 independent determinations.

^d Data were obtained from 10 different plants.

^e Data were deducted from results of seeds/pod and pod/plant.

^f Differences were statistically significant at $p < 0.05$.

(Fig. 1E). Both Pennycress lines showed a similar average number of seeds per pod (9.32 and 9.21 for NASC and French lines, respectively), but again, statistically significant differences ($p < 0.05$) were found when the number of pods per plant was counted, resulting in a higher average value for the French line (490 vs 349). This higher number of pods per plant resulted in a higher average number of seeds per plant from the French line when compared with the NASC plants (4513 vs 3253). It is worth mentioning that the lower weight of one seed in the French line was compensated with a higher number of pods per plant and, therefore, a higher number of seeds per plant. No problems of pod shattering were detected during plant manipulation. Seed oil characteristics were also analyzed. As shown in Table 1, total seed oil content ranged from 39.08 to 41.18% for NASC and French lines, respectively. No statistically significant differences were detected in this parameter between the Pennycress lines, suggesting that the differences in seed weight and seed production compensated for a similar oil production. These results are similar to those obtained from the high oil content Pennycress strains from USA (Sedbrook et al., 2014), indicating that both European lines accumulated high oil content in their seeds. The fatty acid composition of the seed oil from both Pennycress

NASC and French lines cultivated in the growth chamber was also compared. Erucic acid (22:1^{Δ13}) was the major fatty acid species in the seed oil, with an average percentage of 35.12 and 36.34 for NASC and French lines, respectively. This high percentage of 22:1^{Δ13} is within the range of that previously published from USA Pennycress accessions (Sedbrook et al., 2014). No statistically significant differences were detected in this parameter between both Pennycress lines.

At this point, we compared the seed oil characteristics from Pennycress plants grown in the controlled chamber with those cultivated in experimental plots under field conditions. Once the growing season (September–May) was completed and the Pennycress seeds were harvested, their fatty acid content was analyzed. As shown in Table 2, the fatty acid composition of seeds from the NASC line cultivated in field plots was essentially similar to that obtained in the controlled chamber. Erucic acid was also the major fatty acid species in their seed total lipids with an average percentage of 37.23% and 39.68% for the NASC and French plants, respectively (Table 2). Although these values seemed to be slightly higher than those obtained for the same Pennycress lines cultivated under controlled conditions in the chamber (35.12% and 36.34%,

Table 2

Fatty acid composition of seeds from *Thlaspi arvense* L. lines grown in a culture chamber and in field plots.

Fatty acid	NASC chamber	NASC field	French chamber	French field
16:0	4.26 ± 0.76	3.61 ± 0.05	4.09 ± 0.13	3.23 ± 0.07
16:1	0.37 ± 0.050	0.34 ± 0.001	0.40 ± 0.04	0.33 ± 0.007
18:0	0.68 ± 0.23	0.52 ± 0.001	0.61 ± 0.12	0.48 ± 0.001
18:1	13.14 ± 1.94	11.64 ± 0.07	13.16 ± 3.01	11.39 ± 0.05
18:2	20.26 ± 0.51	19.54 ± 0.25	20.71 ± 1.34	19.54 ± 0.01
18:3	13.02 ± 1.47	11.17 ± 0.26	13.14 ± 0.76	11.69 ± 0.04
20:0	0.22 ± 0.09	0.24 ± 0.007	0.18 ± 0.01	0.23 ± 0.001
20:1	10.26 ± 1.08	11.09 ± 0.007	8.94 ± 0.60	9.83 ± 0.07
22:0	0.42 ± 0.16	0.13 ± 0.007	0.42 ± 0.19	0.15 ± 0.007
22:1	35.12 ± 2.08	37.23 ± 0.55	36.34 ± 5.02	39.68 ± 0.08
24:0	0.15 ± 0.03	0.09 ± 0.001	0.11 ± 0.04	0.07 ± 0.007
24:1	3.87 ± 0.69	4.18 ± 0.07	3.36 ± 0.03	3.17 ± 0.03

Data (mole% from total fatty acids) are means of four independent biological determinations for chamber experiments and two independent biological determinations for field experiments.

for NASC and French lines, respectively), no statistically significant differences were found between cultivation conditions. This observation might be very useful for the extrapolation of the results obtained from plants grown under controlled conditions to field conditions.

3.2. Fatty acid composition during seed maturation in two varieties of pennycress

To further characterize the biosynthesis of 22:1^{Δ13} in Pennycress seeds, we monitored the fatty acid composition during seed maturation in both NASC and French plants grown in the culture chamber. Seeds from four developmental stages corresponding to green (G), green-yellow (GY), yellow-green (YG), and dry pods (D) were chosen for the analysis. The results are shown in Fig. 2. Both lines showed an increase of total lipid accumulation on a seed fresh weight basis in a nearly linear fashion (Fig. 2A). At the initial stages of seed maturation (green), Pennycress seeds were characterized by high levels of erucic acid (22:1^{Δ13}) that was the major fatty acid present in the analysis, with a content of 27–28% in this stage in both Pennycress lines (Fig. 2B). Seeds also contained relatively high levels of 18:2 (22–23%) and 18:3 (18%), (Figs. 2C and D). With seed maturation, levels of 22:1^{Δ13} increased from 27–28 to 35–37% in seeds from GY and YG pods. In the French seeds, 22:1^{Δ13} peaked at the YG developmental stage, while in the NASC plants, 22:1^{Δ13} levels were very similar in both GY and YG stages (Fig. 2B). However, no statistically significant differences in the relative 22:1^{Δ13} values were detected when fatty acid composition from NASC and French lines was compared. In both cases, the increase in 22:1^{Δ13} was accompanied by a concomitant decrease of 18:2 and also 18:3 (Figs. 2C and D). 22:1^{Δ13} is synthesized outside the plastid by a membrane bound fatty acid elongation complex (elongase) that uses 18:1 CoA substrates. This increase of 22:1^{Δ13}, concomitant with the decrease of 18:2 and 18:3 in Pennycress seeds during maturation, suggested a change of the acyl flux towards elongation that might result in less 18:1 CoA available for its incorporation into PC at the sn-2 position where it could be desaturated by the microsomal $\Delta 12$ desaturase FAD2.

