

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS
ACILTRANSFERASAS LPAAT Y DAGAT
IMPLICADAS EN LA SÍNTESIS DE
TRIACILGLICÉRIDOS EN SEMILLAS DE GIRASOL
(*Helianthus annuus* L.) Y OBTENCIÓN DE LÍNEAS
CON COMPOSICIÓN MODIFICADA DE LÍPIDOS



TESIS DOCTORAL

JUAN DIEGO FERNÁNDEZ GARCÍA



Departamento de Bioquímica
Vegetal y Biología
Molecular

Facultad de Biología

Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular de Productos
Vegetales

Instituto de la Grasa

**CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS
ACILTRANSFERASAS LPAAT Y DAGAT IMPLICADAS EN LA
SÍNTESIS DE TRIACILGLICÉRIDOS EN SEMILLAS DE GIRASOL
(*Helianthus annuus* L.) Y BÚSQUEDA DE NUEVOS
MUTANTES**

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor por

Juan Diego Fernández García

Trabajo dirigido por

Dr. Enrique Martínez Force

Dr. Rafael Garcés Mancheño

Sevilla, 2015

Los Dres. Enrique Martínez Force, Investigador Científico, y Rafael Garcés Mancheño, Profesor de Investigación del CSIC, emiten el siguiente informe:

El presente trabajo titulado “Clonación y caracterización de las aciltransferasas LPAAT y DAGAT implicadas en la síntesis de triacilglicéridos en semillas de girasol (*Helianthus annuus* L.) y búsqueda de nuevos mutantes” ha sido realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento en los laboratorios del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Productos Vegetales del Instituto de la Grasa (Sevilla) durante los años académicos 2006-2015, constituyendo la Memoria que presenta el Lcdo. D. Juan Diego Fernández García para optar al grado de Doctor.

Consideramos que el trabajo realizado es original y ha dado lugar a varias publicaciones en comunicaciones en congresos. La excelente labor realizada por el Lcdo. D. Juan Diego Fernández García, tanto en tareas experimentales como en la discusión de los resultados, acredita una adecuada formación para la obtención del título de Doctor.

Para que conste a efectos de tramitación de la referida Tesis Doctoral, firmamos el presente informe en Sevilla, a 13 de Octubre de 2015.

Dr. Enrique Martínez Force

Dr. Rafael Garcés Mancheño

Tutor de la Tesis Doctoral:

Dr. Francisco Javier Florencio Bellido
Catedrático de la Universidad de Sevilla

*A mis padres,
por su cariño y apoyo incondicional*

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de este trabajo de investigación ha requerido un esfuerzo tenaz durante años y un gran compromiso personal y de diversas entidades. Aún a riesgo de omitir nombres, quisiera desde estas líneas hacer pública mi gratitud a todas ellas.

La presente tesis doctoral se ha llevado a cabo en los laboratorios del Instituto de la Grasa (CSIC), bajo la dirección de los doctores *Enrique Martínez* y *Rafael Garcés*, de los que recibí la orientación, el estímulo y la ayuda, que hicieron posible mi labor. Desde aquí expreso mi más sincero agradecimiento por su magisterio, sabiduría, perspectiva, buen hacer y calma transmitida.

Igualmente desde aquí, quisiera dar las gracias a todos mis compañeros del Grupo de Genética y Bioquímica de Lípidos de Semillas, tantos a los presentes como a los que ya terminaron su etapa de formación dentro del mismo, por sus aportaciones e interés en el desarrollo de esta tesis y por el buen ambiente creado durante todos estos años de duro trabajo.

También quisiera agradecer la colaboración prestada por el personal científico y técnico del Instituto de la Grasa, destacando la labor de Dña. *Marisol Parra*, Dña. *Bárbara Cordero* y Dña. *Arantxa González*, por la excelente labor realizada para la consecución del trabajo que hoy se expone.

Respecto al personal e instituciones externas al CSIC, mi especial agradecimiento al profesor *Randall Weselake* de la Universidad de Alberta (Canadá), por la fructífera estancia realizada en su laboratorio y valiosos conocimientos en materia de caracterización enzimática mediante el uso de sustratos radiactivos.

Finalmente a los más importantes, a mi familia y amigos; en especial a mis padres, por su amor, ejemplo y buena disposición que en todo momento me manifestaron.

Muchas gracias a todos, pues sin vuestra ayuda este trabajo no hubiera sido posible.

Juan Diego Fernández García
Sevilla, 13 Octubre de 2015

Las oleaginosas son plantas de cuya semilla o fruto puede extraerse aceite. Los aceites vegetales son muy importantes desde un punto de vista económico, por la gran versatilidad de sus aplicaciones, ya sea en alimentación, tanto animal como humana, como en aplicaciones industriales, desde síntesis química a disolventes o biolubricantes. Sin embargo, no todos los aceites disponibles en la actualidad poseen las características tecnológicas requeridas para tales fines.

En respuesta a esta problemática, en las últimas décadas se vienen desarrollando una serie de modificaciones de la composición de lípidos de algunas de estas oleaginosas, ya sea mediante mejora clásica, mutagénesis o ingeniería genética, descartando métodos químicos como la hidrogenación y/o transesterificación, cuyas consecuencias conllevan efectos perjudiciales para la salud.

Al interés despertado por dichas modificaciones se une la posibilidad en los últimos años de purificar y caracterizar las enzimas implicadas en las rutas de síntesis de ácidos grasos y triacilglicéridos. Para ello, se está invirtiendo un gran esfuerzo en el estudio de las rutas metabólicas que gobiernan la síntesis de éstos en general, lo que ha permitido la clonación de un número relativamente alto de genes correspondientes a enzimas que intervienen en dichas rutas, así como a la caracterización bioquímica de otras tantas. No obstante, los mecanismos bioquímicos, moleculares y celulares en los que están implicados no han sido comprendidos a la perfección hasta la fecha.

Durante el transcurso de este trabajo se ha realizado el estudio de genes y enzimas implicadas en la biosíntesis de triacilglicéridos en semillas en desarrollo de girasol, así como la obtención de nuevas líneas de girasol con composición modificada de lípidos en su aceite.

CONTENIDO

<i>Índice general</i>	I
<i>Índice de figuras</i>	XI
<i>Índice de tablas</i>	XV
<i>Abreviaturas</i>	XVII

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1-72
1. GIRASOL	3
1.1 HISTORIA, ORIGEN Y BOTÁNICA	3
1.2 MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA	4
1.3 IMPORTANCIA ECONÓMICA Y DISTRIBUCIÓN DEL CULTIVO	9
1.4 PRODUCCIÓN Y CONSUMO	10
1.5 MEJORA DEL CULTIVO Y PERSPECTIVAS DE FUTURO	14
2. LÍPIDOS DE PLANTAS: CLASIFICACIÓN Y FUNCIÓN	16
2.1 ÁCIDOS GRASOS (AGs)	19
2.1.1 <u>Definición y clasificación</u>	19
2.1.2 <u>Propiedades físico-químicas</u>	20
2.1.3 <u>Nomenclatura</u>	22
2.1.4 <u>Ácidos grasos más frecuentes en la naturaleza</u>	22
2.2 ACILGLICÉRIDOS	25
2.2.1 <u>Definición y clasificación</u>	25
2.2.2 <u>Propiedades físico-químicas</u>	27
2.2.3 <u>Nomenclatura</u>	28
2.2.4 <u>Acilglicéridos más frecuentes en la naturaleza</u>	29
2.3 FOSFOLÍPIDOS	30
2.3.1 <u>Definición y clasificación</u>	30
3. LÍPIDOS DE PLANTAS: BIOSÍNTESIS	32
3.1 SÍNTESIS <i>DE NOVO</i> DE ÁCIDOS GRASOS (AGs)	32
3.2 FORMACIÓN DEL POOL DE ACIL-CoAs	34

3.3 BIOSÍNTESIS DE TRIACILGLICÉRIDOS (TAGs)	35
3.3.1 <u>Lisofosfatidato aciltransferasas (LPAATs)</u>	37
3.3.2 <u>Diacilglicerol aciltransferasas (DAGATs)</u>	38
4. LÍPIDOS DE PLANTAS: MODIFICACIÓN	43
4.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN	44
4.2 PROBLEMÁTICA ACTUAL	47
4.3 MODIFICACIÓN DEL CONTENIDO GRASO DE LAS SEMILLAS	49
4.4 MODIFICACIÓN DE LA CALIDAD DE LOS ACEITES	52
4.4.1 <u>Modificación en la composición de ácidos grasos</u>	52
4.4.1.1 Modificación en el contenido de PUFAs	52
4.4.1.2 Modificación en el contenido de MUFAs	53
4.4.1.3 Modificación en el contenido de AGs saturados	53
4.4.2 <u>Modificación en la distribución de ácidos grasos en TAGs</u>	56
4.4.2.1 Coeficiente de asimetría α Sat	59
5. ACEITE DE GIRASOL	61
5.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES	61
5.2 OBTENCIÓN DE MUTANTES CON COMPOSICIÓN MODIFICADA DE ACEITE	62
5.2.1 <u>Línea de girasol HOHE (CAS-15)</u>	66
5.2.1.1 Herencia del carácter HOHE y enzimas implicadas	67
5.2.1.2 Composición de AGs y distribución en TAGs	70
OBJETIVOS	3-76
MATERIALES Y MÉTODOS	77-154
1. MATERIALES	79
1.1 APARATOS Y MATERIALES	79
1.2 REACTIVOS Y QUÍMICOS	80
1.3 ENZIMAS Y KITS	81
1.4 MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CULTIVO	81
1.4.1 <u><i>Escherichia coli</i></u>	81
1.4.1.1 Condiciones de cultivo	82
1.4.1.2 Recogida de material biológico	82

1.4.2	<u><i>Agrobacterium tumefaciens</i></u>	82
1.4.2.1	Condiciones de cultivo	83
1.4.2.2	Recogida de material biológico	83
1.4.3	<u><i>Saccharomyces cerevisiae</i></u>	83
1.4.3.1	Condiciones de cultivo	84
1.4.3.2	Recogida de material biológico	84
1.4.4	<u><i>Helianthus annuus</i> L.</u>	85
1.4.4.1	Condiciones de cultivo	86
1.4.4.2	Recogida de material biológico	86
1.4.5	<u><i>Arabidopsis thaliana</i></u>	88
1.4.5.1	Condiciones de cultivo	89
1.4.5.2	Recogida de material biológico	91
1.5	MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES NUTRITIVAS	91
1.5.1	<u><i>E. coli</i></u>	91
1.5.2	<u><i>A. tumefaciens</i></u>	92
1.5.3	<u><i>S. cerevisiae</i></u>	92
1.5.4	<u><i>A. thaliana</i></u>	92
1.6	ANTIBIÓTICOS	93
1.6.1	<u><i>E. coli</i></u>	93
1.6.2	<u><i>A. tumefaciens</i></u>	94
1.6.3	<u><i>A. thaliana</i></u>	95
1.7	TAMPONES Y SOLUCIONES	95
1.7.1	<u>Biología Molecular</u>	95
1.7.1.1	Ácidos nucleicos	95
1.7.1.2	Preparación de células competentes	96
1.7.1.3	Transformación de células	96
1.7.1.4	Transformación de plantas	96
1.7.1.5	Microsomas de levaduras	96
1.7.1.6	Stock de células	97
1.7.2	<u>Bioquímica</u>	97
1.7.2.1	Extracción de lípidos y metilación de ácidos grasos	97
1.7.2.2	Ensayos de actividad <i>HaDAGAT in vitro</i>	98
1.8	OLIGONUCLEÓTIDOS	98
1.9	PLÁSMIDOS Y VECTORES DE EXPRESIÓN	99

2. MÉTODOS	102
2.1 BIOLOGÍA MOLECULAR	102
2.1.1 <u>Extracción de ácidos nucleicos</u>	102
2.1.1.1 Protocolos de bacterias	102
2.1.1.1.1 <i>Extracción de DNA plasmídico</i>	102
2.1.1.2 Protocolos de levaduras	102
2.1.1.2.1 <i>Aislamiento de RNA total</i>	102
2.1.1.2.2 <i>Síntesis de la primera cadena de cDNA</i>	103
2.1.1.2.3 <i>Extracción de DNA plasmídico</i>	103
2.1.1.3 Protocolos de plantas	103
2.1.1.3.1 <i>Aislamiento de RNA total</i>	103
2.1.1.3.2 <i>Aislamiento de mRNA</i>	104
2.1.1.3.3 <i>Síntesis de la primera cadena de cDNA</i>	104
2.1.1.3.4 <i>Extracción de gDNA</i>	104
2.1.2 <u>Cuantificación de ácidos nucleicos</u>	106
2.1.3 <u>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</u>	106
2.1.3.1 Amplificación de DNA mediante PCR	106
2.1.3.2 Amplificación rápida de los extremos del cDNA (RACE)	108
2.1.3.4 Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa	109
2.1.3.4.1 <i>Bases teóricas</i>	109
2.1.3.4.2 <i>Aplicación técnica</i>	111
2.1.3.4.3 <i>Eficiencia de amplificación</i>	112
2.1.3.4.4 <i>Cuantificación de los productos de PCR</i>	112
2.1.4 <u>Separación y purificación de ácidos nucleicos</u>	113
2.1.4.1 Electroforesis de DNA en gel de agarosa	113
2.1.4.2 Purificación de fragmentos de DNA a partir de gel de agarosa	114
2.1.5 <u>Tratamientos enzimáticos del DNA</u>	114
2.1.5.1 Digestión del DNA con nucleasas de restricción	114
2.1.5.2 Desfosforilación de extremos del DNA	114
2.1.5.3 Ligación de fragmentos del DNA	115
2.1.6 <u>Construcciones génicas</u>	116
2.1.6.1 Clonación en plásmidos de clonación en <i>E. coli</i>	116
2.1.6.2 Clonación en vector de expresión en <i>S. cerevisiae</i>	116

2.1.6.3	Clonación en vector de expresión en <i>A. thaliana</i>	118
2.1.7	<u>Secuenciación del DNA</u>	119
2.1.8	<u>Transformación génica</u>	119
2.1.8.1	Transformación génica en <i>E. coli</i>	119
2.1.8.1.1	Preparación de células competentes	119
2.1.8.1.2	Transformación mediante choque térmico	120
2.1.8.1.3	Comprobación de transformantes	120
2.1.8.2	Transformación génica en <i>A. tumefaciens</i>	122
2.1.8.2.1	Preparación de células competentes	122
2.1.8.2.2	Transformación mediante choque térmico	122
2.1.8.2.3	Comprobación de transformantes	123
2.1.8.3	Transformación génica en <i>S. cerevisiae</i>	123
2.1.8.3.1	Transformación mediante LiAc-PEG	123
2.1.8.3.2	Comprobación de transformantes	124
2.1.8.4	Transformación génica en <i>A. thaliana</i>	124
2.1.8.4.1	Selección de líneas KO homocigotas	124
2.1.8.4.2	Transformación mediante <i>A. tumefaciens</i>	125
2.1.8.4.3	Selección y comprobación de líneas transgénicas	126
2.1.9	<u>Expresión heteróloga de proteínas recombinantes</u>	128
2.1.9.1	Análisis funcional en <i>S. cerevisiae</i>	128
2.1.9.1.1	Inducción de proteínas recombinantes	128
2.1.9.1.2	Obtención de microsomas	130
2.1.9.1.3	Cuantificación de proteínas microsomales	131
2.1.9.2	Análisis funcional en <i>A. thaliana</i>	131
2.1.9.2.1	Análisis fenotípico	132
2.1.9.2.2	Análisis de expresión génica	132
2.1.10	<u>Medidas de densidad óptica de cultivos</u>	132
2.1.11	<u>Cálculo de tasa de crecimiento y tiempo de generación de cultivos</u>	132

2.2 BIOQUÍMICA	133
2.2.1 <u>Análisis de lípidos</u>	133
2.2.1.1 Extracción de lípidos totales	134
2.2.1.1.1 <i>Protocolo de levaduras</i>	134
2.2.1.1.2 <i>Protocolo de plantas</i>	134
2.2.1.2 Separación de TAGs mediante cromatografía en capa fina (TLC)	135
2.2.1.3 Obtención de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES)	137
2.2.1.4 Separación de TAGs y FAMES mediante cromatografía de gases (GC)	138
2.2.2 <u>Caracterización bioquímica de <i>HaDAGATs</i></u>	140
2.2.2.1 Ensayo de actividad <i>HaDAGAT in vitro</i>	140
2.2.2.2 Cuantificación de la radiactividad y determinación de la cantidad de TAGs formados	141
2.3 BIOINFORMÁTICA	142
2.3.1 <u>Análisis informático de secuencias de DNA y proteínas</u>	142
2.3.2 <u>Análisis informático de muestras y datos</u>	143
2.4 BIOESTADÍSTICA	144
2.4.1 <u>Estadística descriptiva</u>	144
2.4.1.1 Medidas de tendencia central o posición	145
2.4.1.2 Medidas de dispersión	146
2.4.1.3 Medidas de forma de la distribución	146
2.4.2 <u>Estadística inferencial</u>	147
2.4.3 <u>Genética cuantitativa</u>	150
2.5 DISEÑO EXPERIMENTAL Y CRITERIOS DE SELECCIÓN LÍNEA HOHE	150
 RESULTADOS	 135-252
 BLOQUE I: CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ENZIMÁTICA DE LAS ACILTRANSFERASAS IMPLICADAS EN LA BIOSÍNTESIS DE TRIACILGLICÉRIDOS EN GIRASOL	 157

1. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ENZIMÁTICA DE LAS ENZIMAS LISOFOSFATIDATO ACILTRANSFERASAS 1 Y 2 (*HaLPAAT1* Y *HaLPAAT2*)

1.1 CLONACIÓN DE LOS GENES <i>HaLPAATs</i>	157
1.1.1 <u>Clonación de fragmentos internos de <i>HaLPAATs</i></u>	157
1.1.2 <u>Obtención de las secuencias completas de cDNA de <i>HaLPAATs</i></u> ...	159
1.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>HaLPAATs</i>	161
1.2.1 <u>Características fisicoquímicas de las secuencias polipeptídicas deducidas a partir de los cDNAs de <i>HaLPAATs</i></u>	161
1.2.2 <u>Análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas derivadas de <i>HaLPAATs</i></u>	162
1.2.3 <u>Predicción de estructuras y localización subcelular de <i>HaLPAATs</i></u>	164
1.3 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE <i>HaLPAATs</i> EN SEMILLAS Y TEJIDOS VEGETATIVOS ..	166
1.4 CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE <i>HaLPAATs</i>	168
1.4.1 <u>Expresión heteróloga de proteínas recombinantes <i>HaLPAATs</i> en <i>S. cerevisiae</i></u>	168
1.4.1.1 Efecto sobre la tasa de crecimiento en <i>S. cerevisiae</i>	169
1.4.1.2 Análisis de expresión de <i>HaLPAATs</i> en <i>S. cerevisiae</i>	171
1.4.1.3 Análisis lipídico <i>in vivo</i>	172
1.4.2 <u>Análisis funcional de proteínas recombinantes <i>HaLPAATs</i> en <i>A. thaliana</i></u>	172
1.4.2.1 Análisis de expresión de <i>HaLPAATs</i> en <i>A. thaliana</i>	173
1.4.2.2 Análisis fenotípico de semillas	174
1.4.2.3 Análisis lipídico de semillas	174
1.4.2.3.1 <i>Análisis de la composición de TAGs</i>	174
1.4.2.3.2 <i>Análisis de la composición de FAMES</i> ...	174

2. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ENZIMÁTICA DE LAS ENZIMAS DIACILGLICEROL ACILTRANSFERASAS 1A, 1B Y 2 (*HaDAGAT1A*, *HaDAGAT1B* Y *HaDAGAT2*) **175** |

2.1 CLONACIÓN DE LOS GENES <i>HaDAGATs</i>	175
2.1.1 <u>Clonación de fragmentos internos de <i>HaDAGATs</i></u>	175
2.1.2 <u>Obtención de las secuencias completas de cDNA de <i>HaDAGATs</i></u> .	176

2.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>HaDAGATs</i>	179
2.2.1 <u>Características fisicoquímicas de las secuencias polipeptídicas deducidas a partir de los cDNAs de <i>HaDAGATs</i></u>	179
2.2.2 <u>Análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas derivadas de <i>HaDAGATs</i></u>	180
2.2.3 <u>Predicción de estructuras y localización subcelular de <i>HaDAGATs</i></u>	184
2.3 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE <i>HaDAGATs</i> EN SEMILLAS Y TEJIDOS VEGETATIVOS .	189
2.4 CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE <i>HaDAGATs</i>	191
2.4.1 <u>Expresión heteróloga de proteínas recombinantes <i>HaDAGATs</i> en <i>S. cerevisiae</i></u>	191
2.4.1.1 Efecto sobre la tasa de crecimiento en <i>S. cerevisiae</i>	192
2.4.1.2 Análisis de expresión de <i>HaDAGATs</i> en <i>S. cerevisiae</i>	195
2.4.1.3 Análisis lipídico <i>in vivo</i>	196
2.4.1.4 Ensayos de actividad <i>HaDAGAT in vitro</i>	197
2.4.1.4.1 <i>Efecto del pH en la actividad</i>	197
2.4.1.4.2 <i>Especificidad por distintos sustratos</i>	199
2.4.2 <u>Análisis funcional de proteínas recombinantes <i>HaDAGATs</i> en <i>A. thaliana</i></u>	200
2.4.2.1 Análisis de expresión de <i>HaDAGATs</i> en <i>A. thaliana</i>	201
2.4.2.2 Análisis fenotípico de semillas	202
2.4.2.3 Análisis lipídico de semillas	202
2.4.2.3.1 <i>Análisis de la composición de TAGs</i>	202
2.4.2.3.2 <i>Análisis de la composición de FAMES</i> ...	202
 BLOQUE II: ANÁLISIS DE TRIACILGLICÉRIDOS (TAGs) EN LÍNEAS MUTAGENIZADAS DE GIRASOL ALTO OLEICO ALTO ESTEÁRICO (HOHE) Y SELECCIÓN DE NUEVOS CANDIDATOS	203
 1. OBJETIVO Y CRITERIOS DE SELECCIÓN	203
 2. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE POBLACIONES (M₂-M₅)	204
2.1 GENERACIÓN M₂	204
2.2 GENERACIÓN M₃	204
2.3 GENERACIÓN M₄	204

2.4 GENERACIÓN M ₅	205
-------------------------------------	-----

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE POBLACIONES (M₂-M₅) 206

3.1 ANÁLISIS POR VARIABLES A LO LARGO DE LAS GENERACIONES	206
3.1.1 <u>Contenido esteárico (E)</u>	206
3.1.2 <u>Contenido EOE</u>	216
3.1.3 <u>Contenido SUS</u>	226
3.1.4 <u>Valor αSat</u>	235
3.2 ANÁLISIS DE RELACIÓN DE VARIABLES POR GENERACIONES	245
3.2.1 <u>Generación M₂</u>	245
3.2.2 <u>Generación M₃</u>	249
3.2.1 <u>Generación M₄</u>	249
3.2.2 <u>Generación M₅</u>	249

DISCUSIÓN 53-288

BLOQUE I: CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ENZIMÁTICA DE LAS ACILTRANSFERASAS IMPLICADAS EN LA BIOSÍNTESIS DE TRIACILGLICÉRIDOS EN GIRASOL 255

1. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS ENZIMAS IMPLICADAS EN LA BIOSÍNTESIS DE TRIACILGLICÉRIDOS EN GIRASOL: *Ha*LPAATs Y *Ha*DAGATs

1.1 CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE <i>Ha</i> LPAATs Y <i>Ha</i> DAGATs ..	255
1.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE <i>Ha</i> LPAATs Y <i>Ha</i> DAGATs	256
1.2.1 <u>Evolución de familias génicas LPATs y DGATs</u>	257
1.3 PREDICCIÓN DE ESTRUCTURAS DE <i>Ha</i> LPAATs Y <i>Ha</i> DAGATs	258
1.3.1 <u>Estudio comparativo de motivos conservados y residuos aminoacídicos</u>	259
1.3.1.1 <i>Ha</i> LPAATs	260
1.3.1.2 <i>Ha</i> DAGATs	261
1.3.2 <u>Estudio comparativo de dominios transmembrana (TMDs)</u>	265
1.4 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE <i>Ha</i> LPAATs Y <i>Ha</i> DAGATs	266
1.4.1 <u>Localización en subdominios y relación con otros elementos</u>	268

1.5 ESTUDIO COMPARATIVO DE MODELOS TOPOLÓGICOS DE <i>Ha</i>LPAA<i>Ts</i>	
<i>Y Ha</i>DAGAT<i>s</i>	270
1.6 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE <i>Ha</i>LPAA<i>Ts</i>	
<i>Y Ha</i>DAGAT<i>s</i>	273
1.6.1 <u>LPAT<i>s</i></u>	274
1.6.2 <u>DGAT<i>s</i></u>	274
1.6.3 <u>Regulación de la expresión de <i>Ha</i>LPAA<i>Ts</i> y <i>Ha</i>DAGAT<i>s</i> en</u> <u>semillas en desarrollo</u>	275
2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS ENZIMAS IMPLICADAS EN LA BIOSÍNTESIS DE TRIACILGLICÉRIDOS EN GIRASOL: <i>Ha</i>LPAA<i>Ts</i> Y <i>Ha</i>DAGAT<i>s</i>	277
2.1 <i>Ha</i>LPAA<i>Ts</i>	277
2.1.1 <u>Nivel cantidad</u>	278
2.1.2 <u>Nivel calidad</u>	278
2.2 <i>Ha</i>DAGAT<i>s</i>	281
2.2.1 <u>Nivel cantidad</u>	281
2.2.2 <u>Nivel calidad</u>	285
BLOQUE II: ANÁLISIS DE TRIACILGLICÉRIDOS (TAG<i>s</i>) EN LÍNEAS MUTAGENIZADAS DE GIRASOL ALTO OLEICO ALTO ESTEÁRICO (HOHE) Y SELECCIÓN DE NUEVOS CANDIDATOS	288
CONCLUSIONES	289-294
BIBLIOGRAFÍA	295-326
APÉNDICES	327-332

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Radiografía de planta de girasol
2. Inflorescencia y semilla de girasol
3. Distribución mundial del cultivo de girasol
4. Evolución de la producción (Mt) y superficie cultivada (Mha) de semillas de girasol en las últimas décadas a nivel mundial (FAOSTAT, 2015)
5. Comparativa de la evolución de la producción (miles de toneladas, kt) de aceite de girasol en las últimas décadas a nivel mundial y España (FAOSTAT, 2015)
6. Evolución de la producción (Mt) y superficie cultivada (Mha) de semillas de girasol en las últimas décadas en España (FAOSTAT, 2015)
7. Ejemplos de las estructuras representativas para cada categoría de lípidos (LIPID MAPS-ICCNL)
8. Esquema comparativo de las estructuras de varios ácidos grasos
9. Estructura de los acilglicéridos
10. Disposición estructural de los polimorfismos de los triacilglicéridos en sus formas β y β'
11. Representación gráfica de las tres posiciones estereoespecíficas de ácidos grasos en la molécula de TAG
12. Estructura de los fosfolípidos
13. Esquema general de la ruta de biosíntesis de lípidos en plantas
14. Diagrama esquemático de la ruta de biosíntesis de los ácidos grasos principales saturados, monoinsaturado (MUFA) y poliinsaturados (PUFAs) en semillas de oleaginosas, así como sus propiedades nutritivas y funcionales
15. Representación esquemática de los plásmidos y vectores usados en este trabajo
16. Curva de amplificación de la qRT-PCR
17. Método rápido para la identificación de transformantes *A. thaliana* empleado en este trabajo
18. Selección de transformantes *A. thaliana* resistentes a higromicina B
19. Separación de lípidos neutros por cromatografía en capa fina (TLC)
20. Esterificación de triacilglicérido (TAG) en sus ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES)

21. Esquema general de un cromatógrafo de gases (GC)
22. Esquema representativo del diseño experimental seguido para la obtención de nuevas generaciones mediante análisis y selección de semillas procedentes de la línea segregante alto oleico alto esteárico (HOHE) de girasol
23. Alineamiento parcial de secuencias nucleotídicas de LPATs de plantas
24. Secuencias nucleotídicas flanqueantes al fragmento interno de *HaLPAAT2*
25. Secuencias completas de los cDNA y proteínas de *HaLPAAT1* (A) y de *HaLPAAT2* (B) de la línea silvestre CAS-6
26. Árbol filogenético de las proteínas *HaLPAATs* junto con LPATs de distintas especies vegetales enraizado mediante LPAT de *Capsaspora owczarzaki* empleando el método NJ con el programa MEGA 5.10
27. Alineamiento aminoacídico de *HaLPAATs* con LPATs homólogas de distintas especies vegetales empleando el programa Clustal Omega
28. Predicción de dominios transmembrana para *HaLPAATs* mediante el uso del programa TMHMM 2.0
29. Representación esquemática de las proteínas *HaLPAATs* mediante el uso del programa Geneious 5.4.4
30. Perfil de expresión de los genes *HaLPAATs* en tejidos vegetativos (hoja, raíz, tallo y cotiledón) y en semillas en desarrollo en la línea silvestre CAS-6 mediante qRT-PCR absoluta
31. Representación de las curvas de crecimiento de la estirpe silvestre W303-1A transformada con las construcciones *pYES2::HaLPAATs*, junto con la estirpe con o sin vector *pYES2* vacío como controles
32. Expresión de los genes *HaLPAAT1*, *HaLPAAT2* y *ScrRNA18S* en la estirpe silvestre W303-1A de *S. cerevisiae*
33. Expresión de los genes *HaLPAAT1*, *HaLPAAT2* y *AtActina* en la línea KO N504681 de *A. thaliana*
34. Alineamiento parcial de secuencias nucleotídicas de DGATs de plantas
35. Secuencias completas de los cDNA y proteínas de *HaDAGAT1A* (A) y *HaDAGAT1B* (B) de la línea silvestre CAS-6
36. Secuencias completas del cDNA y proteína de *HaDAGAT2* de la línea silvestre CAS-6

37. Árbol filogenético de las proteínas *HaDAGAT1s* junto con *DGAT1s* de distintas especies vegetales enraizado mediante la *DGAT1* de *Capsaspora owczarzaki* empleando el método NJ con el programa MEGA 5.10
38. Árbol filogenético de la proteína *HaDAGAT2* junto con *DGAT2s* de distintas especies vegetales enraizado mediante la *DGAT2* de *Capsaspora owczarzaki* empleando el método NJ con el programa MEGA 5.10
39. Alineamiento aminoacídico de las *HaDAGAT1s* con *DGAT1s* homólogas de distintas especies vegetales empleando el programa Clustal Omega
40. Alineamiento aminoacídico de la *HaDAGAT2* con *DGAT2s* homólogas de distintas especies vegetales empleando el programa Clustal Omega
41. Predicción de dominios transmembrana para las *HaDAGATs* mediante el uso del programa TMHMM 2.0
42. Representación esquemática de las proteínas *HaDAGATs* mediante el uso del programa Geneious 5.4.4
43. Perfil de expresión de los genes *HaDAGATs* en tejidos vegetativos (hoja, raíz, tallo y cotiledón) y en semillas en desarrollo en la línea silvestre CAS-6 mediante qRT-PCR absoluta
44. Representación de las curvas de crecimiento de la estirpe cuádruple mutante H1246 transformada con las construcciones *pYES2::HaDAGATs*, junto con la estirpe con o sin vector *pYES2* vacío y la estirpe silvestre W303-1A como controles
45. Expresión de los genes *HaDAGAT1A*, *HaDAGAT1B*, *HaDAGAT2* y *ScrRNA18S* en la estirpe cuádruple mutante H1246 de *S. cerevisiae*
46. Efecto del pH en la actividad *HaDAGAT1A*, *HaDAGAT1B* y *HaDAGAT2*
47. Especificidad por sustrato de *HaDAGAT1A*, *HaDAGAT1B* y *HaDAGAT2*
48. Expresión de los genes *HaDAGAT1A*, *HaDAGAT1B*, *HaDAGAT2* y *AtActina* en la línea KO N3861 (*AS11*) de *A. thaliana*
49. Distribución en términos absolutos y porcentuales de la variable “contenido de esteárico (E)” en las distintas generaciones poblacionales (M_2 - M_5)
50. Distribución en términos absolutos y porcentuales de la variable “contenido de EOE” en las distintas generaciones poblacionales (M_2 - M_5)
51. Distribución en términos absolutos y porcentuales de la variable “contenido de SUS” en las distintas generaciones poblacionales (M_2 - M_5)

52. Distribución en términos absolutos y porcentuales de la variable “valor α Sat” en las distintas generaciones poblacionales (M_2 - M_5)
53. Análisis bidimensional entre las variables estudiadas en la población inicial perteneciente a la generación M_2
54. Relaciones entre las variables estudiadas en la población inicial perteneciente a la generación M_2 mediante Análisis de Componentes Principales (ACP)
55. Distribución de las frecuencias absolutas de las variables estudiadas en las poblaciones pertenecientes a las generaciones M_2 - M_5
56. Esquema propuesto para la evolución de DGAT1s y DGAT2s en eucariotas
57. Mecanismo de acción propuesto para LPAT de plantas
58. Modelos topológicos propuestos para las proteínas *Ha*LPAATs y *Ha*DAGATs

ÍNDICE DE TABLAS

1. Principales países productores de *aceite* de girasol en el mundo en el año 2012 (FAOSTAT, 2015)
2. Ácidos grasos más comunes en los lípidos de reserva
3. Enzimas asociadas con cambios en la acumulación de aceite en semillas
4. Composición en ácidos grasos modificados de los principales aceites vegetales usados en la industria alimentaria
5. Composición modificada de ácidos grasos de aceites de líneas de girasol estándares y mutantes, algunas de las cuales pertenecen a la Colección del Instituto de la Grasa
6. Composición en TAGs modificada de aceites de líneas de girasol pertenecientes a la Colección del Instituto de la Grasa
7. Especies TAGs, contenido total de ácidos grasos saturados y coeficiente α Sat de aceites de líneas de girasol pertenecientes a la Colección del Instituto de la Grasa
8. Aparatos usados en este trabajo
9. Materiales usados en este trabajo
10. Reactivos y químicos usados en este trabajo
11. Estirpes de *E. coli* usadas en este trabajo
12. Estirpe de *A. tumefaciens* usada en este trabajo
13. Estirpes de *S. cerevisiae* usadas en este trabajo
14. Líneas de girasol (*H. annuus* L.) usadas en este trabajo
15. Líneas de *A. thaliana* usadas en este trabajo
16. Plásmidos y vectores de expresión utilizados en este trabajo
17. Propiedades fisicoquímicas de las secuencias aminoacídicas de las *HaLPAATs*
18. Tasas de crecimiento (μ) y tiempos de generación (τ) calculados a partir de la fase exponencial de los cultivos de la estirpe silvestre W303-1A, con y sin plásmido *pYES2* vacío, y las transformadas con *pYES2::HaLPAAT1* y *pYES2::HaLPAAT2* en W303-1A
19. Falta
20. Falta
21. Propiedades fisicoquímicas de las secuencias aminoacídicas *HaDAGAT1A*, *HaDAGAT1B* y *HaDAGAT2*

22. Tasas de crecimiento (μ) y tiempos de generación (τ) calculados a partir de la fase exponencial de los cultivos de la estirpe silvestre W303-1A, la estirpe mutante H1246, con y sin plásmido *pYES2* vacío, y las transformadas con *pYES2::HaDAGAT1A*, *pYES2::HaDAGAT1B* y *pYES2::HaDAGAT2* en H1246
23. Falta
24. Falta
25. Distribución de frecuencias de la variable “contenido de esteárico (E)” en las distintas generaciones poblacionales (M_2 - M_5)
26. Estadísticos descriptivos relativos a la variable “contenido de esteárico (E)” en las distintas generaciones poblacionales (M_2 - M_5)
27. Distribución de frecuencias de la variable “contenido de EOE” en las distintas generaciones poblacionales (M_2 - M_5)
28. Estadísticos descriptivos relativos a la variable “contenido de EOE” en las distintas generaciones poblacionales (M_2 - M_5)
29. Distribución de frecuencias de la variable “contenido de EOE” en las distintas generaciones poblacionales (M_2 - M_5)
30. Estadísticos descriptivos relativos a la variable “contenido de SUS” en las distintas generaciones poblacionales (M_2 - M_5)
31. Distribución de frecuencias de la variable “valor α Sat” en las distintas generaciones poblacionales (M_2 - M_5)
32. Estadísticos descriptivos relativos a la variable “valor α Sat” en las distintas generaciones poblacionales (M_2 - M_5)
33. Funciones de ajuste y coeficientes de determinación (R^2) entre las variables estudiadas en la población inicial perteneciente a la generación M_2
34. Coeficientes de correlación lineal (r) y Chi cuadrado reducido entre las variables estudiadas en la población inicial perteneciente a la generación M_2
35. Distribución de frecuencias entre las variables estudiadas en las distintas poblaciones estudiadas (M_2 - M_5)

ABREVIATURAS

A. UNIDADES

Unidades de concentración		Unidades de peso	
M	Molar	Mt	Millones de toneladas
mM	Milimolar	kt	Miles de toneladas
μ M	Micromolar	kg	Kilogramo
g/L	Gramos/litro	g	Gramo
v/v	Volumen/volumen	mg	Miligramo
p/v	Peso/volumen	μ g	Microogramo
p/p	Peso/peso		

Unidades de longitud		Unidades de volumen	
m	Metro	L	Litro
cm	Centímetro	mL	Mililitro
mm	Milímetro	μ L	Microlitro
μ m	Micrómetro	nm^3	Nanómetro cúbico
nm	Nanómetro		

Unidades de tiempo		Unidades de superficie	
h	Hora	Mha	Millones de hectáreas
min	Minuto		
s	Segundo		

Otras unidades			
%	Porcentaje	GBq	Gigabecquerel
$^{\circ}$ C	Grado centígrado	kb	Kilobase de nucleótidos
Aas	Aminoácido	KPa	Kilopascal
Abs	Absorbancia	mCi	Milicurios
Da	Dalton	pb	Par bases de nucleótidos
DDF	Día después de floración	rpm	Revolución por minuto
DDS	Día después de siembra	U	Unidad de enzima
DPM	Desintegración por minuto	V	Voltio
<i>g</i>	Aceleración de la gravedad		

B. NOMENCLATURA DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Nombre común	Nombre sistemático	Abreviatura	Símbolo
Láurico	Dodecanoico	12:0	
Mirísrico	Tetradecanoico	14:0	
Palmítico	Hexadecanoico	16:0	P
Palmitoleico	Cis-9-hexadecenoico	16:1 ω 7c	
Esteárico	Octadecanoico	18:0	E
Oleico	Cis-9-octadecenoico	18:1 ω 9c	O
Linoleico	Cis,cis-9,12-octadecadienoico	18:2 ω 6c,9c	L
α -linolénico	Cis,cis,cis-9,12,15-octadecatrienoico	18:3 ω 3c,6c,9c	Ln
γ -linolénico	Cis,cis,cis-6,9,12-octadecatrienoico	18:3 ω 6c,9c,12c	
Aráquico	Eicosanoico	20:0	
Gadoleico	Cis-11-icosenoico	20:1 ω 9c	
Araquidónico	Eicosatetraenoico	20:4 ω 6	A
Behénico	Docosanoico	22:0	B
Erúcico	Cis-13-docosenoico	22:1 ω 9c	
Lignocérico	Tetracosanoico	24:0	

C. NOMENCLATURA DE LOS ACIL-COAs

18:0-CoA	Estearil-CoA
18:1-CoA	Oleil-CoA

D. NOMENCLATURA DE LOS TRIACILGLICÉRIDOS

SSS	Saturado-Saturado-Saturado
SIS	Saturado-Insaturado-Saturado
SII	Saturado-Insaturado-Insaturado
α Sat	Coefficiente de asimetría

E. NOMENCLATURA DE LOS AMINOÁCIDOS

Nombre común	Abreviatura	Símbolo	MW
Ácido Aspartico	Asp	D	133
Ácido glutámico	Glu	E	147
Alanina	Ala	A	89
Arginina	Arg	R	174
Asparragina	Asn	N	132
Cisteina	Cys	C	121
Fenilalanina	Phe	F	165
Glicina	Gly	G	75
Glutamina	Gln	Q	146
Histidina	His	H	155
Isoleucina	Ile	I	131
Leucina	Leu	L	131
Lisina	Lys	K	146
Metionina	Met	M	149
Prolina	Pro	P	115
Serina	Ser	S	105
Tirosina	Try	Y	181
Treonina	Thr	T	119
Triptofano	Trp	W	204
Valina	Val	V	117

F. ORGANISMOS

Nombre científico	Abreviatura	Nombre científico	Abreviatura
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>Os</i> <i>O. sativa</i>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>At</i> <i>A. thaliana</i>	<i>Perilla frutescens</i>	<i>Pf</i> <i>P. frutescens</i>
<i>Brassica</i>	<i>B</i>	<i>Physcomitrella patens</i>	<i>Pp</i> <i>P. patens</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Ec</i> <i>E. coli</i>	<i>Picea sitchensis</i>	<i>Ps</i> <i>P. sitchensis</i>
<i>Euonymus</i>	<i>E</i>	<i>Ricinus communis</i>	<i>Rc</i> <i>R. communis</i>
<i>Glycine max</i>	<i>Gm</i> <i>G. max</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Sc</i> <i>S. cerevisiae</i>
<i>Helianthus annuus</i>	<i>Ha</i> <i>H. annuus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>	<i>Tt</i> <i>T. thermophilus</i>
<i>Helianthus ciliaris</i>	<i>Hc</i> <i>H. ciliaris</i>	<i>Vernicia fordii</i>	<i>Vf</i> <i>V. fordii</i>
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Nt</i> <i>N. tabacum</i>	<i>Zea mays</i>	<i>Zm</i> <i>Z. mays</i>
<i>Olea europaea</i>	<i>Oe</i> <i>O. europaea</i>		

G. ENZIMAS Y SUSTRATOS

Abreviatura	Enzima
ACAT	Acetil-CoA: ACP transacilasa
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ACP	Proteína transportadora de acilos
ACS	Acil-CoA sintetasa
BCCP	Proteína transportadora de biotina carboxilada
CPT	Colina fosfotransferasa
DAGAT	Diacilglicerol aciltransferasa
DGTA	Diacilglicerol:Diacilglicerol transacilasa
DH	β -hidroxiacil-ACP deshidratasa
ELO	Elongasa de ácidos grasos (levaduras)
ENR	Enoil-ACP reductasa
FAD2	Oleato desaturasa microsomal
FAD3	Linoleato desaturasa microsomal
FAD6	Oleato desaturasa plastidial
FAD7/8	Linoleato desaturasa plastidial
FAE	Elongasa de ácidos grasos
FAH	Oleato-12-hidroxilasa (<i>R. communis</i>)
FAS I	Complejo ácido graso sintetasa I
FAS II	Complejo ácido graso sintetasa II
FAS III	Complejo ácido graso sintetasa III
FatA	Acil-ACP tioesterasa tipo A
FatB	Acil-ACP tioesterasa tipo B
GPAT	Glicerol-3-fosfato aciltransferasa
KAS	β -cetoacil-ACP sintasa
KCS	β -cetoacil-CoA sintasa
KR	β -cetoacil-ACP reductasa
LPAAT	Lisofosfatidil aciltransferasa
LPCAT	Lisofosfatidilcolina aciltransferasa
MCAT	Malonil-CoA:ACP transacilasa
MAGAT	Monoacilglicerol aciltransferasa
mtKAS	β -cetoacil-ACP sintasa mitocondrial
ODS	Oleato desaturasa
OLE	$\Delta 9$ desaturasa (levaduras)
PAP	Fosfatidato fosfatasa
PDAT	Fosfolípido-diacilglicerol aciltransferasa
PPasa	Fosfatidato fosfatasa
SAD	Estearato desaturasa ó estearil-ACP desaturasa
TE	Acil-ACP tioesterasas

Abreviatura	Sustrato
ADP	Adenosina-5'-difostato
AG	Ácidos grasos
AGL	Ácidos grasos libres
AMP	Adenosina-5'-monofosfato
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
CoA	Coenzima A
CoASH	Coenzima A con grupo sulfhidrilo
DAG	Diacilglicerol
DGDG	Digalactosildiacylglicerol
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
G3P	Glicerol-3-fosfato
LPA	Ácido lisofosfatídico ó lisofosfatidato
LPC	Lisofosfatidilcolina
MAG	Monoacylglicerol
MGDG	Monogalactosildiacylglicerol
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido trifosfato
PA	Ácido fosfatídico ó fosfatidato
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PI	Fosfatidilinositol
PSer	Fosfatidilserina
TAG	Triacylglicéridos ó triglicéridos
VLCFA	Ácidos grasos de cadena muy larga

H. PRODUCTOS QUÍMICOS

Abreviatura	Producto químico
BHT	Butilhidroxitolueno
BrEt	Bromuro de etidio
DMP	Dimetoxipropano
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
EMS	Etilmetanosulfonato
HCL	Ácido clorhídrico
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
MES	Ácido 2-(n-morfolin)etanosulfónico
MetOH	Metanol
Ni-NTA	Ácido nitrilo triacético-níquel
PEG	Polietilenglicol
SDS	Dodecil sulfato sódico
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
X-Gal	5'-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido

I. GENOTIPO Y MARCADORES GENÉTICOS

Genotipo y marcadores genéticos usados en las cepas de *E. coli*

<i>Amp</i>	Construcción que confiere resistencia a ampicilina
<i>argF</i>	Mutación en ornitina carbamoiltransferasa que bloquea la capacidad de usar arginina
<i>bioA</i>	Adenosilmetionina-8-amino-7-oxononanoato aminotransferasa
<i>cm, cat</i>	Construcción que confiere resistencia a cloranfenicol
<i>cro</i>	Gen que codifica para una proteína de lisis temprana en el fago λ
<i>deoR</i>	Gen regulador que permite la expresión constitutiva de los genes de síntesis de deoxirribosas. Permite la toma de grandes plásmidos
<i>endA</i>	Mutación en endonucleasa no específica I, eliminando su actividad, por lo que mejora la preparación de plásmidos
<i>F'</i>	Plásmido auto trasmisivo y de baja copia usado para generación de DNA monocatenario cuando se infecta con el fago M13; puede contener un marcador de resistencia que permita el mantenimiento y normalmente lleva los genotipos <i>lacI</i> y <i>LacZΔM15</i>

<i>galK</i>	Mutación en galactoquinasa que bloquea el catabolismo de la galactosa. Las células que son <i>galK</i> poseen un crecimiento lento en presencia de galactosa como única fuente de carbono
<i>gyrA96</i>	Mutación en DNA girasa que produce resistencia al ácido nalidixico
<i>hsd</i>	Nombre genérico de endonucleasas de <i>E. coli</i>
<i>Kan</i>	Construcción que confiere resistencia a kanamicina
<i>lacI</i>	Codifica el represor lac que controla la expresión de promotores que llevan un operador lac. El IPTG se une al represor lac y lo desplaza del promotor; frecuentemente usado al escanear células blancas/azules o para el control de expresión de genes recombinantes
<i>lacY1</i>	
<i>lacZ</i>	Mutación que bloquea el uso de lactosa via β -D-galactosidasa
<i>LacZΔM15</i>	Gen de la β -D-galactosidasa; mutaciones en este gen producen colonias sin color en presencia de X-Gal Elemento requerido para complementación de la β -D-galactosidasa cuando se emplea X-Gal; usado en la búsqueda de recombinantes blancos/azules; normalmente llevado en el profago lambda ϕ 80 o F'
<i>mcrA, mcrBC o mrr</i>	
<i>mutS</i>	Mutaciones que permiten la metilación del DNA que no ha sido reconocido como foráneo; este genotipo es necesario cuando se clona DNA genómico o cDNA metilado
<i>phoA</i>	Mutación en el mecanismo de reparación celular. Permite que el proceso de recombinación no sea eliminado por la célula
<i>phoAB</i>	
<i>recA</i>	Mutación en fosfatasa alcalina
<i>relA</i>	Mutación que impide el crecimiento celular en medio mínimo sin prolina Mutación en gen responsable para la recombinación general de DNA
<i>supE,F</i>	El RNA es sintetizado en ausencia de síntesis proteica (fenotipo relajado). El locus <i>relA</i> regula el acoplamiento entre la transcripción y la traducción. En el silvestre, concentraciones limitantes de aminoácidos resultan en una caída de la síntesis de RNA
<i>Tet</i>	
<i>thi-1</i>	
<i>Tn10</i>	Mutación en supresor del RNA transferente de glutamina de ambar (<i>supE</i>) (UAG) o tirosina (<i>supF</i>) Construcción que confiere resistencia a tetraciclina
<i>λcl857</i>	Mutación que impide el crecimiento celular en medio mínimo sin tiamina Construcción que confiere resistencia a tetraciclina por medio de un transposón cuando no se indique lo contrario Represor termosensible de los genes Red bajo el operón <i>pL</i>

Genotipo y marcadores genéticos usados en las cepas de *S. cerevisiae*

<i>ADE2</i>	Gen que codifica la carboxilasa de fosforibosilaminoimidazol implicada en la síntesis de adenina
<i>ade2-1</i>	Mutación en el gen <i>ADE2</i> que codifica la carboxilasa de fosforibosilaminoimidazol implicada en la síntesis de adenina
<i>are1-Δ::HIS3</i>	Mutación en el gen <i>ARE1</i> que codifica, junto a <i>ARE2</i> , la acetil-CoA aciltransferasa implicada en la síntesis de ésteres de esterol. Mutación por inserción del gen <i>HIS3</i>
<i>are2-Δ::LEU2</i>	Mutación en el gen <i>ARE2</i> que codifica, junto a <i>ARE1</i> , la acetil-CoA aciltransferasa implicada en la síntesis de ésteres de esterol. Mutación por inserción del gen <i>LEU2</i>
<i>can1-100</i>	Mutación en el gen <i>CAN1</i> que codifica una permeasa que confiere sensibilidad a la canavalina
<i>dga1-Δ::KanMX4</i>	Mutación en el gen <i>DGA1</i> que codifica la diacilglicerol aciltransferasa implicada en la síntesis de triacilglicéridos. Mutación por inserción del gen <i>KanMX4</i> que confiere resistencia a kanamicina
<i>his3-11,15</i>	Mutación en el gen <i>HIS3</i> que codifica la imidazole gliceron fosfatasa implicada en la síntesis de histidina
<i>leu2,3-112</i>	Mutación en el gen <i>LEU2</i> que codifica la β-Isopropilmalato deshidrogenasa implicada en la síntesis de leucina
<i>lro1- Δ::TRP1</i>	Mutación en el gen <i>LRO1</i> que codifica la fosfolípido:diacilglicerol aciltransferasa implicada en la síntesis de triacilglicéridos.
<i>MATα</i>	Mutación por inserción del gen <i>TRP1</i>
<i>trp1-1</i>	Tipo sexual haploide de <i>S. cerevisiae</i>
<i>ura3-1</i>	Mutación en el gen <i>URA3</i> que codifica la anthranilato isomerasa implicada en la síntesis de triptófano
	Mutación en el gen <i>URA3</i> que codifica la orotidina-5'-fosfato descarboxilasa implicada en la síntesis de pirimidina

Genotipo y marcadores genéticos usados en las cepas de *A. tumefaciens*

<i>rpoH⁺</i>	El gen <i>rpoH</i> codifican para el gen homólogo de <i>E. coli</i> sigma 32 (heat shock sigma factor)
<i>hrcA⁺</i>	Represor de la transcripción inducible por temperatura <i>HrcA</i> . Regulador negativo de genes de choque térmico de clase I (operones <i>grpE-dnaK-dnaJ</i> and <i>groELS</i>).

J. OTROS

Abreviatura	Nombre
A.C.	Antes de Cristo
Aprox	Aproximadamente
BSA	Albúmina de suero bovino
CAS	Colección Andaluza de Girasoles
C	Carbono
cDNA	DNA complementario
CO ₂	Dióxido de carbono
Col-0	Columbia
Ct	Ciclo umbral (RT-PCR)
C-terminal	Carboxilo terminal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
E.C.	Número enzimático (Enzyme Commission number)
EST	Marcador de secuencia expresada
<i>et al.</i>	Y colaboradores
F	Forward (oligonucleótidos)
F1	Primera generación
F2 / M2	Segunda generación
FAMES	Ésteres metílicos de ácidos grasos
GC	Cromatografía de gases
gDNA	DNA genómico
GLC	Cromatografía gas-líquido
ICCNL	Comité Internacional para la Clasificación y Nomenclatura de Lípidos
INV	Invernadero
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
K _M	Afinidad por sustrato
LIPID MAPS	The Lipid Metabolites and Pathways Strategy
LB	Medio Luria Bertani
MCS	Sitio de clonación múltiple
M _r	Peso molecular relativo
mRNA	RNA mensajero
MW	Peso molecular
Nº / nº	Número
N-terminal	Amino terminal
ORF	Pauta abierta de lectura
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PF	Peso fresco

pH	Potencial de hidrógeno
pI	Punto isoeléctrico
qRT-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real
R	Reverse (oligonucleótidos)
RACE	Amplificación rápida de los extremos del cDNA
RE	Retículo endoplásmico
Rn	Emisión de fluorescencia (RT-PCR)
RNA	Ácido ribonucleico
SC	Medio mínimo (levaduras)
SC-URA	Medio mínimo de selección (levaduras)
SD	Desviación estándar
SDW	Agua destilada estéril
<i>sn-</i>	Posición estereoespecífica de acilos en TAG
TM	Segmentos transmembranas
TLC	Cromatografía en capa fina
URA	Uracilo
UV	Ultravioleta
WT	Tipo silvestre
YPD	Medio enriquecido (levaduras)

INTRODUCCIÓN | 1-72

1. GIRASOL	3
1.1 HISTORIA, ORIGEN Y BOTÁNICA	3
1.2 MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA	4
1.3 IMPORTANCIA ECONÓMICA Y DISTRIBUCIÓN DEL CULTIVO	9
1.4 PRODUCCIÓN Y CONSUMO	10
1.5 MEJORA DEL CULTIVO Y PERSPECTIVAS DE FUTURO	14
2. LÍPIDOS DE PLANTAS: CLASIFICACIÓN Y FUNCIÓN	16
2.1 ÁCIDOS GRASOS (AGs)	19
2.2 ACILGLICÉRIDOS	25
2.3 FOSFOLÍPIDOS	30
3. LÍPIDOS DE PLANTAS: BIOSÍNTESIS	32
3.1 SÍNTESIS <i>DE NOVO</i> DE ÁCIDOS GRASOS (AGs)	32
3.2 FORMACIÓN DEL POOL DE ACIL-CoAs	34
3.3 BIOSÍNTESIS DE TRIACILGLICÉRIDOS (TAGs)	35
4. LÍPIDOS DE PLANTAS: MODIFICACIÓN	43
4.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN	44
4.2 PROBLEMÁTICA ACTUAL	47
4.3 MODIFICACIÓN DEL CONTENIDO GRASO DE LAS SEMILLAS	49
4.4 MODIFICACIÓN DE LA CALIDAD DE LOS ACEITES	52
5. ACEITE DE GIRASOL	61
5.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES	61
5.2 OBTENCIÓN DE MUTANTES CON COMPOSICIÓN MODIFICADA DE ACEITE	62

1. GIRASOL

1.1 HISTORIA, ORIGEN Y BOTÁNICA

El girasol (*Helianthus annuus L.*) es una planta anual dicotiledónea perteneciente al orden Synandrales, familia Asteridae (Compuestas). El nombre latino del género describe la forma y aspecto de la inflorescencia, así como su capacidad heliotrópica, mientras que el de la especie alude a la anualidad de su ciclo vegetativo-reproductivo.

El género *Helianthus* procede de la hibridación de dos especies ancestrales del género *Viguiera*, con números cromosómicos $n=8$ y $n=9$. La evolución del genoma en este género, del cual se conocen hasta 68 especies, se asocia con una amplia diversidad debido a la hibridación libre entre las especies y fenómenos como la introgresión y la poliploidía (Heiser 1965; Jackson y Murray, 1983; Rieseberg *et al.*, 2000). En particular, la especie *H. annuus*, aun comportándose como diploide ($2n=34$), podría presentar cromosomas homeólogos por su origen tetraploide. *H. annuus* acapara la mayor extensión geográfica y es la más variable de su género. Dentro de esta especie existen numerosos tipos o subespecies cultivadas como plantas ornamentales, oleaginosas y forrajeras.

El girasol silvestre es originario de Norteamérica. Las evidencias más antiguas indican que el girasol fue domesticado primero en México al menos 2600 años a. C. En muchas culturas amerindias molían la semilla y la utilizaban para hacer tortas, incluso es probable que extrajesen aceite para la elaboración del pan; además se usaba para teñir ropas y el propio cuerpo. A comienzos del siglo XVI fue introducido por los españoles en Europa, donde inicialmente se empleaba como planta ornamental. Gracias a su fácil adaptación a diferentes ambientes y la aparición de nuevos usos, el cultivo de girasol experimentó una rápida expansión por todo el continente europeo, alcanzando una gran notoriedad en países del este, donde se desarrollaron nuevas variedades productoras de aceite. Posteriormente, hacia finales del siglo XIX, las semillas de girasol de origen ruso regresaron a su centro de origen, donde se siguió domesticando y mejorando como especie cultivada. En los años 70 se obtuvieron los primeros híbridos,

aumentando la productividad, mayor calidad de aceite y mayor resistencia a las diferentes enfermedades. Actualmente, el girasol está presente en los cinco continentes y su cultivo está dirigido principalmente a satisfacer la gran demanda que de su aceite existe en el mercado mundial.

1.2 MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA

La *raíz* es de tipo pivotante, con un sistema de raíces secundarias de las que nacen las terciarias, que exploran el suelo en sentido horizontal y vertical. Normalmente, la longitud de la raíz principal sobrepasa la altura del tallo. Sin embargo, su escaso poder de penetración ante los obstáculos hace que sea muy sensible a la compactación de los suelos, llegando a perjudicar el desarrollo del cultivo y, por tanto, el rendimiento de la cosecha.

El *tallo* es cilíndrico y de consistencia semileñosa y maciza en su interior, con un diámetro variable de 2-6 cm y una altura hasta el capítulo de entre 40 cm y 2 m. La superficie exterior del tallo es rugosa, asurcada y vellosa, excepto en su base. En la madurez, el tallo se inclina en la parte terminal debido al peso del capítulo.

Las *hojas* son alternas, grandes, trinervadas, largamente pecioladas, acuminadas, dentadas y de áspera vellosidad, tanto en el haz como en el envés. El número de hojas varía de 12-40, según las condiciones de cultivo y la variedad. El color también es variable, del verde oscuro al verde amarillento.

En la Figura 1 se muestra con detalle la morfología típica del girasol.

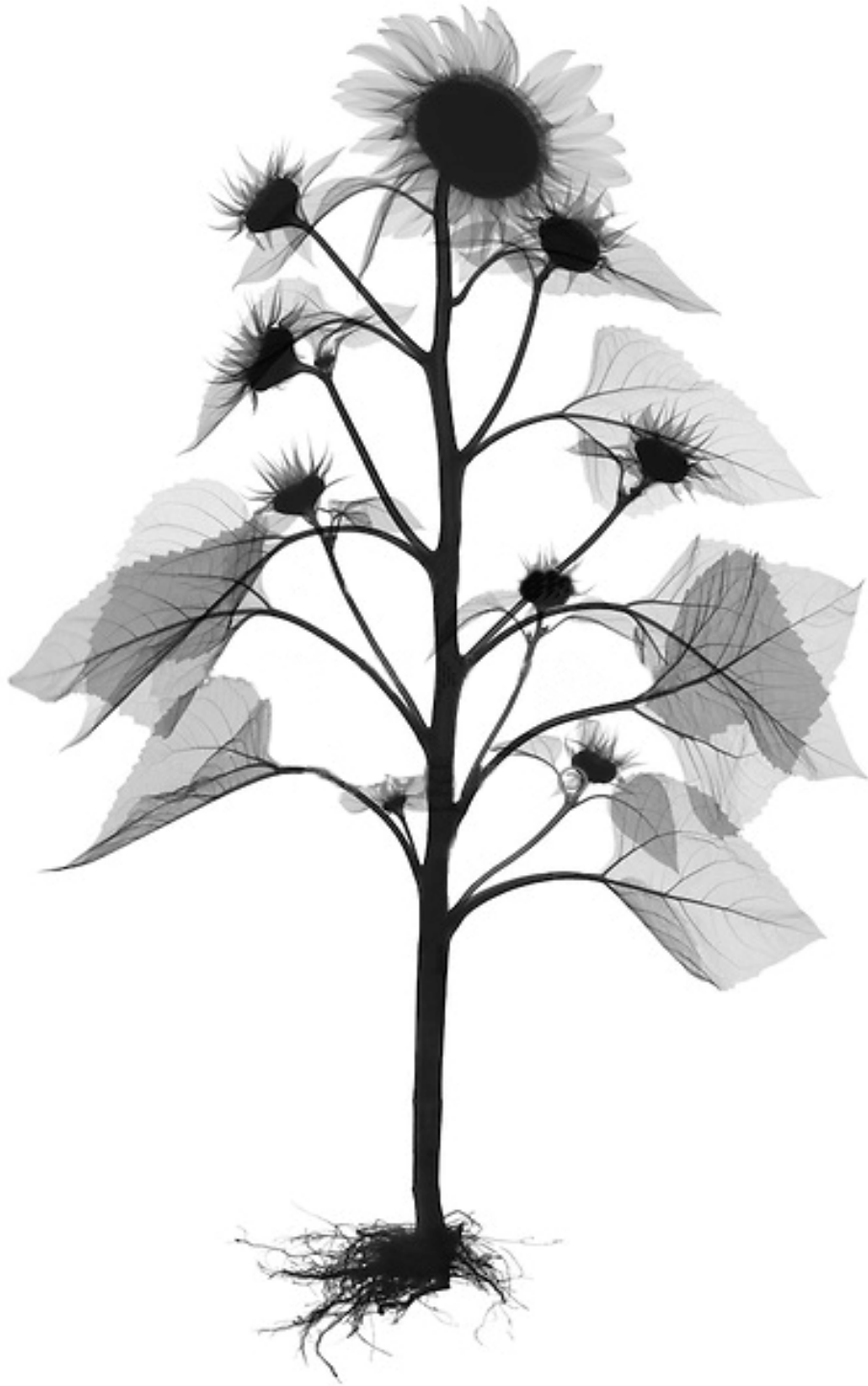


Figura 1. Radiografía de planta de girasol. Morfología de raíz, tallo, hojas e inflorescencias.

La *inflorescencia* es simple, de 10-40 cm de diámetro, y puede ser plana, cóncava o convexa. El capítulo del girasol cultivado es solitario, rotatorio y está rodeado por brácteas involucrales. El número de flores varía entre 700-3000 en variedades para aceite y hasta 6000 o más en variedades de consumo directo. Está formado por un tejido de naturaleza esponjosa en el que se insertan las flores, que nacen sobre su cara superior (Figura 2A). El verticilo o anillo exterior del capítulo está formado por flores liguladas, estériles y dispuestas radialmente, con una función de exhibición y atracción visual para los insectos polinizadores (Figura 2A). Las flores propiamente dichas son las tubulosas, que están en el interior del capítulo y forman espirales desde el centro (Figura 2A). Estas flores están formadas por un ovario inferior, dos sépalos, una corola en forma de tubo compuesta por cinco pétalos, y cinco anteras unidas a la base del tubo de la corola (Figura 2A2).

El *fruto* es un aquenio de tamaño comprendido entre 3-20 mm de largo, 2-13 mm de ancho, y 2,5-5 mm de grosor (Figura 2B). La envuelta exterior del fruto o pericarpio es duro y fibroso, y está unido a la semilla excepto en sus aristas. La membrana seminal crece con el endospermo y forma una película fina que cubre el embrión de la semilla, asegurando dicha unión. Los cotiledones constituyen la reserva energética de la semilla, y entre éstos está la yema germinal o gémula.

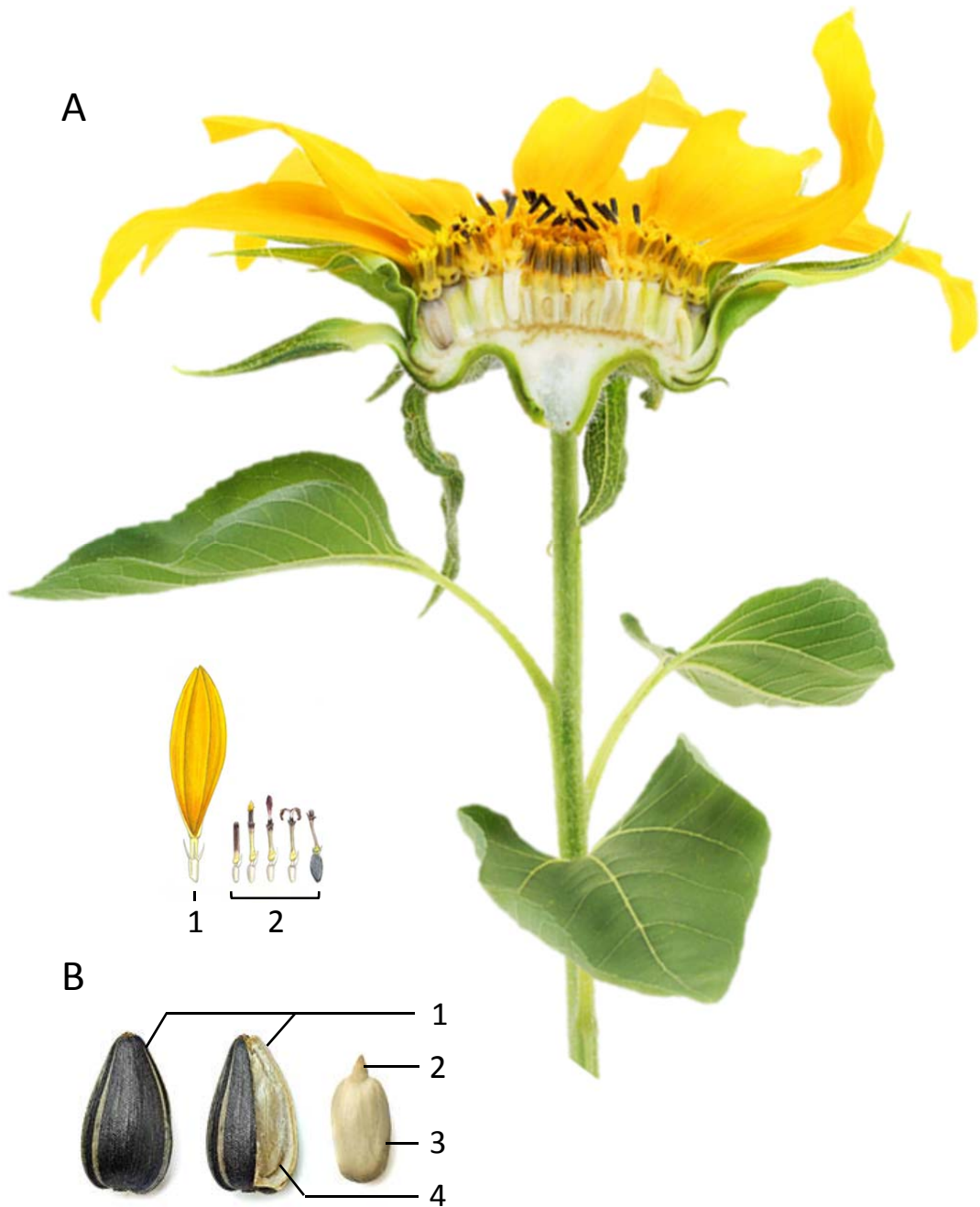


Figura 2. Inflorescencia y semilla de girasol. A) Sección longitudinal de un capítulo de girasol, en el que se aprecian flores liguladas (1) | flores tubulosas (2) | B) Sección longitudinal de un aquenio de girasol, en el que se aprecian pericarpio (1) | gémula (2) | cotiledón (3) | membrana seminal (4).

Introducción

La duración del ciclo del girasol depende de la variedad y el momento de la siembra. Éste se divide en varias etapas (Alba y Llanos, 1990):

La *germinación y emergencia* discurren desde la siembra hasta la aparición de los cotiledones. En función de la humedad y la temperatura puede durar de 10-30 días. A continuación se produce la formación de las primeras hojas (4-5 pares). Durante esta fase se produce un rápido crecimiento de la raíz, lo que condiciona el posterior vigor de la planta. En esta etapa, la disponibilidad de agua es vital, siendo perjudicial tanto la falta como el exceso de ésta. Esta fase dura entre 15-25 días. A partir de este momento tiene lugar la fase de crecimiento más activa y de máxima absorción de minerales del suelo, que se prolonga hasta el inicio de la floración.

La *floración* comprende todo el período en el que las flores se van abriendo y tiene una duración de entre 40-50 días. En este punto, la planta es especialmente sensible al estrés hídrico, así como a temperaturas extremas. Las primeras flores en abrirse son las de la parte exterior del capítulo y continúa con la apertura de los anillos exteriores hacia el centro (floración centripeta), a razón de 1-5 anillos por día. Las flores liguladas que rodean el capítulo comienzan a secarse y caen días después de abrirse las últimas flores del centro del capítulo. El proceso tarda en completarse de 10-12 días.

La *polinización y fecundación*, llevada a cabo por insectos, es generalmente alegama (fecundación cruzada entre flores distintas). Los óvulos, una vez fecundados, reciben sustancias de reserva hasta que se convierten en semilla madura.

La fase de *maduración* se completa una vez alcanzada la madurez fisiológica, esto es, el momento en el que la semilla alcanza su máximo peso seco, lo que representa el fin del período de llenado. Esta fase suele durar entre 35-50 días y finaliza cuando la semilla tiene aproximadamente un 40% de humedad, momento en el que, si se dan las condiciones adecuadas, vuelve a germinar.

1.3 IMPORTANCIA ECONÓMICA Y DISTRIBUCIÓN DEL CULTIVO

Actualmente, el girasol es una de las cinco plantas oleaginosas para consumo humano más cultivadas en todo el mundo.

Las razones del éxito de este cultivo pueden resumirse en dos: por un lado, el girasol es una planta rústica de fácil cultivo y tiene una buena adaptación a una gran variedad de suelos. De hecho, las regiones de mayor producción se localizan muy alejadas de su centro de origen. Por otro lado, posee un alto porcentaje de aceite en semilla (38-52%), aceite que ha encontrado, desde el primer momento, una excelente acogida entre los consumidores, científicos y dietistas, debido a su calidad dietética y sus cualidades físico-químicas. La relativa sencillez de las técnicas industriales para su extracción, así como su fácil conservación y bajo coste frente a otros aceites, permiten, además, alcanzar altos rendimientos en su producción, constituyendo una ventaja añadida para su industrialización y comercio (Alba y Llanos, 1990).

El papel que tiene en la alimentación humana se completa también con otros usos, como son los forrajeros y técnicos. La torta de girasol, subproducto de la extracción del aceite de semillas, también se emplea en la producción de harinas proteicas por su alto contenido proteico (53-66%), ya sea para consumo animal o humano (Bau *et al.*, 1983). Recientemente, el aceite de girasol también se está utilizando en la producción de biolubricantes, permitiendo así producir conjuntamente un alimento y un producto industrial, lo cual contribuye decisivamente a la rentabilidad de su cultivo. Además, el aceite de girasol, junto a otros aceites vegetales, se considera de particular interés para la industria de pinturas y cosméticos, que constantemente demandan aceites con una composición específica de ácidos grasos.

La distribución del girasol ocupa casi la totalidad de América del Norte, desde Canadá hasta el norte de México, así como Argentina, y está presente en la mayoría de los países europeos, además de Rusia. Los focos de producción se localizan mayoritariamente en dichas regiones (Figura 3).

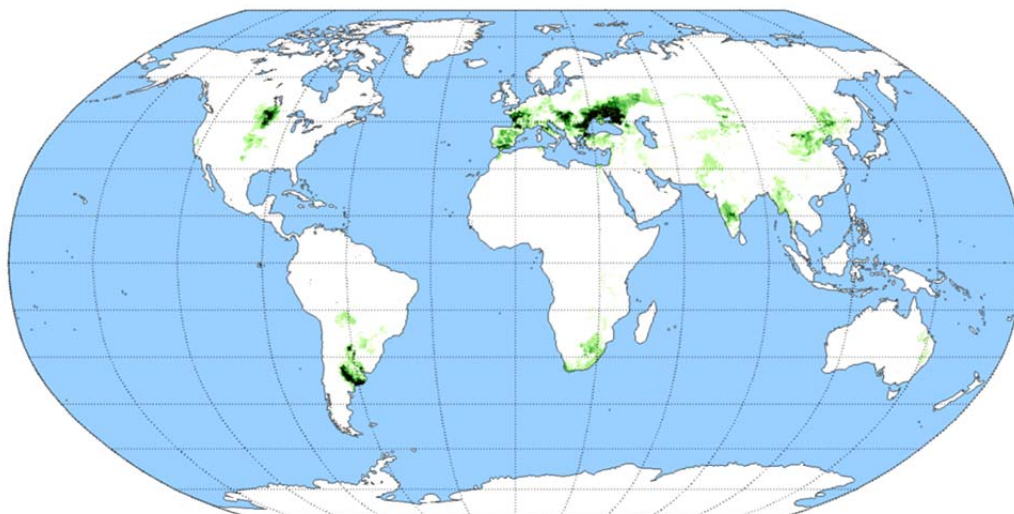


Figura 3. Distribución mundial del cultivo de girasol. En verde se marcan las zonas de cultivo.

1.4 PRODUCCIÓN Y CONSUMO

En el último medio siglo, el cultivo de girasol ha experimentado un importante desarrollo, triplicándose la superficie mundial dedicada a su cultivo desde 1961 hasta 2012, pasando de 6,6 a 25,0 millones de hectáreas (Mha) (FAOSTAT, 2015). Su producción también se ha visto incrementada, habiéndose quintuplicado con creces en el mismo período al pasar de 6,8 a 37,0 millones de toneladas (Mt) (FAOSTAT, 2015). No obstante, la tendencia general actual se caracteriza por períodos ascendentes con significativos descensos puntuales en ambos parámetros (Figura 4).

Como ya hemos mencionado, el principal destino del cultivo de girasol es la elaboración de aceite para alimentación. En la actualidad, el aceite de girasol representa más del 10% de la producción mundial de aceites vegetales, lo que lo convierte en el cuarto en importancia de producción, tan sólo superado por los aceites de colza, soja y palma.

La producción del aceite de girasol a nivel mundial, expresada en miles de toneladas (kt), ha ido evolucionando de forma irregular, si bien se ha producido en la última década un incremento muy significativo (Figura 5).

En 2012, la producción mundial de aceite de girasol se situó en torno a las 15,21 millones de toneladas, de los que 2,66 millones correspondían al conjunto de los países de la Unión Europea (UE), cantidad ampliamente superada por Ucrania y Rusia, principales países productores (FAOSTAT, 2015). En el seno de la UE, Alemania se erigió como primer productor, seguido de Francia y España. En la Tabla 1 se resumen los doce principales países productores de aceite de girasol en el mundo correspondiente a dicho año, ordenados de mayor a menor producción (kt) (FAOSTAT, 2015).

Tabla 1. Principales países productores de *aceite* de girasol en el mundo en el año 2012 (FAOSTAT, 2015).

País	Producción (kt)
Ucrania	3937,2
Rusia	3632,0
Argentina	1541,6
Turquía	819,2
China	598,1
Alemania	492,0
Francia	463,0
Hungría	373,7
España	268,3
Sudáfrica	265,8
Rumanía	250,4
Holanda	215,0

Rusia, que hasta ahora era considerada la primera potencia mundial, se ha visto relegada al segundo puesto gracias al auge experimentado por Ucrania en los últimos años. En 2011, Ucrania producía ya algo más de 3 millones de toneladas de aceite de girasol, habiendo exportado más del 80% de esta cifra, convirtiéndose así en el primer país productor de aceite de girasol y exportador del mundo (FAOSTAT, 2015). Es curioso ver cómo este país, pese a su tamaño, produce hoy día más volumen de aceite de girasol que toda la extinta Unión

Introducción

Soviética. Esto se debe a que hace más de una década, Ucrania comenzó a estimular su industria de producción de aceite por medio de la introducción de los impuestos de exportación para las semillas. Además, creó incentivos destacados para los productores nacionales, que aceleraron la producción de aceite de girasol a nivel nacional en lugar de exportar el producto en bruto a las plantas de procesamiento del extranjero. De esta forma, y desde entonces, Ucrania ha descendido de forma gradual los impuestos de las exportaciones. Por otro lado, India se constituye como el primer país importador de aceite de girasol, seguido de lejos por Turquía y Bélgica, según datos obtenidos en el año 2011 (FAOSTAT, 2015).

España, por su parte, ha experimentado un descenso paulatino de la producción de aceite de girasol en las últimas décadas (Figura 5). Sin embargo, desde hace unos años, se observa una incipiente recuperación de la producción que, pese al brusco descenso de 2012, sitúa al país en el noveno puesto de los principales países productores de este aceite (Tabla 1). Esta pronta recuperación y brusco descenso también son visibles al comparar los datos de producción y superficie cultivada de semillas de girasol (Figura 6), a pesar de que ambos parámetros no han dejado de crecer desde el año 2005 (FAOSTAT, 2015). No obstante, este cultivo supone más del 10% de la producción total de oleaginosas en nuestro país, tan sólo superado por el cultivo de aceitunas (80%), siendo su interés indiscutible hoy día (FAOSTAT, 2015).

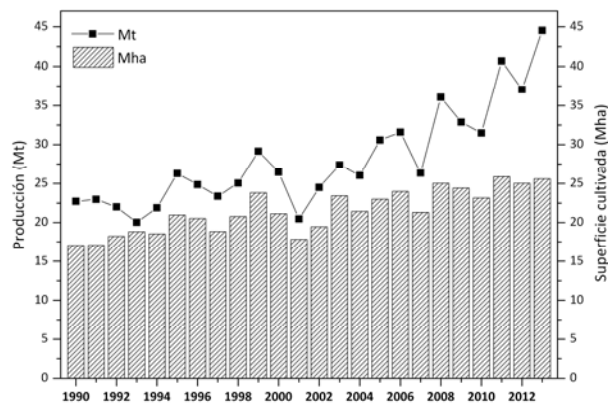


Figura 4. Evolución de la producción (Mt) y superficie cultivada (Mha) de *semillas* de girasol en las últimas décadas a nivel mundial (FAOSTAT, 2015).

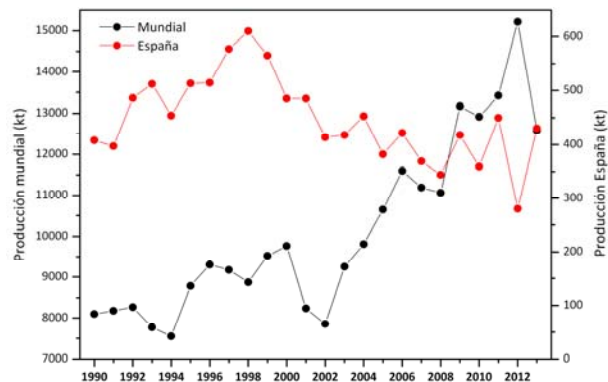


Figura 5. Comparativa de la evolución de la producción (miles de toneladas, kt) de *aceite* de girasol en las últimas décadas a nivel mundial y España (FAOSTAT, 2015).

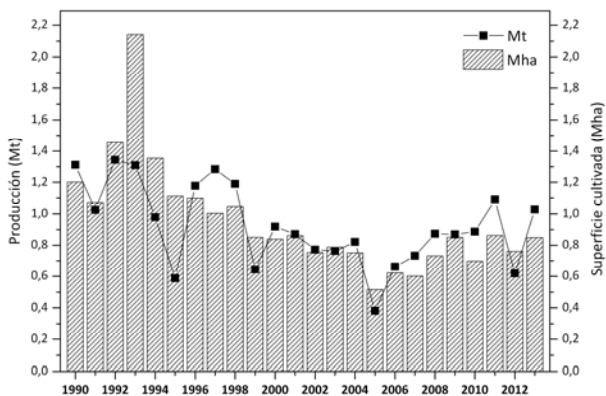


Figura 6. Evolución de la producción (Mt) y superficie cultivada (Mha) de *semillas* de girasol en las últimas décadas en España (FAOSTAT, 2015).

En cuanto al *consumo* de aceite de girasol, la Antigua República Yugoslava de Macedonia se coloca como el mayor país consumidor del mundo, con 16,20 kg/persona/año, seguida de Montenegro con 13,60 y Hungría y Bulgaria con 12,60 kg/persona/año cada uno, según datos recogidos en el año 2009 (FAOSTAT, 2015). En ese mismo año, el aceite de girasol acaparó en España el 34% de la cuota de mercados de aceites comestibles, con un consumo aproximado de 9,40 kg/persona/año, cifra que lo convierte en el undécimo consumidor de aceite de girasol del mundo (FAOSTAT, 2015). El aceite de girasol, sin embargo, no es tan popular en China, con un consumo de tan sólo 0,10 kg/persona/año en el año 2009. Algo parecido ocurre en EEUU que, a pesar de ser el mayor consumidor de aceites vegetales del mundo y contar con una importante Asociación Nacional de Productores de Girasol, consumió alrededor de 0,10 kg/persona/año de este aceite en ese mismo año (FAOSTAT, 2015).

1.5 MEJORA DEL CULTIVO Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

En el cultivo de girasol se ha perseguido desde sus inicios la obtención de nuevas variedades con mejoras tales como una mayor producción de semillas y aceite, una mayor resistencia a enfermedades y parásitos y una mayor resistencia a condiciones de cultivo adversas, como la sequía o la elevada salinidad de los suelos, todas ellas encaminadas a incrementar el rendimiento. Para conseguir estos objetivos se han estado utilizando diversas estrategias a lo largo del tiempo.

La estrategia tradicional utilizada ha sido la mejora del cultivo aprovechando la variabilidad genética natural que posee el girasol. Gracias a esta cualidad, desde los inicios de la mejora clásica en Rusia a finales del siglo XIX, se consiguió reducir hasta uno el número de capítulos por planta, incrementar el tamaño de las semillas (Vrânceanu, 1977) y pasar de variedades con un contenido de aceite del 30% (1912-1926) a variedades con un rendimiento de aceite del 45-50% a principios de los años 60. Estas mejoras confirieron a esta planta la consideración e importancia de cultivo oleaginoso que actualmente tiene (Sharma *et al.*, 2012).

Posteriormente, se desarrolló la mejora mediante la obtención de híbridos, aprovechando el fenómeno de la heterosis o vigor híbrido de primera generación. La mejora mediante la heterosis dio sus primeros frutos en Canadá a mediados del siglo pasado, pero debido a que se usaba esterilidad génica y que sobre el parental femenino sucedía tanto autopolinización como polinización cruzada, los porcentajes de hibridación eran menores del 50% (Röbbelen *et al.*, 1989). Este problema se solucionó a principios de los años 70 con la introducción en la línea parental femenina del carácter de androesterilidad citoplásmica (CMS). Este carácter se transfiere de una generación a otra por vía materna, está relacionado con la producción de una proteína mitocondrial alterada y las plantas que lo poseen son incapaces de producir polen (Köhler *et al.*, 1991). La línea masculina utilizada para obtener híbridos, además de producir polen, debe contener los genes restauradores de la fertilidad, para que los híbridos de primera generación obtenidos puedan producir polen de manera normal y, por tanto, semillas. Así, y debido a que siempre se usan líneas CMS como parental femenino, todos los híbridos cultivados están relacionados, al menos en cuanto a su citoplasma (Friedt, 1992).

Sin embargo, dado que tanto la variabilidad genética natural del girasol como la conseguida mediante la hibridación son en ocasiones insuficientes para conseguir líneas con unas características determinadas, es necesario recurrir a otras técnicas, como la mutagénesis o la ingeniería genética. Este aspecto será ampliamente tratado en Introducción, 4 y 5.