In developing seeds, oil is accumulated in the form of triacylglycerol (TAG) which is the major fraction in total seed-oil lipids (Bates et al., 2013). The direct lipid precursor for TAG assembly is diacylglycerol (DAG) which represents an important intermediate step in the synthesis between TAG and membrane lipids (Li-Beisson et al., 2013). To further characterize oil biosynthesis in Pennycress seeds, we determined the fatty acid composition of TAG and DAG fractions from developing Pennycress seeds. To that end, seeds from at least five plants from both lines grown in the culture chamber were

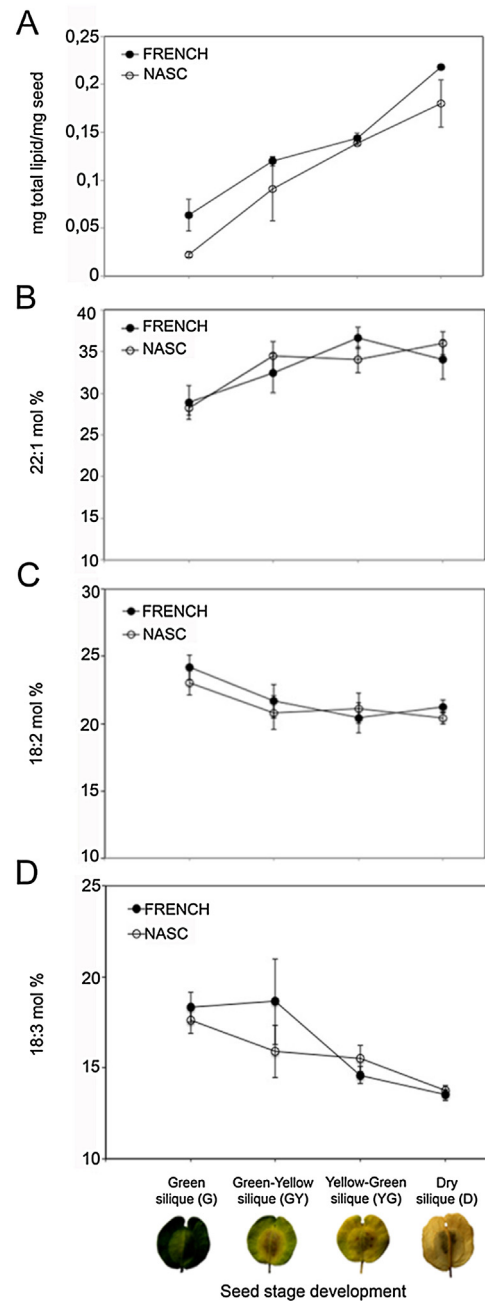


Fig. 2. Fatty acid composition analysis of Pennycress (*Thlaspi arvense* L.) seeds during maturation. (A) Total lipid on a fresh weight basis, (B) Erucic acid, 22:1, (C) linoleic acid, 18:2; and (D) linolenic acid, 18:3, content. Data are expressed as molar percentages from the quantitative analysis of peak areas obtained from the GC analysis. Data were obtained from three independent experiments. SD ± 3. Open circles, NASC line; closed circles, French line. The photograph shows the maturation stages of Pennycress pods from which the seeds were analyzed: Green (G), Green-Yellow (GY), Yellow-Green (YG) and Dry (D). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

pooled to extract total lipids and subjected to TLC to separate TAG, and DAG. These fractions were subsequently analyzed for their fatty acid composition. 22:1^{Δ13} was the major fatty acid detected in TAG in Pennycress seeds. In the first stages of seed development, corresponding to the G stage, levels of 22:1^{Δ13} fatty acid represented a mole percent of 34 and 35% of total fatty acids in TAG for both French and NASC lines, respectively (Fig. 3A and B). In both lines, 22:1^{Δ13} levels increased with seed development. Thus, in the French seeds, 22:1^{Δ13} increased from 34% in the G stage to the highest level of

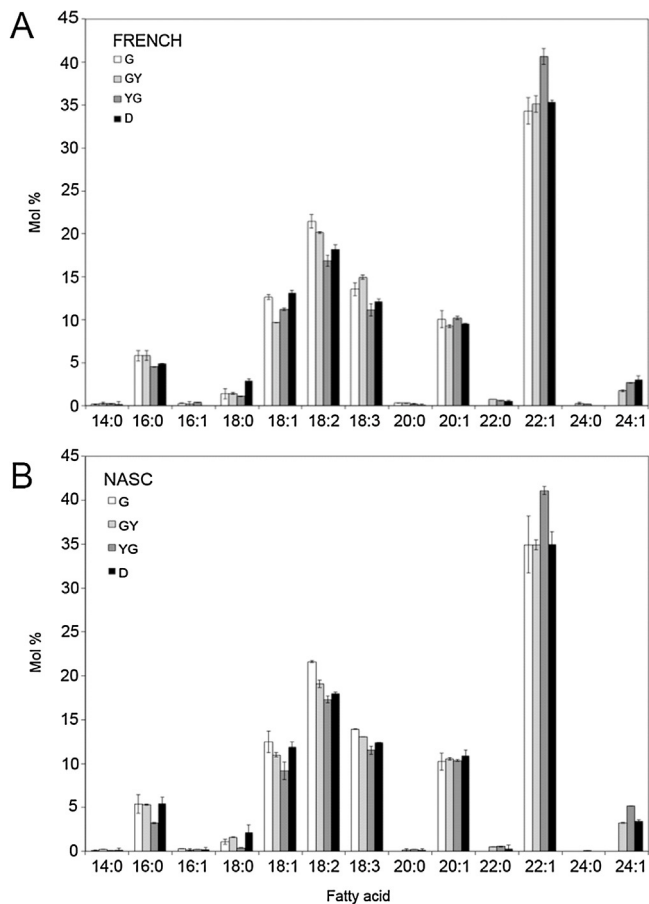


Fig. 3. Fatty acid composition of the TAG fraction of the Pennycress seed oil from French (A) and NASC (B) plants. G, Green seed, GY, Green-yellow seed, YG, yellow-green seed and D, Dry seed developmental stages. Data are means of two independent biological experiments.

42% in the YG stage (Fig. 3A). In the NASC plants, 22:1 Δ^{13} increased from 35% in the G stage to peak at 42% in the YG stage, as occurred in the French line seeds (Fig. 3B). The increase of 22:1 Δ^{13} was concomitant with a decrease in 18:2 and 18:3 during seed development that also occurred in both Pennycress lines (Fig. 3). The 22:1 Δ^{13} content in the TAG fractions from both Pennycress lines was consistent with the 22:1 levels obtained from their total lipids (Fig. 2B and Tables 1 and 2). The high levels of 22:1 detected in TAG at the earlier stages of seed development might suggest that 22:1-CoA pools were rapidly available for their incorporation to TAG in Pennycress plants. In that sense, during the analysis of 22:1 incorporation to TAG in *Crambe abyssinica*, another high-erucic containing species, it was shown that the incorporation of 22:1-CoA to TAG was rapidly accelerated upon seed development (Furmanek et al., 2014).

The fatty acid composition of the DAG fraction during seed development was also analyzed. In contrast to what happened in TAG, 22:1 Δ^{13} levels were only slightly higher with respect to other fatty acids in DAG. 22:1 Δ^{13} levels reached 17% or 22% at the G developmental stage in both French and NASC lines, respectively (Fig. 4). 18:2 levels were 14 and 19% for the same developmental stage in both French and NASC lines, respectively (Fig. 4). Interestingly, 18:2 levels increased in DAG during seed development between the G and GY stages in both Pennycress lines. This increase was concomitant with a decrease in 22:1 (Figs. 4A and B), further indicating that the change in acyl fluxes to favor elongation that occurred during seed development in Pennycress seeds, acts conversely in TAG and DAG fractions. This observation could be related to the fact that a portion of the DAG pool is channeled for PC production

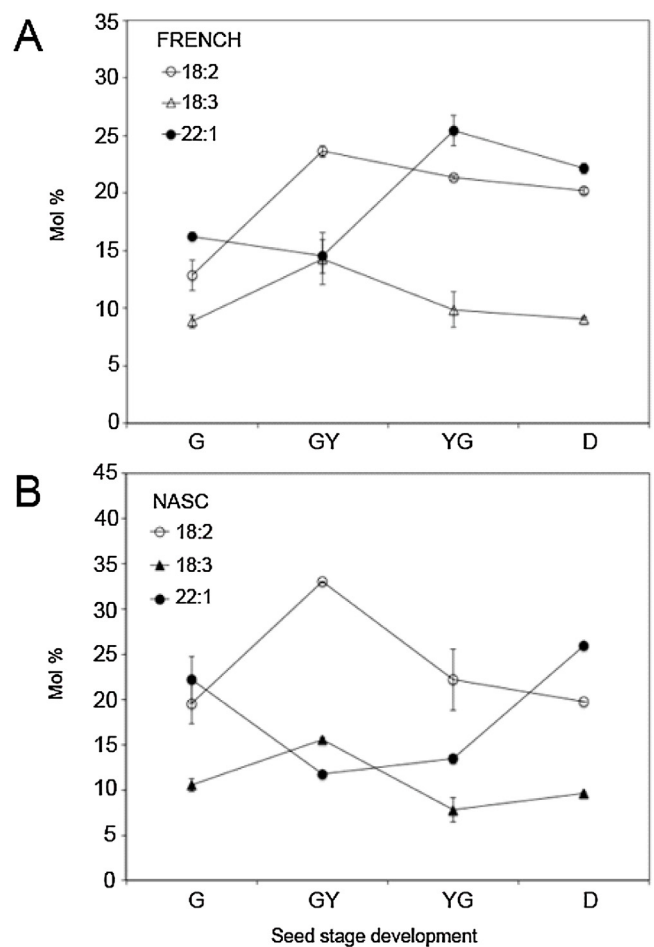


Fig. 4. Fatty acid composition analysis of DAG fraction from Pennycress oil from French (A) and NASC (B) plants. Closed circles, erucic acid, 22:1; open circles, linolenic acid, 18:3; open triangles, linoleic acid, 18:2. Data are expressed as molar percentages from the quantitative analysis of peak areas obtained from the GC analysis. Data were obtained from at least three independent experiments. SD \pm 3.

instead of TAG biosynthesis, through the action of phosphatidylcholine:diacylglycerol choline phosphotransferase (PDCT; Lu et al., 2009). This PC is incorporated into membrane lipids that require polyunsaturated fatty acids like 18:2.

3.3. Characterization of the *TaFAE1* gene from NASC and French pennycress plant lines

Biosynthesis of very long chain fatty acids (VLCFAs) like 22:1 Δ^{13} is performed in plants by a microsomal fatty acid elongation complex that catalyzes the sequential addition of malonyl-CoA moieties to C18 fatty acids. Each condensation step involves four different activities: (i) condensation of malonyl-CoA with a long chain acyl-CoA; (ii) reduction of 13-keto-acyl-CoA; (iii) dehydration to an enoyl-CoA; and, (iv) reduction of the enoyl-CoA resulting in an elongated acyl-CoA (James et al., 1995). Despite the fact that these four activities are required for the elongation (Von Wettstein-Knowles, 1982), ectopic expression experiments of the *FAE1* gene in Arabidopsis, together with heterologous expression experiments in yeast, confirmed that the *FAE1* activity is the rate-limiting step of the elongase reaction (Millar and Kunst, 1997; Katavic et al., 2001). Our lipid analysis indicated that 22:1 was rapidly synthesized and incorporated to seed oil in Pennycress. Accordingly, as a first step to characterize the biosynthesis of 22:1 Δ^{13} in Pennycress seeds at the molecular level, we focused our attention in the *FAE1* gene. Based on the sequence similarity among plant fatty acid