En cuanto a las perspectivas de futuro del cultivo de girasol, según las estimaciones, la producción mundial de su aceite se mantendrá casi sin modificaciones en las próximas campañas. A pesar de las condiciones atmosféricas desfavorables de los últimos años a las que tuvieron que hacer frente países tan destacados como Rusia e India, con la consecuente pérdida de producción, el aumento de la producción de países como Argentina y Ucrania logró contrarrestar dichas pérdidas, manteniendo casi sin modificaciones la producción mundial de aceite de girasol. Este hecho, junto a las medidas adoptadas por la mayoría de los países productores, encaminadas a ampliar las zonas de cultivo y la producción de semillas, está favoreciendo la creación de un

potencial para la aceleración de la producción de aceite de girasol a nivel mundial (FAOSTAT 2015).

Los precios de un mercado mundial activo, motivado por un rápido crecimiento del consumo general y el aumento de demanda por parte de nuevos países emergentes, también podrían favorecer una notable expansión de los cultivos y producciones mundiales hasta niveles sin precedentes.

Por último, la versatilidad del aceite de girasol en cuanto a sus usos, así como la rentabilidad de su cultivo y la aparición de nuevos aprovechamientos (aceite de girasol alto oleico para fritura y biolubricantes, ...), está haciendo que, actualmente, el aceite de girasol gane popularidad en detrimento de otros aceites tradicionales y aumenten las perspectivas de crecimiento para su cultivo.

A continuación se expondrán varios apartados dedicados a la clasificación, función, biosíntesis y modificación de lípidos de plantas en general necesarios para comprender y desarrollar aspectos del aceite de girasol relacionados con éstos, dedicándoles un último apartado en esta Introducción.

2. LÍPIDOS DE PLANTAS: CLASIFICACIÓN Y FUNCIÓN

En términos químicos, los lípidos son compuestos que se caracterizan por poseer un alto grado de insolubilidad en agua siendo, en cambio, fácilmente solubles en disolventes orgánicos no polares (Badui, 2006). Aunque químicamente heterogéneos, todos presentan un denominador común estructural: la totalidad o al menos una parte significativa de su molécula es de naturaleza hidrocarbonada y, por tanto, apolar.

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.

Históricamente, una de las clasificaciones más comunes dividía a los lípidos en dos grandes categorías: *lípidos saponificables*, que contienen ácidos grasos unidos a algún otro componente, generalmente mediante un enlace tipo éster (acilglicéridos, ceras, fosfoglicéridos, glucolípidos y esfingolípidos), y *lípidos no saponificables*, que 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).

Actualmente, los lípidos se catalogan bajo el sistema de clasificación ideado por el Comité Internacional “The Lipid Metabolites and Pathways Strategy” (LIPID MAPS), en conjunto con el Comité Internacional para la Clasificación y Nomenclatura de Lípidos (ICCNL), basado en principios químicos y bioquímicos, compatible con las bases de datos y necesidades informáticas actuales (Fahy *et al.*, 2005, 2009, 2011). De esta manera, los lípidos se distribuyen en ocho grandes categorías, cada una de las cuales presenta a su vez sus propias subcategorías. Éstas son: i) ácidos grasos (AG), ii) glicerolípidos (GL), iii) glicerofosfolípidos (GP), iv) esfingolípidos (SP), v) lípidos esteroides (ST), vi) lípidos prenoides (PR), vii) sacarolípidos (SL) y viii) policétidos (PK) (Figura 7).

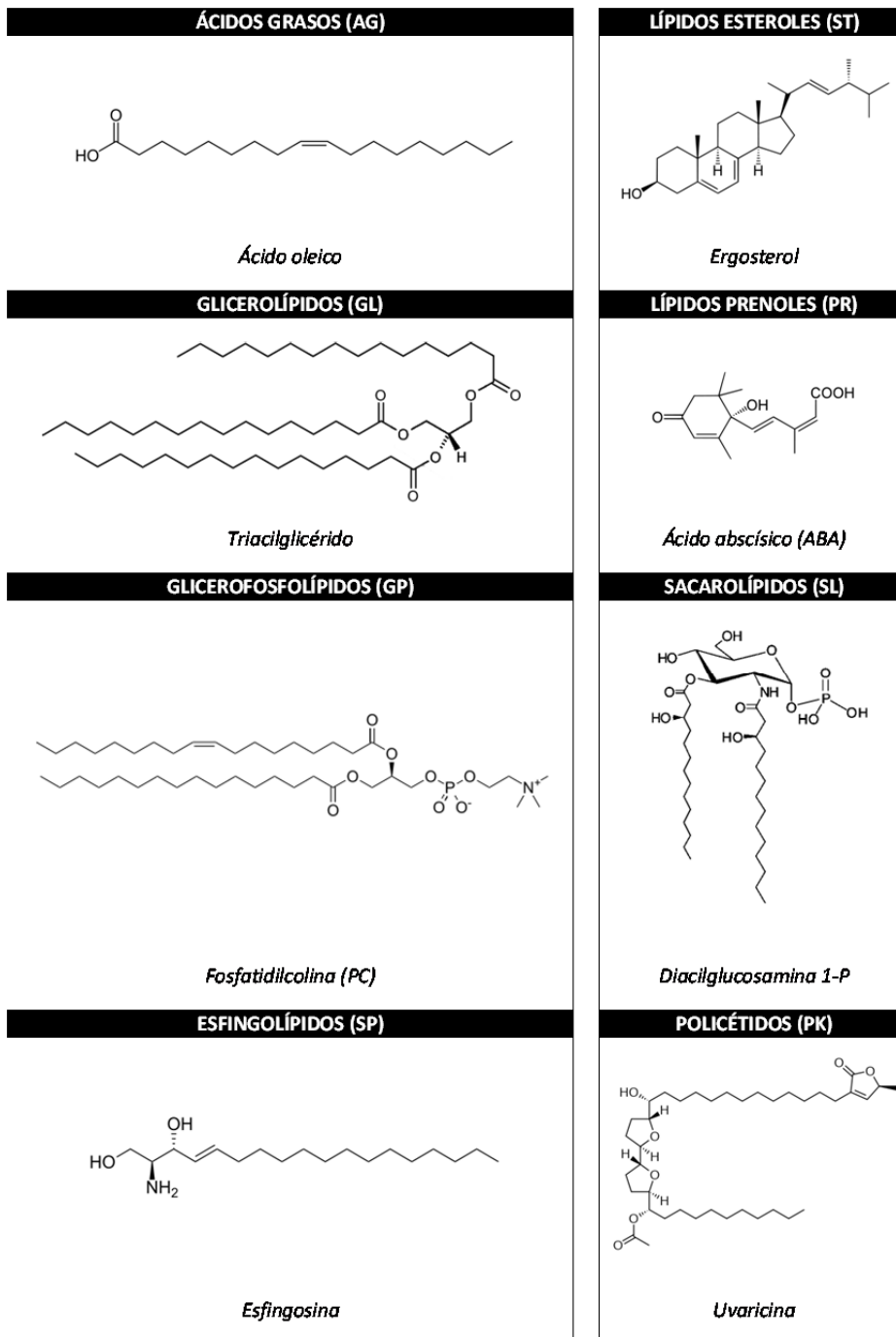


Figura 7. Ejemplos de las estructuras representativas para cada categoría de lípidos (LIPID MAPS-ICCNL). Ácidos grasos (AG) | Glicerolípidos (GL) | Glicerofosfolípidos (GP) | Esfingolípidos (SP) | Lípidos esteroides (ST) | Lípidos prenoles (PR) | Sacarolípidos (SL) | Policétidos (PK).

En cuanto a sus *funciones biológicas*, los lípidos de plantas, al igual que en el resto de seres vivos, están implicados en numerosos procesos biológicos (Harwood, 1996; 2007): i) poseen un papel estructural fundamental, ya que son los componentes básicos de las membranas celulares, que actúan como barreras delimitando tanto las células como los compartimentos celulares; ii) constituyen la principal reserva de energía. Las especies vegetales oleaginosas acumulan lípidos en la semilla o el fruto, generalmente en forma de triacilglicéridos (TAGs); iii) 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 inositol fosfato. Además están implicados en la fotoprotección, la modificación post-traduccional de proteínas, el reconocimiento celular, la especificidad de especie, la inmunidad de los tejidos y la adaptación al frío; iv) actúan como cubierta protectora en la superficie de muchas plantas, como es el caso de las ceras, la cutina y la suberina.

A continuación se describirán con más detalle aquellos lípidos implicados en la biosíntesis de aceite en semillas de girasol, objeto de estudio de esta tesis: *ácidos grasos, acilglicéridos* (glicerolípidos) y *fosfolípidos* (glicerofosfolípidos).

2.1 ÁCIDOS GRASOS (AGs)

2.1.1 Definición y clasificación

Como mencionamos anteriormente, los ácidos grasos (AGs) son considerados como los componentes básicos estructurales de los lípidos saponificables. En general, están formados por una cadena hidrocarbonada lineal que contiene un número par de átomos de carbono y un grupo carboxilo terminal. 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 número impar de carbonos o con cadena ramificada no representan más del 1 o 2% del total de ácidos grasos presentes en los lípidos.

Introducción

La estructura de los ácidos grasos pueden variar según: i) el número total de átomos de carbono; ii) la presencia o no de dobles enlaces en su cadena hidrocarbonada; o iii) la posición de estos dobles enlaces.

En función del número total de carbonos se diferencian *AG de cadena corta* (C_6-10), *cadena media* (C_{12-14}), *cadena larga* (C_{16-18}) y *cadena muy larga* ($C_{\geq 20}$, *Very Long Chain Fatty Acid*, VLCFA). En función de la presencia o no de dobles enlaces se diferencian *AG saturados* (ausencia de dobles enlaces) y *AG insaturados*, los cuáles pueden presentar entre uno (*AG monoinsaturados*, MUFAs) y seis dobles enlaces (*AG poliinsaturados*, PUFAs). Los AG insaturados presentan, a su vez, dos tipos de isomería: *isomería geométrica*, en la que se diferencian la configuración *cis-*, donde los dos átomos de hidrógeno están situados en el mismo plano del doble enlace, y la configuración *trans-*, en la que los átomos de hidrógeno están a ambos lados del plano del doble enlace; e *isomería posicional*, relativa a la posición del doble enlace en la cadena hidrocarbonada (AOCS Lipid Library).

2.1.2 Propiedades físico-químicas

Las propiedades físico-químicas de los ácidos grasos derivan de la presencia de un grupo carboxilo terminal hidrofílico y por la existencia de una cadena hidrocarbonada hidrofóbica. La coexistencia de ambos componentes en la misma molécula convierte a los ácidos grasos en moléculas débilmente anfipáticas. El carácter anfipático es tanto mayor cuanto menor es la longitud de la cadena hidrocarbonada.

En general, cuanto mayor es la longitud de la cadena hidrocarbonada, mayor es el punto de fusión del ácido graso. Por el contrario, la presencia de dobles enlaces en la cadena hace que el punto de fusión disminuya. No obstante, el punto de fusión puede variar a su vez en función del tipo de isomería que presenten estos dobles enlaces. Cuando los dobles enlaces presentan isomería *cis-* se produce la formación de “codos” en las cadenas de los ácidos grasos, lo que disminuye la capacidad de unión entre las cadenas hidrofóbicas adyacentes y, en consecuencia, disminuye su punto de fusión. No sucede lo mismo con los dobles enlaces en configuración *trans-*, que no introducen más que un pequeño

ángulo en la cadena, asemejándose más a las propiedades físico-químicas de los ácidos grasos saturados. Por ejemplo, el ángulo que produce el doble enlace *cis*- del ácido oleico (18:1 Δ^9c) hace que su punto de fusión baje de 68,8°C del ácido esteárico (18:0) a 15,2°C; sin embargo, el doble enlace *trans*- del ácido eláidico (18:1 Δ^9t) no distorsiona tanto su estructura, por lo que el punto de fusión se mantiene en 44,0°C (Figura 8). Así pues, en general, los puntos de fusión de los AG insaturados son más bajos que los de sus homólogos saturados y *trans*.

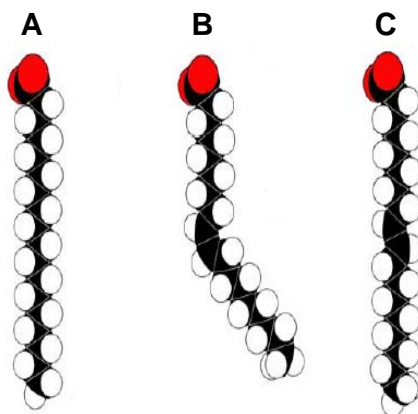


Figura 8. Esquema comparativo de las estructuras de varios ácidos grasos: A) ácido esteárico (18:0) | B) ácido oleico (18:1 Δ^9c) | C) ácido eláidico (18:1 Δ^9t).

Los ácidos grasos, al establecer enlaces tipo éster con otras moléculas a través de su extremo carboxilo terminal, pierden su condición anfipática, confiriendo al lípido resultante un marcado carácter hidrofóbico.

Los lípidos ricos en ácidos grasos saturados de cadena larga son sólidos a temperatura ambiente (grasas), mientras que los lípidos ricos en ácidos grasos de cadena corta y, en particular, más insaturados, son líquidos a temperatura ambiente (aceites).

2.1.3 Nomenclatura

Los ácidos grasos se pueden denominar de diferentes formas. La mayoría de ellos tienen un nombre común, pero además, todos ellos se pueden nombrar mediante la nomenclatura sistemática (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, IUPAC) y la abreviada (Tabla 2).

- *Nomenclatura sistemática (IUPAC)*: los ácidos grasos se denominan a partir del grupo carboxilo terminal, la estructura de la cadena carbonada (naturaleza de los enlaces, número, posición y configuración de los dobles o triples enlaces, si los hubiera) y la naturaleza de la función (ácido). Así el ácido $\Delta 9,12$ -*cis*-octadecadienoico, es un ácido (terminación -oico) de 18 átomos de carbono (octadeca) con 2 (di) dobles enlaces (eno) en los carbonos 9 y 12, a contar a partir del grupo carboxilo (ácido) y de configuración geométrica *cis*-.
- *Nombre común*: designa a menudo los principales ácidos grasos según criterios arbitrarios. Así, el ácido $\Delta 9,12$ -*cis*-octadecadienoico es conocido comúnmente como ácido linoleico.
- *Nomenclatura abreviada*: distingue a los ácidos grasos por su número de carbonos, seguido del número de dobles enlaces, su posición con respecto al grupo carboxilo y la geometría de éstos (Browse *et al.*, 1998). De esta manera, el ácido $\Delta 9,12$ -*cis*-octadecadienoico se denomina 18:2 9c,12c o, más a menudo, 18:2 $\Delta 9,12c$. Existe una variante de esta nomenclatura que consiste en numerar los dobles enlaces a partir del metilo terminal en lugar del carboxilo (Knutzon y Knauf, 1998). El ácido linoleico se convierte así en 18:2 n-6 n-9. A veces se emplea la nomenclatura antigua, en la que se resalta la pertenencia a las familias o series de ácidos grasos omega-3 ($\omega 3$), omega-6 ($\omega 6$) y omega-9 ($\omega 9$), ácidos α -linolénico, linoleico y oleico, respectivamente (Horrobin, 1990). Así, el ácido linoleico se representaría como 18:2 $\omega 6c,9c$.

2.1.4 Ácidos grasos más frecuentes en la naturaleza

Los ácidos grasos se encuentran presentes en las grasas, raramente libres, y casi siempre esterificando al glicerol (Ohlrogge y Browse, 1995). En la naturaleza

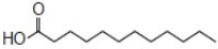
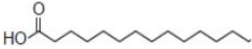
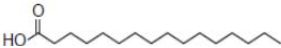
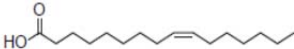
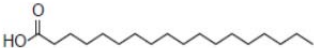
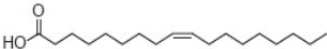
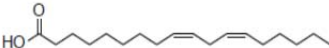
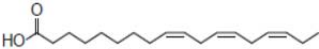
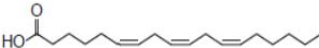
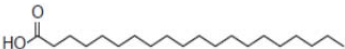
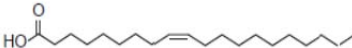
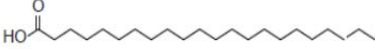
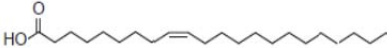
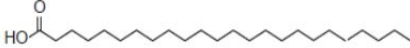
existe una gran diversidad de ácidos grasos, pero no todos tienen la misma importancia. Aunque se han aislado unos 300 tipos distintos de ácidos grasos (Smith, 1970), los más comunes tienen entre C₁₆₋₂₂ y contienen entre 1-3 dobles enlaces (Ohlrogge y Jaworski, 1997).

Los ácidos grasos considerados mayoritarios, que constituyen en la mayoría de los casos más del 95 % del total, son el palmítico, esteárico, oleico, linoleico y α -linolénico (Harwood, 1979; Ohlrogge y Browse, 1995; Thelen y Ohlrogge, 2002). Además existen otros tantos, característicos de lípidos de reservas, resumidos todos ellos en la Tabla 2.

En general, se puede indicar que los ácidos grasos saturados se concentran en ciertas grasas de origen animal (grasa láctea, manteca de cerdo,...) y en otras de origen vegetal (aceite de palma y coco, manteca de cacao,...). Los ácidos monoinsaturados de cadena larga, en particular el ácido oleico, se presentan mayoritariamente en algunas grasas de origen vegetal (aceites de oliva y colza) y, aunque en menores porcentajes, en grasas de origen animal. El ácido linoleico es el más abundante, siendo el componente mayoritario de muchos aceites de semillas (girasol, maíz, cacahuete), mientras que el ácido linolénico lo es presentándose en proporciones importantes en algunos aceites vegetales como el de soja, linaza y germen de trigo. Los PUFAs con más de tres dobles enlaces como el ácido eicosapentanoico (EPA) (20:5 Δ 5,8,11,14,17c) y el ácido docosahexanoico (DHA) (22:6 Δ 4,7,10,13,19,19c) se presentan en porcentajes que oscilan entre el 15 y 20%, para el contenido de ambos ácidos grasos, en los aceites de pescado (Rodríguez Rivera y Simón Magro, 2008).

Los PUFAs más frecuentes, como los mencionados en el párrafo anterior, pertenecen a las series omega-3 (ω 3) y omega-6 (ω 6), derivados del ácido α -linolénico y del linoleico, respectivamente. Estos dos ácidos grasos son esenciales, es decir, no pueden ser sintetizados por la especie humana, y deben obtenerse de la dieta (Burdge y Calder, 2005; Graham *et al.*, 2007). Todos los demás ácidos grasos de sus series sí pueden obtenerse a partir de ellos.

Tabla 2. Ácidos grasos más comunes en los lípidos de reserva.

Nombre común	Nomenclatura Sistemática (IUPAC)	Nomenclatura abreviada	Fórmula química	Punto de fusión (°C)	Estructura química
Láurico	Dodecanoico	12:0	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	43,2	
Mirístico	Tetradecanoico	14:0	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	58,8	
Palmítico	Hexadecanoico	16:0	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	62,8	
Palmitoleico	Δ^9 - <i>cis</i> -hexadecaenoico	16:1 Δ^9c	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	-0,1	
Esteárico	Octadecanoico	18:0	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	68,8	
Oleico	Δ^9 - <i>cis</i> -octadecaenoico	18:1 Δ^9c	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	15,2	
Linoleico	$\Delta^9,12$ - <i>cis</i> -octadecadienoico	18:2 $\Delta^9,12c$	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	-5,0	
α -linolénico	$\Delta^9,12,15$ - <i>cis</i> -octadecatrienoico	18:3 $\Delta^9,12,15c$	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	-11,0	
γ -linolénico	$\Delta^6,9,12$ - <i>cis</i> -octadecatrienoico	18:3 $\Delta^6,9,12c$	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	-11,0	
Araquídico	Eicosanoico	20:0	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	76,0	
Gadoleico	Δ^9 - <i>cis</i> -eicosaenoico	20:1 Δ^9c	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	23,5	
Behénico	Docosanoico	22:0	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	79,9	
Erúcico	Δ^9 - <i>cis</i> -docosenoico	22:1 Δ^9c	C ₂₂ H ₄₂ O ₂	38,0	
Lignocérico	Tetracosanoico	24:0	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	84,2	

Además de todos estos ácidos grasos, existen a su vez otros con estructuras poco frecuentes, característicos de determinados grupos o especies vegetales. Estos ácidos grasos *inusuales* presentan dobles enlaces en posiciones poco comunes, triples enlaces, ramificaciones, sustituyentes como grupos hidroxilo, epoxi, anillos de ciclopropeno, etc.,... y confieren a los lípidos características de gran valor en diferentes áreas. Ejemplos de éstos son los ácidos ricinoleico, erúcico, petroselinico, vernólico, etc. (Cahoon *et al.*, 2002; Jaworski y Cahoon, 2003; Kinney y Clemente, 2005; Taylor *et al.*, 2011).

Por último, mencionar que en las grasas alimentarias no modificadas, y en la naturaleza en general, los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados se encuentran mayoritariamente en configuración *cis*-. En cuanto a la isomería posicional, aunque éstos pueden situarse teóricamente en diferentes lugares de la cadena, también existen posiciones favorecidas por la naturaleza.

2.2 ACILGLICÉRIDOS

2.2.1 Definición y clasificación

Los acilglucéridos, dentro de los glicerolípidos (GL), son ésteres de ácidos grasos unidos a una molécula de glicerol.

El glicerol presenta tres grupos alcohólicos y, por tanto, puede aparecer esterificado en una, dos o tres posiciones, dando lugar respectivamente a *monoacilglucéridos*, *diacilglucéridos* y *triacilglucéridos* (Figura 9).

- Monoacilglucéridos (MAGs): hay un solo ácido graso esterificando a la molécula de glicerol en la posición *sn*-1, *sn*-2 o *sn*-3. Existen, por tanto, tres formas isoméricas: los 1(3)-MAGs y 2-MAGs.
- Diacilglucéridos (DAGs): tienen esterificadas dos posiciones (1,2-DAG, 2,3-DAG y 1,3-DAG). Los 1,2-DAGs de configuración L son los más comunes, mientras que los 2,3-DAGs y 1,3-DAGs sólo se encuentran en cantidades trazas.

Introducción

- Triacilglicéridos (TAGs): tienen esterificadas las tres posiciones del glicerol. Cuando presentan un solo tipo de ácido graso se denominan TAGs *simples* u *homogéneos* y si contienen dos o más ácidos diferentes se llaman TAGs *compuestos* o *mixtos*. Pueden existir muchas formas isoméricas.

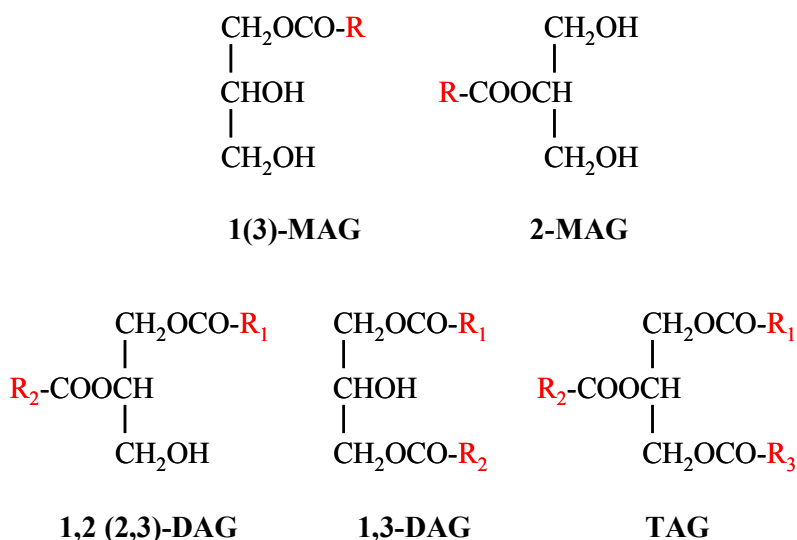


Figura 9. Estructura de los acilglicéridos. MAG: monoacilglicérido | DAG: diacilglicérido | TAG: triacilglicérido | R: ácido graso.

En su inmensa mayoría, los acilglicéridos, también llamados lípidos neutros, se presentan como TAGs, constituyendo la principal reserva de energía en semillas (Ohlrogge y Browse, 1995; Ohlrogge y Jaworski, 1997; Athenstaedt y Daum, 2006; Napier, 2007; Yen *et al.*, 2008). Los MAGs y DAGs, por su parte, aparecen ocasionalmente como intermediarios en la biosíntesis o degradación de TAGs o como segundos mensajeros hormonales (Stobart *et al.*, 1997).

2.2.2 Propiedades físico-químicas

Las diferencias en las propiedades físico-químicas de los acilglicéridos vienen determinadas por el número y tipos de ácidos grasos que los componen, así como la disposición o configuración estereoespecífica de éstos en la molécula de glicerol (Rodríguez Rivera y Simón Magro, 2008).

Así, los TAGs se comportan como moléculas muy hidrofóbicas, al encontrarse tres ácidos grasos esterificando la molécula de glicerol, mientras que los MAGs y DAGs muestran carácter anfipático debido a la presencia de grupos OH no esterificados. El papel que juegan los distintos tipos de ácidos grasos fue detallado en Introducción, 2.1.2. En cuanto a la configuración estereoespecífica de los distintos ácidos grasos en la molécula de glicerol, ésta se considera el factor más influyente en las propiedades físicas de los TAGs, ya que incluye al resto de factores mencionados.

El *estado cristalino* es una de las propiedades físicas características de los TAGs. Los triacilglicéridos presentan polimorfismo, lo cual significa que un mismo triacilglicérido puede tener diferentes formas cristalinas en función de su composición y de las condiciones de cristalización a las que está sometido. Las formas polimórficas más importantes son las β' , mayormente compuestas por una mezcla de AGs de entre C_{16-18} , y las β , compuestas en su totalidad por AGs de C_{18} (Figura 10). La forma β' forma cristales en un sistema rómbico y la forma β lo hace en un sistema triclinico; ambas formas polimórficas se caracterizan por formar un bajo número de cristales de gran tamaño.

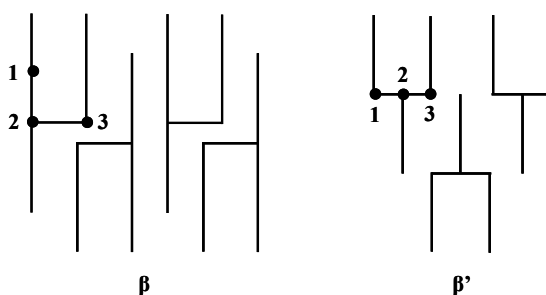


Figura 10. Disposición estructural de los polimorfismos de los triacilglicéridos en sus formas β y β' . 1, 2 y 3 representan las tres posiciones estereoespecíficas de la molécula de glicerol.

El *punto de fusión* es otra de las propiedades características de los TAGs, como así lo fuera en el caso de los ácidos grasos, y está condicionado lógicamente por la naturaleza de éstos (Introducción, 2.1.2). Además, la propia forma polimórfica en que se encuentren los TAGs cristalizados también influye en el punto de fusión, de manera que para un mismo triacilglicérido, éste es mayor en la forma β y menor en la β' .

2.2.3 Nomenclatura

Como ya se ha indicado, las tres posiciones de esterificación del glicerol pueden aparecer con tres ácidos grasos iguales, dos iguales y uno distinto, o los tres diferentes. De esta manera, el triacilglicérido puede presentar un carbono asimétrico (C2 del glicerol), dotando a la molécula de quiralidad y observándose estereoisómeros. Así pues, desde un punto de vista bioquímico, se distinguen tres *posiciones estereoespecíficas* en la molécula de TAG: posición central correspondiente al C2 del glicerol (*sn-2*) y posiciones primarias correspondientes a los C1 y C3 del glicerol (*sn-1* y *sn-3*) (Figura 11).

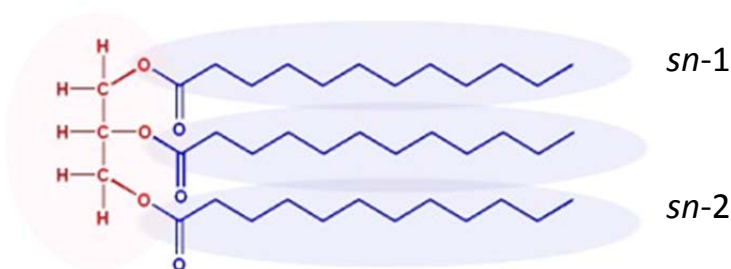


Figura 11. Representación gráfica de las tres posiciones estereoespecíficas de ácidos grasos en la molécula de TAG.

Para nombrarlos se indican primero los radicales de ácidos grasos, seguido de glicerol. El nombre *sn-1* estearil, *sn-2* oleil, *sn-3* palmitil glicerol hace referencia por tanto a un triacilglicérido con ácido esteárico, ácido oleico y ácido palmítico en las posiciones *sn-1*, *sn-2* y *sn-3*, respectivamente.

2.2.4 Acilglicéridos más frecuentes en la naturaleza

Los triacilglicéridos son los componentes mayoritarios de los lípidos de reserva y están presentes tanto en el tejido adiposo animal como en las semillas y frutos de las plantas oleaginosas. Los TAGs de origen animal poseen mayor porcentaje de ácidos grasos saturados, por lo que suelen ser sólidos a temperatura ambiente (grasas). Por el contrario, los TAGs de origen vegetal y animales marinos tienen un alto contenido de ácidos grasos insaturados y son líquidos a temperatura ambiente (aceites). Los mono y diacilglicéridos se consideran componentes minoritarios.

En los TAGs de aceites de origen vegetal, los AGs insaturados oleico y linoleico se encuentran en mayor proporción y representan alrededor de un 60% del total; entre los saturados el más abundante es el palmítico, seguido del esteárico. En cuanto a su posición, por lo general, los PUFAs (ácidos linoleico y linoléico) se encuentran principalmente en la posición central *sn-2*, mientras que los AGs saturados de cadena larga (ácido palmítico y esteárico) ocupan las posiciones primarias *sn-1* y *sn-3*. Los AGs monoinsaturados como el ácido oleico se distribuyen entre las tres posiciones estereoespecíficas.

En las grasas alimentarias existen tanto TAGs homogéneos como mixtos, aunque en las grasas formadas por un número no muy elevado de ácidos grasos (aceites de origen vegetal) es habitual la presencia de altas proporciones de TAGs homogéneos que contienen el ácido graso mayoritario (trioleína en el aceite de oliva, o trilinoleína en aceite de girasol o maíz). Sin embargo, en grasas complejas donde se presentan un número elevado de ácidos grasos (grasa láctea y aceites de pescado), existe un alto porcentaje de triacilglicéridos mixtos.

2.3 FOSFOLÍPIDOS

2.3.1 Definición y clasificación

Los fosfolípidos, dentro de los glicerofosfolípidos (GP), son ésteres de dos ácidos grasos y un ácido fosfórico unidos a una molécula de glicerol en las posiciones C1-C2 y C3, respectivamente. Además, el ácido fosfórico se halla esterificado por un alcohol, que constituye un grupo de cabeza polar, confiriéndole carácter anfipático a la molécula (Figura 12).

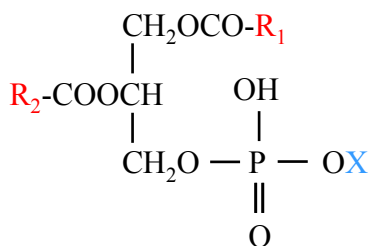


Figura 12. Estructura de los fosfolípidos. R: ácido graso | X: alcohol esterificado.

Los distintos fosfolípidos se diferencian por tamaño, forma y carga eléctrica de sus grupos de cabezas polares. Son los compuestos más abundantes en las membranas celulares, mientras que en otras localizaciones celulares y en grasas y aceites sólo aparecen en pequeñas cantidades. Los más importantes son:

Ácido fosfatídico (PA): compuesto primario de los fosfolípidos que contiene un grupo de cabeza no polar, al no poseer el alcohol esterificado. Se encuentra en pequeñas cantidades en las células, pero es un intermediario importante en la biosíntesis de los fosfolípidos y TAGs (Dörmann, 2005). PA puede estar esterificado a un segundo alcohol, originando el resto de fosfolípidos.

Fosfatidilcolina (PC), *fosfatidiletanolamina (PE)* y *fosfatidilserina (PSer)*: presentan un segundo alcohol nitrogenado, colina, etanolamina o serina, respectivamente. Estos compuestos contienen en su cabeza polar un aminoalcohol y pueden interconvertirse entre sí mediante varias reacciones

enzimáticas (Dörmann, 2005). Los más abundantes en plantas son PC y PE, constituyendo más del 50% de los glicerofosfolípidos presentes en las membranas extraplastidiales. Mientras que PE no se encuentra en las membranas plastidiales, PC forma parte, además, de las membranas de la envuelta externa del cloroplasto. PSer es un fosfolípido minoritario en plantas, y, al igual que PE, no se encuentra en membranas cloroplásticas.

Fosfatidilinositol (PI): su segundo alcohol es un polialcohol cíclico, el inositol. Este fosfolípido forma parte de las membranas y juega un papel importante en la transducción de señal en las células, ya que es el precursor de los segundos mensajeros inositol trifosfato y DAG. PI se detecta en pequeñas cantidades en casi todas las membranas de las células vegetales. Sin embargo, mientras que su presencia en las membranas extraplastidiales está generalmente aceptada, la identificación de PI en las membranas tilacoidales no ha sido confirmada (Dörmann, 2005).

Fosfatidilglicerol (PG): su segundo alcohol es otra molécula de glicerol. Es el único fosfolípido presente tanto en las membranas tilacoidales como en las membranas extraplastidiales (Dörmann, 2005).

Difosfatidilglicerol (DPG) o cardiolipina: en este caso, el grupo fosfato del ácido fosfatídico está esterificado con otra molécula de fosfatidilglicerol. Su esqueleto contiene así tres moléculas de glicerol unidas mediante dos puentes fosfodiéster; los dos grupos hidroxilo de los gliceroles externos se hallan esterificados por ácidos grasos. Su localización está restringida a las membranas internas mitocondriales (Dörmann, 2005).

3. LÍPIDOS DE PLANTAS: BIOSÍNTESIS

La biosíntesis de lípidos en plantas es un proceso complejo en el que están implicadas varias rutas interconectadas entre sí (Figura 13). En este apartado se resume la biosíntesis de TAGs, la cual puede dividirse en tres fases bien diferenciadas: i) síntesis *de novo* de ácidos grasos en el plastidio, ii) formación del pool de acil-CoAs en el citosol, y iii) ensamblaje de TAGs *per se* en el retículo endoplasmático de semillas en desarrollo (Ohlrogge y Jaworski, 1997; Baud y Lepiniec, 2010; Bates *et al.*, 2013).

3.1 SÍNTESIS *DE NOVO* DE ÁCIDOS GRASOS (AGs)

En plantas, la biosíntesis *de novo* de los ácidos grasos se desarrolla en los plastidios (Ohlrogge y Browse, 1995) mediante la acción combinada de dos sistemas multienzimáticos: la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la sintasa de ácidos grasos (FAS) (Harwood, 2005) (Figura 13).

La ACC cataliza el primer paso en la síntesis de ácidos grasos, consistente en la formación de malonil-CoA a partir de acetil-CoA (Sasaki y Nagano, 2004). El malonil-CoA producido pasa posteriormente a malonil-ACP (Acyl Carrier Protein, proteína portadora de acilos) mediante la acción de la malonil-CoA:ACP transacilasa (MAT) (Ohlrogee y Browse, 1995).

El complejo FAS realiza la elongación de las cadenas de ácidos grasos emergentes a través de la adición de dos unidades de carbono, los cuales son donados por el malonil-ACP (Slabas *et al.*, 2001). En plantas, el complejo FAS es de tipo II, en el que cada enzima que lo compone es codificada por un gen independiente y cataliza un paso individual de la ruta (Slabas *et al.*, 2001). La elongación de las cadenas de acilo implica ciclos repetitivos de condensación, reducción, deshidratación y reducción en los que intervienen distintas enzimas (Ohlrogge y Browse, 1995). La condensación inicial, catalizada por la β -cetoacil-ACP sintasa III (KASIII), tiene lugar entre malonil-ACP y acetil-CoA. Aunque KASIII puede catalizar más reacciones (González-Mellado *et al.*, 2010), se considera que la β -cetoacil-ACP sintasa I (KASI) y la β -cetoacil-ACP sintasa II (KASII) catalizan los siguientes

pasos de condensación desde 4:0-ACP hasta 16:0-ACP y 16:0-ACP a 18:0-ACP, respectivamente (Harwood, 2005). Dentro de cada ciclo de condensación, se requieren tres reacciones adicionales (reducción, deshidratación y reducción). Estas reacciones adicionales están catalizadas secuencialmente por la 3-oxoacil-ACP reductasa (KR), hidroxiacil-ACP deshidratasa (DH), y enoil-ACP reductasa (ER) (Ohlrogge y Jaworski, 1997).

En la mayoría de las plantas, la síntesis *de novo* de ácidos grasos finaliza cuando las cadenas de acilo alcanzan una longitud de C₁₆₋₁₈. Parte del 16:0-ACP sintetizado puede entrar en la ruta procariota, en la capa interna de los plastidios, donde los acil-ACPs son usados directamente por las aciltransferasas plastidiales para producir glicerolípidos y glicerofosfolípidos a partir de PA y DAG (Ohlrogge y Browse, 1995; Dormänn, 2005); el resto del 16:0-ACP es hidrolizado por las acil-ACP tioesterasas de tipo A o B (FatA o FatB) (Jones *et al.*, 1995a), y los AGs libres resultantes son exportados fuera de los plastidios y 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 tras la acción de las tioesterasas, la mayoría son eficientemente desaturados a través de la acción catalítica de la estearil-ACP desaturasa (SAD) plastidial, que introduce un doble enlace en la posición $\Delta 9$ del 18:0-ACP para formar 18:1 $\Delta 9c$ -ACP (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). Normalmente tiene mayor actividad relativa que KASII, lo que explica la menor acumulación de 18:0 que de 16:0 en plantas (Harwood, 1996). El 18:1-ACP resultante puede a su vez ser hidrolizado vía acción catalítica de las tioesterasas ya mencionadas para formar AGs libres, los cuáles son posteriormente exportados al citoplasma, o entrar en la ruta procariota de síntesis de glicerolípidos y glicerofosfolípidos (Li-Beisson *et al.*, 2010) (Figura 13).

3.2 FORMACIÓN DEL POOL DE ACIL-CoAs

Para formar el pool de acil-CoAs en el citosol, la mayoría de los acil-ACPs recién formados en el plastidio son hidrolizados por una acil-ACP tioesterasa (TE) para formar AGs libres. Como se indicó en el apartado anterior, la LACS cataliza posteriormente la formación de acil-CoAs a partir de éstos, exportándolos fuera del plastidio (Ohlrogge y Browse, 1995). Además de la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos, la cual contribuye con AG saturados y monoinsaturados al pool de acil-CoAs, existen otras rutas que intercambian grupos acilos entre el pool de acil-CoAs y los fosfolípidos, promoviendo el aporte de PUFAs al pool de acil-CoAs (Bates *et al.*, 2007) (Figura 13).

La fosfatidilcolina (PC), lípido mayoritario de las membranas eucariotas, es el principal sustrato para la desaturación de 18:1 a 18:2 y 18:3, reacciones catalizadas por la oleil desaturasa (FAD2) y la linoleoil desaturasa (FAD3), respectivamente (Stymne y Appelqvist, 1978; Okuley *et al.*, 1994; Arondel *et al.*, 1992; Lu *et al.*, 2009). Existen dos posibles mecanismos de liberación de PUFAs a partir de PC que contribuyen a la formación del pool de acil-CoAs: uno de ellos está catalizado por la acción reversa de la lisofosfatidilcolina aciltransferasa (LPCAT) (Stymne y Stobart, 1984; Bates *et al.*, 2007, 2012); el otro está catalizado por la fosfolipasa A2 (PLA₂), de manera que los AGs libres obtenidos son posteriormente reactivados por la LACS (Das *et al.*, 2001). Otras rutas para el movimiento de los grupos acilos desde PC directamente a lípidos de reserva son discutidas en el apartado siguiente.

Además de estas rutas de intercambio existe otra manera de enriquecer el pool de acil-CoAs. En este caso, el complejo citosólico de la FAE (elongasa de ácidos grasos), análogo a FAS, cataliza la elongación de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos provenientes del propio pool de acil-CoAs, obteniéndose de esta manera AGs de cadena larga, que variarán en función de las especies vegetales, y que serán usados junto con el resto de acil-CoAs en el resto de reacciones.

3.3 BIOSÍNTESIS DE TRIACILGLICÉRIDOS (TAGs)

La biosíntesis de TAGs se realiza en el retículo endoplasmático a partir del glicerol-3-P (G3P) y del conjunto de ácidos grasos provenientes tanto del pool de acil-CoAs como de otras rutas alternativas (Figura 13).

La ruta clásica de síntesis de TAGs se conoce como *ruta de Kennedy*, es dependiente de acil-CoA e implica la transferencia de grupos acilos al esqueleto del glicerol a través de tres pasos secuenciales de acilación (Kennedy, 1961; Ohlrogge y Browse, 1995; Chapman y Ohlrogge, 2012; Li-Beisson *et al.*, 2013). Dicha ruta se inicia tras la síntesis en el citosol de G3P por la reducción de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) mediante la acción de la glicerol-3-P deshidrogenasa (G3PDH). La glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) cataliza la primera reacción de esta ruta, que consiste en la acilación de un grupo acilo a partir del pool de acil-CoAs en la posición *sn*-1 de G3P para dar lugar al ácido lisofosfatídico (LPA). A continuación, la lisofosfatidato aciltransferasa (LPAAT) cataliza la transferencia de un segundo grupo acilo en la posición *sn*-2 de LPA para formar ácido fosfatídico (PA), precursor de la biosíntesis de glicerofosfolípidos. La rotura del grupo fosfato final de PA, catalizada por la fosfatidato fosfatasa (PAP), conduce a la formación de *sn*-1,2-diacilglicerol (DAG). La diacilglicerol aciltransferasa (DAGAT) cataliza la última acilación en la posición *sn*-3 de DAG, dando lugar a la producción de TAG (Voelker y Kinney, 2001).

A pesar de considerarse a la ruta de Kennedy como la vía central de biosíntesis de TAGs en semillas, existen además otras *rutas independientes de acil-CoA* interconectadas a ésta en la que están implicadas diversas enzimas (Chapman y Ohlrogge, 2011; 2012; Li-Beisson *et al.*, 2013). No obstante, las contribuciones de estas rutas alternativas a la composición final de TAGs podrían variar en función no sólo del tejido o especie en cuestión, sino también debido a cambios en las condiciones ambientales y/o estadíos de desarrollo (Bates y Browse, 2012; Banaš *et al.*, 2013). En general, tan sólo una pequeña porción de los acil-CoAs y DAGs sintetizados *de novo* 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 de la reacción catalizada por la

lisofosfatidilcolina aciltransferasa (LPCAT) (Bates *et al.*, 2009), mientras que la mayoría de los DAGs son convertidos nuevamente a PC mediante la acción de la CDP-colina:diacilglicerol colinafosfotransferasa (DAG-CPT) (Vogel y Browse, 1996). Posteriormente, los grupos acilos de la PC sintetizada *de novo* (pool activo) pueden seguir tres vías: i) convertirse en sustratos para la desaturación (como se describió en el apartado anterior), ii) participar en la edición de acilos en el pool de PC, o iii) convertirse en DAGs “derivados de PC” por la acción de la fosfolípido:diacilglicerol colinafosfotransferasa (PDCT) (Bates *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2009). A su vez, estos DAGs derivados de PC podrían ser usados para la formación de TAGs mediante las acciones catalíticas de: i) DAGAT (Kennedy, 1961); ii) DAG:DAG transacilasa (DGTA), que transfiere grupos acilos entre dos moléculas de DAGs para producir TAG y MAG, siendo este último reconvertido en DAG por la monoacilglicerol aciltransferasa (MAGAT) (Stobart *et al.*, 1997); o iii) mediante la acción de la fosfolípido:diacilglicerol aciltransferasa (PDAT), la cual cataliza la transacilación de grupos acilos desde la posición *sn-2* de la PC al DAG, formando TAG y LPC (Banaś *et al.*, 2000; Dahlqvist *et al.*, 2000; Stahl *et al.*, 2004), pero que bien podría tener también alguna actividad DGTA (Ghosal *et al.*, 2007). En soja, parece que la mayoría de TAG formado es sintetizado a partir de DAG derivado de PC, así como en cártamo y *Arabidopsis thaliana*, mientras que en especies como el cacao y cilantro, este TAG parece formarse mayoritariamente a partir de DAG sintetizado *de novo* (Bates *et al.*, 2009; Bates y Browse, 2012).

Finalmente, los TAGs así sintetizados se acumulan entre las dos capas de fosfolípidos de la membrana del retículo endoplasmático, a la espera de ser liberados a través de los denominados cuerpos lipídicos u oleosomas (Hsieh y Huang, 2004; Siloto *et al.*, 2006) (Figura 13).

A continuación se ampliará la información disponible a cerca de las LPAATs y DAGATs, objeto de nuestro estudio.

3.3.1 Lisofosfatidato aciltransferasas (LPAATs)

La LPAAT cataliza la transferencia de un ácido graso de un acil-CoA/ACP donador a la posición central *sn*-2 del ácido lisofosfatídico (LPA) para producir ácido fosfatídico (PA) (Figura 13).



El gen de la LPAAT, *plsC*, fue aislado por primera vez en *E. coli* por complementación de un mutante termosensible, JC201 (Coleman, 1992). Este mutante no tenía actividad detectable LPAAT a 44°C y mostraba una acumulación de LPA. Posteriormente, se aisló un gen del maíz (*pMAT1*) a partir de una librería plasmídica de cDNA que complementó a JC201 (Brown *et al.* 1994), el cuál mostró alta homología con el gen *slc1* de levaduras (Nagiec *et al.*, 1993). A partir de entonces, han sido numerosos los genes de LPAAT clonados y caracterizados en diversas especies como coco (Knutzon *et al.*, 1995), *Limnanthes sp.* (Brown *et al.* 1995), cacahuete (Chen *et al.*, 2012) o ricino (Arroyo-Caro *et al.*, 2013), encontrándose hasta cinco genes en *Arabidopsis* (Kim *et al.*, 2005).

Al igual que para otras aciltransferasas, existen tres localizaciones para la enzima LPAAT en las células vegetales: los plastidios, el retículo endoplásmico y las mitocondrias (Frentzen, 1993). La LPAAT de plastidios y mitocondrias está localizada tanto en la membrana exterior como en la interior, mientras que la microsomal lo hace en la membrana del retículo endoplásmico (Frentzen, 1993). Además, recientemente se ha descubierto una LPAAT soluble en *A. thaliana* (Ghosh *et al.*, 2009).

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 AGs saturados; los VLCFAs son generalmente excluidos de la posición central *sn*-2 (Frentzen, 1993; Voelker *et al.*, 1996). No obstante, en aquellas especies vegetales cuyos aceites poseen ciertas cantidades de AGs inusuales en la posición *sn*-2, existen LPAATs adicionales con preferencia por

estos sustratos (Cao *et al.*, 1990; Laurent y Huang, 1992; Brown *et al.*, 1995; Frentzen, 1998).

La selectividad de LPAAT, así como sus niveles de actividad, influye claramente tanto en la distribución estereoespecífica de los ácidos grasos en TAGs como en el contenido de aceite, por lo que su caracterización ha sido clave a la hora de modificar la composición de determinados aceites. Estos aspectos serán ampliamente desarrollados en Introducción, 4.4.2.

3.3.2 Diacilglicerol aciltransferasas (DAGATs)

La DAGAT cataliza la transferencia de un ácido graso de un acil-CoA donador a la posición primaria *sn*-3 del 1,2-diacilglicerol para formar TAG (Figura 13).



La clonación de diversos genes *DAGAT* ha sido llevada a cabo recientemente. Hoy día se han clonado numerosos genes *DAGAT* a partir de una gran variedad de organismos, poniéndose de manifiesto la existencia de al menos tres familias evolutivamente diferentes: DAGAT1, DAGAT2 y DAGAT3 (Kroon *et al.*, 2006; Lung y Weselake, 2006).

El gen *DAGAT1* de mamífero fue el primero en ser clonado y se hizo por homología con la esterol:acetil-CoA aciltransferasa (ACAT) (Cases *et al.*, 1998). Posteriormente se clonó un gen aparentemente ortólogo en *Arabidopsis thaliana* (Hobbs *et al.*, 1999; Routaboul *et al.*, 1999; Zou *et al.*, 1999), llegándose a clonar en otros organismos como colza (Nykiforuk *et al.*, 2002), ricino (He *et al.*, 2004a), *Euonymus alatus* (Milcamps *et al.*, 2005), árbol del tung (Shockey *et al.*, 2006), soja (Wang *et al.*, 2006), *Brassica juncea* (Ilaiyaraja *et al.*, 2008), *Tropaeolum majus* (Xu *et al.*, 2008), dos isoformas en *Vernonia galamensis* (Yu *et al.*, 2008) y más recientes el de una especie de diatomeas (Guihéneuf *et al.*, 2011), girasol (Sun *et al.*, 2011) y humanos (Hiramine y Tanabe, 2011). Igualmente se han encontrado genes ortólogos en levadura, *Are1* y *Are2* (Yang *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1996), si bien en bacterias, la síntesis de TAGs es llevada a cabo por la enzima

bifuncional WS/DGAT (Kalscheuer y Steinbuchel, 2003). DAGAT1 y ACAT constituyen evolutivamente una misma familia de aciltransferasas unidas a membranas (MBOAT) (Hofmann, 2000; Turkish *et al.*, 2005; Wagner y Daum, 2005; Yen *et al.*, 2005) diferente de DAGAT2 y DAGAT3 (Kroon *et al.*, 2006; Lung y Weselake, 2006).

El gen *DAGAT2* fue clonado inicialmente en *Mortierella ramanniana* (Lardizabal *et al.*, 2001), aunque recientemente ha sido también identificado en otros organismos como, humanos y ratones (Cases *et al.*, 2001), ricino (Kroon *et al.*, 2006), árbol del tung (Shockey *et al.*, 2006), algas (Wagner *et al.*, 2010; Chen y Smith, 2012), olivo (Banilas *et al.*, 2011) y *Arabidopsis thaliana* (Zhou *et al.*, 2013). Igualmente se ha encontrado un gen ortólogo en levadura, *dga1*, cuya proteína controla el grueso de la biosíntesis de TAGs en este organismo (Oelkers *et al.*, 2002; Sandager *et al.*, 2002; Sorger y Daum, 2003; Turkish *et al.*, 2005; Wagner y Daum, 2005; Yen *et al.*, 2005). DAGAT2 es miembro de una familia mayor que engloba enzimas monoacilglicerol aciltransferasas (MAGATs) y sintetisas de ceras (Yen *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2003; Lockwood *et al.*, 2003; Yen y Farese, 2003; Cheng y Russell, 2004; Turkish *et al.*, 2005).

Ambas enzimas se localizan en la membrana del retículo endoplasmático, si bien parecen estar localizadas en diferentes áreas de ésta (Shockey *et al.*, 2006).

En cuanto a la especificidad por sustrato, DAGAT1 posee un amplio rango de afinidad por distintos AGs, jugando un papel principal en la biosíntesis de TAGs durante el desarrollo de la semilla (Lung y Weselake, 2006), mientras que DAGAT2, relegada en ocasiones a un segundo plano, parece tener un papel clave en la incorporación de AGs inusuales a TAGs en aquellas plantas que los acumulan (Kroon *et al.*, 2006; Yen *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2012). Así pues, 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, 2001; Shockey *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010).

Por último, la familia de DAGAT3 es la más reciente de las descubiertas hasta la fecha, inicialmente descubierta en cacahuete (Saha *et al.*, 2006; Chi *et al.*, 2014) y

actualmente también en *Arabidopsis thaliana* (Hernández *et al.*, 2012), árbol del tung (Cao *et al.*, 2013) y levaduras (Rani *et al.*, 2013), entre otros. A diferencia de las dos anteriores, las proteínas DAGAT3 son solubles, localizándose 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), si bien el 30% de la actividad DAGAT es imputable a la fracción citosólica (Saha *et al.*, 2006), la cual pudiera estar implicada en el reciclaje de los AGs insaturados 18:2 y 18:3 en TAGs (Hernández *et al.*, 2012).

En general, al ser responsable del último paso de la biosíntesis de TAGs y no estar implicado en la de lípidos de membrana, DAGAT es considerada la enzima clave en el control de la tasa de síntesis de TAGs 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 AGs en TAGs, por lo que su caracterización resulta fundamental en la modificación de determinados aceites. Estos aspectos serán ampliamente desarrollados en Introducción, 4.3 y 4.4.2.

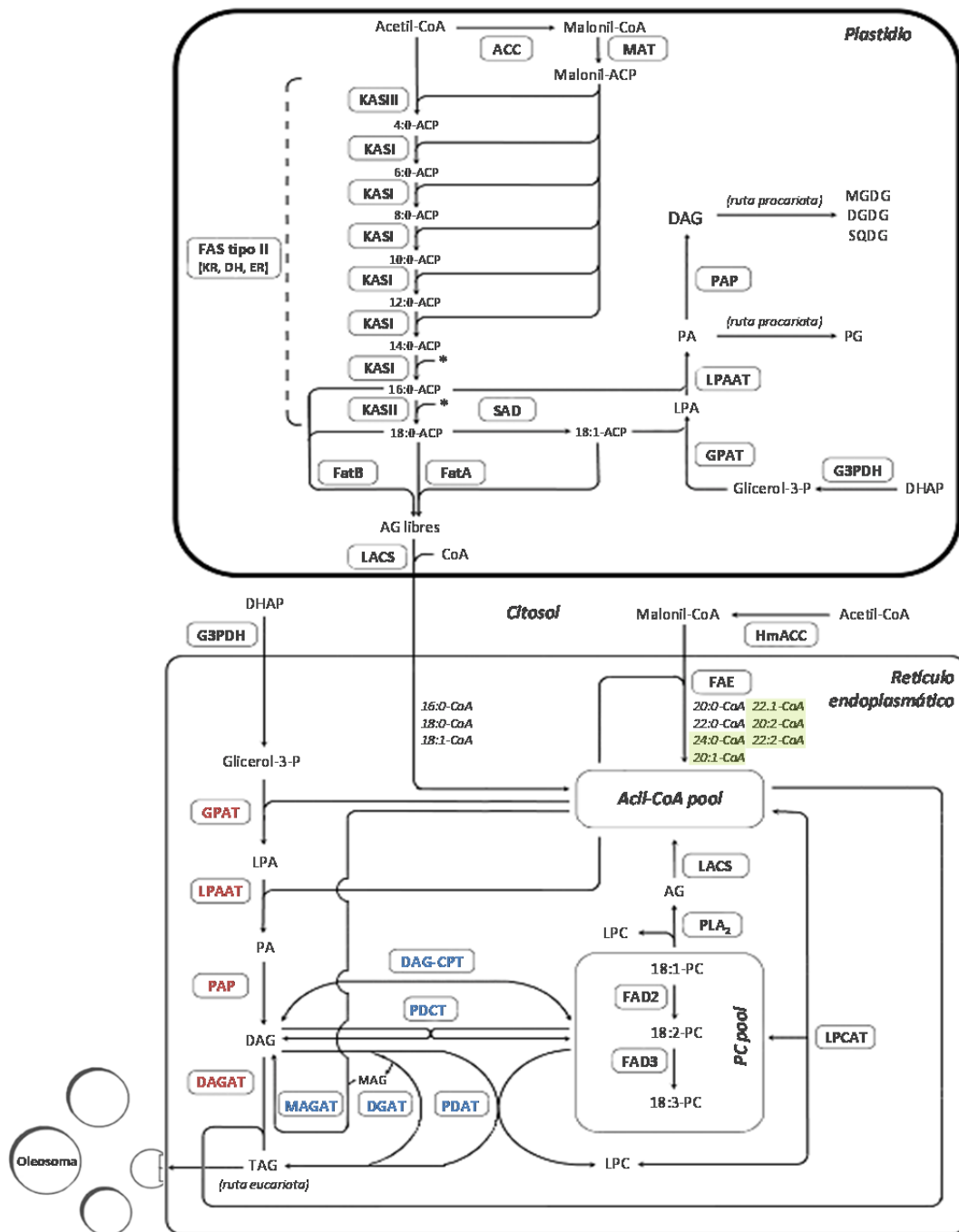


Figura 13. Esquema general de la ruta de biosíntesis de lípidos en plantas.

ACC: acetil-CoA carboxilasa | ACP: proteína transportadora de acilo | AG: ácido graso | CoA: coenzima A | DAG: diacilglicerol | DAGAT: diacilglicerol aciltransferasa | DAG-CPT: CDP-colina:diacilglicerol colinafosfotransferasa | DGDG: digalactosildiacilglicerol | DGTA: DAG:DAG transacilasa | DH: hidroaxil-ACP deshidratasa | ER: enoil-ACP reductasa | FAD2: oleil desaturasa | FAD3: linoleil desaturasa | FAE: complejo de la elongasa de ácidos grasos | FAS: complejo de la sintasa de ácidos grasos | FatA/B: acil-ACP tioesterasas tipo A y B | G3PDH: glicerol-3-P deshidrogenasa | GPAT: glicerol-3-fosfato aciltransferasa | HmACC: acetil-CoA carboxilasa homomérica | KAS: β -cetoacil-ACP sintasa | KR: 3-oxoacil-ACP reductasa | LACS: acil-CoA sintetasa de cadena larga | LPAAT: lisofosfatidato aciltransferasa | LPC: lisofosfatidilcolina | LPCAT: lisofosfatidilcolina aciltransferasa | MAG: monoacilglicerol | MAGAT: monoacilglicerol aciltransferasa | MAT: malonil-CoA:ACP transacilasa | MGDG: monogalactosildiacilglicerol | PA: ácido fosfatídico | PAP: fosfatidato fosfatasa | PC: fosfatidilcolina | PDCT: fosfolípido:diacilglicerol colinafosfotransferasa | PG: fosfatidilglicerol | PLA₂: fosfolipasa A2 | PDAT: fosfolípido:diacilglicerol aciltransferasa | SAD: estearil-ACP desaturasa | SQDG: sulfoquinovosildiacilglicerol | TAG: triacilglicérido | *: Malonil-ACP. En rojo se marcan las enzimas pertenecientes a la ruta de Kennedy, mientras que en azul se marcan las enzimas pertenecientes a las rutas independientes de acil-CoA. Los acil-CoAs sombreados en verde están presentes en exclusividad en la familia Brassicaceae. Modificado de Baud y Lepiniec, 2010.

4. LÍPIDOS DE PLANTAS: MODIFICACIÓN

Los aceites vegetales se usan tanto para consumo humano como para usos industriales no alimentarios (productos farmacéuticos, jabones, pinturas, cosméticos, biolubricantes, biodiesel, etc.) (Napier, 2007; Durrett *et al.*, 2008; Dyer *et al.*, 2008; Dyer y Mullen, 2008; Napier y Graham, 2010; Rogalski y Carrer, 2011; Taylor *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011; Santori *et al.*, 2012). De la producción mundial de aceites vegetales, el 70-80% se destina al consumo humano, ya sea de forma directa, a través de la dieta (aceites crudos para aderezar, aceites para freír y cocinar, margarinas, etc...), o de forma indirecta, a través de productos procesados destinados a la industria alimentaria (industria panadera, pastelera, para la confección de helados, etc...). Puesto que las aplicaciones de los aceites vegetales son muy diversas, exigiendo cada una de ellas unas características físico-químicas diferentes, es obvio que requieran distintos perfiles óptimos específicos de ácidos grasos. No obstante, cualquier intento de modificación de estos aceites estará lógicamente sometido a las propias limitaciones naturales de las plantas en términos de viabilidad seminal y crecimiento vegetal (Knauf y Del Vecchio, 2008).

La modificación de lípidos de plantas oleaginosas se centra en dos aspectos fundamentales: la mejora en el *contenido graso* de la semilla y la *calidad* del aceite producido.

Dado que esta Tesis se ha desarrollado dentro de proyectos de investigación del Grupo de Genética y Bioquímica de Lípidos de Semillas (GGBLS) encaminados a la obtención de nuevos aceites saludables para el consumo humano, este apartado se centrará en las modificaciones de oleaginosas orientadas a la obtención de aceites de interés para la *industria alimentaria*.

4.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN

Los criterios de selección hacen referencia a una serie de requisitos que debe cumplir todo aceite vegetal destinado al consumo humano; éstos se pueden dividir entre los que persiguen mejoras desde un punto de vista nutricional o aquéllos que persiguen mejoras tecnológicas de los aceites.

El efecto que ejercen las grasas consumidas en la dieta sobre la salud cardiovascular depende de la composición en ácidos grasos de éstas, lo cual está relacionado directamente con los niveles de colesterol plasmático (Mensink *et al.*, 2003). El colesterol se transporta en el torrente sanguíneo asociado fundamentalmente a lipoproteínas de alta y baja densidad (HDL y LDL, respectivamente). El colesterol asociado a LDL se deposita en el endotelio de los vasos sanguíneos y su exceso determina la aparición de ateromas que obstruyen el flujo.

Existen numerosos estudios científicos que demuestran que los AGs insaturados (oleico, linoleico y linolénico) incrementan las HDL y disminuyen las LDL, por lo que se consideran saludables. En general, grasas con AGs saturados de cadena menor a C₁₈ (láurico, mirístico y palmítico) aumentan en conjunto tanto las LDL como las HDL, incrementando la relación LDL/HDL (Mensink *et al.*, 2003). No obstante, al analizar el efecto de estos ácidos grasos de manera independiente se observan notables diferencias (Dubois *et al.*, 2007; Steijns, 2008), atribuyéndose peores resultados al mirístico que al láurico, aunque la posición de éstos en el triacilglicérido se estima importante (Hunter, 2001); en cuanto al palmítico, algunos estudios han demostrado relativa neutralidad (Khosla y Sundram, 1996). El ácido esteárico, sin embargo, es considerado neutro o positivo desde la perspectiva de la salud cardiovascular (Kelly *et al.*, 2001; OMS, 2003; Mensink, 2005; Thijssen y Mensink, 2005). Éste se encuentra mayoritariamente esterificado en las posiciones primarias *sn*-1 y *sn*-3 del TAG, lo que contribuye a su liberación por la acción de las lipasas estereoespecíficas de esos enlaces durante la digestión. Estos ácidos grasos no se absorben fácilmente debido a su alto punto de fusión y a la tendencia de éstos a formar sales cálcicas insolubles, por lo que son excretados finalmente (Bracco, 1994; Zock *et al.*, 1995; Ramírez *et*

al., 2001). Otras contribuciones basan el efecto neutro o positivo del ácido esteárico a su transformación en ácido oleico, más que a una limitada absorción (Bonanome y Grundy, 1988; Grundy, 1994). Por el contrario, los ácidos grasos que están en la posición central *sn-2* de los TAGs son preferentemente absorbidos a través de la pared intestinal (Small, 1991).

Así pues, desde un punto de vista nutricional, se pretende incrementar el consumo de aceites con AGs insaturados en la posición central sn-2 de los TAGs, mucho más beneficiosos para la salud que los saturados en esa misma posición, ya que éstos, excluyendo al ácido esteárico, están íntimamente relacionados con enfermedades cardiovasculares.

Por otra parte, desde un punto de vista tecnológico se persigue el aumento de la estabilidad oxidativa de los aceites y la obtención de grasas plásticas de origen vegetal. La oxidación de los aceites se produce por la reacción de los dobles enlaces de las moléculas lipídicas con el oxígeno, produciendo una variedad de productos químicos. Las consecuencias de esta reacción son una disminución del valor nutricional del alimento y la formación de sabores no deseables acompañados de rancidez. Aceites con altos contenidos en AGs esenciales ω_3 y ω_6 , en principio saludables, tienen una menor estabilidad oxidativa por el alto contenido en dobles enlaces, oxidándose muy rápidamente, por lo que son más adecuados para el consumo directo. Por otra parte aceites muy ricos en AGs saturados presentan una mayor estabilidad pero están asociados a problemas cardiovasculares. Por ello, para el uso industrial, en el que los aceites y grasas se ven sometidos frecuentemente a altas temperaturas, son más adecuados aceites ricos en AGs monoinsaturados, como el ácido oleico, y saturados saludables, como el ácido esteárico.

Las propiedades físicas más importantes de las grasas son el *intervalo de fusión* y la *consistencia* que presentan, las cuáles están estrechamente relacionadas y proporcionan la textura adecuada de alimentos grasos y elaborados. Como se describió en apartados anteriores, ambas propiedades físicas dependen de las distintas especies de TAGs que las componen y éstas, a su vez, de la naturaleza de los ácidos grasos que las conforman. Las grasas naturales son mezclas de TAGs

y presentan, por tanto, intervalos de fusión, los cuáles se alcanzan a temperaturas moderadamente bajas, provocando la licuefacción o el ablandamiento de las grasas con calentamientos moderados. Así pues, la consistencia de las grasas está directamente relacionada con sus intervalos de fusión: grasas sometidas a temperaturas por debajo del punto inicial de éstos presentarán una consistencia líquida, mientras que a temperaturas mayores del punto final de éstos mostrarán una consistencia completamente solidificada. Sin embargo, es a temperaturas comprendidas dentro de su intervalo de fusión cuando las grasas presentan las propiedades más interesantes para la elaboración de alimentos grasos y elaborados como margarinas, productos de bollería, repostería o galletería. Las grasas en su intervalo de fusión se denominan grasas plásticas. Así pues, la *plasticidad* de una grasa engloba las características de consistencia anteriormente mencionadas (Rodríguez Rivera y Simón Magro, 2008).

Por último, la capacidad de *cristalización* de estos aceites también se erige como factor determinante en su selección. Por ejemplo, los aceites empleados en frituras y/o biolubricantes no deberían contener cristales o TAGs que cristalizaran fácilmente, mientras que para los untables es deseable que estén y permanezcan en la forma β' (C_{16-18}), lo que les confiere una superficie brillante y un suave realce, en vez de la forma β (C_{18}) que, pese a formar cristales pequeños, crece en aglomerados, produciendo una textura granulada y siendo menos capaces de incorporar líquido (Gunstone, 2001).

Así pues, desde un punto de vista tecnológico, se pretende disminuir el uso de aceites con AGs poliinsaturados (PUFAs), ya que en casos de consumo indirecto se da prioridad a la estabilidad oxidativa a expensas del valor nutritivo de éstos. Además, para obtener buenas grasas plásticas se hace necesario establecer un equilibrio entre AGs saturados y AGs monoinsaturados, con especial atención a los ácidos oleico y esteárico. La longitud de los AGs que componen estos aceites puede variar en función de su uso y el grado de cristalización deseados.

A continuación se resume la idoneidad de ciertos ácidos grasos en función de los criterios de selección descritos anteriormente (Figura 14).

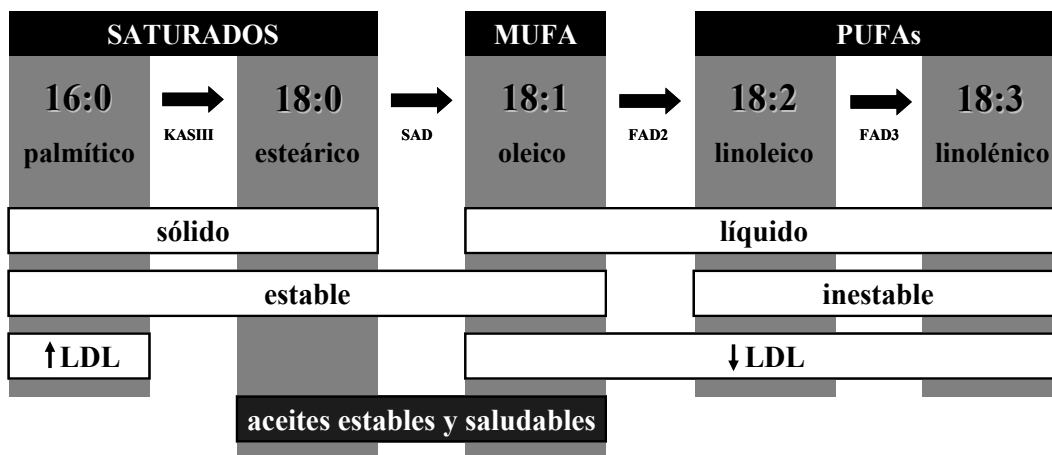


Figura 14. Diagrama esquemático de la ruta de biosíntesis de los ácidos grasos principales saturados, monoinsaturado (MUFA) y poliinsaturados (PUFAs) en semillas de oleaginosas, así como sus propiedades nutritivas y funcionales. Modificado de Liu et al, 2002a.

Una vez establecidos los criterios de selección, es preciso identificar la variabilidad genética de cada especie y aplicar técnicas eficientes de modificación.

4.2 PROBLEMÁTICA ACTUAL

Como se deduce de los apartados anteriores, la mayoría de los usos en la industria alimentaria requieren grasas que sean sólidas a temperatura ambiente y/o bastante resistentes a la oxidación.

Originariamente, y para tal fin, la industria alimentaria usaba grasas de origen animal, como la manteca de cerdo y la mantequilla. Sin embargo, y debido a la riqueza de estas grasas en determinados AGs saturados en la posición central *sn*-2 de los TAGs, en los últimos 30 años se ha promovido su sustitución por aceites de origen vegetal. Los aceites vegetales apenas poseen AGs saturados en dicha posición, por lo que se consideran muy beneficiosos para el consumo humano.

Introducción

No obstante, su elevado contenido en AGs insaturados hace que sean líquidos a temperatura ambiente, por lo que estos aceites no son apropiados para la fabricación de margarinas.

Para conseguir que los aceites vegetales tengan una consistencia más sólida se manipulan químicamente de manera que se les modifica su composición de ácidos grasos y/o la estructura de sus TAGs. Los principales procesos que se utilizan con este fin son la hidrogenación y la transesterificación.

La *hidrogenación* (Patterson, 1994; Dijkstra, 2007) es un proceso químico que se realiza a altas temperaturas, utilizando corrientes de hidrógeno y ciertos catalizadores metálicos, normalmente níquel, para convertir los AGs insaturados presentes en estos aceites en saturados, mediante la reducción del número de sus dobles enlaces. La hidrogenación permite así convertir los aceites vegetales líquidos en grasas sólidas y/o semisólidas a temperatura ambiente. No obstante, durante este proceso también se producen isómeros *trans* de los ácidos grasos, los cuáles pueden llegar a representar hasta un 40% del total del aceite y cuyo consumo está estrechamente relacionado con la aparición de enfermedades cardiovasculares (Stender y Dyerberg, 2004; Weggemans *et al.*, 2004; Mozaffarian *et al.*, 2006, 2009; Pfeuffer y Schrezenmeir, 2006; Tarrago-Trani *et al.*, 2006; Gebauer *et al.*, 2007; Chardigny *et al.*, 2008; Jakobsen *et al.*, 2008; Khor y Esa, 2008; Kummerow, 2009; Anadón *et al.*, 2010; EFSA, 2010). Esto se debe a que su ingesta produce un aumento de la concentración plasmática de LDL y la disminución de la de HDL, en mayor proporción que lo hace el consumo de grasas animales saturadas a las que sustituye.

La *transesterificación* (Schuchardt *et al.*, 1998; Dijkstra, 2007), por su parte, es un proceso químico por el cual se produce una redistribución de los ácidos grasos en la molécula de TAG, seguido de un fraccionamiento que enriquece al aceite en AGs saturados. La transesterificación permite así convertir estos aceites vegetales en grasas más parecidas a la animal. Sin embargo, dicha reordenación favorece la disposición de los AGs saturados en la posición central *sn-2* de los TAGs, siendo absorbidos a través de la pared intestinal y causando los efectos biológicos comentados anteriormente.

Actualmente, y según los expertos, el aceite o grasa que debe usar la industria tiene que ser de origen vegetal, sin manipulación química alguna que pudiera disminuir su calidad nutricional y elevar su coste, y pudiendo tener un mayor contenido en AGs saturados en las posiciones primarias sn-(1+3), ya que la estructura natural de los TAGs de aceites vegetales permite este incremento sin ser perjudicial para la salud.

Con el propósito de cubrir esta demanda se vienen desarrollando numerosas técnicas de modificación genética de plantas oleaginosas ya que, a pesar de su gran variabilidad genética y de la mejora de su producción con el uso de híbridos, no se cubren completamente estas necesidades (Cahoon *et al.*, 2007). Entre estas técnicas cabe destacar la mutagénesis, tanto física como química, así como la ingeniería genética, cuyo uso se ha disparado en los últimos años gracias al desarrollo de la biología molecular y la biotecnología. Avances recientes en la comprensión de mecanismos bioquímicos, moleculares y celulares de la biosíntesis de aceite en semillas de plantas oleaginosas, junto a la identificación y clonación de genes implicados en este proceso, han facilitado a su vez la obtención de innumerables aceites con composición de ácidos grasos modificada.

4.3 MODIFICACIÓN DEL CONTENIDO GRASO DE LAS SEMILLAS

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; Thelen y Ohlrogge, 2002; Dyer y Mullen 2005; Lung y Weselake, 2006).

En general, la mejora en este aspecto se centra en el control del flujo de carbono hacia la producción de aceite (Weselake *et al.*, 2009; Baud y Lepiniec, 2010). Hasta ahora, las contribuciones a la mejora del contenido de aceite se han producido principalmente a través de las técnicas clásicas de mejora en plantas oleaginosas de gran interés como colza y soja (Weselake *et al.*, 2009) o girasol (Introducción, 1.5). Actualmente, el uso de técnicas de ingeniería genética ha permitido abordar esta mejora desde otro punto de vista. Inicialmente, los estudios basados en estas técnicas se centraron en los primeros pasos de la ruta

Introducción

de biosíntesis de ácidos grasos, si bien la tendencia actual es modificar los pasos finales, ya que así no se producen moléculas intermediarias que puedan cursar en otras rutas metabólicas relacionadas con la biosíntesis de TAGs. Es por ello por lo que se están estudiando las aciltransferasas y sus mecanismos de regulación. Entre estas enzimas, cabe destacar el papel de DAGAT, siendo la enzima mejor estudiada en estos términos. Algunos trabajos han demostrado que el nivel de actividad DAGAT determina el contenido en aceite de la semilla, por lo que esta enzima parece ser crucial tanto en aspectos cuantitativos como cualitativos de la síntesis de aceite (Katavic *et al.*, 1995; Ohlrogge y Jaworski, 1997; Settlage *et al.*, 1998; Routaboul *et al.*, 1999; Zou *et al.*, 1999; Bouvier-Nave *et al.*, 2000; Jako *et al.*, 2001; Slabas *et al.*, 2001; Lung y Weselake, 2006; Weselake *et al.*, 2007, 2008, 2009; Lardizabal *et al.*, 2008, 2010; Xu *et al.*, 2008; Yen *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2008; Lock *et al.*, 2009; Snyder *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2009; van Erp *et al.*, 2014).

En la Tabla 3 se resumen algunas de las enzimas cuya modificación está asociada a cambios en el contenido de aceite en semilla. Si bien aún no se ha desarrollado la modificación en plantas oleaginosas de interés en industria alimentaria en dicho aspecto, estos estudios permitirán en un futuro próximo la consecución de este objetivo.

No obstante, la principal dificultad de incrementar el contenido de aceite es que éste se realiza a expensas de reducir el contenido de proteínas. Existe una regulación muy estricta para conseguir que en la planta se alcance un equilibrio entre los distintos compuestos y el conocimiento de estos mecanismos de regulación es muy limitado, por lo que las modificaciones están más encaminadas a mejorar la calidad de los aceites.

Tabla 3. Enzimas asociadas con cambios en la acumulación de aceite en semillas.Modificado de Weselake *et al.*, 2009 y Yu *et al.*, 2011.

Enzima	Efecto en la acumulación de aceite	Referencia
ACC	La sobreexpresión de una variante citosólica de ACC incrementa la acumulación de aceite en semilla de colza	Töpfer <i>et al.</i> , 1995
	La sobreexpresión de la ACC citosólica de Arabidopsis en el plastidio incrementa la acumulación de aceite en semilla	Roesler <i>et al.</i> , 1997
G3PDH	La sobreexpresión incrementa la acumulación de aceite en semilla de colza un 40%	Bao y Ohlrogge, 1999
	La sobreexpresión incrementa la acumulación de aceite en semilla de colza	Vigeolas <i>et al.</i> , 2007
GPAT	La expresión de GPAT plastidial de cártamo o de <i>E. coli</i> en Arabidopsis incrementa la acumulación de aceite en semilla	Jain <i>et al.</i> , 2000
	La expresión de GPAT de cártamo en Arabidopsis incrementa la acumulación de aceite en semilla un 10-21%	Nikolau <i>et al.</i> , 2003
LPAAT	La expresión del gen <i>SLC1-1</i> de levadura en colza y Arabidopsis incrementa la acumulación de aceite en semilla	Zou <i>et al.</i> , 1997 Taylor <i>et al.</i> , 2001
	La expresión de dos genes LPAAT de colza en Arabidopsis incrementa la acumulación de aceite en semilla	Maisonneuve <i>et al.</i> , 2010a
DAGAT1	La expresión de DAGAT1 de Arabidopsis en colza incrementa la acumulación de aceite y el peso de la semilla	Ohlrogge y Jaworski, 1997
	La expresión constitutiva de DAGAT1 de Arabidopsis en tabaco incrementa la acumulación de aceite en hoja	Bouvier-Nave <i>et al.</i> , 2000
	La sobreexpresión de DAGAT1 de Arabidopsis incrementa la acumulación de aceite en semilla	Jako <i>et al.</i> , 2001
	La sobreexpresión de DAGAT1 de Arabidopsis o colza en colza incrementa la acumulación de aceite en semilla	Weselake <i>et al.</i> , 2007, 2008 Taylor <i>et al.</i> , 2009
	La expresión ectópica de DAGAT1-2 de maíz en maíz incrementa la acumulación de aceite en semilla	Zheng <i>et al.</i> , 2008
	La sobreexpresión de DAGAT1 de <i>Jatropha curcas</i> en Arabidopsis incrementa la acumulación de aceite en semilla	Misra <i>et al.</i> , 2013
DAGAT2	La expresión de DAGAT2A de <i>Mortierella ramanniana</i> en soja incrementa la acumulación de aceite en semilla	Lardizabal <i>et al.</i> , 2008
	La expresión de DAGAT2s de <i>Mortierella ramanniana</i> y <i>Neurospora crassa</i> en maíz incrementa la acumulación de aceite en grano	Oakes <i>et al.</i> , 2011

4.4 MODIFICACIÓN DE LA CALIDAD DE LOS ACEITES

La *calidad* de un aceite vegetal es un concepto relativo que depende principalmente del uso a que se destine dicho aceite. Ésta viene dada tanto por la composición de ácidos grasos (Frentzen, 1998), como por la distribución de éstos en los TAGs (Gunstone y Harwood, 2007). Este apartado seguirá centrándose en el uso de estos aceites vegetales en la industria alimentaria.

4.4.1 Modificación en la composición de ácidos grasos

4.4.1.1 Modificación en el contenido de PUFAs

Los ácidos grasos poliinsaturados encontrados en aceites vegetales son por lo general los ácidos linoleico (18:2) y linolénico (18:3). Como se comentó en anteriores apartados, estos ácidos grasos hacen a los aceites que los contienen muy inestables tecnológicamente hablando, por lo que la tendencia general de la industria alimentaria es reducir el contenido de éstos.

La síntesis de ácido linoleico está controlada por la actividad FAD2, enzima que utiliza 18:1-PC como sustrato y es responsable de su desaturación a 18:2-PC. La síntesis de ácido linolénico, por su parte, es controlada por la actividad FAD3, enzima que actúa sobre 18:2-PC para formar 18:3-PC (Figura 13). Las modificaciones obtenidas mediante técnicas clásicas de cruzamiento y selección, mutagénesis y/o ingeniería genética recaen principalmente sobre la actividad de FAD2, ya que la cantidad de ácido linolénico también está regulada por esta enzima (Hitz *et al.*, 1995; Kinney, 1996; Chapman *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002a, 2002b; Haun *et al.*, 2012).

Por regla general, un descenso de estos PUFAs lleva consigo un aumento de los niveles de ácido oleico, si bien el contenido del resto de ácidos grasos no se modifica de manera apreciable y no aparecen nuevos ácidos grasos derivados del proceso de obtención.

En la Tabla 4 se recogen algunas variedades de aceites vegetales cuya composición de ácidos grasos poliinsaturados ha sido modificada, con el objetivo de aumentar su estabilidad.

4.4.1.2 Modificación en el contenido de MUFAs

El ácido graso monoinsaturado mayoritario en aceites vegetales es el ácido oleico (18:1). Como se comentó en anteriores apartados, este ácido graso no sólo contribuye al aumento del valor nutricional de los aceites, sino que además es muy estable a altas temperaturas, por lo que se pretende aumentar su contenido en aceites vegetales.

La cantidad de ácido oleico está controlada por la actividad de SAD, enzima que utiliza 18:0-ACP como sustrato y es responsable de su desaturación a 18:1-ACP (Figura 13). Sin embargo, las modificaciones obtenidas mediante técnicas clásicas de cruzamiento y selección, mutagénesis y/o ingeniería genética recaen principalmente sobre la actividad de la ya mencionada FAD2 y/o FatB (Hitz *et al.*, 1995; Kinney, 1996; Lacombe *et al.*, 2009).

Por regla general, un aumento de ácido oleico lleva consigo un descenso de los niveles de ácidos grasos poliinsaturados, si bien el contenido del resto de ácidos grasos no se modifica de manera apreciable y no aparecen nuevos ácidos grasos derivados del proceso de obtención.

En la Tabla 4 se recogen algunas variedades de aceites vegetales cuya composición de ácidos grasos monoinsaturados ha sido modificada con el objetivo de aumentar su estabilidad y valor nutricional.

4.4.1.3 Modificación en el contenido de AGs saturados

Los ácidos grasos saturados encontrados en aceites vegetales son por lo general los ácidos palmítico (16:0) y esteárico (18:0). Como se comentó en anteriores apartados, estos ácidos grasos hacen a los aceites que los contienen muy estables tecnológicamente hablando, aunque desde el punto de vista nutricional

el palmítico no es deseable en función de la posición que ocupe en el TAG, por lo que la tendencia general de la industria alimentaria es aumentar el contenido de éstos, con el fin último de acaparar las posiciones primarias *sn*-1 y *sn*-3 del TAG.

La cantidad de ácido palmítico en el aceite está principalmente controlada por el balance de las actividades de dos enzimas clave que utilizan 16:0-ACP como sustrato: KASII/KASI, responsables de la elongación de 16:0-ACP a 18:0-ACP, y la tioesterasa FatB, responsable de la liberación de 16:0 desde el plastidio para su incorporación a TAG (Figura 13). El nivel de ácido esteárico, por su parte, es controlado por la actividad de SAD, en combinación con la actividad de las tioesterasas que actúan sobre 18:0-ACP (Figura 13). Las modificaciones obtenidas mediante técnicas clásicas de cruzamiento y selección, mutagénesis y/o ingeniería genética 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).

Por regla general, un aumento de ácido esteárico lleva consigo un descenso de los niveles de ácido oleico, si bien el contenido del resto de ácidos grasos no se modifica de manera apreciable y no aparecen nuevos ácidos grasos derivados del proceso de obtención. Por el contrario, un incremento en el contenido del ácido palmítico suele ir asociado con un incremento en ácidos grasos derivados de éste como son el palmitoleico (16:1) y el aslépico (18:1 Δ 11).

En la Tabla 4 se recogen algunas variedades de aceites vegetales cuya composición de ácidos grasos saturados ha sido modificada con el objetivo de aumentar su estabilidad y valor nutricional.

Tabla 4. Composición en ácidos grasos modificados de los principales aceites vegetales usados en la industria alimentaria.

Modificado de Martínez-Force y Garcés, 1999 y Tarrago-Trani *et al.*, 2006.

		Composición AG (mol%)					Referencia
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	
Soja		11	4	23	54	8	Dyer <i>et al.</i> , 2008
LPUFAs	IG	10	3	20	65	1	Hitz <i>et al.</i> , 1995
HO	IG	8	3	84	3	1	Kinney, 1996
HE	M	9	26	18	39	8	Rahman <i>et al.</i> , 1995
LP	M	4	3	25	58	8	Liu <i>et al.</i> , 2002a
HP	M	25	4	16	44	10	Hammond y Ferh, 1984
Canola^a		4	2	60	21	10	Dyer <i>et al.</i> , 2008
LPUFAs	M	4	2	80	4	5	Auld <i>et al.</i> , 1992
HO	IG	3	1	88	3	4	Hitz <i>et al.</i> , 1995
HE	IG	4	28	15	20	23	Knutzon <i>et al.</i> , 1992
HP	IG	27	3	29	23	14	Jones <i>et al.</i> , 1995b
Girasol		7	5	19	68	<1	Dyer <i>et al.</i> , 2008
MO	MC	4	4	66	25	<1	Kleingartner, 2002
HO	M	4	4	91			Garcés <i>et al.</i> , 1989
HE	M	5	26	14	55	<1	Osorio <i>et al.</i> , 1995
HPHO	M	31	2	56	3		Fernández-Martínez <i>et al.</i> , 1997
HP	M	25	3	11	55		Osorio <i>et al.</i> , 1995
Algodón		24	3	19	53	<1	Gunstone y Harwood, 2007
MO	IG	25	2	40	33	<1	Chapman <i>et al.</i> , 2001
HO	IG	15	2	78	4	<1	Liu <i>et al.</i> , 2002a
HE	IG	15	40	4	39	<1	Liu <i>et al.</i> , 2002a
Cártamo		7	3	18	71	<1	Fernández-Martínez <i>et al.</i> , 1993
HO	M	5	2	78	14	<1	Fernández-Martínez <i>et al.</i> , 1993
HP	M	28	4	13	6	43	Rowland <i>et al.</i> , 1990

^a Canola es el derivado de colza (*Brassica napus*), con bajo contenido en ácido erúxico (22:1) y glucosinolatos, usado en la actualidad.

Método usado para modificar la línea: IG: ingeniería genética | M: mutagénesis | MC: mejora clásica.

Fenotipos: LPUFAs: bajo PUFAs | HO: alto oleico | MO: medio oleico | HP: alto palmítico | HPHO: alto palmítico/alto oleico | MP: medio palmítico | LP: bajo palmítico | HE: alto esteárico | LE: bajo esteárico.

Ácidos grasos: 16:0: ácido palmítico | 18:0: ácido esteárico | 18:1: ácido oleico | 18:2: ácido linoleico | 18:3: ácido linolénico.

4.4.2 Modificación en la distribución de ácidos grasos en TAGs

Como se ha mencionado anteriormente, la composición de ácidos grasos, su disponibilidad y su distribución en las distintas especies de TAGs determinan las propiedades físico-químicas y nutricionales de los aceites y dependen en última instancia de la especificidad por sustrato de las aciltransferasas que las sintetizan, principalmente las que forman parte de la ruta de Kennedy: GPAT, LPAAT y DAGAT.

En el caso de GPAT de plantas, no ha sido posible identificar hasta la fecha ningún gen para la isoforma microsomal. Sólo en el caso de *Arabidopsis thaliana*, la cual presenta hasta ocho isoformas plastidiales relacionadas con la síntesis de cutina y suberina (Li-Beisson *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012), se cree haber encontrado una novena isoforma presumiblemente microsomal y, por consiguiente, relacionada directamente con la biosíntesis de TAGs, GPAT9 (Gidda *et al.*, 2009). Por contra, la isoforma plastidial de GPAT ha sido bien estudiada en varias especies vegetales (Frentzen y Wolter, 1998; Jain *et al.*, 2000).

Las LPAAT de plantas, por su parte, presentan una mayor preferencia por AGs insaturados de C₁₈, por lo que una de las principales características de los aceites vegetales, a excepción de algunos tropicales tales como palma y coco (Gunstone y Harwood, 2007), es el bajo contenido de AGs saturados en la posición central *sn*-2 de TAG. Esta especificidad por sustrato se mantiene incluso cuando se elevan los contenidos de ácido esteárico en determinadas líneas de girasol HE, manteniéndose las proporciones de éste entre las distintas posiciones de la molécula TAG (Fernández-Moya *et al.*, 2005). No obstante, los genes LPAAT han demostrado ser útiles para aumentar la acumulación de determinados AGs inusuales en la posición central *sn*-2 de TAGs en cultivos oleaginosos, como el ácido erúrico (Lassner *et al.*, 1995; Brough *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2012) o el ácido láurico (Knutzon *et al.*, 1999).

Como ya mencionamos, DAGAT ejerce a su vez una fuerte influencia sobre la cantidad y composición de los TAGs sintetizados en el desarrollo de semillas (Katavic *et al.*, 1995; Settlage *et al.*, 1998; Routaboul *et al.*, 1999; Zou *et al.*, 1999; Bouvier-Nave *et al.*, 2000; Jako *et al.*, 2001; Slabas *et al.*, 2001; Lung y Weselake, 2006; Lardizabal *et al.*, 2008, 2010; Xu *et al.*, 2008; Yen *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2008; Lock *et al.*, 2009; Snyder *et al.*, 2009; Weselake *et al.*, 2009), presentando un amplio rango de afinidad por distintos ácidos grasos.

En líneas generales, las especies de AGs insaturados están presentes principalmente en la posición central *sn*-2 del glicerol, mientras que las especies saturadas quedan relegadas a las posiciones primarias *sn*-1 y *sn*-3 (Miquel y Browse, 1995). A pesar de que un subconjunto limitado de estas especies moleculares a menudo predomina (Brockerhoff, 1971; Fatemi *et al.*, 1977; Burgal *et al.*, 2008), la variedad de ácidos grasos presentes en un determinado aceite vegetal lleva a la producción de una población heterogénea de moléculas TAGs difícil de caracterizar. Para tal fin se han venido desarrollando distintas *técnicas analíticas* y *teorías matemáticas* que, en combinación, permiten a día de hoy determinar en mayor o menor grado la calidad de un aceite en función de su uso, así como la posibilidad de compararlo con otros de distinta composición.

Entre estas técnicas analíticas cabe destacar el análisis en la composición de ácidos grasos, considerada la más útil a la hora de caracterizar dicha población de TAGs. Sin embargo, en algunos casos, esta técnica no es suficiente para distinguir entre dos aceites diferentes o una mezcla de ellos. Esto ocurre, principalmente, en algunos aceites vegetales que tienen un perfil similar de ácidos grasos, por ejemplo entre aceites ricos en ácido linoleico (girasol, cártamo y maíz), aceites ricos en ácido oleico (oliva, alto oleico de girasol, y alto oleico de cártamo) o entre muchos nuevos tipos de aceites vegetales genéticamente modificados (Martínez-Force y Garcés, 1999; Hazebroek, 2000). Para caracterizar mejor y discriminar entre estos aceites es necesario analizar el perfil de TAGs por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o por cromatografía gas-líquido (GLC) (Reske *et al.* 1997; Fernández-Moya *et al.* 2000a). Alternativamente, en algunos casos, la composición en ácidos grasos en la posición central *sn*-2 de TAGs puede ser analizada usando lipasas específicas (Luddy *et al.* 1964); este

enfoque ha sido utilizado también para caracterizar ciertos aceites vegetales (Reske *et al.* 1997; Álvarez-Ortega *et al.* 1997). Más recientemente, se han puesto a punto nuevas técnicas para el análisis estereoespecífico de TAGs, haciendo posible la determinación del contenido en ácidos grasos en las tres posiciones (Laakso *et al.*, 1990; Takagi y Ando, 1991). Sin embargo, estas técnicas, pese a permitir diferenciar no sólo aceites de diferentes cultivos (Santinelli *et al.* 1992; Reske *et al.* 1997; Harp y Hammond, 1998) sino también de diferentes localizaciones y condiciones medioambientales (Fatemi *et al.* 1977; Damiani *et al.* 1997), resultan ser complejas, difíciles de utilizar de manera rutinaria y con resultados a veces contradictorios.

Entre las teorías propuestas para explicar la distribución estereoquímica de los ácidos grasos en TAGs, la teoría 1,3-random-2-random (Van der Wal, 1960) se convirtió en la más ampliamente aceptada. Ésta se basa en una distribución al azar y simétrica de los AGs saturados en las posiciones estereoquímicas *sn*-1 y *sn*-3 de TAG. Aplicando esta teoría es posible calcular con bastante precisión las especies de TAGs presentes en un aceite a partir de los contenidos de TAGs y de ácidos grasos en la posición central *sn*-2. No obstante, y gracias al uso de análisis estereoespecíficos de las tres posiciones *sn*-, se ha vuelto evidente que en la mayoría de los aceites de origen vegetal dicha distribución de AGs no es al azar ni totalmente simétrica, por lo que no es posible aplicar dicha teoría. Por ejemplo, el contenido en ácido oleico en la manteca de cacao es mayor en la posición *sn*-1 que en la *sn*-3 de los TAGs (Takagi y Ando, 1995; Gunstone y Harwood, 2007) y es prácticamente el mismo en el aceite de oliva (Santinelli *et al.* 1992; Damiani *et al.* 1997). Además, el ácido esteárico se encuentra predominantemente en la posición *sn* -3 de los TAGs en el aceite de girasol (Reske *et al.*, 1997) y en el aceite de oliva (Santinelli *et al.*, 1992; Damiani *et al.* 1997), pero está distribuido uniformemente en ambas posiciones en la manteca de cacao (Takagi y Ando, 1995). Efectivamente, también existen diferencias entre los contenidos de ácidos grasos en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 entre diferentes variedades de un mismo cultivo o en aquellas cultivadas bajo diferentes condiciones medioambientales. Sin embargo, las asimetrías características son siempre mantenidas, es decir, se mantiene la tendencia por un ácido graso específico a ser encontrado en una posición *sn*- en particular (Fatemi *et al.* 1977; Damiani *et al.* 1997).

4.4.2.1 Coeficiente de asimetría α Sat

El coeficiente de asimetría α Sat surge de la necesidad de poder integrar toda la información proveniente del análisis de las distintas especies TAGs presentes en aceites vegetales. Este coeficiente permite calcular la distribución relativa de los AGs saturados entre las posiciones primarias $sn-1$ y $sn-3$ en los TAGs a partir del contenido total de AGs saturados (S) de los TAGs, así como el contenido de los AGs saturados en la posición $sn-2$ (S_2) y las diferentes especies moleculares de TAGs: (α SUS/SUU) (Martínez-Force *et al.*, 2004).

El valor de α Sat oscila entre 0, cuando una de las posiciones primarias contiene el 100% de los AGs saturados, y 0,5, cuando las dos posiciones tienen el mismo contenido en AGs saturados, o lo que es lo mismo, una distribución simétrica en consonancia con la teoría de Van der Wal (Van der Wal, 1960). Valores inferiores a 0,5 implica que hay más AGs saturados en la posición $sn-1$ que en $sn-3$, o viceversa. Así, un valor de α Sat = 0,33 representaría que el 33% de los AGs saturados se encuentran en una posición y el 67% en la otra, sin distinguir entre éstas. Igualmente no es de extrañar que cuando el contenido de AGs saturados del aceite es muy alto, α Sat tiende a ser próximo a 0,5 debido a que todo el sistema enzimático está completamente ocupado de AGs saturados (Fernández-Moya *et al.*, 2005).

Como hemos visto hasta ahora, la distribución de estos AGs saturados entre las posiciones $sn-1$ y $sn-3$ de los TAGs de un aceite es particularmente relevante de cara a sus posibles usos industriales. Cuando la asimetría aumenta, la cantidad de TAGs disaturados (SUS) se reduce y, en consecuencia, el valor α Sat también se ve disminuido. Esto es exactamente lo que se observa en los aceites de girasol, concretamente en aquéllos con más de un 12% de ácido esteárico (Fernández-Moya *et al.* 2000b). A efectos prácticos, cuanto más bajo sea el valor α Sat, peor serán las propiedades plásticas de ese aceite. El máximo de especies SUS, aquéllas que tienen buenas propiedades plásticas para la elaboración de margarinas, pastelería, panadería, etc, se obtendrían cuando α Sat alcanzase el valor de 0,5. De esta forma, este coeficiente permite atribuir a cada aceite un valor α Sat específico en función de su composición, por lo que se puede emplear

Introducción

como método de selección añadido a los criterios ya mencionados a la hora de considerar un determinado aceite como apto o no para un determinado uso, diferenciándolo del resto de aceites.

No obstante, es importante señalar que los datos obtenidos utilizando el coeficiente de asimetría α_{Sat} , no son totalmente comparables con un análisis estereoespecífico. Por ejemplo, el contenido en AGs saturados en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 en soja fue muy similar cuando se determinó en cada posición estereoquímica del TAG (Reske *et al.* 1997; Harp y Hammond, 1998). Sin embargo, el coeficiente α_{Sat} del aceite fue 0,29, indicando que los AGs saturados se distribuían asimétricamente. Estas discrepancias surgen porque, a diferencia del coeficiente α_{Sat} , que es calculado a partir de la composición de TAGs, el análisis estereoquímico considera las tres posiciones como independientes. Como consecuencia de esta asimetría, el contenido de la subclase SUS es menor del esperado y hay más SUU presente. El coeficiente α_{Sat} por tanto no distingue entre las posiciones *sn*-1 y *sn*-3. Como se ha indicado anteriormente, éste es un coeficiente de asimetría, no un análisis estereoquímico. Sin embargo, en la mayoría de aceites con una distribución asimétrica ya se ha identificado, por análisis estereoquímicos tradicionales, la posición *sn*- con la menor proporción de un ácido graso en concreto y es siempre la misma. Por ello, y si así fuera necesario, se podría asumir qué posición tiene el menor valor para ese ácido graso en particular.

5. ACEITE DE GIRASOL

5.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

El aceite de girasol es un excelente aceite comestible que posee un alto contenido en AGs insaturados (85-91%), representados en su mayor parte por los ácidos oleico y linoleico. En la mayoría de los casos, el aceite de girasol es rico en ácido linoleico, ya que representa del 50% al 70% del total, mientras que el ácido oleico suele suponer del 15 al 45 % de todos los ácidos grasos del aceite (Tabla 5); el hecho de que prácticamente no tenga ácido linolénico le proporciona una razonable estabilidad oxidativa (Murphy, 1993; Fernández-Moya *et al.*, 2005).

El 98-99% de este aceite está formado por acilglicéridos, siendo el 95% TAGs; el resto son sustancias que se pueden agrupar con el término genérico de “insaponificable” (ceras, mucílagos, carbohidratos, esteroides y tocoferoles). Los fosfolípidos mayoritarios, que suponen un 2% del aceite total, son PC (48,7%), PI (27,9%), PE (21,2%) y PA (2,2%) (Chapman, 1980; Salas *et al.*, 2006). Por último, el contenido de AGs libres se estima en un 0,5%, al igual que en otras semillas oleaginosas (Campbell, 1983), por lo que la composición de ácidos grasos de los TAGs es prácticamente igual a la del aceite.

En la Tabla 6 se representan los porcentajes de las distintas especies de TAGs mayoritarios en un aceite de girasol estándar (RHA-274), con aproximadamente un 87% conteniendo al menos un ácido linoleico. Los TAGs restantes no llegan a representar un 20% (Fernández-Moya *et al.*, 2005). En general, el 97% de las especies TAGs presentes en el aceite de girasol estándar (RHA-274) están formadas por las subclases UUU y SUU, siendo casi el 3% restante SUS; no hay presencia de especies de la subclase SSS y el valor α Sat de 0,27 alcanzado se aleja del valor 0,5 deseado (Tabla 7).

El aceite de girasol presenta una serie de características físico-químicas que lo sitúa entre los mejores aceites vegetales, a lo que se suma la presencia de vitaminas liposolubles, esteroides (α -tocoferol, β -tocoferol y γ -tocoferol), lecitinas, y otros componentes que contribuye de manera notable a aumentar su valor

nutritivo (Vrânceanu, 1977; Gunstone *et al.*, 2007; Grompone, 2011). No obstante, y en línea a todo lo anteriormente descrito, el aceite de girasol ha sido también susceptible de ser modificado con vistas a aumentar su calidad en función de su uso (Garcés *et al.*, 2009).

5.2 OBTENCIÓN DE MUTANTES CON COMPOSICIÓN MODIFICADA DE ACEITE

En el caso del girasol son varios los mutantes obtenidos con modificaciones en los lípidos de semilla. El primer mutante de girasol se obtuvo en Rusia utilizando como agente mutagénico el dimetilsulfato (DMS), que originó la primera variedad alto oleico (70-75%) (Soldatov, 1976). A partir de esta línea, llamada Pervenets, derivan todas las líneas alto oleico que existen en la actualidad, algunos con hasta el 90 % de este ácido graso (Garcés *et al.*, 1989; Pleite *et al.*, 2006a; Garcés *et al.*, 2009). La introducción en el mercado y comercialización del aceite de girasol alto oleico supuso un gran avance en cuanto a la mejora de la calidad de los aceites comestibles y muestra con qué facilidad se pueden modificar las características de estos aceites.

Posteriormente, en respuesta a la demanda de grasas que se adecuen a los requerimientos técnicos para la elaboración de los alimentos, se ha obtenido en el Instituto de la Grasa (CSIC) una colección de líneas de girasol con composición de ácidos grasos modificada, la llamada *Collection Andalusian Sunflower* (CAS). Algunas de estas líneas más importantes, junto a su fenotipo, origen, composición modificada de AGs y distribución en TAGs, así como el contenido de las distintas especies de TAGs, contenido total de AGs saturados (Sat) y sus coeficientes de asimetría α Sat, se resumen en las Tablas 5, 6 y 7.

En términos generales, la modificación de la composición de ácidos grasos en estos aceites de girasol viene marcada por los mismos criterios de selección planteados en Introducción, apartado 4.1. Igualmente, las consecuencias de la modificación de uno u otro ácido graso, así como la/s posible/s enzima/s implicada/s en dichas modificaciones son las mismas que las citadas en Introducción, 4.4.1, según el caso. De estas líneas de girasol cabrían destacar

aquéllas con fenotipo alto esteárico (HE), muy alto esteárico (VHE) y alto oleico (HO), así como la línea CAS-15 alto oleico alto esteárico (HOHE) (Tabla 5).

Por otro lado, los perfiles de TAGs de estos aceites de girasol (Tabla 6) se asemejan a algunos aceites tropicales con alto contenido en TAG disaturados (SUS), en los cuáles esta subclase de TAG representa el 34% del contenido total (Gunstone y Harwood, 2007). Aun así, no llegan a igualarse a aceites como los de cacao, con valores del 70-80%.

Los valores de los coeficientes de asimetría α Sat de estos aceites, así como los datos usados para calcularlos, TAGs disaturados (SUS), monosaturados (SUU) y triinsaturados (UUU), y el contenido total de ácidos grasos saturados (Sat) se muestran en la Tabla 7. Como se puede observar, no hay una relación lógica entre Sat y las especies SUS y SUU; esto se debe al coeficiente α Sat de cada aceite. Cuando la asimetría aumenta, Sat se reduce, produciendo valores bajos de α Sat. Por ejemplo, CAS-19 y CAS-15 tienen contenidos similares de AGs saturados pero valores α Sat muy diferentes, 0,36 y 0,28, respectivamente. Además, el contenido de SUS es mayor en CAS-19 incluso teniendo un contenido de AGs saturados ligeramente inferior. Este coeficiente de asimetría α Sat se ha calculado en otros aceites con alto Sat y es normalmente pequeño, sugiriendo una fuerte distribución asimétrica de los AGs saturados en las moléculas de TAGs (Martínez-Force *et al.*, 2004). Hay que remarcar que las líneas con más ácido oleico tienen los valores α Sat más pequeños (CAS-9, CAS-33 y CAS-15), probablemente porque la selectividad por sustrato en la biosíntesis de TAGs es diferente en el caso de los ácidos oleico y linolénico.

Tabla 5. Composición modificada de ácidos grasos de aceites de líneas de girasol estándares y mutantes, algunas de las cuales pertenecen a la Colección del Instituto de la Grasa. SD < 10%.

Modificado de Martínez-Force y Garcés, 1999; Fernández-Moya *et al.*, 2005 y Tarrago-Trani *et al.*, 2006.

Fenotipo	Origen	Composición AG (mol%)						Referencia	
		16:0	18:0	18:1	18:2	20:0	22:0		
RHA-274	ST	USDA	7,4	5,8	37,3	48,3	0,3	0,9	Martínez-Force <i>et al.</i> , 2004
HA89	ST	USDA	6,9	5,2	18,1	69,8	-	-	Schuppert <i>et al.</i> , 2006
RHA-345	HO	RHA-274 x Pervenets	3,5	4,4	89,1	30,6	-	-	Schuppert <i>et al.</i> , 2006
Pervenets	HO	M	3,9	5,4	88,9	1,8	-	-	Schuppert <i>et al.</i> , 2006
HA-OL9	HO	HA89 x Pervenets	5,2	3,7	88,1	1,5	0,3	1,1	Álvarez-Ortega <i>et al.</i> , 1997
CAS-3	HE	M	7,2	26,3	18,6	45,1	1,4	1,4	Osorio <i>et al.</i> , 1995
CAS-6	ST	IG	5,7	7,5	28,8	56,7	0,4	0,8	Fernández-Moya <i>et al.</i> , 2002
CAS-19	ME	CAS-3 x RHA-274	7,2	21,5	19,9	48,0	1,8	1,6	Pérez-Vich <i>et al.</i> , 2004b
CAS-20	ME	CAS-3 x RHA-274	6,0	10,0	38,3	43,7	0,4	1,6	Pérez-Vich <i>et al.</i> , 2004b
CAS-29	VHE	CAS-3 x CAS-4	7,2	34,5	13,0	41,7	1,8	1,8	Fernández-Moya <i>et al.</i> , 2005
CAS-30	VHE	CAS-3	6,6	30,3	10,2	49,6	1,5	1,8	Fernández-Moya <i>et al.</i> , 2005
CAS-9	HO	HA-OL9 x RHA-274	3,1	5,2	86,2	3,3	0,7	1,5	Fernández-Moya <i>et al.</i> , 2005
CAS-33	HOME	CAS-3 x RHA-345	6,1	17,4	64,1	9,7	1,1	1,7	Fernández-Moya <i>et al.</i> , 2005
CAS-15	HOHE	CAS-3 x RHA-345	5,4	24,9	57,8	8,2	1,8	1,9	Fernández-Moya <i>et al.</i> , 2005

Fenotipo: ST: estándar | HO: alto oleico | HE: alto esteárico | VHE: muy alto esteárico | ME: medio esteárico | HOME: alto oleico medio esteárico | HOHE: alto oleico alto esteárico.

Origen la línea: IG: Instituto de la Grasa | M: mutagénesis | USDA: Departamento de Agricultura de EEUU | _x_: cruzamiento.

Ácidos grasos: 16:0: ácido palmítico | 18:0: ácido esteárico | 18:1: ácido oleico | 18:2: ácido linoleico | 20:0: ácido araquídico | 22:0: ácido behénico.

Tabla 6. Composición en TAGs modificada de aceites de líneas de girasol pertenecientes a la Colección del Instituto de la Grasa. SD < 10%.

Modificado de Martínez-Force *et al.*, 2004; Fernández-Moya *et al.*, 2005.

TAGs	TAG (mol%)									
	RHA-274	CAS-3	CAS-6	CAS-19	CAS-20	CAS-29	CAS-30	CAS-9	CAS-33	CAS-15
POP	0,3	-	-	-	-	-	-	-	0,5	0,5
PLP	0,7	0,8	0,9	0,5	-	0,6	0,5	-	-	-
POE	0,5	2,0	-	1,5	1,2	2,0	1,0	0,4	3,0	4,5
POO	3,0	-	-	0,7	2,8	-	-	6,4	8,7	6,2
PLE	1,2	6,8	1,1	4,8	1,4	6,8	5,8	-	0,9	0,6
POL	7,4	3,4	13,0	3,1	4,9	1,7	1,4	-	0,8	1,4
PLL	6,1	5,1	9,1	4,4	3,0	3,7	4,4	-	0,4	-
EOE	-	3,3	-	3,1	1,3	5,6	2,9	0,5	4,3	10,4
EOO	2,2	3,9	1,2	3,2	6,8	2,1	1,8	11,7	29,5	37,7
ELE	-	11,0	-	10,2	1,2	20,5	17,0	-	1,4	a
OOO	6,4	-	5,1	-	8,3	-	-	70,9	32,5	14,3
EOL	5,2	14,0	6,4	14,7	11,8	13,5	11,5	a	5,1	7,7
OOL	18,9	2,8	15,6	3,8	18,6	-	-	6,6	2,8	4,0
ELL	5,2	25,0	-	23,3	7,8	28,9	34,0	-	3,0	1,2
OLL	26,9	6,7	28,0	10,1	18,8	3,1	4,4	-	1,1	0,8
LLL	14,8	8,3	19,0	11,0	9,4	5,3	9,4	-	-	-
EOA	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	1,5
ELA	-	1,2	-	1,2	-	2,0	1,2	-	-	-
OOA	-	-	-	-	-	-	-	0,9	1,5	2,8
OLA	-	0,8	-	0,8	0,7	0,7	0,8	-	-	0,5
LLA	-	1,3	-	1,1	-	1,1	1,4	-	-	-
EOB	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	1,4
OOB	-	-	-	-	0,8	-	-	2,5	2,8	3,7
ELB	-	0,8	-	0,7	a	1,0	0,6	-	-	-
OLB	0,5	0,8	-	0,8	1,2	0,4	0,5	-	-	0,7
LLB	0,6	0,9	-	1,1	-	0,8	1,2	-	-	-

a: Esta especie de TAG no se separó y se incluyó en la especie de TAG superior.

Ácidos grasos: P: ácido palmítico | E: ácido esteárico | O: ácido oleico | L: ácido linoleico | A: ácido araquídico | B: ácido behénico.

Tabla 7. Especies TAGs, contenido total de ácidos grasos saturados y coeficiente α Sat de aceites de líneas de girasol pertenecientes a la Colección del Instituto de la Grasa.

Modificado de Martínez-Force et al., 2004; Fernández-Moya *et al.*, 2005.

	Especies TAGs (mol%)			Sat	α Sat
	SUS	SUU	UUU		
RHA-274	2,7	30,3	67,0	11,9	0,27
CAS-3	25,9	55,2	17,8	35,7	0,34
CAS-6	2,0	29,7	67,7	11,2	0,19
CAS-19	22,0	53,2	24,9	32,1	0,36
CAS-20	5,1	39,8	55,1	18,0	0,27
CAS-29	38,5	52,9	8,4	45,3	0,36
CAS-30	29,0	57,0	13,8	40,2	0,32
CAS-9	0,9	21,5	77,5	7,8	0,17
CAS-33	11,3	51,2	37,5	26,3	0,26
CAS-15	18,4	61,9	19,1	34,0	0,28

SUS: TAG disaturado | SUU: TAG monosaturado | UUU: TAG triinsaturado | Sat: contenido total de ácidos grasos saturados | α Sat: coeficiente de asimetría α calculado como α SUS/SUU.

5.2.1 Línea de girasol HOHE (CAS-15)

CAS-15 es una línea alto esteárico en fondo alto oleico (HOHE) que se generó a partir del cruzamiento de la línea mutante CAS-3 (HE), previamente obtenida en el Instituto de la Grasa mediante técnicas de mutagénesis e hibridación convencionales, con la línea RHA-345 (HO) obtenida del Departamento de Agricultura de EEUU (USDA), a partir del cruzamiento de la línea estándar RHA-274 (ST) con la línea alto oleico Pervenets (HO) (Fernández-Moya *et al.*, 2005) (Tabla 5).

5.2.1.1 Herencia del carácter HOHE y enzimas implicadas

Para comprender la herencia del carácter HOHE de la línea CAS-15 es preciso conocer la genética de sus parentales.

El alto contenido de ácido esteárico característico de la línea mutante CAS-3 está determinado por dos loci independientes, *Es1* y *Es2*, cada uno de ellos con dos alelos (Pérez-Vich *et al.*, 1999). Estos genes presentan acción aditiva, si bien su contribución al contenido en ácido esteárico no es la misma (Pérez-Vich *et al.*, 2004b). En la línea original RDF-1-532 de la que procede CAS-3, el locus *Es2* se considera inalterado y está presente en forma recesiva, por lo que la alteración genética producida por mutagénesis de CAS-3 radica en una modificación del locus *Es1*, siendo por tanto su genotipo *es1es1es2es2*.

El alto contenido de ácido oleico, en general, presenta mayor complejidad. Los primeros estudios genéticos realizados sobre líneas alto oleico de girasol como Pervenets apuntaban a que un único gen parcialmente dominante (Fick, 1984) o dominante (Urie, 1984), designado como *O1*, controlaba el carácter alto oleico (Fick, 1984). La mutación *O1* segregaba como un único gen dominante en las poblaciones F_2 , en las cuales la progenie se podía asignar inequívocamente a la clase dominante (*O1_*, alto oleico) o la clase recesiva (*o1o1*, bajo oleico) (Fick, 1984; Urie, 1984). Años más tarde, Fernández-Martínez *et al.* (1989) identificaron dos genes adicionales dominantes y complementarios a *O1*, que controlaban también el carácter alto oleico. Los tres genes se denominaron *O1₁*, *O1₂* y *O1₃*. Aquellos fenotipos con alto contenido de oleico en el aceite se correspondían con la presencia de tres alelos dominantes (*O1₁_ O1₂_ O1₃_*), mientras que dos alelos dominantes *O1₁* y *O1₂* con el tercer gen en homocigosis recesiva (*O1₁_ O1₂_ o1₃o1₃*) expresaban niveles intermedios de oleico.

De los datos disponibles en la bibliografía más reciente es posible asignar o especular acerca de la función que los distintos loci *Es1*, *Es2* y *O1* tienen dentro de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos en semillas de girasol.

La cantidad de esteárico disponible en semillas está controlada por la regulación combinada de las enzimas ya mencionadas SAD y TEs (Harwood, 1996) (Figura 13). La caracterización bioquímica del mutante alto esteárico CAS-3 indicó que ambas actividades enzimáticas, SAD y FatB, tioesterasa con mayor afinidad por acil-ACP saturados, estaban implicadas en la determinación del fenotipo mutante alto esteárico (Cantisán *et al.*, 2000). No obstante, y a pesar de que las TEs se expresan durante el desarrollo de las semillas de CAS-3 (Martínez-Force *et al.* 2000), ninguno de los loci polimórficos tiene un efecto significativo sobre el contenido de esteárico, si bien no deberían descartarse la participación de las proteínas FatA y FatB como potenciales candidatas del fenotipo alto esteárico en el mutante CAS-3, junto con la actividad SAD (Pérez-Vich *et al.* 2004b).

La cantidad final de oleico almacenado en la semilla suele estar relacionada con una mayor o menor actividad de la enzima FAD2, la cual desatura oleico a linoleico, aunque también existen otras enzimas que canalizan el tránsito de oleico desde el plastidio hacia PC (Stymne y Stobart, 1987) (Figura 13). En el girasol, existen al menos tres genes codificantes para FAD2, *FAD2-1*, *FAD2-2* y *FAD2-3* (Hongtrakul *et al.* 1998; Martínez-Rivas *et al.* 2001), siendo *FAD2-1* quien lidera la síntesis de ácido linoleico en semillas en desarrollo, ya que su mutación aumenta las concentraciones de ácido oleico en TAGs (Sperling *et al.*, 1990; Garcés y Mancha 1991; Martínez-Rivas *et al.*, 2000, 2001; García-Díaz *et al.*, 2002). Líneas de girasol alto oleico presentan niveles reducidos de actividad FAD2 (Garcés y Mancha, 1989) así como bajos niveles de mRNA del gen *FAD2-1* (Kabbaj *et al.*, 1996; Hongtrakul *et al.*, 1998; Martínez-Rivas *et al.*, 1998; 2001; Lacombe y Bervillé, 2001), el cuál aparece duplicado en estas líneas (Hongtrakul *et al.* 1998). Sin embargo, las regiones codificantes del gen *FAD2-1* son idénticas tanto en líneas de girasol alto oleico como en líneas bajo oleico (Hongtrakul *et al.* 1998), lo que apuntaba a que la mutación *O1* presente en las líneas alto oleico descansase en alguna secuencia reguladora del gen. Actualmente se sabe que dicha mutación consiste en una repetición del gen *FAD2-1* presente en la línea Pervenets y heredada por el resto de líneas alto oleico que provoca un efecto de silenciamiento del RNA, produciendo siRNA de 21 y 24 nucleótidos de tamaño que facilitan la degradación de su mRNA en mayor o menor medida (Lacombe *et al.*, 2001; 2004; 2009; Lacombe y Bervillé, 2001; Schuppert *et al.*, 2006).

El estudio de las relaciones genéticas entre los caracteres HOHE en girasol mediante cruces entre variedades mutantes alto esteárico CAS-3 y mutantes de girasol alto oleico HAOL-9 determinaron que los patrones de segregación para 18:0 y 18:1 se ajustaban a los descritos con anterioridad cuando ambos ácidos grasos se estudiaban de manera independiente (Pérez-Vich *et al.*, 2000). Sin embargo, en la segregación combinada F_2 no se recuperaban las semillas recombinantes HOHE. Además, el análisis de la generación F_3 de esos mismos cruces reveló que aquellas semillas F_2 que tenían las mayores concentraciones de esteárico en fondo alto oleico seguían segregando tanto para 18:0 como para 18:1, lo que los autores explicaron como la existencia de un ligamiento génico entre los alelos *Es2* y *O1* (Pérez-Vich *et al.*, 2000). A pesar de esto, Pérez-Vich *et al.* (2002) no encontraron evidencias directas sobre dicho ligamiento cuando realizaron un análisis de QTLs de los mismos cruces, pero Pérez-Vich *et al.* (2004a) mapearon el locus de la tioesterasa *FatA* en el cromosoma LG1 del genoma de girasol a 36,8 cM del locus *FAD2-1*, y tan solo a 11,4 cM del locus de la SAD. Todo lo cual indica que la herencia del carácter alto 18:0 en girasol es más compleja de lo que en un principio se pensó ya que existía un ligamiento genético entre ambos loci (Ebrahimi *et al.*, 2008).

Con la finalidad de obtener elevados niveles de esteárico en fondos alto oleico, Pérez-Vich *et al.* (2000) propusieron diversas alternativas: i) el uso de aproximaciones bioquímicas y moleculares que suministraran más información sobre la naturaleza de las relaciones existentes entre los caracteres alto esteárico y alto oleico, ii) el análisis de un mayor número de poblaciones segregantes, lo que incrementaría la probabilidad de recuperar el recombinante alto esteárico/alto oleico, o iii) la utilización de otros fondos alto oleico distintos de HAOL-9, que contribuyeran a superar las limitaciones impuestas por el ligamiento *Es2-O1* detectado en su investigación. Finalmente, Pleite *et al.* (2006b) desarrollaron un método de selección eficaz capaz de identificar aquellas líneas alto oleico con alelos para tioesterasas con mayor afinidad por estearil-ACP y, por tanto, mejores parentales para la obtención de líneas mejoradas alto esteárico en fondo alto oleico.

5.2.1.2 Composición de AGs y distribución en TAGs

Como se recoge en la Tabla 5, el contenido de ácido esteárico del aceite extraído de CAS-15 difiere significativamente de los contenidos de esteárico de sus líneas parentales CAS-3 y RHA 345, alcanzando un 24,9%, el doble del contenido de esteárico descrito previamente en fondo alto oleico (Reske *et al.*, 1997). El contenido de ácido oleico, por su parte, se ve disminuido a expensas del aumento en ácido esteárico, siendo éste de 57,8%. En cuanto al resto de ácidos grasos, CAS-15 presenta una proporción reducida y más o menos constante de ácido linoleico, heredada del fondo Pervenets, mientras que los ácidos aráquico y behénico se ven ligeramente modificados en este aceite. Finalmente, no aparecen nuevos ácidos grasos derivados del proceso de obtención.

Como consecuencia de la modificación de la composición de los ácidos grasos, el patrón de especies moleculares TAGs también se ve modificado, no sólo alterándose la cantidad relativa de estas especies, sino también encontrándose en este aceite nuevas especies TAGs. En el caso de CAS-15, la composición de TAGs es totalmente diferente a otras líneas mutantes obtenidas, siendo SOO y OOO las especies principales y desapareciendo casi por completo la cantidad de TAGs compuestos por ácido linoleico (Tabla 6). El contenido de la especie disaturada EOE es del 10,4%, siendo similar al contenido de ELE de su parental CAS-3, mientras que el contenido en POE representa el 4,5% en CAS-15 y el 2,0% en CAS-3 (Fernández-Moya *et al.*, 2005). CAS-15 presenta a su vez dos nuevas especies de TAGs ausentes en las líneas anteriormente estudiadas, EOA y EOB, con contenidos del 1,5 y 1,4%, respectivamente. Estas dos nuevas especies están también presentes en la línea CAS-33, la cual comparte los mismos parentales que CAS-15, aunque con contenidos menores. Por otro lado, su contenido en AGs saturados en la posición central *sn*-2 del TAG aumenta, aunque en este aceite, como en la mayoría de los aceites vegetales y a diferencia de las grasas animales, los AGs saturados están prácticamente excluidos de la posición central *sn*-2 de los TAGs.

El aceite obtenido a partir de la línea CAS-15, al tener un porcentaje incrementado de ácido esteárico y oleico, así como de algunas especies de TAGs,

posee ciertas características físico-químicas que lo convierten en un aceite adecuado para diversos usos en la industria de la alimentación (estado semisólido a temperatura ambiente, mayor estabilidad oxidativa,...). No obstante, y a pesar de la mejora que supone un aumento de un 5,7% de los TAGs del tipo SUS, un incremento del 31,6% de la especie SUU y una reducción del 47,9% de UUU con respecto a la línea estándar RHA-274, CAS-15 presenta un coeficiente de asimetría α Sat de 0,28 (Tabla 7), alejado del deseado 0,5 óptimo requerido por la industria. En otras palabras, el aceite de CAS-15 es apto desde un punto de vista nutricional, pero no desde un punto de vista tecnológico, al no cumplir los criterios de selección ideados para tal fin (Introducción, 4.1). Esto se debe a que las distintas afinidades de las aciltransferasas de girasol implicadas en la distribución de estos ácidos grasos en TAGs favorecen la síntesis de TAGs del tipo SUU, en detrimento de las especies SUS en fondos alto oleico (Martínez-Force *et al.*, 2009). Además, la introducción del carácter alto esteárico en híbridos comerciales produjo un descenso del contenido en esteárico en fondos alto oleico, obteniéndose en campo valores medios del 14-15% (comunicación personal ADVANTA SEEDS).

Las técnicas rápidas de análisis de la composición de ácidos grasos y TAGs de aceite de girasol, como la desarrollada por Ruiz-López *et al.* (2003), los datos de la composición de ácidos grasos en la posición *sn*-2 y el correspondiente coeficiente de asimetría α Sat calculado a partir de esta información permitirán seleccionar alelos de aciltransferasas que presenten diferencias en su especificidad por los distintos ácidos grasos, como ya lo hiciera el coeficiente saturado en la selección de alelos de tioesterasas con alta afinidad por estearil-ACP en líneas mutantes alto oleico (Pleite *et al.*, 2006a). Esta capacidad de seleccionar nuevos haplotipos ayudará a la producción de nuevos aceites con distribuciones de TAGs modificadas y propiedades diferentes para determinados usos, posibilitando el empleo de éstos como una fuente fiable de EOE para la elaboración de equivalentes de manteca de cacao (CBEs). Esto permitirá revalorizar aún más el aceite de girasol HOHE, que actualmente se comercializa ya como un aceite saludable y estable para fritura bajo la marca Nutrisun® (www.nutrisunoil.com) (Dubinsky y Garcés, 2011).

OBJETIVOS | 73-76

BLOQUE I: CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ENZIMÁTICA DE LAS ACILTRANSFERASAS IMPLICADAS EN LA BIOSÍNTESIS DE TRIACILGLICÉRIDOS EN GIRASOL	75
BLOQUE II: ANÁLISIS DE TRIACILGLICÉRIDOS (TAGs) EN LÍNEAS MUTAGENIZADAS DE GIRASOL ALTO OLEICO ALTO ESTEÁRICO (HOHE) Y SELECCIÓN DE NUEVOS CANDIDATOS	76

Esta Tesis Doctoral se enmarca dentro de la caracterización de la ruta biosintética de triacilglicéridos en semillas de girasol que el Grupo de Genética y Bioquímica de Lípidos de Semillas (GGBLS) del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Productos Vegetales del Instituto de la Grasa (CSIC) está llevando a cabo desde el año 1995.

Este trabajo se divide en dos bloques principales, dos estrategias complementarias que persiguen la obtención de nuevos aceites de girasol con composición modificada de lípidos requeridas por la industria.

El *primer bloque* consiste en el estudio genético y bioquímico de dos de las tres aciltransferasas implicadas en la ruta de biosíntesis de TAGs en semillas en desarrollo de girasol. Los resultados de estos estudios nos proporcionarán la información necesaria para en un futuro desarrollar nuevas estrategias de ingeniería genética basadas en las afinidades por sustrato de estas enzimas que permitan modificar la distribución de ácidos grasos en TAGs y así obtener nuevos aceites de girasol. Este primer bloque se resume en los siguientes objetivos específicos:

1. Clonación y caracterización de los genes que codifican para las actividades lisofosfatidato aciltransferasa (LPAAT) en semillas en desarrollo de girasol.
2. Clonación y caracterización de los genes que codifican para las actividades diacilglicerol aciltransferasa (DAGAT) en semillas en desarrollo de girasol.

Objetivos

El *segundo bloque* se enmarca dentro del estudio de mutantes con composición modificada de ácidos grasos obtenidos mediante técnicas de mutagénesis e hibridación convencionales. Mediante una serie de criterios de selección, este estudio nos permitirá obtener líneas de girasol con una composición mejorada de TAGs. Este segundo bloque se resume en el siguiente objetivo específico:

3. Obtención y selección de nuevos mutantes a partir de una población segregante alto oleico alto esteárico (HOHE) que contengan una mayor proporción de TAGs del tipo SUS, ya sea debido a un incremento en el contenido de ácido esteárico o una mejor distribución de los AGs saturados en los TAGs y, en consecuencia, valores α Sat próximos al 0.5 óptimo.

MATERIALES Y MÉTODOS | 77-154

1. MATERIALES	79
1.1 APARATOS Y MATERIALES	79
1.2 REACTIVOS Y QUÍMICOS	80
1.3 ENZIMAS Y KITS	81
1.4 MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CULTIVO	81
1.5 MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES NUTRITIVAS	91
1.6 ANTIBIÓTICOS	93
1.7 TAMPONES Y SOLUCIONES	95
1.8 OLIGONUCLEÓTIDOS	98
1.9 PLÁSMIDOS Y VECTORES DE EXPRESIÓN	99
2. MÉTODOS	102
2.1 BIOLOGÍA MOLECULAR	102
2.2 BIOQUÍMICA	133
2.3 BIOINFORMÁTICA	142
2.4 BIOESTADÍSTICA	144
2.5 DISEÑO EXPERIMENTAL Y CRITERIOS DE SELECCIÓN LÍNEA HOHE	150

1. MATERIALES

1.1 APARATOS Y MATERIALES

Aparato	Modelo	Compañía
Agitador magnético con calefacción	AG-2	Raypa, España
Agitador tipo vórtex	MS2	IKA®, Alemania
Autoclaves	Presoclave 75L 2540 ML	JP Selecta®, España Tuttnauer, Holanda
Balanza analítica	TE 313 S	Sartorius, Alemania
Balanza analítica de precisión	AL54	Mettler Toledo, España
Baños termostáticos	Biocold SWB SW22 Unitronic 320 OR	JP Selecta®, España Stuart Scientific®, Reino Unido Julabo, Alemania JP Selecta®, España
Baño sonicador ultrasonido	Ultrasons	JP Selecta®, España
Cabina flujo laminar vertical	FASTER TWO 30	Cultek, España
Cámara cultivo	APT.line™ KBW	Binder, Alemania
Centrífuga	Sorvall RC5C	Thermo Scientific, EEUU
Concentrador de muestras	DB-3D	Techne, Reino Unido
Contador líquido de centelleo	LS-6500	Beckman Coulter™, EEUU
Cromatógrafos de gases (GC)	Clarus 500 6890	PerkinElmer, EEUU Agilent, EEUU
Desionizador	S8000P	Station, EEUU
Espectrofotómetro	Ultrospec 3300 pro	Amersham-Biosciences, EEUU
Incubadores orbitales	Ecotron SI50	Infors HT, Suiza Stuart Scientific®, Reino Unido
Lupa binocular estéreo	ST-30-2LF	Optika, Italia
Microcentrífugas	5415R 5810R Heraeus Pico Spectrafuge 24D	Eppendorf, Alemania Eppendorf, Alemania Thermo Scientific, EEUU Labnet, EEUU
Microscopio óptico	SZM-2	Optika, Italia
Mini-BeadBeater	8	Biospec, EEUU
NanoDrop	2000	Thermo Scientific, EEUU
pH-metro	Inolab 720	WTW, Alemania
Rotavapor	VWR	IKA®, Alemania
Rotores	A-4-62 Sorvall GSA Sorvall SS-34 70iTi	Eppendorf, Alemania Thermo Scientific, EEUU Thermo Scientific, EEUU Beckman Coulter™, EEUU
Sistemas de electroforesis horizontal	Power-Pac Basic Power-Pac 300 Sub-Cell® GT	Bio-Rad, EEUU Bio-Rad, EEUU Bio-Rad, EEUU
Termobloque	Digital Heatblock	VWR™, EEUU
Termocicladores	MJ Mini™ Gradient Mini Opticon™ RT-PCR TGradient	Bio-Rad, EEUU Bio-Rad, EEUU Biometra®, Alemania
Transiluminador	Chemi Genius ² TFX-20M	Syngene, Reino Unido Vilber Lourmat, Alemania
Ultracentrífuga	L8-70M	Beckman Coulter™, EEUU

Tabla 8. Aparatos usados en este trabajo.

Tabla 9. Materiales usados en este trabajo.

Material	Modelo	Compañía
Cámaras de placas TLC		CAMAG, Alemania
Cinta porosa	3M	Micropore, EEUU
Cubetas electroforesis		Bio-Rad, EEUU
Glass beads	0.5mm	Sigma-Aldrich, EEUU
Filtros de jeringa (acetato de celulosa)	Minisart® 16534-K	Sartorius, Alemania
Material de vidrio		Pyrex, Reino Unido
Microcubetas densidad óptica		Hellma Analytics, Alemania
Pipetas	P10,20,200,1000,5000	Eppendorf, Alemania
Pipetas Pasteur	150mm	VWR™, EEUU
Placas de gel de sílice TLC	20x20cm	Merck Millipore, Alemania
Placas de polipropileno		Stratagene®, Alemania
Placas de Petri		
Tubos de metilar y viales de centelleo		

1.2 REACTIVOS Y QUÍMICOS

Tabla 10. Reactivos y químicos usados en este trabajo.

Reactivo / Químico	Compañía
Bromuro de etidio	Sigma-Aldrich, EEUU
Componentes medios cultivo y agarosa	Pronadisa, España
Compuestos radiactivos	GE Healthcare, EEUU
Disolventes orgánicos, ácidos y bases	Panreac, España
Ficoll 400, PEG 4000	Fluka, EEUU
Fungicida sistémico Previcur® N	Bayer, Alemania
Gases y N ₂ líquido	Carburos Metálicos y Air Liquide, España
IPTG, X-Gal, tampón de carga, RNasa A, marcadores de tamaño y peso molecular para DNA y dNTPs	Fermentas, EEUU
Líquido de centelleo Ecoscint™ H	National Diagnostics, EEUU
Medio Murashige-Skoog (MS)	Duchefa, Holanda
PMSF y cóctel inhibidor de proteasas de levaduras	Sigma-Aldrich, EEUU
Reactivo de Bradford	Bio-Rad, EEUU
Sales inorgánicas y DPM	Merck Millipore, Alemania
Silwet L-77	Momentive, EEUU
SYBR® Green	Qiagen, Alemania
Tampones orgánicos, sales orgánicas, metabolitos, enzimas, detergentes, compuestos orgánicos, aminoácidos y antibióticos	Sigma-Aldrich, EEUU
YNB sin aminoácidos	BD Difco™, EEUU

Para biología molecular, así como para la preparación de medios de cultivo, se utilizó agua de grado Milli-Q, purificada mediante un sistema de cartuchos de purificación de agua Millipore. El agua empleada en los experimentos de bioquímica estaba purificada mediante ósmosis inversa y posteriormente desionizada mediante un desionizador modelo S8000P (Station, EEUU).

1.3 ENZIMAS Y KITS

Las distintas enzimas y kits utilizados en este trabajo, de no especificarse lo contrario, fueron adquiridas a las siguientes compañías:

Ambion (EEUU), Amersham-Biosciences (EEUU), Amersham-Pharmacia (EEUU), Bio-Rad (EEUU), Boehringer Ingelheim (Alemania), Clontech (Japón), Ecogen (España), Invitrogen (EEUU), Macherey-Nagel (Alemania), Mbiotech (EEUU), New England Biolabs (Reino Unido), Qiagen (Alemania). Stratagene® (Alemania).

1.4 MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CULTIVO

1.4.1 *Escherichia coli*

Durante el desarrollo de este trabajo se han utilizado diferentes estirpes de *E. coli*, empleadas en los procesos de clonación (Materiales y Métodos, 2.1.8.1) (Tabla 11).

Tabla 11. Estirpes de *E. coli* usadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo ^a	Compañía	Referencia
XL1-Blue	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ $endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1$ $lac [F'proAB, lacIq\Delta M15, Tn10 (tetr)]$	Invitrogen, EEUU	Bullock <i>et al.</i> , 1987
DH5- α	$F-, deoR recA1 endA1 hsdR17 (rk- mk+)$ $supE44\lambda thi-1 gyrA96 relA1$	Invitrogen, EEUU	Hanahan, 1983

^a La descripción de cada genotipo se encuentra en la tabla I, sección abreviaturas.

1.4.1.1 Condiciones de cultivo

Las bacterias se incubaron a 37°C durante 16h. Los cultivos en medio sólido se crecieron en placas de Petri selladas con película autosellante (Parafilm), mientras que los cultivos líquidos lo hacían en tubos estériles con agitación continua en incubadores orbitales a 200 rpm.

Los medios de cultivo empleados se describen en el Materiales y Métodos, 1.5.1.

1.4.1.2 Recogida de material biológico

Todas las estirpes usadas con las construcciones pertinentes se almacenaron en glicerol:

Stocks de glicerol: Se tomaron 500 µL de cultivo fresco en 500 µL de solución de glicerol estéril 40% (p/v) (Materiales y Métodos, 1.7.1.6).

Todos los stocks se congelaron directamente en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso.

1.4.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Durante el desarrollo de este trabajo se ha utilizado la estirpe GV3101/pMP90 de *A. tumefaciens*, empleada en los procesos de agroinfiltración en *Arabidopsis thaliana* (Materiales y Métodos, 2.1.8.4.2) (Tabla 12).

Tabla 12. Estirpe de *A. tumefaciens* usada en este trabajo.

Estirpe	Genotipo ^a	Compañía	Referencia
GV3101/pMP90	<i>rpoH⁺ hrcA⁺</i>	Invitrogen, EEUU	Koncz and Schell, 1986

^a La descripción de cada genotipo se encuentra en la tabla I, sección abreviaturas.

1.4.2.1 Condiciones de cultivo

Las bacterias se incubaron a 28°C durante 16h. Los cultivos en medio sólido crecieron en placas de Petri selladas con película autosellante (Parafilm), mientras que los cultivos líquidos lo hacían en tubos o matraces Erlenmeyer estériles con agitación continua en incubadores orbitales a 200 rpm.

Los medios de cultivo empleados se describen en Materiales y Métodos, 1.5.2.

1.4.2.2 Recogida de material biológico

Todas las estirpes usadas con las construcciones pertinentes se almacenaron en glicerol:

Stocks de glicerol: Se tomaron 500 µL de cultivo fresco en 500 µL de solución de glicerol estéril 40% (p/v) (Materiales y Métodos, 1.7.1.6).

Todos los stocks se congelaron directamente en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso.

1.4.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Durante el desarrollo de este trabajo se han utilizado la estirpe silvestre W303-1A y el cuádruple mutante H1246 de *S. cerevisiae*, empleados en los procesos de expresión heteróloga en levaduras (Materiales y Métodos, 2.1.9.1) (Tabla 13).

Tabla 13. Estirpes de *S. cerevisiae* usadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo ^a	Referencia
W303-1A	MAT α , <i>ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>	Thomas y Rothstein, 1989
H1246 ^b	MAT α , <i>are1-Δ::HIS3 are2-Δ::LEU2 dga1-Δ::KanMX4 lro1- Δ::TRP1 ADE2</i>	Sandager <i>et al.</i> , 2002

^a La descripción de cada genotipo se encuentra en la tabla I, sección Abreviaturas.

^b H1246 es congénita a W303-1A, por lo que también presenta sus marcadores genéticos, excepto los compensados por las mutaciones por inserción.

H1246 tiene mutados los genes *DGA1*, *LRO1*, *ARE1* and *ARE2*, de manera que es deficiente en actividad DAGAT y acumulación de TAGs. En consecuencia, H1246 presenta una tasa de crecimiento inferior a la estirpe silvestre W303-1A, la cual no presenta modificaciones en ninguno de los aspectos anteriormente citados (Sandager *et al.*, 2002).

1.4.3.1 Condiciones de cultivo

Las levaduras se incubaron a 30°C. Los cultivos en medio sólido se llevaron a cabo en placas de Petri selladas con película autosellante (Parafilm) durante 48h, mientras que los cultivos líquidos lo hacían en matraces Erlenmeyer estériles con agitación continua en incubadores orbitales a 200 rpm durante 24h. El volumen del medio líquido fue siempre inferior a un tercio del volumen del matraz con el fin de mantener una aireación adecuada.

Los medios de cultivo empleados se describen en Materiales y Métodos, 1.5.3, así como la inducción de éstos para la expresión de proteínas recombinantes (Materiales y Métodos, 2.1.9.1.1).

1.4.3.2 Recogida de material biológico

Tanto el volumen de cultivo como el tiempo de recogida variaron en función de la metodología seguida:

1. *Extracción de RNA.*- Se tomaron 10^7 células de cada cultivo tras 3 y 18 h de inducción (Materiales y Métodos, 2.1.1.2.1).
2. *Curva de crecimiento.*- Se tomaron 100 µl de cultivos inducidos de 50 mL cada hora para medir DO_{600} , durante 24 h totales, por triplicado (Materiales y Métodos, 2.1.9.1.1).
3. *Extracción de lípidos totales.*- Se tomaron 50 mL de cultivos inducidos tras 48 h, por triplicado (Materiales y Métodos, 2.2.1.1.1).

4. *Obtención de microsomas.*- Se tomaron cultivos de 250 mL tras 18 h de inducción (Materiales y Métodos, 2.1.9.1.2).

Todas las estirpes usadas con las construcciones pertinentes se almacenaron en glicerol:

5. *Stocks de glicerol.*- Se tomaron 500 μ L de cultivo fresco en 500 μ L de solución de glicerol estéril 40% (p/v) (Materiales y Métodos, 1.7.1.6).

Todos los stocks se congelaron directamente en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso. Los cultivos, por el contrario, se almacenaron a -20°C.

1.4.4 Helianthus annuus L.

Durante el desarrollo de este trabajo se han utilizado líneas estándar y mutante en la composición de ácidos grasos de girasol (*H. annuus L.*). La línea empleada como control fue CAS-6, la cual presenta una composición estándar de ácidos grasos en su aceite, mientras que la línea mutante CAS-15 muestra unos contenidos en ácidos oleico y esteárico incrementados con respecto a la línea control del 3,3X y 2X, respectivamente (Tabla 14).

Tabla 14. Líneas de girasol (*H. annuus L.*) usadas en este trabajo.

	Fenotipo	Composición AG (mol%)						Referencia
		16:0	18:0	18:1	18:2	20:0	22:0	
CAS-6	ST	5,7	7,5	28,8	56,7	0,4	0,8	Fernández-Moya <i>et al.</i> , 2002
CAS-15	HOHE	5,4	24,9	57,8	8,2	1,8	1,9	Fernández-Moya <i>et al.</i> , 2005

Fenotipo: ST: estándar | HOHE: alto oleico alto esteárico.

Ácidos grasos: 16:0: ácido palmítico | 18:0: ácido esteárico | 18:1: ácido oleico | 18:2: ácido linoleico | 20:0: ácido araquídico | 22:0: ácido behénico.

1.4.4.1 Condiciones de cultivo

Las semillas, previa germinación, se sometieron a un tratamiento de *esterilización* consistente en una solución de lejía al 50% (v/v) con unas gotas de Tritón X-100 durante 20min con agitación y posterior aclarado con abundante agua. A continuación, las semillas fueron germinadas en placas de Petri con perlita expandida húmeda, en condiciones de oscuridad a 25°C durante dos o tres días. Posteriormente, se pasaron a macetas pequeñas con turba húmeda donde continuó el crecimiento y, tras dos semanas aproximadamente, se trasplantaron a macetas de mayor tamaño.

El crecimiento de las líneas CAS-6 tuvo lugar en cámaras de cultivo y se realizó con temperatura y fotoperiodo controlados. La temperatura de crecimiento fue de 25°C/15°C (día/noche) y la intensidad de luz de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con fotoperiodo de 16 h. El riego se realizó de forma automática dos veces al día y el abonado dos veces por semana; éste se detuvo una semana antes de la recolección de semillas. El crecimiento de la línea mutante HOHE, por el contrario, se desarrolló en campo, coincidiendo con su temporada de cultivo (abril-junio), o en invernadero, cuando las condiciones externas no fueron propicias para dicho crecimiento. El ciclo biológico de la planta es de 6 meses.

1.4.4.2 Recogida de material biológico

Las muestras recogidas variaron en función de la metodología seguida:

1. *Clonación de genes de semillas.*- Se tomaron muestras de semillas a 15 días después de floración (DDF) de la línea estándar CAS-6, tomando como primer día de la floración aquel en el que los tres círculos exteriores de flores del capítulo estaban totalmente abiertos. En este momento se presupone mayor expresión génica de los genes objeto de estudio (Materiales y Métodos, 2.1.6.1).

2. *Análisis de expresión génica en semillas.*- Se tomaron muestras de semillas que se encontraban en diversos estadios de desarrollo, abarcando desde los 12 a los 33 DDF, con un intervalo de tres días aproximadamente. Se consideraron semillas maduras a partir de 30 DDF, ya que, en esta edad, la semilla ha alcanzado la madurez fisiológica y la composición de lípidos no varía significativamente (Materiales y Métodos, 2.1.3.4).
3. *Análisis de expresión génica en tejidos vegetativos.*- Se tomaron muestras de tejidos en los estadios iniciales de crecimiento, tras 15 días después de la siembra (DDS) de raíz, tallo, cotiledones y hojas (Materiales y Métodos, 2.1.3.4).
4. *Análisis lipídico de semillas.*- Se tomaron trozos del extremo basal opuesto al del embrión de semillas maduras de al menos cinco semillas del total de la población de cada planta mutante, reservando el resto de cada semilla para su posterior germinación en caso de ser necesario (Materiales y Métodos, 2.2.1.1.2).

Todas las muestras destinadas al análisis de expresión génica se recogieron por triplicado al inicio de la fase lumínica del fotoperiodo y se congelaron directamente en N₂ líquido, almacenándose a -80°C hasta su posterior uso. Las muestras destinadas a la clonación de genes de semillas, en cambio, se conservaron a -20°C.

1.4.5 Arabidopsis thaliana

Durante el desarrollo de este trabajo se usó tanto el ecotipo silvestre Columbia-0 (Col-0) como líneas knock out (KO) de determinados genes de interés (Tabla 15).

Tabla 15. Líneas de *A. thaliana* usadas en este trabajo.

Línea	NASC	Gen	Código At	Referencia
Col-0	N22681			
	N504681	<i>AtLPAT2</i>	At3g57650	
	N546680	<i>AtLPAT3</i>	At1g51260	
<i>tag1-1 (AS11)</i>	N3861	<i>AtDGAT1</i>	At2g19450	Katavic <i>et al.</i> , 1995; Zou <i>et al.</i> , 1999

Las líneas KO N504681 y N546680 fueron donadas por el Dr. Joseph R. Ecker (The Salk Institute for Biological Studies, California), obtenida mediante inserción de T-DNA utilizando para ello el vector de transformación pROK2 (Baulcombe *et al.*, 1986). La línea KO N3861 (*AS11*), por su parte, fue donada por el Dr. Ljerka Kunst (University of British Columbia, UBC), obtenida mediante duplicación génica utilizando etil metano sulfonato (EMS) como agente mutagénico.

De las tres líneas KO, tan sólo N3861 (*AS11*) está descrita. En comparación con la línea silvestre Col-0, ésta se caracteriza por tener alterada la composición de ácidos grasos: mayores niveles de ácido α -linolénico frente a un menor contenido de ácido eicosenoico (20:1 Δ 11c) y ácido oleico. Además, presenta menor actividad DGAT, por lo que el contenido en TAGs y aceite en semilla se ve reducido y, en consecuencia, posee menor tasa de germinación (Katavic *et al.*, 1995; Zou *et al.*, 1999).

Todas las líneas KO fueron distribuidas a través del *European Arabidopsis Stock Center* (NASC) (Scholl *et al.*, 2000) como líneas segregantes en fondo genético Col-0.

1.4.5.1 Condiciones de cultivo

Las semillas, previa germinación, se sometieron a un tratamiento de *esterilización* consistente en una primera solución de lejía al 10% (v/v), seguido de una solución de etanol al 70% (v/v) y una serie de lavados sucesivos con abundante agua. A continuación, las semillas pudieron seguir dos métodos de siembra:

1. *Cultivo en tierra.*- Las semillas se sembraron directamente en semilleros con tierra húmeda previamente desinfectada con fungicida sistémico Previcur® N (Bayer, Alemania) para evitar plagas, dispuestos en bandejas.
2. *Cultivo in vitro.*- Las semillas se resuspendieron en una solución de agarosa 0,8% (p/v) previamente calentada y se sembraron sobre placas de Petri de 9 cm Ø selladas con cinta porosa (Micropore, 3M, EEUU) en medio sólido MS (Materiales y Métodos, 1.5.4).

Indistintamente del medio de cultivo usado, las semillas se sometieron a un proceso de *estratificación* durante 3 días a 4°C en condiciones de oscuridad y humedad, permitiendo así una óptima sincronización en la germinación. Finalmente, la germinación de las semillas y el crecimiento de las plantas tuvieron lugar en cámaras de cultivo APT.line™ KBW (Binder, Alemania), bajo condiciones de temperatura y fotoperiodo controladas.

En general, la temperatura de crecimiento fue de 20-22°C (luz/oscuridad) y la intensidad de luz de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con fotoperiodo de ciclo largo de 16h/8h (luz/oscuridad) y humedad de 40-50%. Las plántulas crecidas a partir de cultivos *in vitro* se trasplantaron a semilleros con tierra húmeda dispuestos en bandejas donde continuó su crecimiento. El riego se realizó de forma manual dos veces por semana mediante inundación de la bandeja, suplementado con solución nutritiva (Materiales y Métodos, 1.5.4); éste se detuvo una semana antes de la recolección de semillas para potenciar su desecación. El ciclo biológico de la planta es de 2-3 meses.

En función del uso para el que fuesen sembradas, las plantas y semillas sufrieron modificaciones puntuales en las condiciones de cultivo:

1. Las plantas destinadas a completar su ciclo biológico y producir semillas fueron crecidas directamente en cultivos de tierra húmeda. Excepcionalmente, las semillas de la línea KO N3861 (AS11) fueron germinadas *in vitro* debido a su nula germinación en tierra. Las condiciones de crecimiento fueron las descritas anteriormente.
2. Las plantas destinadas a ser transformadas con *Agrobacterium* mediante infiltración (Materiales y Métodos, 2.1.8.4.2) fueron trasplantadas a macetas con tierra húmeda en grupos de cinco por construcción, por triplicado, dispuestas en bandejas. El crecimiento se realizó igualmente a 20-22°C (luz/oscuridad), pero esta vez se sometieron primero a fotoperiodo de ciclo corto de 8h/16h (luz/oscuridad) para potenciar el crecimiento vegetativo, y después a fotoperiodo de ciclo largo de 16h/8h (luz/oscuridad), para inducir la fase reproductiva. Las plantas, una vez transformadas, se mantuvieron un día en oscuridad y humedad, para posteriormente volver a ser transformadas y trasplantadas nuevamente a la cámara de cultivo, procurando el aislamiento de unas con otras para evitar cruzamientos no deseados y favoreciendo la alternancia posicional de éstas.
3. Las semillas procedentes de plantas transformadas fueron germinadas *in vitro* en placas de Petri de 14 cm Ø en medio sólido MS suplementado con higromicina (15 µg/ml) para su posterior identificación. El método empleado para tal fin, basado en cambios en el fotoperiodo, así como el criterio de selección, se especifica en Materiales y Métodos, 2.1.8.4.3.

1.4.5.2 Recogida de material biológico

Las muestras recogidas variaron en función de la metodología seguida:

1. *Selección de líneas KO homocigotas.*- Se tomaron hojas basales de líneas KO en los estadios iniciales de crecimiento, tras 15 días después de siembra (DDS). Todas ellas se congelaron directamente en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso (Materiales y Métodos, 2.1.1.3.4).
2. *Análisis de genotipo en hojas.*- Se tomaron igualmente hojas basales de líneas transgénicas T₃ en los estadios iniciales de crecimiento, tras 15 días después de siembra (DDS). Se procedió de igual modo que en el punto anterior (Materiales y Métodos, 2.1.1.3.4).
3. *Análisis fenotípico de semillas.*- Se recogieron semillas maduras, tanto de líneas silvestre como de líneas KO (S₀), y semillas T₃ de líneas transgénicas. Las semillas se guardaron en un lugar oscuro y seco a temperatura ambiente hasta su visualización en lupa (Materiales y Métodos, 2.1.9.2.1).
4. *Análisis lipídico de semillas.*- Se recogieron semillas, tanto de líneas silvestre como de líneas KO (S₀) y de líneas transgénicas (T₃). Las semillas se guardaron en un lugar oscuro y seco a temperatura ambiente hasta su posterior análisis (Materiales y Métodos, 2.2.1.1.2).

1.5 MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES NUTRITIVAS

Para el crecimiento de los distintos organismos objetos de estudio se emplearon los siguientes medios y soluciones:

1.5.1 E. coli

- ✓ *Medio Luria-Bertani (LB)* (Sambrook *et al.*, 1989): Bactotripton a 1% (p/v), extracto de levadura al 0,5% (p/v) y NaCl al 1% (p/v).

1.5.2 A. tumefaciens

- ✓ *Medio Luria-Bertani (LB)* (Sambrook *et al.*, 1989): Bactotripton a al 1% (p/v), extracto de levadura al 0,5% (p/v) y NaCl al 1% (p/v).

1.5.3 S. cerevisiae

- ✓ *Medio rico YPD*: Extracto de levadura al 1% (p/v), peptona bacteriológica al 2% (p/v), glucosa al 2% (p/v).
- ✓ *Medio mínimo SC*: Yeast Nitrogen Base (YNB) sin aminoácidos al 0,67% (p/v), fuente de carbono* al 2% (p/v) y una mezcla en polvo de aminoácidos y nucleósidos al 0,13% (p/v) conteniendo: 0,04 g/L adenina sulfato, 0,02 g/L L-arginina, 0,1 g/L ácido L-aspártico, 0,1 g/L ácido L-glutámico, 0,02 g/L L-histidina, 0,06 g/L L-leucina, 0,03 g/L L-lisina, 0,02 g/L L-metionina, 0,05 g/L L-fenilalanina, 0,375 g/L L-serina, 0,2 g/L L-treonina, 0,04 g/L L-triptófano, 0,03 g/L L-tirosina, 0,15 g/L L-valina y 0,15 g/L uracilo; pH 5,6 ajustado con NaOH.
- ✓ *Medio mínimo SC-URA*: Medio mínimo SC sin uracilo para la selección de auxotrofías.

* Las fuentes de carbono empleadas fueron: 2% (p/v) glucosa, 2% (p/v) rafinosa o 2% (p/v) galactosa, según la finalidad del cultivo. Éstas se esterilizaron por filtración a través de una membrana de filtro de jeringa de acetato de celulosa de 0,2 µm de poro y 25 mm de diámetro Minisart® 16534-K (Sartorius, Alemania).

1.5.4 A. thaliana

- ✓ *Medio Murashige-Skoog (MS)*: Sales MS (Sigma-Aldrich, EEUU) al 0,44% (p/v), sacarosa al 1-3% (p/v) y MES al 0,05% (p/v); pH 5,7 ajustado con KOH.
- ✓ *Solución nutritiva*: 0,005M KNO₃, 0,0025M KH₂PO₄, 0,004M MgSO₄ × 7H₂O y 0,002M Ca(NO₃)₂ × 4H₂O.

En todos los casos, los medios y soluciones se hicieron con agua de alta calidad Milli-Q (Millipore, Reino Unido) y se esterilizaron en autoclave a 120°C y 1atm de presión durante 20min. En general, para la preparación de los medios sólidos se añadió agar al 1,5% (p/v) previa esterilización y se realizaron en placas de Petri. En la preparación de medio sólido para semillas de *A. thaliana* se usó en cambio fitoagar al 0,8% (p/v).

Las sustancias termolábiles como los antibióticos se adicionaron en las concentraciones indicadas (Materiales y Métodos, 1.6) al medio de cultivo ya estéril y enfriado por debajo de los 50°C, al igual que las fuentes de carbono (Materiales y Métodos, 1.5.3).

Para la selección de colonias de *E. coli* transformadas con plásmidos que contienen inserto y poseen el gen *lacZ* (Materiales y Métodos, 2.1.8.1.3) se añadieron isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,5 mM esterilizado por filtración a través de una membrana de filtro de jeringa de acetato de celulosa de 0,2 μ m de poro y 25 mm de diámetro Minisart® 16534-K (Sartorius, Alemania) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal) 80 μ g/mL al medio de cultivo sólido LB ya estéril y enfriado por debajo de los 50°C.

Los medios sólidos se conservaron a 4°C y los medios líquidos a temperatura ambiente.

1.6 ANTIBIÓTICOS

Para la selección de las propias estirpes y los distintos transformantes, en función del organismo objeto de estudio, se utilizaron los siguientes antibióticos:

1.6.1 *E. coli*

- ✓ *Ampicilina*: Antibiótico bactericida que inhibe la síntesis de la pared celular, actuando sobre las enzimas responsables de dicha síntesis. El gen de resistencia *amp* presente en los plásmidos pGEM®-T Easy, pMBL-T y pYES2 (Materiales y Métodos, 1.9) codifica para una enzima periplásmica que rompe el anillo β -lactámico del antibiótico. La ampicilina (sal sódica) se preparó a 100 mg/mL en agua, diluyéndose y adicionándose posteriormente a una concentración final de 100 μ g/ml.

- ✓ *Kanamicina*: Antibiótico bactericida que se une a la subunidad 70S de los ribosomas y causa la lectura errónea del RNA. El gen de resistencia *kan* presente en el plásmido pCAMBIA-1300EC (Materiales y Métodos, 1.9) codifica para una enzima fosfotransferasa aminoglicida que modifica el antibiótico y previene su interacción con el ribosoma. La kanamicina se preparó a 50 mg/mL en agua, diluyéndose y adicionándose posteriormente a una concentración final de 50 µg/ml.

1.6.2 *A. tumefaciens*

- ✓ *Rifampicina*: Antibiótico bactericida que se une a la subunidad β de la RNA polimerasa, inhibiendo así la síntesis de RNA. La resistencia *rif* presente en la propia estirpe GV3101 (Materiales y Métodos, 1.4.2) como marcador cromosomal evita la interacción antibiótico-enzima mediante una serie de mutaciones de varios aminoácidos presentes en dicha subunidad. La rifampicina se preparó a 25 mg/mL en metanol, diluyéndose y adicionándose posteriormente a una concentración final de 100 µg/ml.
- ✓ *Gentamicina*: Antibiótico bactericida que se une a la subunidad 30S de los ribosomas, interfiriendo en la elongación de la cadena peptídica. El gen de resistencia *gem* presente en el plásmido pMP90 (Materiales y Métodos, 1.9) codifica para una enzima adenililtransferasa aminoglicida que evita la interacción antibiótico-ribosoma mediante la modificación de un aminoácido presente en dicha subunidad. La gentamicina se preparó a 50 mg/mL en agua, diluyéndose y adicionándose posteriormente a una concentración final de 50 µg/ml.
- ✓ *Kanamicina*: Antibiótico bactericida que se une a la subunidad 70S de los ribosomas y causa la lectura errónea del RNA. El gen de resistencia *kan* presente en el plásmido pCAMBIA-1300EC (Materiales y Métodos, 1.9) codifica para una enzima fosfotransferasa aminoglicida que modifica el antibiótico y previene su interacción con el ribosoma. La kanamicina se preparó a 50 mg/mL en agua, diluyéndose y adicionándose posteriormente a una concentración final de 50 µg/ml.

1.6.3 A. thaliana

- ✓ *Higromicina B*: Antibiótico que mata tanto a bacterias como hongos y células eucariotas superiores al inhibir la síntesis proteica. El gen de resistencia *hyg* presente en el plásmido pCAMBIA-1300EC (Materiales y Métodos, 1.9) codifica para una quinasa que inactiva al antibiótico a través de la fosforilación del mismo. La higromicina se preparó a 15 mg/mL en agua, diluyéndose y adicionándose posteriormente a una concentración final de 15 µg/ml.

Todos los antibióticos preparados en agua fueron posteriormente esterilizados por filtración a través de una membrana de filtro de jeringa de acetato de celulosa de 0,2 µm de poro y 25 mm de diámetro Minisart® 16534-K (Sartorius, Alemania) y se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso. Aquellos antibióticos que fueron preparados en metanol no precisaron esterilización alguna.

1.7 TAMPONES Y SOLUCIONES

1.7.1 Biología Molecular

1.7.1.1 Ácidos nucleicos

- ✓ *TAE*: 40 mM Tris-acetato y 1 mM EDTA pH 8,0.
- ✓ *TE*: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0.
- ✓ *Solución para los geles de agarosa*: 0,8-2% agarosa (p/v), suplementando con TAE.
- ✓ *Solución de extracción 2xCTAB*: 0,1 M Tris pH 8,0, 2% CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio-C₁₉H₄₂NBr) (Sigma-Aldrich, EEUU), 1,4 M NaCl y 20 mM EDTA pH 8,0. Añadir en el momento de usar 50 µg/mL de RNAasa.

Materiales y Métodos

- ✓ *Tampón de extracción*: 0,2 M Tris-HCl pH 7,5, 0,25 M NaCl, 25mM EDTA pH 8,0 y SDS 0,5% (p/v).

1.7.1.2 Preparación de células competentes

- ✓ *Medio ψ Broth*: bactotripton 2% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), $MgSO_4$ 0,4% (p/v), 10 mM KCl.
- ✓ *Solución TjBI*: 100 mM RbCl, 50 mM $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 30 mM acetato potásico, 10 mM $CaCl_2$, glicerol 15% (p/v); pH 5,8 ajustado con acético 0,2 M y esterilizado por filtración.
- ✓ *Solución TjBII*: 10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM $CaCl_2$, glicerol 15% (p/v); pH 7 ajustado con NaOH y esterilizado por filtración.
- ✓ *Solución $CaCl_2$* : 20 mM de $CaCl_2$.

1.7.1.3 Transformación de células

- ✓ *Solución de $CaCl_2$* : 10 mM Pipes pH 7,0, 60 mM $CaCl_2$ y glicerol 15% (p/v).
- ✓ *Tampón "Plate"*: PEG4000 40% (p/v), 0,1 M acetato de litio, 10 mM Tris-HCl pH 7.5 y 1 mM EDTA.

1.7.1.4 Transformación de plantas

- ✓ *Solución de transformación*: sacarosa 5% (p/v) y Silwet L-77 0,05% (p/v) (Momentive, EEUU).

1.7.1.5 Microsomas de levaduras

- ✓ *Tampón de extracción*: 0,2M HEPES-NaOH, pH 7,4, 0,5M sacarosa. Añadir 1 mM PMSF (Sigma-Aldrich, EEUU) justo antes de usar.

- ✓ *Tampón de resuspensión*: 10mM HEPES-NaOH, pH 7,4.
- ✓ *Tampón SCEM*: 1M sorbitol, citrato sódico 2,94% (p/v), 10 mM EGTA; pH 6,5-7,0.
- ✓ *Tampón de rotura "breakage buffer"*: 10 mM MES pH 6,9 ajustado con Tris-HCl, Ficoll 400 12% (p/p) y 0,2 mM EDTA. Añadir 1 mM PMSF y cóctel inhibidor de proteasas de levaduras 0,6% (v/v) (Sigma-Aldrich, EEUU) justo antes de usar.
- ✓ *Tampón TEGM*: 50 mM Tris pH 7,5, 1 mM EGTA, 1 mM β -mercaptoetanol, 1 mM PMSF.
- ✓ *Tampón TEGM/33*: TEGM en glicerol 33% (p/v).

1.7.1.6 Stock de células

- ✓ *Solución de glicerol*: 25mM Tris-HCl, pH 7,5, glicerol 70% (p/v).

Todas las soluciones utilizadas para biología molecular fueron esterilizadas mediante un proceso de autoclave a 120°C y 1atm de presión durante 20min. Las soluciones que no podían resistir esas condiciones fueron esterilizadas por filtración a través de una membrana de filtro de jeringa de acetato de celulosa de 0,2 μ m de poro y 25 mm de diámetro Minisart® 16534-K (Sartorius, Alemania). El material de vidrio y otros equipos eran esterilizados a 200°C durante 1h.

1.7.2 Bioquímica

1.7.2.1 Extracción de lípidos y metilación de ácidos grasos

- ✓ *Mezcla de metilación y extracción*: metanol/tolueno/dimetoxipropano/H₂SO₄ (39:20:5:2, v/v/v/v).
- ✓ *Mezcla de metilar*: metanol/tolueno/H₂SO₄ (88:10:2, v/v/v).

Todas las soluciones que se han utilizado para el análisis lipídico contenían un 0,01% (v/v) de butil hidroxitolueno (BHT) como antioxidante.

1.7.2.2 Ensayos de actividad *HaDAGAT in vitro*

- ✓ *Tampón de stock*: 0,340M HEPES-NaOH, pH 7.4; 5.5mM MgCl₂.
- ✓ *Tampón curva pH*: 0,340M Bis-Tris Propano, a distintos pHs; 5.5mM MgCl₂.

1.8 OLIGONUCLEÓTIDOS

Todos los oligonucleótidos empleados fueron sintetizados por la empresa MWG-Biotech (Alemania). De forma general, su diseño siguió los siguientes requisitos:

- Longitud del oligonucleótido de 18-25 pb.
- Contenido G+C ≥ 55%.
- Temperatura de hibridación (T_m) ≤ 72°C.
$$T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T)$$
- Extremo 3' con un par de guaninas y/o citosinas.
- No han de formar estructuras secundarias.
- Aquéllos utilizados como parejas no deben hibridar entre ellos.

Los oligonucleótidos podrán presentar degeneraciones o no, incluir codones de inicio y/o parada de la traducción de proteínas, secuencias diana de corte de enzimas de restricción, bases adicionales y/o bases modificadas, así como secuencias específicas de inicio de translación, en función de los distintos usos para los que fueron diseñados.

Todos los oligonucleótidos usados en este trabajo se muestran en el *Apéndice I*, clasificados por familias génicas.

1.9 PLÁSMIDOS Y VECTORES DE EXPRESIÓN

Los plásmidos y vectores de expresión utilizados en este trabajo se muestran en la Tabla 16, junto con los organismos en los que se han utilizado. En la Figura 15 se muestran sus representaciones gráficas.

Tabla 16. Plásmidos y vectores de expresión utilizados en este trabajo.

Nombre	Organismo	Marcador selección	Compañía / Referencia
pGEM [®] -T Easy	<i>E. coli</i>	<i>amp^R</i>	Promega, EEUU
pMBL-T	<i>E. coli</i>	<i>amp^R</i>	Dominion, EEUU
pYES2	<i>E. coli</i>	<i>amp^R</i> / <i>URA3</i>	Invitrogen, EEUU
	<i>S. cerevisiae</i>		
pCAMBIA-1300EC	<i>E. coli</i>	<i>hyg^R</i> / <i>kan^R</i>	Lazarus <i>et al.</i> , 2004
	<i>A. tumefaciens</i> <i>A. thaliana</i>		
pMP90	<i>A. tumefaciens</i>	<i>gem^R</i>	Koncz and Schell, 1986

Marcadores de selección: *amp^R*: resistencia ampicilina | *gem^R*: resistencia gentamicina | *hyg^R*: resistencia higromicina B | *kan^R*: resistencia kanamicina | *URA3*: gen de síntesis de uracilo, restaurador de esta auxotrofia.

pGEM[®]-T Easy / *pMBL-T*.- Plásmidos multicopia empleados como vectores convencionales en la transformación génica de *E. coli* (Materiales y Métodos, 2.1.8.1). Poseen un sitio de clonación múltiple (MCS o polylinker), el gen marcador de resistencia bacteriana a ampicilina y el fragmento *lacZα* para confirmar la presencia del inserto en el sitio de clonación.

pYES2.- Plásmido multicopia utilizado en la transformación génica de *S. cerevisiae* (Materiales y Métodos, 2.1.8.3). Contiene el promotor inducible por galactosa y reprimido por glucosa *GAL1* y el terminador transcripcional *CYC1*. Además posee un sitio de clonación múltiple (MCS o polylinker), el gen marcador de resistencia bacteriana a ampicilina y el gen *URA3* para la selección de transformantes en levaduras con fenotipo *ura3*.

pCAMBIA-1300EC.- Plásmido binario derivado del plásmido pPZP (Hajdukiewicz *et al.*, 1994), cedido por el Dr. Colin Lazarus (Universidad de Bristol, Reino Unido), utilizado en la transformación génica de *A. thaliana* (Materiales y Métodos, 2.1.8.4). Contiene el promotor de expresión constitutiva CaMV 35S y el terminador nos. Además posee en la región comprendida entre las zonas LB y RB (T-DNA) un sitio de clonación múltiple (MCS o polylinker) del plásmido pBI220, en sustitución del polylinker del plásmido pUC18 originario de pCAMBIA-1300, los genes de resistencia a higromicina B y kanamicina y el fragmento *lacZα* para confirmar la presencia de los genes de interés en el sitio de clonación.

pMP90.- Plásmido Ti derivado del plásmido pTiC58 (von Bodman *et al.*, 1989) presente en la estirpe GV3101 de *A. tumefaciens* (Materiales y Métodos, 1.4.2). Contiene el T-DNA y toda la maquinaria de virulencia para su inserción en el genoma de la planta, además del gen de resistencia a gentamicina.