Fig. 5. Comparison of the deduced protein sequence of the *Thlaspi arvense* FAE1 protein from both NASC and French lines with FAE1 proteins from *Arabidopsis thaliana* (low erucic acid producer) and *Brassica napus* (High erucic acid producer). Sequences were aligned using CLUSTALW2. GenBank accession numbers are: *Thlaspi arvense* NASC line, (KT223024); *Thlaspi arvense* French line, (KT223025); *Arabidopsis thaliana* (U29142.1) and *Brassica napus* (U50771.1). Identical residues are indicated by an asterisk below the sequence. Conservative substitutions were indicated as a double point below the sequence. Semi-conservative substitutions were indicated as a single point below the sequence. Residues involved in the active site of the enzyme are indicated with a cross above the sequence. Sequence motifs related with the high erucic acid trait are indicated by a line over the sequence.

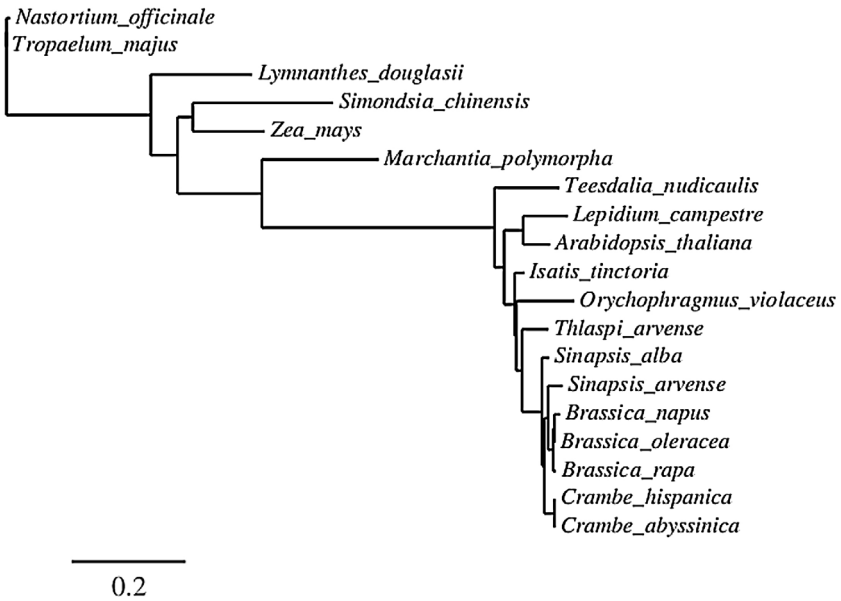


Fig. 6. Phylogenetic tree of the FAE1 protein from different plant species. The names and Genbank accession numbers of the sequences used for the analysis are: *Arabidopsis thaliana* (U29142.1); *Brassica napus* (U50771.1); *Brassica oleracea* (GU325726.1); *Brassica rapa* (GU325723.1); *Crambe hispanica* (KF664157); *Crambe abyssinica* (KC565738); *Isatis tinctoria* (AY888038.1); *Lepidium campestre* (FJ907545.1); *Limnanthes douglasii* (AF247134); *Marchantia polymorpha* (AY308831); *Nastortium officinale* (AY0826190); *Orychophragmus violaceus* (AY888042.1); *Simonsdia chinensis* (U37088); *Sinapsis arvense* (AY888041.1); *Sinapsis alba* (AY888040.1); *Teesdalia nudicaulis* (EF186003.1); *Thlaspi arvense* (KT223024); *Tropaeolum majus* (AY082610); *Zea mays* (AJ29770).

elongases, we designed specific primers from FAE1 sequences retrieved from available databases. RT-PCR screening of a cDNA obtained from Pennycress seeds from either NASC or French lines resulted in the amplification of a 1518 bp band. This RT-PCR band

was cloned and sequenced, confirming that it corresponded to the full-length *TaFAE1* gene sequence. The same primers were used for amplification of the *TaFAE1* gene from genomic DNA from both Pennycress lines. Sequencing of the genomic fragments from both lines confirmed the sequence data obtained with the cDNA. The RT-PCR and genomic analysis suggested that a single *TaFAE1* gene is present in the *T. arvensis* genome. It is worth mentioning that no introns were detected in the genomic amplification of the *TaFAE1* gene. This feature was shared with other *FAE1* genes from other *Brassicaceae* like *Arabidopsis thaliana* (Katavic et al., 2002; Mietkiewska et al., 2004). Fig. 5 shows the deduced protein sequence alignment of the *TaFAE1* enzyme from either NASC (Genbank accession number KT223024) or French (Genbank accession number KT223025) Pennycress lines, as well as that from *Arabidopsis* (that does not accumulate erucic acid in seeds) and that from *Brassica napus* (a high erucic acid producer). The *TaFAE1* complete ORF encoded a protein of 506 amino acid that showed an 86% identity (93.67% homology) with respect to that from *Arabidopsis* and a 91.3% of identity (95.45% homology) with respect to that from *B. napus*. It should be noted that no differences were observed between the *TaFAE1* protein sequences from the Pennycress lines (Fig. 5). Several residues have been identified as crucial for FAE1 activity (Ghanevati and Jaworski, 2001, 2002). The cysteine (Cys85, Cys223, Cys312, Cys389, Cys460) and histidine (His302, His387, His391, His420) residues identified as part of the active site of the FAE1 enzyme (Ghanevati and Jaworski, 2002) were all present in both Pennycress lines. Particularly, Cys223, His391, and Asn424 (Ghanevati and Jaworski, 2001, 2002) were also conserved in all of the analyzed sequences. Mutations in Ser282 have been associated with the low erucic trait (LEA) in *Brassica napus* (Han et al., 2001; Katavic et al., 2002). However, as shown in Fig. 5, Ser282 was conserved in Pennycress and *Brassica* plants (high erucic content, HEA) but also in *Arabidopsis* (low erucic producer). This observation is in line with reports that suggest that Ser282 itself is not an absolute requirement for a functional FAE1 condensing enzyme (Katavic et al., 2004). To further characterize the *TaFAE1* gene, a phylogenetic tree was constructed with 19 FAE1 deduced complete protein sequences that included 8 high erucic (>25%) accumulators, including Pennycress, as well as 11 species that did not accumulate erucic acid in seeds in significant amounts. The phylogenetic tree is shown in Fig. 6. *TaFAE1* was grouped in the same clade in which *FAE1* genes from other *Brassicaceae* that accumulated high amounts of erucic acid in their seed were present. This result further strengthens the hypothesis that, although the FAE1 enzymes are highly conserved in the plant kingdom and independently of the acyl-CoA pools, certain amino acid residues or protein domains, not directly related with the active site, could be behind the high erucic acid trait phenotype of certain plants, particularly those from the *Brassicaceae* family. Recent studies have suggested a correlation between several sequence motifs and the content of erucic acid in seeds (Sun et al., 2013). A search of the seven motifs identified by Sun et al. (2013) as associated with high erucic acid accumulation in seeds showed that all of them were present in the *TaFAE1* sequences from both Pennycress lines while none of them were detected in the *AtFAE1* sequence (Fig. 5). Complementation analysis of *fae1* mutants from *Arabidopsis* using the FAE1 enzyme from Pennycress is in progress to determine the influence of specific residues on the high erucic acid trait. This information would be extremely useful to manipulate the erucic acid content in any plant seed oils.