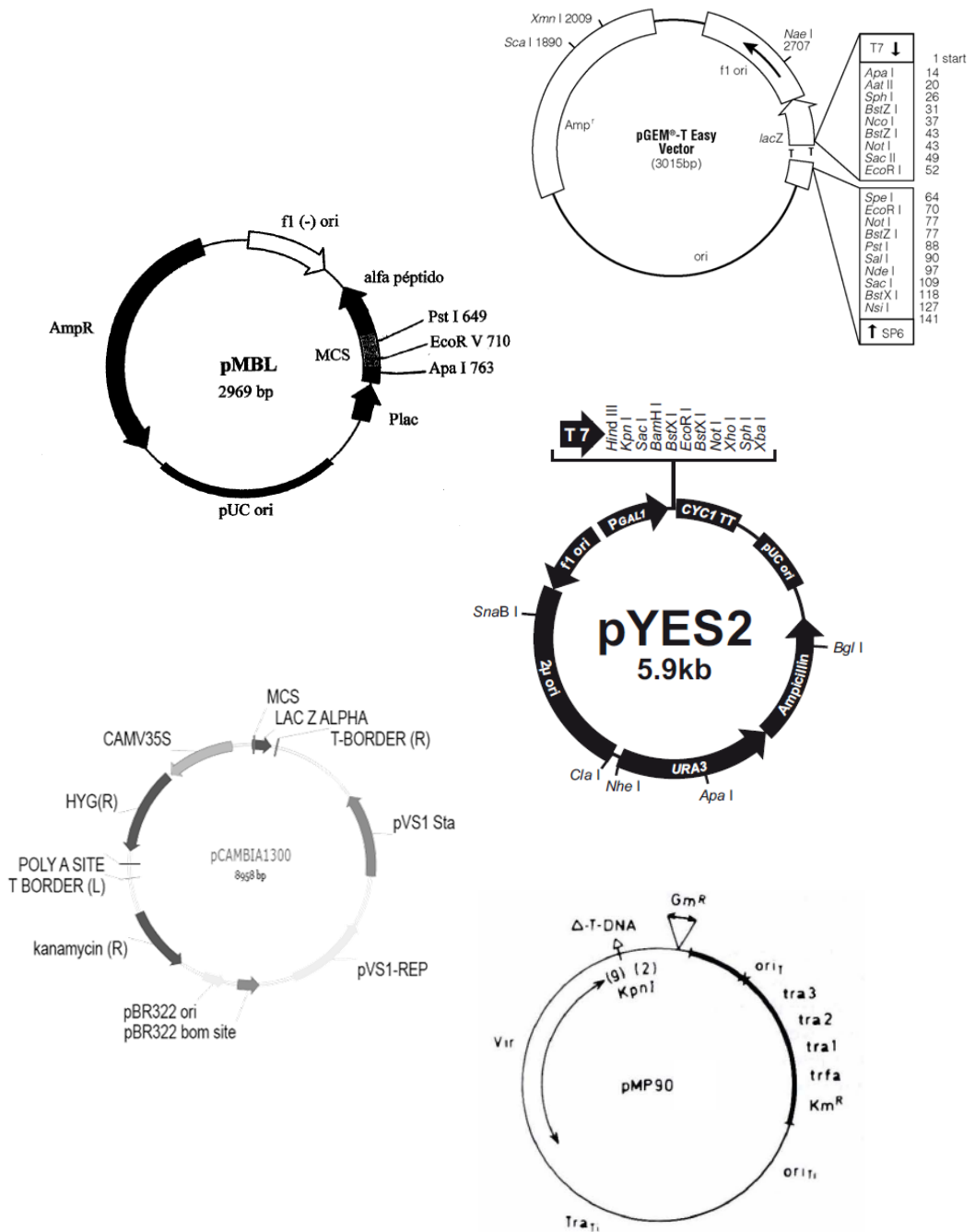


Figura 15. Representación esquemática de los plásmidos y vectores usados en este trabajo.

2. MÉTODOS

2.1 BIOLOGÍA MOLECULAR

2.1.1 Extracción de ácidos nucleicos

2.1.1.1 Protocolos de bacterias

2.1.1.1.1 *Extracción de DNA plasmídico*

Las extracciones de DNA plasmídico se realizaron mediante lisis alcalina y se purificaron mediante columnas. El kit comercial utilizado fue SpinClean Plasmid miniprep kit (Mbiotech, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA resultante se eluyó de la columna en un volumen de 50 µL de H₂O.

2.1.1.2 Protocolos de levaduras

2.1.1.2.1 *Aislamiento de RNA total*

Aproximadamente 10^7 células de cada cultivo inducido a 3 y 18 h fueron tratadas con liticasa (20U/µl) hasta su rotura. El RNA total fue aislado utilizando el kit comercial RNAeasy Mini Kit (Qiagen, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para eliminar posibles contaminaciones por gDNA, las muestras se cuantificaron (Materiales y Métodos, 2.1.2) y se trataron con DNAsa mediante el uso del DNA-Free™ kit (Ambion, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA total obtenido se resuspendió en 40 µl de TE. Finalmente, para comprobar la integridad del aislamiento, se desnaturalizó 2 µl de este RNA extraído (70°C durante 2min) y se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, de manera similar a la separación de fragmentos de DNA (Materiales y Métodos, 2.1.4.1).

2.1.1.2.2 Síntesis de la primera cadena de cDNA

La síntesis de cDNA a partir del RNA total extraído (1 µg) se realizó utilizando el kit Ready-To-Go™ T-Primed First-Strand Kit (Amersham-Biosciences, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit utiliza la enzima retrotranscriptasa del virus “Moloney Murine Leukemia Virus” (M-MuLV) y un oligonucleótido oligo(dT) para generar la primera cadena de cDNA (3'RACE). El oligonucleótido utilizado incorpora a su vez una secuencia que contiene una diana de restricción NotI-(dT)₁₈. Después de la primera síntesis de cDNA, la reacción estuvo lista para el análisis de expresión génica mediante reacciones de PCR (Materiales y Métodos, 2.1.9.1.1.a).

2.1.1.2.3 Extracción de DNA plasmídico

Las extracciones de DNA plasmídico fueron llevadas a cabo mediante lisis alcalina y se purificaron mediante columnas. El kit comercial utilizado fue Plasmid Midi kit (Qiagen, Alemania), siguiendo para su utilización las recomendaciones del fabricante. El DNA resultante se eluyó de la columna en un volumen de 50 µL de H₂O.

2.1.1.3 Protocolos de plantas

2.1.1.3.1 Aislamiento de RNA total

Aproximadamente 0,1 g de cada tejido o semilla previamente congelado a -80°C fue machacado en un mortero con maza estéril hasta su trituración a polvo fino con N₂ líquido. El RNA total fue aislado utilizando el kit comercial Spectrum Plant Total RNA kit (Sigma-Aldrich, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.1.1.3.2 Aislamiento de mRNA

Partiendo de la muestra de RNA total del apartado anterior, se realizó el paso de purificación del RNA mensajero utilizando el kit comercial GenElute mRNA Miniprep kit (Sigma-Aldrich, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. El precipitado de RNA mensajero fue resuspendido en 33 μ L de solución TE libre de RNAasa (Materiales y Métodos, 1.7.1.1).

2.1.1.3.3 Síntesis de la primera cadena de cDNA

La síntesis de cDNA a partir del mRNA extraído se realizó igualmente utilizando el kit Ready-To-GoTM T-Primed First-Strand Kit (Amersham-Biosciences, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la primera síntesis de cDNA, la reacción estuvo lista para la clonación génica mediante reacciones de PCR estándar (Materiales y Métodos, 2.1.3.1.a) y el análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa (Materiales y Métodos, 2.1.3.4) o PCR cualitativa (Materiales y Métodos, 2.1.9.2.2).

2.1.1.3.4 Extracción de gDNA

Dependiendo de la cantidad de DNA genómico que se pretendió aislar, se siguieron tres protocolos diferentes:

- a) Aislamiento con kit comercial.-* Se recogieron 0,1 g de hojas frescas de la planta estudio. Rápidamente se congelaron con N₂ líquido y se machacaron con mortero y maza estéril hasta la obtención de un polvo fino. El gDNA fue posteriormente extraído del material usando el kit comercial GenElute Plant Genomic DNA Miniprep kit (Sigma-Aldrich, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez extraído, el gDNA fue resuspendido en 100 μ L de TE y almacenado a -20°C hasta su posterior uso. La cantidad obtenida con este método fue, como máximo, de 20 μ g por preparación.

- b) *Aislamiento con protocolo CTAB.*- Se siguió el método descrito en el artículo de Murray y Thompson (1980). Se tomaron 2,5 g de hojas frescas de la planta a estudio. Rápidamente se congelaron con N₂ líquido y se machacaron con mortero y maza estéril hasta la obtención de un polvo fino. Al tejido se añadieron 5 mL de la solución 2xCTAB con RNAasa (Materiales y Métodos, 1.7.1.1), mezclando por inversión. La mezcla se incubó a 65°C durante 20 min, añadiendo posteriormente 5 mL de CHCl₃ (Merck Millipore, Alemania) y mezclando vigorosamente por inversión. Tras 2 min de centrifugación a 15.000 g se añadieron 5 mL de isopropanol puro, mezclando inmediatamente e incubando 1-2 min a temperatura ambiente. Tras una nueva centrifugación de 5 min a 15.000 g se apreció un precipitado ligeramente amarillo por el precipitado del gDNA. A continuación, se lavó el precipitado con etanol 70% (v/v), se precipitó tras 5 min a 15.000 g y se dejó secar en campana tras retirar el sobrenadante. Una vez seco, se resuspendió en 875 µL de agua y se almacenó a -20°C hasta su posterior uso. La cantidad obtenida con este método fue, como máximo, de 2 mg por preparación.
- c) *Aislamiento con protocolo modificado CTAB.*- Se siguió un método modificado del anterior que no requería el uso de fenol ni cloroformo y, en consecuencia, más rápido. Se tomaron hojas frescas individuales de la planta a estudio. Rápidamente se congelaron con N₂ líquido en tubos Eppendorf y se machacaron con punta estéril de 1 mL hasta la obtención de una masa compacta. Esta masa se maceró a temperatura ambiente durante 15 s y a continuación se añadieron 400 µL de tampón de extracción (Materiales y Métodos, 1.7.1.1), mezclando vigorosamente durante 5 s. Tras 1 min de centrifugación a 13000 rpm, se transfirieron 300 µL del sobrenadante a un nuevo tubo y se añadieron 300 µL de isopropanol puro, mezclando inmediatamente e incubando 2 min a temperatura ambiente. Tras una nueva centrifugación de 5 min a 13000 rpm se obtuvo el precipitado de gDNA, el cuál fue secado y resuspendido en 100 µL de tampón TE (Materiales y Métodos, 1.7.1.1) y se almacenó a -20°C hasta su posterior uso. La cantidad obtenida con este método fue suficiente para realizar análisis por PCR screening (Materiales y Métodos, 2.1.3.1c).

2.1.2 Cuantificación de ácidos nucleicos

La concentración y pureza de los ácidos nucleicos se determinó indistintamente midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Ultrospec 3300 pro (Amersham-Biosciences, EEUU) o en un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, EEUU). La relación entre la absorbancia medida a 260 nm y a 280 nm (260/280) indica la pureza de los ácidos nucleicos, mientras que la absorbancia medida a 260 nm permite estimar la concentración de ácidos nucleicos presentes en la preparación.

Así, una relación 260/280 próxima a 1,8 indica que el DNA es puro, correspondiéndose una unidad de absorbancia a 260 nm a una concentración de 50 µg/mL de DNA de doble cadena. Para el caso del RNA, la relación 260/280 debe aproximarse a 2, correspondiéndose una unidad de absorbancia a 260 nm a una concentración de 40 µg/mL de RNA (Sambrook *et al.*, 1989).

2.1.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

2.1.3.1 Amplificación de DNA mediante PCR

Todas las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador TGradient (Biometra®, Alemania) o en un MJ Mini™ Gradient (Bio-Rad, EEUU). Dependiendo de la finalidad y el molde a amplificar, se llevaron a cabo cuatro tipos de reacciones:

- a) *Reacción estándar.*- Las reacciones se desarrollaron en un volumen final de 50 µL conteniendo: tampón comercial de la polimerasa (10x), 2mM de MgCl₂, 0,25mM de una mezcla que contenía todos los desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), 0,5µM de cada oligonucleótido, 0,1-1 µg de DNA molde y 0,05 U de EcoTaq DNA polimerasa (Ecogen, España). De forma rutinaria, la mezcla de reacción se sometió a una activación de la enzima y primera desnaturalización a 94°C durante 3min. Posteriormente, se efectuaron 30 ciclos que consistían en una primera etapa de desnaturalización a 94°C durante 30 s, una fase de alineamiento de oligonucleótidos de 30 s a un

temperatura 2° por debajo de la T_m menor del par de oligonucleótidos, y una etapa de extensión a 72°C con una duración que variaba en función de la longitud del fragmento a amplificar, siendo la relación de 1 min/kb. Finalmente, tras los 30 ciclos, la mezcla se sometió a 72°C durante 10 min en los que se produjo una extensión final de los fragmentos obtenidos. La temperatura de alineamiento se modificó hasta encontrar el punto óptimo para cada reacción.

- b) *Reacción de alta fidelidad.*- En este tipo de reacción se empleó la iProof DNA polimerasa (Bio-Rad, EEUU), enzima con actividad correctora (3'-5' exonucleasa) capaz de aumentar en seis veces la fidelidad en la síntesis de DNA en comparación con la Taq polimerasa. Al no poseer actividad transferasa terminal, los fragmentos sintetizados con la iProof poseen extremos romos. En este caso, las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µL que contenía: 1X iProof HF buffer, 0,25 mM de la mezcla de dNTPs, 0,5 µM de cada oligonucleótido, 0,1-1 µg de DNA molde y 0,02 U de iProof DNA polimerasa (Bio-Rad, EEUU). La mezcla se sometió a una activación de la enzima y primera desnaturalización a 98°C durante 30 s. Posteriormente, se efectuaron de 25-30 ciclos en los que la mezcla se sometía a una primera etapa de desnaturalización a 98°C durante 10 s, seguida de una etapa de alineamiento de secuencias en la que la temperatura ensayada fue nuevamente la T_m más baja de los dos oligonucleótidos menos 2°C durante 10-30 s, y una tercera etapa de extensión a 72°C con un duración que variaba en función de la longitud del fragmento a amplificar, siendo esta vez la relación de 15-30 s/kb. Finalmente, la mezcla se sometió a 72°C durante 5-10 minutos en los que se produjo una extensión final de las cadenas. La temperatura de alineamiento se modificó hasta encontrar el punto óptimo para cada reacción.
- c) *PCR diagnóstica o screening.*- Mediante esta técnica se obtiene la amplificación directa de secuencias génicas a partir de colonias de bacterias o levaduras sin necesidad del aislamiento previo del DNA usado como molde de la reacción. Su uso en este trabajo tuvo como fin la identificación de clones portadores de las secuencias de interés, en su correcta orientación, por lo

que la mezcla de reacción y amplificación se asemejaron a las del apartado a). No obstante, existen pequeñas variaciones: el DNA molde se sustituyó por 0,5 μL de una dilución previa en 20 μL de la colonia a probar y el paso inicial de 95°C/98°C se realizó durante 5 minutos para favorecer la rotura de la pared celular.

Existe además otro uso de PCR screening, idéntico en metodología al apartado a), en la selección de líneas KO homocigotas (genotipado) como paso previo a la transformación génica de *A. thaliana* (Materiales y Métodos, 2.1.8.4.1).

d) *Análisis de expresión génica.*- en este tipo de reacción, de idéntica metodología al apartado a), los cDNAs usados como molde fueron obtenidos a partir de las estirpes transformantes de levadura (Materiales y Métodos, 2.1.9.1.1a) y de las plantas transgénicas T₂ de Arabidopsis (Materiales y Métodos, 2.1.9.2.2). Las parejas de oligonucleótidos específicos usados estaban diseñados a partir de la región codificante de cada gen. En este caso, la finalidad fue determinar cualitativamente la expresión o no de los genes a estudio.

2.1.3.2 Amplificación rápida de los extremos del cDNA (RACE)

Según el extremo de los cDNAs que se quiso amplificar, se llevaron a cabo distintos métodos:

a) *Extremo 3'.*- Para la amplificación de este extremo se utilizó el kit de optimización de PCR (Invitrogen, EEUU), mediante el uso de un oligonucleótido interno del fragmento obtenido con los oligos degenerados y otro diseñado a partir de la cola de poliadenina del mRNA (FA2Z) (*Apéndice I*). El procedimiento seguido fue el descrito para el uso de este kit.

b) *Extremo 5'.*- Para la amplificación de este extremo se utilizó el SmartTM-RACE cDNA amplification kit (Clontech, Japón). Tras la síntesis de la primera cadena de cDNA se realizó una reacción de PCR que contenía: tampón BD Advantage

2 PCR (10X), una mezcla de dNTPs en una concentración final de 0,2 mM para cada uno, 1 µL de BD Advantage 2 Polimerasa Mix (50X) y 5 µL de la mezcla del oligonucleótido universal (UPM, Universal Primers Mix) (10X) (*Apéndice I*), suministrado todo ello por el kit. A esta mezcla se añadió un oligonucleótido reverso específico más alejado del extremo 5' a una concentración final de 0,2 µM. Las condiciones de PCR variaron con respecto a las estándar (*Materiales y Métodos*, 2.1.3.1a) y consistieron en 25 ciclos con un primer paso de desnaturalización a 94°C durante 30 s, una etapa de alineamiento a 68°C durante 30 s y una última etapa de extensión a 72°C durante 3 min. Con el producto de esta reacción se realizó una segunda PCR de 20 ciclos utilizando las condiciones anteriores, pero en la que los oligonucleótidos utilizados fueron NUP (Nested Universal Primers) (10X) (*Apéndice I*), del propio kit, y un segundo oligonucleótido reverso específico. Posteriormente, a este producto se le realizó una nueva PCR con un tercer oligonucleótido específico y NUP, siguiendo las mismas condiciones que en la segunda reacción.

2.1.3.4 Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa

2.1.3.4.1 *Bases teóricas*

Mediante la combinación de técnicas de fluorescencia y la capacidad de detección, la PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) permite monitorizar el proceso de reacción siguiendo su desarrollo ciclo a ciclo (Heid *et al.*, 1996; Bustin, 2002).

En el proceso de la reacción de PCR se pueden distinguir dos fases bien diferenciadas: una primera fase, donde tiene lugar un incremento exponencial de las moléculas de DNA, en la que una mayor cantidad de DNA de partida implica mayor producto de reacción, y una segunda fase, en la que la reacción alcanza una fase estacionaria donde los componentes de la mezcla de reacción comienzan a ser limitantes, los inhibidores de la reacción se acumulan y la polimerasa pierde actividad.

El incremento en la emisión de fluorescencia (ΔRn) que tiene lugar durante el transcurso de la reacción está directamente relacionado con el incremento en la amplificación de la secuencia diana. Cuando este incremento es expresado frente al número de ciclos se obtiene una curva de amplificación (Figura 16). El parámetro C_t (ciclo umbral) se define como el ciclo en el cual la señal de fluorescencia cruza el umbral superando la línea base. En este punto en el cual la curva de fluorescencia cruza el umbral, la reacción se encuentra en fase exponencial, existiendo relación lineal entre el logaritmo de cambio de fluorescencia y el número de ciclos. Cuanto mayor es la cantidad de DNA molde de partida, menos ciclos son necesarios para que el producto de reacción se acumule y pueda ser detectado y, por tanto, más rápido se alcanza el C_t . El C_t permite cuantificar el DNA presente en la muestra y así, la expresión del gen.

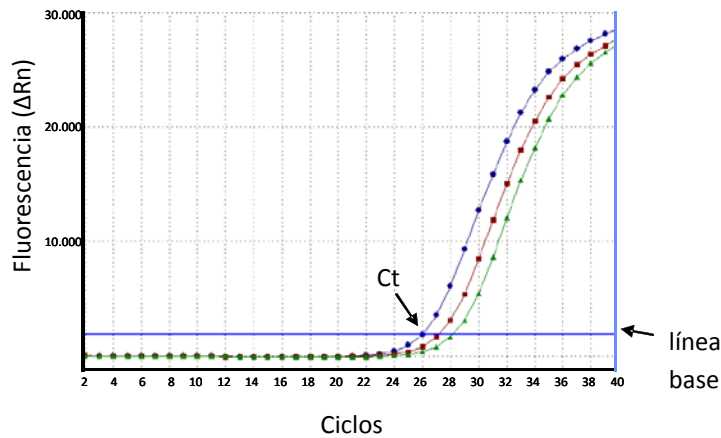


Figura 16. Curva de amplificación de la qRT-PCR.

Como método de generación de fluorescencia se empleó SYBR[®] Green (Qiagen, Alemania), cuya fluorescencia se ve incrementada cuando se une al surco menor del DNA de doble cadena generado en la PCR. La discriminación entre productos específicos y no específicos se logra mediante la representación de la fluorescencia como una función de la temperatura, generando una curva de desnaturalización (*melting curve*) para cada producto de amplificación. Así, cada producto posee un pico de desnaturalización (*melting peak*) característico en función de su composición nucleotídica, que permite distinguirlo de posibles artefactos generados durante la amplificación.

Para la cuantificación del producto de PCR, la señal de fluorescencia, medida durante el transcurso de la reacción, es digitalizada y transformada en un valor numérico que corresponde al valor de Ct para cada uno de los productos amplificados.

2.1.3.4.2 Aplicación técnica

El mRNA aislado de las muestras de material vegetal (Materiales y Métodos, 2.1.1.3.2) fue retrotranscrito a cDNA (Materiales y Métodos, 2.1.1.3.3). Éste último fue cuantificado según el procedimiento previamente descrito (Materiales y Métodos, 2.1.2) y se utilizó de molde para la realización de PCR cuantitativas.

El estudio de la expresión de cada uno de los genes fue realizado mediante la amplificación de una región concreta de los mismos, de unas 100 pb, mediante el diseño y uso de oligonucleótidos específicos (*Apéndice I*).

Como reactivo para la emisión de fluorescencia se empleó SYBR[®] Green (Qiagen, Alemania). Las reacciones de amplificación a tiempo real se realizaron en un volumen final de 25 µL, conteniendo: 12 µL de QuantiTect SYBR[®] Green PCR Master mix (2x), con 2,5 mM de MgCl₂, 0,3 µM de cada oligonucleótido, 2 µL de cDNA y agua libre de RNasa. Las reacciones, incluyendo los controles negativos, se llevaron a cabo por triplicado en placas de polipropileno de 48 pocillos (Stratagene[®], Alemania) cubiertas con tiras “Optical cap” (Stratagene[®], Alemania).

Para llevar a cabo las reacciones de amplificación se utilizó el sistema MJMini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad, EEUU) acoplado a un cabezal Mini Opticon Real Time PCR System (Bio-Rad, EEUU), mediante software específico, monitorizando así la reacción a tiempo real. El programa seguido consistió en una incubación inicial de la mezcla de reacción a 50°C durante 2 min, seguida de una etapa de activación de la enzima y primera desnaturalización a 95°C durante 15 min. Posteriormente, se efectuaron 40 ciclos que consistían en una primera etapa de desnaturalización a 94°C durante 15 s, una fase de alineamiento de oligonucleótidos de 30 s a 62°C, y una etapa de extensión a 72°C de 15 s. Finalmente, tras los 40 ciclos, la mezcla se sometió a una curva de

desnaturalización que comenzaba a 70°C y terminaba a 90°C, con un incremento de 0,2°C/s, en los que se produjo una extensión final de los fragmentos obtenidos. La temperatura de alineamiento se modificó ligeramente hasta encontrar el punto óptimo para cada reacción.

Tras finalizar las reacciones se comprobó la ausencia de dímeros de oligonucleótidos mediante el análisis de las curvas de disociación. Este análisis consistió en una primera etapa de desnaturalización durante 1 min a 95°C, seguida de una etapa de hibridación a 55°C y otra de un incremento de temperatura de 0,2°C/s hasta 95°C. Además, se pudo constatar la especificidad de productos de PCR obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (Materiales y Métodos, 2.1.4.1).

2.1.3.4.2 Eficiencia de amplificación

Para determinar la eficiencia de amplificación de cada pareja de oligonucleótidos se realizó una curva estándar por triplicado, preparando diluciones seriadas de las muestras de cDNA (1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320) y representando los valores de Ct frente al logaritmo de las diferentes diluciones de cDNA. En todos los casos, el valor de la pendiente de la recta estaba comprendido entre -3,1 y -3,6, lo que significaba que la reacción tenía una eficiencia de amplificación ($E = [10^{(-1/\text{pendiente})}] - 1$) de 90-110%. Asimismo, el coeficiente de regresión obtenido era $\geq 0,985$, lo cual indicaba que las condiciones del ensayo eran aceptables en cuanto a precisión, reproducibilidad y sensibilidad.

2.1.3.4.3 Cuantificación de los productos de PCR

La cuantificación del número de copias de los transcritos génicos se llevó a cabo mediante cuantificación absoluta, en la que los valores de Ct determinan el número de copias de los transcritos de los genes en estudio, tras relacionar la señal de PCR con una curva de calibración (Bustin, 2000). Las curvas de calibración se realizaron determinando las Ct de diferentes diluciones de concentración conocida, utilizándose como molde construcciones del plásmido

pMBL-T que contenían el gen a estudio. Las rectas de calibración se realizaron conociendo el número de copias de moléculas de plásmido/ μ l DNA y su Ct. Finalmente, los resultados obtenidos se expresaron como la media \pm SD.

2.1.4 Separación y purificación de ácidos nucleicos

2.1.4.1 Electroforesis de DNA en gel de agarosa

La separación de los fragmentos de DNA se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa, según Sambrook *et al.* (1989). El gel se prepara en tampón TAE (Material y Métodos, 1.7.1.1). La concentración de agarosa (p/v) en los geles puede variar entre 0,8%, para la separación de bandas de tamaños mayores o iguales a 1 kb, y 2%, para bandas de pequeño tamaño. Antes de ser sometidas a electroforesis, las muestras se suplementan con 1/6 del volumen de tampón de carga 6x (sacarosa 40% (p/v), 0,1 M EDTA y azul de bromofenol 0,25% (p/v)) (Fermentas, EEUU). Para determinar el tamaño de los fragmentos de DNA se emplearon los marcadores de peso molecular: GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, y MassRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, EEUU). Las electroforesis se llevaron a cabo en una cubeta horizontal alimentada por la fuente PowerPac (Bio-Rad, EEUU), aplicando diferencias de potencial entre 80 y 120 V.

Para la detección del DNA en los geles y su visualización, se añadieron durante la preparación del gel 0,5 ng/mL de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, EEUU). La visualización de los geles y el almacenamiento de las imágenes se realizó mediante un transiluminador de luz ultravioleta Chemi Genius² (Syngene, Reino Unido), el cual incluye una cámara FIREWIRE CCD de alta resolución, y está acoplado a un ordenador personal que incluye el software GeneSnap (Syngene, Reino Unido).

2.1.4.2 Purificación de fragmentos de DNA a partir de gel de agarosa

Los fragmentos de DNA separados mediante electroforesis en gel de agarosa se extrajeron cortando las bandas de interés usando una cuchilla estéril y utilizando el kit NucleoSpin[®] Extract II (Macherey-Nagel, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.1.5 Tratamientos enzimáticos del DNA

2.1.5.1 Digestión del DNA con nucleasas de restricción

Las reacciones de restricción fueron realizadas mediante enzimas de restricción o endonucleasas (New England Biolabs, Reino Unido; Amersham-Pharmacia, Alemania) y se llevaron a cabo en un volumen de 20 μ L en el tampón suministrado con cada enzima, según las recomendaciones del fabricante. Las digestiones con dos enzimas de restricción se realizaron en un tampón compatible de la misma casa comercial o purificando el producto de la primera restricción (Materiales y Métodos, 2.1.4.2) y realizando posteriormente la segunda. Cuando era requerido, las enzimas eran inactivadas incubándolas durante 15 min a 65°C.

2.1.5.2 Desfosforilación de extremos del DNA

Para realizar ligaciones de fragmentos de DNA con extremos romos provenientes de amplificaciones con iProof (Materiales y Métodos, 2.1.3.1.b) fue necesaria la desfosforilación de los extremos del plásmido sobre el que iba a realizarse la ligación, con el fin de aumentar la eficiencia de la misma. Para ello, se obtuvo una preparación del plásmido según el protocolo descrito en Materiales y Métodos, 2.1.1.1.1, con la salvedad de que, en el paso final, el DNA fue resuspendido en agua MilliQ. Una fracción de 1 μ g del plásmido así obtenido se sometió a restricción con la enzima deseada, en un volumen final de 40 μ L. Una vez completada su digestión, se añadieron a esta mezcla de reacción 6 U de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Boehringer Ingelheim, Alemania), 5 μ L de tampón 10X comercial de la fosfatasa alcalina, completando hasta un volumen

final de 50 μL con agua Mili-Q, y se incubó durante 30 min a 37°C. A continuación, la mezcla de reacción se suplementó con EDTA 200 mM (pH 8,0) y se incubó durante 15 min a 74°C para la inactivación de la enzima. Finalmente, el DNA se purificó tal y como se describe en Materiales y Métodos, 2.1.4.2.

2.1.5.3 Ligación de fragmentos del DNA

Para calcular la cantidad apropiada de inserto (producto de PCR) a incluir en la reacción de ligación, se usó la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{Kb de inserto}}{\text{Kb del vector}} \times \text{proporción inserto : vector} = \text{ng de inserto}$$

La ligación de fragmentos de DNA se realizó mezclando preparaciones de los fragmentos, siendo la proporción inserto:vector óptima de 3:1. La mezcla se incubó en presencia de la enzima DNA ligasa T_4 (Fermentas, EEUU; Promega, EEUU), siguiendo en ambos casos las instrucciones del fabricante. Las ligaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μL usando como tampón de la reacción el suministrado por los fabricantes.

En el caso de los plásmidos pGEM[®]-T Easy y pMBL-T (Materiales y Métodos, 1.9), ambos llevan unas colas de deoxitimina de cadena simple en el extremo 3', en el sitio de inserción. Estas colas aumentan la eficiencia de ligación para productos de PCR, previniendo la recirculación del vector y proporcionando colas compatibles a las generadas en la PCR por las polimerasas utilizadas, ya que, estas polimerasas añaden deoxiadenina al extremo 3' de los fragmentos amplificados (Materiales y Métodos, 2.1.1.1). La ligación en el plásmido se realizó durante 2 h a 22°C, en una mezcla de reacción que contenía 1X del tampón de la DNA ligasa T_4 , 55 ng de vector, 3 U de DNA ligasa T_4 (Fermentas, EEUU o Promega, EEUU) y la cantidad anteriormente calculada del inserto de DNA.

Por el contrario, los plásmidos pYES2 y pCAMBIA-1300EC (Materiales y Métodos, 1.9), a diferencia de los anteriores, no se encuentran abiertos, sino circularizados. Así, para realizar la ligación de los genes de interés en estos plásmidos, se han de generar los extremos cohesivos por medio de reacciones de restricción (Materiales y Métodos, 2.1.5.1). Una vez realizados, se procedió a la ligación durante 2 h a 22°C, en una mezcla de reacción que contenía 1X del tampón de la DNA ligasa T₄, 400 ng de vector, 2 U de DNA ligasa T₄ (Fermentas, EEUU o Promega, EEUU) y la cantidad anteriormente calculada del inserto de DNA (40-80 ng). Finalmente, la enzima se inactivó por incubación a 65°C durante 10 min.

2.1.6 Construcciones génicas

2.1.6.1 Clonación en plásmidos de clonación en *E. coli*

Para la clonación de fragmentos internos y/o secuencias completas de *HaLPAATs* y *HaDAGATs* en *E. coli* y posterior secuenciación y análisis se utilizaron indistintamente los vectores de clonación pGEM[®]-T Easy y pMBL-T (Materiales y Métodos, 1.9). Para ello, se purificaron los fragmentos o clones obtenidos mediante PCR (Materiales y Métodos, 2.1.4.2), usando como molde cDNA de semillas de girasol de 15DDF previamente sintetizado (Materiales y Métodos, 2.1.1.3.3), y se ligaron directamente con los plásmidos mencionados (Materiales y Métodos, 2.1.5.3).

La comprobación de las construcciones se realizó tal y como se indica en Materiales y Métodos, 2.1.8.1.3.

La clonación y obtención de los genes de *HaLPAATs* y *HaDAGATs* se ampliará en Resultados, 1.1 y 2.1, respectivamente, como parte del trabajo realizado.

2.1.6.2 Clonación en vector de expresión en *S. cerevisiae*

Para permitir la expresión heteróloga de los genes de interés en *S. cerevisiae* se utilizó el vector pYES2 (Materiales y Métodos, 1.9). Para ello, primero se realizó un análisis bioinformático con el programa NEBcutter 2.0 del cDNA del gen a

introducir y del plásmido en el que clonar (Materiales y Métodos, 2.3.1). Una vez conocido el mapa de restricción de ambos, se seleccionaron aquellas enzimas que no poseían dianas de restricción en las secuencias a estudio y que se encontraban presentes en el sitio de clonación múltiple (MCS) del plásmido. Con ello, se diseñó una pareja de oligonucleótidos de cada gen completo, los cuáles incluían los codones de inicio y final, añadiendo en los extremos 3' y 5' las dianas de restricción elegidas junto con cuatro bases adicionales en cada extremo, mejorando la eficiencia de corte de las endonucleasas. Se procuró seleccionar en cada caso dos enzimas que generasen extremos cohesivos diferentes con el fin de que la asimetría en los extremos obligara a la correcta inserción del gen, manteniendo el sentido correcto de lectura. Los oligonucleótidos forward diseñados en este caso debían incluir además la secuencia de inicio de translación Kozak (Kozak, 1991) (Apéndice I). Tras ello, se amplificaron los genes a estudiar siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos, 2.1.3.1.b, usando nuevamente como molde cDNA de semillas de girasol de 15DDF y se purificaron en geles de agarosa (Materiales y Métodos, 2.1.4.2). A continuación se generaron los extremos cohesivos deseados mediante restricciones enzimáticas específicas tanto de los genes completos purificados como del plásmido (Materiales y Métodos, 2.1.5.1), para posteriormente ser purificados nuevamente mediante geles de agarosa (Materiales y Métodos, 2.1.4.2), obteniéndose así las construcciones deseadas por ligación (Materiales y Métodos, 2.1.5.3).

Para la expresión de *HaLPAATs* en la estirpe silvestre W303-1A de *S. cerevisiae* (Materiales y Métodos, 1.4.3) se usaron los pares de oligonucleótidos *KpnILPAT1F* / *XbaILPAT1R* (*HaLPAAT1*) y *KpnILPAT2F* / *XbaILPAT2R* (*HaLPAAT2*) (Apéndice I). Las enzimas de digestión empleadas fueron *KpnI/XbaI*. Como resultado, se obtuvieron las construcciones *pYES2::HaLPAAT1* y *pYES2::HaLPAAT2*.

Para la expresión de *HaDAGATs* en la estirpe cuádruple mutante H1246 de *S. cerevisiae* (Materiales y Métodos, 1.4.3) se usaron los pares de oligonucleótidos *KpnIDGAT1AF* / *XbaIDGAT1AR* (*HaDAGAT1A*) *BamHIDGAT1BF* / *XbaIDGAT1BR* (*HaDAGAT1B*) y *KpnIDGAT2F2* / *XbaIDGAT2R* (*HaDAGAT2*) (Apéndice I). Las enzimas de digestión empleadas en este caso fueron *KpnI/XbaI* y *BamHI/XbaI*.

Como resultado, se obtuvieron las construcciones *pYES2::HaDAGAT1A*, *pYES2::HaDAGAT1B* y *pYES2::HaDAGAT2*.

La comprobación de dichas construcciones se realizó tal y como se indica en *Materiales y Métodos*, 2.1.8.3.2.

2.1.6.3 Clonación en vector de expresión en *A. thaliana*

Para permitir la expresión heteróloga de los genes de interés en *A. thaliana* se utilizó el vector *pCAMBIA-1300EC* (*Materiales y Métodos*, 1.9). El método seguido para la clonación de los genes en dicho vector se desarrolló del mismo modo que para la clonación en el vector *pYES2* (*Materiales y Métodos*, 2.1.6.2), con la salvedad de que los oligonucleótidos empleados carecían de la secuencia Kozak.

Para la expresión de *HaLPAATs* en la línea KO N504681 de *A. thaliana* se usaron los pares de oligonucleótidos *BamHILPAT1F / XmaILPAT1R* (*HaLPAAT1*) y *BamHILPAT2F / XmaILPAT2R* (*HaLPAAT2*) (*Apéndice I*). Las enzimas de digestión empleadas en este caso fueron *BamHI/XmaI*. Como resultado se obtuvieron las construcciones *pCAMBIA-1300EC::HaLPAAT1* y *pCAMBIA-1300EC::HaLPAAT2*.

Para la expresión de *HaDAGATs* en la línea KO N3861 (AS11) de *A. thaliana* se usaron los pares de oligonucleótidos *BamHIDGAT1AF / XmaIDGAT1AR* (*HaDAGAT1A*), *BamHIDGAT1BF2 / XmaIDGAT1BR* (*HaDAGAT1B*) y *BamHIDGAT2F3 / XmaIDGAT2R3* (*HaDAGAT2*) (*Apéndice I*). Las enzimas de digestión empleadas en este caso fueron *BamHI/XmaI*. Como resultado se obtuvieron las construcciones *pCAMBIA-1300EC::HaDAGAT1A*, *pCAMBIA-1300EC::HaDAGAT1B* y *pCAMBIA-1300EC::HaDAGAT2*.

La comprobación de dichas construcciones se realizó tal y como se indica en *Materiales y Métodos*, 2.1.8.2.3.

2.1.7 Secuenciación del DNA

La secuenciación de todos los fragmentos de DNA clonados en este trabajo se desarrolló en los laboratorios GATC GmbH (Alemania) y Secugen, S.A. (España). Para ello se emplearon tanto oligonucleótidos cedidos por la propia empresa como oligonucleótidos diseñados a partir de las regiones flanqueantes al sitio de clonación múltiple (MCS) del correspondiente plásmido/vector usado donde se insertaba cada clon (*Apéndice I*). Así, se comprobaba no sólo la presencia o no de insertos, sino también la correcta orientación de éstos en el plásmido/vector. Las secuencias obtenidas fueron identificadas mediante homología con secuencias conocidas utilizando el programa BLAST 2.0 (Basic Local Alignment Search Tools) del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Materiales y Métodos, 2.3.1).

2.1.8 Transformación génica

2.1.8.1 Transformación génica en *E. coli*

2.1.8.1.1 *Preparación de células competentes*

El método seguido fue el descrito por Sambrook *et al.* (1989). Las estirpes de *E. coli* utilizadas fueron XL1-Blue y DH5- α (Material y Métodos, 1.4.1). Para su preparación se siguió el protocolo siguiente:

Las células se cultivaron a 37°C en medio LB sólido (Materiales y Métodos, 1.5.1) durante toda la noche. Al día siguiente se preparó un preinóculo de 5 mL de medio ψ Broth (Materiales y Métodos, 1.7.1.2) a partir de una sola colonia, y se cultivó en agitación continua a 37°C hasta que la DO_{600} fue 0,375 (3h aprox.). El preinóculo se añadió a 100 mL de medio ψ Broth precalentado a 37°C en un matraz de 500 mL. Éste se incubó a 37°C en agitación (200 rpm) hasta que la DO_{600} fue de 0,48. A continuación, el cultivo se incubó 10 min en hielo, se transfirió a tubos de centrifuga previamente enfriados en hielo, y se centrífugo durante 5 min a 4°C y 800 *g* en una centrífuga Sorvall RC5C (Thermo Scientific, EEUU). Tras la centrifugación se descartó el sobrenadante y las células

precipitadas se resuspendieron en 30 mL de solución TjBI (Materiales y Métodos, 1.7.1.2) previamente enfriada. Se incubó en hielo 10 min, de nuevo se sedimentaron las células y el precipitado se resuspendió en solución TjBI (Materiales y Métodos, 1.7.1.2) previamente enfriada. Finalmente, las células se distribuyeron en alícuotas de 100 o 200 μ L, se congelaron en N₂ líquido y se conservaron a -80°C .

2.1.8.1.2 Transformación mediante choque térmico

El método utilizado para la transformación fue el descrito por Sambrook *et al.* (1989). El volumen de ligación que contenía los fragmentos o genes de interés en los distintos plásmidos (Material y Métodos, 2.1.5.3) se mezcló con 100 μ L de células competentes previamente descongeladas en hielo. La mezcla se incubó durante 15-30 min en hielo y pasado este tiempo se sometió a un choque térmico durante 90 s a 42°C . Posteriormente, se mantuvo 7 min a temperatura ambiente e inmediatamente después se añadieron 1,5 mL de medio LB líquido (Materiales y Métodos, 1.5.1). Se incubó en agitación a 37°C durante 1 h. Transcurrido este tiempo se sembró en medio sólido LB suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Materiales y Métodos, 1.6.1) y se incubó a 37°C durante 10-12 h.

En los casos en que se emplearon los plásmidos de clonación de productos de PCR pGEM[®]-T Easy (Promega, EEUU) y pMBL-T (Dominion, EEUU) (Materiales y Métodos, 1.9), se añadieron además al medio sólido LB IPTG (0,5 mM) (Fermentas, EEUU) y X-Gal (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Fermentas, EEUU).

2.1.8.1.3 Comprobación de transformantes

En los casos en que se emplearon los plásmidos de clonación de productos de PCR pGEM[®]-T Easy (Promega, EEUU) y pMBL-T (Dominion, EEUU) (Materiales y Métodos, 1.9), los posibles transformantes que incluían el inserto en el plásmido pudieron ser identificados por el color de sus colonias. Esto se debe a que la presencia del inserto interrumpe la secuencia del gen *lacZ* que codifica la β -

galactosidasa. Así pues, los clones que contenían el inserto produjeron colonias blancas y las que no lo tenían azules.

Como comprobación de la presencia y orientación del inserto en éstos y el resto de vectores de expresión empleados, se realizaron dos procesos secuenciales:

- a) *PCR de colonia*.- se llevó a cabo tal y como se describe en *Materiales y Métodos*, 2.1.3.1c, usando una pareja de oligonucleótidos específicos del inserto clonado y/o del propio plásmido/vector. Con ello, se realizó una primera selección entre las colonias crecidas en la placa de transformación. El producto de PCR fue visualizado en gel de agarosa al 1% (p/v) (*Materiales y Métodos*, 2.1.4.1).

El par de oligonucleótidos diseñados a partir de las regiones flanqueantes al sitio de clonación múltiple (MCS) de pMBL-T fue *M13forward / M13reverse* (*Apéndice I*).

- b) *Digestión del plásmido de clonación*.- Tras la obtención del DNA plasmídico (*Materiales y Métodos*, 2.1.1.1.1) de aquellas colonias que resultaron positivas en la PCR de colonia, se procedió a su digestión añadiendo 10 U/ μ g de DNA de la endonucleasa de restricción apropiada en el tampón requerido por la enzima (*Materiales y Métodos*, 2.1.5.1). El resultado de la restricción se visualizó nuevamente por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) (*Materiales y Métodos*, 2.1.4.1).

Una vez comprobada la presencia y orientación del inserto, éste se mandó a secuenciar en caso de ser necesario (*Materiales y Métodos*, 2.1.7).

2.1.8.2 Transformación génica en *A. tumefaciens*

2.1.8.2.1 Preparación de células competentes

El método seguido fue el descrito por An *et al.* (1988). La estirpe de *A. tumefaciens* utilizada fue GV3101/pMP90 (Materiales y Métodos, 1.4.2). Para su preparación se siguió el protocolo siguiente:

Las células se cultivaron a 28°C en medio LB sólido (Materiales y Métodos, 1.5.2) suplementado con gentamicina (50 µg/mL) y rifampicina (100 µg/mL) (Materiales y Métodos, 1.6.2) durante toda la noche. Al día siguiente se preparó un preinóculo de 5 mL de medio LB a partir de una sola colonia, y se cultivó en agitación continua a 28°C durante 16 h. Transcurrido este tiempo, se añadió 2 mL del cultivo a 50 mL de medio LB y se incubó en agitación continua a 28°C hasta que la DO₆₀₀ fue 0,5-1,0. A continuación, el cultivo se incubó 10 min en hielo, se transfirió a tubos de centrifuga previamente enfriados en hielo, y se centrifugó durante 5 min a 4°C y 3000 *g* en una centrífuga Sorvall RC5C (Thermo Scientific, EEUU). Tras la centrifugación se descartó el sobrenadante y las células precipitadas se resuspendieron en 1 mL de solución CaCl₂ 20 mM (Materiales y Métodos, 1.7.1.2) previamente enfriada. Finalmente, las células se distribuyeron en alícuotas de 100 µL, se congelaron en N₂ líquido y se conservaron a -80°C.

2.1.8.2.2 Transformación mediante choque térmico

El método utilizado para la transformación fue el descrito por An *et al.* (1988). El volumen de ligación que contenía los genes de interés en pCAMBIA-1300EC (Materiales y Métodos, 2.1.5.3) se mezcló con 100 µL de células competentes previamente descongeladas en hielo. La mezcla se incubó durante 5 min en hielo y pasado este tiempo se sometió a un choque térmico durante 5 min en N₂ líquido, seguido de una incubación a 37°C en baño durante 5 min. A continuación, se añadió 1 mL de medio líquido LB y se incubó a 28°C durante 2-4 h en continua agitación, de manera que la bacteria pudiese expresar los genes de resistencia a antibióticos. Transcurrido este tiempo, el cultivo se centrifugó durante 30 s, se descartó el sobrenadante y las células precipitadas se

resuspendieron en 100 μ L de medio líquido LB (Materiales y Métodos, 1.5.2). Finalmente, se sembró en medio sólido LB suplementado con kanamicina (50 μ g/mL) y gentamicina (50 μ g/mL) (Materiales y Métodos, 1.6.2) y se incubó a 28°C durante 2-3 días.

2.1.8.2.3 Comprobación de transformantes

La comprobación de la presencia de insertos en el plásmido tras el proceso de transformación se realizó del mismo modo que en el caso de *E. coli* (Materiales y Métodos, 2.1.8.1.3). El par de oligonucleótidos diseñados a partir de las regiones flanqueantes al sitio de clonación múltiple (MCS) de pCAMBIA-1300EC fue *CaMV35SF1 / nosT* (Apéndice I).

2.1.8.3 Transformación génica en *S. cerevisiae*

2.1.8.3.1 Transformación mediante LiAc-PEG

El método seguido fue el del acetato de litio (LiAc) y polietilenglicol (PEG) (Elble, 1992), el cual permite una eficiente transformación de las levaduras independientemente de la fase de crecimiento del cultivo y sin necesidad de preparar células competentes. Las estirpes de *S. cerevisiae* utilizadas fueron W303-1A y H1246 (Materiales y Métodos, 1.4.3). Para su preparación se siguió el protocolo siguiente:

Inicialmente se incubó un preinóculo a partir de una sola colonia en 10 mL de medio YPD (Materiales y Métodos, 1.5.3) conteniendo un 2% (p/v) de glucosa a 30°C durante toda la noche. Posteriormente, se centrifugó una alícuota de 1 mL de este preinóculo durante 30 s, descartándose el sobrenadante. El precipitado se mezcló con 10 μ g del DNA portador, en este caso DNA de esperma de salmón previamente desnaturalizado, y 7 μ g del DNA transformante, genes de interés en pYES2 (Materiales y Métodos, 2.1.5.3). A la mezcla se añadieron 0,5 mL de tampón “plate” (Materiales y Métodos, 1.7.1.3), se agitó brevemente en un agitador tipo vórtex (IKA®, Alemania) y se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente, se lavaron las células y se sembraron en

una placa con medio mínimo de selección SC-URA (Materiales y Métodos, 1.5.3) conteniendo un 2% (p/v) de glucosa, incubándose a 30°C durante 48 h. Después de este tiempo se pueden visualizar colonias individuales. Estas colonias se sembraron de nuevo en medio mínimo SC-URA conteniendo un 2% (p/v) de glucosa, proporcionando un número adecuado de células para inocular un cultivo para su posterior inducción.

2.1.8.3.2 *Comprobación de transformantes*

La comprobación de la presencia de inserto en el plásmido tras el proceso de transformación se realizó al igual que en el caso de *E. coli* (Materiales y Métodos, 2.1.8.1.3). El par de oligonucleótidos diseñados a partir de las regiones flanqueantes al sitio de clonación múltiple (MCS) de pYES2 fue *GAL1for/ CYCrev* (Apéndice I). La obtención del DNA plasmídico, sin embargo, difirió del anterior (Materiales y Métodos, 2.1.1.2.3).

2.1.8.4 Transformación génica en *A. thaliana*

2.1.8.4.1 *Selección de líneas KO homocigotas*

El método seguido para la identificación de homocigosis se basó en reacciones de PCR diagnósticas o screening (Materiales y Métodos, 2.1.3.1c) usando como molde gDNA aislado mediante kit comercial (Materiales y Métodos, 2.1.1.3.4a) de las líneas KO de *A. thaliana* N504681, N546680 y N3861 (*AS11*) (Materiales y Métodos, 1.4.5). Esta selección previa a la transformación fue necesaria ya que estas líneas se distribuyeron como líneas segregantes en fondo genético Col-0. Para su comprobación se siguieron distintos protocolos en base al origen de cada línea KO:

- a) N504681 | N546680.- se realizaron PCR diagnósticas utilizando para ello un par de oligonucleótidos específicos para cada línea KO, *N504681 LP* y *N504681 RP* y *N546680 LP* y *N546680 RP* (Apéndice I), que hibridan en el DNA del genoma de *Arabidopsis*, localizados a cada lado del T-DNA, y un tercer oligonucleótido común que hibrida en dicho T-DNA, *LBb1.3*

(Apéndice I). Las líneas KO que carecían de amplificación *LP/RP* se consideraban en homocigosis. La información para la obtención de líneas homocigotas y el programa T-DNA Primer Design para el diseño de los oligonucleótidos están disponibles en <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>.

Igualmente, se usó el par de oligonucleótidos *N852633 LP* y *N852633 RP* (Apéndice I), diseñados a partir de la región 5' no codificante del gen *AtFatA1* que codifica para la tioesterasa de tipo A presente en *A. thaliana*, como control interno de la correcta extracción de gDNA.

- b) *N3861 (AS11)*.- se realizaron PCR diagnósticas utilizando esta vez el par de oligonucleótidos específicos ya diseñados *N3861 LA* y *N3861 RB* (Apéndice I) (Zou *et al.*, 1999), que hibridan en el DNA del genoma de *Arabidopsis*, localizados a cada lado de la duplicación génica, y un tercer oligonucleótidos que hibrida en dicha duplicación, *N3861 LC* (Apéndice I). Las líneas KO que presentaban amplificación *LA/RB* sólo con inserción de 147pb se consideraban en homocigosis (Zou *et al.*, 1999).

En este caso no fue necesario usar el par de oligonucleótidos del gen *AtFatA1* de *A. thaliana* como control interno de la correcta extracción de gDNA.

Cada grupo de líneas KO se analizó individualmente, seleccionando aquellas plantas que presentaban señal de homocigosis (S_0).

2.1.8.4.2 Transformación mediante *A. tumefaciens*

Una vez seleccionadas líneas KO homocigotas (S_0), se emplearon 5 plantas crecidas en una misma maceta por cada construcción, por triplicado, con una inflorescencia primaria de 10 cm de longitud aprox. A estas plantas se les cortó el ápice de la inflorescencia primaria para promover la aparición de inflorescencias secundarias y tener mayor cantidad de botones florales. La transformación de las

plantas se realizó 4-5 días después de haber cortado el ápice de la inflorescencia primaria y tras la eliminación de botones ya florecidos.

El método utilizado para la transformación de *A. thaliana* mediante *A. tumefaciens* fue el conocido como “floral dip method” o método de transformación por inmersión (Clough y Bent, 1999; Zhang *et al.*, 2006). Para la transformación se agregaron 2,5 mL de cultivos saturados de *A. tumefaciens* con los genes de interés en pCAMBIA-1300EC (Materiales y Métodos, 2.1.8.2.2) a 250 mL de medio LB con kanamicina (50 µg/ml) (Materiales y Métodos, 1.6.2) y se incubaron en agitación a 28°C durante 24 h. Posteriormente, las células son recogidas por centrifugación en frío a 5000 rpm durante 10 min y resuspendidas en 250 mL de solución de transformación (Materiales y Métodos, 1.7.1.4). La solución de transformación se colocó en un recipiente donde se introdujo la parte aérea de las plantas durante 15-20 s. Posteriormente, las plantas se cubrieron con bolsas de plástico para mantener la humedad y oscuridad durante 16-24 h. Pasado este tiempo, las bolsas se retiraron y las macetas se trasladaron a la cámara de cultivo para el crecimiento de las plantas (Materiales y Métodos, 1.4.5.1). Transcurridos 4 días en cámara, las plantas se volvieron a agroinfiltrar, aumentando así la eficiencia de la transformación. Cuando las silicuas maduraron y se secaron, se recogió la población de semillas transgénicas T₁ y se seleccionaron para transformantes positivos.

2.1.8.4.3 Selección y comprobación de líneas transgénicas

Las semillas transgénicas T₁ obtenidas, previamente esterilizadas (Materiales y Métodos, 1.4.5.1), se resuspendieron en una solución de agarosa 0,8% (p/v) previamente calentada y se sembraron en placas de Petri de 14 cm Ø con medio sólido MS (Materiales y Métodos, 1.5.4) suplementado con higromicina B (15 µg/mL) (Materiales y Métodos, 1.6.3) como antibiótico de selección. Para la identificación de transformantes se empleó un método rápido de 3,25 días de duración, con el que se reducía la posible contaminación por hongos (Harrison *et al.*, 2006): después de 2 días de estratificación, las semillas eran sometidas a un régimen de 4-6h de luz, 48h en oscuridad y 24h de luz (Figura 17).

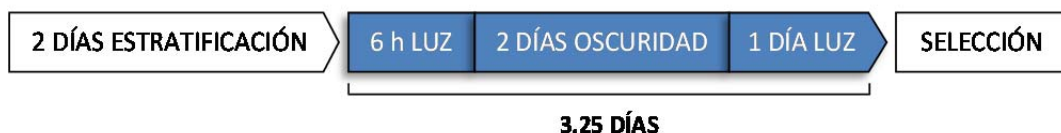


Figura 17. Método rápido para la identificación de transformantes *A. thaliana* empleado en este trabajo. Modificado de Harrison *et al.*, 2006.

Transcurrido este tiempo, las plántulas resistentes al antibiótico (T_1) presentaban hipocótilos largos (0,2-0,4 cm) a diferencia de los no resistentes, cuyos hipocótilos eran cortos, además de un sistema radicular más desarrollado (Figura 18). Después de 8-10 días, las plántulas transgénicas (T_1) eran cuidadosamente trasplantadas a macetas. Las plantas transformantes positivas se mantuvieron creciendo 4-6 semanas más hasta obtener la generación T_2 de semillas. Las semillas T_2 eran crecidas nuevamente en medio sólido MS suplementado con higromicina B (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) siguiendo el mismo método rápido de crecimiento. De aquellas líneas transgénicas cuyas plántulas mostraron nuevamente resistencia al antibiótico se obtuvieron, tras 4-6 semanas, una nueva generación de semillas (T_3) a analizar (Materiales y Métodos, 2.2.1.1.2).

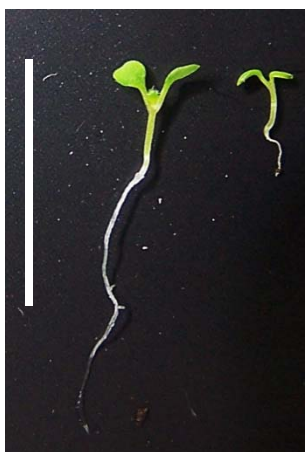


Figura 18. Selección de transformantes *A. thaliana* resistentes a higromicina B. La plántula transformada (izq.) presenta mayor tamaño de hipocótilos y un mayor desarrollo de su sistema radicular que la plántula no transformada (dcha.). El tamaño de la barra es de 1cm. Método descrito por Harrison *et al.*, 2006.

La comprobación de la presencia de los genes en el genoma se realizó a partir de la extracción de gDNA de hojas basales de plantas transgénicas (T₁-T₂), tras dos o tres semanas de crecimiento, mediante aislamiento con protocolo modificado CTAB (Materiales y Métodos, 2.1.1.3.4c). Este gDNA se usó como molde en PCRs diagnósticas o screening (Materiales y Métodos, 2.1.3.1c), usando para ello parejas de oligonucleótidos específicos de secuencia y/o el par específico de pCAMBIA-1300EC *CaMV35SF1 / nosT* (Apéndice I).

2.1.9 Expresión heteróloga de proteínas recombinantes

2.1.9.1 Análisis funcional en *S. cerevisiae*

2.1.9.1.1 *Inducción de proteínas recombinantes*

Las células transformadas con los genes de interés en pYES2 (Materiales y Métodos, 2.1.6.2) fueron crecidas en un volumen de 10 mL de medio mínimo de selección SC-URA (Materiales y Métodos, 1.5.3) conteniendo un 2% (p/v) de glucosa como fuente de carbono, dejándose crecer durante al menos 16 h a 30°C. La glucosa actúa como fuerte represor del promotor de expresión de las proteínas recombinantes GAL1 (West *et al.*, 1984). Transcurrido este tiempo, se tomó una alícuota de 5 mL de este cultivo, se centrifugó a 3000 *g* durante 2 min y se resuspendió en 20 mL de medio mínimo SC-URA conteniendo esta vez un 2% (p/v) de rafinosa, dejándose crecer de nuevo durante 16 h a 30°C. La rafinosa, a diferencia de la glucosa, facilita el crecimiento de los cultivos sin represión para su inducción posterior. Cuando los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ de 0,4, éstos fueron centrifugados a 3000 *g* durante 5 min, lavados dos veces con agua estéril y resuspendidos en medio de inducción SC-URA conteniendo galactosa al 2% (p/v). La galactosa actúa como inductor del promotor GAL1 que, a su vez, permite la expresión de las proteínas recombinantes (Giniger *et al.*, 1985). Todos estos cultivos se dejaron crecer a 30°C para inducir la expresión de las proteínas recombinantes.

El tiempo de inducción, así como el volumen de cultivo inducido, varió en función del uso para el que fue destinado:

- a) *Análisis de expresión génica.*- Se tomaron aproximadamente 10^7 células de cultivos tras 3 y 18 h de inducción y se extrajo RNA total y cDNA (Materiales y Métodos, 2.1.1.2.1 y 2.1.1.2.2, respectivamente). Este cDNA se usó como molde en reacciones de PCR con pareja de oligonucleótidos específicos de la región codificante de cada gen (Materiales y Métodos, 2.1.3.1d). Como control se usó el par de oligonucleótidos específicos *Sc18Sf1sp / Sc18Sr1sp* (Apéndice I), diseñados a partir del cDNA que codifica para la subunidad ribosomal 18S de *S. cerevisiae*.
- b) *Curva de crecimiento.*- Se tomaron 100 μ L cada hora de cultivos inducidos de 50 mL para determinar la DO_{600} , durante 24 h totales, por triplicado (Resultados, 1.4.1.1).
- c) *Análisis de lípidos in vivo.*- Se tomaron 50 mL de cultivos inducidos tras 48 h, por triplicado, se extrajeron y separaron los lípidos totales (Materiales y Métodos, 2.2.1.1.1) y, finalmente, los TAGs fueron analizados mediante cromatografía de gases (GC) (Materiales y Métodos, 2.2.1.4).
- d) *Ensayos de actividad HaDAGAT in vitro.*- Se tomaron 250 mL de cultivos tras 18 h de inducción y fueron sometidos a obtención y cuantificación de proteínas microsomales (Materiales y Métodos, 2.1.9.1.2 y 2.1.9.1.3, respectivamente) previos pasos para dichos ensayos (Materiales y Métodos, 2.2.2.1).

Los cultivos destinados tanto al análisis de lípidos *in vivo* como a los ensayos de actividad *HaDAGAT in vitro* se centrifugaron a 3000-5000 *g* durante 5 min y se lavaron dos veces con agua estéril para retirar las trazas de medio. En el primer caso, la centrifugación se desarrolló a temperatura ambiente y los pellets se secaron bajo corriente de N_2 , almacenándose a 4°C hasta su posterior uso (Materiales y Métodos, 2.2.1.1.1) mientras que en el segundo, la centrifugación se desarrolló a 4°C y los pellets se resuspendieron en su correspondiente tampón, en función del método empleado, para la obtención previa de microsomas (Materiales y Métodos, 2.1.9.1.2).

2.1.9.1.2 Obtención de microsomas

Para el análisis funcional *in vitro* mediante ensayos de actividad *HaDAGAT*, se tomaron 250 mL de cultivos en fase estacionaria tras 18 h de inducción, se centrifugaron a 5000 *g* durante 5 min a 4°C y se lavaron dos veces con agua estéril para retirar las trazas de medio. A continuación, se obtuvieron microsomas mediante dos métodos distintos:

- a) *Rotura mecánica*.- Los cultivos se resuspendieron en 1 mL de tampón de extracción (Materiales y Métodos, 1.7.1.5) y 0,5 mm de glass beads (Sigma-Aldrich, EEUU) y se sometieron a rotura mecánica durante 1 min en mini-bead Beater 8 (Biospec, EEUU), alternando con 1 min en hielo, durante 6 ciclos. A continuación, se centrifugó y se tomó el sobrenadante, el cuál fue nuevamente centrifugado a 1500 *g* durante 20 min a 4°C para eliminar los restos celulares. Finalmente, el sobrenadante fue centrifugado a 100000 *g* durante 1 h a 4°C en ultracentrífuga L8-70M (Beckman Coulter™, EEUU) y se resuspendió el pellet en 175 µL de tampón de resuspensión (Materiales y Métodos, 1.7.1.5) (Modificado de Siloto *et al.*, 2009).

- b) *Rotura enzimática*.- Los cultivos se resuspendieron en 1.4 mL/g células de tampón TE y completado hasta un volumen final de 3.5 mL/g células de H₂O, a los que se añadieron 17.5 µL/g células de β-mercaptoetanol, incubándose durante 1 h a 30°C en agitación. A continuación, se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min y se resuspendió el pellet en 4 mL/g células de tampón SCEM (Materiales y Métodos, 1.7.1.5), al que se sometió a rotura enzimática añadiendo 50 U/g células de zimoliasa/litica, incubándose durante 1 h a 30°C en agitación. Para monitorizar dicha rotura, se tomaron alícuotas de 1 µL y se observó la presencia de esferoplastos a través del microscopio óptico SZM-2 (Optika, Italia). Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min a 4°C, los esferoplastos se resuspendieron en 4 mL/g células de tampón de rotura “breakage buffer” (Materiales y Métodos, 1.7.1.5) y se homogeneizaron con ayuda de un homogeneizador de vidrio.

Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 8K durante 10 min para eliminar los restos celulares y el sobrenadante se centrifugó a 100000 *g* durante 1 h a 4°C en ultracentrífuga L8-70M (Beckman Coulter™, EEUU). Finalmente, los microsomas se resuspendieron en 200 µL de tampón TEGM/33+PIs (Materiales y Métodos, 1.7.1.5) y se homogeneizaron con ayuda de un homogeneizador de vidrio.

Independientemente del método empleado, se procedió a la cuantificación de proteínas microsomales (Materiales y Métodos, 2.1.9.1.3), de manera que las muestras se congelaron con N₂ líquido y se almacenaron a -80°C en alícuotas a una concentración idónea para su posterior uso en ensayos de actividad *HaDAGAT in vitro* (Materiales y Métodos, 2.2.2.1).

2.1.9.1.3 Cuantificación de proteínas microsomales

El contenido de proteína microsomal se determinó según el método descrito por Bradford (1976). Se tomó una alícuota de la muestra y se llevó hasta un volumen final de 0,8 mL con agua destilada. Se añadieron 0,2 mL de reactivo de proteínas (Bio-Rad, EEUU) y, tras agitar vigorosamente, se incubó la muestra durante 15 min. A continuación, se determinó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Ultrospec 3300 pro (Amersham-Biosciences, EEUU). Se empleó seroalbúmina bovina (BSA) como patrón.

2.1.9.2 Análisis funcional en *A. thaliana*

Las semillas T₃ de líneas transgénicas con los genes de interés en pCAMBIA-1300EC (Materiales y Métodos, 2.1.6.3) fueron recolectadas y analizadas previa extracción de lípidos totales (Materiales y Métodos, 2.2.1.1.2) mediante determinación de la composición lipídica por cromatografía de gases (Materiales y Métodos, 2.2.1.4).

2.1.9.2.1 *Análisis fenotípico*

El análisis fenotípico se centró en la comparación morfológica de las semillas pertenecientes a la línea silvestre Col-0, líneas KO N504681, N546680 y N3861 sin transformar y líneas transgénicas con los genes de interés. El estudio se realizó con una lupa binocular estéreo ST-30-2LF (Optika, Italia). Para la toma de imágenes se les acopló una cámara digital distribuida por PCE-Instrumental (España).

2.1.9.2.2 *Análisis de expresión génica*

Se tomaron aproximadamente 0,1 g de semillas y se extrajo RNA total y cDNA (Materiales y Métodos, 2.1.1.3.1 y 2.1.1.3.3, respectivamente). Este cDNA se usó como molde en reacciones de PCR con pareja de oligonucleótidos específicos de la región codificante de cada gen (Materiales y Métodos, 2.1.3.1d). Como control se usó el par de oligonucleótidos específicos *AtActinF* / *AtActinR* (Apéndice I) diseñados a partir del cDNA que codifica para la actina de *A. thaliana*.

2.1.10 Medidas de densidad óptica de cultivos

El crecimiento de cultivos bacterianos y de levaduras se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro Ultrospec 3300 pro (Amersham-Biosciences, EEUU) mediante el uso de microcubetas (Hellma Analytics, Alemania). Para estandarizar las medidas fue necesario determinar previamente dicha absorbancia de los correspondientes blancos.

2.1.11 Cálculo de tasa de crecimiento y tiempo de generación de cultivos

A partir de las medidas de densidad óptica de los cultivos de levadura ensayados (Materiales y Métodos, 2.1.10) se calcularon las tasas de crecimiento y los tiempos de generación de éstos.

El tiempo de generación (μ), entendido como el tiempo necesario para que el número de células de un cultivo (N) se duplique, se calculó a través de la siguiente ecuación:

$$\ln N = \ln N_0 + \mu t$$

En un crecimiento equilibrado, todos los parámetros de crecimiento evolucionan en paralelo, por lo que se consideró N como la OD_{600} media estimada de un cultivo al finalizar su fase exponencial, N_0 la OD_{600} media estimada para ese mismo cultivo al inicio de dicha fase y t el tiempo transcurrido entre estas mediciones (6 h).

Finalmente, la tasa de crecimiento (τ), entendida como la constante de proporcionalidad entre el incremento del número de células de un cultivo por unidad de tiempo y el número de células presentes en ese cultivo, se calculó a partir de la tasa de crecimiento (μ) medida con anterioridad mediante la siguiente ecuación:

$$\tau = \ln 2 / \mu$$

Estos parámetros se calcularon durante la fase exponencial de crecimiento de los cultivos inducidos, donde la velocidad de crecimiento es máxima, lo que permitió entender mejor la evolución del número de células por cultivo.

2.2 BIOQUÍMICA

2.2.1 Análisis de lípidos

El análisis de lípidos lleva implícito la extracción y posterior separación de los distintos lípidos a estudio, en función del método empleado, la procedencia de las muestras y el fin para el que fueron desarrollados, para finalmente ser analizados *per se*.

2.2.1.1 Extracción de lípidos totales

2.2.1.1.1 Protocolo de levaduras

La extracción de lípidos totales de levadura se realizó a partir de células crecidas en 50 mL de cultivos inducidos tras 48 h, por triplicado, coincidiendo con su fase estacionaria (Materiales y Métodos, 1.4.3.1). Inicialmente, los cultivos se centrifugaron a 5000 *g* durante 5 min a 4°C y se lavaron dos veces con agua estéril para retirar las trazas de medio. A continuación, se añadieron 4 mL de metanol y 0,5 mm de glass beads (Sigma-Aldrich, EEUU). La rotura mecánica y posterior extracción con cloroformo se realizó según el método descrito por Bligh y Dyer (1959). Las muestras se evaporaron dado su elevado volumen en un rotavapor VWR (IKA®, Alemania) bajo atmósfera de N₂ y se resuspendieron en 30 µL de cloroformo/ácido acético (100:1, v/v). Finalmente, las muestras se separaron mediante cromatografía en capa fina para la obtención de TAGs (Materiales y Métodos, 2.2.1.2).

2.2.1.1.2 Protocolo de plantas

Para la extracción de lípidos totales de semillas de la línea de girasol alto oleico alto esteárico (HOHE) se empleó un método denominado “técnica de la media semilla” (Ruiz-López *et al.*, 2003). Esta técnica permite la digestión de los tejidos, la extracción de lípidos totales y el análisis posterior de los TAGs y de los ácidos grasos contenidos en éstos. En nuestro estudio se partió de un pequeño fragmento del extremo basal opuesto al del embrión de semillas maduras, el cual se incubó durante 2 h en un baño a 80°C con una mezcla de solución de metanol saturado con NaCl al 0,17 M (33%) y 66,6% de heptano. Al enfriar, la fase superior contuvo los TAGs y una alícuota de éstos fue separada y cuantificada por cromatografía de gases (Materiales y Métodos, 2.2.1.4). Las semillas sobrantes se almacenaron para su posterior germinación en caso de ser necesario. De cada planta a estudio se analizaron y reservaron al menos 5 semillas del total, generación tras generación, para continuar la selección de los caracteres de interés (Materiales y Métodos, 2.5).

Para la extracción de lípidos totales de semillas de *Arabidopsis* se empleó igualmente la técnica de la media semilla (Ruiz-López *et al.*, 2003). En este caso se partió de un total de 30 semillas completas aproximadamente, las cuáles fueron previamente separadas de restos vegetales, depositadas en tubos de vidrio pretratados con cloroformo para eliminar cualquier contaminación por residuos de lípidos y finalmente trituradas. Una vez transmitidas, se tomó una alícuota de la fase superior que contenía los TAGs y se cuantificó igualmente por cromatografía de gases (Materiales y Métodos, 2.2.1.4), reservando en esta ocasión el resto para la obtención directa de ésteres metílicos (Materiales y Métodos, 2.2.1.3)

En general, en caso de ser necesario, las muestras se evaporaban bajo atmósfera de N₂ a 40°C y se almacenaban a 4°C hasta su posterior uso, para lo cual se resuspendían en heptano.

2.2.1.2 Separación de TAGs mediante cromatografía en capa fina (TLC)

La cromatografía en capa fina (TLC) es una técnica de separación que se basa en el equilibrio existente entre la adsorción de las moléculas sobre una fase fija de polaridad variable y la solubilidad de las mismas en una fase móvil. Se utiliza como soporte o fase fija gel de sílice y como fase móvil disolventes orgánicos mezclados en diferente proporción según la polaridad requerida para separar las diferentes clases de lípidos.

Las placas utilizadas fueron de gel de sílice (Merck Millipore, Alemania) de 20x20 cm y 0,25 mm de grosor. Previamente a su utilización, las placas se activaban durante 30 min a 110°C para eliminar la humedad.

Las mezclas de lípidos que se deseaban separar se concentraron en un pequeño volumen de disolvente y se cargaron en un estrecho frente a 3 cm del extremo inferior de la placa a la par que los patrones lipídicos. El desarrollo se realizó en cubetas de vidrio utilizando como líquido de desarrollo diferentes mezclas de disolventes según la naturaleza de las muestras a separar. Finalmente, la separación se detenía a falta de 3 cm del límite superior de la placa.

En este trabajo, esta técnica se empleó para separar *lípidos neutros* de muestras procedentes tanto de la extracción de lípidos totales de levaduras (Materiales y Métodos, 2.2.1.1.1) como de los ensayos de actividad *HaDAGAT in vitro* (Materiales y Métodos, 2.2.2.1). Para tal fin se utilizó una mezcla de desarrollo compuesta por hexano/éter dietílico/ácido acético (80:20:1, v/v/v) (Christie, 1982) para el primer caso y una mezcla de hexano/éter dietílico (80:20, v/v) para el segundo. Estos desarrollos separan los lípidos de mayor a menor polaridad, siendo los fosfolípidos (LP) el primer grupo en separarse al ser polares, seguido de los diacilglicéridos (DAG) por presentar un grupo hidroxilo libre el cuál le confiere cierta polaridad, los ácidos grasos libres (AG) debido a la polaridad de su grupo carboxilo, los triacilglicéridos (TAG) y los esteroides (ST), que constituyen la fracción más apolar y, por tanto, la que menos se retiene en la sílice (Figura 19). El tiempo requerido para obtener una óptima separación fue de 30 min a 1 h aprox.

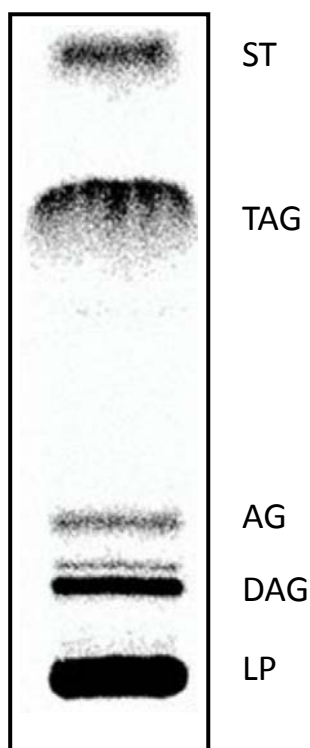


Figura 19. Separación de lípidos neutros por cromatografía en capa fina (TLC). AG: ácidos grasos | DAG: diacilglicéridos | LP: lípidos polares | ST: esteroides | TAG: triacilglicéridos.

Para recuperar los TAGs de interés se tiñó la placa levemente con yodo, se marcaron las zonas correspondientes a su banda tomando como referencia la altura de los patrones y se rasparon con ayuda de una espátula. A continuación, los TAGs destinados al análisis lipídico *in vivo* de levaduras (Resultados, 1.4.1.3 y 2.4.1.3) se eluyeron de la sílice con 5 mL de cloroformo/metanol (2:1, v/v) ó 2 mL de éter, se evaporaron y se resuspendieron en 150 μ L de heptano para su posterior análisis mediante cromatografía de gases (Materiales y Métodos, 2.2.1.4), mientras que a los TAGs destinados a los ensayos de actividad *HaDAGAT in vitro* (Resultados, 2.4.1.4) se les añadió directamente líquido de centelleo para cuantificar su radiactividad (Materiales y Métodos, 2.2.2.2).

2.2.1.3 Obtención de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES)

Para determinar la composición en ácidos grasos de los TAGs mediante cromatografía de gases (Materiales y Métodos, 2.2.1.4) fue necesario obtener previamente sus ésteres metílicos (FAMES, *Fatty Acid Methyl Esters*). Para ello se empleó un método de metilación rápida (Garcés y Mancha, 1993), que consistió en la formación de ésteres metílicos a partir de los ácidos grasos mediante un proceso de transesterificación (Figura 20).

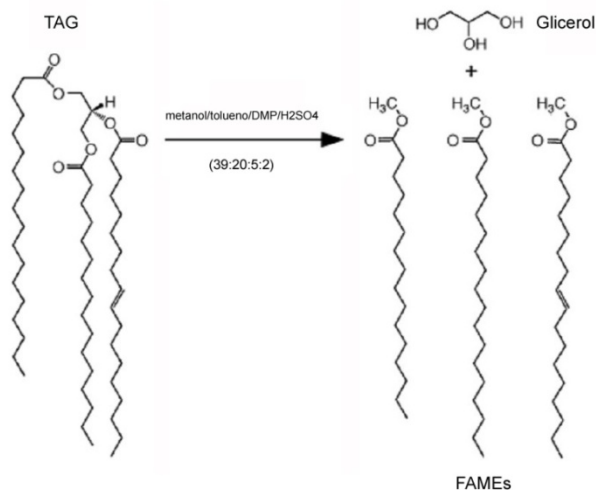


Figura 20. Esterificación de triacilglicérido (TAG) en sus ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES). Modificado de Scott *et al.*, 2010.

En este trabajo, este método se empleó tanto para TAGs de levaduras extraídos mediante TLC (Materiales y Métodos, 2.2.1.2) como para TAGs de semillas de *Arabidopsis* (Materiales y Métodos, 2.2.1.1.2). Para tal fin se añadieron 3 mL de una mezcla de metilar compuesta por metanol/tolueno/H₂SO₄ (88:10:2, v/v/v) más 1 mL de heptano para el primer caso y 0,9 mL de una mezcla de metilar de metanol/tolueno/dimetoxipropano/H₂SO₄ (39:20:5:2, v/v/v/v) para el segundo.

En ambos casos, las muestras se incubaron durante 1 hora a 80°C. Una vez enfriadas, se extrajo la fase superior de heptano donde se encontraban los FAMES, se pasó a un tubo limpio, se evaporó en atmósfera de N₂ y se resuspendió en 150 µL de heptano para su análisis mediante cromatografía de gases (Materiales y Métodos, 2.2.1.4).

Por último, la determinación de la composición de ácidos grasos en los TAGs de la línea de girasol HOHE no necesitó de la obtención previa de FAMES, ya que ésta se realizó a partir de los porcentajes de las distintas especies de TAGs obtenidas. La composición de ácidos grasos, por tanto, se calculó asumiendo que cada ácido graso en la molécula de TAG representa una tercera parte del porcentaje de esa molécula en el total de TAGs (Ruiz-López *et al.*, 2003) (Materiales y Métodos, 2.3.2).

2.2.1.4 Separación de TAGs y FAMES mediante cromatografía de gases (GC)

La cromatografía de gases (GC) es una técnica de separación que se basa en la capacidad de volatilización de los componentes de una mezcla orgánica compleja. Así pues, para llevar a cabo la separación se inyecta una pequeña cantidad de la muestra a separar a través de una columna cromatográfica (fase fija) la cual estará sometida a una corriente de gas inerte (fase móvil) a elevada temperatura, separando así los componentes de la mezcla a distintos intervalos (tiempos de retención) en función de su naturaleza química. En este caso, y a diferencia de otras técnicas cromatográficas, la fase móvil no está en contacto con las muestras a separar. Finalmente, los componentes separados emergerán de la columna y pasarán a través de un sistema de detección que permitirá analizar los resultados (Figura 21).

Esta técnica permite no sólo separar mezclas orgánicas complejas, sino que además permite determinar cuantitativa y cualitativamente los componentes de éstas. Para el análisis cualitativo se suele emplear el tiempo de retención citado, que es único para cada compuesto dadas unas determinadas condiciones (mismo gas portador, rampa de temperatura y flujo) y para el análisis cuantitativo se suele integrar el área de cada pico, obteniéndose así la concentración o cantidad presente de cada componente.

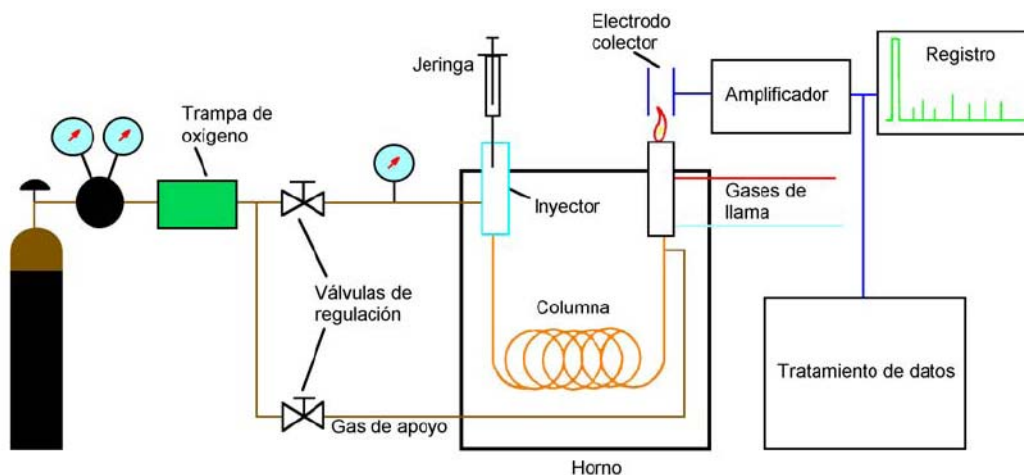


Figura 21. Esquema general de un cromatógrafo de gases (GC).

Para determinar **la composición de triacilglicéridos** se separaron y cuantificaron en un cromatógrafo Agilent modelo 6890 (EEUU), con una columna capilar de sílice fundida 007-65HT (15 m de longitud, 0,25 mm de luz interna y 0,10 μm de grosor de fase) con una fase de polaridad media de (65% fenil) metilpolisiloxano de Quadrex (EEUU). La temperatura del inyector fue 350°C, la del horno 335°C y la del detector 370°C. La razón de división de la muestra (“split”) fue 1:50, variando el tiempo para cada análisis individual en función de la procedencia de las muestras. Se utilizó una rampa de presión de 90 a 130 kPa a una velocidad de 4 kPa/min. Tras 5 min se continuó subiendo la presión a 5 kPa/min hasta alcanzar 140 kPa. El factor de respuesta del detector corregido (Carelli y Cert, 1993). El software empleado para analizar los resultados fue Agilent ChemStation.

Para determinar la **composición de ácidos grasos de TAGs** se separaron y cuantificaron los FAMES en un cromatógrafo PerkinElmer modelo Clarus 500 (EEUU), con una columna capilar de sílice fundida SP2380 (60 m de longitud, 0,25 mm de luz interna y 0,20 μm de grosor de fase) (Supelco, Bellefonte, Penn., USA) y un detector de ionización de llama. El gas portador utilizado fue hidrógeno con una velocidad lineal de 28 cm/s. La temperatura del detector y del inyector fueron de 220°C, la temperatura del horno 170°C, y la razón de división de la muestra (“split”) 1:50, variando el tiempo para cada análisis individual en función de la procedencia de las muestras. El software empleado para analizar los resultados fue TotalChrom Workstation 6.3.1.

La identificación de los picos cromatográficos en ambos casos se determinó por comparación con patrones estándar (Sigma-Aldrich, EEUU) y/o muestras conocidas de levadura, girasol (Fernández-Moya *et al.*, 2000) y *A. thaliana* Col-0.

2.2.2 Caracterización bioquímica de *Ha*DAGATs

2.2.2.1 Ensayos de actividad *Ha*DAGAT *in vitro*

La actividad *Ha*DAGAT se midió como la cantidad de acil-CoA radiactivo incorporado a TAG por unidad de tiempo y cantidad de proteína microsomal ensayada.

La mezcla de reacción de 60 μL en condiciones estándar contenía los siguientes componentes (Modificado de Siloto *et al.*, 2009): 35 μL de tampón de stock (Materiales y Métodos, 1.7.2.2), 5 μL DAG (4mM *sn*-1,2-dioleína en 0,2% Tween 20) previamente sonicado, 5 μL [$1\text{-}^{14}\text{C}$] acil-CoA (180 μM [$1\text{-}^{14}\text{C}$] acil-CoA en tampón sodio acetate 100mM, pH 5.0), 10 μL proteínas microsomales (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y 5 μL dH₂O. El ensayo se realizó por triplicado. Cada reacción se detuvo añadiendo 10 μL de SDS al 10% a tiempos $t=0$ y $t=10$, con agitación en vórtex. A continuación, se separaron los lípidos neutros de 50 μL de cada muestra mediante cromatografía en capa fina (TLC) (Materiales y Métodos, 2.2.1.2) con un desarrollo de hexano/éter (80:20, v/v) durante 1 h aprox.

Para estudiar la influencia del pH sobre la actividad enzimática, se utilizó un tampón de amplio rango (Materiales y Métodos, 1.7.1.5) y $2 \mu\text{M}$ [$1\text{-}^{14}\text{C}$] 18:1-CoA como donador de acilos. Para estudiar la especificidad por sustrato, se utilizaron [$1\text{-}^{14}\text{C}$] 18:0-CoA y [$1\text{-}^{14}\text{C}$] 18:1-CoA como donadores de acilos.

2.2.2.2 Cuantificación de la radiactividad y determinación de la cantidad TAGs formados

Para medir la radiactividad presente en los TAGs sintetizados se utilizó un contador de líquido de centelleo LS6500 (Beckman CoulterTM, EEUU) previamente calibrado. Para ello, se utilizaron viales de centelleo de polietileno de 5 mL de capacidad a los que se les añadió las bandas de TAGs recuperadas mediante raspado de cada TLC (Materiales y Métodos, 2.2.1.2) y 5 mL de líquido de centelleo EcoscintTM H (National Diagnostics, Reino Unido). Después de agitar fuertemente se cuantificó la radiactividad durante 240 s.

Para determinar la actividad *Ha*DAGAT se calculó inicialmente la cantidad de TAGs formados por unidad de tiempo. Primeramente se calculó el diferencial de desintegraciones por minuto (Δdpm) cuantificado en el contador de centelleo para cada muestra. A continuación se multiplicó por 7/5, corrigiéndose así el volumen de muestra empleado frente al volumen inicial de partida, incluyendo los 10 μL de SDS al 10% añadido para detener cada reacción. Para convertir dpm a pmol fue necesario dividir inicialmente por 2200 dpm/nCi, dividir por la actividad específica radiactiva del acil-CoA (Xmol/nCi) y multiplicar por 1000 pmol/nmol. En último lugar, se dividió por los 10 min de tiempo de reacción y 10 μL de proteínas microsomales por 1000 $\mu\text{L}/\text{mL}$, obteniendo así pmol de TAG formado/min/mL. Para obtener la actividad específica sólo hubo que dividir por la concentración de proteínas microsomales (mg/mL), obteniendo pmol/min/mg. Finalmente, se calculó la actividad específica media y la desviación estándar (SD) a partir de los triplicados.

2.3 BIOINFORMÁTICA

2.3.1 Análisis informático de secuencias de DNA y proteínas

Las secuencias obtenidas tras la secuenciación (Materiales y Métodos, 2.1.7) fueron visualizadas mediante el programa GATCViewer (GATC-Biotech) e identificadas mediante homología con secuencias conocidas utilizando el programa BLAST 2.0 (Basic Local Alignment Search Tools). Los mapas de restricción, tanto de los genes a clonar como de los correspondientes vectores de expresión, se realizaron mediante el programa NEBcutter 2.0 (Vincze *et al.*, 2003). El diseño de oligonucleótidos empleados en el genotipado de las líneas KO de *A. thaliana* (Materiales y Métodos, 2.1.8.4.1) se realizó mediante el programa T-DNA Primer Design (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>).

Los alineamientos de secuencias de nucleótidos o aminoácidos iniciales se llevaron a cabo utilizando el programa informático ClustalX v2.0 (Larkin *et al.*, 2007). Los alineamientos posteriores de secuencias aminoacídicas completas se realizaron mediante el programa Clustal Omega 1.1.0 (Sievers *et al.*, 2011) y Jalview 2.8 (Waterhouse *et al.*, 2009) para su visualización. Para la construcción de árboles filogenéticos se empleó el programa MEGA 5.10 (Tamura *et al.*, 2011). Asimismo, los paquetes informáticos BioEdit (Hall, 1999), SEQtools 8.4 (Rasmussen, 2007) y DNATools 6.0 (Carlsberg Research Center, Dinamarca) aportaron numerosas herramientas para manejar las secuencias como la búsqueda de marcos abiertos de lectura (ORFs) o la traducción de las secuencias de los nucleótidos a aminoácidos, entre otras.

Las estimaciones de diversos parámetros físico-químicos a partir de las secuencias polipeptídicas se realizaron con las herramientas ProtParam y ProtScale disponibles en el servidor de ExPaSy (Gasteiger *et al.*, 2003). Las predicciones de dominios transmembrana (TMDs) para cada enzima se realizó mediante el programa TMHMM 2.0 (Krogh *et al.*, 2001). Para el estudio de la posible presencia de péptidos señal en la región N-terminal y el análisis de la localización celular de las proteínas se utilizaron los siguientes programas: WOLF PSORT (Horton *et al.*, 2007), Protein Prowler Prediction (Bodén y Hawkins, 2005)

y TargetP 1.1 (Emanuelsson *et al.*, 2000). Finalmente, se usó el programa Geneious 5.4.4 (Biomatters Ltd., Nueva Zelanda) para las representaciones esquemáticas de cada enzima.

2.3.2 Análisis informático de muestras y datos

Los porcentajes de las distintas especies obtenidas en el análisis de la composición de TAGs (Materiales y Métodos, 2.2.1.4) permitieron calcular no sólo las especies moleculares esperadas de éstos, sino también la composición de ácidos grasos presentes en ellos, así como el coeficiente de asimetría α Sat.

Las gráficas presentes en este trabajo se realizaron mediante el uso del programa OriginPro 9.1, así como las tablas de distribución de frecuencias y cálculos estadísticos descriptivos (Materiales y Métodos, 2.4.1).

Igualmente se emplearon diversas bases de datos, entre las que destacan:

NCBI	National Center for Biotechnology Information http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Brenda	The Comprehensive Enzyme Information System http://www.brenda-enzymes.org/
TAIR	The Arabidopsis Information Resource http://www.arabidopsis.org/index.jsp
uNASC	European Arabidopsis Stock Centre http://arabidopsis.info/home.html
AraLip	Arabidopsis Acyl-Lipid Metabolism http://aralip.plantbiology.msu.edu/pathways/pathways
iHOP	Information Hyperlinked over Proteins http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/

2.4 BIOESTADÍSTICA

En general, para el conjunto de datos analizados en el presente estudio se realizaron cálculos de las medias y desviación estándar (SD) (Materiales y Métodos, 2.4.1) de al menos tres muestras o réplicas, comentados en sus correspondientes apartados. A continuación nos centraremos en la bioestadística desarrollada para la obtención de nuevos mutantes con composición de aceite modificada a partir de la línea segregante alto oleico alto esteárico (HOHE) previamente descrita (Introducción, 5.2.1). Toda esta bioestadística se realizó mediante el programa OriginPro 9.1 (Materiales y Métodos, 2.3.2).

2.4.1 Estadística descriptiva

Los valores registrados para cada una de las cuatro variables analizadas (Materiales y Métodos, 2.5) se recogieron en **tablas de distribución de frecuencias**, agrupados en intervalos de clase para facilitar su estudio. En ellas se recogen diferentes frecuencias asociadas a dichos valores: frecuencias absolutas (FA), frecuencias relativas (FR), frecuencias absolutas acumuladas (FAA) y frecuencias relativas acumuladas (FRA). FA indica la cantidad de datos que hay en cada intervalo de clase de la variable analizada, coincidiendo la suma de todas éstas con el tamaño poblacional. Con FR se obtienen las frecuencias relativas al total de datos, es decir, el cociente entre la correspondiente FA y el total de datos, pudiendo ser interpretadas como porcentajes. Para el cálculo de las frecuencias se contabilizaron en cada intervalo de clase aquellos datos comprendidos entre los límites inferior (LI) y superior (LS) de dicho intervalo. La definición de los límites de cada intervalo se realizó considerando los LI cerrados y los LS abiertos, esto es: valores exactamente iguales a un LI serán incluidos en el segundo de los dos intervalos que tengan este valor como límite; igualmente, valores coincidentes a un LS se contabilizarán en el segundo de los dos intervalos que tengan este valor como límite. En cuanto a la determinación de la cantidad y amplitud de éstos, ésta se realizó de manera arbitraria, si bien se tuvieron en cuenta ciertos criterios generales. Los intervalos englobaron al 100% de los valores analizados, procurando la no saturación de unos en detrimento de otros, manteniendo un margen recomendado de 5 a 15 intervalos. No obstante, y

debido a la naturaleza de dichos valores, la necesidad de delimitar el valor elegido para la selección y la propia evolución experimentada por las poblaciones a favor de dicha selección, se optó finalmente por un número de 4-6 intervalos con una amplitud equidistante entre ellos.

Las frecuencias absolutas (FA) determinadas en la tabla de distribución de frecuencias se representaron gráficamente a través de **histogramas**, mientras que las frecuencias relativas (FR), expresadas en porcentaje, lo fueron mediante **gráficos de sectores**, en función de las clases o intervalos generados. Los histogramas, sumado a una serie de estadísticos descriptivos que analizaremos a continuación, permitieron conocer la distribución poblacional de cada variable de manera empírica. Los gráficos de sectores permitieron visualizar la proporción de valores en cada clase o intervalo de la variable analizada.

Además de estos gráficos, y con idea de complementar y profundizar en el estudio de la distribución poblacional en cada generación, se calcularon los siguientes **estadísticos descriptivos**.

2.4.1.1 Medidas de tendencia central o posición

Media, entendida como la suma de todos los valores de una variable dividida entre el número total de datos de los que se dispone.

Mediana, entendida como el valor que deja a la mitad de los datos por encima de dicho valor y a la otra mitad por debajo, en otras palabras, el valor equidistante de los extremos.

Percentiles 10/90, entendidos como los valores de la variable por debajo de los cuales se encuentran el 10 y 90% del total de datos, respectivamente.

2.4.1.2 Medidas de dispersión

Desviación estándar (SD), entendida como la raíz cuadrada de la varianza y expresa la dispersión de la distribución.

Valor mínimo (Min), entendido como el menor de los valores presente en la distribución.

Valor máximo (Max), entendido como el mayor de los valores presente en la distribución.

Rango o amplitud, entendida como la diferencia entre el valor mayor y el menor de la distribución.

Varianza, entendida como la media de los cuadrados de las diferencias entre cada valor de la variable y la media aritmética de la distribución. Permite realizar estadística inferencial mediante análisis de la varianza, ANOVA (Materiales y Métodos, 2.4.2).

Coefficiente de variación (CV), entendido como el cociente entre la desviación típica muestral por la media, lo que nos permite comparar la dispersión o variabilidad de dos o más variables expresadas en diferentes magnitudes (Materiales y Métodos, 2.4.2).

2.4.1.3 Medidas de forma de la distribución

Coefficiente de curtosis, entendido como el grado de concentración que presentan los valores alrededor de la media de la distribución.

Coefficiente de asimetría, entendido como el grado de uniformidad que presentan los valores a ambos lados de la media de la distribución.

2.4.2 Estadística inferencial

Test de Normalidad, se realizó el test de Kolmogorov-Smirnov que evalúa la similitud de la distribución de los datos con una distribución normal; recomendado para muestras grandes $n \geq 50$

Análisis de la varianza (ANOVA), se realizó para ver si las varianzas eran iguales o diferentes y decantarse por un contraste de hipótesis para la diferencia entre dos medias u otro en función de esto, es decir, permite generalizar el contraste de igualdad de medias de varias poblaciones dadas.

El coeficiente de variación (CV), se usó en estadística inferencial para comparar distribuciones de variables medidas en diferentes magnitudes o iguales magnitudes pero medidas en diferentes unidades. Así mismo, permite hacer comparaciones entre dos o más poblaciones diferentes o aun de una misma población que haya sufrido distintas modificaciones. Un alto valor en porcentaje sugiere escasa confiabilidad de los datos; por el contrario, un valor bajo indica un buen manejo de las unidades experimentales. Si un conjunto de datos tiene menor coeficiente de variación que otro, indica comportamiento más homogéneo.

Para el estudio de posibles tendencias en las relaciones entre variables se emplearon los denominados **diagramas de dispersión**. Por regla general, los valores de la variable independiente se situaron en el eje X y los valores de la otra variable, en teoría dependiente, en el eje Y. No obstante, a veces, dicha distribución fue aleatoria, indistintamente de la naturaleza de las variables a relacionar. En nuestro estudio, al presentar hasta cuatro variables o parámetros diferentes (Materiales y Métodos, 2.5), se recurrió a la representación gráfica mediante **matrices de diagramas de dispersión**, lo que permitió visualizar multidimensionalmente las relaciones existentes entre estas variables en su conjunto.

Para minimizar las diferencias entre la curva de ajuste y la nube de puntos y así poder predecir valores de la variable dependiente a valores de la independiente dados, y viceversa, se emplearon las **funciones de ajuste**. Mediante estas funciones se puede diferenciar entre las predicciones para valores distintos a los empleados en el ajuste cuando se encuentran dentro del rango de valores de ajuste (*interpolaciones*) de aquéllas que se encuentran fuera de dicho rango (*extrapolaciones*).

Análisis de bondad del ajuste. El ajuste no estaría totalmente resuelto si no viniera acompañado de una medida de su bondad, es decir, de un valor, a ser posible acotado en un intervalo, que exprese en qué porcentaje la variable dependiente se explica por la independiente a través del ajuste realizado. Para ello se calculó el **coeficiente de determinación (R^2)**. Esta medida toma valores en $[0,1]$, interpretándose que la variable Y se explica en un $100 * R^2\%$ por la variable X , mientras que el resto, es decir el $100 * (1 - R^2)\%$, se explicaría por una parte a través de una mejora de la función de ajuste, por otra incorporando, si es factible, información nueva (otras variables, con lo que se tendría un modelo de regresión múltiple) y por la variabilidad intrínseca de los datos. Para el caso de ajuste lineal existe un coeficiente específico de bondad de ajuste denominado **coeficiente de correlación lineal (r)**, que toma valores en el intervalo $[-1, 1]$ y que además de medir la intensidad de la relación indica si ésta es de tipo directo, cuando X crece Y crece, o inverso, cuando X crece Y decrece. Se verifica que $r^2 = R^2$. El coeficiente de correlación indica si las variables se relacionan de forma lineal pero no que existe una relación de causalidad. Para el caso de correlaciones exponenciales se usó el **coeficiente de correlación Chi cuadrado reducido**.

Además, y de forma complementaria, se realizó un **Análisis de Componentes Principales (ACP)**, el cual permitió estudiar las relaciones múltiples entre variables. Esto se consigue traduciendo las variables en índices y usando éstos para definir los ejes de nuevos diagramas de dispersión. Estos índices o variables sintéticas se denominan componentes principales (CP) y permiten explicar mejor las diferencias entre unidades de análisis. En este caso, el valor de las CP no es importante como tal, ya que éstas son índices cuya escala depende de la

combinación particular de variables que representen. El valor del eje solo es importante para identificar qué observaciones tienen mayores valores positivos y cuáles más negativos. Unidades de análisis con valores de CP parecidos son más parecidas entre sí que unidades con valores más distantes y, por tanto, más alejados en el plano de representación. El “parecido” implica similitud de todo el perfil de variables, es un parecido en sentido multivariado. Los vectores que representan las variables surgen del centro de la gráfica y se puede inferir que:

1. Vectores que van para el mismo lado del gráfico, es decir, con ángulos agudos conformados entre ellos, sugieren variables correlacionadas positivamente.
2. Vectores que oponen su sentido, es decir, que tienden a formar ángulos llanos, sugieren variables correlacionadas negativamente.
3. Vectores que forman ángulos rectos, sugieren variables no correlacionadas.

Los vectores de variables que se dirigen hacia valores altos de la CP indican que esa variable asume valores altos en las unidades de análisis que tienen también los valores más altos para la componente. Análogamente, se concluye respecto a los vectores que tienen valores bajos de la componente. De esta manera, el Análisis de Componentes Principales permite no sólo analizar la variabilidad entre unidades de análisis y la correlación entre variables sino también analizar la correlación entre valores de variables y unidades de análisis. Usualmente, los gráficos biplot del ACP representan bien la estructura de la tabla de datos cuando la suma de los porcentajes de variabilidad explicados por cada eje es mayor al 60 o 70%.

2.4.3 Genética cuantitativa

La estimación de los parámetros genéticos es indispensable cuando una población se ha sometido a un proceso continuo de selección y se desea saber qué tan efectiva ha sido ésta en producir cambios favorables (Allard, 1975; Vargas *et al.*, 1982). Para calcular estos parámetros necesitamos medidas de posición y dispersión calculadas en Materiales y Métodos, 2.4.1.

Entre estos parámetros genéticos destacamos ***diferencial de selección, respuesta a la selección y heredabilidad***, de los que se hace una pequeña estima en este trabajo.

2.5 DISEÑO EXPERIMENTAL Y CRITERIOS DE SELECCIÓN PARA EL ESTUDIO DE NUEVOS MUTANTES HOHE

Como ya mencionamos, el punto de partida de nuestro diseño experimental para el estudio de nuevos mutantes fue una línea segregante de girasol, con fenotipo alto esteárico en fondo alto oleico (HOHE), proporcionada por la empresa ADVANTA, y cuyas principales características se detallan en Introducción, 5.2.1.

Con el objetivo de inducir variabilidad, no sólo en la composición de ácidos grasos en el aceite de esta línea, sino también mejorar la distribución de estos ácidos grasos en las especies de TAGs, se expusieron semillas maduras de dicha línea a etil metano sulfonato (EMS) como agente mutagénico. Las semillas tratadas de esta forma se germinaron y crecieron en campo o invernadero (Materiales y Métodos, 1.4.4.1). Las plantas de la primera generación (M_1) se autofecundaron y sus semillas (M_2) se recolectaron para la selección de los posibles mutantes, tal como se esquematiza en la Figura 22.

El análisis de cada progenie se llevó a cabo mediante la extracción de lípidos totales de un número determinado de estas semillas mediante la técnica de la media semilla (Materiales y Métodos, 2.2.1.1.2) y se sometieron a un posterior análisis de TAGs mediante cromatografía de gases (Materiales y Métodos, 2.2.1.4). A partir de dicho análisis y del cálculo de otros parámetros tales como contenidos en ácidos grasos, especies moleculares TAGs y coeficiente de asimetría α Sat (Materiales y Métodos, 2.3.2), se generó una gran cantidad de datos sujetos a ser clasificados y seleccionados.

De forma genérica, para describir las distintas poblaciones, generación tras generación, nos fijamos en los siguientes parámetros: contenidos en EOE, E, SUS y valores α Sat. El contenido en oleico (O) no fue un parámetro a tener en cuenta a priori ya que el carácter alto oleico se considera fijado.

Finalmente, se emplearon una serie de criterios de selección relativos a los parámetros citados anteriormente que debían cumplir los candidatos. Estos fueron:

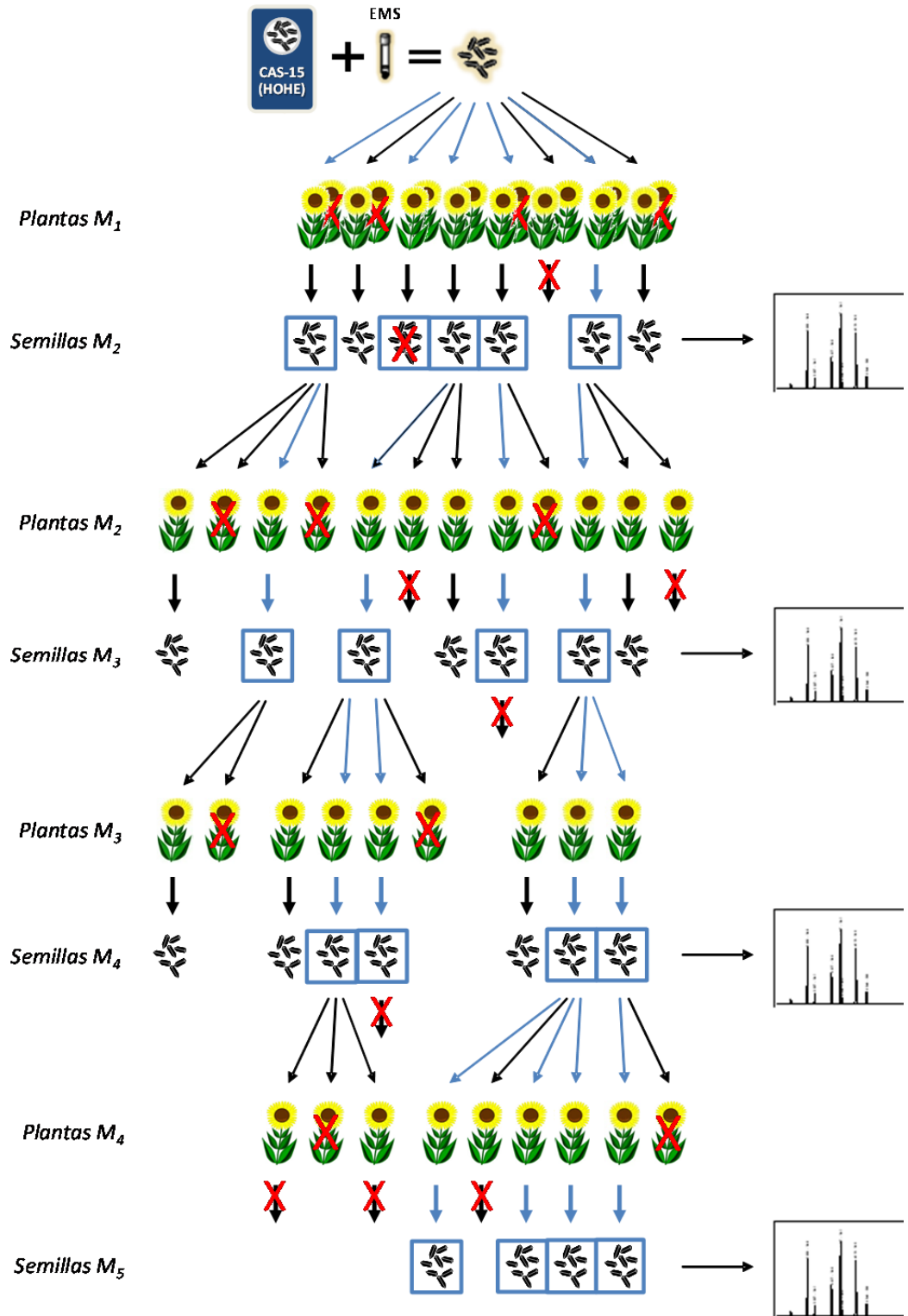
- Contenido en EOE ≥ 8 (Patente 2003).
- Contenido en E ≥ 20 (Izquierdo 2013).
- Contenido en SUS ≥ 20 (Patente 2003).
- Valor α Sat $\geq 0,30$ (Martínez-Force *et al.*, 2009).

Estos criterios de selección permitieron aglutinar en un mismo estudio el punto de partida inicial de este apartado: obtener nuevos mutantes que contengan una mayor proporción de TAGs del tipo SUS, ya sea debido a un incremento en el contenido de ácido esteárico (E) o una mejor distribución de los AGs saturados en los TAGs y, en consecuencia, valores α Sat próximos al 0,5 óptimo.

Mediante este análisis se fueron seleccionando los candidatos, a partir de los cuáles, tras cultivo de sus medias semillas restantes, autofecundación y obtención de nuevas poblaciones de plantas, se volvieron a analizar y seleccionar entre las semillas que se recolectaron. De esta manera se obtuvieron las sucesivas generaciones de la línea HOHE, un total de cuatro, M₂-M₅ (Figura 22).

LIMITACIONES: Como se puede deducir de lo anteriormente descrito, el hecho de obtener una nueva generación a partir de semillas seleccionadas está supeditada o limitada por una serie de factores que comprometen el éxito del trabajo realizado. Entre estos factores se encontraron bajas tasas de germinación de las semillas, la no supervivencia de la plántula resultante y/o el nulo crecimiento y reproducción de las plantas derivadas. Las causas de estos factores pueden ser de origen muy variable, desde una incorrecta manipulación y/o monitorización (errores humanos/técnicos) hasta cualidades intrínsecas de las propias semillas/plantas, por lo que no se profundizó en estos términos. Para tratar de solventar estos problemas y, con ello, aumentar la probabilidad combinada de que una semilla viable germine y la plántula originada sobreviva, se utilizó un número de semillas suficientemente grande, garantizando así un número mínimo de plantas. Aun así, a consecuencia de esto, algunas poblaciones seleccionadas se vieron mermadas de una u otra forma, incluso llegando a desaparecer por falta de semillas en sus sobres. A esto hubo que sumarle los propios descartes fruto de la no presencia de valores deseados en semillas pese a provenir de una generación anterior previamente seleccionada, por lo que no se continuaba su estudio. Todos estos procesos aparecen reflejados en la Figura 22.

Figura 22. Esquema representativo del diseño experimental seguido para la obtención de nuevas generaciones mediante análisis y selección de semillas procedentes de la línea segregante alto oleico alto esteárico (HOHE) de girasol.



RESULTADOS | 155-252

BLOQUE I: CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ENZIMÁTICA DE LAS ACILTRANSFERASAS IMPLICADAS EN LA BIOSÍNTESIS DE TRIACILGLICÉRIDOS EN GIRASOL 157

1. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ENZIMÁTICA DE LAS ENZIMAS LISOFOSFATIDATO ACILTRANSFERASAS 1 Y 2 (*HaLPAAT1* Y *HaLPAAT2*) 157

1.1 CLONACIÓN DE LOS GENES *HaLPAATs* 157

1.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *HaLPAATs* 161

1.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE *HaLPAATs* EN SEMILLAS Y TEJIDOS VEGETATIVOS 166

1.4 CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE *HaLPAATs* 168

2. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ENZIMÁTICA DE LAS ENZIMAS DIACILGLICEROL ACILTRANSFERASAS 1A, 1B Y 2 (*HaDAGAT1A*, *HaDAGAT1B* Y *HaLPAAT2*) 175

2.1 CLONACIÓN DE LOS GENES *HaDAGATs* 175

2.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *HaDAGATs* 179

2.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE *HaDAGATs* EN SEMILLAS Y TEJIDOS VEGETATIVOS 189

2.4 CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE *HaDAGATs* 191

BLOQUE II: ANÁLISIS DE TRIACILGLICÉRIDOS (TAGs) EN LÍNEAS MUTAGENIZADAS DE GIRASOL ALTO OLEICO ALTO ESTEÁRICO (HOHE) Y SELECCIÓN DE NUEVOS CANDIDATOS 203

1. OBJETIVO Y CRITERIOS DE SELECCIÓN 203

2. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE POBLACIONES (M_2 - M_5) 204

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE POBLACIONES (M_2 - M_5) 206

BLOQUE I: CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ENZIMÁTICA DE LAS ACILTRANSFERASAS IMPLICADAS EN LA BIOSÍNTESIS DE TRIACILGLICÉRIDOS EN GIRASOL

1. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ENZIMÁTICA DE LAS ENZIMAS LISOFOSFATIDATO ACILTRANSFERASAS *Ha*LPAAAT1 y *Ha*LPAAAT2

1.1 CLONACIÓN DE LOS GENES *Ha*LPAAATs

En el desarrollo de este trabajo se han identificado dos genes diferentes que codifican para las enzimas lisofosfatidato aciltransferasas de *Helianthus annuus*, denominadas *Ha*LPAAAT1 y *Ha*LPAAAT2.

1.1.1 Clonación de fragmentos internos de *Ha*LPAAATs

A partir de las secuencias nucleotídicas de genes que codifican para LPATs microsomales de origen vegetal junto con una secuencia parcial (EST) de *Helianthus annuus*, todas ellas disponibles en la base de datos GenBank (Materiales y Métodos, 2.3.1), se realizó un alineamiento para la identificación de regiones homólogas usando el programa ClustalX v2.0 (Larkin *et al.*, 2007), diseñándose a continuación un par de oligonucleótidos degenerados, *LPATf1a* y *LPATr1* (Apéndice I), a partir de zonas altamente conservadas (Figura 23).

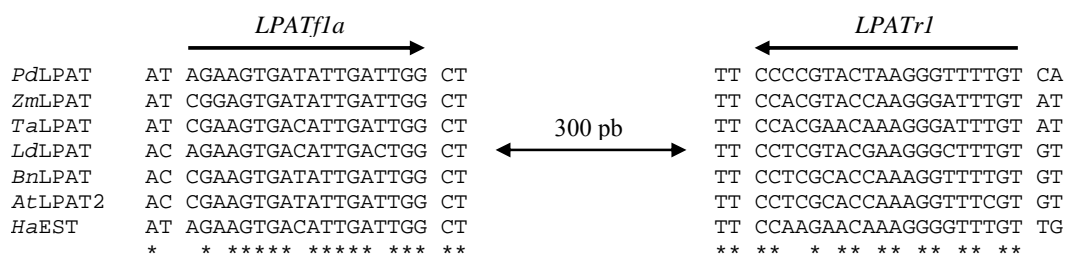


Figura 23. Alineamiento parcial de secuencias nucleotídicas de LPATs de plantas. El alineamiento se realizó mediante el programa Clustal X v2.0. *At*, *Arabidopsis thaliana* (gi | 30694691); *Bn*, *Brassica napus* (gi | 4583543); *Ha*, *Helianthus annuus* (gi | 22459625); *Ld*, *Limnanthes douglasii* (gi | 1067137); *Pd*, *Prunus dulcis* (gi | 6635839); *Ta*, *Triticum aestivum* (gi | 32400848); *Zm*, *Zea mays* (gi | 575959).

Resultados

Usando dicho par de oligonucleótidos degenerados, se consiguió la amplificación mediante PCR de un fragmento interno correspondiente a una de las dos isoformas de la lisofosfatidato aciltransferasa de girasol, *HaLPAAT1*.

Para la obtención del fragmento interno de *HaLPAAT2* hubo que obtener inicialmente los extremos 5' y 3' de dicho gen (Resultados, 1.1.2). De esta manera, se diseñaron oligonucleótidos esta vez específicos a partir de las regiones flanqueantes ya secuenciadas (Figura 24).

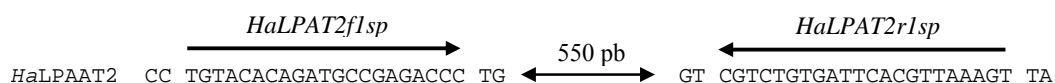


Figura 24. Secuencias nucleotídicas flanqueantes al fragmento interno de *HaLPAAT2*.

Usando los oligonucleótidos específicos *HaLPAT2f1sp* y *HaLPAT2r1sp* (Apéndice I) (Figura 24) se consiguió la amplificación por PCR de un fragmento interno correspondiente a la segunda de las dos isoformas de la lisofosfatidato aciltransferasa de girasol, *HaLPAAT2*.

Para la obtención de ambos fragmentos internos se realizaron reacciones de amplificación por PCR cuyo molde fue cDNA generado a partir de mRNA aislado de semillas de 15 DDF de la línea silvestre CAS-6 (Materiales y Métodos, 2.1.1.3.3) y cuyos parámetros fueron descritos con anterioridad (Materiales y Métodos, 2.1.3.1a). Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa (Materiales y Métodos, 2.1.4.1) y se visualizaron en un transiluminador. De estas reacciones de amplificación se obtuvieron las bandas esperadas de 300 pb para *HaLPAAT1* y 550 pb para *HaLPAAT2*. Éstas se aislaron del gel, se purificaron y clonaron en el vector de clonación pGEM[®]-T Easy (Promega, EEUU) y se transformaron en la estirpe XL1Blue de *E. coli* (Materiales y Métodos, 2.1.8.1). Posteriormente, se aislaron los DNA plasmídicos de los transformantes (Materiales y Métodos, 2.1.1.1.1) y se secuenciaron (Materiales y Métodos, 2.1.7). El análisis bioinformático de las secuencias clonadas se realizó

con el programa Blast del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Altschul *et al.*, 1990), confirmando la identidad de las dos secuencias como fragmentos internos de los mRNA de *HaLPAAT1* y *HaLPAAT2*, con variaciones puntuales entre sus secuencias nucleotídicas.

1.1.2 Obtención de las secuencias completas de cDNA de *HaLPAATs*

Las secuencias completas del **extremo 3'** de ambas *HaLPAATs* se obtuvieron usando el oligonucleótido comercial *FA2Z* (*Apéndice I*), cuya secuencia se incorpora a todas las moléculas de cDNA en la reacción de síntesis a partir del mRNA aislado (Materiales y Métodos, 2.1.1.3.2). Para ello bastó con realizar dos reacciones de PCR seriadas (NESTED) usando los oligonucleótidos específicos *LPATf1sp* y *LPATf2sp* (*Apéndice I*) diseñados a partir del fragmento interno de *HaLPAAT1* clonado (Resultados, 1.1.1), distanciados por 150 pb, en combinación con *FA2Z*, de manera que el producto de la primera reacción de PCR se usó como molde en la segunda. La alta homología secuencial entre ambas *HaLPAATs* permitió obtener así clones de los extremo 3', tanto de *HaLPAAT1* como de *HaLPAAT2*.

Por otro lado, los **extremos 5'** fueron amplificados usando los oligonucleótidos comerciales *UPM mix* (*UPM Long* + *UPM Short*) y *NUP* (*Apéndice I*), cuyas secuencias son añadidas a dicho extremo en la reacción 5' RACE (Materiales y Métodos, 2.1.3.2). Para ello bastó nuevamente con realizar dos reacciones de PCR seriadas (NESTED) usando los oligonucleótidos específicos *LPATr3sp* y *LPATr2sp* (*Apéndice I*) diseñados a partir del fragmento interno de *HaLPAAT1* clonado (Resultados, 1.1.1), en combinación con los oligonucleótidos comerciales ya mencionados y en el que el producto de la primera reacción de PCR se usó como molde en la segunda. De esta manera se obtuvieron clones de los extremos 5' tanto de *HaLPAAT1* como de *HaLPAAT2*.

Resultados

Los fragmentos de PCR obtenidos fueron clonados, secuenciados y ensamblados *in silico*. De esta forma se pudieron deducir los marcos abiertos de lectura (ORFs), obteniéndose las secuencias completas del cDNA de *HalPAAT1*, con su respectiva secuencia aminoacídica (Figura 25A), así como la de *HalPAAT2* (Figura 25B), ambas depositadas en la base de datos GenBank con números de acceso EF514399 [gi | 145692846] y EF563991 [gi | 156122739], respectivamente.

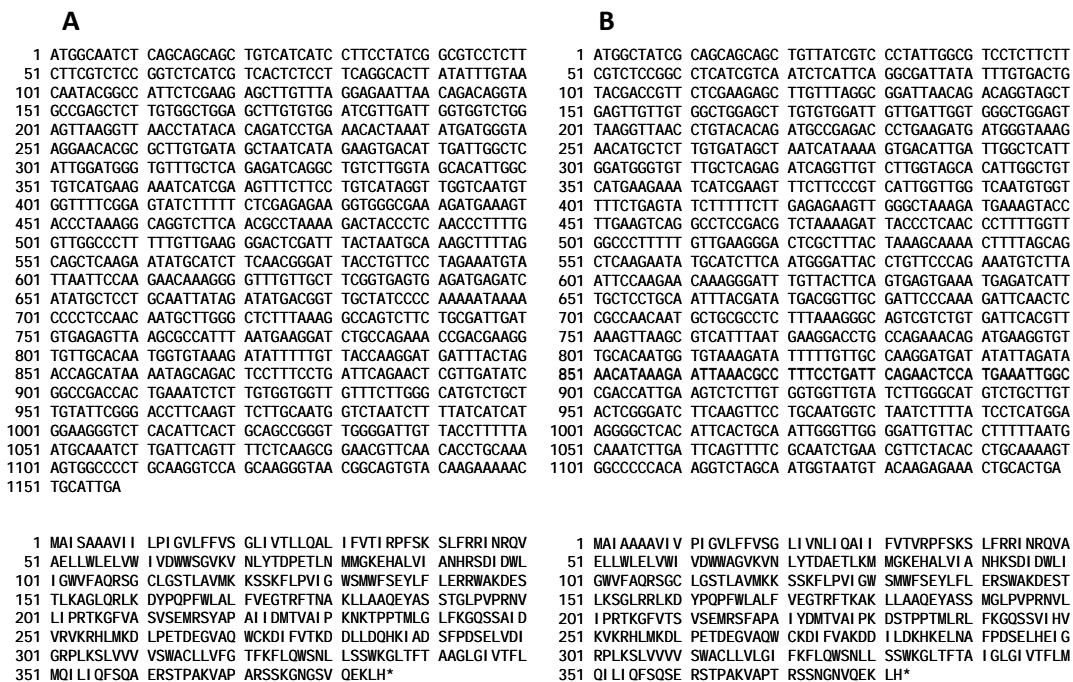


Figura 25. Secuencias completas de los cDNA y proteínas de *HalPAAT1* (A) y de *HalPAAT2* (B) de la línea silvestre CAS-6.

1.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Ha*LPAAATs

1.2.1 Características fisicoquímicas de las secuencias polipeptídicas deducidas a partir de los cDNAs de *Ha*LPAAATs

Las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de la pauta de lectura abierta (ORF) de los cDNA *Ha*LPAAAT1 y *Ha*LPAAAT2 mostraron una serie de propiedades fisicoquímicas resumidas en la siguiente tabla (Tabla 17):

Tabla 17. Propiedades fisicoquímicas de las secuencias aminoacídicas de las *Ha*LPAAATs.

	<i>Ha</i> LPAAAT1	<i>Ha</i> LPAAAT2
Tamaño (Aas)	385	382
Peso molecular (kDa)	43,15	43,08
Punto isoeléctrico (pI)	10,29	10,38
Insolubilidad (%)	82	79
Hidrofobicidad (%)	51,9	52,1
Hidrofilicidad (%)	27,3	25,9
Básico (%)	12,5	13,6
Ácido (%)	8,3	8,4

*Ha*LPAAAT1 y *Ha*LPAAAT2 presentan una diferencia de tamaño de tan sólo 3 aminoácidos, con pesos moleculares estimados en torno a 43 kDa y puntos isoeléctricos prácticamente idénticos. La insolubilidad y hidrofobicidad de ambas *Ha*LPAAATs es notoria, presentando porcentajes en torno al 80% y 52%, respectivamente. Así mismo, la frecuencia de residuos aminoacídicos entre *Ha*LPAAATs es similar, presentando aproximadamente un 12-13% de residuos básicos frente a un 8% de residuos ácidos.

1.2.2 Análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas derivadas de *HaLPAATs*

El análisis filogenético de *HaLPAATs* se realizó mediante previo análisis bioinformático con el programa Blastp del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Altschul *et al.*, 1990), el cual permitió identificar secuencias homólogas entre *HaLPAATs* y otras LPATs. Finalmente, el árbol filogenético incluyendo las secuencias de LPATs del grupo Viridiplantae fue generado mediante el método de Neighbor-Joining (NJ) con el programa MEGA 5.10 (Tamura *et al.*, 2011) (Materiales y Métodos, 2.3.1) (Figura 26). Para enraizar dicho árbol se empleó la secuencia proteica de la LPAT de *Capsaspora owczarzaki*, eucariota unicelular que parece estar relacionado con el origen de las células animales.

En él se observa claramente cómo las *HaLPAATs* se encuentran enclavadas dentro del grupo de las plantas eudicotiledóneas, con un porcentaje de identidad del 90%, manteniendo una relación distante con otras LPATs pertenecientes a especies como *Arabidopsis thaliana*, *Ricinus communis* o *Glycine max*, entre otras. Cabe destacar que ambas *HaLPAATs* presentan mayor homología con las isoformas LPAT2 que con las LPAT3 de especies como *A. thaliana* y *G. max* (Figura 26).

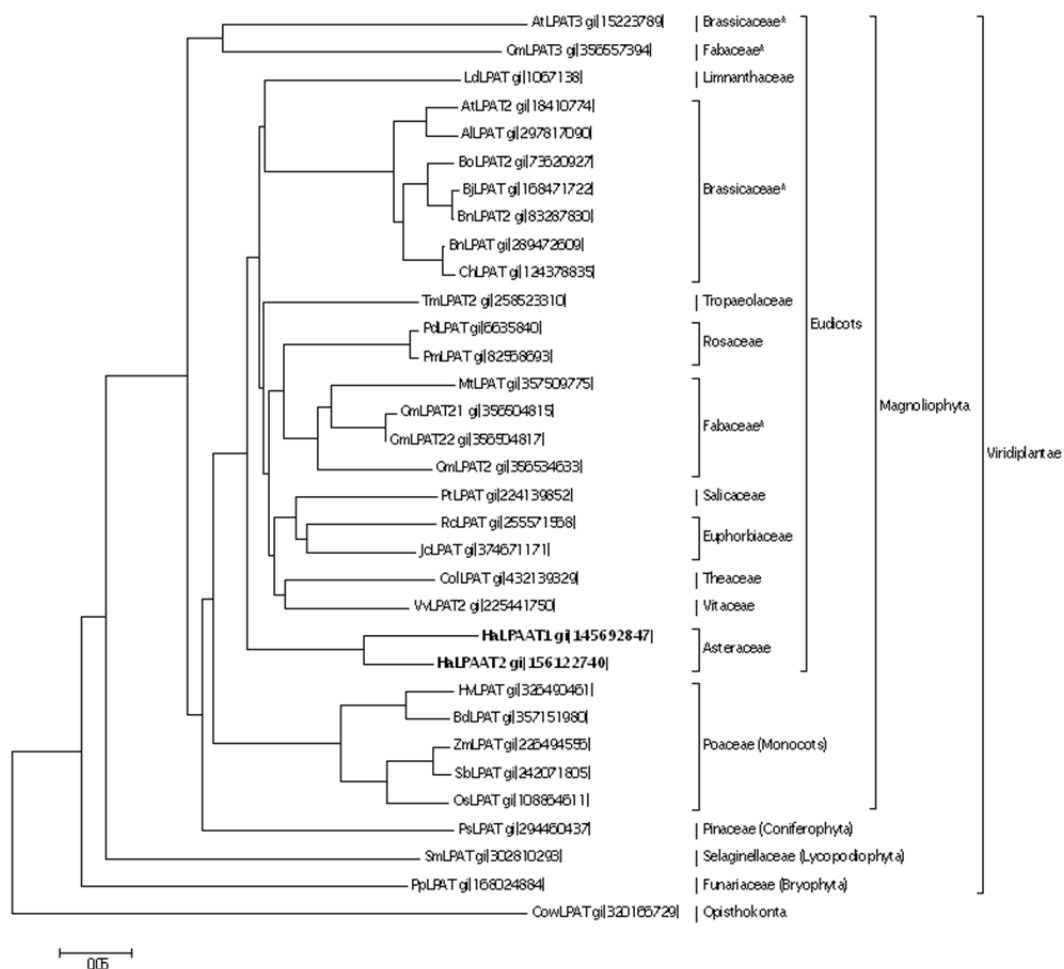


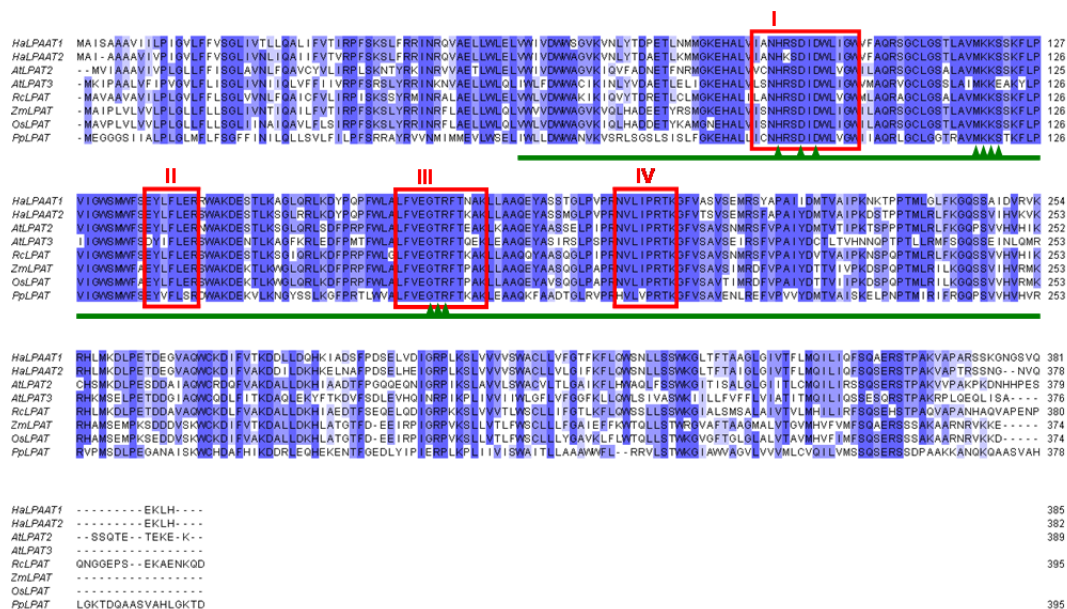
Figura 26. Árbol filogenético de las proteínas *HaLPAATs* junto con *LPATs* de distintas especies vegetales enraizado mediante *LPAT* de *Capsaspora owczarzaki* empleando el método NJ con el programa MEGA 5.10. Grupos y especies incluídas: Eudicotiledóneas (*Al*, *Arabidopsis lyrata* subsp. *lyrata*; *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Bj*, *Brassica juncea*; *Bn*, *Brassica napus*; *Bo*, *Brassica oleracea*; *Ch*, *Crambe hispanica* subsp. *abyssinica*; *Col*, *Camellia oleifera*; *Gm*, *Glycine max*; *Ha*, *Helianthus annuus*; *Jc*, *Jatropha curcas*; *Ld*, *Limnanthes douglasii*; *Mt*, *Medicago truncatula*; *Pd*, *Prunus dulcis*; *Pm*, *Prunus mume*; *Pt*, *Populus trichocarpa*; *Rc*, *Ricinus communis*; *Tm*, *Tropaeolum majus*; *Vv*, *Vitis vinifera*), Monocotiledóneas (*Bd*, *Brachypodium distachyon*; *Hv*, *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*; *Os*, *Oryza sativa* var. *japonica*; *Sb*, *Sorghum bicolor*; *Zm*, *Zea mays*), Coniferofitas (*Ps*, *Picea sitchensis*), Licopodiofitas (*Sm*, *Selaginella moellendorffii*), Briofitas (*Pp*, *Physcomitrella patens* subsp. *patens*), y Opistoconta (*Cow*, *Capsaspora owczarzaki* ATCC 30864). Los números de acceso al GenBank acompañan a las secuencias analizadas; las secuencias *HaLPAATs* deducidas se destacan en negrita.

Resultados

1.2.3 Predicción de estructuras y localización subcelular de las *Ha*LPAAATs

Las secuencias aminoacídicas deducidas de *Ha*LPAAATs fueron comparadas con proteínas homólogas de diferentes grupos filogenéticos de plantas empleando para ello el programa Clustal Omega 1.1.0 (Sievers *et al.*, 2011) y Jalview 2.8 (Waterhouse *et al.*, 2009) para su visualización (Figura 27).

El alineamiento obtenido muestra, después de la región más variable del extremo N-terminal, cuatro regiones altamente conservadas (I-IV) (Lewin *et al.*, 1999; Yamashita *et al.*, 2007; Nagle *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2010). Así mismo, se observa un gran dominio conservado perteneciente a la superfamilia de las lisofosfolípido aciltransferasas (LPLATs) del tipo LCLAT1, implicadas en la biosíntesis de glicerofosfolípidos, la cual presenta a su vez un supuestobolsillo de unión a acilos conformado por diversos aminoácidos localizados entre las regiones I y III (Figura 27). Finalmente, el extremo C-terminal presenta también gran variabilidad entre las secuencias alineadas.



A continuación se realizaron predicciones de dominios transmembrana (TMDs) para cada enzima mediante el programa TMHMM 2.0 (Materiales y Métodos, 2.3.1). De esta manera se pudo constatar la presencia de al menos tres dominios transmembrana para ambas *Ha*LPAATs, localizados aproximadamente en las posiciones 5-27, 303-326 y 336-358 con respecto al extremo N-terminal para *Ha*LPAAT1 (Figura 28A) y en las posiciones 4-26, 306-325 y 335-357 para *Ha*LPAAT2 (Figura 28B). En ambos casos, el extremo N-terminal estaría situado en el lado citoplasmático, mientras que prácticamente el resto de la enzima se hallaría en el lumen del retículo endoplásmico, incluyendo el extremo C-terminal (Figura 28).

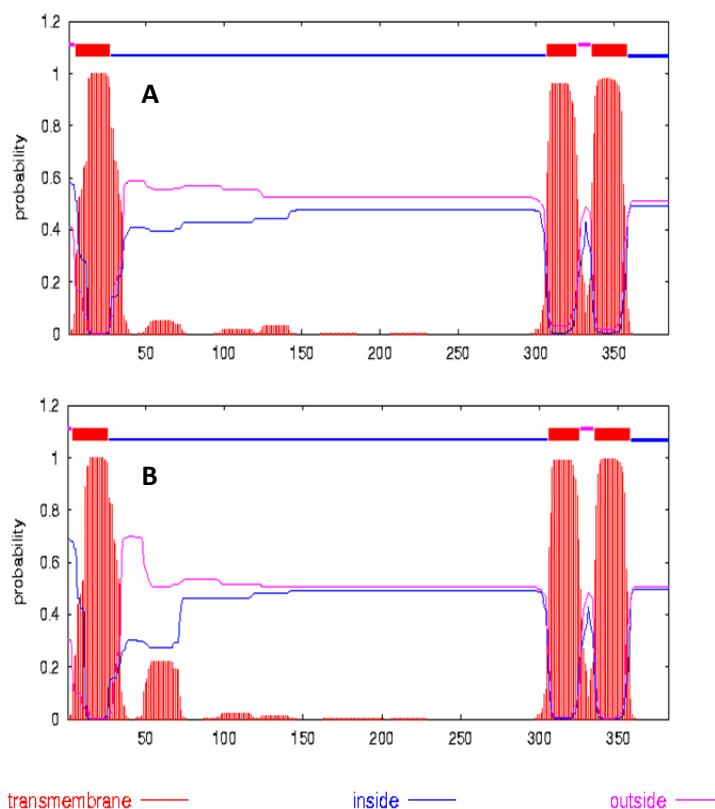


Figura 28. Predicción de dominios transmembrana para *Ha*LPAATs mediante el uso del programa TMHMM 2.0. A) *Ha*LPAAT1, B) *Ha*LPAAT2. En rojo se marcan los dominios transmembrana, en azul la sección situada en el lumen del RE y en rosa la sección situada en el lado citoplasmático.

Resultados

Por otro lado, se realizaron predicciones de la localización subcelular de estas enzimas mediante los programas ProtComp 9.0 y WoLF PSORT (Materiales y Métodos, 2.3.1). Las predicciones confirman que *HaLPAAT1* y *HaLPAAT2* son efectivamente proteínas ancladas a la membrana del retículo endoplásmico y que, por tanto, ejercen su función en este compartimento celular.

Tras la recopilación de todos estos datos se pudo realizar a modo de resumen un esquema representativo para cada *HaLPAAT* mediante el programa Geneious 5.4.4 (Figura 29). En ambas proteínas, las regiones altamente conservadas (I-IV) se encuentran inmersas en el gran dominio LPLAT, flanqueado por los dominios transmembrana (1-2).

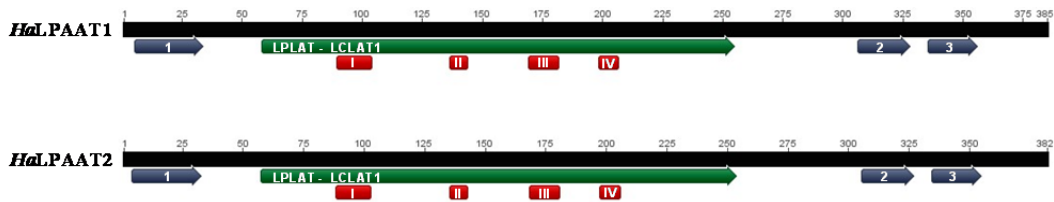


Figura 29. Representación esquemática de las proteínas *HaLPAATs* mediante el uso del programa Geneious 5.4.4. En negro se marcan las secuencias aminoacídicas, en rojo las regiones conservadas (I-IV), en verde el gran dominio LPLAT-LCLAT1 y en azul los dominios transmembrana (1-3).

1.3 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE *HaLPAATs* EN SEMILLAS Y TEJIDOS VEGETATIVOS

Para el estudio de la expresión de los genes *HaLPAATs* se realizaron PCRs cuantitativas absolutas en tiempo real (qRT-PCR) (Materiales y Métodos, 2.1.3.4) de muestras de tejido vegetativo (cotiledón, raíz, tallo y hoja) y de semillas en desarrollo (12-33 DDF) de la línea silvestre CAS-6. Los oligonucleótidos utilizados se diseñaron a partir de secuencias específicas de los fragmentos internos de cada uno de los genes, siendo el par *qHaLPAT1f1sp* / *qHaLPAT1r1sp* para *HaLPAAT1* y *qHaLPAT2f2sp* / *qHaLPAT2r1sp* en el caso de *HaLPAAT2* (Apéndice I).

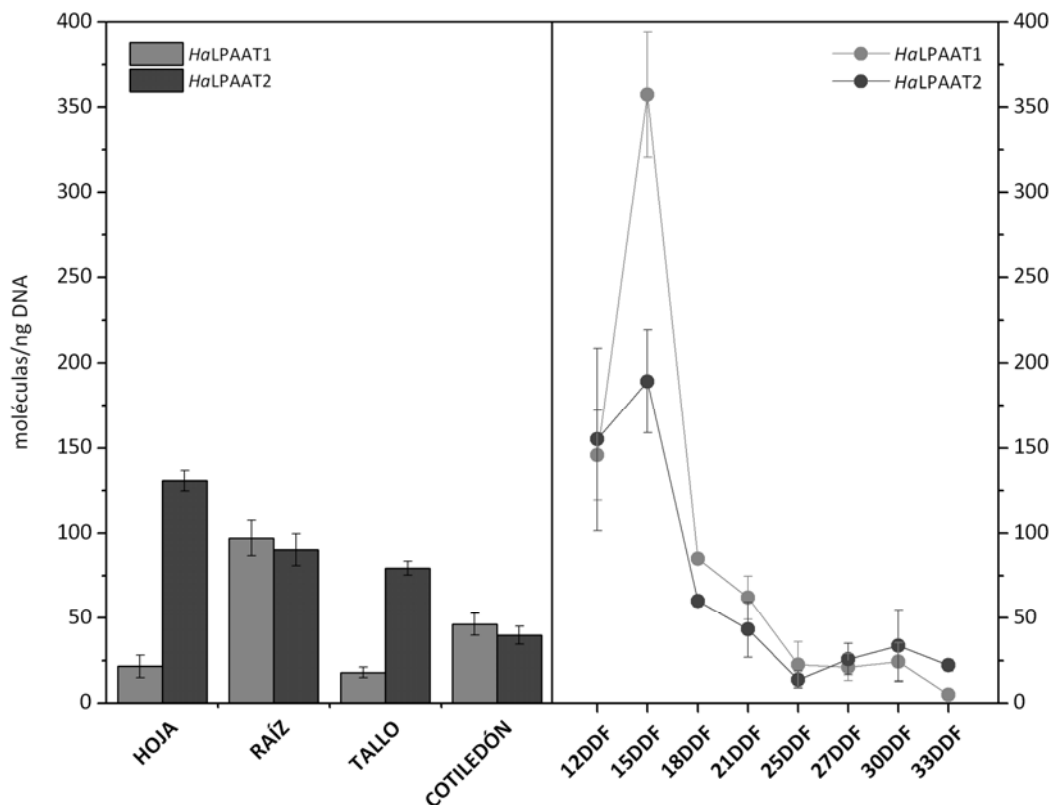


Figura 30. Perfil de expresión de los genes *HaLPAATs* en tejidos vegetativos (hoja, raíz, tallo y cotiledón) y en semillas en desarrollo en la línea silvestre CAS-6 mediante qRT-PCR absoluta. Los datos muestran los valores medios \pm SD de tres plantas independientes. DDF: Días Después de Floración.

Los niveles de expresión de *HaLPAAT1* presentaron un patrón diferencial en los distintos tejidos vegetativos, oscilando entre las 25-30 moléculas/ng de hoja y tallo y las cerca de 90 moléculas/ng de raíz, siendo éste el valor máximo observado (Figura 30). Por otro lado, en las semillas en desarrollo se observó un aumento de los niveles de expresión en los primeros estadios, con un pico máximo a los 15 DDF de 350 moléculas/ng aprox., seguido de una caída drástica en los días sucesivos (Figura 30).

Resultados

A diferencia del anterior, los niveles de expresión de *HaLPAAT2* en tejidos vegetativos presentaron un patrón más constante, con valores mayores en hoja (180 moléculas/ng) (Figura 30). En semillas en desarrollo se observó nuevamente un pico máximo de expresión a los 15 DDF, que disminuyó a partir de éste momento (Figura 30).

En general, los niveles de expresión de *HaLPAAT1* son mayores que los de *HaLPAAT2* tanto en raíz y cotiledón como en semillas en desarrollo. Además, en ambos genes se apreció una caída drástica de los niveles de expresión en semillas tardías tras el pico de 15 DDF, alcanzando valores inferiores a los hallados en tejido vegetativo. Así mismo, el valor medio de *HaLPAAT1* en semillas de 15 DDF fue el doble que el observado para *HaLPAAT2*, 360 moléculas/ng y 190 moléculas/ng, respectivamente.

1.4 CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LAS *HaLPAATs*

1.4.1 Expresión heteróloga de proteínas recombinantes *HaLPAATs* en *S. cerevisiae*

Para la expresión heteróloga de las *HaLPAATs* en levadura se empleó la estirpe silvestre W303-1A (Materiales y Métodos, 1.4.3) transformada con las construcciones pYES2::*HaLPAAT1* y pYES2::*HaLPAAT2* (Materiales y Métodos, 2.1.6.2). Como controles se emplearon dicha estirpe silvestre transformada o no con el vector pYES2 vacío, W303-1A-pYES2 y W303-1A, respectivamente. En todos los casos, los cultivos se crecieron a 30 °C en medio mínimo de selección SC-URA (Materiales y Métodos, 1.5.3), utilizando glucosa como fuente de carbono y galactosa como inductor de la expresión de las proteínas recombinantes (Materiales y Métodos, 2.1.9.1.1). El crecimiento de la estirpe W303-1A sin vector, a diferencia del resto, se llevó a cabo en medio mínimo SC (Materiales y métodos, 1.5.3).

1.4.1.1 Efecto sobre la tasa de crecimiento en *S. cerevisiae*

Para determinar el efecto de la expresión heteróloga sobre la tasa de crecimiento en levaduras se comparó el crecimiento de la estirpe silvestre W303-1A frente a las transformaciones comentadas en el apartado anterior. La inducción se inició una vez los cultivos alcanzaron una DO_{600} de 0,4, para ser medida cada hora, durante 24 h totales, por triplicado (Materiales y Métodos, 2.1.9.1.1). La turbidez de cada cultivo medida a una densidad óptica de 600 nm (DO_{600}) se relacionó directamente con el número de células presentes en éstos.

En la Figura 31 se muestran las curvas de crecimiento de todos los cultivos ensayados.

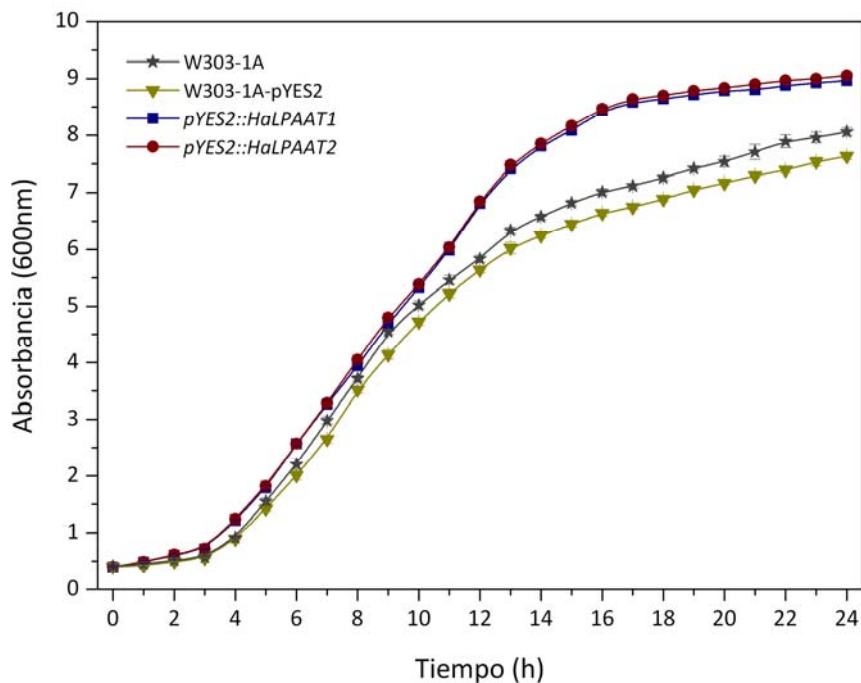


Figura 31. Representación de las curvas de crecimiento de la estirpe silvestre W303-1A transformada con las construcciones *pYES2::HaLPAATs*, junto con la estirpe con o sin vector *pYES2* vacío como controles. Los cultivos se crecieron en medio mínimo de selección SC-URA suplementado con 2% galactosa para inducir la expresión de los genes a 30°C durante 24h; W303-1A sin plásmido *pYES2* vacío creció en medio mínimo SC. La DO_{600} se midió cada hora, tomando una pequeña alícuota de cada cultivo, con *factor de dilución, fd*: 10. Los datos muestran los valores medios \pm SD de tres cultivos independientes.

Resultados

Todos los cultivos ensayados se caracterizaron por poseer un período de latencia corto, sin sobrepasar las 3 h después de inducción (Figura 31).

Una vez alcanzada la *fase exponencial*, los cultivos experimentaron un crecimiento similar (Figura 31). No obstante, para valorar dicha fase, se calcularon las tasas de crecimiento (μ) y los tiempos de generación (τ) para cada cultivo (Materiales y Métodos, 2.1.11) (Tabla 18).

Tabla 18. Tasas de crecimiento (μ) y tiempos de generación (τ) calculados a partir de la fase exponencial de los cultivos de la estirpe silvestre W303-1A, con y sin plásmido pYES2 vacío, y las transformadas con *pYES2::HaLPAAT1* y *pYES2::HaLPAAT2* en W303-1A.

	Tasa de crecimiento (μ) (h^{-1})	Tiempo de generación (τ) (h)
W303-1A	0,28	2,44
W303-1A-pYES2	0,28	2,49
<i>pYES2::HaLPAAT1</i>	0,25	2,82
<i>pYES2::HaLPAAT2</i>	0,25	2,83

A raíz de los parámetros calculados, se observó cómo los cultivos W303-1A y W303-1A-pYES2 se caracterizaban por poseer tasas de crecimiento iguales, $0,28 h^{-1}$, a diferencia de los cultivos *pYES2::HaLPAAT1* y *pYES2::HaLPAAT2*, siendo para estos dos últimos de $0,25 h^{-1}$. En correlación a estos datos, *pYES2::HaLPAAT1* y *pYES2::HaLPAAT2* fueron los cultivos que mostraron mayores tiempos de generación, 2,82 y 2,83 h, respectivamente. Los cultivos W303-1A y W303-1A-pYES2, por su parte, se caracterizaron por poseer tiempos de generación menores, siendo W303-1A el cultivo con menor tiempo de generación, 2,44 h.

Finalmente, los cultivos alcanzaron la *fase estacionaria* con una densidad óptica diferente, distinguiéndose dos puntos de saturación máxima (Figura 31). Los cultivos W303-1A y W303-1A-pYES2 mostraron un punto de saturación similar, correspondiente a una DO_{600} de 7,5-8,0. Los cultivos *pYES2::HaLPAAT1* y *pYES2::HaLPAAT2* mostraron un punto de saturación máxima por encima de los anteriores, prácticamente idéntico situado en 9,0.

1.4.1.2 Análisis de expresión de *HaLPAATs* en *S. cerevisiae*

Para comprobar la expresión de los genes *HaLPAATs* transformados en la estirpe silvestre W303-1A se extrajo RNA total tras 3 y 18 h de inducción (Materiales y Métodos, 2.1.9.1.1a) de todas las estirpes recombinantes generadas, así como de los controles empleados (Resultados, 1.4.1). A continuación, se sintetizaron los correspondientes cDNAs (Materiales y Métodos, 2.1.1.2.2). Estos cDNAs fueron utilizados como molde para llevar a cabo reacciones de PCR (Materiales y Métodos, 2.1.3.1d). Los pares de oligonucleótidos usados fueron los mismos que los usados en el análisis de expresión de *HaLPAATs* en semillas y tejidos vegetativos (Resultados, 1.3). Como control interno se comprobó la expresión del gen del RNA ribosómico 18S de *S. cerevisiae*, usando para ello el par de oligonucleótidos *Sc18Sf1sp* / *Sc18Sr1sp* (Apéndice I).

Tal y como muestra la Figura 32, el gel obtenido a partir de dichas reacciones de PCR certificó la expresión de los mRNAs de *HaLPAATs* en sus correspondientes líneas recombinantes, así como la ausencia de dicha expresión en la estirpe silvestre W303-1A, con y sin plásmido pYES2 vacío.

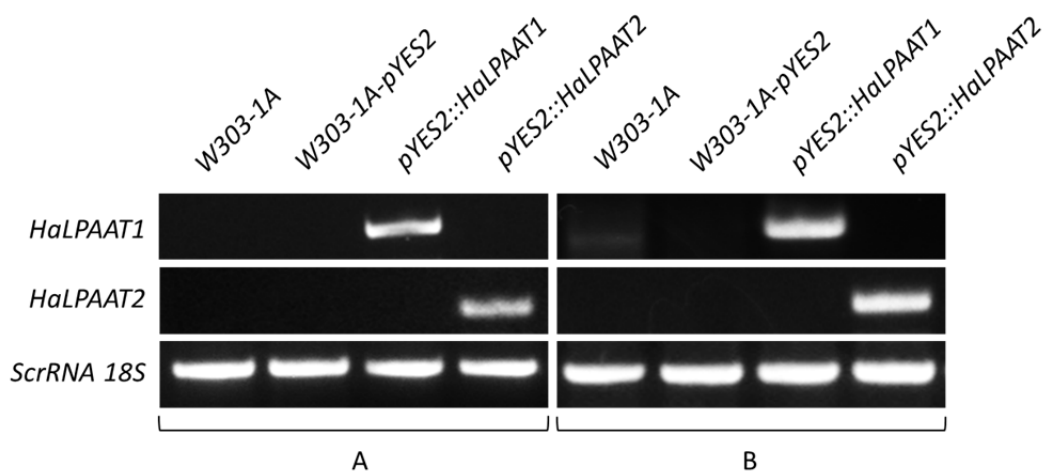


Figura 32. Expresión de los genes *HaLPAAT1*, *HaLPAAT2* y *ScrRNA18S* en la estirpe silvestre W303-1A de *S. cerevisiae*. RNA extraídos de cultivos tras 3h (A) y 18h (B) de crecimiento inducido y posterior retrotranscripción a cDNA. Gel al 2% de agarosa visualizado con bromuro de etidio.

Resultados

1.4.1.3 Análisis lipídico *in vivo*

Para determinar la funcionalidad de las *HaLPAATs* transformadas en la estirpe silvestre W303-1A se extrajeron lípidos totales de cultivos de 50 ml tras 48 h de inducción (Materiales y Métodos, 2.2.1.1.1) de todas las estirpes recombinantes generadas, así como de los controles empleados (Resultados, 1.4.1). Tras dicha extracción, se separaron los TAGs mediante cromatografía en capa fina (Materiales y Métodos, 2.2.1.2) y se analizaron por cromatografía de gases (Materiales y Métodos, 2.2.1.4).

En las placas TLC se observaban bandas de TAGs más acentuadas en las estirpes recombinantes generadas, ya que se están sobreexpresando las *HaLPAATs*; también en estirpe silvestre W303-1A.

No se pudo cuantificar el contenido total de aceite debido a la poca diferencia de peso (peso lípidos totales / peso seco).

1.4.2 Análisis funcional de proteínas recombinantes *HaLPAATs* en *A. thaliana*

Para el análisis funcional de las *HaLPAATs* en *A. thaliana* se empleó la línea KO N504681 (Materiales y Métodos, 1.4.5) transformada con las construcciones *pCAMBIA-1300EC::HaLPAAT1* y *pCAMBIA-1300EC::HaLPAAT2* (Materiales y Métodos, 2.1.6.3), usando la estirpe GV3101/pMP90 de *A. tumefaciens* como vector de expresión (Materiales y Métodos, 2.1.8.4.2). Como controles se empleó dicha línea KO sin transformar, N504681, y la línea silvestre Col-0 (Materiales y Métodos, 1.4.5). En todos los casos, las plantas se crecieron en cámaras de cultivo bajo condiciones estándar (Materiales y Métodos, 1.4.5.1).

La verificación de la homocigosis se llevó a cabo en base a la línea KO en estudio, N504681 (Materiales y Métodos, 2.1.8.4.1a) y la selección de líneas transgénicas se realizó en placas de Petri con medio sólido MS suplementado con higromicina B (15 µg/ml) (Materiales y Métodos, 2.1.8.4.3).

1.4.2.1 Análisis de expresión de *HaLPAATs* en *A. thaliana*

Para comprobar la expresión de los genes *HaLPAATs* transformados en la línea KO N504681 se extrajo RNA total de hojas basales (Materiales y Métodos, 2.1.1.3.1) de todas las líneas transgénicas generadas, así como del control N504681 (Resultados, 1.4.2). Posteriormente, se sintetizaron los cDNAs (Materiales y Métodos, 2.1.1.3.3). Estos cDNAs fueron utilizados como molde para llevar a cabo reacciones de PCR (Materiales y Métodos, 2.1.3.1d). Los pares de oligonucleótidos usados fueron los mismos que los usados en el análisis de expresión de *HaLPAATs* en semillas y tejidos vegetativos (Resultados, 1.3). Como control interno se comprobó la expresión del gen de la actina de *A. thaliana*, usando para ello el par de oligonucleótidos *AtActin-F / AtActin-R* (Apéndice I).

Tal y como muestra la Figura 33, el gel obtenido a partir de dichas reacciones de PCR certificó la expresión de los mRNAs de *HaLPAATs* en sus correspondientes líneas transgénicas, así como la ausencia de dicha expresión en la línea KO N504681 sin transformar.

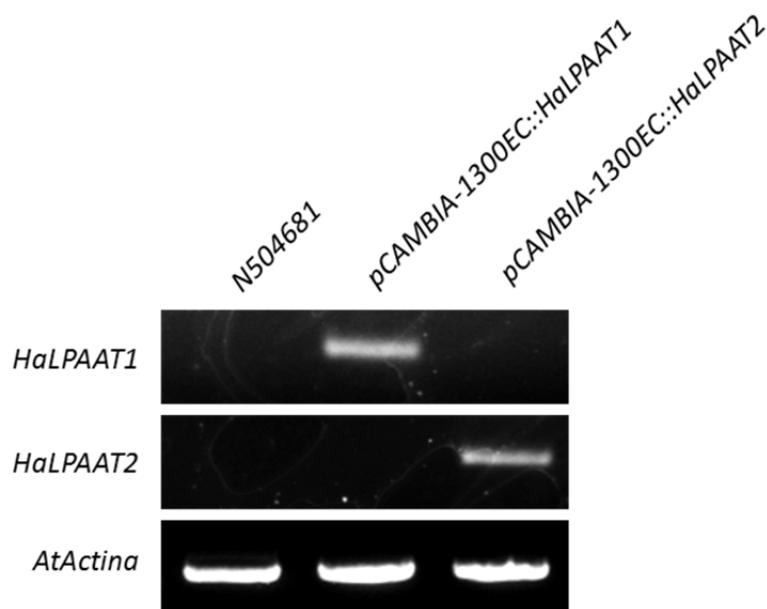


Figura 33. Expresión de los genes *HaLPAAT1*, *HaLPAAT2* y *AtActina* en la línea KO N504681 de *A. thaliana*. RNA total extraídos de hojas basales y posterior síntesis de cDNAs. Gel al 2% de agarosa visualizado con bromuro de etidio.

Resultados

1.4.2.2 Análisis fenotípico de semillas

Para determinar la funcionalidad de las *Ha*LPAATs transformadas en la línea KO N504681 se efectuó un análisis fenotípico basado en la observación detallada de caracteres morfológicos de las semillas (Materiales y Métodos, 2.1.9.2.1) de todas las líneas transgénicas generadas, así como de los controles empleados (Resultados, 1.4.2).

Ninguno de los análisis efectuados realizados reveló diferencias significativas respecto a los controles.

1.4.2.3 Análisis lipídico de semillas

Para determinar la funcionalidad de las *Ha*LPAATs transformadas en la línea KO N504681 se extrajeron lípidos totales de semillas (Materiales y Métodos, 2.2.1.1.2) de todas las líneas transgénicas generadas, así como de los controles empleados (Resultados, 1.4.2). Tras dicha extracción, se tomó una alícuota que contenía los TAGs y se analizó por cromatografía de gases (Materiales y Métodos, 2.2.1.4), reservando el resto para la obtención directa de ésteres metílicos (Materiales y Métodos, 2.2.1.3).

1.4.2.3.1 Análisis de la composición de TAGs

El primer objetivo establecido fue determinar la composición de TAGs extraídos con anterioridad (Resultados, 1.4.2.3) (Tabla 19).

1.4.2.3.2 Análisis de la composición de FAMES

A continuación se trató de determinar la composición de FAMES de los TAGs analizados con anterioridad (Resultados, 1.4.2.3.1) (Tabla 20).

No se pudo cuantificar el contenido total de aceite debido a la poca diferencia de peso (peso lípidos totales / peso seco).

2. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ENZIMÁTICA DE LAS ENZIMAS DIACILGLICEROL ACILTRANSFERASAS *Ha*DAGAT1A, *Ha*DAGAT1B Y *Ha*DAGAT2

2.1 CLONACIÓN DE LOS GENES *Ha*DAGATs

En el desarrollo de este trabajo se han identificado dos isoformas diferentes que codifican para las enzimas diacilglicerol aciltransferasas 1 de *Helianthus annuus*, denominadas *Ha*DAGAT1A y *Ha*DAGAT1B. Además, se ha identificado una isoforma que codifica para la enzima diacilglicerol aciltransferasa 2, denominada *Ha*DAGAT2.

2.1.1 Clonación de fragmentos internos de *Ha*DAGATs

A partir de la secuencia nucleotídica del gen *DGAT1* de *A. thaliana*, junto a EST de genes *DGAT* de distintas especies del género *Helianthus* (*H. exilis* y *H. argophylus*), todas ellas disponibles en la base de datos GenBank (Materiales y Métodos, 2.3.1), se realizó un alineamiento para la identificación de regiones homólogas usando de nuevo el programa ClustalX v2.0 (Larkin *et al.*, 2007), diseñándose a continuación un oligonucleótido específico, *DGAT1f2sp*, y otro degenerado, *DGAT1r1*, (Apéndice I) a partir de zonas altamente conservadas (Figura 34).

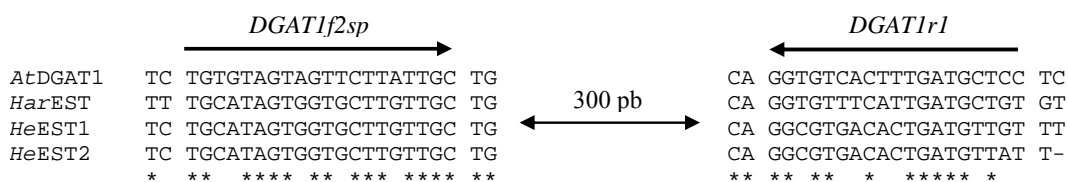


Figura 34. Alineamiento parcial de secuencias nucleotídicas de DGATs de plantas. El alineamiento se realizó mediante el programa Clustal X v2.0. *At*, *Arabidopsis thaliana* (gi | 30680677); *Har*, *Helianthus argophylus* (gi |); *He*, *Helianthus exilis* (gi | , gi |).

Resultados

Usando dichos oligonucleótidos, se consiguió la amplificación de dos fragmentos internos correspondientes a cada uno de los dos genes identificados de la diacilglicerol aciltransferasa 1 de girasol, *HaDAGAT1A* y *HaDAGAT1B*.

Para la obtención de ambos fragmentos internos se realizaron reacciones de amplificación por PCR cuyo molde fue cDNA generado a partir de mRNA aislado de semillas de 15 DDF de la línea silvestre CAS-6 (Materiales y Métodos, 2.1.1.3.3) y cuyos parámetros fueron descritos con anterioridad (Materiales y Métodos, 2.1.3.1a). Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa (Materiales y Métodos, 2.1.4.1) y se visualizaron en un transiluminador. De estas reacciones de amplificación se obtuvieron las bandas esperadas de 300 pb para *HaDAGAT1s*. Éstas se aislaron del gel, se purificaron y clonaron en el vector de clonación pGEM[®]-T Easy (Promega, EEUU) y se transformaron en la estirpe XL1Blue de *E. coli* (Materiales y Métodos, 2.1.8.1). Posteriormente, se aislaron los DNA plasmídicos de los transformantes (Materiales y Métodos, 2.1.1.1.1) y se secuenciaron (Materiales y Métodos, 2.1.7). El análisis bioinformático de las secuencias clonadas se realizó con el programa Blast del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Altschul *et al.*, 1990), confirmando la presencia de los dos fragmentos internos de los mRNA de *HaDAGAT1A* y *HaDAGAT1B*, con variaciones puntuales entre sus secuencias nucleotídicas.

En el caso de *HaDAGAT2* no fue necesario obtener fragmento interno previo a la obtención de la secuencia completa, ya que la longitud de su secuencia estimada era lo suficientemente pequeña como para ser amplificada mediante el uso de dos pares de oligonucleótidos (Resultados, 2.1.2).

2.1.2 Obtención de las secuencias completas de cDNA de *HaDAGATs*

Las secuencias completas del **extremo 3'** de *HaDAGAT1A* y *HaDAGAT2* se obtuvieron usando el oligonucleótido comercial *FA2Z* (Apéndice I), cuya secuencia se incorpora a todas las moléculas de cDNA en la reacción de síntesis a partir del mRNA aislado (Materiales y Métodos, 2.1.1.3.2), junto a una serie de oligonucleótidos, tanto degenerados como específicos. En el caso de

HaDAGAT1A, fue necesario realizar dos reacciones de PCR seriadas (NESTED) usando dos oligonucleótidos diseñados a partir del fragmento interno clonado (Resultados, 2.1.1) en combinación con *FA2Z*, de manera que el producto de la primera reacción de PCR se usó como molde en la segunda. Estos oligonucleótidos fueron *DGAT1ABf3*, el cual presentaba una degeneración de 2 veces y *DGAT1Af2sp*, específico, distanciados el uno del otro por 60 pb (Apéndice I). En el caso de *HaDAGAT2*, sólo hubo que usar el oligonucleótido específico *DGAT2f1sp* (Apéndice I), diseñado a partir de una región altamente conservada observada tras realizar un alineamiento de *DGAT2s* de plantas, en combinación con *FA2Z*. Sin embargo, para obtener la secuencia completa del extremo 3' de *HaDAGAT1B* no fue suficiente el uso de un oligonucleótido degenerado 2 veces (*DGAT1ABf3*) (Apéndice I), diseñado a partir del fragmento interno clonado (Resultados, 2.1.1) en combinación con *FA2Z*, sino que hubo que volver a diseñar un nuevo oligonucleótido, esta vez específico (*DGAT1Bf3sp*) (Apéndice I), sobre la nueva secuencia clonada y usarlo en combinación con un oligonucleótido específico diseñado a partir de la comparación de dicha secuencia clonada, el extremo 3' de *HaDAGAT1A* y ESTs del género *Helianthus* cuyas secuencias incluyesen algún codón de stop. El oligonucleótido en cuestión se denominó *DGAT1BSTOP* (Apéndice I).

Por otro lado, el **extremo 5'** de *HaDAGAT2* fue el único amplificado usando los oligonucleótidos comerciales *UPM* y *NUP* (Apéndice I) (Materiales y Métodos, 2.1.3.2). Para ello se empleó además el oligonucleótido específico *DGAT2r1sp* (Apéndice I), diseñado a partir del alineamiento de *DGAT2s* citado anteriormente. En el caso de *HaDAGAT1A*, el extremo 5' fue amplificado mediante la combinación de dos oligonucleótidos específicos, *DGAT1AATG* y *DGAT1Ar1sp* (Apéndice I). *DGAT1AATG* se diseñó a partir de la comparación del fragmento interno previamente clonado (Resultados, 2.1.1) con ESTs del género *Helianthus* cuyas secuencias incluyesen algún codón de inicio (ATG), mientras que *DGAT1Ar1sp* se diseñó a partir de dicho fragmento interno; la secuencia de *DGAT1AATG* contenía el codón de inicio (ATG). El extremo 5' de *HaDAGAT1B*, se obtuvo de manera similar, salvo que en este caso los oligonucleótidos empleados contenían degeneraciones de 4 y 2 veces, *DGAT1ATG* y *DGAT1ABr1*, respectivamente (Apéndice I). *DGAT1ATG* se diseñó a partir del alineamiento de

Resultados

varios EST del género *Helianthus* previo alineamiento de un EST de DGAT de *Perilla frutescens* (gi | 10803053) con el fragmento interno de *HaDAGAT1B* previamente clonado (Resultados, 2.1.1) y un EST de *Helianthus exilis* (gi | 113237051), cuya secuencia alcanzaba el extremo 5' al completo; la secuencia de *DGAT1ATG* contuvo así el codón de inicio (ATG).

Los fragmentos de PCR obtenidos fueron clonados, secuenciados y ensamblados *in silico*. De esta forma se pudieron deducir los marcos abiertos de lectura (ORFs), obteniéndose las secuencias completas de lecturas de *HaDAGAT1A*, con su respectiva secuencia aminoacídica (Figura 35A), así como la de *HaDAGAT1B* (Figura 35B) y *HaDAGAT2* (Figura 36), todas ellas depositadas en la base de datos GenBank con números de acceso EU543809 [gi | 188998307], EU232721 [gi | 161334748] y EF563992 [gi | 156122741], respectivamente.