3.4. Expression analysis of genes involved in erucic acid accumulation in pennycress seeds during maturation

As a first step to understand the molecular mechanism controlling erucic acid accumulation in Pennycress seeds, we monitored the expression of several genes encoding key enzymes that

participate in the biosynthesis of 22:1. Taking into account the fatty acid composition of total lipids and TAG during Pennycress seed development, we focused our attention on several genes. On one hand, the *TaFAE1* gene that encodes the FA elongase responsible for the elongation of 18:1 CoA to 20:1 CoA and then to 22:1^{Δ13} was the first target choice. On the other hand, the microsomal Δ12 desaturase *FAD2*, that uses 18:1 esterified at sn-2 position of PC as a substrate for 18:2 biosynthesis, was a second choice. The compared analysis of the expression of both *TaFAE1* and *TaFAD2* genes might help us to analyze, at the molecular level, the changes in acyl fluxes between elongation and desaturation that seemed to occur during seed maturation as reflected by the fatty acid composition of total lipids and the TAG fraction from both Pennycress lines. The *DGAT1* gene, encoding diacylglycerol acyl-transferase 1, which encodes the final step of the Kennedy pathway, and catalyzes the acylation of sn1,2 diacylglycerol (DAG) at the sn-3 position to produce TAG was also included in the expression analysis.

RT-PCR of the different genes analyzed from both NASC and French lines are shown in Fig. 7. *TaFAE1* mRNA levels were high in the initial stages of seed development in both Pennycress lines (G and GY), but decreased in the latter stages of maturation (YG and D), (Fig. 7). In fact, *TaFAE1* mRNA was undetectable in seeds from dry pods in both French and NASC plant lines. Note that no *TaFAE1* mRNA was detected in leaves (Fig. 7), which is consistent with the specific role of FAE1 in seeds. Although the expression profile was similar in both Pennycress lines, French plants showed a higher accumulation pattern of *TaFAE1* transcripts in seeds from green pods, while the NASC plants showed greater *TaFAE1* transcript accumulation in seeds from green-yellow pods with less *TaFAE1* mRNA at the G stage (Fig. 7). Nevertheless, the expression profile of the *TaFAE1* gene in both Pennycress lines was consistent with the lipid analysis shown in Figs. 2 and 3, indicating that elongase activity acts at the early stages of seed development on 18:1-CoA pools to rapidly provide 22:1-CoA for its incorporation to TAG. This result was also consistent with the presence of *TaDGAT1* mRNA already at the G or GY stages, indicating that TAG was rapidly synthesized upon seed development. It should be noted that no changes in *TaDGAT1* mRNA levels were detected during Pennycress seed maturation in both lines suggesting that its expression was controlled mainly at the post-transcriptional level. This expression pattern is consistent with that reported in *Arabidopsis* (Lu et al., 2003; Li et al., 2010), Tung tree (Shockey et al., 2006) or *Ricinus communis* (Kroon et al., 2006). Our expression analysis suggested that the FAE1 activity during seed maturation was controlled at least at the transcriptional level in Pennycress seeds. Overexpression of FAE1 resulted in higher levels of VLCFAs in *Arabidopsis* (Millar and Kunst, 1997). Similarly, seed-specific expression of *N. officinale* or *T. nudicaulis* FAE1 in *Arabidopsis* also resulted in higher 22:1^{Δ13} and 20:1^{Δ11} accumulation in seed oil, respectively (Mietkiewska et al., 2004, 2007). All these results indicate that, independently of the availability of acyl-CoA pools for the elongase complex, any increase in the amount of the FAE1 enzyme results in an increase of erucic acid in seeds.

The fatty acid composition from total lipids and TAG, as well as the expression profile of the *TaFAE1* gene suggested that FAE1 elongase activity was very high at the early stages of seed development. Only the DAG fraction showed an increase in 18:2 fatty acids. Since an increase in elongase activity might result in a change of acyl fluxes with less 18:1 CoA pools available for its incorporation into PC and further desaturation by the microsomal Δ12 desaturase *FAD2*, we decided to monitor the expression of the *TaFAD2* gene during Pennycress seed development. As shown in Fig. 7, *TaFAD2* mRNA levels remained unaffected during all the steps of seed development. This observation suggests that the coordination of Δ12 desaturase activity during seed maturation was controlled at the post-transcriptional level. This is not striking since

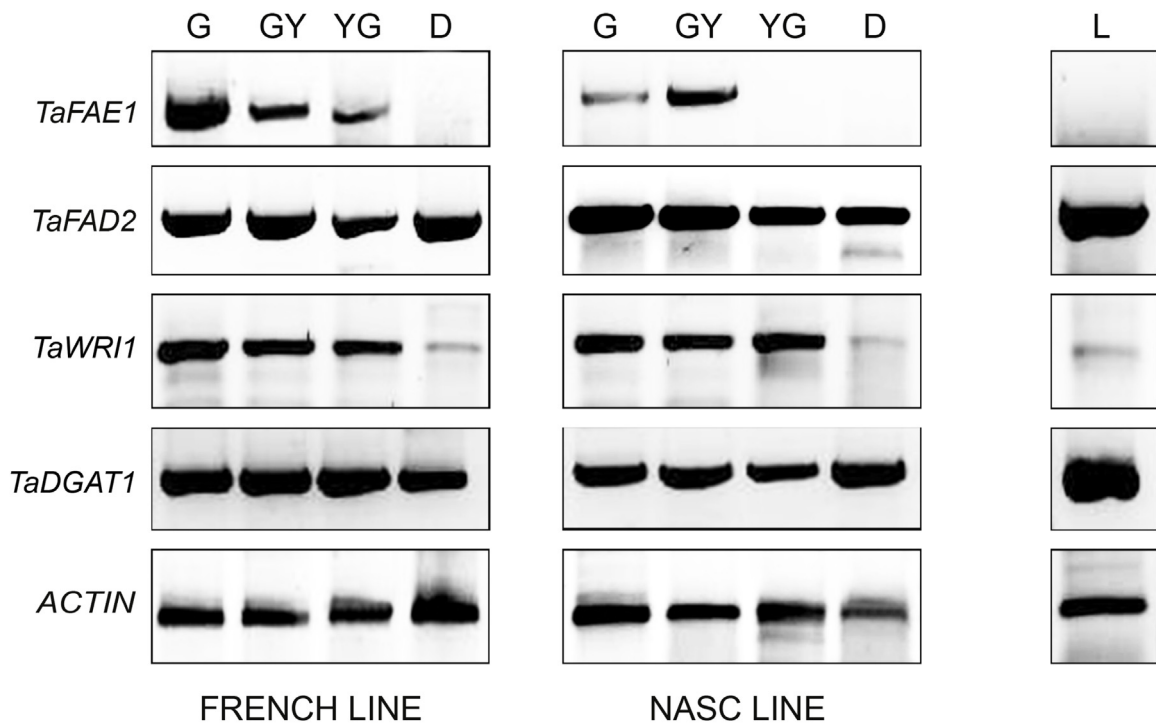


Fig. 7. *TaFAE1*, *TaFAD2*, *TaDGAT1* and *TaWRI1* gene expression during seed maturation in both Pennycress lines. Bold letters correspond to the different seed maturation stages tested: Green (G), Green-Yellow (GY), Yellow-Green (YG) and Dry (D). (L) shows the expression in leaf tissue. ACTIN was used as housekeeping gene. All PCRs were done under non-saturating conditions. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

post-transcriptional regulation has been shown to control microsomal desaturase activity in many plant species (OíQuin et al., 2010). Nevertheless, the expression analysis of *TaFAE1* and *TaFAD2* suggests the existence of a complex mechanism, acting on different genes at different levels during seed development to maintain appropriate levels of erucic acid in Pennycress seeds. The identification of control elements acting on this regulation would be extremely useful to manipulate the erucic acid content not only in the Pennycress oil but in any plant seed oils. To shed light into this question we decided to include the *WRI1* gene in our analysis. *WRI1* encodes a transcription factor from the APETALA2/ethylene-responsive element binding family that governs the flux of carbon through glycolysis and fatty acid biosynthesis in developing seeds by regulating the expression of a group of target genes that encode key enzymes of these pathways (Baud et al., 2007; To et al., 2012). These include the *FAE1* and *DGAT1*, which are critical for determining the composition and/or quantity of seed storage oil in Arabidopsis (To et al., 2012; Li-Beisson et al., 2013). When the *TaWRI1* gene expression was analyzed, a similar pattern of expression to that of the *TaFAE1* gene (Fig. 7) was observed, with higher accumulation of the *TaWRI1* RNA at the earlier stages of seed development. This result suggests that, as occurred in Arabidopsis, the *TaWRI1* is a major transcriptional factor controlling oil biosynthesis in Pennycress seeds. Overall, the expression analysis identified several genes like *TaFAE1*, *TaDGAT1* or *TaWRI1* as potential candidates for genetic manipulation in order to increase oil-seed content in this plant species.

4. Conclusion

Pennycress has become an attractive oilseed feedstock for biofuel production because of its excellent low temperature and energetic properties. Understanding the biochemical and molecular pathways involved in oil biosynthesis in Pennycress seeds together with the agronomic analysis of new varieties would be

necessary to guide future crop breeding efforts directed towards an increase in oil yield and quality as well as other important agronomic traits. In this work, we characterized oil and erucic acid biosynthesis both at the biochemical and molecular levels in two Pennycress lines of European origin. Our data showed differences between both lines in some agronomic interesting traits like vernalization (winter cycle in the case of French and spring cycle in the case of NASC), plant size (taller in the NASC plants), flowering time (delayed in the French plants) or seed production (higher in the French line). Both lines showed a high amount (35–40%) of erucic acid in their seed oil. Our lipid analysis showed that TAG was the major reservoir of 22:1^{Δ13} in the seed and that it was incorporated to TAG very rapidly during seed development. This analysis also suggested that a change in acyl fluxes towards elongation occurred during Pennycress seed maturation. This pattern of erucic acid accumulation was consistent with the transcriptional control of the *TaFAE1* gene that encodes the main component of the elongase complex responsible of 22:1^{Δ13} biosynthesis. *TaWRI1*, the master regulator of seed-oil biosynthesis, might participate in this regulation. Overall, these data might guide the biotechnological manipulation of Pennycress seeds to maximize the production of fatty acids for their use in biofuel production.