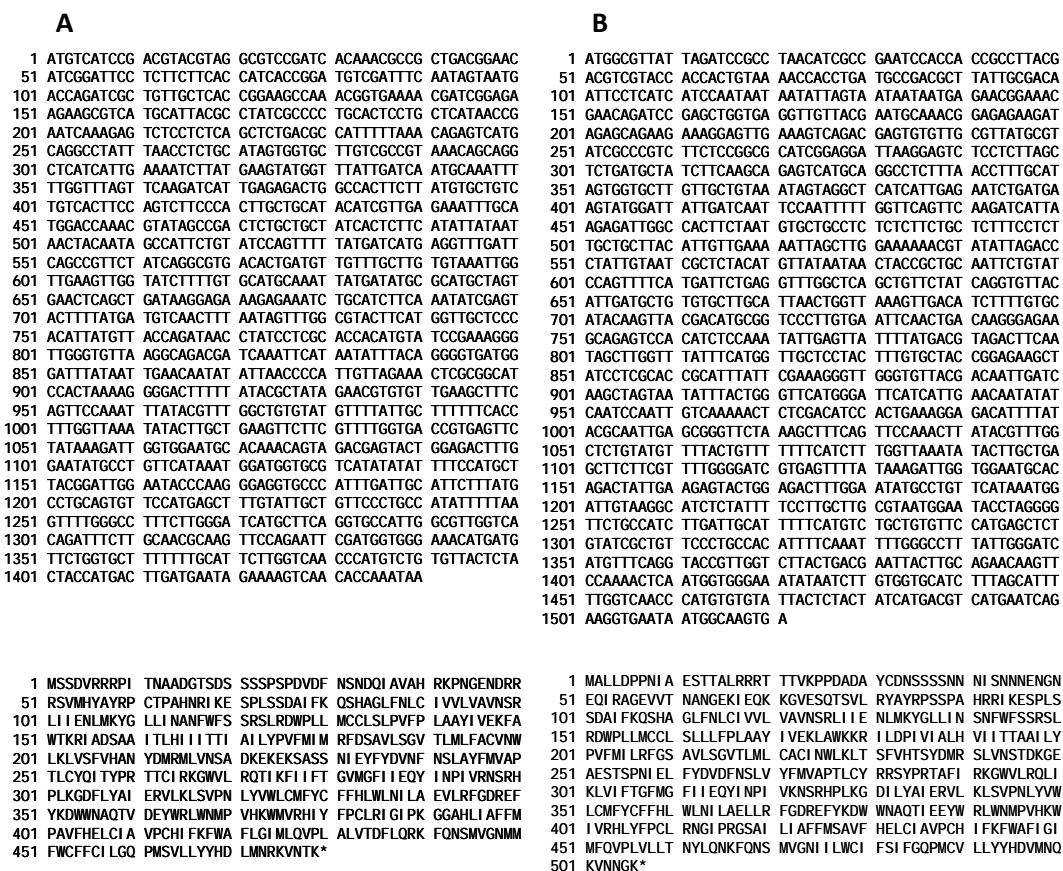


Figura 35. Secuencias completas de los cDNA y proteínas de *HaDAGAT1A* (A) y *HaDAGAT1B* (B) de la línea silvestre CAS-6.

```

1 ATGTCCACGA CGACGGAGAA CACAAACGGA ACTTCGCCAC AACCCACCAC
51 ACCGCCACCG ATGTCCACAC CAACGCCGGT AGAGTTCACC GGA AAAACCCAC
101 AGCCGCCTCAT CCACACAGCA CTCGCAATGA TAGCTTGCTT CGGCTCGATT
151 CATCTCAACG TGTTCATCGT TCTCGCTTCG TTTTTCCTTC TTCGATTCGA
201 CAAATTCTTC GTTGTGATTG GAATGCTTGT GATCTTAATT GTGATCCGGA
251 TTAATGAGAG GAGTAGATGG GGAAGAGGTT TAGGCAGATA CATATGCAAG
301 CATGCTGTCG GTTTTTTTCG GGTACGCTG TATGTGGAGG ATTATAAAGC
351 TTTTGTTCCT GATCAGGCCT ATGTTTTTGG GTATGAGCCT CATTCCGTCT
401 GGCCGATTGG AGTTGTCGCA CTGGCAGATC TTACGGGATT CATGCCCTCT
451 CCTAAAATAA AGGTCCTTGC CAGTACCGCG GTGTTCTATA CACCGTTTCT
501 GAGGCATATA TGGACATGGC TTGGACTAAC GGCTGCAACC AGGAAAAACT
551 TCTCCTCTCT CCTAAAAGCT GGTATAGCT GCATAGTCAT ACCAGGTGGC
601 GTTCAGGAGA CGTTTTACAT GGATCATGAT TCTGAGATCG CCTTCTGAG
651 AACAAAGAAA GGATTTGTAC GCCTTGCAAT GGAGACTAAT TCCCCCTTGG
701 TTCCAGTTTT TGGTTTCGGT CAGTCCATG TTTACAAGTG GTGGAAGCCA
751 CGCGGGAAAT TGTTCCTGAA ATTGCTCTGG GCTATAAGGT TCACTCCGGT
801 TTTCTTCTGG GGTATACTCG GGTCTCTAT ACCCTTCCGG CAACCAATGC
851 ATGTGGTGGT TGGTAGACCG ATACATTTCA AGAAAAATAC AACGCCACCA
901 ATGGAAGAGG TTTCAGAAGT ACACCGGCAG TTTGTGGATG CGGTTGAAGA
951 TCTATTCGAG AGGCATAAAG CGAGAGCCGG TTATCCTAAT CTTCAGTTAA
1001 GAATTATGTG A

1 MSTTTENTNG TSPOPPPPPP MSTPTPVEFT GKPOPLI HTA LAMI AWLGS I
51 HLNWFI VLAS FLLLP I HKFF VVI GMLVI LI VI PI NERSRW GRGLGRYI CK
101 HAVGFPPVTL YVEDYKAFVP DOAYVFGYEP HSWPI GVVA LADLTGFMP L
151 PKI KVLASTA VFYTPFLRHI WTWLGLTAAT RKNFSSLLKA GYSCI VI PGG
201 VQETFYMDHD SEI AFLRTRK GFVRLAMETN SPLVPVFGFG QSYVYKWKPK
251 RGKLFKLSR AI RFTPVFFW GI LGSPI PFR QPMHVVGRP I HFKNNTPTT
301 MEEVSEVHRO FVDAVDLFE RHKARAGYPN LQLRI M*

```

Figura 36. Secuencias completas del cDNA y proteína de *HaDAGAT2* de la línea silvestre CAS-6.

2.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *HaDAGATs*

2.2.1 Características fisicoquímicas de las secuencias polipeptídicas deducidas a partir de los cDNAs de *HaDAGATs*

Las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de la pauta de lectura abierta (ORF) de los cDNAs *HaDAGAT1A*, *HaDAGAT1B* y *HaDAGAT2* presentaron las siguientes características fisicoquímicas (Tabla 21):

Tabla 21. Propiedades fisicoquímicas de las secuencias aminoacídicas *HaDAGAT1A*, *HaDAGAT1B* y *HaDAGAT2*.

	<i>HaDAGAT1A</i>	<i>HaDAGAT1B</i>	<i>HaDAGAT2</i>
Tamaño (Aas)	479	506	336
Peso molecular (kDa)	55,75	58,39	38,09
Punto isoeléctrico (pI)	9,24	9,34	10,67
Insolubilidad (%)	79	86	83
Hidrofobicidad (%)	51,6	50,0	53,3
Hidrofilicidad (%)	28,4	31,0	27,4
Básico (%)	13,2	12,1	13,4
Ácido (%)	6,9	6,9	6,0

HaDAGAT1A y *HaDAGAT1B* presentan una diferencia de tamaño de tan sólo 27 aminoácidos, mientras que el tamaño de *HaDAGAT2* es mucho menor, lo que se traduce en una diferencia de peso molecular considerable entre éstas. No obstante, los puntos isoeléctricos estimados de las *HaDAGAT1s* son similares, con una ligera variación con respecto al de *HaDAGAT2*. La insolubilidad y hidrofobicidad de todas las *HaDAGATs* es notoria, presentando porcentajes en torno al 80% y 50%, respectivamente. En cuanto a la frecuencia de residuos aminoacídicos entre *HaDAGATs*, ésta es considerablemente similar, presentando aproximadamente un 12-13% de residuos básicos frente a un 6-7% de residuos ácidos.

2.2.2 Análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas derivadas de *HaDAGATs*

El análisis filogenético de *HaDAGATs* se realizó mediante previo análisis bioinformático con el programa Blastp del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Altschul *et al.*, 1990), el cual permitió identificar secuencias homólogas entre *HaDAGATs* y otras DGATs. A continuación, se hizo una clara división entre DGAT1s y DGAT2s, ya que pertenecen a familias completamente distintas que no poseen homología entre ellas ni un origen en común. Finalmente, los árboles filogenéticos incluyendo las secuencias de DGAT1s y DGAT2s del grupo

Viridiplantae fueron generados mediante el método de Neighbor-Joining (NJ) con el programa MEGA 5.10 (Tamura *et al.*, 2011) (Materiales y Métodos, 2.3.1) (Figuras 37 y 38). Para enraizar dichos árboles se emplearon las secuencias proteicas de DGAT1 y DGAT2 de *Capsaspora owczarzaki*.

Las proteínas *HaDAGAT1s* se encuentran enclavadas dentro del grupo de las plantas eudicotiledóneas, con un porcentaje de identidad del 81%, manteniendo una estrecha relación con las DGAT1s de *Vernonia galamensis*, especie perteneciente también a la familia de las Asteraceae, y con otras de especies pertenecientes a la familia Euphorbiaceae, entre otras (Figura 37).

HaDAGAT2, por su parte, se sitúa igualmente dentro del grupo de las plantas eudicotiledóneas, manteniendo una estrecha relación esta vez con DGAT2s de especies pertenecientes a las familias Fabaceae y Brassicaceae, entre otras (Figura 38).

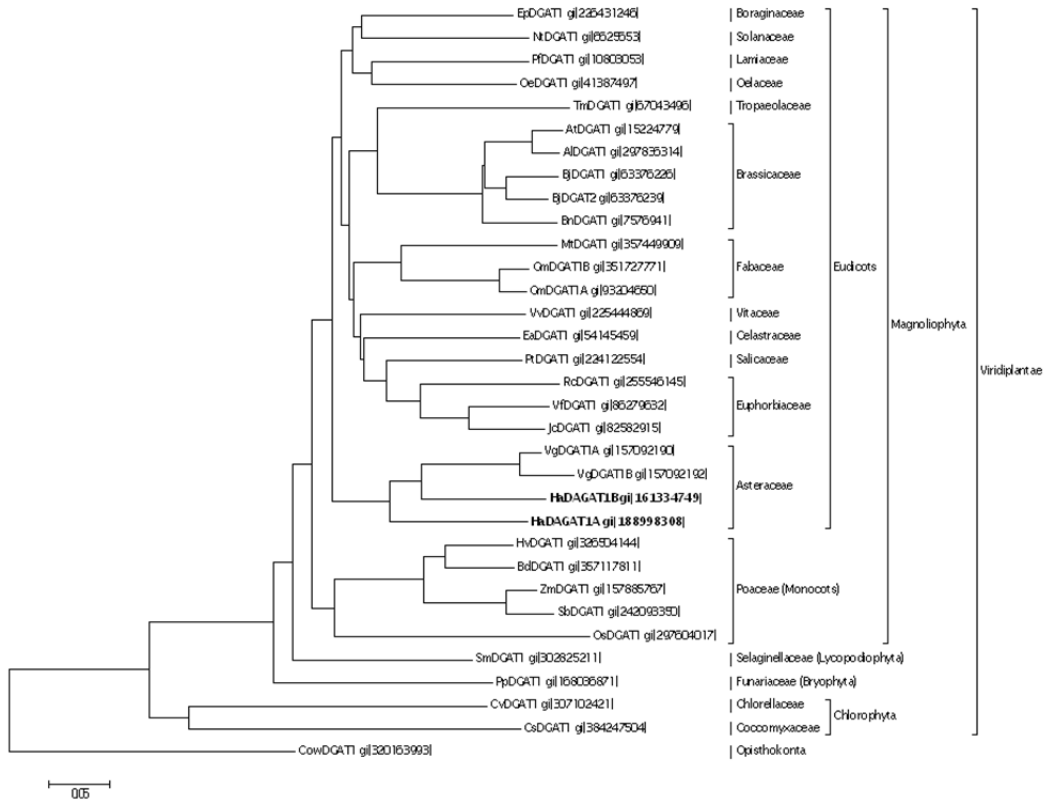


Figura 37. Árbol filogenético de las proteínas *HaDAGAT1s* junto con *DGAT1s* de distintas especies vegetales enraizado mediante la *DGAT1* de *Capsaspora owczarzaki* empleando el método NJ con el programa MEGA 5.10. Grupos y especies incluidas: Eudicotiledóneas (*Al*, *Arabidopsis lyrata* subsp. *lyrata*; *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Bj*, *Brassica juncea*; *Bn*, *Brassica napus*; *Ea*, *Euonymus alatus*; *Ep*, *Echium pitardii*; *Gm*, *Glycine max*; *Ha*, *Helianthus annuus*; *Jc*, *Jatropha curcas*; *Mt*, *Medicago truncatula*; *Nt*, *Nicotiana tabacum*; *Oe*, *Olea europaea*; *Pf*, *Perilla frutescens*; *Pt*, *Populus trichocarpa*; *Rc*, *Ricinus communis*; *Tm*, *Tropaeolum majus*; *Vf*, *Vernicia fordii*; *Vg*, *Vernonia galamensis*; *Vv*, *Vitis vinifera*), Monocotiledóneas (*Bd*, *Brachypodium distachyon*; *Hv*, *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*; *Os*, *Oryza sativa* var. *japonica*; *Sb*, *Sorghum bicolor*; *Zm*, *Zea mays*), Licopodiofitas (*Sm*, *Selaginella moellendorffii*), Briofitas (*Pp*, *Physcomitrella patens* subsp. *patens*), Clorofitas (*Cs*, *Coccomyxa subellipsoidea* C-169; *Cv*, *Chlorella variabilis*) y Opistoconta (*Cow*, *Capsaspora owczarzaki* ATCC 30864). Los números de acceso al GenBank acompañan a las secuencias analizadas; las secuencias *HaDAGAT1s* deducidas se destacan en negra.

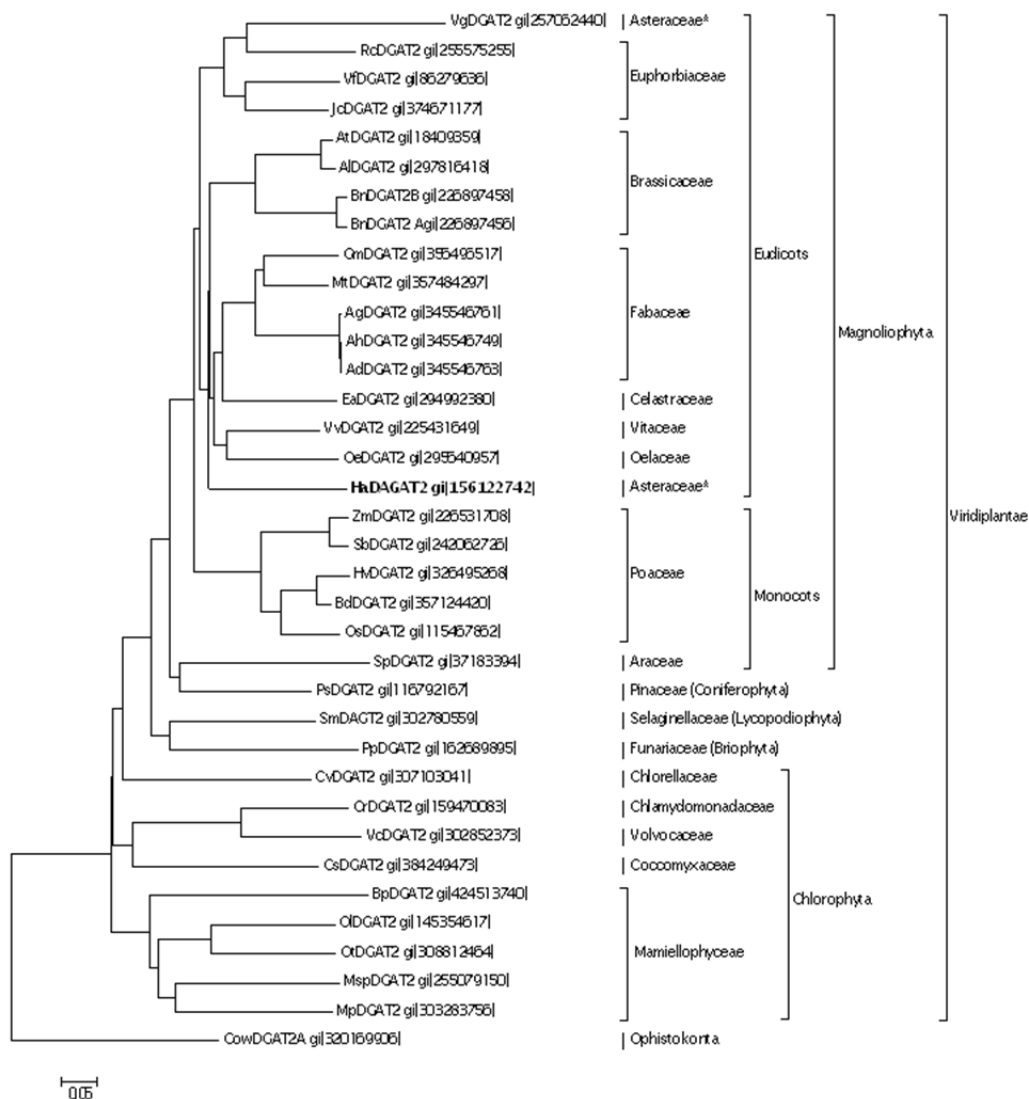


Figura 38. Árbol filogenético de la proteína *HaDAGAT2* junto con DGAT2s de distintas especies vegetales enraizado mediante la DGAT2 de *Capsaspora owczarzaki* empleando el método NJ con el programa MEGA 5.10. Grupos y especies incluídas: Eudicotiledóneas (*Ad*, *Arachis diogeni*; *Ag*, *Arachis glabrata*; *Ah*, *Arachis hypogaea*; *Al*, *Arabidopsis lyrata* subsp. *lyrata*; *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Bn*, *Brassica napus*; *Ea*, *Euonymus alatus*; *Gm*, *Glycine max*; *Ha*, *Helianthus annuus*; *Jc*, *Jatropha curcas*; *Mt*, *Medicago truncatula*; *Oe*, *Olea europaea*; *Rc*, *Ricinus communis*; *Vf*, *Vernicia fordii*; *Vg*, *Vernonia galamensis*; *Vv*, *Vitis vinifera*), Monocotiledóneas (*Bd*, *Brachypodium distachyon*; *Hv*, *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*; *Os*, *Oryza sativa* var. *japonica*; *Sb*, *Sorghum bicolor*; *Sp*, *Spirodela polyrhiza*; *Zm*, *Zea mays*), Coniferofitas (*Ps*, *Picea sitchensis*), Licopodiofitas (*Sm*, *Selaginella moellendorffii*), Briofitas (*Pp*, *Physcomitrella patens* subsp. *patens*), Clorofitas (*Bp*, *Bathycoccus prasinos*; *Cr*, *Chlamydomonas reinhardtii*; *Cs*, *Coccomyxa subellipsoidea* C-169; *Cv*, *Chlorella variabilis*; *OI*, *Ostreococcus lucimarinus* CCE9901; *Ot*, *Ostreococcus tauri*; *Mp*, *Micromonas pusilla* CCMP1545; *Msp*, *Micromonas* sp. RCC299; *Vc*, *Volvox carteri* f. *nagariensis*) y Opistoconta (*Cow*, *Capsaspora owczarzaki* ATCC 30864). Los números de acceso al GenBank acompañan a las secuencias analizadas; la secuencia *HaDAGAT2* deducida se destaca en negra.

2.2.3 Predicción de estructuras y localización subcelular de *HaDAGATs*

Las secuencias aminoacídicas deducidas de *HaDAGATs* fueron comparadas con proteínas homólogas de diferentes grupos filogenéticos de plantas empleando para ello el programa Clustal Omega 1.1.0 (Sievers *et al.*, 2011) y Jalview 2.8 (Waterhouse *et al.*, 2009) para su visualización (Materiales y Métodos, 2.3.1) (Figura 39).

El alineamiento obtenido para *HaDAGAT1s* muestra, después de la región más variable del extremo N-terminal, hasta siete regiones altamente conservadas (I-VII) (Cao *et al.*, 2011). Así mismo, se observa un gran dominio conservado perteneciente a la superfamilia de las O-aciltransferasas de unión a membrana (MBOAT), en el que se encuentran los residuos de asparraguina (N) e histidina (H) que se suponen implicados en el sitio activo de la enzima (Figura 39). Igualmente se observan otros motivos altamente conservados que parecen estar implicados en esta misma función: RXXXE (I), HXXXD (II) y HXXXXD (IV-V) (Figura 39). En cuanto a posibles motivos conservados implicados en la unión a sustratos, cabe destacar los formados por FYXDWWN (V), de unión de acil-CoAs, y HXXXXRHXXXXP (V), de unión éster DAG/forbol (Figura 39). Destacar a su vez la

presencia de múltiples sitios de fosforilación a lo largo de las secuencias, además de una cremallera de leucina formada por 5 residuos de leucina (L) consecutivos, separados entre sí por seis aminoácidos (LX₆LX₆LX₆L₆L) (I-II), posiblemente relacionados con la regulación y función de las enzimas *in vivo*. Por otro lado, en el extremo N-terminal aparece un clúster de argininas altamente conservado (RRR) cuya función podría ser la de asistir a la localización de las enzimas al retículo endoplásmico; se observa además un motivo de señal de retorno a este mismo compartimento celular cercano al extremo C-terminal, YYHD(L/V)MN (VII) (Figura 39). Finalmente, se pueden observar dos residuos aminoacídicos conservados en todas las DGATs: un residuo de prolina (P) que se corresponde con P250 en *HaDAGAT1A* y un residuo de fenilalanina (F) seguido de un residuo de glicina (G) altamente conservado correspondiente a F345 en *HaDAGAT1A* (Figura 39). Existe además otro residuo de prolina (P), esta vez presente en casi todas las DGATs, con excepción de DGAT2 de *Ostreococcus tauri* (Cao *et al.*, 2011), que se corresponde con P412 en *HaDAGAT1A* (Figura 39).

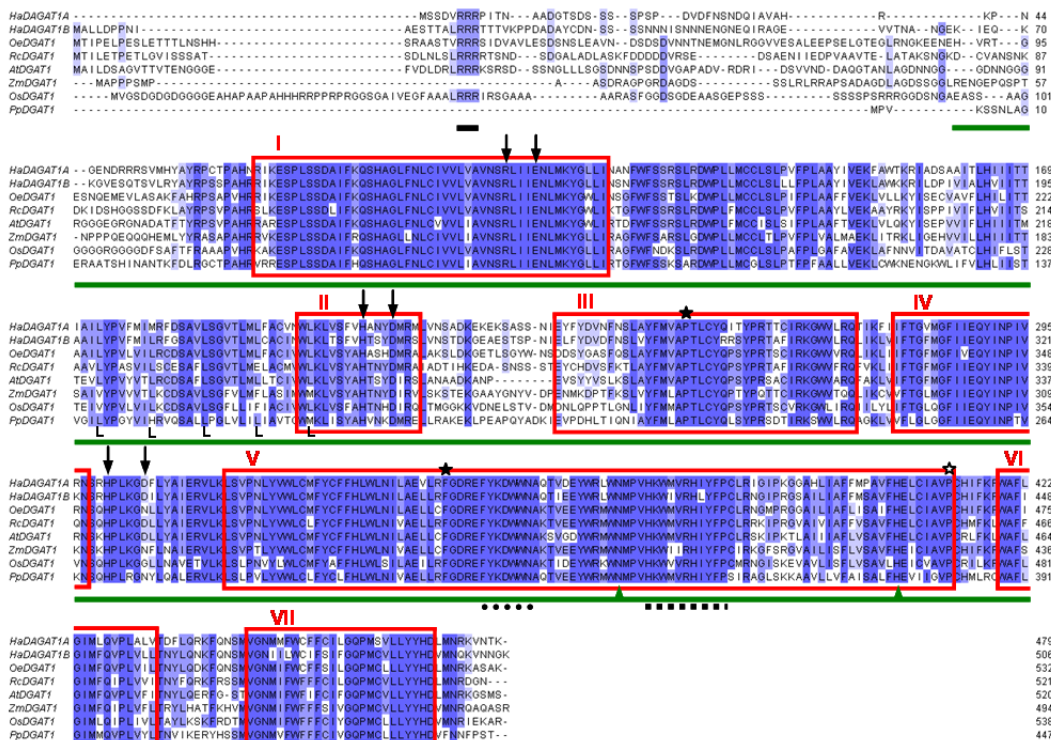
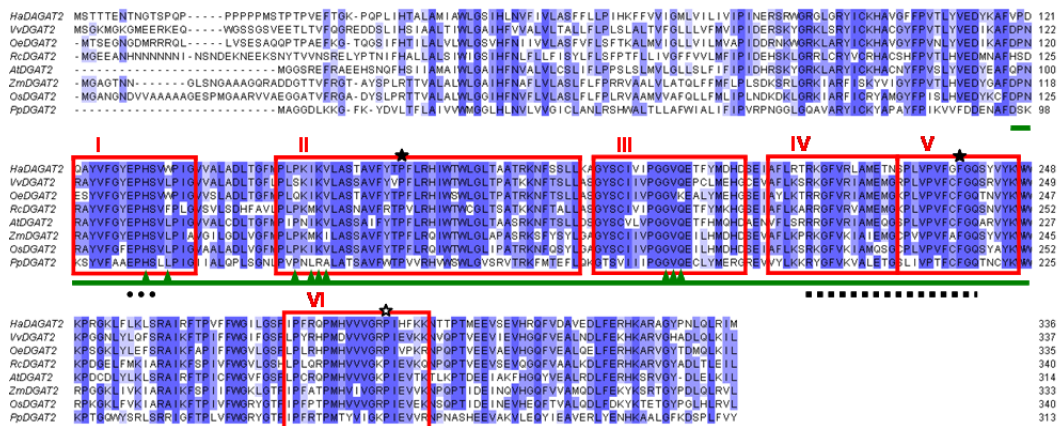


Figura 39. Alineamiento aminoacídico de las *HaDAGAT1s* con *DGAT1s* homólogas de distintas especies vegetales empleando el programa Clustal Omega. En azul se marca el porcentaje de identidad, en cuadros rojos las zonas conservadas destacadas, en verde el gran dominio MBOAT con los residuos implicados en el sitio activo subrayados, en negro el clúster de argininas y posibles motivos de unión a sustrato y en amarillo la supuesta señal de retorno al retículo endoplásmico. Así mismo, también se marcan la cremallera de leucina (L-L-L-L-L), residuos implicados en el sitio activo (↓) y residuos conservados en todas o casi todas las *DGATs* (★, ☆). Las abreviaturas y números de acceso al GenBank se pueden encontrar en la Figura 37.

El alineamiento obtenido para *HaDAGAT2* muestra, después de la región más variable del extremo N-terminal, hasta seis regiones altamente conservadas (I-VI) (Cao *et al.*, 2011). Asimismo, se observa un gran dominio conservado perteneciente a la superfamilia de las lisofosfolípido aciltransferasas (LPLATs) del tipo MGAT, implicadas en la biosíntesis de glicerofosfolípidos, la cual presenta a su vez un supuesto bolsillo de unión a acilos conformado por diversos aminoácidos localizados entre las regiones I y III (Figura 40). Igualmente se observan tres motivos altamente conservados que podrían ejercer un papel importante en la catálisis enzimática: FFP, EPHS (I) y RKGfVRLAMETNSPLVPVFGFGQ (IV-V) (Figura 40). Además, aparece un motivo de señal de retorno al retículo endoplásmico en el extremo C-terminal (LQLRIM). De nuevo se observan aquellos residuos conservados en todas o casi todas las *DGATs* citados anteriormente (Figura 40). En este caso, poco o nada se sabe acerca de posibles motivos implicados en la unión a sustratos.

Figura 40. Alineamiento aminoacídico de la *HaDAGAT2* con *DGAT2s* homólogas de distintas especies vegetales empleando el programa Clustal Omega. En azul se marca el porcentaje de identidad, en cuadros rojos las zonas conservadas destacadas, en negro posibles motivos implicados en la catálisis enzimática y en amarillo la supuesta señal de retorno hacia retículo endoplasmático. Así mismo, también se marcan los residuos conservados en todas o casi todas las *DGATs* (★, ☆). Las abreviaturas y números de acceso al GenBank se pueden encontrar en la Figura 38.



A continuación se realizaron predicciones de dominios transmembrana (TMDs) para cada enzima mediante el programa TMHMM 2.0 (Materiales y Métodos, 2.3.1). De esta manera se pudo constatar la presencia de ocho dominios transmembrana para *HaDAGAT1A*, localizados aproximadamente en las posiciones 84-103, 127-146, 158-180, 185-207, 268-287, 321-343, 409-431 y 446-448 con respecto al extremo N-terminal, nueve para *HaDAGAT1B*, localizados aproximadamente en las posiciones 110-129, 153-172, 184-206, 211-233, 299-321, 347-369, 417-439, 444-463 y 472-494, y tan sólo dos para *HaDAGAT2*, localizados aproximadamente en las posiciones 42-64 y 69-86 (Figura 41). En el caso de todas las *HaDAGAT1s*, el extremo N-terminal estaría situado en el lumen del retículo endoplásmico, al igual que prácticamente el resto de cada proteína, con excepción del extremo C-terminal de *HaDAGAT1B*, que se situaría hacia el citosol (Figura 41B), mientras que en el caso de *HaDAGAT2*, el extremo N-terminal estaría situado en el lado citoplasmático, junto a casi la totalidad de la enzima, extremo C-terminal incluido (Figura 41C).

Resultados

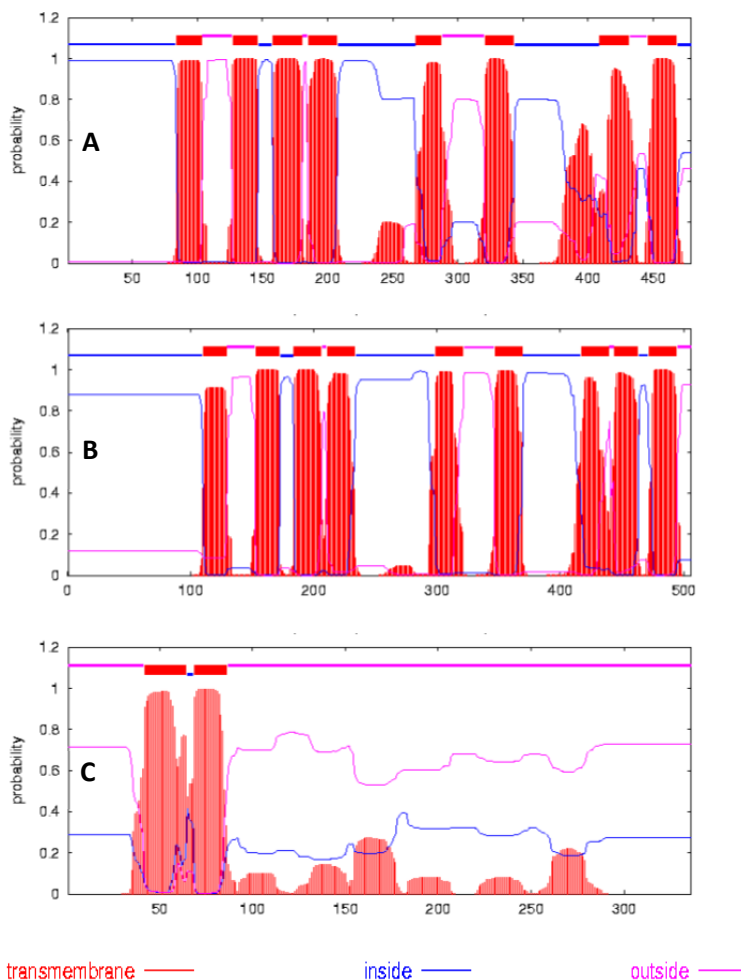


Figura 41. Predicción de dominios transmembrana para las *HaDAGATs* mediante el uso del programa TMHMM 2.0. A) *HaDAGAT1A*, B) *HaDAGAT1B*, C) *HaDAGAT2*. En rojo se marcan los dominios transmembrana, en azul la sección situada en el lumen del RE y en rosa la sección situada en el lado citoplasmático.

Por otro lado, se realizaron predicciones de la localización subcelular de estas enzimas mediante los programas ProtComp 9.0 y WoLF PSORT (Materiales y Métodos, 2.3.1). Las predicciones confirmaron que *HaDAGAT1A*, *HaDAGAT1B* y *HaDAGAT2* son efectivamente proteínas ancladas a la membrana del retículo endoplásmico y que, por tanto, ejercen su función en este compartimento celular.

Tras la recopilación de todos estos datos se pudo realizar a modo de resumen un esquema representativo para cada *HaDAGAT* mediante el programa Geneious 5.4.4 (Figura 42). En todas las proteínas, las regiones altamente conservadas se encuentran inmersas dentro de su correspondiente gran dominio, con los dominios transmembrana solapándose a veces con éstos, salvo en el caso de *HaDAGAT2*, donde sus únicos dos dominios transmembrana (1-2) se encuentran en la región menos conservada y por lo tanto no solapan con motivos conservados.

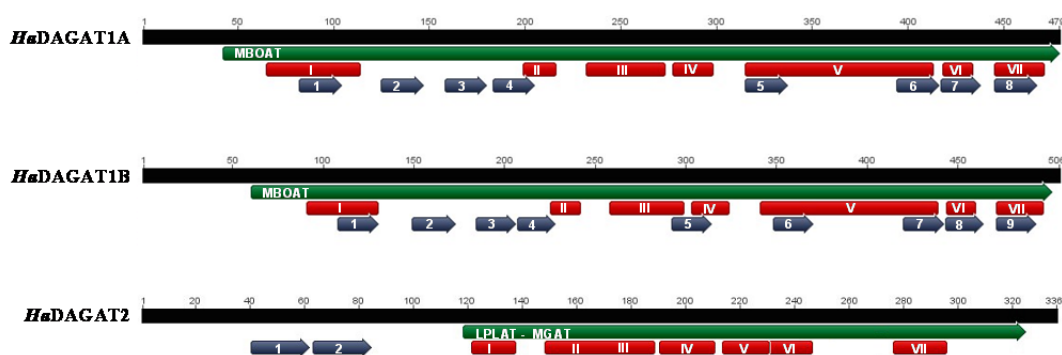


Figura 42. Representación esquemática de las proteínas *HaDAGATs* mediante el uso del programa Geneious 5.4.4. En negro se marcan las secuencias aminoacídicas, en rojo las regiones conservadas, en verde los grandes dominios MBOAT y LPLAT-MGAT y en azul los dominios transmembrana correspondientes a cada *HaDAGAT*.

2.3 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LAS *HaDAGATs* EN SEMILLAS Y TEJIDOS VEGETATIVOS

Para el estudio de la expresión de los genes *HaDAGATs* se realizaron PCRs cuantitativas absolutas en tiempo real (qRT-PCR) (Materiales y Métodos, 2.1.3.4) de muestras de tejido vegetativo (cotiledón, raíz, tallo y hoja) y de semillas en desarrollo (12-33 DDF) de la línea silvestre CAS-6. Los oligonucleótidos utilizados se diseñaron a partir de secuencias específicas internas de cada uno de los genes, siendo el par *qHaDGAT1Af1sp* / *qHaDGAT1Ar1sp* el utilizado para *HaDAGAT1A*, *qHaDGAT1Bf1sp* / *qHaDGAT1Br1sp* para *HaDAGAT1B* y *qHaDGAT2f1sp* / *qHaDGAT2r1sp* en el caso de *HaDAGAT2* (Apéndice I).

Resultados

Los niveles de expresión de *HaDAGAT1A* en tejidos vegetativos, así como los observados en semillas en desarrollo, fueron los más bajos de las tres *HaDAGATs*, no llegando a superar la molécula por ng en el mejor de los casos (Figura 43).

Los niveles de expresión de *HaDAGAT1B*, por el contrario, siguieron un patrón constante en los distintos tejidos vegetativos a excepción del cotiledón, con valores medios mayores a los encontrados en *HaDAGAT1A* cercanos a los 2 órdenes de magnitud (Figura 43). En semillas en desarrollo, esta diferencia se acentuó aún más, observándose de nuevo mayor expresión en semillas en torno a los 12-15 DDF (Figura 43).

Los niveles de expresión de *HaDAGAT2* en los distintos tejidos vegetativos fueron constantes, alrededor de las 75 moléculas/ng (Figura 43), mientras que en semillas en desarrollo se hallaron valores medios en torno a las 400 moléculas/ng en los primeros estadios de la semilla. Finalmente se produjo una nueva caída de los niveles de expresión hasta valores parejos a los observados en tejidos vegetativos (Figura 43).

En general, *HaDAGAT2* se expresa más en semillas en desarrollo, seguido por *HaDAGAT1B* y *HaDAGAT1A*, observándose de nuevo un máximo de expresión a los 15 DDF. En tejidos vegetativos, por el contrario, los niveles de expresión alcanzaron niveles similares para cada gen con excepción de *HaDAGAT1A*, siendo de nuevo *HaDAGAT2* la más expresada.

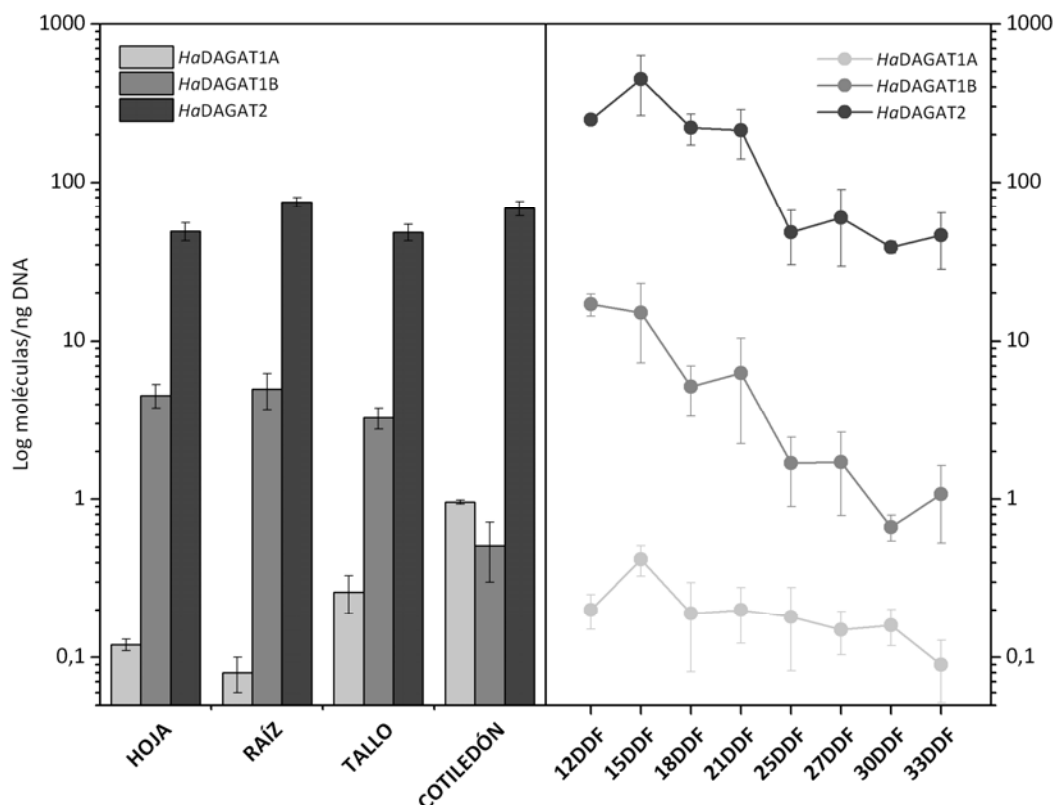


Figura 43. Perfil de expresión de los genes *HaDAGATs* en tejidos vegetativos (hoja, raíz, tallo y cotiledón) y en semillas en desarrollo en la línea silvestre CAS-6 mediante qRT-PCR absoluta. Los datos muestran los valores medios \pm SD de tres plantas independientes. DDF: Días Después de Floración.

2.4. CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LAS *HaDAGATs*

2.4.1 Expresión heteróloga de proteínas recombinantes *HaDAGATs* en *S. cerevisiae*

Para la expresión heteróloga de las *HaDAGATs* en levaduras se empleó la estirpe cuádruple mutante H1246 (Materiales y Métodos, 1.4.3) transformada con las construcciones pYES2::*HaDAGAT1A*, pYES2::*HaDAGAT1B* y pYES2::*HaDAGAT2* (Materiales y Métodos, 2.1.6.2). Como controles se emplearon dicha estirpe mutante transformada o no con el vector pYES2 vacío, H2146-pYES2 y H1246

Resultados

respectivamente, y la estirpe silvestre W303-1A (Materiales y Métodos, 1.4.3). En todos los casos, los cultivos se crecieron a 30°C en medio mínimo de selección SC-URA (Materiales y Métodos, 1.5.3), utilizando glucosa como fuente de carbono y galactosa como inductor de la expresión de las proteínas recombinantes (Materiales y Métodos, 2.1.9.1.1). Los crecimientos de las estirpes W303-1A y H1246 sin vector, a diferencia del resto, se llevaron a cabo en medio mínimo SC (Materiales y métodos, 1.5.3).

2.4.1.1 Efecto sobre la tasa de crecimiento en *S. cerevisiae*

Para determinar el efecto de la expresión heteróloga en levaduras sobre la tasa de crecimiento se compararon el crecimiento de la estirpe mutante H1246 y la estirpe silvestre W303-1A frente a las transformadas comentadas en el apartado anterior. La inducción se inició una vez los cultivos alcanzaron una DO_{600} de 0,4, para ser medida cada hora, durante 24 h totales, por triplicado (Materiales y Métodos, 2.1.9.1.1). La turbidez de cada cultivo medida a una densidad óptica de 600 nm (DO_{600}) se relacionó directamente con el número de células presentes en éstos.

En la Figura 44 se muestran las curvas de crecimiento de todos los cultivos ensayados.

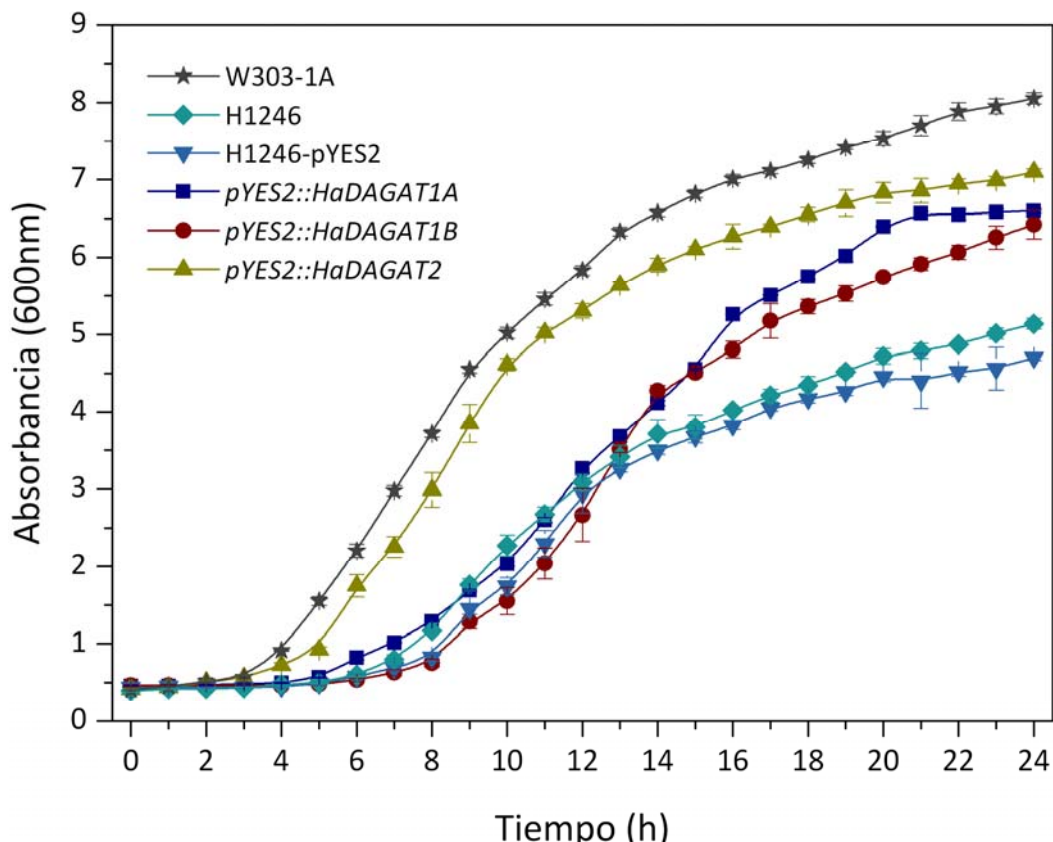


Figura 44. Representación de las curvas de crecimiento de la estirpe cuádruple mutante H1246 transformada con las construcciones *pYES2::HaDAGATs*, junto con la estirpe con o sin vector *pYES2* vacío y la estirpe silvestre W303-1A como controles. Los cultivos se crecieron en medio mínimo de selección SC-URA suplementado con 2% galactosa para inducir la expresión de los genes a 30°C durante 24h; H1246 sin plásmido *pYES2* vacío y W303-1A crecieron en medio mínimo SC. La DO_{600} se midió cada hora, tomando una pequeña alícuota de cada cultivo, con *factor de dilución*, *fd*: 10. Los datos muestran los valores medios \pm SD de tres cultivos independientes.

Durante el *período de latencia* se pudieron observar dos comportamientos bien diferenciados: los cultivos que contenían las construcciones *pYES2::HaDAGAT1s*, así como los cultivos de la estirpe H1246 con y sin plásmido *pYES2* vacío, prolongaron dicho período hasta las 6-8 h de inducción aproximadamente, mientras que el cultivo que contenía *pYES2::HaDAGAT2*, junto con la estirpe W303-1A, lo reducían hasta las 4-5 h de inducción (Figura 44).

Resultados

Una vez alcanzada la *fase exponencial*, los cultivos experimentaron un crecimiento desigual, en la que gráficamente los cultivos *pYES2::HaDAGAT2* y W303-1A destacaron por encima del resto (Figura 44). No obstante, para valorar dicha fase, se calcularon las tasas de crecimiento (μ) y los tiempos de generación (τ) para cada cultivo (Materiales y Métodos, 2.1.11) (Tabla 22).

Tabla 22. Tasas de crecimiento (μ) y tiempos de generación (τ) calculados a partir de la fase exponencial de los cultivos de la estirpe silvestre W303-1A, la estirpe mutante H1246, con y sin plásmido *pYES2* vacío, y las transformadas con *pYES2::HaDAGAT1A*, *pYES2::HaDAGAT1B* y *pYES2::HaDAGAT2* en H1246.

	Tasa de crecimiento (μ) (h^{-1})	Tiempo de generación (τ) (h)
W303-1A	0,28	2,44
H1246	0,24	2,86
H1246-pYES2	0,24	2,88
<i>pYES2::HaDAGAT1A</i>	0,19	3,58
<i>pYES2::HaDAGAT1B</i>	0,29	2,40
<i>pYES2::HaDAGAT2</i>	0,28	2,46

A raíz de los parámetros calculados, se observó cómo el cultivo W303-1A se caracterizaba por poseer una tasa de crecimiento similar a la de los cultivos *pYES2::HaDAGAT1B* y *pYES2::HaDAGAT2*, en torno a 0,28-0,29 h^{-1} . H1246 y H1246-pYES2 presentaron la misma tasa de crecimiento, 0,24, mientras que el cultivo que presentó menor tasa de crecimiento fue *pYES2::HaDAGAT1A* con 0,19. En correlación con estos datos, *pYES2::HaDAGAT1A* fue el cultivo que mostró mayor tiempo de generación, 3,58 h, seguido de H1246-pYES2 y H1246, con 2,88 y 2,86 h, respectivamente. El cultivo *pYES2::HaDAGAT2* mostró un valor de 2,46 h y W303-1A de 2,44 h, mientras que *pYES2::HaDAGAT1B* fue el cultivo con menor tiempo de generación, 2,40 h.

Finalmente, los cultivos alcanzaron la *fase estacionaria* con una densidad óptica diferente, distinguiéndose hasta cuatro puntos de saturación máxima (Figura 44). La estirpe W303-1A mostró el mayor punto de saturación, correspondiente a una DO_{600} de 8.0, seguida del cultivo *pYES2::HaDAGAT2*, con un punto de saturación máxima en torno a 7.0. Los cultivos *pYES2::HaDAGAT1A* y *pYES2::HaDAGAT1B* mostraron un punto de saturación máxima similar situado en 6.5 mientras que H1246 y H1246-pYES2 fueron los cultivos con menor punto de saturación alcanzado en esta fase, con valores cercanos a 5.0.

2.4.1.2 Análisis de expresión de *HaDAGATs* en *S. cerevisiae*

Para comprobar la expresión de los genes *HaDAGATs* transformados en la estirpe mutante H1246 se extrajo RNA total tras 3 y 18 h de inducción (Materiales y Métodos, 2.1.1.2.1) de todas las estirpes recombinantes generadas, así como de los controles empleados (Resultados, 2.4.1), con excepción de la estirpe silvestre W303-1A. A continuación, se sintetizaron los correspondientes cDNAs (Materiales y Métodos, 2.1.1.2.2). Estos cDNAs fueron utilizados como molde para llevar a cabo reacciones de PCR (Materiales y Métodos, 2.1.3.1d). Los pares de oligonucleótidos usados fueron los mismos que los usados en el análisis de expresión de *HaDAGATs* en semillas y tejidos vegetativos (Resultados, 2.3). Como control interno se comprobó la expresión del gen del RNA ribosómico 18S de *S. cerevisiae*, usando para ello el par de oligonucleótidos *Sc18Sf1sp* / *Sc18Sr1sp* (Apéndice I).

Tal y como muestra la Figura 45, el gel obtenido a partir de dichas reacciones de PCR certificó la expresión de los mRNAs de *HaDAGATs* en sus correspondientes líneas recombinantes, así como la ausencia de dicha expresión en la estirpe mutante H1246, con y sin plásmido pYES2 vacío.

Resultados

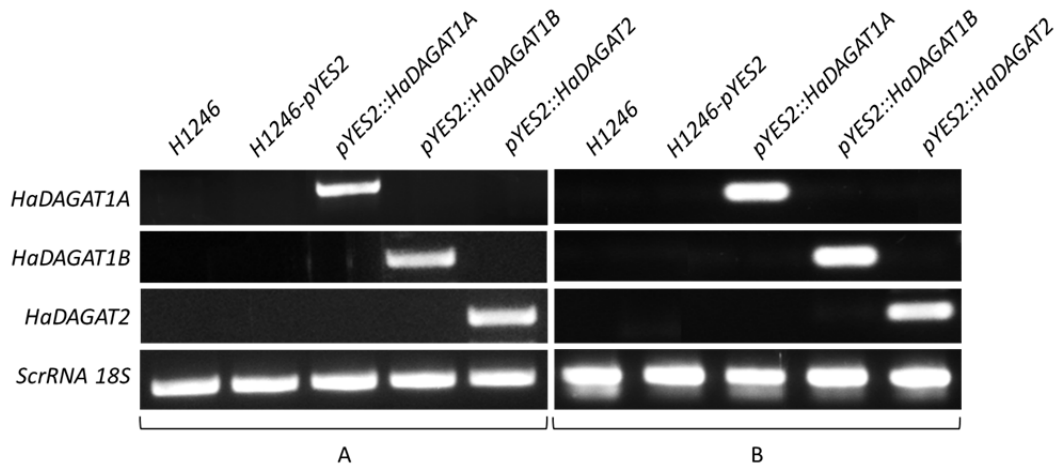


Figura 45. Expresión de los genes *HaDAGAT1A*, *HaDAGAT1B*, *HaDAGAT2* y *ScrRNA18S* en la estirpe cuádruple mutante H1246 de *S. cerevisiae*. RNA extraídos de cultivos tras 3h (A) y 18h (B) de crecimiento inducido y posterior retrotranscripción a cDNA. Gel al 2% de agarosa visualizado con bromuro de etidio.

2.4.1.3 Análisis lipídico *in vivo*

Para determinar la funcionalidad de las *HaDAGATs* transformadas en la estirpe mutante H1246 se extrajeron lípidos totales de cultivos de 50 ml tras 48 h de inducción (Materiales y Métodos, 2.2.1.1.1) de todas las estirpes recombinantes generadas, así como de los controles empleados (Resultados, 2.4.1). Tras dicha extracción, se separaron los TAGs mediante cromatografía en capa fina (Materiales y Métodos, 2.2.1.2) y se analizaron por cromatografía de gases (Materiales y Métodos, 2.2.1.4).

En las placas TLC no se observaban bandas de esteroides por encima de TAGs en ningún carril y sí se observaba bandas de TAGs en las estirpes recombinantes generadas, a diferencia de las estirpes H1246 con y sin plásmido pYES2 vacío; W303-1A sí presentó banda de TAGs. A su vez se pudo observar disminución de intensidad de bandas DAGs y AGs en estirpes recombinantes, ya que las *HaDAGATs* las usan como sustratos.

No se pudo cuantificar el contenido total de aceite debido a la poca diferencia de peso (peso lípidos totales / peso seco).

2.4.1.4 Ensayos de actividad *HaDAGAT in vitro*

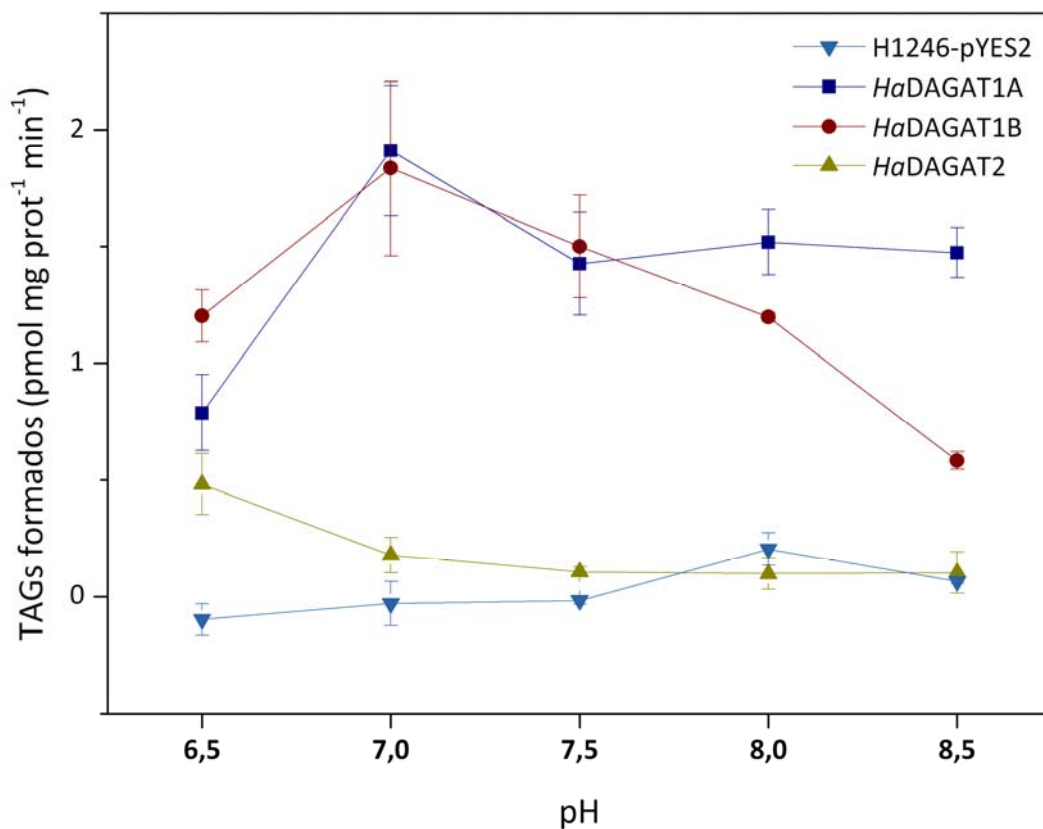
Para caracterizar bioquímicamente las *HaDAGATs* transformadas en la estirpe mutante H1246 se aislaron fracciones microsomales de cultivos de 250 ml tras 18 h de inducción (Materiales y Métodos, 2.1.9.1.2) de todas las estirpes recombinantes generadas, así como del control H1246-pYES2 (Resultados, 2.4.1). Una vez obtenidos, se cuantificaron las proteínas microsomales presentes en ellos (Materiales y Métodos, 2.1.9.1.3) y se emplearon en diversos ensayos de actividad *in vitro* (Materiales y Métodos, 2.2.2.1).

2.4.1.4.1 Efecto del pH en la actividad

El primer objetivo establecido fue determinar el pH óptimo de cada *HaDAGAT* al que realizar los ensayos de actividad. La realización de estos ensayos con diferentes pH se llevó a cabo tal y como se detalla en Materiales y Métodos, 2.2.2.1, añadiendo en este caso tampón stock a diferentes pH (6.5-8.5) (Materiales y Métodos, 1.7.2.2) y usando oleil-CoA marcado radiactivamente ([1-¹⁴C] 18:1-CoA) como sustrato. De esta forma, se determinó la curva de pH de las actividades *HaDAGATs* de girasol en la estirpe cuádruple mutante H1246 (Figura 46).

Figura 46. Efecto del pH en la actividad *HaDAGAT1A*, *HaDAGAT1B* y *HaDAGAT2*. Curvas de pH de las *HaDAGATs* expresadas heterológicamente en la estirpe cuádruple mutante H1246 *S. cerevisiae*, usando como control dicha estirpe con el vector pYES2 vacío. La actividad fue expresada como la cantidad de TAGs formados por minuto y microgramo de enzima, usando en la reacción proteínas microsomales y los sustratos [1-¹⁴C] 18:1-CoA y di-18:1-DAG, este último como aceptor de acilos. Los datos representan el valor medio \pm SD de tres ensayos independientes.

Resultados



Como se observa en la Figura 46, tanto *HaDAGAT1A* como *HaDAGAT1B* presentan un pH óptimo en torno a 7.0, observándose como a valores superiores disminuyen sus actividades. *HaDAGAT1A* presenta ligeramente mayor actividad a dicho pH que *HaDAGAT1B*. En el caso de *HaDAGAT2*, su pH óptimo parece estar alejado del de las *HaDAGAT1s*, situándose en valores más ácidos, cercanos a 6.5, si bien, a pHs más alcalinos no se observan diferencias significativas de actividad con respecto al control H1246 transformado con el vector pYES2 vacío; presentando actividad prácticamente nula.

2.4.1.4.2 Especificidad por distintos sustratos

A continuación se trató de determinar la especificidad de cada *HaDAGAT* por diferentes sustratos. Para ello, los ensayos se realizaron nuevamente tal y como se detalla en Materiales y Métodos, 2.2.2.1, añadiendo en este caso la misma concentración de estearoil-CoA y oleoil-CoA marcados radiactivamente ($[1-^{14}\text{C}]$ 18:0-CoA y $[1-^{14}\text{C}]$ 18:1-CoA, respectivamente) (Materiales y Métodos, 1.7.2.2). De esta forma, se determinó la afinidad por estos sustratos de las *HaDAGATs* de girasol en la estirpe cuádruple mutante H1246 (Figura 47).

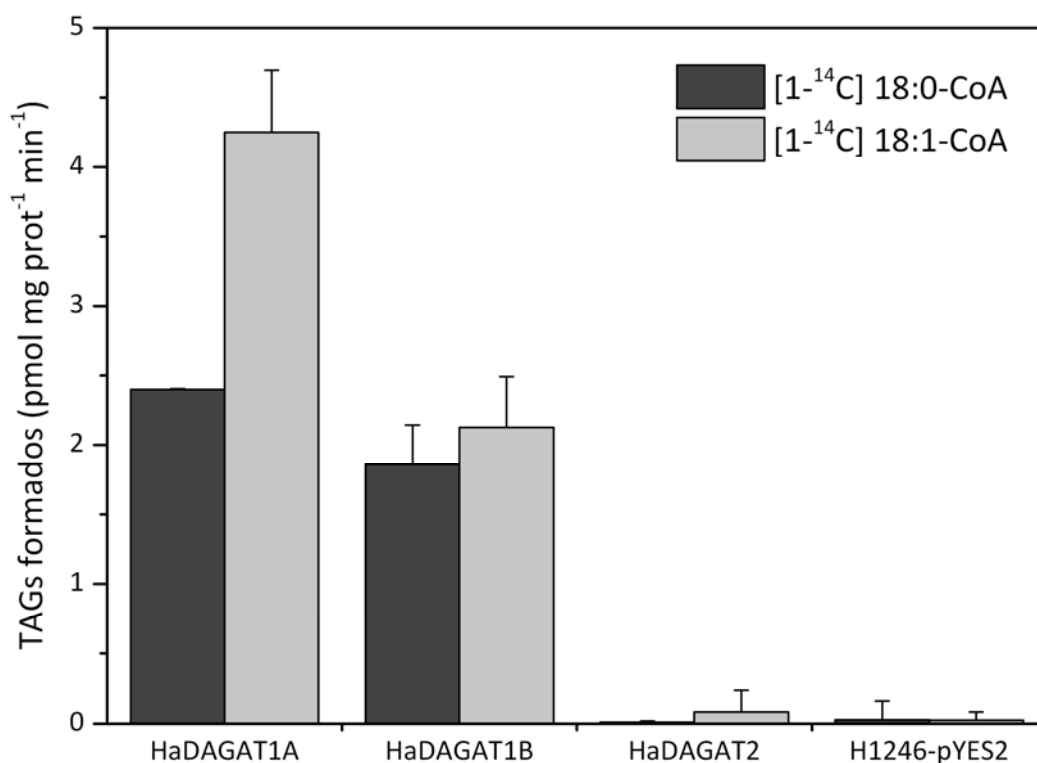


Figura 47. Especificidad por sustrato de *HaDAGAT1A*, *HaDAGAT1B* y *HaDAGAT2*. Especificidad por sustrato de las *HaDAGATs* expresadas heterológicamente en la estirpe cuádruple mutante H1246 de *S. cerevisiae*, usando como control dicha estirpe con el vector pYES2 vacío. La actividad fue expresada como la cantidad de TAGs formados por minuto y microgramo de enzima, usando en la reacción proteínas microsomales y los sustratos $[1-^{14}\text{C}]$ 18:0-CoA (■), $[1-^{14}\text{C}]$ 18:1-CoA (■) y di-18:1-DAG, este último como aceptor de acilos. Los datos representan el valor medio \pm SD de tres ensayos independientes.

Resultados

Como se observa en la Figura 47, *HaDAGAT1A* mostró una actividad aproximadamente 2 veces superior con $[1-^{14}\text{C}]$ 18:1-CoA como sustrato que con $[1-^{14}\text{C}]$ 18:0-CoA, 4,25 y 2,40 pmol mg proteína⁻¹ min⁻¹, respectivamente. *HaDAGAT1B*, sin embargo, presentó prácticamente el mismo perfil de especificidad para ambos sustratos, siendo de 1,86 pmol mg proteína⁻¹ min⁻¹ para $[1-^{14}\text{C}]$ 18:0-CoA y de 2,13 pmol mg proteína⁻¹ min⁻¹ para $[1-^{14}\text{C}]$ 18:1-CoA. Es decir, *HaDAGAT1A* muestra mayor especificidad por oleoil-CoA que *HaDAGAT1B* y ambas proteínas igual especificidad por el estearoil-CoA. Por otro lado, *HaDAGAT2* no mostró actividad alguna, con valores muy próximos a los obtenidos con el control H1246-pYES2.

2.4.2 Análisis funcional de las proteínas recombinantes *HaDAGATs* en *A. thaliana*

Para el análisis funcional de las *HaDAGATs* en *A. thaliana* se empleó la línea KO N3861 (*AS11*) (Materiales y Métodos, 1.4.5) transformada con las construcciones pCAMBIA-1300EC::*HaDAGAT1A*, pCAMBIA-1300EC::*HaDAGAT1B* y pCAMBIA-1300EC::*HaDAGAT2* (Materiales y Métodos, 2.1.6.3), usando la estirpe GV3101/pMP90 de *A. tumefaciens* como vector de transformación (Materiales y Métodos, 2.1.8.4.2). Como controles se empleó dicha línea KO sin transformar, N3861, y la línea silvestre Col-0 (Materiales y Métodos, 1.4.5). En todos los casos, las plantas se crecieron en cámaras de cultivo bajo condiciones estándar (Materiales y Métodos, 1.4.5.1). Excepcionalmente, las semillas de la línea KO N3861 (*AS11*) fueron germinadas *in vitro* debido a su nula germinación en tierra (Materiales y Métodos, 1.4.5.1).

La verificación de homocigosis se llevó a cabo en base a la línea KO en estudio, N3861 (*AS11*) (Materiales y Métodos, 2.1.8.4.1b) y la selección de líneas transgénicas se realizó en placas de Petri con medio sólido MS suplementado con higromicina B (15 µg/ml) (Materiales y Métodos, 2.1.8.4.3).

2.4.2.1 Análisis de expresión de *HaDAGATs* en *A. thaliana*

Para comprobar la expresión de los genes *HaDAGATs* transformados en la línea KO N3861 (*AS11*) se extrajo RNA total de hojas basales (Materiales y Métodos, 2.1.1.3.1) de todas las líneas transgénicas generadas, así como del control N3861 (Resultados, 2.4.2). A continuación, se sintetizaron los correspondientes cDNAs (Materiales y Métodos, 2.1.1.3.3). Estos cDNAs fueron utilizados como molde para llevar a cabo reacciones de PCR (Materiales y Métodos, 2.1.3.1d). Los pares de oligonucleótidos usados fueron los mismos que los usados en el análisis de expresión de *HaDAGATs* en semillas y tejidos vegetativos (Resultados, 2.3). Como control interno se comprobó la expresión del gen de la actina de *A. thaliana*, usando para ello el par de oligonucleótidos *AtActin-F / AtActin-R* (Apéndice I).

Tal y como muestra la Figura 48, el gel obtenido a partir de dichas reacciones de PCR certificó la expresión de los mRNAs de *HaDAGATs* en sus correspondientes líneas transgénicas, así como la ausencia de dicha expresión en la línea KO N3861 (*AS11*) sin transformar.

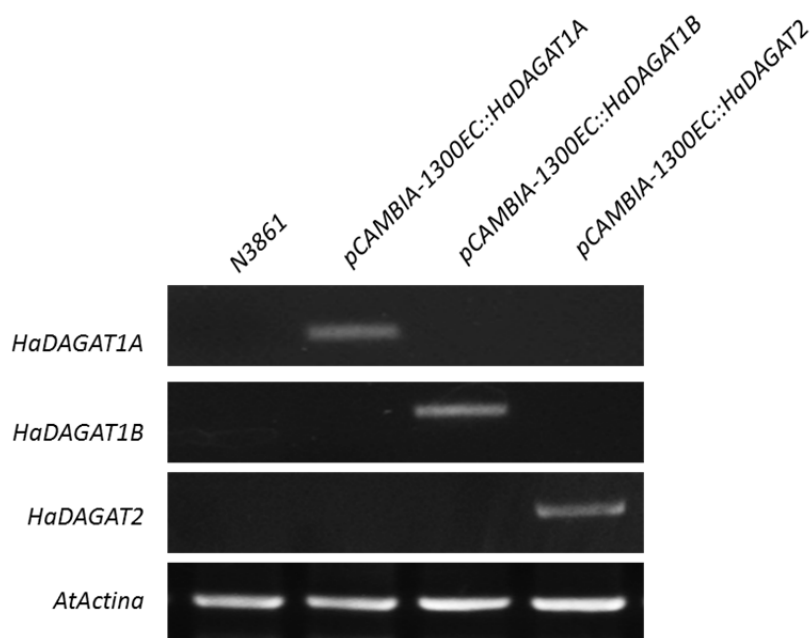


Figura 48. Expresión de los genes *HaDAGAT1A*, *HaDAGAT1B*, *HaDAGAT2* y *AtActina* en la línea KO N3861 (*AS11*) de *A. thaliana*. RNA extraídos de hojas basales y posterior retrotranscripción a cDNA. Gel al 2% de agarosa visualizado con bromuro de etidio.

Resultados

2.4.2.2 Análisis fenotípico de semillas

Para determinar la funcionalidad de las *HaDAGATs* transformadas en la línea KO N3861 (*AS11*) se efectuó un análisis fenotípico basado en la observación detallada de caracteres morfológicos de las semillas (Materiales y Métodos, 2.1.9.2.1) de todas las líneas transgénicas generadas, así como de los controles empleados (Resultados, 2.4.2).

Todas las líneas transgénicas *HaDAGATs*, al igual que la línea control Col-0, presentaron diferencias con respecto a la línea control N3861 (*AS11*). Éstas presentaron semillas con un volumen mayor que las semillas de la línea KO N3861 (*AS11*).

2.4.2.3 Análisis lipídico de semillas

Para determinar la funcionalidad de las *HaDAGATs* transformadas en la línea KO N3861 (*AS11*) se extrajeron lípidos totales de semillas (Materiales y Métodos, 2.2.1.1.2) de todas las líneas transgénicas generadas, excepto *HaDAGAT1B* al quemarse sus semillas T₃, así como de los controles empleados (Resultados, 2.4.2). Tras dicha extracción, se tomó una alícuota que contenía los TAGs y se analizó por cromatografía de gases (Materiales y Métodos, 2.2.1.4), reservando el resto para la obtención directa de ésteres metílicos (Materiales y Métodos, 2.2.1.3).

2.4.2.3.1 Análisis de la composición de TAGs

El primer objetivo establecido fue determinar la composición de TAGs extraídos con anterioridad (Resultados, 2.4.2.3) (Tabla 23).

2.4.2.3.2 Análisis de la composición de FAMES

A continuación se trató de determinar la composición de FAMES de los TAGs analizados con anterioridad (Resultados, 2.4.2.3.1) (Tabla 24).

No se pudo cuantificar el contenido total de aceite debido a la poca diferencia de peso (peso lípidos totales / peso seco).

BLOQUE II: ANÁLISIS DE TRIACILGLICÉRIDOS (TAGs) EN LÍNEAS MUTAGENIZADAS DE GIRASOL ALTO OLEICO ALTO ESTEÁRICO (HOHE) Y SELECCIÓN DE NUEVOS CANDIDATOS

1. OBJETIVO Y CRITERIOS DE SELECCIÓN

A modo de recordatorio, teniendo en cuenta el diseño experimental seguido (Materiales y Métodos, 2.5), resumimos el objetivo y los criterios de selección de este bloque de la presente Tesis Doctoral.

De forma genérica, nos fijamos en las siguientes variables o parámetros: contenidos en EOE, E, SUS y valores αSat y derivamos a partir de éstos los siguientes criterios de selección (Materiales y Métodos, 2.5):

- Contenido en EOE ≥ 8
- Contenido en E ≥ 20
- Contenido en SUS ≥ 20
- Valor $\alpha\text{Sat} \geq 0.30$

Estos criterios de selección permiten aglutinar en un mismo estudio el objetivo de partida inicial de este bloque: obtener nuevos mutantes que contengan una mayor proporción de TAGs del tipo SUS, ya sea debido a un incremento en el contenido de ácido esteárico (E) o una mejor distribución de los AGs saturados en los TAGs y, en consecuencia, valores αSat próximos al 0,5 óptimo.

A continuación describimos una a una las poblaciones de cada generación obtenidas en el presente estudio.

2. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE POBLACIONES (M₂-M₅)

2.1 GENERACIÓN M₂

La población inicial de esta generación se compuso de las semillas procedentes de 370 plantas, de ellas se analizaron un total de 1938 semillas. Tras la selección, sólo 33 de las semillas analizadas cumplían los requisitos exigidos (1,7% del total analizado), pertenecientes a 17 plantas distintas. No obstante, a esta selección se sumaron 8 semillas (0,4%) de otras 3 plantas que cumplían al menos tres de los criterios de selección. Por lo que, finalmente, se seleccionaron en total 41 semillas pertenecientes a 20 plantas diferentes. La identificación de estas semillas y sus plantas correspondientes se detallan en Resultados, tal. A partir de éstas se obtuvo la siguiente generación de plantas M₂.

2.2 GENERACIÓN M₃

De la población de semillas generadas a partir de las 41 plantas M₂ se analizaron 196 semillas pertenecientes a 18 plantas distintas. Tras la selección, sólo 4 de las semillas analizadas cumplían los cuatro criterios de selección exigidos (2,0%), pertenecientes a 4 plantas distintas. No obstante, hubo que descartarlas, ya que dos de ellas no germinaron y las plantas derivadas de las dos restantes no crecieron. Así pues, se decidió continuar con 7 semillas (3,5%) pertenecientes a 3 plantas diferentes, que cumplían al menos tres de los criterios de selección*. La identificación de estas semillas y sus plantas correspondientes se detallan en Resultados, tal. A partir de estas semillas se obtuvo la siguiente generación de plantas M₃.

2.3 GENERACIÓN M₄

De la población de semillas generadas a partir de las 7 plantas M₃ se analizaron 104 semillas pertenecientes a estas 7 plantas. Tras la selección, tan sólo 6 de las semillas analizadas cumplían los requisitos exigidos de manera estricta (5,7%), pertenecientes a 3 plantas distintas. No obstante, hubo que descartar 5 de estas semillas, ya que o bien no germinaron, la plántula generada no sobrevivió o la

planta derivada no creció, quedando tan sólo 1 semilla procedente de 1 planta. Llegados a este punto, se seleccionaron además 5 semillas (4,8%) pertenecientes a 3 plantas distintas que cumplían al menos tres de los criterios de selección*. La identificación de estas semillas y sus plantas correspondientes se detallan en Resultados, tal. En general, esta generación se caracterizó por una baja tasa de germinación y/o alta mortalidad de las plantas. A partir de estas 6 semillas de 3 plantas diferentes se obtuvo la siguiente generación de plantas M₄.

2.4 GENERACIÓN M₅

De la población de semillas generadas a partir de las 6? plantas M₄ se analizaron 78 semillas pertenecientes a 5 plantas distintas. De nuevo, tras la selección, tan sólo 4 de las semillas analizadas cumplían los cuatro criterios de selección exigidos (5,1%), pertenecientes a 3 plantas diferentes. No obstante, hubo que descartar 3 de estos candidatos, ya que las plantas generadas no crecieron pese a la alta tasa de germinación experimentada, quedando tan sólo 1 semilla de 1 planta. Llegados a este punto, se seleccionaron además 5 semillas (6,4%) pertenecientes a 4 plantas distintas que cumplían al menos tres de los criterios de selección*. La identificación de estas semillas y sus sobres correspondientes se detallan en Resultados, tal. En general, esta generación se caracterizó por una alta mortalidad de las plantas. A partir de estas 6 semillas de 4 plantas diferentes se obtuvo la siguiente generación de plantas M₅, con sus correspondientes semillas.

* Como ya se mencionó en Materiales y Métodos, 2.5, existen limitaciones que impiden continuar con alguna de las semillas seleccionadas. En estos casos se compararon sus análisis con los de semillas pertenecientes al mismo sobre y se trató de continuar con semillas que, pese a no cumplir los 4 requisitos de manera estricta, sí lo hacían de al menos 3.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE POBLACIONES (M₂-M₅)

Para facilitar el análisis estadístico de las poblaciones de semillas analizadas, inicialmente se estudió cada variable de manera independiente mediante estadística descriptiva (Materiales y Métodos, 2.4.1), pudiendo así describir la evolución de éstas generación tras generación. Posteriormente, se analizó cada generación por separado, pudiendo así comparar todas las variables de cada generación en su conjunto, tratando de establecer relaciones entre éstas mediante inferencia estadística (Materiales y Métodos, 2.4.2). En un tercer apartado, se caracterizaron las poblaciones en función del cumplimiento de sus criterios de selección. Para todo ello se empleó el programa OriginPro 9.1 (Materiales y Métodos, 2.3.2). Finalmente, se estudió la heredabilidad de las variables estudiadas..

3.1. ANÁLISIS POR VARIABLE A LO LARGO DE LAS GENERACIONES

Como ya ha sido indicado, en este apartado se analizarán de forma unidimensional cada una de las variables o parámetros a estudio. Para ello fue necesario recabar toda la información procedente de las poblaciones analizadas (Materiales y Métodos, 2.5) y extraer aquellos datos relativos a las variables en cuestión. La finalidad de este análisis fue conseguir un entendimiento básico de los datos, caracterizándolos a través de tablas de distribución de frecuencias, gráficos, estadísticos y modelos descriptivos. La naturaleza de las variables y los objetivos del estudio fueron determinantes a la hora de fijar las técnicas empleadas.

3.1.1 Contenido de esteárico (E)

Para facilitar el estudio de la variable “contenido de esteárico (E)”, se creó inicialmente una *tabla de distribución de frecuencias* (Materiales y Métodos, 2.4.1), la cual resume la contribución de las semillas analizadas a dicha variable, generación tras generación (Tabla 25).

Tabla 25. Distribución de frecuencias de la variable “contenido de esteárico (E)” en las distintas generaciones poblacionales (M₂-M₅). Las frecuencias se dividieron en clases o intervalos, con sus correspondientes límite inferior (LI) y límite superior (LS). FA: frecuencia absoluta | FAA: frecuencia absoluta acumulada | FR: frecuencia relativa | FRA: frecuencia relativa acumulada.

GENERACIÓN	CLASE	LI	LS	FA	FAA	FR	FRA
M₂	1	0	10	303	303	0,16	0,16
	2	10	20	1469	1772	0,76	0,91
	3	20	30	166	1938	0,09	1,00
	4	30	40	0	1938	0,00	1,00
M₃	1	0	10	9	9	0,05	0,05
	2	10	20	36	45	0,18	0,23
	3	20	30	144	189	0,73	0,96
	4	30	40	7	196	0,04	1,00
M₄	1	0	10	3	3	0,03	0,03
	2	10	20	14	17	0,13	0,16
	3	20	30	86	103	0,83	0,99
	4	30	40	1	104	0,01	1,00
M₅	1	0	10	0	0	0,00	0,00
	2	10	20	2	2	0,03	0,03
	3	20	30	70	72	0,96	0,99
	4	30	40	1	73	0,01	1,00

Generación M₂: Respecto al contenido de esteárico (E), el 91% de las semillas analizadas de la generación inicial se encontraban incluidas en las dos primeras clases de las cuatro establecidas para esta variable [0-20]. En concreto, la clase 1 [0-10] aportó un 17% del total al encontrarse en ella 303 semillas de las 1772 examinadas. La clase 2 [10-20], por su parte, aportó un 83%, incluyéndose en ésta 1469 semillas, lo que la convierte en la clase más frecuente. La clase 3 [20-30] aglutinó tan sólo 166 de las semillas analizadas, lo que supone aproximadamente un 9% del total analizado. Este porcentaje coincide con el porcentaje de semillas analizadas que cumplieron el criterio de selección establecido para esta variable ($E \geq 20$), ya que en esta generación la clase 4 [30-40] no tuvo aportación alguna.

Generación M₃: La distribución de las frecuencias en esta generación, a diferencia de la anterior, fue ligeramente más dispersa. En esta ocasión, un 96% de las semillas se encontraban en las tres primeras clases [0-30]. Concretamente, la clase que mayor aportación hizo fue la 3 [20-30], con 144 semillas de las 189 incluidas en estas tres clases (76%), seguida de la clase 2 [10-20] con 36 semillas (19%) y la clase 1 [0-10] con tan sólo 9 semillas, un 5% aproximadamente de este total. La clase 4 [30-40] sí obtuvo representación en esta generación, aportando 7 semillas al cómputo global, lo que supone aproximadamente un 4% del total acumulado. De este modo, el porcentaje de semillas que cumplieron el criterio de selección ($E \geq 20$) debe calcularse sumando las frecuencias absolutas obtenidas en las clases 3 y 4, un total de 151 semillas, y dividiéndolas por el tamaño poblacional de esta generación ($n = 196$), lo que supone un 77% del total analizado.

Generación M₄: Prácticamente el 100% del contenido de esteárico (E) acumulado de esta generación se corresponde con la suma de las frecuencias halladas en las tres primeras clases [0-30], al igual que veíamos en la generación anterior. De nuevo, la clase que mayor aportación hizo a este intervalo fue la 3 [20-30], con unas 86 semillas de las 103 acumuladas (83%), seguida de la clase 2 [10-20] con 14 semillas (13%) y la clase 1 [0-10] con tan sólo 3 semillas, un 3% de este total. La clase 4 [30-40] volvió a acumular frecuencias, si bien esta vez sólo 1 semilla, lo que supone un escaso 1% del total acumulado. El porcentaje de semillas que cumplieron el criterio de selección ($E \geq 20$) se calculó sumando directamente las frecuencias relativas de las clases 3 y 4 expresadas en porcentaje, obteniendo un 84% del total analizado (87 semillas).

Generación M₅: Prácticamente el 100% del contenido de esteárico (E) acumulado se corresponde con la suma de las frecuencias halladas en las clases 2 y 3 [10-30]; en esta generación, la aportación de la clase 1 [0-10] es nula. De nuevo, la clase que mayor aportación hizo a este intervalo fue la 3 [20-30], con unas 70 semillas de las 72 acumuladas (97%), seguida de la clase 2 [10-20] con tan sólo 2 semillas, no llegando al 3% de este total. La clase 4 [30-40] volvió a acumular tan sólo 1 semilla, lo que supone un escaso 1% del total acumulado. El porcentaje de semillas que cumplieron el criterio de selección ($E \geq 20$) en esta generación fue de

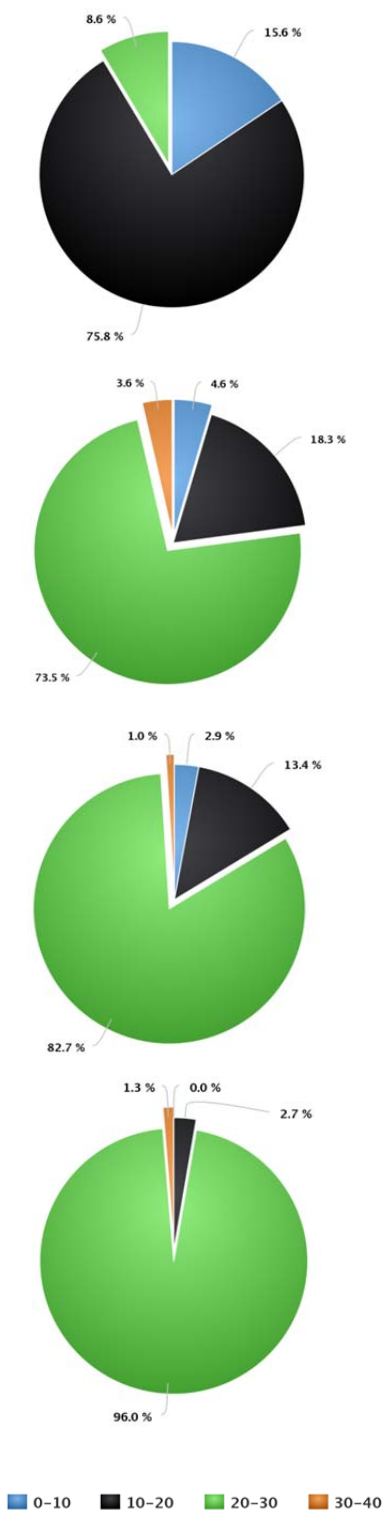
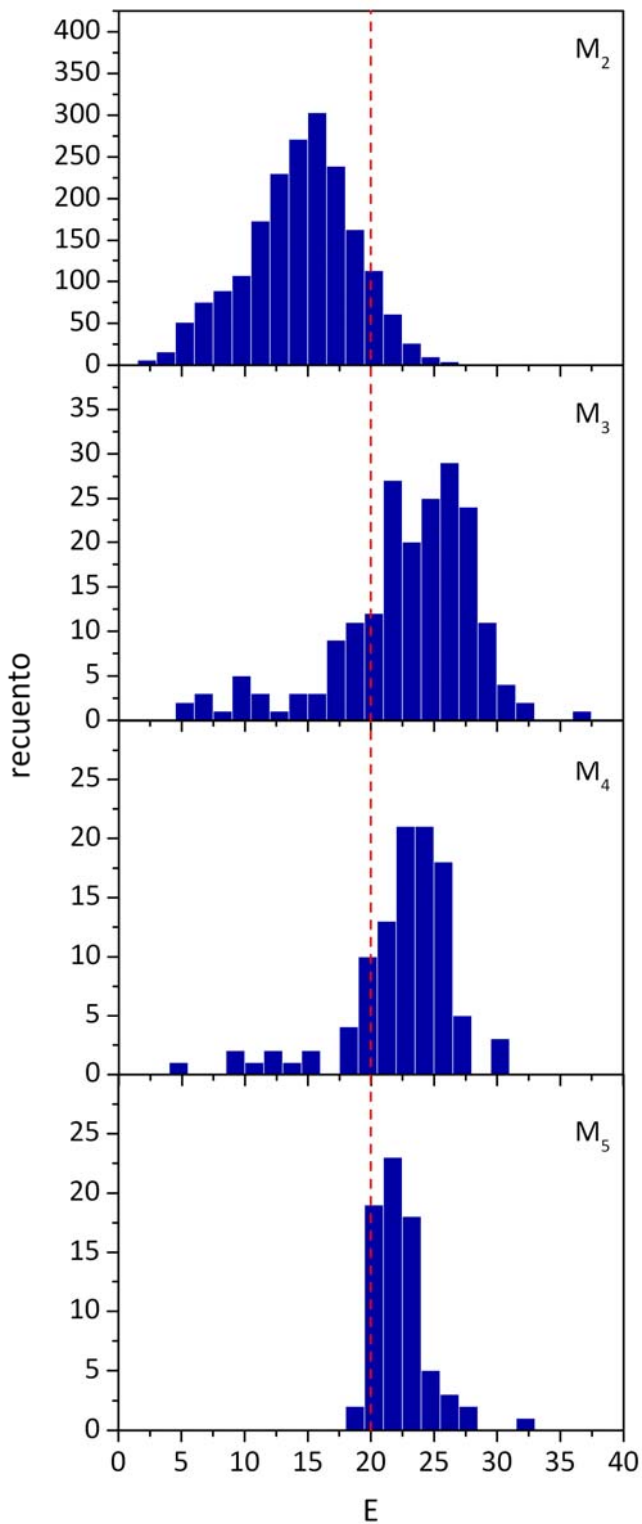
un 97% del total analizado (71 semillas), fruto de la suma de frecuencias observadas en las clases 3 y 4.