Acknowledgements

Authors wish to thank M. Josefa Salvador, Marina de la Vega and Ricardo Gracia for skillful technical assistance in growing Pennycress in growth chambers and field plots. This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO AGL2014-55300-R) and Aragón Government (Grant E33).

References

- Bates, P.D., Stymne, S., Ohlrooge, J., 2013. Biochemical pathways in seed oil synthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16, 358–364.

- Baud, S., Mendoza, M.S., To, A., Harscoët, E., Lepiniec, L., Dubreucq, B., 2007. WRINKLED1 specifies the regulatory action of LEAFY COTYLEDON2 towards fatty acid metabolism during seed maturation in Arabidopsis. *Plant J.* 50, 825–838.
- Bligh, E.G., Dyer, W.S., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
- Bouaid, A., Martínez, M., Aracil, J., 2009. Production of biodiesel from bioethanol and Brassica carinata oil: oxidation stability study. *Bioresour. Technol.* 100, 2234–2239.
- Cahoon, E.B., Shockey, J.M., Dietrich, C.R., Gidda, S.K., Mullen, R.T., Dyer, J.M., 2007. Engineering oilseeds for sustainable production of industrial and nutritional feedstocks: solving bottlenecks in fatty acid flux. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 236–244.
- Dorn, K.M., Fankhauser, J.D., Wyse, D.L., Marks, M.D., 2013. De novo assembly of the pennycress (*Thlaspi arvense*) transcriptome provides tools for the development of a winter cover crop and biodiesel feedstock. *Plant J.* 75, 1028–1038.
- Evangelista, R.L., Isbell, T.A., Cermak, S.C., 2012. Extraction of pennycress (*Thlaspi arvense* L.) seed oil by full pressing. *Ind. Crop Prod.* 37, 76–81.
- Fan, J., Shonnard, D.R., Kalnes, T.N., Johnson, P.B., Rao, S., 2013. A life cycle assessment of pennycress (*Thlaspi arvense* L.) – derived jet fuel and diesel. *Biomass Bioenergy* 55, 87–100.
- Frohlich, A., Rice, B., 2005. Evaluation of Camelina sativa oil as a feedstock for biodiesel production. *Ind. Crops Prod.* 21, 25–31.
- Furmanek, T., Demski, K., Banas, W., Haslam, R., Napier, J., Stymne, S., Banas, A., 2014. The utilization of the Acyl-CoA and the involvement PDAT and DGAT in the biosynthesis of erucic acid-rich triacylglycerols in Crambe seed oil. *Lipids* 49, 327–333.
- Garcés, R., Mancha, M., 1993. One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Anal. Biochem.* 211, 139–143.
- Gasic, K., Hernández, A., Korban, S., 2004. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Mol. Biol. Rep.* 22, 437–438.
- Ghanevati, M., Jaworski, J.G., 2001. Active-site residues of a plant membrane-bound fatty acid elongase beta-ketoacyl-CoA synthase FAE1 KCS. *Biochim. Biophys. Acta* 1530, 77–85.
- Ghanevati, M., Jaworski, J.G., 2002. Engineering and mechanistic studies of the Arabidopsis FAE1 beta-ketoacyl-CoA synthase, FAE1 KCS. *Eur. J. Biochem.* 269, 3531–3539.
- Groeneveld, J.H., Klein, A.M., 2014. Pollination of two oil-producing plant species: camelina (*Camelina sativa* L. Krantz) and pennycress (*Thlaspi arvense* L.) double cropping in Germany. *GCB Bioenergy* 6, 242–251.
- Groeneveld, J.H., Klein, A.M., 2015. Pennycress-corn double cropping increases ground beetle diversity. *Biomass Bioenergy* 77, 16–25.
- Guan, R., Lager, I., Li, X., Stymne, S., Zhu, L.-H., 2014. Bottlenecks in erucic acid accumulation in genetically engineered ultrahigh erucic acid *Crambe abyssinica*. *Plant Biotechnol. J.* 12, 193–203.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biol.* 52, 696–704.
- Han, J., Lühs, W., Sonntag, K., Zähringer, U., Borchardt, D.S., Wolter, F.P., Heinz, E., Frentzen, M., 2001. Functional characterization of beta-ketoacyl-CoA synthase genes from *Brassica napus* L. *Plant Mol. Biol.* 46, 229–239.
- James, D.W., Lim, E., Keller, J., Plooy, I., Dooner, H.K., 1995. Directed tagging of the Arabidopsis fatty acid elongation 1 (FAE1) gene with the maize transposon activator. *Plant Cell* 7, 309–319.
- Katavic, V., Friesen, W., Barton, D.L., Gossen, K.K., Giblin, E.M., Luciw, T., An, J., Zou, J.-T., Mackenzie, S.L., Keller, W.A., Males, D., Taylor, D.C., 2001. Improving erucic acid content in rapeseed through biotechnology: what can the Arabidopsis FAE1 and the yeast SLC1-1 genes contribute. *Crop Sci.* 41, 739–747.
- Katavic, V., Mietkiewska, E., Barton, D.L., Giblin, E.M., Reed, D.W., Taylor, D.C., 2002. Restoring enzyme activity in non-functional low erucic acid *Brassica napus* fatty acid elongase 1 by a single amino acid substitution. *Eur. J. Biochem.* 269, 5625–5631.
- Katavic, V., Barton, D.L., Giblin, E.M., Reed, D.W., Kumar, A., Taylor, D.C., 2004. Gaining insight into the role of serine 282 in *B. napus* FAE1 condensing enzyme. *FEBS Lett.* 562, 118–124.
- Kroon, J.T.M., Wei, W., Simon, W.J., Slabas, A.R., 2006. Identification and functional expression of a type 2 acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (DGAT2) in developing castor bean seeds which has high homology to the major triglyceride biosynthetic enzyme of fungi and animal. *Phytochemistry* 67, 2541–2549.