En general, el alto porcentaje del contenido de esteárico (E) acumulado en la clase 2 [10-20] de la generación originaria M_2 se ve reducido inicialmente de manera drástica y de forma paulatina en las sucesivas generaciones. La clase 3 [20-30], por contra, adquiere mayor protagonismo, acumulando el mayor porcentaje del contenido de esteárico (E) analizado, llegando a representar hasta un 97% del total acumulado en la última generación M_5 . La clase 4 [30-40], por su parte, queda representada levemente en las tres últimas generaciones.

Esta misma evolución se puede constatar gráficamente al comparar los *histogramas* y *gráficos de sectores* generados a partir de dicha tabla para cada generación (Figura 49). En ellos queda patente el fenómeno de criba al que se sometió a las diferentes poblaciones generacionales bajo el criterio de selección correspondiente ($E \geq 20$).

Figura 49. Distribución en términos absolutos y porcentuales de la variable “contenido de esteárico (E)” en las distintas generaciones poblacionales (M_2 - M_5). La línea roja discontinua presente en los histogramas delimita el criterio de selección establecido para dicha variable ($E \geq 20$).

Resultados



A continuación se extrajeron y calcularon una serie de *estadísticos descriptivos* (Materiales y Métodos, 2.4.1.1 y 2.4.1.2) con el fin de caracterizar la distribución de los datos analizados en cada generación. En la Tabla 26 se resumen los estadísticos de posición y dispersión relativos al contenido de esteárico (E) observado en cada una de las poblaciones estudiadas, antes (P) y después (S) de aplicar el criterio de selección establecido para esta variable ($E \geq 20$). Posteriormente, se evaluará la forma y el tipo de distribución en base a la población inicial M_2 .

Tabla 26. Estadísticos descriptivos relativos a la variable “contenido de esteárico (E)” en las distintas generaciones poblacionales (M_2 - M_5). Las generaciones se dividieron en poblaciones antes (P) y después (S) de aplicar el criterio de selección ($E \geq 20$). CV: coeficiente de variación | Max: valor máximo | Min: valor mínimo | n: tamaño muestral | P10: percentil 10 | P90: percentil 90 | SD: desviación estándar.

		Estadísticos descriptivos										
		Medidas de posición				Medidas de dispersión						
		n	Media	Mediana	P10	P90	SD	Min	Max	Rango	Varianza	CV
M_2	P	1938	14,40	14,70	8,34	19,67	4,28	1,92	27,25	25,33	18,36	0,30
	S	166	21,73	21,34	20,24	23,94	1,48	20,00	27,25	7,25	2,18	0,07
M_3	P	196	22,87	23,96	16,23	28,32	5,57	5,18	36,39	31,21	31,01	0,24
	S	151	25,27	25,29	21,37	29,04	2,96	20,07	36,39	16,32	8,76	0,12
M_4	P	104	22,44	23,31	18,48	26,38	4,29	5,30	30,68	25,38	18,39	0,19
	S	87	23,88	23,72	20,77	26,46	2,29	20,00	30,68	10,68	5,24	0,10
M_5	P	73	22,41	22,00	20,44	24,33	2,18	19,04	32,67	13,63	4,76	0,10
	S	71	22,50	22,05	20,62	24,33	2,14	20,01	32,67	12,67	4,56	0,09

A partir de las medidas resumen recogidas en la tabla anterior, se observó lo siguiente:

Generación M_2 : El contenido medio de esteárico (E) de la población inicial analizada perteneciente a esta generación, con un tamaño muestral de 1938 semillas, fue del $14,40 \pm 4,28$ %. Si bien se observaron contenidos de esteárico (E) entre 1,92 y 27,25 %, la mayoría de éstos se situó entre 8,34 y 19,67 %, con un 10% de los valores inferiores al 8,34 % (P10) y un 10% mayores al 19,67 % (P90). Esta misma población se caracterizó por poseer una alta variación relativa para esta variable, como pone en evidencia el alto coeficiente de variación. Una vez

Resultados

aplicado el criterio de selección ($E \geq 20$), la población que cumplía dicho criterio se redujo a 166 semillas, un 8,5 % de la población inicial. El contenido medio de esteárico (E) aumentó hasta el $21,73 \pm 1,48$ %, con valores mínimos y máximos de 20,00 y 27,25 %, respectivamente, situándose la mayoría entre 20,24 y 23,94 %. La variación relativa de esta población se vio reducida considerablemente.

Generación M₃: El contenido medio de esteárico (E) de la población analizada perteneciente a esta generación, con un tamaño muestral de 196 semillas, fue del $22,87 \pm 5,57$ %. Si bien se observaron contenidos de esteárico (E) entre 5,18 y 36,39 %, la mayoría de éstos se situó entre 16,23 y 28,32 %, con un 10% de los valores inferiores al 16,23 % (P10) y un 10% mayores al 28,32 % (P90). Esta misma población se caracterizó nuevamente por poseer una alta variación relativa para esta variable. Una vez aplicado el criterio de selección ($E \geq 20$), la población que cumplía dicho criterio se redujo a 151 semillas, un 77,0 % de la población total. El contenido medio de esteárico (E) aumentó hasta el $25,27 \pm 2,96$ %, con valores mínimos y máximos de 20,07 y 36,39 %, respectivamente, situándose la mayoría entre 21,37 y 29,04 %. La variación relativa de esta población fue menor que la anterior.

Generación M₄: El contenido medio de esteárico (E) de la población analizada perteneciente a esta generación, con un tamaño muestral de 104 semillas, fue del $22,44 \pm 4,29$ %. Si bien se observaron contenidos de esteárico (E) entre 5,30 y 30,68 %, la mayoría de éstos se situó entre 18,48 y 26,38 %, con un 10% de los valores inferiores al 18,48 % (P10) y un 10% mayores al 26,38 % (P90). Esta misma población se caracterizó por poseer una baja variación relativa para esta variable. Una vez aplicado el criterio de selección ($E \geq 20$), la población que cumplía dicho criterio se redujo a 87 semillas, un 83,6 % de la población total. El contenido medio de esteárico (E) aumentó hasta el $23,88 \pm 2,29$ %, con valores mínimos y máximos de 20,07 y 36,39 %, respectivamente, situándose la mayoría entre 21,37 y 29,04 %. La variación relativa de esta población fue menor que la anterior.

Generación M₅: El contenido medio de esteárico (E) de la población analizada perteneciente a esta generación, con un tamaño muestral de 73 semillas, fue del

22,41±2,18 %. Si bien se observaron contenidos de esteárico (E) entre 19,04 y 32,67 %, la mayoría de éstos se situó entre 20,44 y 24,33 %, con un 10% de los valores inferiores al 20,44 % (P10) y un 10% mayores al 24,33 % (P90). Esta misma población se caracterizó nuevamente por poseer una baja variación relativa para esta variable. Una vez aplicado el criterio de selección ($E \geq 20$), la población que cumplía dicho criterio supuso un 97,2 % de la población total, por lo que las medidas calculadas fueron muy similares a las calculadas para la población anterior.

En cuanto a la evolución de las medidas resumen a lo largo de las generaciones, se pudo determinar que:

Tamaño muestral (n): el tamaño muestral de la población inicial perteneciente a la generación M_2 se vio reducido un 91% tras aplicar el criterio de selección. A partir de la siguiente generación (M_3), y en lo sucesivo, el porcentaje de semillas cribadas fue en aumento, superando en todo momento el 75% con respecto al total analizado por generación.

Media \pm SD: El contenido de esteárico (E) medio en la generación inicial M_2 pasó de un 14.40% presente en la población origen (P) a un 21.73% tras aplicar el criterio de selección (S), lo cual supone un diferencial aproximado de 7.3%. Sin embargo, a partir de la generación M_3 , las medias estimadas tanto de las poblaciones origen (P) como de las poblaciones cribadas (S) se mantuvieron en torno al 22-25% en cada generación. Las desviaciones estándar para cada población S, por su parte, se mantuvieron siempre inferiores a las de las poblaciones de las que procedían.

Mediana: la mediana calculada en la generación inicial M_2 pasó de un 14.70% presente en la población origen (P) a un 21.34% tras aplicar el criterio de selección (S), lo cual supone un diferencial aproximado de 6.6%. Sin embargo, a partir de la generación M_3 , las medianas estimadas tanto de las poblaciones origen (P) como de las poblaciones cribadas (S) se mantuvieron en torno al 21-25% en cada generación.

Percentiles 10/90 (P10/P90): los valores P10 alcanzados en cada generación previo a la aplicación del criterio de selección ($E \geq 20$) fueron aumentando progresivamente, detectándose un importante salto cuantitativo entre las generaciones M_2 y M_3 , y siempre fueron menores a los alcanzados por las poblaciones cribadas (S) en cada generación. Por el contrario, los valores P90 tanto en las poblaciones de origen (P) como en las poblaciones cribadas (S), aumentaron inicialmente para posteriormente ir disminuyendo en cada generación. Teniendo en cuenta ambas medidas se observó cómo los datos relativos a esta variable se fueron concentrando a lo largo de las generaciones.

Valores máximo (Max) y mínimo (Min): los valores máximos alcanzados en estas poblaciones oscilan entre los 27.25% registrados en la generación M_2 y los 36.39% de la generación M_3 , lo que nos permite calcular un diferencial/incremento del 9.14% en el contenido de esteárico, si bien este pico se ve reducido en las posteriores generaciones M_4 y M_5 , 30.68 y 32.67%, respectivamente. Por contra, el valor mínimo alcanzado en cada generación previo a la aplicación del criterio de selección va aumentando progresivamente, detectándose un importante salto cuantitativo entre las generaciones M_4 y M_5 , llegando en este último caso a valores cercanos a los establecidos en el propio criterio (19.04%). Los valores mínimos para todas las poblaciones cribadas, como cabría esperar, se situaron en torno al 20%, superando así el valor establecido en la propia criba ($E \geq 20$).

Amplitud o Rango: el rango observado en las sucesivas poblaciones que cumplían el criterio de selección (S), generación tras generación, adquirió valores siempre inferiores a los obtenidos por sus poblaciones de origen (P).

Varianza: Se observa un aumento considerable de éstas al paso de la generación M_2 a la M_3 , tanto en la población de origen (P) como en la población cribada (S), continuado de un descenso paulatino a medida que avanzamos en las generaciones posteriores. Los valores de la varianza en la población S fueron siempre menores a los de la población P, siendo este hecho una constante a lo largo de las generaciones. Para el estudio en profundidad de las varianzas

calculadas se realizaron *análisis de varianzas (ANOVA)*, para lo cual fue necesario conocer la distribución de las poblaciones.

Coefficiente de Variación (CV): Al analizar los coeficientes de variación (CV) se observa cómo la variación del contenido en esteárico (E) va disminuyendo a medida que se obtienen nuevas generaciones. No obstante, la variación detectada en la población que cumplía el criterio de selección perteneciente a la generación M_2 (0.07%) se ve inicialmente incrementada en la generación M_3 (0.12%), para posteriormente disminuir en las generaciones siguientes. Los valores del coeficiente de variación en la población cribada (S) fueron siempre menores a los de la población de origen (P), siendo este hecho una constante a lo largo de las generaciones.

En resumen, el tamaño muestral fue disminuyendo progresivamente a medida que se avanzó en el proceso de criba generacional. Durante este proceso, el contenido medio de esteárico (E) se mantuvo en torno al 21-25%, con desviaciones estándar (SD) relativamente bajas. En cuanto a las varianzas y coeficientes de variación (CV), éstos experimentaron un aumento inicial para posteriormente disminuir a medida que se avanzó en la obtención de nuevas generaciones.

Finalmente, se evaluó la forma y tipo de distribución correspondiente a la población inicial M_2 (Materiales y Métodos, 2.4.1.3). Una primera visión del histograma (Figura 39) y posterior análisis de la media y mediana calculadas para dicha población (Tabla 17), con valores muy similares en torno al 14%, sugirieron una cierta normalidad y simetría de la distribución de los datos obtenidos para dicha población. No obstante, el *test de Kolmogorov-Smirnov* reveló que los datos no se asemejaban a una distribución normal ($p=0,5$). El *coeficiente de asimetría* estimado, con un valor de -0,11, determinó que la no normalidad testada se debía a una ligera asimetría desplazada hacia la izquierda. Por otro lado, el *coeficiente de curtosis*, con un valor de -0,25, hizo referencia a una menor concentración de datos alrededor de la media, es decir, una distribución menos apuntada y con colas menos anchas que la normal.

Resultados

Así pues, todos estos datos nos permitieron obtener una aproximación más exacta de la distribución de la variable “contenido de esteárico (E)” en las poblaciones analizadas.

3.1.2 Contenido de EOE

Para la variable “contenido de EOE” se creó nuevamente una *tabla de distribución de frecuencias* (Materiales y Métodos, 2.4.1), la cual resume la contribución de las semillas analizadas a dicha variable, generación tras generación (Tabla 27).

Generación M₂: Prácticamente el 100% del contenido de EOE acumulado perteneciente a esta generación inicial se corresponde con la suma de las frecuencias halladas en las dos primeras de las seis clases establecidas para esta variable [0-8]. En concreto, la clase 1 [0-4] aporta un 59% del total al encontrarse en ella 1109 semillas de las 1869 acumuladas en estos intervalos, lo que la convierte en la clase más frecuente, no sólo a este nivel, sino también del cómputo global, contribuyendo con un 57% del total analizado. La clase 2 [4-8], por su parte, aporta algo más de un 40% al total perteneciente al intervalo [0-8], hallándose en ésta 760 semillas. La clase 3 [8-12] aglutina tan sólo 67 de las semillas analizadas, lo que supone aproximadamente un 3% del total analizado, mientras que la aportación de la clase 4 [12-16] no alcanza el 1% del total, con tan sólo 2 semillas. Así pues, la suma de los porcentajes de estas dos últimas clases coincide con el porcentaje de semillas analizadas que cumplieron el criterio de selección establecido para esta variable ($EOE \geq 8$), ya que las clases 5 y 6 [16-24], al no reunir ninguna de las frecuencias analizadas, no tuvieron aportación alguna.

Tabla 27. Distribución de frecuencias de la variable “contenido de EOE” en las distintas generaciones poblacionales (M₂-M₅). Las frecuencias se dividieron en clases o intervalos, con sus correspondientes límite inferior (LI) y límite superior (LS). FA: frecuencia absoluta | FAA: frecuencia absoluta acumulada | FR: frecuencia relativa | FRA: frecuencia relativa acumulada.

GENERACIÓN	CLASE	LI	LS	FA	FAA	FR	FRA
M ₂	1	0	4	1109	1109	0,57	0,57
	2	4	8	760	1869	0,39	0,96
	3	8	12	67	1936	0,03	1,00
	4	12	16	2	1938	0,00	1,00
	5	16	20	0	1938	0,00	1,00
	6	20	24	0	1938	0,00	1,00
M ₃	1	0	4	27	27	0,14	0,14
	2	4	8	60	87	0,31	0,44
	3	8	12	85	172	0,43	0,88
	4	12	16	22	194	0,11	0,99
	5	16	20	2	196	0,01	1,00
	6	20	24	0	196	0,00	1,00
M ₄	1	0	4	8	8	0,08	0,08
	2	4	8	45	53	0,43	0,51
	3	8	12	48	101	0,46	0,97
	4	12	16	3	104	0,03	1,00
	5	16	20	0	104	0,00	1,00
	6	20	24	0	104	0,00	1,00
M ₅	1	0	4	0	0	0,00	0,00
	2	4	8	46	46	0,63	0,63
	3	8	12	23	69	0,32	0,95
	4	12	16	2	71	0,03	0,97
	5	16	20	1	72	0,01	0,99
	6	20	24	1	73	0,01	1,00

Generación M₃: La distribución de las frecuencias en esta generación, a diferencia de la anterior, fue ligeramente más dispersa. En esta ocasión, casi la mitad del contenido de EOE acumulado (44%) se debió a la suma de las frecuencias halladas en las dos primeras clases [0-8], siendo la clase 2 [4-8] la que mayor aportación hizo a dicho intervalo, con unas 60 semillas de las 87 acumuladas (69%). No obstante, la clase más frecuente en esta población fue la 3 [8-12], contribuyendo con un 43% al total analizado. La clase 4 [12-16] volvió a acumular frecuencias, esta vez con 22 de las semillas analizadas, lo que supone un 11% del total analizado. La clase 5 [16-20], a diferencia de la clase 6 [16-24], sí obtuvo representación en esta generación, aportando 2 semillas al cómputo global, lo que supone aproximadamente un 1% del total acumulado. De este modo, el porcentaje de semillas que cumplieron el criterio de selección ($EOE \geq 8$) coincidió con la suma de los porcentajes obtenidos en las clases 3, 4 y 5, lo que supone más de la mitad de las semillas analizadas, concretamente un 55%.

Generación M₄: En este caso, la mitad del contenido de EOE acumulado de esta generación se corresponde con la suma de las frecuencias halladas en las dos primeras clases [0-8], un 7% más del observado en la generación anterior. De nuevo, la clase que mayor aportación hizo a este intervalo fue la 2 [4-8], con unas 45 semillas de las 53 acumuladas (85%). La clase 3 [8-12], con 48 semillas del total analizado vuelve a convertirse en la clase más frecuente de la población (46%). La clase 4 [12-16] volvió a acumular frecuencias, si bien su aportación al cómputo global disminuyó hasta el 3%; las clases 5 y 6 [16-24] no acumularon frecuencias en esta ocasión. Finalmente, el porcentaje de semillas que cumplieron el criterio de selección ($EOE \geq 8$) para esta generación se correspondió con la suma de los porcentajes obtenidos en las clases 3 y 4, un 49% del total analizado, nuevamente alrededor de la mitad de las semillas analizadas.

Generación M₅: En esta generación, la aportación de la clase 1 [0-4] al contenido de EOE acumulado es nula. Esta vez, la clase 2 [4-8] aparece como la clase más frecuente de la población, con unas 46 semillas de las 73 analizadas (63%). La clase 3 [8-12], por su parte, supuso un 32% del total analizado, mientras que la clase 4 se vio representada en un 3%. Las clases 5 y 6 [16-24] acumularon tan sólo 1 semilla cada una, lo que supone un escaso 2% del total acumulado. El porcentaje de semillas que cumplieron el criterio de selección ($EOE \geq 8$) en esta

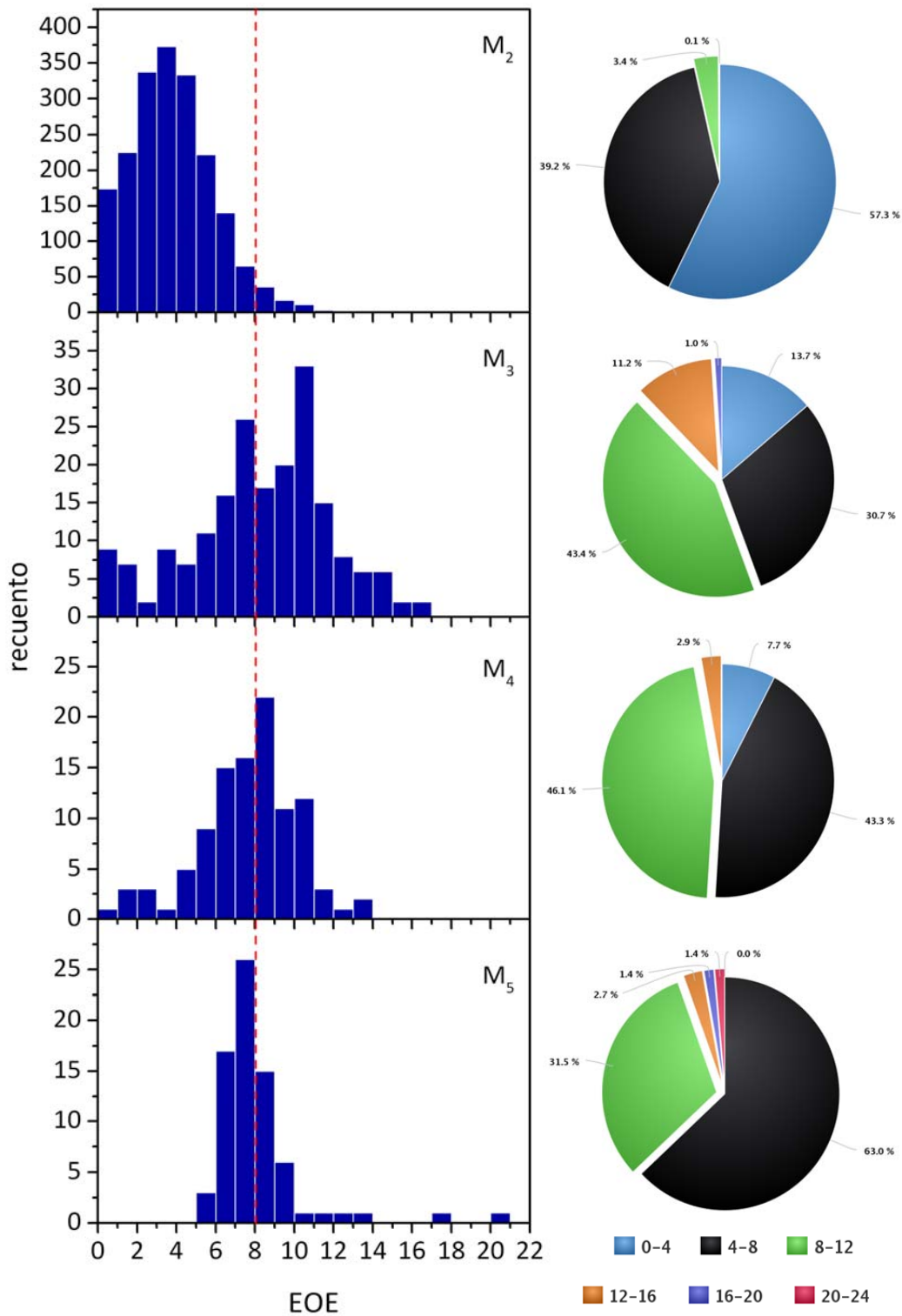
generación fue del 37% analizado (27 semillas), fruto de la suma de frecuencias observadas en las clases 3, 4, 5 y 6.

En general, el alto porcentaje del contenido EOE acumulado en la clase 1 [0-4] de la generación inicial M_2 se ve reducido drásticamente en favor del resto de clases a lo largo de las siguientes generaciones. Las clases 2 y 3 [4-12] tienden a acumular el mayor porcentaje de frecuencias, llegando a suponer más del 75% en la generación M_3 y más del 90% en M_4 y M_5 . No obstante, el reparto de estas frecuencias varió en función de la generación, de manera que la clase 3 en M_3 comenzó siendo superior y terminó siendo superada por la clase 2, la cual llegó a representar hasta un 63% del total acumulado en M_5 . Las clases 4 y 5 [16-20], por su parte, apenas quedan representadas, a pesar del buen dato obtenido para la primera en M_3 (11%), mientras que la clase 6 [20-24] aparece exclusivamente en la última generación analizada.

Esta misma evolución se puede constatar gráficamente al comparar los *histogramas* y *gráficos de sectores* generados a partir de dicha tabla para cada generación (Figura 50). En ellos queda patente el fenómeno de criba al que se sometió a las diferentes poblaciones generacionales bajo el criterio de selección correspondiente ($EOE \geq 8$).

Figura 50. Distribución en términos absolutos y porcentuales de la variable “contenido de EOE” en las distintas generaciones poblacionales (M_2 - M_5). La línea roja discontinua presente en los histogramas delimita el criterio de selección establecido para dicha variable ($EOE \geq 8$).

Resultados



A continuación se extrajeron y calcularon los *estadísticos descriptivos* (Materiales y Métodos, 2.4.1.1 y 2.4.1.2). En la Tabla 28 se resumen los estadísticos de posición y dispersión relativos al contenido de EOE observado en cada una de las poblaciones estudiadas, antes (P) y después (S) de aplicar el criterio de selección establecido para esta variable ($EOE \geq 8$). Posteriormente, se evaluará la forma y el tipo de distribución en base a la población inicial M_2 .

Tabla 28. Estadísticos descriptivos relativos a la variable “contenido de EOE” en las distintas generaciones poblacionales (M_2 - M_5). Las generaciones se dividieron en poblaciones antes (P) y después (S) de aplicar el criterio de selección ($EOE \geq 8$). CV: coeficiente de variación | Max: valor máximo | Min: valor mínimo | n: tamaño muestral | P10: percentil 10 | P90: percentil 90 | SD: desviación estándar.

		Estadísticos descriptivos										
		Medidas de posición				Medidas de dispersión						
		n	Media	Mediana	P10	P90	SD	Min	Max	Rango	Varianza	CV
M_2	P	1938	3,77	3,63	1,09	6,51	2,11	0,00	12,24	12,24	4,44	0,56
	S	69	9,23	8,94	8,17	10,84	1,06	8,00	12,24	4,24	1,13	0,12
M_3	P	196	8,31	8,38	3,39	12,35	3,59	0,27	16,83	16,56	12,89	0,43
	S	109	10,86	10,66	8,38	13,96	1,95	8,09	16,83	8,73	3,80	0,18
M_4	P	104	7,68	7,83	4,72	10,71	2,51	0,53	13,81	13,28	6,30	0,33
	S	51	9,60	9,21	8,22	11,00	1,33	8,08	13,81	5,72	1,77	0,14
M_5	P	73	8,13	7,51	6,46	9,62	2,35	5,67	20,86	15,19	5,50	0,29
	S	27	10,05	8,85	8,29	13,61	2,94	8,08	20,86	12,78	8,62	0,29

A partir de las medidas resumen recogidas en la tabla anterior, se observó lo siguiente:

Generación M_2 : El contenido medio de EOE de la población inicial analizada perteneciente a esta generación, con un tamaño muestral de 1938 semillas, fue del $3,77 \pm 2,11$ %. Si bien se observaron contenidos de EOE entre 0,00 y 12,24 %, la mayoría de éstos se situó entre 1,09 y 6,51 %, con un 10% de los valores inferiores al 1,09 % (P10) y un 10% mayores al 6,51 % (P90). Esta misma población se caracterizó por poseer una alta variación relativa para esta variable, como pone en evidencia el alto coeficiente de variación. Una vez aplicado el criterio de selección ($EOE \geq 8$), la población que cumplía dicho criterio se redujo a 69 semillas, un 3,5 % de la población inicial. El contenido medio de EOE aumentó hasta el $9,23 \pm 1,06$ %, con valores mínimos y máximos de 8,00 y 12,24 %,

respectivamente, situándose la mayoría entre 8,17 y 10,84 %. La variación relativa de esta población se vio reducida considerablemente.

Generación M₃: El contenido medio de EOE de la población analizada perteneciente a esta generación, con un tamaño muestral de 196 semillas, fue del $8,31 \pm 3,59$ %. Si bien se observaron contenidos de EOE entre 0,27 y 16,83 %, la mayoría de éstos se situó entre 3,39 y 12,35 %, con un 10% de los valores inferiores al 3,39 % (P10) y un 10% mayores al 12,35 % (P90). Esta misma población se caracterizó nuevamente por poseer una alta variación relativa para esta variable. Una vez aplicado el criterio de selección ($EOE \geq 8$), la población que cumplía dicho criterio se redujo a 109 semillas, un 55,6 % de la población total. El contenido medio de EOE aumentó hasta el $10,86 \pm 1,95$ %, con valores mínimos y máximos de 8,09 y 16,83 %, respectivamente, situándose la mayoría entre 8,38 y 13,96 %. La variación relativa de esta población se vio reducida nuevamente.

Generación M₄: El contenido medio de EOE de la población analizada perteneciente a esta generación, con un tamaño muestral de 104 semillas, fue del $7,68 \pm 2,51$ %. Si bien se observaron contenidos de EOE entre 0,53 y 13,81 %, la mayoría de éstos se situó entre 4,72 y 10,71 %, con un 10% de los valores inferiores al 4,72 % (P10) y un 10% mayores al 10,71 % (P90). Esta misma población se caracterizó por poseer aún una alta variación relativa para esta variable. Una vez aplicado el criterio de selección ($EOE \geq 8$), la población que cumplía dicho criterio se redujo a 51 semillas, un 49,0 % de la población total. El contenido medio de EOE aumentó hasta el $9,60 \pm 1,33$ %, con valores mínimos y máximos de 8,08 y 13,81 %, respectivamente, situándose la mayoría entre 8,22 y 11,00 %. La variación relativa de esta población fue menor que la anterior.

Generación M₅: El contenido medio de EOE de la población analizada perteneciente a esta generación, con un tamaño muestral de 73 semillas, fue del $8,13 \pm 2,35$ %. Si bien se observaron contenidos de EOE entre 5,67 y 20,86 %, la mayoría de éstos se situó entre 6,46 y 9,62 %, con un 10% de los valores inferiores al 6,46 % (P10) y un 10% mayores al 9,62 % (P90). Esta misma población se caracterizó nuevamente por poseer una alta variación relativa para esta variable. Una vez aplicado el criterio de selección ($EOE \geq 8$), la población que

cumplía dicho criterio se redujo a 27 semillas, un 36,9 % de la población total. El contenido medio de EOE aumentó hasta el $10,05 \pm 2,94$ %, con valores mínimos y máximos de 8,08 y 20,86 %, respectivamente, situándose la mayoría entre 8,29 y 13,61 %. La variación relativa de esta población fue igual que la anterior.

En cuanto a la evolución de las medidas resumen a lo largo de las generaciones, se pudo determinar que:

Tamaño muestral (n): el tamaño muestral de la población inicial perteneciente a la generación M_2 se vio reducido un 96% tras aplicar el criterio de selección. A partir de la siguiente generación (M_3), el porcentaje de semillas cribadas superó el 50% con respecto al total analizado por generación, con excepción de la última generación (M_5), cuya porción cribada supuso un 37% de su población de origen.

Media \pm SD: el contenido de EOE medio en la generación inicial M_2 pasó de un 3.77 % presente en la población origen (P) a un 9.23% tras aplicar el criterio de selección (S), lo cual supone un diferencial aproximado de 5.5%. A partir de la generación M_3 , las medias estimadas de las poblaciones cribadas (S) se mantuvieron en torno a los 2 puntos por encima de las medias estimadas para las poblaciones de origen (P), sin una tendencia determinada, con pequeñas fluctuaciones. Las desviaciones estándar para cada población S, por su parte, se mantuvieron siempre inferiores a las de las poblaciones de las que procedían, salvo en la generación M_5 , donde fue ligeramente superior.

Mediana: la mediana calculada en la generación inicial M_2 pasó de un 3.63% presente en la población origen (P) a un 8.94% tras la aplicación del criterio de selección (S), lo cual supone un diferencial aproximado de 5.3%. A partir de la generación M_3 , el comportamiento observado fue muy similar al analizado anteriormente para las medias poblacionales.

Percentiles 10/90 (P10/P90): los valores P10 alcanzados en cada generación previo a la aplicación del criterio de selección ($EOE \geq 8$) fueron aumentando progresivamente, detectándose un importante salto cuantitativo entre las generaciones M_2 y M_3 , y siempre fueron menores a los alcanzados por las

Resultados

poblaciones cribadas (S) en cada generación. Por el contrario, los valores P90 tanto en las poblaciones de origen (P) como en las poblaciones cribadas (S), aumentaron inicialmente para posteriormente ir disminuyendo en cada generación, con la excepción de la población cribada (S) perteneciente a la generación M_5 que aumentó. Teniendo en cuenta ambas medidas se observó cómo los datos relativos a esta variable se fueron concentrando a lo largo de las generaciones.

Valores máximo (Max) y mínimo (Min): los valores máximos alcanzados en estas poblaciones oscilan entre los 12.24% registrados en la generación M_2 y los 20.86% de la generación M_5 , lo que nos permite calcular un diferencial/incremento del 8.62% en el contenido de EOE, si bien la evolución no es siempre al alza, con valores para el resto de generaciones de 16.83% (M_3) y 13.81% (M_4). El valor mínimo alcanzado en cada generación de las poblaciones origen (P) va aumentando progresivamente, detectándose un importante salto cuantitativo entre las generaciones M_4 y M_5 ; los valores mínimos para todas las poblaciones cribadas (S), como cabría esperar, se situaron en torno al 8%, superando así el valor establecido en la propia criba ($EOE \geq 8$).

Amplitud o Rango: el rango observado en las sucesivas poblaciones cribadas (S), generación tras generación, adquirió valores siempre inferiores a los obtenidos por sus poblaciones de origen (P).

Varianza: Se observa un aumento considerable de éstas al paso de la generación M_2 a la M_3 , tanto en la población de origen (P) como en la cribada (S), seguido de un descenso en la generación M_4 y un aumento en la generación M_5 , para ambas poblaciones. Los valores de la varianza en la población cribada fueron siempre menores a los de la población de origen, siendo este hecho una constante a lo largo de las generaciones, con excepción de lo ocurrido en la generación M_5 . Para el estudio en profundidad de las varianzas calculadas se realizaron análisis de varianzas (**ANOVA**), para lo cual fue necesario conocer la distribución de las poblaciones.

Coefficiente de Variación (CV): Al analizar los coeficientes de variación (CV) se observa cómo la variación del contenido de EOE en las poblaciones origen (P) va disminuyendo a medida que se obtienen nuevas generaciones. No obstante, las variaciones detectadas en las poblaciones cribadas (S) fluctúan constantemente. Los valores del coeficiente de variación en la población cribada fueron siempre menores a los de la población de origen, siendo este hecho una constante a lo largo de las generaciones, con excepción de la generación M_5 , en la que estos valores fueron iguales.

En resumen, el tamaño muestral fue disminuyendo progresivamente a medida que se avanzó en el proceso de criba generacional. Durante este proceso, el contenido medio de EOE fluctuó en torno al 9-10%, con desviaciones estándar (SD) en ligero aumento. En cuanto a las varianzas y coeficientes de variación (CV), éstos experimentaron ciertas fluctuaciones a medida que se avanzó en la obtención de nuevas generaciones.

Finalmente, se evaluó la forma y tipo de distribución correspondiente a la población inicial M_2 (Materiales y Métodos, 2.4.1.3). Una primera visión del histograma (Figura 50) y posterior análisis de la media y mediana calculadas para dicha población (Tabla 19), con valores muy similares en torno al 3,7 %, sugirieron una cierta normalidad y asimetría de la distribución de los datos obtenidos para dicha población. El *test de Kolmogorov-Smirnov* recalzó esta apreciación revelando que los datos no se asemejaban a una distribución normal ($p=0,5$). El *coeficiente de asimetría* estimado, con un valor de 0,56, determinó que la no normalidad testada se debía a una asimetría desplazada hacia la derecha. Por otro lado, el *coeficiente de curtosis*, con un valor de 0,39, hizo referencia a una mayor concentración de datos alrededor de la media, es decir, una distribución más apuntada y con colas más anchas que la normal.

Así pues, todos estos datos nos permitieron obtener una aproximación más exacta de la distribución de la variable “contenido de EOE” en las poblaciones analizadas.

3.1.3 Contenido de SUS

Para la variable “contenido de SUS” se creó nuevamente una *tabla de distribución de frecuencias* (Materiales y Métodos, 2.4.1), la cual resume la contribución de las semillas analizadas a dicha variable, generación tras generación (Tabla 29).

Tabla 29. Distribución de frecuencias de la variable “contenido de EOE” en las distintas generaciones poblacionales (M₂-M₅). Las frecuencias se dividieron en clases o intervalos, con sus correspondientes límite inferior (LI) y límite superior (LS). FA: frecuencia absoluta | FAA: frecuencia absoluta acumulada | FR: frecuencia relativa | FRA: frecuencia relativa acumulada.

GENERACIÓN	CLASE	LI	LS	FA	FAA	FR	FRA
M ₂	1	0	10	642	642	0,33	0,33
	2	10	20	1168	1810	0,60	0,93
	3	20	30	126	1936	0,07	1,00
	4	30	40	1	1937	0,00	1,00
	5	40	50	1	1938	0,00	1,00
M ₃	1	0	10	30	30	0,15	0,15
	2	10	20	124	154	0,63	0,79
	3	20	30	39	193	0,20	0,98
	4	30	40	3	196	0,02	1,00
	5	40	50	0	196	0,00	1,00
M ₄	1	0	10	8	8	0,08	0,08
	2	10	20	68	76	0,65	0,73
	3	20	30	25	101	0,24	0,97
	4	30	40	3	104	0,03	1,00
	5	40	50	0	104	0,00	1,00
M ₅	1	0	10	0	0	0,00	0,00
	2	10	20	65	65	0,89	0,89
	3	20	30	6	71	0,08	0,97
	4	30	40	2	73	0,03	1,00
	5	40	50	0	73	0,00	1,00

Generación M₂: El 93% del contenido de SUS acumulado perteneciente a esta generación inicial se corresponde con la suma de las frecuencias halladas en las dos primeras de las cinco clases establecidas para esta variable [0-20]. En concreto, la clase 1 [0-10] aportó algo más de un 35% del total al encontrarse en ella 642 semillas de las 1810 que acumularon estos intervalos. La clase 2 [10-20], por su parte, aportó un 64% a este total, hallándose en ésta 1168 semillas, lo que la convierte en la clase más frecuente, no sólo a este nivel, sino también del cómputo global, contribuyendo con un 60% del total analizado. La clase 3 [20-30] aglutinó 126 de las semillas analizadas, lo que supone aproximadamente un 7% del total analizado. Las clases 4 y 5 [30-50], por su parte, acumularon tan sólo 1 semilla cada una, lo que supone una aportación mínima al total analizado. Así pues, el porcentaje de semillas analizadas que cumplieron el criterio de selección establecido para esta variable ($SUS \geq 20$), coincidió prácticamente con el porcentaje calculado para la clase 3 [20-30], si bien las 2 semillas aportadas por las clases 4 y 5 [30-50] fueron importantes e incluidas en dicha selección.

Generación M₃: La distribución de las frecuencias en esta generación, a diferencia de la anterior, fue ligeramente más dispersa. En esta ocasión, tan sólo un 79% del contenido de SUS acumulado se debió a la suma de las frecuencias halladas en las dos primeras clases [0-20]. Nuevamente, la clase que mayor aportación hizo a dicho intervalo y al total analizado fue la clase 2 [10-20], con unas 124 semillas de las 154 acumuladas (80%) y un 63%, respectivamente. La clase 3 [20-30] llegó a acumular esta vez 39 semillas, lo que supuso un 20% del total analizado, mientras que la clase 4 [30-40] lo hizo con tan sólo un 2%. La aportación de la clase 5 [40-50] en esta generación fue nula. De este modo, el porcentaje de semillas que cumplían el criterio de selección ($SUS \geq 20$) se calculó sumando los porcentajes obtenidos en las clases 3 y 4, un 22% del total analizado.

Generación M₄: El 73% del contenido de SUS acumulado de esta generación se corresponde con la suma de las frecuencias halladas en las dos primeras clases [0-20], prácticamente igual al observado en la generación anterior. No obstante, la clase 1 [0-10] aportó tan sólo un 10% de este total, 8 semillas de las 76 acumuladas en estos intervalos. De nuevo, la clase 2 [10-20] realizó la mayor

Resultados

aportación a dicho intervalo y al total analizado, con un 90 y 65%, respectivamente. La clase 3 [20-30], con 25 semillas, supuso un 24% al cómputo global, mientras que la clase 4 [30-40] lo hizo con un escaso 3%; la clase 5 [40-50] volvió a no estar representada. Finalmente, el porcentaje de semillas que cumplieron el criterio de selección ($SUS \geq 20$) en esta generación fue del 27%, fruto de la suma de porcentajes calculados para las clases 3 y 4.

Generación M_5 : en esta última generación, la mayor aportación al contenido de SUS viene dada por la clase 2 [10-20], con 89% del total analizado. La clase 3 [20-30] llegó a acumular 6 semillas, lo que supone una menor aportación que la observada en la anterior generación, con un 8%. La clase 4 [30-40], por su parte, supuso un 3% del total analizado. Las clases 1 [0-10] y 5 [40-50] no presentaron frecuencia alguna en esta ocasión. El porcentaje de semillas que cumplieron el criterio de selección ($SUS \geq 20$) en esta generación fue de un 97% del total analizado, 71 semillas, fruto de la suma de frecuencias observadas en las clases 3 y 4.

En general, el alto porcentaje del contenido de SUS acumulado en la clase 2 [10-20] de la generación inicial M_2 se ve aumentado progresivamente en las sucesivas generaciones, llegando a suponer hasta un 89% en la generación M_5 . Por el contrario, los porcentajes de la clase 1 [0-10] experimentan un continuo descenso a lo largo de las generaciones. La clase 3 [20-30], por su parte, ve aumentado su porcentaje en las generaciones M_3 y M_4 , si bien, en la última generación analizada, disminuye hasta valores hallados en la generación inicial M_2 . Las clases 4 [30-40] y 5 [40-50] apenas contribuyen al total analizado en cada generación, aunque las semillas pertenecientes a estos intervalos fueron importantes de cara al proceso de criba por generación.

Esta misma evolución se puede constatar gráficamente al comparar los *histogramas y gráficos de sectores* generados a partir de dicha tabla para cada generación (Figura 51). En ellos queda patente el fenómeno de criba al que se sometió a las diferentes poblaciones generacionales bajo el criterio de selección correspondiente ($SUS \geq 20$).

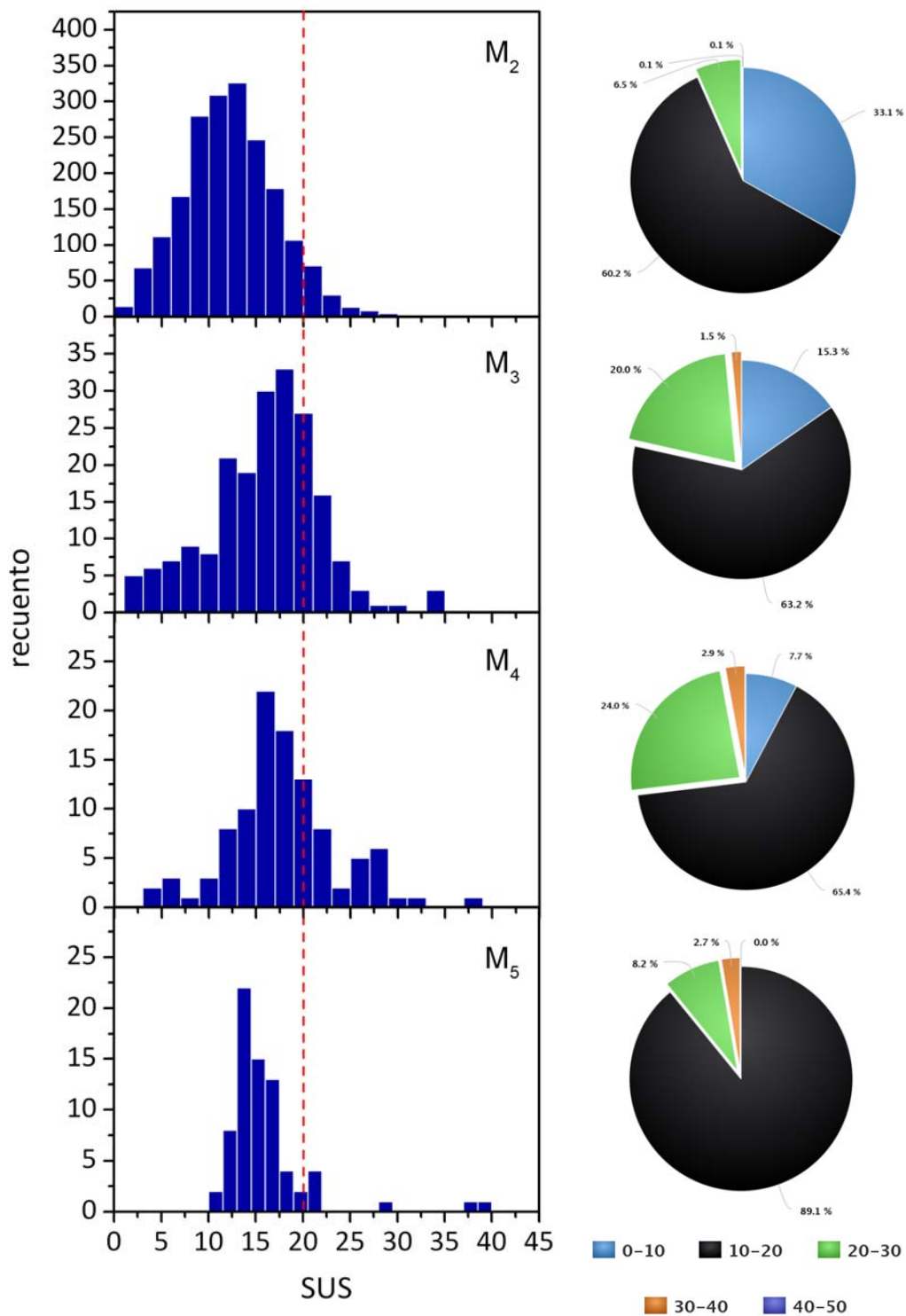


Figura 51. Distribución en términos absolutos y porcentuales de la variable “contenido de SUS” en las distintas generaciones poblacionales (M₂-M₅). La línea roja discontinua presente en los histogramas delimita el criterio de selección establecido para dicha variable (SUS≥20).

A continuación se extrajeron y calcularon los *estadísticos descriptivos* (Materiales y Métodos, 2.4.1.1 y 2.4.1.2). En la Tabla 30 se resumen los estadísticos de posición y dispersión relativos al contenido de SUS observado en cada una de las poblaciones estudiadas, antes (P) y después (S) de aplicar el criterio de selección establecido para esta variable (SUS≥20). Posteriormente, se evaluará la forma y el tipo de distribución en base a la población inicial M₂.

Tabla 30. Estadísticos descriptivos relativos a la variable “contenido de SUS” en las distintas generaciones poblacionales (M₂-M₅). Las generaciones se dividieron en poblaciones antes (P) y después (S) de aplicar el criterio de selección (SUS≥20). CV: coeficiente de variación | Max: valor máximo | Min: valor mínimo | n: tamaño muestral | P10: percentil 10 | P90: percentil 90 | SD: desviación estándar

		Estadísticos descriptivos										
		n	Medidas de posición				Medidas de dispersión					
	Media		Mediana	P10	P90	SD	Min	Max	Rango	Varianza	CV	
M ₂	P	1938	12,30	12,13	5,99	18,60	4,94	0,00	40,50	40,50	24,39	0,40
	S	128	22,73	21,81	20,50	26,22	2,85	20,01	40,50	20,50	8,15	0,13
M ₃	P	196	15,85	16,67	7,03	22,12	5,98	1,24	33,29	32,05	35,76	0,38
	S	42	23,31	21,74	20,65	28,13	3,53	20,06	33,29	13,23	12,48	0,15
M ₄	P	104	17,86	17,22	11,60	26,39	5,87	3,06	37,25	34,19	34,46	0,33
	S	28	25,09	24,83	20,82	30,65	4,18	20,61	37,25	16,64	17,45	0,17
M ₅	P	73	16,04	14,80	12,55	20,35	4,84	11,20	39,93	28,73	23,43	0,30
	S	8	26,41	21,15	20,36	39,93	8,39	20,36	39,93	19,58	70,38	0,32

A partir de las medidas resumen recogidas en la tabla anterior, se observó lo siguiente:

Generación M₂: El contenido medio de SUS de la población inicial analizada perteneciente a esta generación, con un tamaño muestral de 1938 semillas, fue del 12,30±4,94 %. Si bien se observaron contenidos de SUS entre 0,00 y 40,50 %, la mayoría de éstos se situó entre 5,99 y 18,60 %, con un 10% de los valores inferiores al 5,99 % (P10) y un 10% mayores al 18,60 % (P90). Esta misma población se caracterizó por poseer una alta variación relativa para esta variable,

como pone en evidencia el alto coeficiente de variación. Una vez aplicado el criterio de selección ($SUS \geq 20$), la población que cumplía dicho criterio se redujo a 128 semillas, un 6,6 % de la población inicial. El contenido medio de SUS aumentó hasta el $22,73 \pm 2,85$ %, con valores mínimos y máximos de 20,01 y 40,50 %, respectivamente, situándose la mayoría entre 20,50 y 26,22 %. La variación relativa de esta población se vio reducida considerablemente.

Generación M₃: El contenido medio de SUS de la población analizada perteneciente a esta generación, con un tamaño muestral de 196 semillas, fue del $15,85 \pm 5,98$ %. Si bien se observaron contenidos de SUS entre 1,24 y 33,29 %, la mayoría de éstos se situó entre 7,03 y 22,12 %, con un 10% de los valores inferiores al 7,03 % (P10) y un 10% mayores al 22,12 % (P90). Esta misma población se caracterizó nuevamente por poseer una alta variación relativa para esta variable. Una vez aplicado el criterio de selección ($SUS \geq 20$), la población que cumplía dicho criterio se redujo a 42 semillas, un 21,4 % de la población total. El contenido medio de SUS aumentó hasta el $23,31 \pm 3,53$ %, con valores mínimos y máximos de 20,06 y 33,29 %, respectivamente, situándose la mayoría entre 20,65 y 28,13 %. La variación relativa de esta población se vio reducida nuevamente.

Generación M₄: El contenido medio de SUS de la población analizada perteneciente a esta generación, con un tamaño muestral de 104 semillas, fue del $17,86 \pm 5,87$ %. Si bien se observaron contenidos de SUS entre 3,06 y 37,25 %, la mayoría de éstos se situó entre 11,60 y 26,39 %, con un 10% de los valores inferiores al 11,60 % (P10) y un 10% mayores al 26,39 % (P90). Esta misma población se caracterizó por poseer aún una alta variación relativa para esta variable. Una vez aplicado el criterio de selección ($SUS \geq 20$), la población que cumplía dicho criterio se redujo a 28 semillas, un 26,9 % de la población total. El contenido medio de SUS aumentó hasta el $25,09 \pm 4,18$ %, con valores mínimos y máximos de 20,61 y 37,25 %, respectivamente, situándose la mayoría entre 20,82 y 30,65 %. La variación relativa de esta población fue menor que la anterior.

Generación M₅: El contenido medio de SUS de la población analizada perteneciente a esta generación, con un tamaño muestral de 73 semillas, fue del $16,04 \pm 4,84$ %. Si bien se observaron contenidos de SUS entre 11,20 y 39,93 %, la

Resultados

mayoría de éstos se situó entre 12,55 y 20,35 %, con un 10% de los valores inferiores al 12,55 % (P10) y un 10% mayores al 20,35 % (P90). Esta misma población se caracterizó nuevamente por poseer una alta variación relativa para esta variable. Una vez aplicado el criterio de selección ($SUS \geq 20$), la población que cumplía dicho criterio se redujo a tan sólo 8 semillas, un 10,9 % de la población total. El contenido medio de SUS aumentó hasta el $26,41 \pm 8,39$ %, con valores mínimos y máximos de 20,36 y 39,93 %, respectivamente, situándose la mayoría en este mismo intervalo. La variación relativa de esta población fue ligeramente superior que la anterior.

En cuanto a la evolución de las medidas resumen a lo largo de las generaciones, se pudo determinar que:

Tamaño muestral (n): el tamaño muestral de la población inicial perteneciente a la generación M_2 se vio reducido un 93% tras aplicar el criterio de selección. A partir de la siguiente generación (M_3), el porcentaje de semillas cribadas superó el 20% con respecto al total analizado por generación, con excepción de la última generación (M_5), cuya porción cribada supuso tan sólo un 11% de su población de origen.

Media \pm SD: El contenido de SUS medio en la generación inicial M_2 pasó de un 12.30 % presente en la población origen (P) a un 22.73% tras aplicar el criterio de selección (S), lo cual supone un diferencial aproximado de 10.4%. A partir de la generación M_3 , las medias estimadas de las poblaciones cribadas (S) fueron en continuo aumento, alcanzando los 26.41% en la generación M_5 . Esta misma evolución se observó al comparar las medias estimadas de las poblaciones de origen (P), si bien la media en la generación M_5 disminuyó casi en 2 puntos en relación al valor de la generación anterior. Las desviaciones estándar para cada población S, por su parte, se mantuvieron siempre inferiores a las de las poblaciones de las que procedían, salvo en la generación M_5 , donde fue notablemente superior.

Mediana: la mediana calculada en la generación inicial M_2 pasó de un 12.13% presente en la población origen (P) a un 21.81% tras aplicar el criterio de selección (S), lo cual supone un diferencial aproximado de 9.7%. A partir de la generación M_3 , el comportamiento observado fue muy similar al analizado anteriormente para las medias poblacionales, si bien el valor observado en la población cribada (S) en la generación M_5 fue menor que el observado en ésta misma en la generación anterior.

Percentiles 10/90 (P10/P90): los valores P10 alcanzados en cada generación previo a la aplicación del criterio de selección ($SUS \geq 20$) fueron aumentando progresivamente y siempre fueron menores a los alcanzados por las poblaciones cribadas (S) en cada generación. Igualmente, los valores P90 tanto de las poblaciones de origen (P) como de las poblaciones cribadas (S) fueron aumentando, si bien el valor obtenido en la generación M_5 de la población de origen disminuyó con respecto a la obtenida en la generación anterior. Teniendo en cuenta ambas medidas se observó cómo los datos relativos a esta variable en las poblaciones de origen (P) se fueron desplazando mientras que los datos en las poblaciones cribadas (S) se fueron dispersando a lo largo de las generaciones.

Valores máximo (Max) y mínimo (Min): los valores máximos alcanzados en estas poblaciones oscilan entre los 33.29% registrados en la generación M_3 y los 40.50% de la generación M_2 . No obstante, en la generación M_5 se registró un máximo de 39.93%, próximo al observado en la generación inicial M_2 . Por contra, el valor mínimo alcanzado en cada generación previa a la criba va aumentando progresivamente, detectándose un importante salto cuantitativo entre las generaciones M_4 y M_5 . Los valores mínimos para todas las poblaciones cribadas (S), como cabría esperar, se situaron en torno al 20%, superando así el valor establecido en la propia selección ($SUS \geq 20$).

Amplitud o Rango: el rango observado en las sucesivas poblaciones cribadas (S), generación tras generación, adquirió valores siempre inferiores a los obtenidos por sus poblaciones de origen (P).

Varianza: Se observa un aumento considerable de éstas al paso de la generación M_2 a la M_3 , tanto en la población de origen (P) como en la cribada (S). A partir de este momento, las varianzas de las poblaciones de origen (P) experimentaron un descenso paulatino, mientras que las poblaciones cribadas (S) vieron aumentada su varianza, destacando el incremento del 53% observado entre las generaciones M_4 y M_5 . Los valores de la varianza en la población cribada fueron siempre menores a los de la población de origen, siendo este hecho una constante a lo largo de las generaciones, con excepción de lo ocurrido en la generación M_5 . Para el estudio en profundidad de las varianzas calculadas se realizaron análisis de varianzas (**ANOVA**), para lo cual fue necesario conocer la distribución de las poblaciones.

Coefficiente de Variación (CV): los coeficientes de variación (CV) experimentaron la misma tendencia observada al analizar las varianzas, esto es, un descenso paulatino en las poblaciones de origen (P) y un aumento gradual en las poblaciones cribadas (S). Los valores del coeficiente de variación en la población cribada fueron siempre menores a los de la población de origen, siendo este hecho una constante a lo largo de las generaciones, con excepción de la generación M_5 , en la que esta tendencia se invirtió.

En resumen, el tamaño muestral fue disminuyendo progresivamente a medida que se avanzó en el proceso de criba generacional. Durante este proceso, el contenido medio de SUS se mantuvo en torno al 22-26%, con desviaciones estándar (SD) relativamente bajas. En cuanto a las varianzas y coeficientes de variación (CV), éstos experimentaron un aumento constante a medida que se avanzó en la obtención de nuevas generaciones.

Finalmente, se evaluó la forma y tipo de distribución correspondiente a la población inicial M_2 (Materiales y Métodos, 2.4.1.3). Una primera visión del histograma (Figura 51) y posterior análisis de la media y mediana calculadas para dicha población (Tabla 21), con valores muy similares en torno al 12,2 %, sugirieron una cierta normalidad y simetría de la distribución de los datos obtenidos para dicha población. No obstante, el *test de Kolmogorov-Smirnov* reveló que los datos no se asemejaban a una distribución normal ($p=0,5$). El

coeficiente de asimetría estimado, con un valor de 0,39, determinó que la no normalidad testada se debía a una asimetría desplazada hacia la derecha. Por otro lado, el *coeficiente de curtosis*, con un valor de 0,61, hizo referencia a una mayor concentración de datos alrededor de la media, es decir, una distribución más apuntada y con colas más anchas que la normal.

Así pues, todos estos datos nos permitieron obtener una aproximación más exacta de la distribución de la variable “contenido de SUS” en las poblaciones analizadas.

3.1.4 Valor α Sat

Para la variable “valor α Sat” se creó nuevamente una *tabla de distribución de frecuencias* (Materiales y Métodos, 2.4.1), la cual resume la contribución de las semillas analizadas a dicha variable, generación tras generación (Tabla 31).

Generación M₂: El 68% del valor α Sat acumulado perteneciente a esta generación inicial se corresponde con la suma de las frecuencias halladas en las tres primeras de las cuatro seis establecidas para esta variable [0.0-0.3]. En concreto, la clase 1 [0.0-0.1] no llegó a aportar ni el 1% del total al encontrarse en ella tan sólo 4 semillas de las 1328 que acumulan estos intervalos. Las clases 2 [0.1-0.2] y 3 [0.2-0.3], por su parte, aportaron alrededor de un 7 y 93% a este total, respectivamente. La clase 3 [0.2-0.3], a su vez, se convierte en la clase más frecuente del total analizado, contribuyendo con un 64%, seguida de la clase 4 [20-30], la cual supuso un 24% de este total. Las clases 5 [0.4-0.5] y 6 [0.5-0.6] sumaron entre las dos 140 de las semillas analizadas, lo que supuso aproximadamente un 7% del total analizado. El porcentaje de semillas que cumplieron el criterio de selección establecido para esta variable (α Sat \geq 0.30) resultó de la suma de los porcentajes de las clases 4, 5 y 6, un total de 31%.

Resultados

Tabla 31. Distribución de frecuencias de la variable “valor α Sat” en las distintas generaciones poblacionales (M_2 - M_5). Las frecuencias se dividieron en clases o intervalos, con sus correspondientes límite inferior (LI) y límite superior (LS). FA: frecuencia absoluta | FAA: frecuencia absoluta acumulada | FR: frecuencia relativa | FRA: frecuencia relativa acumulada.

GENERACIÓN	CLASE	LI	LS	FA	FAA	FR	FRA
M_2	1	0,0	0,1	4	4	0,00	0,00
	2	0,1	0,2	91	95	0,05	0,05
	3	0,2	0,3	1233	1328	0,64	0,68
	4	0,3	0,4	470	1798	0,24	0,93
	5	0,4	0,5	64	1862	0,03	0,96
	6	0,5	0,6	76	1938	0,04	1,00
M_3	1	0,0	0,1	1	1	0,01	0,01
	2	0,1	0,2	49	50	0,25	0,26
	3	0,2	0,3	135	185	0,69	0,94
	4	0,3	0,4	5	190	0,03	0,97
	5	0,4	0,5	0	190	0,00	0,97
	6	0,5	0,6	6	196	0,03	1,00
M_4	1	0,0	0,1	0	0	0,00	0,00
	2	0,1	0,2	4	4	0,04	0,04
	3	0,2	0,3	83	87	0,80	0,84
	4	0,3	0,4	13	100	0,13	0,96
	5	0,4	0,5	1	101	0,01	0,97
	6	0,5	0,6	3	104	0,03	1,00
M_5	1	0,0	0,1	0	0	0,00	0,00
	2	0,1	0,2	3	3	0,04	0,04
	3	0,2	0,3	65	68	0,89	0,93
	4	0,3	0,4	3	71	0,04	0,97
	5	0,4	0,5	1	72	0,01	0,99
	6	0,5	0,6	1	73	0,01	1,00

Generación M₃: En esta ocasión, el valor α Sat acumulado en las tres primeras clases [0.0-0.3] sumó un 94%. Concretamente, la clase que mayor aportación hizo a dicho intervalo fue la clase 3 [0.2-0.3], con unas 135 semillas de las 185 acumuladas (73%), seguida de la clase 2 [0.1-0.2] con 49 semillas (26%) y la clase 1 [0.0-0.1], con tan sólo 1 semilla, menos del 1% de este total. La clase 3 [0.2-0.3], por su parte, volvió a ser la clase más representada en la población, con un 69% del total analizado. La clase 4 [0.3-0.4] obtuvo un escasa representación en esta generación al igual que la clase 6 [0.5-0.6], aportando un 3% cada una. La clase 5 [0.4-0.5] no obtuvo representación alguna esta vez, por lo que el porcentaje de semillas que cumplieron el criterio de selección (α Sat \geq 0.30) en esta generación se calculó sumando los porcentajes relativos de las clases 5 y 6, un 6% del total analizado.

Generación M₄: El 84% del valor α Sat acumulado de esta generación se corresponde con la suma de las frecuencias halladas en las clases 2 y 3 [0.1-0.3], ya que no se observaron frecuencias referentes a la clase 1 [0.0-0.1]. De nuevo, la clase que mayor aportación hizo a este intervalo fue la 3 [0.2-0.3], con unas 83 semillas de las 87 acumuladas (95%), convirtiéndose a su vez en la clase más representada en la población con un 80% del total analizado. La clase 4 [0.3-0.4] volvió a estar representada, esta vez aportando 13 del total de semillas analizadas (13%). Las clases 5 [0.4-0.5] y 6 [0.5-0.6], por su parte, sumaron entre ambas 4 semillas, lo que se correspondió con un 4% del total analizado. Así pues, el porcentaje de semillas que cumplieron el criterio de selección (α Sat \geq 0.30) en esta generación fue del 17%, suma de los porcentajes calculados de las clases 4, 5 y 6.

Generación M₅: Prácticamente el 100% del valor α Sat acumulado en esta ocasión se corresponde con la suma de las frecuencias halladas en las clases 2 y 3 [0.1-0.3], ya que, al igual que ocurriese en la generación anterior, la aportación de la clase 1 [0.0-0.1] fue nula. La clase que mayor aportación hizo a este intervalo fue la 3 [0.2-0.3], con unas 65 semillas de las 68 acumuladas (96%), convirtiéndose de nuevo en la clase más representada en la población con un 89% del total analizado. La clase 4 [0.3-0.4], por su parte, acumuló tan sólo 3 semillas, lo que supuso un escaso 4%. Las clases 5 [0.4-0.5] y 6 [0.5-0.6], con 1 semilla cada una,

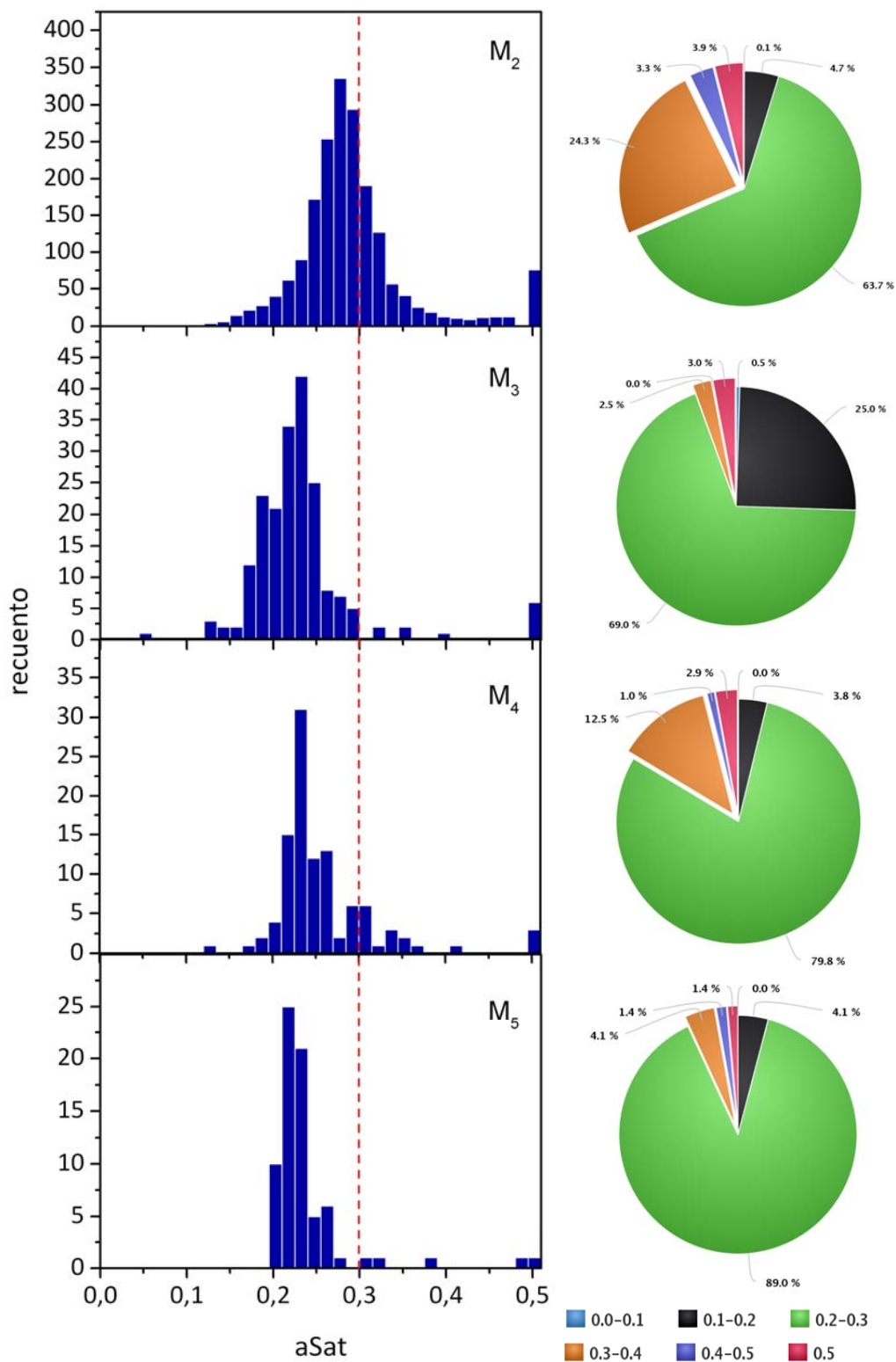
Resultados

aportaron el 2% restante. Finalmente, el porcentaje de semillas que cumplieron el criterio de selección ($\alpha\text{Sat} \geq 0.30$) en esta generación fue tan sólo del 6% del total analizado (5 semillas), fruto de la suma de frecuencias observadas en las clases 4, 5 y 6.

En general, el mayor porcentaje de valor αSat acumulado se situó en torno a las clases 3 y 4 [0.2-0.4] para las generaciones M_2 , M_4 y M_5 y en torno a las clases 2 y 3 [0.1-0.3] para la generación M_3 . No obstante, en todas ellas, la clase más representada fue la 3 [0.2-0.3], aumentando su porcentaje a lo largo de las generaciones. El resto de las clases quedan en segundo plano, ya que no superan el 7% observado en la generación inicial M_2 . A pesar de esto, las clases 5 [0.4-0.5] y 6 [0.5-0.6] fueron importantes de cara a la criba llevada a cabo en cada generación.

Esta misma evolución se puede constatar gráficamente al comparar los *histogramas* y *gráficos de sectores* generados a partir de dicha tabla para cada generación (Figura 52). En ellos queda patente el fenómeno de criba al que se sometió a las diferentes poblaciones generacionales bajo el criterio de selección correspondiente ($\alpha\text{Sat} \geq 0.30$).

Figura 52. Distribución en términos absolutos y porcentuales de la variable “valor αSat ” en las distintas generaciones poblacionales (M_2 - M_5). La línea roja discontinua presente en los histogramas delimita el criterio de selección establecido para dicha variable ($\alpha\text{Sat} \geq 0,30$).



Resultados

A continuación se extrajeron y calcularon los *estadísticos descriptivos* (Materiales y Métodos, 2.4.1.1 y 2.4.1.2). En la Tabla 32 se resumen los estadísticos de posición y dispersión relativos al valor αSat observado en cada una de las poblaciones estudiadas, antes (P) y después (S) de aplicar el criterio de selección establecido para esta variable ($\alpha\text{Sat} \geq 0,30$). Posteriormente, se evaluará la forma y el tipo de distribución en base a la población inicial M_2 .

Tabla 32. Estadísticos descriptivos relativos a la variable “valor αSat ” en las distintas generaciones poblacionales (M_2 - M_5). Las generaciones se dividieron en poblaciones antes (P) y después (S) de aplicar el criterio de selección ($\alpha\text{Sat} \geq 0,30$). CV: coeficiente de variación | Max: valor máximo | Min: valor mínimo | n: tamaño muestral | P10: percentil 10 | P90: percentil 90 | SD: desviación estándar.

		Estadísticos descriptivos										
		Medidas de posición					Medidas de dispersión					
		n	Media	Mediana	P10	P90	SD	Min	Max	Rango	Varianza	CV
M_2	P	1938	0,29	0,28	0,22	0,36	0,07	0,10	0,50	0,40	0,00	0,23
	S	610	0,36	0,33	0,30	0,50	0,07	0,30	0,50	0,20	0,00	0,19
M_3	P	196	0,23	0,23	0,18	0,27	0,06	0,05	0,50	0,45	0,00	0,27
	S	11	0,43	0,50	0,32	0,50	0,08	0,32	0,50	0,18	0,01	0,19
M_4	P	104	0,26	0,24	0,21	0,32	0,06	0,12	0,50	0,38	0,00	0,23
	S	17	0,36	0,34	0,30	0,50	0,07	0,30	0,50	0,20	0,01	0,20
M_5	P	73	0,24	0,23	0,20	0,26	0,05	0,20	0,50	0,30	0,00	0,22
	S	5	0,40	0,38	0,30	0,50	0,09	0,30	0,50	0,20	0,01	0,23

A partir de las medidas resumen recogidas en la tabla anterior, se observó lo siguiente:

Generación M_2 : El valor medio de αSat de la población inicial analizada perteneciente a esta generación, con un tamaño muestral de 1938 semillas, fue de $0,29 \pm 0,07$. Si bien se observaron valores de αSat entre 0,10 y 0,50, la mayoría de éstos se situó entre 0,22 y 0,36, con un 10 % de los valores inferiores a 0,22 (P10) y un 10 % mayores a 0,36 (P90). Esta misma población se caracterizó por poseer una variación relativa moderada para esta variable, como pone en evidencia el coeficiente de variación medido. Una vez aplicado el criterio de selección ($\alpha\text{Sat} \geq 0,30$), la población que cumplía dicho criterio se redujo a 610

semillas, un 31,4 % de la población inicial. El valor medio de αSat aumentó hasta $0,36\pm 0,07$, con valores mínimos y máximos de 0,30 y 0,50, respectivamente, situándose la mayoría en este mismo intervalo. La variación relativa de esta población se vio reducida ligeramente.

Generación M₃: El valor medio de αSat de la población analizada perteneciente a esta generación, con un tamaño muestral de 196 semillas, fue de $0,23\pm 0,06$. Si bien se observaron valores de αSat entre 0,05 y 0,50, la mayoría de éstos se situó entre 0,18 y 0,27, con un 10 % de los valores inferiores a 0,18 (P10) y un 10 % mayores a 0,27 (P90). Esta misma población se caracterizó por poseer una alta variación relativa para esta variable. Una vez aplicado el criterio de selección ($\alpha\text{Sat}\geq 0,30$), la población que cumplía dicho criterio se redujo a tan sólo 11 semillas, un 5,6 % de la población total. El valor medio de αSat aumentó hasta $0,43\pm 0,08$, con valores mínimos y máximos de 0,32 y 0,50, respectivamente, situándose la mayoría en este mismo intervalo. La variación relativa de esta población se vio reducida nuevamente.

Generación M₄: El valor medio de αSat de la población analizada perteneciente a esta generación, con un tamaño muestral de 104 semillas, fue de $0,26\pm 0,06$. Si bien se observaron valores de αSat entre 0,12 y 0,50, la mayoría de éstos se situó entre 0,21 y 0,32, con un 10 % de los valores inferiores a 0,21 (P10) y un 10 % mayores a 0,32 (P90). Esta misma población se caracterizó por poseer aún una variación relativa moderada para esta variable. Una vez aplicado el criterio de selección ($\alpha\text{Sat}\geq 0,30$), la población que cumplía dicho criterio se redujo a 17 semillas, un 16,3 % de la población total. El valor medio de αSat aumentó hasta $0,36\pm 0,07$, con valores mínimos y máximos de 0,30 y 0,50, respectivamente, situándose la mayoría en este mismo intervalo. La variación relativa de esta población fue menor que la anterior.

Generación M₅: El valor medio de αSat de la población analizada perteneciente a esta generación, con un tamaño muestral de 73 semillas, fue de $0,24\pm 0,05$. Si bien se observaron valores de αSat entre 0,20 y 0,50, la mayoría de éstos se situó entre 0,20 y 0,26, con un 10 % de los valores inferiores a 0,20 (P10) y un 10 % mayores a 0,50 (P90). Esta misma población se caracterizó nuevamente por

Resultados

poseer una variación relativa moderada para esta variable. Una vez aplicado el criterio de selección ($\alpha_{\text{Sat}} \geq 0,30$), la población que cumplía dicho criterio se redujo a tan sólo 5 semillas, un 6,8 % de la población total. El valor medio de α_{Sat} aumentó hasta $0,40 \pm 0,09$, con valores mínimos y máximos de 0,30 y 0,50, respectivamente, situándose la mayoría en este mismo intervalo. La variación relativa de esta población fue ligeramente superior que la anterior.

En cuanto a la evolución de las medidas resumen a lo largo de las generaciones, se pudo determinar que:

Tamaño muestral (n): el tamaño muestral de la población inicial perteneciente a la generación M_2 se vio reducido un 68% tras aplicar el criterio de selección. A partir de la siguiente generación (M_3), el porcentaje de semillas cribadas no superó el 7% con respecto al total analizado por generación, con excepción de la generación M_5 , cuya porción cribada supuso un 16% de su población de origen.

Media \pm SD: El valor α_{Sat} medio en la generación inicial M_2 pasó de un 0.29 presente en la población origen (P) a un 0.36 tras aplicar el criterio de selección (S), lo cual supone un diferencial aproximado de 0.01. A partir de la generación M_3 , las medias estimadas tanto de las poblaciones origen (P) como las poblaciones cribadas (S) experimentaron ciertas fluctuaciones a lo largo de las sucesivas generaciones, si bien siempre se mantuvieron superiores en éstas últimas. Igualmente, las desviaciones estándar para cada población S, por su parte, se mantuvieron siempre superiores a las de las poblaciones de las que procedían.

Mediana: la mediana calculada en la generación inicial M_2 pasó de un 0.28 presente en la población origen (P) a un 0.33 tras aplicar el criterio de selección (S), lo cual supone un diferencial de 0.05. A partir de la generación M_3 , el comportamiento observado fue muy similar al analizado anteriormente para las medias poblacionales.

Percentiles 10/90 (P10/P90): los valores P10 alcanzados en cada generación previo a la aplicación del criterio de selección ($\alpha_{\text{Sat}} \geq 0,30$) se mantuvieron prácticamente iguales y siempre fueron menores a los alcanzados por las poblaciones cribadas (S) en cada generación. Por el contrario, los valores P90 de las poblaciones de origen (P) fueron oscilando en cada generación, mientras que los de las poblaciones cribadas (S) se mantuvieron en 0,50. Teniendo en cuenta ambas medidas se observó cómo los datos relativos a esta variable en las poblaciones de origen (P) se fueron desplazando mientras que los datos en las poblaciones cribadas (S) se fijaron en un mismo rango a lo largo de las generaciones.

Valores máximo (Max) y mínimo (Min): los valores máximos alcanzados en estas poblaciones coinciden en un 0.50. Por contra, el valor mínimo alcanzado en cada generación previo a la criba (P) va aumentando progresivamente, a pesar de disminuir inicialmente en la generación M_3 . Los valores mínimos para todas las poblaciones cribadas (S), como cabría esperar, se situaron en torno al 0.30, igualando así el valor establecido en la propia selección ($\alpha_{\text{Sat}} \geq 0.30$).

Amplitud o Rango: el rango observado en las sucesivas poblaciones cribadas (S), generación tras generación, adquirió valores siempre inferiores a los obtenidos por sus poblaciones de origen (P).

Varianza: el valor de la varianza estimada para las poblaciones generacionales previas a la criba (P) fue de 0.00, mientras que el valor en las poblaciones cribadas a partir de la generación M_3 fue de tan sólo el 0.01. Para el estudio en profundidad de las varianzas calculadas se realizaron análisis de varianzas (ANOVA), para lo cual fue necesario conocer la distribución de las poblaciones.

Coefficiente de Variación (CV): Al analizar los coeficientes de variación (CV) de las poblaciones de origen (P) se observa cómo el valor α_{Sat} se mantiene constante en torno al 0.23 a lo largo de las generaciones. Por el contrario, la variación detectada en las poblaciones cribadas (S) va en aumento. Los valores del coeficiente de variación en la población cribada fueron siempre menores a los de la población de origen, siendo este hecho una constante a lo largo de las

Resultados

generaciones, con excepción de la generación M₅, en la que esta tendencia se invirtió.

En resumen, el tamaño muestral fue disminuyendo progresivamente a medida que se avanzó en el proceso de criba generacional. Durante este proceso, el valor medio α Sat fluctuó, con desviaciones estándar (SD) relativamente bajas. En cuanto a las varianzas y coeficientes de variación (CV), éstos experimentaron un aumento inicial para posteriormente disminuir a medida que se avanzó en la obtención de nuevas generaciones.

Finalmente, se evaluó la forma y tipo de distribución correspondiente a la población inicial M₂ (Materiales y Métodos, 2.4.1.3). Una primera visión del histograma (Figura 52) y posterior análisis de la media y mediana calculadas para dicha población (Tabla 23), con valores muy similares en torno a 028-0,29, sugirieron una cierta normalidad y simetría de la distribución de los datos obtenidos para dicha población. No obstante, el *test de Kolmogorov-Smirnov* reveló que los datos no se asemejaban a una distribución normal ($p=0,5$). El *coeficiente de asimetría* estimado, con un valor de 1,31, determinó que la no normalidad testada se debía a una asimetría desplazada hacia la derecha. Por otro lado, el *coeficiente de curtosis*, con un valor de 2,86, hizo referencia a una mayor concentración de datos alrededor de la media, es decir, una distribución mucho más apuntada y con colas más anchas que la normal.

Así pues, todos estos datos nos permitieron obtener una aproximación más exacta de la distribución de la variable “valor α Sat” en las poblaciones analizadas.

3.2 ANÁLISIS DE RELACIONES ENTRE VARIABLES POR GENERACIÓN

Una vez estudiadas las distintas variables de forma individual (Resultados, 3.1), se realizó un análisis estadístico conjunto de carácter multidimensional en la que se analizaron las relaciones existentes entre dichas variables generación tras generación. Para ello se emplearon tanto medidas de relación entre variables como representaciones gráficas. Igualmente, se trató de establecer modelos estadísticos capaces de relacionar mediante una o varias expresiones matemáticas a un grupo de variables que ocasionalmente deben cumplir ciertos requisitos. El método a seguir incluyó un estudio pormenorizado de la relación entre las variables en la población inicial perteneciente a la generación M_2 (Materiales y Métodos, 2.4.2). La naturaleza de las variables y los objetivos del estudio fueron determinantes a la hora de fijar las técnicas empleadas.

3.2.1 Generación M_2

Inicialmente, se realizó un análisis bidimensional entre las variables estudiadas, representadas gráficamente mediante la siguiente *matriz de dispersión* (Figura 53).

A la vista de los resultados se observó la existencia de relaciones entre al menos tres de las cuatro variables analizadas: contenidos de esteárico (E), EOE y SUS. La nube de puntos observada en cada caso sugirió que los ajustes más eficientes eran de tipo lineal ($y = a+bx$) entre las variables “contenido de esteárico (E)” y “SUS” y entre “contenido de EOE” y “SUS” y de tipo exponencial ($y = p_1e^{-x/p_2+p_3+p_4x}$) entre las variables “contenido de esteárico (E)” y “EOE”.

Resultados

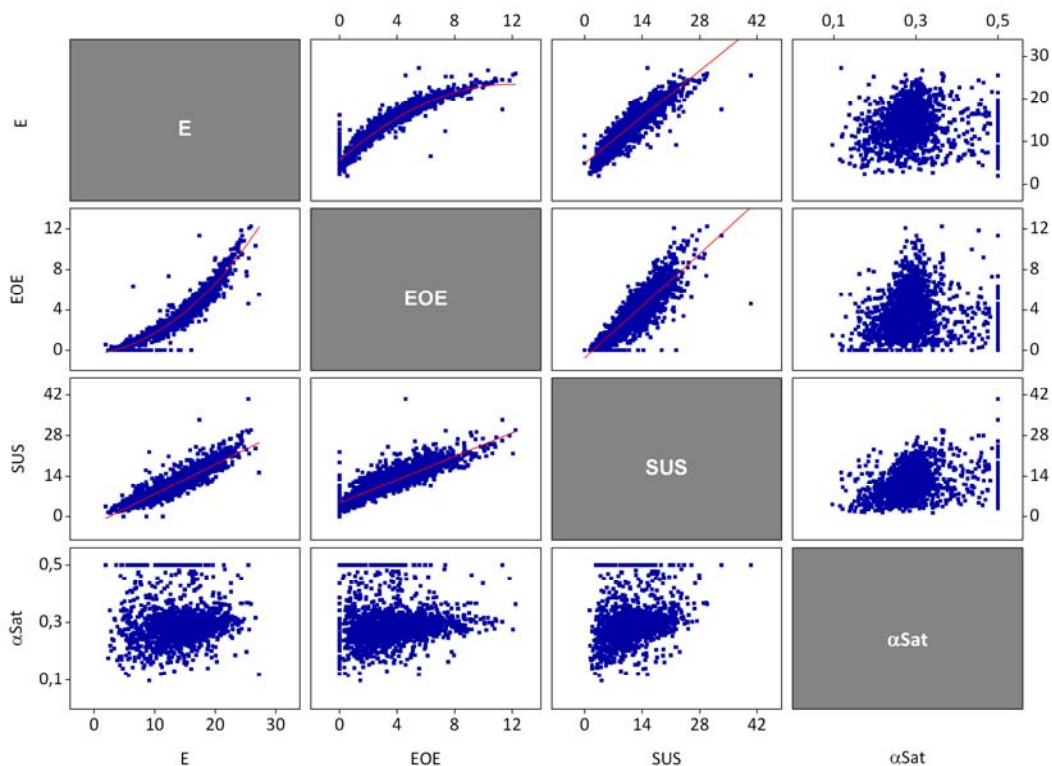


Figura 53. Análisis bidimensional entre las variables estudiadas en la población inicial perteneciente a la generación M_2 .

A continuación, se obtuvo para cada relación su *función de ajuste* y se calculó su *coeficiente de determinación (R^2)* (Materiales y Métodos, 2.4.2) (Tabla 33).

Tabla 33. Funciones de ajuste y coeficientes de determinación (R^2) entre las variables estudiadas en la población inicial perteneciente a la generación M_2 .