- Li, Y.H., Beisson, F., Pollard, M., Ohlrogge, J., 2006. Oil content of Arabidopsis seeds: the influence of seed anatomy: light and plant-to plant variation. *Phytochemistry* 67, 904–915.
- Li, R., Yu, K., Hildebrand, D.F., 2010. DGAT1, DGAT2 and PDAT expression in seeds and other tissues of epoxy and hydroxy fatty acid accumulating plants. *Lipids* 45, 145–157.
- Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M.X., Arondel, V., Bates, P.D., Baud, S., Bird, D., Debono, A., Durret, 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., Ohlrogge, J., 2013. Acyl-lipid metabolism. *Arabidopsis Book* 11, e0161.
- Lu, C.L., Bayon de Noyer, S., Hobbs, D.H., Kang, J., Wen, Y., Krachtus, D., Hills, M., 2003. Expression pattern of diacylglycerol acyltransferase-1, an enzyme involved in triacylglycerol biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol. Biol.* 52, 31–41.
- Lu, C., Xin, Z., Ren, Z., Miquel, M., 2009. An enzyme regulating triacylglycerol composition is encoded by the ROD1 gene of Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 18837–18842.
- Mietkiewska, E., Giblin, E.M., Wang, S., Barton, D.L., Dirpaul, J., Brost, J.M., Katavic, V., Taylor, D.C., 2004. Seed-specific heterologous expression of a nasturtium FAE gene in Arabidopsis results in a dramatic increase in the proportion of erucic acid. *Plant Physiol.* 136, 2665–2675.
- Mietkiewska, E., Brost, J.M., Giblin, E.M., Barton, D.L., Taylor, D.C., 2007. *Tesdelia nudicalis* FAE1 complements the fae1 mutation in transgenic Arabidopsis thaliana plants and shows a preference for elongating oleic acid to eicosenoic acid. *Plant Sci.* 173, 198–205.
- Millar, A.A., Kunst, L., 1997. Very-long-chain fatty acid biosynthesis is controlled through the expression and specificity of the condensing enzyme. *Plant J.* 12, 101–111.
- Moser, B.R., Knothe, G., Vaughn, S.F., Isbell, T.A., 2009a. Production and evaluation of biodiesel from field Pennycress (*Thlaspi arvense* L.) oil. *Energy Fuels* 23, 4149–4155.
- Moser, B.R., Shah, S.N., Winkler-Moser, J.K., 2009b. Composition and physical properties of cress (*Lepidium sativum* L.) and field pennycress (*Thlaspi arvense* L.) oils. *Ind. Crops Prod.* 30, 199–205.
- Moser, B.R., 2012. Biodiesel from alternative feedstocks: camelina and field pennycress. *Biofuels* 3, 193–209.
- OiQuin, J.B., Bourassa, L., Zhang, D.Y., Shockey, J.M., Gidda, S.K., Fosnot, S., Chapman, K.D., Mullen, R.T., 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, 21781–21796.
- Robson, P., Jensen, E., Hawkins, S., White, S.R., Kenobi, K., Clifton-Brown, J., Donnison, I., Farrar, K., 2013. Accelerating the domestication of a bioenergy crop: identifying and modelling morphological targets for sustainable yield increase in Miscanthus. *J. Exp. Bot.* 64, 4143–4155.
- Sedbrook, J.C., Phippen, W.B., Marks, M.D., 2014. New approaches to facilitate rapid domestication of a wild plant to an oilseed crop: example pennycress (*Thlaspi arvense* L.). *Plant Sci.* 227, 122–132.
- Sharma, N., Cram, D., Huebert, T., Zhou, N., Parkin, I.A.P., 2007. Exploiting the wild crucifer *Thlaspi arvense* to identify conserved and novel genes expressed during a plant's response to cold stress. *Plant Mol. Biol.* 63, 171–184.
- Shockey, J.M., Gidda, S.K., Chapital, D.C., Kuan, J.-C., Dhanoa, P.K., Bland, J.M., Rothstein, S.J., Mullen, R.T., Dyer, J.M., 2006. Tung tree DGAT1 and DGAT2 have nonredundant function in triacylglycerol biosynthesis and are localized to different subdomains of the endoplasmic reticulum. *Plant Cell* 18, 2294–2313.
- Sun, X., Pang, H., Li, M., Guo, H., Yan, Q., Hang, Y., 2013. Evolutionary pattern of the FAE1 gene in Brassicaceae and its correlation with the erucic acid trait. *PLoS One* 8, 1–12.
- To, A., Joubès, J., Barthole, G., L'Ecureuil, A., Scagnelli, A., Jasinski, S., Lepiniec, L., Baud, S., 2012. WRINKLED transcription factors orchestrate tissue-specific regulation of fatty acid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 24, 5007–5023.
- Tsogtbaatar, E., Cocuraon, J.-C., Corchado Sonera, M., Alonso, A.P., 2015. Metabolite fingerprinting of pennycress (*Thlaspi arvense* L.) embryos to assess active pathways during oil biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 66, 4267–4277.
- Vaughn, S.F., Isbell, T.A., Weisleder, D., Berhow, M.A., 2005. Biofumigant compounds released by field pennycress (*Thlaspi arvense* L.) seedmeal. *J. Chem. Ecol.* 31, 167–177.
- Von Wettstein-Knowles, P.M., 1982. Elongase and epicuticular wax biosynthesis. *Physiol. Veg.* 20, 797–809.
- Warwick, S.I., Francis, A., Susko, D.J., 2002. The biology of Canadian weeds. 9. *Thlaspi arvense* L. *Can. J. Plant. Sci.* 8, 803–823 (updated).