		E	EOE	SUS
E	$f(x)$		$y = -916.43e^{-x/63.73} + 921.94 + 17.31x$	$y = 4.84 + 0.77x$
	R^2		0.914	0.801
EOE	$f(x)$	$y = 210.73e^{-x/90.88} - 211.14 - 2.24x$		$y = -0.75 + 0.36x$
	R^2	0.911		0.742
SUS	$f(x)$	$y = -2.55 + 1.03x$	$y = 4.69 + 2.01x$	
	R^2	0.801	0.742	

Para confirmar la existencia de una correlación se calcularon por un lado el *coeficiente de correlación lineal* (r) para las relaciones de tipo lineal y por otro el *coeficiente de correlación Chi cuadrado reducido* para las relaciones de tipo exponencial (Materiales y Métodos, 2.4.2) (Tabla 34).

Tabla 34. Coeficientes de correlación lineal (r) y Chi cuadrado reducido entre las variables estudiadas en la población inicial perteneciente a la generación M₂.

	E	EOE	SUS
	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>
E		1.571	0.895
EOE	0.392		0.861
SUS	0.895	0.861	

Los coeficientes de correlación fueron positivos y relativamente altos, lo que indicó la existencia de una relación directa entre las variables analizadas.

Una vez relacionadas las variables “dos a dos”, se procedió al análisis múltiple de éstas mediante un *Análisis de Componentes Principales (ACP)* (Materiales y Métodos, 2.4.2) (Figura 54).

Como puede observarse en el biplot generado, la primera componente (CP1) separa sustancialmente dos grupos de variables, uno representado exclusivamente por el valor α Sat y otro por los contenidos en E, EOE y SUS. En el caso de la segunda componente (CP2), ésta vuelve a separar los dos grupos descritos, si bien el segundo de ellos se subdivide a su vez en dos, uno representado por el contenido SUS y otro por los contenidos en E y EOE. La suma de ambos componentes explicó el 95,9 % de la variabilidad total en las observaciones, lo que nos permitió inferir lo siguiente:

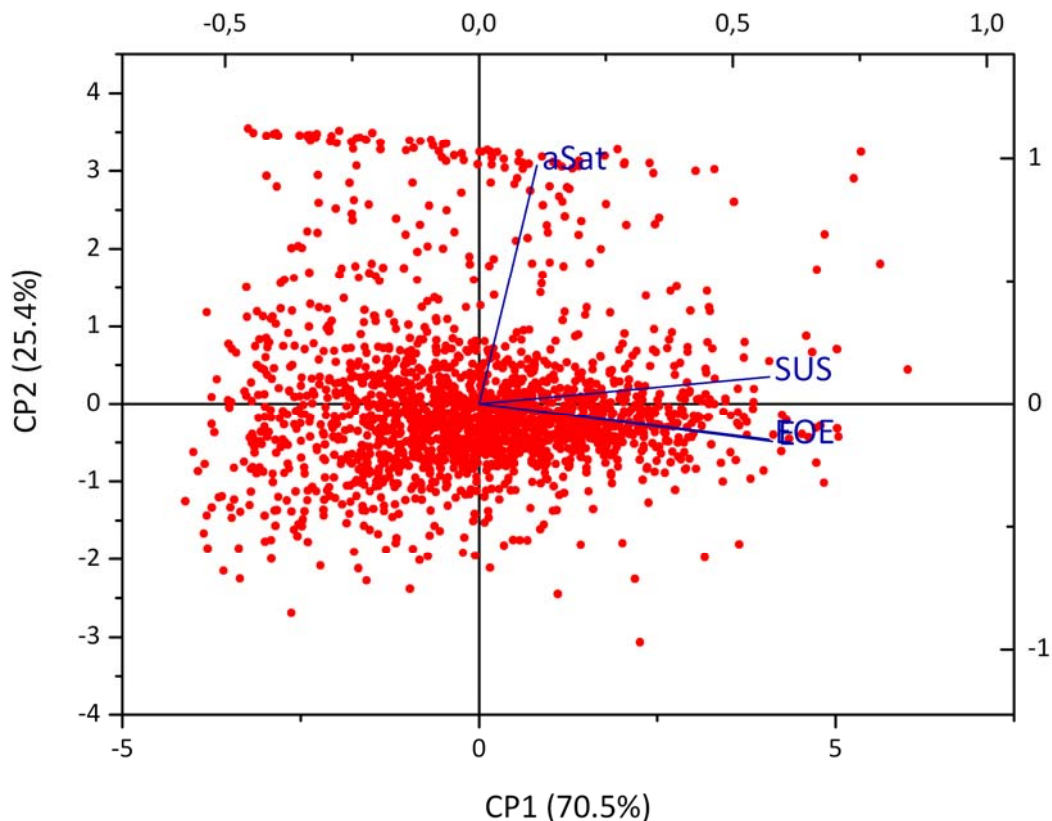


Figura 54. Relaciones entre las variables estudiadas en la población inicial perteneciente a la generación M_2 mediante Análisis de Componentes Principales (ACP). CP: Componente Principal.

- Existe una alta correlación entre las variables “contenido de E” y “EOE”.
- Existe una cierta correlación entre las dos variables anteriormente citadas y la variable “contenido de SUS”.
- Existe una leve correlación entre las variables “valor α Sat” y “SUS”.
- No existe correlación alguna entre las variables “valor α Sat” y “contenidos de E” y “EOE”.

A continuación, se representaron en tres dimensiones las frecuencias absolutas de las cuatro variables estudiadas de la población inicial perteneciente a la generación M_2 (Materiales y Métodos, 2.4.2) (Figura 55).

Finalmente, se muestra la tabla de frecuencias absolutas y relativas (%) de sólo aquellos datos que cumplían al menos uno de los criterios de selección, estableciéndose relaciones entre las distintas variables en la población inicial perteneciente a la generación M_2 (Tabla 26).

3.2.2 Generación M_3

Al igual que en el caso anterior, se representaron en tres dimensiones las frecuencias absolutas de las cuatro variables estudiadas, esta vez de la población perteneciente a la generación M_3 (Materiales y Métodos, 2.4.2) (Figura 55).

Del mismo modo, se muestra en la Tabla 26 las frecuencias absolutas y relativas (%) de sólo aquellos datos que cumplían al menos uno de los criterios de selección de la población perteneciente a la generación M_3 .

3.2.3 Generación M_4

En la Figura 55 se representan las frecuencias absolutas de las cuatro variables estudiadas correspondientes a la generación M_4 . Igualmente, en la Tabla 26 aparecen las frecuencias absolutas y relativas (%) de sólo aquellos datos que cumplían al menos uno de los criterios de selección de la población perteneciente a la generación M_4 .

3.2.4 Generación M_5

Al igual que para las anteriores generaciones, en la Figura 55 y Tabla 35 se pueden observar las frecuencias absolutas y relativas (%) de sólo aquellos datos que cumplían al menos uno de los criterios de selección de la población perteneciente a la generación M_5 .

Resultados

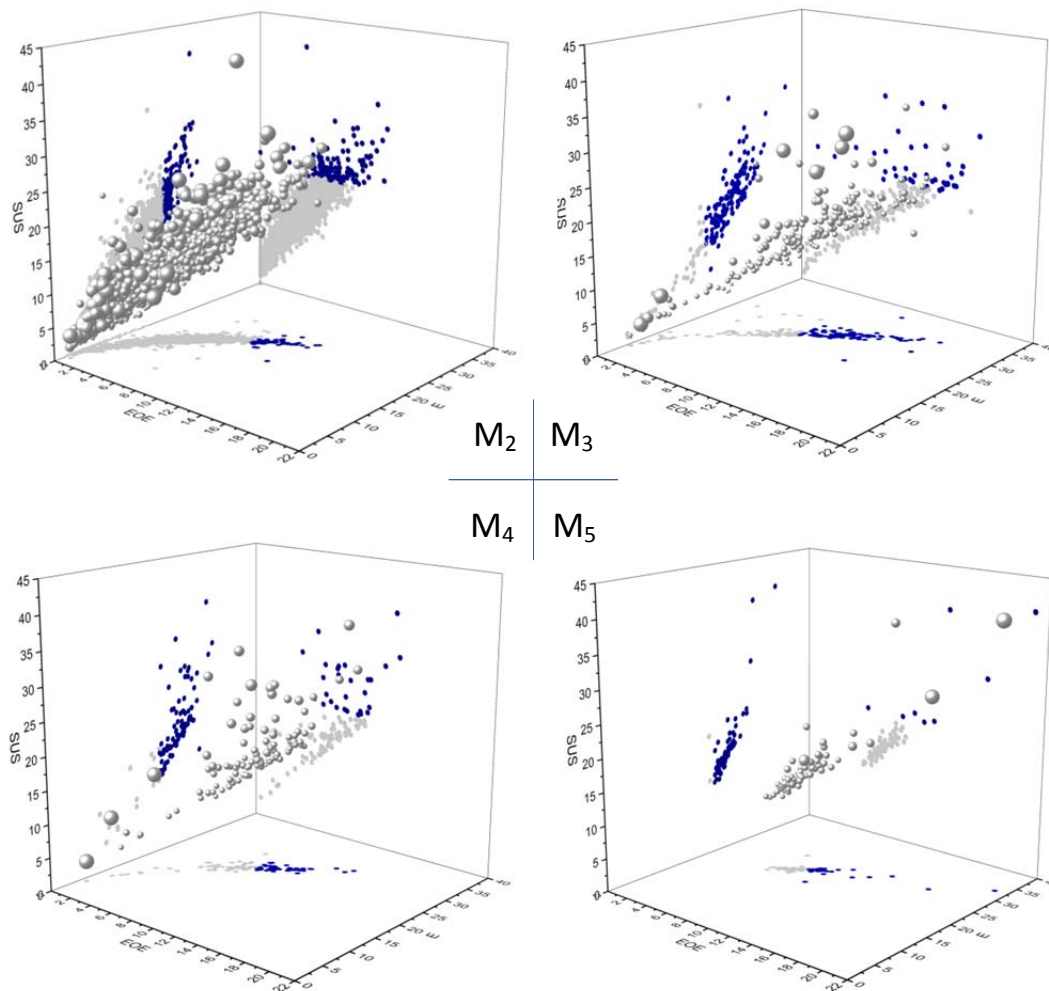


Figura 55. Distribución de las frecuencias absolutas de las variables estudiadas en las poblaciones pertenecientes a las generaciones M₂-M₅. En cada plano generado se proyectan las relaciones “dos a dos” entre las frecuencias absolutas de las variables estudiadas. En gris se marcan aquellas frecuencias que no cumplieron los criterios de selección marcados para cada variable y en azul se marcan aquéllas que sí lo hicieron. La variable “valor αSat” queda representada por el tamaño de los puntos.

Tabla 35. Distribución de frecuencias entre las variables estudiadas en las distintas poblaciones estudiadas (M₂-M₅).

		E	EOE	SUS	α Sat	E + EOE	E + SUS	E + α Sat	EOE + SUS	EOE + α Sat	SUS + α Sat	TODOS	
M ₂	E	FA	166	67	98	86			51	35	71	33	
		FR	0.08*	0.40	0.59	0.52			0.30	0.21	0.42	0.20	
	EOE	FA	67	69	52	37		51	35			35	33
		FR	0.97	0.03*	0.75	0.53		0.74	0.50			0.50	0.48
	SUS	FA	98	52	128	97	51		71		35		33
		FR	0.76	0.40	0.06*	0.75	0.40		0.55		0.27		0.25
α Sat	FA	86	37	97	610	35	71		35			33	
	FR	0.14	0.06	0.16	0.31*	0.05	0.11		0.05			0.05	
M ₃	E	FA	151	108	41	6			36	4	5	4	
		FR	0.76*	0.71	0.27	0.04			0.24	0.02	0.03	0.02	
	EOE	FA	108	109	37	5		36	4			4	4
		FR	0.99	0.55*	0.34	0.04		0.33	0.03			0.03	0.03
	SUS	FA	41	37	42	6	36		5		4		4
		FR	0.97	0.88	0.21*	0.14	0.86		0.12		0.10		0.10
α Sat	FA	6	5	6	11	4	5		4			4	
	FR	0.54	0.45	0.54	0.05*	0.36	0.45		0.36			0.36	
M ₄	E	FA	87	51	28	14			20	6	12	6	
		FR	0.83*	0.58	0.32	0.16			0.23	0.07	0.14	0.07	
	EOE	FA	51	51	20	6		20	6			6	6
		FR	1.00	0.48*	0.39	0.11		0.39	0.11			0.11	0.11
	SUS	FA	28	20	28	12	20		12		6		6
		FR	1.00	0.71	0.26*	0.43	0.71		0.43		0.21		0.21
α Sat	FA	14	6	12	17	6	12		6			6	
	FR	0.82	0.35	0.70	0.16*	0.35	0.70		0.35			0.35	
M ₅	E	FA	71	26	8	4			7	4	4	4	
		FR	0.91*	0.36	0.11	0.05			0.10	0.05	0.05	0.05	
	EOE	FA	26	27	7	5		7	4			4	4
		FR	0.96	0.34*	0.26	0.18		0.26	0.15			0.15	0.15
	SUS	FA	8	7	8	4	7		4		4		4
		FR	1.00	0.87	0.10*	0.50	0.87		0.50		0.50		0.50
α Sat	FA	4	5	4	5	4	4		4			4	
	FR	0.80	1.00	0.80	0.06*	0.80	0.80		0.80			0.80	

DISCUSIÓN | 253-288

BLOQUE I: CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ENZIMÁTICA DE LAS ACILTRANSFERASAS IMPLICADAS EN LA BIOSÍNTESIS DE TRIACILGLICÉRIDOS EN GIRASOL	255
1. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS ENZIMAS IMPLICADAS EN LA BIOSÍNTESIS DE TRIACILGLICÉRIDOS EN GIRASOL: <i>HaLPAATs Y HaDAGATs</i>	255
1.1 CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE <i>HaLPAATs Y HaDAGATs</i>	255
1.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE <i>HaLPAATs Y HaDAGATs</i>	256
1.3 PREDICCIÓN DE ESTRUCTURAS DE <i>HaLPAATs Y HaDAGATs</i>	258
1.4 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE <i>HaLPAATs Y HaDAGATs</i>	266
1.5 ESTUDIO COMPARATIVO DE MODELOS TOPOLÓGICOS DE <i>HaLPAATs Y HaDAGATs</i>	270
1.6 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE <i>HaLPAATs Y HaDAGATs</i>	273
2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS ENZIMAS IMPLICADAS EN LA BIOSÍNTESIS DE TRIACILGLICÉRIDOS EN GIRASOL: <i>HaLPAATs Y HaDAGATs</i>	277
2.1 <i>HaLPAATs</i>	277
2.2 <i>HaDAGATs</i>	280
BLOQUE II: ANÁLISIS DE TRIACILGLICÉRIDOS (TAGs) EN LÍNEAS MUTAGENIZADAS DE GIRASOL ALTO OLEICO ALTO ESTEÁRICO (HOHE) Y SELECCIÓN DE NUEVOS CANDIDATOS	288

BLOQUE I: CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ENZIMÁTICA DE LAS ACILTRANSFERASAS IMPLICADAS EN LA BIOSÍNTESIS DE TRIACILGLICÉRIDOS EN GIRASOL

1. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS ENZIMAS IMPLICADAS EN LA BIOSÍNTESIS DE TRIACILGLICÉRIDOS EN GIRASOL: *HaLPAATs* Y *HaDAGATs*

1.1 CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE *HaLPAATs* Y *HaDAGATs*

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se han clonado dos LPAAT de *Helianthus annuus*, *HaLPAAT1* [gi | 145692846] y *HaLPAAT2* [gi | 156122739], así como tres DAGATs, *HaDAGAT1A* [gi | 188998307], *HaDAGAT1B* [gi | 161334748] y *HaDAGAT2* [gi | 156122741] (Resultados, 1.1 y 2.1). Las clonaciones se realizaron usando cDNA de semillas de girasol de 15 DDF, estadio donde la expresión de estas aciltransferasas fue máxima (Resultados, 1.3 Figura 30 y 2.3 Figural 43).

Mientras que las dos isoformas *HaLPAATs* presentan características fisicoquímicas semejantes, las *HaDAGATs* difieren unas de otras, diferenciándose las dos isoformas *HaDAGAT1s* de *HaDAGAT2*.

HaLPAAT1 y *HaLPAAT2* presentan un tamaño de 385 y 382 aminoácidos, respectivamente, con pesos moleculares estimados en torno a 43 kDa y puntos isoeléctricos prácticamente idénticos, del orden de 10 (Resultados, 1.2.1, Tabla 17). Estas propiedades fisicoquímicas están en consonancia con las halladas para la mayoría de LPATs microsomales de plantas descritas hasta la fecha (Brown *et al.* 1994; Brown *et al.* 1995; Knutzon *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2012; Arroyo-Caro *et al.*, 2013).

HaDAGAT1A y *HaDAGAT1B*, por su parte, presentan un tamaño de 479 y 506 aminoácidos, respectivamente, con pesos moleculares estimados en torno a 56 kDa y puntos isoeléctricos del orden de 9. *HaDAGAT2*, sin embargo, presenta un tamaño de 336 aminoácidos, menor en relación a *HaDAGAT1s*, con peso molecular estimado de 38.09 kDa y punto isoeléctrico de 10 (Resultados, 2.2.1

Tabla 21). Estas diferencias se aprecian igualmente al comparar DGAT1s y DGAT2s descritas de diferentes organismos (Hobbs *et al.*, 1999; Routaboul *et al.*, 1999; Zou *et al.*, 1999; Cases *et al.*, 2001; Lardizabal *et al.*, 2001; Nykiforuk *et al.*, 2002; He *et al.*, 2004a; Milcamps *et al.*, 2005; Kroon *et al.*, 2006; Shockey *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Ilaiyaraja *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2008; Wagner *et al.*, 2010; Banilas *et al.*, 2011; Cao, 2011; Guihéneuf *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2011; Cao, 2011; Hiramine y Tanabe, 2011; Cao *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2013).

Cabe destacar que, pese a las diferencias mostradas anteriormente, todas las aciltransferasas estudiadas presentaron porcentajes de insolubilidad e hidrofobicidad en torno al 80% y 50%, respectivamente. Así mismo, la frecuencia de residuos aminoacídicos estimada es similar para todas ellas, exhibiendo aproximadamente un 12-13% de residuos básicos frente a un 6-8% de residuos ácidos (Resultados, 1.2.1 Tabla 17 y 2.2.1 Tabla 21).

1.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE *HaLPAATs* Y *HaDAGATs*

El análisis filogenético basado en la variabilidad aminoacídica que presentaron las secuencias codificante de los genes *LPATs* y *DGATs* de plantas implicados en la biosíntesis de triacilglicéridos permitió obtener tres árboles filogenéticos diferentes, uno para cada familia génica estudiada en este trabajo.

Como era de esperar, las dos isoformas de *HaLPAATs* presentan entre ellas el mayor porcentaje de identidad observado, compartiendo escenario con otras *LPATs* de plantas eudicotiledóneas (Resultados, 1.2.2, Figura 26). Cabe destacar que ambas *HaLPAATs* presentan mayor homología con las isoformas *LPAT2* que con las *LPAT3* representadas. Así pues, *HaLPAATs* pertenecería como el resto de *LPATs* a una familia de lisofosfolípido aciltransferasas (*LPLATs*) del tipo *LCLAT1*, implicadas en la biosíntesis de glicerofosfolípidos (Marchler-Bauer *et al.*, 2015).

Las dos isoformas de *HaDAGAT1s*, con un porcentaje de identidad del 81%, mantienen igualmente una estrecha relación con *DGAT1s* plantas eudicotiledóneas (Resultados, 2.2.2, Figura 37). Entre éstas, presentan mayor

homología con las dos isoformas identificadas de *Vernonia galamensis*, perteneciente a la misma familia Asteraceae, y con DGAT1s de especies de la familia Euphorbiaceae, entre otras. Así pues, *HaDAGAT1s* pertenecería a una familia de aciltransferasas unidas a membranas (MBOAT), la cual está constituida por DGAT1s y ACATs (Cases *et al.*, 1998; Hofmann, 2000; Turkish *et al.*, 2005; Wagner y Daum, 2005; Yen *et al.*, 2005; Marchler-Bauer *et al.*, 2015).

HaDAGAT2, por su parte, se sitúa igualmente dentro del grupo de las plantas eudicotiledóneas, manteniendo una estrecha relación esta vez con DGAT2s de especies pertenecientes a las familias Fabaceae y Brassicaceae, entre otras (Resultados, 2.2.2 Figura 38). De esta manera, *HaDAGAT2* pertenecería como el resto de DGAT2s descritas a una familia de lisofosfolípido aciltransferasas (LPLATs) del tipo MGAT, implicadas en la biosíntesis de glicerofosfolípidos (Yen *et al.*, 2002; Kroon *et al.*, 2006; Lung y Weselake, 2006; Marchler-Bauer *et al.*, 2015).

1.2.1 Evolución de familias génicas LPATs y DGATs

Un estudio reciente basado en las diferencias halladas en la estructuras génicas y secuencias aminoacídicas de LPATs presentes en algas, diatomeas y plantas permitió determinar que las distintas isoformas de éstas se originaron por convergencia evolutiva y no por duplicación génica (Misra *et al.*, 2014).

En cuanto a las DGATs, queda patente la división de éstas en dos subfamilias bien diferenciadas, DGAT1s y DGAT2s, distintas a su vez de la subfamilia DGAT3s, las cuáles catalizan las mismas reacciones químicas pese a evolucionar de forma independiente. Este hecho es ampliamente reconocido, considerándose un claro ejemplo de convergencia funcional (Cases *et al.*, 1998, 2001; Shockey *et al.*, 2006; Yen *et al.*, 2008; Holmes, 2010; Cao, 2011; Turchetto-Zolet *et al.*, 2011). Además, estudios basados en genómica y proteómica comparativa coinciden en señalar que la divergencia de sus genes aconteció pronto en la evolución de eucariotas, convergiendo funcionalmente con anterioridad a la división entre animales y vegetales, lo que evidencia el destacado papel que juegan estas enzimas en la biosíntesis de TAGs (Holmes, 2010; Turchetto-Zolet *et al.*, 2011) (Figura 56).

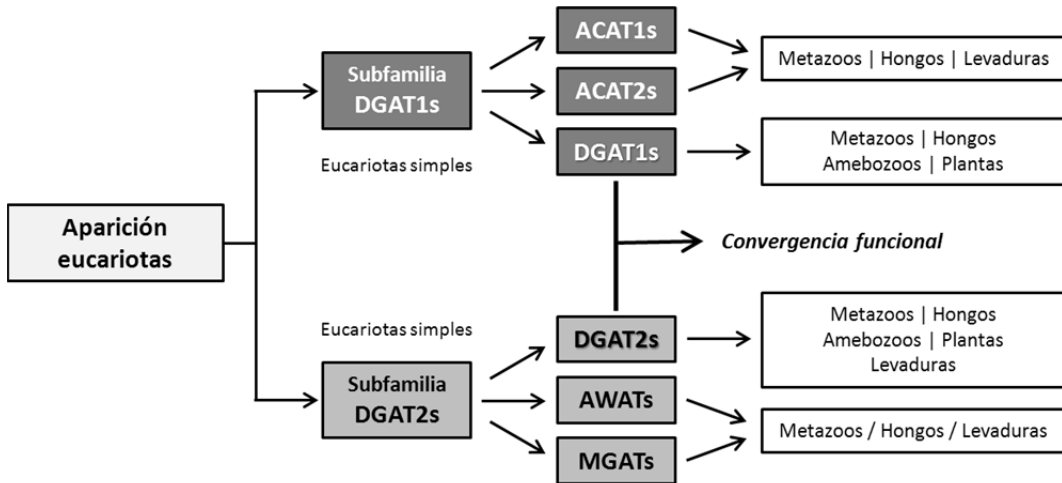


Figura 56. Esquema propuesto para la evolución de DGAT1s y DGAT2s en eucariotas. ACAT1s: esteroil:acetil-CoA aciltransferasas tipo 1 | ACAT2s: esteroil:acetil-CoA aciltransferasas tipo 2 | AWATs: acil-CoA wax-alcohol aciltransferasas | DGAT1s: diacilglicerol aciltransferasas tipo 1 | DGAT2s: diacilglicerol aciltransferasas tipo 2 | MGATs: monoacilglicerol aciltransferasas. Modificado de Turchetto-Zolet *et al.*, 2011.

1.3 PREDICCIÓN DE ESTRUCTURAS DE *Ha*LPAAATs Y *Ha*DAGATs

A pesar de la importancia de estas enzimas, sus mecanismos de acción y reconocimiento de sustratos aún no han sido debidamente caracterizados. Esto se debe en gran parte a que, al ser proteínas integrales de membrana, su solubilización podría afectar a su estructura y actividad, imposibilitando su purificación y posterior cristalización (Cheng *et al.*, 2001; Weselake *et al.*, 2006). No obstante, ya ha producido en este mismo año la purificación de DGAT1 de *Brassica napus* (Caldo *et al.*, 2015), por lo que parece inminente la purificación y caracterización de otras tantas enzimas. Así pues, hasta ahora, los aspectos relacionados con la tipología y funcionalidad de estas enzimas se ha fundamentado tanto en estudios *in silico* de motivos conservados y predicciones de dominios transmembrana basados en alineamientos aminoacídicos como en el uso de técnicas como la mutagénesis dirigida, en combinación con inmunquímica y/o diferentes ensayos (protección frente a proteasas, agentes thiol modifying..).

En nuestro trabajo, el alineamiento aminoacídico de las secuencias codificantes de *HaLPAATs*, *HaDAGAT1s* y *HaDAGAT2*, junto a *LPATs*, *DGAT1s* y *DGAT2s* de otras plantas, permitió predecir en mayor o menor medida la presencia de determinados motivos conservados y dominios transmembrana característicos de las familias génicas a las que pertenecen, posibilitando un mayor entendimiento de la estructura, funcionalidad y regulación de estas enzimas.

1.3.1 Estudio comparativo de motivos conservados y residuos aminoacídicos

Los motivos conservados presentes en *HaLPAATs* y *HaDAGATs* se determinaron en base a los alineamientos aminoacídicos realizados en este trabajo, así como a otros alineamientos y experimentos llevados a cabo por otros autores para tal fin.

En general, *LPATs* y *DGATs* tienen en común la presencia de regiones altamente conservadas, en contraste con extremos N-terminal mucho más variables que el resto de sus secuencias, como así lo demuestran los alineamientos aminoacídicos generados en este estudio (Resultados, 1.2.3, Figura 27 y 2.2.3, Figuras 39 y 40). En relación a esto último, algunos estudios sugieren que tal divergencia entre especies podría jugar un papel clave en la especificidad de sustrato de estas enzimas, así como en la propia conformación y/o regulación de sus actividades enzimáticas (Maisonneuve *et al.*, 2000; Weselake *et al.*, 2000; Siloto *et al.*, 2008; McFie *et al.*, 2010). Incluso se ha llegado a identificar en *DGAT2* de ratón una región en dicho extremo responsable de la asociación de esta enzima con mitocondrias (Stone *et al.*, 2009).

Además, existe un solo residuo de prolina (P) altamente conservado en todas las *GPATs*, *LPATs* y *DGATs* que se cree estar implicado en la unión de acil-CoAs, sustrato común a todas estas aciltransferasas (Lewin *et al.*, 1999; Nykiforuk *et al.*, 2002). Estos residuos de prolina se corresponderían con P203 y P202 en *HaLPAAT1* y *HaLPAAT2*, respectivamente (Resultados, 1.2.3, Figura 27), P175 y P201 en *HaDAGAT1A* y *HaDAGAT1B* (Resultados, 2.2.3, Figuras 39) y P83 en *HaDAGAT2* (Resultados, 2.2.3, Figuras 40).

1.3.1.1 *Ha*LPAATs

El alineamiento aminoacídico de *Ha*LPAATs con otras LPATs (Resultados, 1.2.3, Figura 27) muestra un gran dominio conservado característico de la familia de lisofosfolípido aciltransferasas (LPLATs) del tipo LCLAT1 de la que forman parte (Marchler-Bauer *et al.*, 2015). Embebidas en este dominio se encuentran cuatro regiones altamente conservadas (I-IV) (Resultados, 1.2.3, Figura 27) halladas en diversos organismos (Lewin *et al.*, 1999; Yamashita *et al.*, 2007; Nagle *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012), dos de las cuales, I y III, conforman un supuesto bolsillo de unión a acilos, por similitud con GPAT de *Cucurbita moschata* (Turnbull *et al.*, 2001; Tamada *et al.*, 2004). En concreto, los motivos NHX₄D (I) y EGT (III), conservados no sólo en LPATs y GPATs de plantas, sino también en bacterias, levaduras y animales, formarían el sitio catalítico y el sitio de unión al sustrato LPA, respectivamente, en tanto que mutaciones llevadas a cabo en ellos provocan la pérdida total o parcial de actividad enzimática (Heath y Rock, 1998; Lewin *et al.*, 1999; Maisonneuve *et al.*, 2000; Kim y Huang, 2004; Yamashita *et al.*, 2007; Arroyo-Caro *et al.*, 2013). Incluso se ha postulado un mecanismo de acción basado en los datos anteriores: el residuo básico de histidina (H) extraería un protón del grupo hidroxilo en la posición *sn*-2 del aceptor de acilos (LPA), facilitando así su ataque nucleofílico sobre el tioéster del donador de acilos (acil-CoA); el residuo de ácido aspártico (D) actuaría en un sistema de intercambio de carga con la histidina para incrementar la nucleofilicidad del grupo hidroxilo LPA (Figura 57) (Frentzen y Wolter, 1998).

Finalmente, se observa una gran variabilidad entre los extremos C-terminal de las secuencias LPATs alineadas (Resultados, 1.2.3, Figura 27).

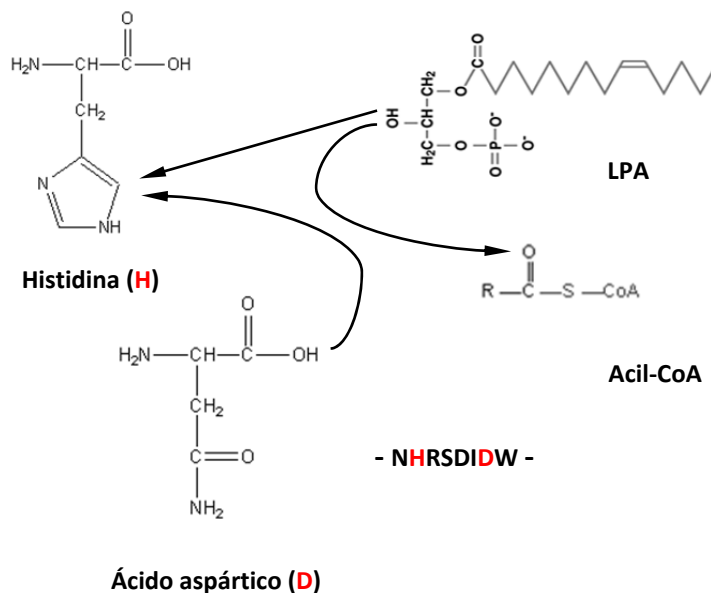


Figura 57. Mecanismo de acción propuesto para LPAT de plantas. El residuo básico de histidina (H) extraería un protón del grupo hidroxilo en la posición *sn*-2 del aceptor de acilos (LPA), facilitando así su ataque nucleofílico sobre el tioéster del donador de acilos (acil-CoA); el residuo de ácido aspártico (D) actuaría en un sistema de intercambio de carga con la histidina para incrementar la nucleofilicidad del grupo hidroxilo LPA. Modificado de Frentzen y Wolter, 1998.

1.3.1.2 *Ha*DAGATs

En general, DGATs tienen en común, a diferencia de lo observado en LPATs, mayor presencia de regiones altamente conservadas a lo largo de sus secuencias, extremos C-terminal incluidos, como así lo demuestran los alineamientos aminoacídicos generados en este estudio (Resultados, 1.2.3, Figura 27 y 2.2.3, Figuras 39 y 40). No obstante, DGAT1s están más conservadas que DGAT2s y no presentan una alta homología entre sus secuencias (Shockey *et al.*, 2006; Cao, 2011; Cao *et al.*, 2011), hecho que refuta aún más la división de estas DGATs en las dos familias anteriormente comentadas.

A pesar de estas diferencias, existen residuos altamente conservados en la mayoría de DGATs descritas que se creen ser esenciales para la actividad catalítica de éstas (Cao, 2011). Por un lado se observan un residuo de prolina (P) que se correspondería con P250, P276 y P165 en *HaDAGAT1A*, *HaDAGAT1B* y *HaDAGAT2*, respectivamente, y un residuo de fenilalanina (F) seguido de un residuo de glicina (G) altamente conservado que se correspondería con F345, F371 y F239 en *HaDAGAT1A*, *HaDAGAT1B* y *HaDAGAT2* (Resultados, 2.2.3, Figuras 39 y 40). Existe además otro residuo de prolina (P), con excepción de DGAT2 de *Ostreococcus tauri*, que se correspondería con P412, P438 y P290 en *HaDAGAT1A*, *HaDAGAT1B* y *HaDAGAT2* (Resultados, 2.2.3, Figuras 39 y 40).

El alineamiento aminoacídico de *HaDAGAT1s* con otras DGAT1s (Resultados, 2.2.3, Figura 39) muestra un gran dominio conservado perteneciente a la superfamilia de las O-aciltransferasas de unión a membrana (MBOAT) de la que forman parte (Cases *et al.*, 1998; Hofmann, 2000; Turkish *et al.*, 2005; Wagner y Daum, 2005; Yen *et al.*, 2005; Marchler-Bauer *et al.*, 2015). Igualmente se encuentran hasta siete regiones altamente conservadas (I-VII) halladas en diversos organismos (Cao, 2011), de las cuales seis, I-VI, quedan embebidas en el dominio MBOAT (Resultados, 2.2.3, Figura 39). En cuanto a los motivos funcionales, quedan perfectamente definidos algunos comunes a esta familia y otros exclusivos de DGAT (Bouvier-Navé *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2001; Ilaiyaraja *et al.*, 2008; Yen *et al.*, 2008; Shindou *et al.*, 2009; Turchetto-Zolet *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012). En concreto, los motivos RXXXE (I), HXXXD (II) y HXXXXD (IV-V) estarían implicados en el sitio activo de la enzima, mientras que los motivos FYXDWWN (V) y HXXXXRHXXXXP (VI) lo estarían en la unión de sustratos acil-CoAs y DAG/forbol, respectivamente (Resultados, 2.2.3, Figura 39). Por otro lado, existen datos que apuntan a que las secuencias aminoacídicas KESPLSSDAIFKQSHAGLF (II) y SRLIEN (III) (Resultados, 2.2.3, Figura 39), pudieran desempeñar papeles clave en la unión a acil-CoAs y sitio activo de la enzima, respectivamente. Incluso se ha postulado un mecanismo de acción similar a los residuos de histidina (H) y ácido aspártico (D) encontrados en GPATs y LPATs para los residuos de arginina (R) y ácido glutámico (E) presentes en SRLIEN (III) (Jako *et al.*, 2001; Milcamps *et al.*, 2005).

Destaca a su vez la presencia de una cremallera de leucina formada por 5 residuos de leucina (L) consecutivos, separados entre sí por seis aminoácidos (LX₆LX₆LX₆LX₆L) (I-II) (Resultados, 2.2.3, Figura 39), además de múltiples sitios de fosforilación a lo largo de las secuencias, aunque no está del todo claro si estas regiones son importantes en la función, estructura o regulación de estas enzimas *in vivo*. Esta cremallera de leucina está presente en un gran número de DGAT1s de plantas pero no de animales (Hobbs *et al.*, 1999; Bouvier-Navé *et al.*, 2000; Nykiforuk *et al.*, 2002; Lung y Weselake, 2006). Esta región coincide además con un motivo de unión a proteínas implicadas en el transporte a través de membrana, habiéndose propuesto que esta región de la enzima podría interactuar con proteínas transportadoras de sustratos acil-CoAs (ACBPs, acil-CoAs binding proteins) (He *et al.*, 2004a). En cuanto a los sitios de fosforilación, éstos están igualmente presentes en DGAT1s y son de muy variada naturaleza, encontrándose sitios de la proteína quinasa C, caseína quinasa II y tirosina quinasa (Hobb *et al.*, 1999; Nykiforuk *et al.*, 2002; He *et al.*, 2004a; Guihéneuf *et al.*, 2011), solapando este último sitio con el motivo FYXDWWN (V) previamente discutido como supuesto sitio de unión acil-CoA. Algunos estudios han probado la funcionalidad de estos sitios mediante sustituciones aminoacídicas, con la consecuente disminución de la afinidad por sustratos (Guo *et al.*, 2001; Thuille *et al.*, 2005). Recientemente, Lopes *et al.*, 2014 han dado un paso más hacia el entendimiento de las interacciones de estos motivos con sus supuestos sustratos: usando péptidos sintéticos correspondientes a los sitios de unión de DGAT1s han probado como uno de ellos, aquel que incluía el motivo FYXDWWN, cambiaba su conformación en presencia de acil-CoAs, lo que sugiere su capacidad de unión a estos sustratos. La regulación de la actividad DGAT1 a través de fosforilación es convincente no sólo por ser éste un mecanismo común de control de actividad enzimática en eucariotas sino también porque DGAT puede “secuestrar” DAG, una molécula importante implicada en cascadas de señalización de fosforilación (Carrasco y Merida, 2007).

Por último, se observa en el extremo N-terminal de DGAT1s un clúster de argininas altamente conservado (RRR) y la secuencia YYHD(L/V)MN (VII) cercana al extremo C-terminal de las mismas (Resultados, 2.2.3, Figura 39), los cuáles serán

objeto de discusión más adelante, debido a sus posibles implicaciones en la localización subcelular de estas enzimas.

El alineamiento aminoacídico de *Ha*DAGAT2 con otras DGAT2s (Resultados, 2.2.3, Figura 40) muestra un gran dominio conservado característico de la familia de lisofosfolípido aciltransferasas (LPLATs) del tipo MGAT, implicadas en la biosíntesis de glicerofosfolípidos (Yen *et al.*, 2002; Kroon *et al.*, 2006; Lung y Weselake, 2006; Marchler-Bauer *et al.*, 2015). Englobadas en este dominio se encuentran hasta seis regiones altamente conservadas (I-VI) (Resultados, 2.2.3, Figura 40) halladas en diversos organismos (Stone *et al.*, 2006; Cao, 2011; Turchetto-Zolet *et al.*, 2011), entre dos de las cuales, I y III, aparecen diversos residuos aminoacídicos que conformarían un supuesto bolsillo de unión a acilos (Cao, 2011). En cuanto a los motivos funcionales, quedan perfectamente definidos algunos de ellos como FFP, EPHS (I) y RKG FVRLAMETNSPLVPVFGFGQ (IV-V), implicados de alguna manera en la actividad enzimática de DGAT2s (Liu *et al.*, 2011). En este caso poco se conoce sobre el papel específico que pudieran desempeñar estos motivos. El motivo FFP representa una variación de la secuencia consenso YFP, conservada en animales, plantas, algas y levaduras (Cao, 2011; Chen y Smith, 2012), mientras que la secuencia EPHS (I), conservada en DGAT2 de plantas (Turchetto-Zolet *et al.*, 2011), equivaldría a la secuencia consenso HPHG de DGAT2s de animales y hongos, la cual es reconocida como dominio de unión a lípido neutro (Stone *et al.*, 2006). Estos dos motivos aparecen igualmente en algas, pese a mostrar ciertas variaciones (Chen y Smith, 2012).

Finalmente, la secuencia LQLRIM presente en el extremo C-terminal de *Ha*DAGAT2 (Resultados, 2.2.3, Figura 40), será objeto de discusión más adelante, debido a su posible implicación en la localización subcelular de esta enzima.

En resumen, y a pesar de las diferencias anteriormente discutidas, hoy día se asume que el dominio catalítico de DGATs se sitúa en el extremo C-terminal, mientras que el dominio regulador descansa sobre el extremo N-terminal, el cuál pudiera igualmente ser responsable de las distintas especificidades por sustrato de estas enzimas debido a su falta de homología entre sus secuencias aminoacídicas.

Por último, como curiosidad, ninguno de los motivos o residuos altamente conservados en las familias DGAT1s y DGAT2s están presentes en DGAT3s y DGAT4s. Esta divergencia de secuencias es contraria a la creencia general de que los sitios activos de las enzimas que catalizan las mismas o similares reacciones bioquímicas deberían poseer cierto grado de conservación durante la evolución (Cahoon *et al.*, 2007).

1.3.2 Estudio comparativo de dominios transmembrana (TMDs)

Los dominios transmembrana (TMDs) de *HaLPAATs* y *HaDAGATs* se determinaron en base a los resultados obtenidos por el programa bioinformático de predicción TMHMM 2.0.

De esta manera se pudo estimar la presencia de al menos tres dominios transmembrana para ambas *HaLPAATs* (Resultados, 1.2.3, Figura 28), en consonancia con LPATs de *E. coli*, levaduras y *Brassica napus* (Bourgis *et al.*, 1999). No obstante, otros programas de predicción de TMDs determinan hasta cuatro dominios transmembrana para *HaLPAATs*, al igual que para LPATs mitocondriales de humanos, ovejas y vacas (Mistry y Medrano, 2002; Yamashita *et al.*, 2007), *AtLPAT2* y *AtLPAT3* de *A. thaliana* (Kim y Huang, 2004; Kim *et al.*, 2005) y cacahuete (Chen *et al.*, 2012). Por el contrario, LPAT microsomal de coco presenta tan sólo dos dominios transmembrana (Knutzon *et al.*, 1995), al igual que LPAT3 de humanos (Schmidt *et al.*, 2010), lo que hace necesario revisar y comparar con mayor exactitud los programas de predicción de estos dominios.

En el caso de las *HaDAGATs*, hubo disparidad en el número de TMDs. *HaDAGAT1A* presenta ocho dominios, nueve para *HaDAGAT1B* y tan sólo dos para *HaDAGAT2* (Resultados, 2.2.3 Figura 41). Estudios en plantas han mostrado que DGAT1s de *Brassica juncea* (Illaiyaraja *et al.*, 2008), *Echium* (Manas-Fernández *et al.*, 2009) y *Helianthus annuus* (Sun *et al.*, 2011) poseen nueve dominios transmembrana, al igual que DGAT1s de *Arabidopsis thaliana*, ricino (*Ricinus comunis*), soja (*Glycine max*) y arroz (*Oryza sativa*), entre otras (Turchetto-Zolet *et al.*, 2011). No obstante, otros autores hacen referencia a diez de estos dominios cuando estudian algunas de las DGAT1s ya citadas, DGAT1 del

árbol de tung (*Vernicia fordii*) incluida (Shockey *et al.*, 2006). DGAT2s de estas plantas, sin embargo, coinciden en poseer tan sólo dos dominios transmembrana (Shockey *et al.*, 2006; Turchetto-Zolet *et al.*, 2011), al igual que DGAT2 de *Brassica juncea* (Illaiyaraja *et al.*, 2008), si bien Dga1p de *S. cerevisiae* posee cuatro TMDs (Liu *et al.*, 2011). En general, DGAT1s presentan mayor variación en el número de dominios transmembrana (6-10) mientras que DGAT2s presentan más consenso (1-2) (Liu *et al.*, 2012). Las diferencias halladas en el número de TMDs entre DGAT1s y DGAT2s indicarían a su vez diferencias en cuanto a sus topologías y, en consecuencia, con diferentes papeles fisiológicos (Yen *et al.*, 2008; Holmes, 2010).

1.4 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE *Ha*LPAATs Y *Ha*DAGATs

En nuestro trabajo, la localización subcelular de *Ha*LPAATs y *Ha*DAGATs se determinó en base a los resultados obtenidos por los programas bioinformáticos de predicción ProtComp 9.0 y WoLF PSORT.

Todas estas predicciones coincidieron en señalar a las aciltransferasas estudiadas como proteínas integrales de membrana, formando parte del RE (Resultados, 1.2.3 y 2.2.3). Además, los altos porcentajes de hidrofobicidad e insolubilidad característicos de estas aciltransferasas (Discusión, 1.1), así como la presencia de dominios transmembranas (Discusión, 1.3.2) refutan aún más la localización de estas enzimas en dicho compartimento.

Por otro lado, al igual que la mayoría de las aciltransferasas microsomales previamente identificadas, *Ha*LPAATs y *Ha*DAGATs no presentan péptidos señales de tránsito al retículo endoplásmico (RE), si bien presentan otras secuencias relacionadas con este orgánulo.

*Ha*LPAATs presentan un primer dominio transmembrana localizado aproximadamente en la posición 4-27 de sus extremos N-terminal que pudieran ser considerados supuestas secuencias hidrofóbicas de anclaje de tipo II (Resultados, 1.2.3, Figura 28). Estas secuencias actuarían insertando a las enzimas de manera cotranslacional, y no post-translacional, a las membranas del RE

mediante un mecanismo dependiente de la partícula de reconocimiento de señal, SRP (McCartney *et al.*, 2004). Este mecanismo de inserción parece ocurrir también en los casos de FAD2 y FAD3, dos enzimas localizadas exclusivamente en el retículo endoplasmático, hecho refutado a través de análisis bioquímicos y estudios de inmunolocalización (Dyer y Mullen, 2001, 2008).

HaDAGATs no parecen poseer estas secuencias hidrofóbicas de anclaje, si bien se asume que son insertadas al RE también mediante este mecanismo dependiente de SRP. No obstante, se ha podido constatar la presencia de ciertas secuencias aminoacídicas conservadas en sus extremos. Por un lado, se observa la presencia del ya citado clúster de argininas altamente conservado (RRR) en los extremos N-terminal de *HaDAGAT1s*, posiblemente implicado no sólo en la localización subcelular de éstas en RE sino también en su retención en dicho compartimento (Michelsen *et al.*, 2005; Boulaflous *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012). Por otro lado, aparecen en sus extremos C-terminal secuencias que pudieran reconocerse como señal de retorno al RE (McCartney *et al.*, 2004): YYHDV(L/V)MN (VII) en el caso de *HaDAGAT1s* (Resultados, 2.2.3, Figura 39) y LQLRIM en el caso de *HaDAGAT2* (Resultados, 2.2.3, Figura 40), por homología con las encontradas en DGAT1 y DGAT2 de otras plantas (Kroon *et al.*, 2006; Shockey *et al.*, 2006). Estas secuencias de retorno no aparecen conservadas en DGATs de animales y hongos pese a localizarse también en el RE (Cao, 2011).

Bajo estos supuestos, *HaLPAATs* serían inicialmente dirigidas al retículo endoplasmático por inserción cotranslacional en las membranas del retículo, sin señales de retorno al RE en su extremo C-terminal que lo devuelvan a este orgánulo desde el aparato de Golgi. En cambio, *HaDAGATs* no presentarían inserción cotranslacional aparente pero sí señales de retorno al RE en su extremo C-terminal.

1.4.1 Localización en subdominios y relación con otros elementos

En general, existen numerosas evidencias que relacionan estas enzimas con la fracción microsomal, indicativo de su relación con membranas. La mayoría de estas evidencias se basan en el uso de este tipo de fracciones en ensayos de actividad *in vitro*. Igualmente, la inmunolocalización permite confirmar la asociación de estas enzimas al retículo endoplasmático, como así ocurriese en algunos casos de LPATs de plantas (Brown *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005) y DGATs (Browse and Somerville, 1991; Shockey *et al.*, 2006; Stone *et al.*, 2006; Hernández *et al.*, 2012).

En numerosos estudios, la localización subcelular de estas enzimas ha sido objeto de discrepancia en cuanto a si está asociada exclusivamente al retículo endoplasmático o si también lo está a cuerpos lipídicos u oleosomas (Hsieh y Huang, 2004; Lung y Weselake, 2006; Siloto *et al.*, 2006). Hoy día existen evidencias que establecen no sólo una asociación estrecha entre la biosíntesis de TAGs y la formación de cuerpos lipídicos (Murphy, 2001; Oelkers *et al.*, 2002; Sandager *et al.*, 2002; Czabany *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2009; Athenstaedt y Daum, 2011; Wilfling *et al.*, 2013; Klug y Daum, 2014; Koch *et al.*, 2014), sino también una localización espacio-temporal de estas enzimas en diferentes subdominios especializados en esta función dentro del RE (Dyer y Mullen, 2008). Este fenómeno de compartimentación es entendido como un mecanismo adicional más adoptado por las células vegetales para controlar la producción de aceite de entre todos los mecanismos descritos hasta la fecha que relacionan diferentes subdominios con distintas funciones bioquímicas dentro de este compartimento (Staehelein, 1997; Levine y Rabouille, 2005). Ejemplos de esta compartimentación los encontramos en LPATs de *Arabidopsis* (Kim *et al.*, 2005) y DGATs de *Vernicia fordii* (Shockey *et al.*, 2006). En este último caso, cabe destacar que VfDGAT1 se localiza en regiones distintas a VfDGAT2, lo que sugiere que estas dos enzimas producen diferentes pools de TAGs dentro del RE. Sin embargo, los mecanismos moleculares que conducen a esta compartimentación y asociación no se conocen con exactitud. De hecho, los motivos de retorno a RE presentes en VfDGATs son necesarios y suficientes para su permanencia en el RE, pero insuficientes para localizarlas en estos subdominios (McCartney *et al.*, 2004;

Shockey *et al.*, 2006), por lo que debe haber otras regiones en sus secuencias y/o mecanismos implicados para tal fin. El reclutamiento de otras proteínas adicionales tales como oleosinas pudiera aportar esa maquinaria adicional que permita la producción especializada de TAGs asociada a oleosomas. En relación a esto, se ha comprobado como la presencia de tres prolinas (P) conservadas en DGAT2 de ratón localizadas en la pequeña región flanqueada por los dos dominios transmembrana característicos de estas enzimas, así como la disposición de sus extremos N- y C-terminal hacia el lado citoplasmático del RE, están relacionados con la formación de cuerpos lipídicos mediada por estas proteínas (Stone *et al.*, 2009). En plantas, se ha verificado igualmente la asociación directa entre DGAT1 y DGAT2 de *Arabidopsis* y la formación de oleosomas (Bouvier-Nave *et al.*, 2000; Kwiatkowska *et al.*, 2012; Aymé *et al.*, 2014). Otro mecanismo por el cual estas enzimas se pudieran agrupar en regiones específicas del RE, además de ser un prerrequisito para llevar a cabo su actividad enzimática, sería su oligomerización homotópica. Ejemplos de esto lo encontramos en ratón (McFie *et al.*, 2010), humanos (Cheng *et al.*, 2001; Yen *et al.*, 2008) y *Brassica napus* (Wesealke *et al.*, 2006; Caldo *et al.*, 2015), cuyas DGAT1s pueden llegar a formar homodímeros y/o homotetrámeros. De este modo, la oligomerización de DGATs de plantas estaría también implicada en la regulación de sus actividades, como se demuestra en los experimentos llevados a cabo por McFie *et al.*, 2010 en DGAT1 de ratón. Por último, el reclutamiento de otras aciltransferasas pudiera contribuir a dicha compartimentación e incluso a la formación de heterooligómeros entre éstas, posibilidad que está siendo investigada en la actualidad. No obstante, la aparente incapacidad de interactuar entre DGAT1 y DGAT2 resultaría en sí mismo un mecanismo de segregación espacial de estas enzimas, favoreciendo así la producción de los diferentes pools de TAGs comentados anteriormente (Thaminy *et al.*, 2004).

Finalmente, mencionar que todos estos mecanismos que parecen ocurrir al mismo tiempo están relacionados con secuencias localizadas en el extremo N-terminal de estas enzimas, el cual fue propuesto no sólo como clave en la especificidad de sustrato, sino también en la propia conformación y/o regulación de sus actividades enzimáticas (Discusión, 1.3.1).

1.5 ESTUDIO COMPARATIVO DE MODELOS TOPOLÓGICOS DE *Ha*LPAATs Y *Ha*DAGATs

En este estudio, se han postulado una serie de modelos topológicos para *Ha*LPAATs y *Ha*DAGATs basados en la recopilación de los datos obtenidos en los apartados anteriores: presencia de motivos conservados y dominios transmembrana (TMDs), así como la localización subcelular de estas enzimas en el retículo endoplasmático.

En base a esto, los modelos topológicos propuestos para ambas *Ha*LPAATs presentarían al menos tres dominios transmembranas, lo que situaría los extremos N-terminal en el lado citosólico, mientras que prácticamente el resto de las enzimas se hallarían en el lumen del RE, incluyendo los extremos C-terminal. No obstante, como ya comentamos, otros programas de predicción de TMDs proponen un cuarto dominio transmembrana para las *Ha*LPAATs, localizado aproximadamente en la posición 46-73 con respecto al extremo N-terminal para *Ha*LPAAT1 y en la posición 45-71 para *Ha*LPAAT2. De esta manera, las cuatro regiones altamente conservadas (I-IV) con supuestas funciones catalíticas estarían expuestas hacia el citosol, al igual que los extremos N- y C-terminal (Figura 58). Estos modelos propuestos para *Ha*LPAATs coinciden en número de TMDs con los planteados para LPATs mitocondriales de humanos, ovejas y vacas (Mistry y Medrano, 2002; Yamashita *et al.*, 2007), así como con los propuestos para *At*LPAT2 y *At*LPAT3 de *A. thaliana* (Kim y Huang, 2004; Kim *et al.*, 2005), cacahuete (Chen *et al.*, 2012). Por el contrario, LPATs de *E. coli*, levaduras y *Brassica napus* contendrían al menos tres de estos dominios (Bourgis *et al.*, 1999; Pagac *et al.*, 2011), mientras que LPAT de coco tan sólo tendría dos (Knutzon *et al.*, 1995), al igual que LPAT3 de humanos (Schmidt *et al.*, 2010).

En el caso de los modelos propuestos para *Ha*DAGAT1s, éstos difieren básicamente en el número de dominios transmembrana, ocho para *Ha*DAGAT1A y nueve para *Ha*DAGAT1B. De esta manera, los extremos N-terminal estarían situados en el citosol, al igual que prácticamente el resto de las enzimas, con excepción del extremo C-terminal de *Ha*DAGAT1B, que se situaría hacia el lumen del RE; algunas de las siete regiones altamente conservadas (I-VII) aparecerían solapándose con algunos TMDs (Figura 58). Estos modelos propuestos para

HaDAGAT1s difieren sustancialmente de los propuestos para *DGAT1s* de *Vernicia fordii* (Shockey *et al.*, 2006) y de ratón (McFie *et al.*, 2010), si bien todos coinciden en situar el extremo N-terminal hacia el lado citosólico del RE, hecho probado experimentalmente en *DGAT1* de *Brassica napus* (Weselake *et al.*, 2006).

Por último, el modelo propuesto para *HaDAGAT2* presentaría dos dominios transmembrana situados en el extremo N-terminal, lo que situaría a ambos extremos en el lado citosólico del RE. De esta manera, las cuatro regiones altamente conservadas (I-IV) con supuestas funciones catalíticas estarían igualmente expuestas hacia el citosol (Figura 58). Este modelo propuesto para *HaDAGAT2* se asemeja al propuesto para *DGAT2* de *Vernicia fordii* (Shockey *et al.*, 2006). En el caso de *DGAT2* de ratón, aún no se ha determinado con exactitud si dicha enzima presenta dos dominios transmembrana estrechamente asociados o una sola región hidrofóbica embebida en la membrana del RE (Stone *et al.*, 2006), mientras que el modelo topológico propuesto para *DGAT2* de levaduras presentaría hasta cuatro TMDs (Liu *et al.*, 2011). No obstante, todos los anteriores modelos propuestos coinciden en situar ambos extremos de *DGAT2s* hacia el citosol.

En general, la incapacidad de purificar debidamente estas enzimas, hecho discutido al inicio de Discusión, 1.3, hace que las técnicas empleadas sean insuficientes para determinar con exactitud los modelos topológicos de estas enzimas integrales de membrana y, en definitiva, el entendimiento de su contexto metabólico.

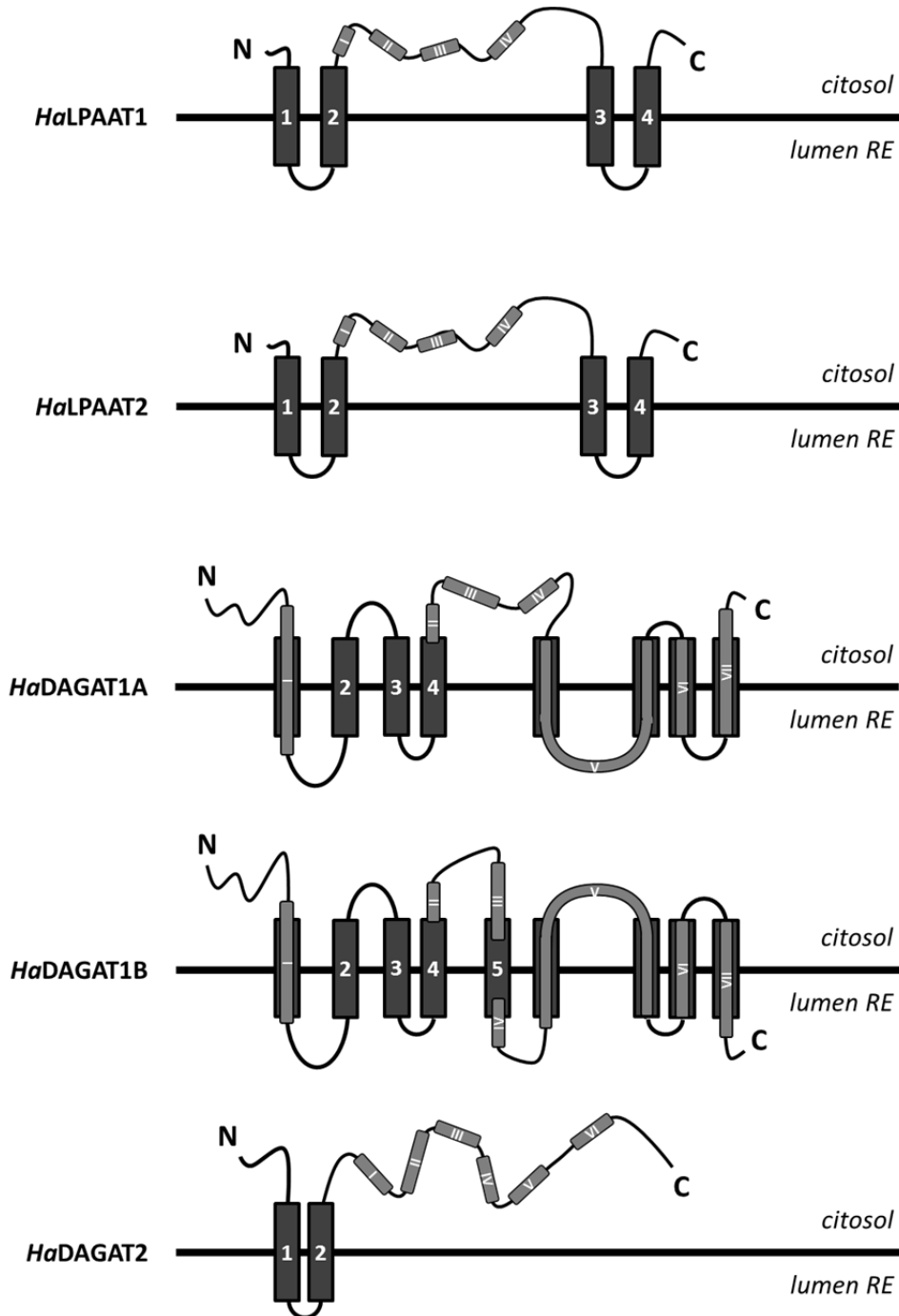


Figura 58. Modelos topológicos propuestos para las proteínas *HaLPAATs* y *HaDAGATs*. En ellos se incluyen los dominios transmembrana (TMDs) y regiones altamente conservadas correspondientes a cada enzima.

1.6 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE *HaLPAATs* Y *HaDAGATs*

En nuestro trabajo, el análisis de expresión de *HaLPAATs* y *HaDAGATs* en tejidos vegetativos y semillas en desarrollo de girasol permitió no sólo conocer el grado de ubicuidad de estas enzimas, sino también la posibilidad de correlacionar estos patrones de expresión con la regulación de sus actividades enzimáticas y la acumulación de aceite en este organismo.

En general, los resultados obtenidos mediante Q-PCR absoluta han puesto de manifiesto que todas las aciltransferasas estudiadas se expresan de forma ubicua en todos los tejidos testados, estableciéndose notables diferencias en los niveles de expresión alcanzados (Resultados, 1.3, Figura 30 y 2.3, Figura 43). En tejidos vegetativos, los niveles de expresión son mayores en los casos de *HaDAGAT2* y *HaLPAAT2*, seguidas de cerca por *HaLPAAT1*; por el contrario, *HaDAGAT1A* y *HaDAGAT1B* presentan niveles de expresión casi indetectables. En semillas en desarrollo todas las aciltransferasas muestran un patrón similar, en el que se alcanzan niveles de expresión máximos en los primeros estadios del desarrollo (12-15 DDF), seguido de un descenso drástico en los días sucesivos hasta alcanzar valores similares a los de tejidos vegetativos, con diferencias en la pendiente de caída para cada aciltransferasa. En este caso, *HaDAGAT2* presenta los mayores niveles de expresión, seguida de *HaLPAAT1* y *HaLPAAT2*, siendo de nuevo inapreciables los niveles de *HaDAGAT1A* y *HaDAGAT1B*.

Igualmente se aprecian diferencias en función del tejido analizado. En el caso de *HaLPAATs*, *HaLPAAT1* se expresa menos en tejidos fotosintéticos (hoja y tallo), allí donde la expresión de *HaLPAAT2* es mayor. *HaLPAAT2*, por su parte, se expresa más en hoja y raíz, si bien la expresión de *HaLPAAT1* en este último tejido es mayor. No obstante, la mayor diferencia entre estas enzimas se observa en semillas de 15 DDF, donde la expresión de *HaLPAAT1* es el doble que la de *HaLPAAT2* (Resultados, 1.3, Figura 30). En el caso de *HaDAGATs*, éstas presentan niveles de expresión más homogéneos que *HaLPAATs*, con la excepción de *HaDAGAT1A*. *HaDAGAT2* se expresa más en todos los tejidos vegetativos analizados, seguida de *HaDAGAT1B* y *HaDAGAT1A*, invirtiendo este último orden

en cotiledón. Finalmente, en semillas en desarrollo, aparece de nuevo el patrón de expresión observado en *HaLPAATs*, con mayores niveles de expresión nuevamente de *HaDAGAT2* (Resultados, 2.3, Figura 43).

Con respecto a los patrones de expresión LPATs y DGATs analizados en otras plantas cabe destacar que, en general, éstas vuelven a expresarse de forma ubicua, con diferencia en los niveles de expresión alcanzados.

1.6.1 LPATs

En *Arabidopsis thaliana*, *AtLPAT2* presenta un patrón de expresión semejante a los obtenidos para *HaLPAATs*, expresándose mayoritariamente en semillas en desarrollo (Kim *et al.*, 2005). *AtLPAT2* es, de las cinco isoformas de LPATs presentes en *Arabidopsis thaliana* (Kim y Huang, 2004; Kim *et al.*, 2005; Li-Beisson *et al.*, 2013), la isoforma de mayor expresión y la que presenta mayor homología con *HaLPAATs* (Resultados, 1.2.2, Figura 26). *AtLPAT3*, presente también en el análisis filogenético de *HaLPAATs*, muestra no obstante un patrón de expresión muy distinto a éstas, expresándose casi exclusivamente en anteras donde participa en la maduración del polen (Kim *et al.*, 2005). En ricino, existen numerosas LPATs que, al igual que *AtLPATs*, presentan distintos patrones de expresión (Arroyo-Caro *et al.*, 2013). *RcLPAT2*, la cual presenta mayor homología con *AtLPAT2* y *HaLPAATs* (Resultados, 1.2.2, Figura 26), se caracteriza por una expresión generalizada, con un mismo patrón en semillas en desarrollo (Troncoso-Ponce *et al.*, 2011; Arroyo-Caro *et al.*, 2013). Igualmente, se ha comprobado la presencia de dicho patrón de expresión a lo largo del desarrollo embrionario de las semillas de *Brassica napus*, *Euonymus alatus* y *Tropaeolum majus* (Maisonneuve *et al.*, 2010; Troncoso-Ponce *et al.*, 2011).

1.6.2 DGATs

El patrón de expresión de *AtDGAT1* se asemeja al de sus análogos *HaDAGAT1s*, en tanto que se expresan de manera ubicua en diferentes tejidos, con un ligero incremento en semillas en desarrollo (Zou *et al.*, 1999). Así mismo, *AtDGAT1* presenta un patrón de expresión característico durante el desarrollo de la semilla

que recuerda a los observados para *HaDAGAT1s* en semillas de girasol (Lu *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2010b). Por el contrario, los patrones de expresión de *AtDGAT2* y *HaDAGAT2*, de expresión ubicua ambos, se diferencian en semillas en desarrollo, donde *AtDGAT2* se expresa en menor proporción (Li *et al.*, 2010b). Por otro lado, los niveles de expresión de *AtDGAT1* y *AtDGAT2* en semillas en desarrollo se invierten con respecto a los niveles observados para *HaDAGAT1s* y *HaDAGAT2*, es decir, esta vez es *AtDGAT1* la que presenta mayores niveles de ARNm en comparación con *AtDGAT2* (Li *et al.*, 2010b). Esta misma inversión se hace patente al comparar los niveles de expresión de *DGAT1s* y *DGAT2s* de plantas que acumulan ácidos grasos inusuales, entre las que destacan *Brassica napus*, ricino, soja y *Vernonia galamensis* (Li *et al.*, 2010a y 2010b; Troncoso-Ponce *et al.*, 2011). No obstante, otros autores coinciden en señalar a *RcDGAT2* como la que presenta mayor acumulación de ARNm durante el desarrollo de la semilla de ricino, con incrementos de los niveles de expresión significativos en relación a otros tejidos analizados, mientras que *RcDGAT1* presenta pequeñas diferencias al respecto (He *et al.*, 2004a; Kroon *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Cagliari *et al.*, 2010; Troncoso-Ponce *et al.*, 2011). Este mismo patrón ha sido observado en *Vernicia fordii*, donde *VfDGAT1* se expresa a niveles similares en distintos tejidos mientras que *VfDGAT2*, de expresión igualmente ubicua, es fuertemente inducida en semillas en desarrollo (Shockey *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2013). Estos últimos datos están más en consonancia con lo que ocurre en el caso de *HaDAGATs*, donde *HaDAGAT2* se expresa más que las *HaDAGAT1s* en dicho tejido (Resultados, 2.3, Figura 43).

Así pues, los diferentes patrones de expresión de *DGAT1s* y *DGAT2s* en semillas en desarrollo podrían tener un papel en la determinación de la composición final de ácidos grasos del aceite de la semilla en la madurez.

1.6.3 Regulación de la expresión de *HaLPAATs* y *HaDAGATs* en semillas en desarrollo

Con todo esto, el patrón de expresión común seguido tanto por *HaLPAATs* como por *HaDAGATs* durante el desarrollo de la semilla de girasol apunta a una posible *regulación transcripcional* orientada a la biosíntesis de TAGs en este órgano, en la

que *HaDAGAT2* jugaría un papel principal. Este mismo patrón de expresión es observado igualmente en otras enzimas implicadas en la ruta de síntesis de AGs y/o modificación de éstos, tanto en girasol como en otras plantas oleaginosas (Troncoso-Ponce *et al.*, 2011). Así pues, esta regulación transcripcional se llevaría a cabo en tándem, englobando a todas las enzimas implicadas en el metabolismo lipídico en semillas de girasol.

Estos datos vienen apoyados por los numerosos estudios que correlacionan dichos patrones de expresión con sus correspondientes actividades enzimáticas y posterior acumulación de aceite en semillas de oleaginosas, la cual alcanza su tasa más elevada a partir de la tercera semana después de floración (Ichihara y Manjiro, 1980; Tzen *et al.*, 1993; Lehner y Kuksis, 1996; Triki *et al.*, 1997; Settlage *et al.*, 1998; Giannoulia *et al.*, 2000; Martínez-Force *et al.*, 2000; Jako *et al.*, 2001; Nykiforuk *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2003; Sorensen *et al.*, 2005; Kroon *et al.*, 2006; Shockey *et al.*, 2006; Weselake *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010a; Troncoso-Ponce *et al.*, 2011; Banaś *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2013; Fatihi *et al.*, 2013).

No obstante, existen estudios que han evidenciado la presencia de otros mecanismos de regulación a distinto nivel. Tal es el caso de *RcDGAT1*, cuyos niveles de proteína y actividad enzimática, lejos de reducirse, se prolongan en el tiempo coincidiendo con el patrón de biosíntesis de TAG, no llegándose a correlacionar con sus niveles de expresión (He *et al.*, 2004b; Chen *et al.*, 2007). Este hecho no se ha probado para el caso de *HaDAGAT1*, si bien se ha discutido la existencia de una posible regulación postraducional a través de mecanismos como la interacción con ACBPs y otras aciltransferasas, fosforilación y capacidad de oligomerización (Discusión, 1.3.1 y 1.4).

2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS ENZIMAS IMPLICADAS EN LA BIOSÍNTESIS DE TRIACILGLICÉRIDOS EN GIRASOL: *HaLPAATs* Y *HaDAGATs*

Las preferencias por sustrato de las aciltransferasa implicadas en la biosíntesis de TAGs son importantes a la hora de acumular ácidos grasos específicos en aceites (Snyder *et al.*, 2009).

A pesar de la importancia de estas enzimas, sus mecanismos de acción y reconocimiento de sustratos aún no han sido debidamente caracterizados. Esto se debe en gran parte a que, al ser proteínas integrales de membrana, su solubilización podría afectar a su estructura y actividad, imposibilitando su purificación y posterior cristalización (Cheng *et al.*, 2001; Weselake *et al.*, 2006). No obstante, ya ha producido en este mismo año la purificación de DGAT1 de *Brassica napus* (Caldo *et al.*, 2015), por lo que parece inminente la purificación y caracterización de otras tantas enzimas. Así pues, hasta ahora, los aspectos relacionados con la caracterización bioquímica de estas enzimas se ha fundamentado en estudios *in vivo* y/o *in vitro* expresadas heterológamente en diferentes organismos.

2.1 *HaLPAATs*

Para *HaLPAATs* se ha testado el efecto indirecto de su actividad en la formación de TAGs, aunque obviamente el producto de su reacción, DAG, puede emplearse en resto de rutas alternativas independientes de acil-CoA y también, por supuesto, en la biosíntesis de fosfolípidos, considerándose una molécula comodín para muchas rutas metabólicas. Concretamente, se ha estudiado la sobreexpresión en estirpe silvestre W303-1A de *S. cerevisiae* y complementariedad en línea KO 81 (*lpat2*) de *A. thaliana*.

2.1.1 Nivel cantidad

2.1.2 Nivel calidad

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 AGs saturados; los VLCFAs son generalmente excluidos de la posición central *sn*-2 (Frentzen, 1993; Voelker *et al.*, 1996). No obstante, en aquellas especies vegetales cuyos aceites poseen ciertas cantidades de AGs inusuales en la posición *sn*-2, existen LPAATs adicionales con preferencia por estos sustratos (Cao *et al.*, 1990; Laurent y Huang, 1992; Brown *et al.*, 1995; Frentzen, 1998).

Los estudios previos al aislamiento de LPAAT se habían concentrado en la purificación proteica y en los ensayos enzimáticos. Esto es mucho más difícil para enzimas unidas a membrana porque implica la solubilización, en la cual, la actividad enzimática puede ser perdida rápidamente, y la reconstitución en vesículas de membrana para ensayar biológicamente la actividad. Con la clonación por complementación, estos obstáculos fueron eliminados y la actividad pudo ser directamente ensayada en las membranas de *E. coli*, que contienen poca actividad endógena.

La LPAAT del endospermo inmaduro de coco (*Cocos nucifera*) fue purificada y tuvo como sustratos acilos de cadena media (Davies *et al.* 1995). Utilizando las secuencias parciales de aminoácidos de la proteína purificada, se obtuvieron los clones de cDNA respectivos (Knutzon *et al.* 1995). Por otro lado, los clones de cDNA de la LPAAT específica de 22:1-CoA de *L. douglasii* (Brown *et al.* 1995; Hanke *et al.* 1995) han sido aislados mediante complementación con el mutante de *E. coli*.

Los estudios enzimológicos iniciales consistieron en la determinación de la especificidad por sustrato de la LPAAT de microsomas de diferentes especies de plantas, usando diferentes combinaciones de donadores y de aceptores. En la mayoría de los cultivos tradicionales de semillas oleaginosas, como las semillas de colza, este enzima manifiesta especificidades por sustrato típicas de las LPAAT microsomales implicadas en la síntesis de lípidos de membrana: preferentemente dirige insaturados C₁₈ a la posición *sn*-2, y excluye a los ácidos grasos inusuales como 22:1 y 12:0 de esta posición (Frentzen, 1993; Voelker *et al.* 1996). Como consecuencia, debido a las propiedades de estas LPAAT, se previene la formación de triacilglicéridos con una composición homogénea de ácidos grasos como la trierucina o la trilaurina.

En contraste con la enzima de colza, las LPAATs microsomales expresadas específicamente en semillas de ciertas especies de plantas pueden incorporar de una manera efectiva grupos acilo inusuales en la posición *sn*-2 del TAG. Por lo tanto, los genes que codifican para LPAATs específicas de semillas parecen ser los apropiados para mejorar las aplicaciones industriales del aceite de semillas a partir de cultivos de semillas oleaginosas tradicionales por ingeniería genética. Por ello, varios grupos, utilizando diferentes estrategias y métodos, han hecho grandes esfuerzos para clonar la LPAAT.

Varios grupos han estado interesados en clonar la LPAAT de *Limnanthes sp.* con el propósito de transformarla en *B. napus*, alterando así la proporción de ácido erúxico en la posición *sn*-2 de la molécula de TAG e incrementando el rendimiento de ácido erúxico. Se han aislado dos cDNAs diferentes que codifican para LPAATs a partir de una librería de cDNA de *L. douglasii*, llamadas LAT1 (*Limnanthes aciltransferasa 1*) y LTA2 (Brown *et al.* 1995). El cDNA de LAT2 fue aislado de manera independiente por Hanke *et al.* (1995) y por Lassner *et al.* (1995). Este enzima es capaz de incorporar ácido erúxico en la posición *sn*-2 de LPA a alta velocidad. Brown *et al.*, 2002 caracterizaron estas dos LPATs. El cDNA aislado de coco (Knutzon *et al.* 1995) tuvo una fuerte homología con la secuencia de la LAT2.

2.2 HaDAGATs

Para HaDAGAT1s se ha testado su actividad directa en la formación de TAGs en el caso de expresión heteróloga en estirpe cuádruple mutante H1246 de *S. cerevisiae* y su efecto indirecto en la formación de TAGs en el caso de expresión funcional en línea mutante AS11 (*dgat1*) de *A. thaliana*, que no deja de tener DGAT2 funcional, por lo que sería complementariedad.

Para HaDAGAT2 se ha testado su actividad directa en la formación de TAGs en el caso de expresión heteróloga en estirpe cuádruple mutante H1246 de *S. cerevisiae* y su sobreexpresión en la formación de TAGs en el caso de expresión funcional en línea mutante AS11 (*dgat1*) de *A. thaliana*, que no deja de tener DGAT2 funcional a pesar de tener mutada DGAT1.

No se detecta actividad ensayada *in vitro* HaDAGAT2; posibles razones:

1. Al igual que ocurre con otras DGAT2s, no se puede detectar *in vitro* porque no se está expresando o no se está configurando bien la enzima activa. Esto puede ser debido a que la enzima necesite de otras proteínas para llevar a cabo su actividad, ACPs, por ejemplo. Sin embargo, HaDAGAT2 se expresa en H1246, curva de crecimiento cercana a WT, aumentan los TAGs y disminuyen los DAGs en relación a estirpe H1246 con y sin plásmido pYES2 vacío (controles) *in vivo*, lo cual nos lleva a una segunda hipótesis.
2. Realmente HaDAGAT2 está activa, pero no hemos ensayado con los sustratos pertinentes para los que HaDAGAT2 presenta actividad. DGAT2s de plantas pudieran desempeñar papel en incorporación de AGs inusuales en TAGs en aquellas plantas que acumulan este tipo de AGs en sus TAGs y que pudiera ser que girasol sea una de estas especies, acumulando linoleico, 50-70% del total. De hecho, algo así ocurre con VgDGAT2, muy relacionada filogenéticamente con *Helianthus annuus*, perteneciendo a misma familia Asteráceas.

3. La actividad DGAT2 se está desviando a cuerpos lipídicos, como ya ocurre con Dga1p: Dga1p activity in *S. cerevisiae* localizes to the ER and lipid droplets (Sorger y Daum, 2002).

HaDAGAT2 parece jugar papel importante en biosíntesis de TAGs en girasol, a raíz de lo observado al estudiar su expresión en semillas en desarrollo (RT-PCR, la que más). Sin embargo, y pese a tener una alta expresión y aumentar la tasa de crecimiento en *S. cerevisiae* (curva crecimiento, la que más por debajo de H1246-SC-ALL), no se han obtenido medidas de actividad alguna... Hay que tener en cuenta que su curva de pH no refleja ningún pH óptimo o que, al menos, el pH elegido para los ensayos de actividad no lo favorecían. Puede que también sea porque no tiene afinidad alguna por los sustratos administrados, dioleína y/o oleico/esteárico... Recordar que aceite de girasol no se caracteriza precisamente por esta especie de TAG y que su ácido graso más representativo es el linoleico... Igualmente es importante los resultados obtenidos a partir del análisis funcional de transgénicos *A. thaliana*.

En nuestro estudio, se ha comprobado que HaDAGATs tienen actividad en formación de TAGs a partir de DAGs y acil-CoAs como donador de acilos. Hay DGATs que son multifuncionales, más que nada en microorganismos y mamíferos, con actividad ACAT y MGAT.. Se descarta actividad MGAT al analizar los DAGs, que disminuyen cuando realizamos análisis *in vivo* y no aumentan como pudiera esperarse de una supuesta actividad MGAT. Se descarta también actividad ACAT pues no se observa síntesis de esteroides (SE) en placas de TLC.. La simple homología secuencial no es suficiente para sostener la funcionalidad real del producto de un gen (Kroon *et al.*, 2006).

2.2.1 Nivel cantidad

En la mayoría de las especies de plantas, DAGAT1 parece jugar un papel más importante en la acumulación de aceite de semillas (Li *et al.*, 2010a). En las plantas, la acumulación de ácidos grasos inusuales, DAGAT2 parece tener un papel más importante en la incorporación de estos ácidos grasos inusuales en TAG (Li *et al.*, 2010a).

Discusión

Como hemos comentado anteriormente, existe un consenso en cuanto al papel clave que tiene DGAT en la biosíntesis de TAG, especialmente en semillas. Sin embargo, no se conoce con exactitud el peso que uno u otro tipo de DGAT ejerce sobre dicha biosíntesis.

Hay datos que sostienen que, en mamíferos (ratas, ratones y humanos), el grueso de la biosíntesis de TAG, especialmente en los órganos especializados hígado y tejido adiposo, lo lleva a cabo DAGAT2 (Turkish *et al.*, 2005; Yen *et al.*, 2005). Más aún, ratones mutantes carentes de actividad DGAT1 se desarrollan con total normalidad y presentan niveles séricos de TAG completamente normales, mientras que ratones carentes de actividad DGAT2 mueren prematuramente (Turkish *et al.*, 2005).

En levadura, Dga1p, la proteína homóloga a DGAT2, es también la que contribuye en mayor medida a la biosíntesis de TAG en tanto que las proteínas Are1p y Are2p, homólogas a DAGAT1, son responsables de la biosíntesis de ésteres de esteroides, con una intervención leve en la biosíntesis de TAG (Oelkers *et al.*, 2002; Sandager *et al.*, 2002; Sorger y Daum, 2003; Turkish *et al.*, 2005; Wagner y Daum, 2005; Yen *et al.*, 2005).

En plantas la situación es algo distinta y menos clara. En *Arabidopsis* se ha observado que la mutación *dga1* (mutante AS11) produce una reducción significativa de TAGs en semillas y una alteración del perfil de ácidos grasos de los TAGs (Katavic *et al.*, 1995; Zou *et al.*, 1999; Routaboul *et al.*, 1999; Jako *et al.*, 2001; Mhaske *et al.*, 2005), acumulando sólo el 55-75% de TAGs en semillas con respecto a la línea silvestre (Katavic *et al.*, 1995; Routaboul *et al.*, 1999). No obstante, el hecho de que el mutante pueda sintetizar la mitad o más de su contenido normal de TAGs sugiere la existencia de otros mecanismos implicados en la biosíntesis de TAGs (Lu y Hills, 2002). Análogamente, en tabaco, el silenciamiento postranscripcional de *DAGAT1* provoca una reducción de TAGs en semillas y en otros tejidos (Zhang *et al.*, 2005). Por su parte, la sobreexpresión de *DGAT1* en *Arabidopsis* hizo que aumentase la deposición de aceite en semilla y, en consecuencia, su peso (Jako *et al.*, 2001). El patrón de expresión de *DGAT1* en *Arabidopsis* es relativamente ubicuo, pero con un máximo de actividad en

semillas en desarrollo, donde también es máxima la presencia de la proteína DGAT1 (Lu *et al.*, 2003). En concreto se estima que al menos el 50% de la biosíntesis de TAG en semillas es atribuible a DGAT1 (Katavic *et al.*, 1995; Routaboul *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2003). Finalmente, se ha observado que la abundancia de DGAT1 está correlacionada con la cantidad de TAG en semillas en desarrollo (Nykiforuk *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2003). Estudios de complementación génica de AtDGAT1 y AtDGAT2 en la estirpe mutante H1246 de *S. cerevisiae* reveló que AtDGAT1 fue capaz de restablecer la síntesis de TAGs mientras que AtDGAT2 no (Zhang *et al.*, 2009).

Por otra parte, en árbol de tung (*Vernicia fordii*), DGAT2 parece ser la responsable de la producción del aceite típico de *V. fordii* rico en ácido oleostearico (Shockey *et al.*, 2006). Sin embargo, curiosamente, *in vitro*, VfDGAT2 es menos activa que VfDGAT1 y, en levaduras transformadas, se observa que las cepas transformadas con VfDGAT1 produce más TAGs que las transformadas con VfDGAT2 (Shockey *et al.*, 2006).

En ricino, se han hecho estudios similares que sugieren como probablemente DGAT2 sea la contribuyente principal a la biosíntesis de TAG en semillas (Kroon *et al.*, 2006). Sin embargo, estudios de complementación génica de RcDGAT2 en la estirpe mutante H1246 de *S. cerevisiae* no fue capaz de restablecer la síntesis de TAGs, mientras que RcDGAT1 sí (Turchetto-Zolet *et al.*, 2011).

Tanto DAGAT1 y DAGAT2 se han sobreexpresado con éxito en cultivos con idea de aumentar el contenido de aceite de la semilla. El mutante de Arabidopsis AS11 tiene una mutación inducida por etil metanosulfonato (EMS), lo que produce la modificación en la composición de ácidos grasos y disminución de la actividad DGAT y contenido de TAG en el aceite de la semilla (Katavic *et al.*, 1995). En comparación con el tipo silvestre (WT) de Arabidopsis (ecotipo Columbia), el aceite de semilla de Arabidopsis AS11 ha reducido la cantidad de ácido eicosenoico (20:01 cis Δ 11) y ácido oleico, y el aumento de los niveles de α -linolénico (Katavic *et al.*, 1995). La sobreexpresión del cDNA de DAGAT1 de Arabidopsis en el mutante AS11 dio como resultado un aumento en el contenido de aceite de semillas y en el peso medio de la semilla (Jako *et al.*, 2001). B. napus,

expresando DAGAT1 de *Arabidopsis* WT o *Brassica napus* L. cv Jet Neuf, mostraron un aumento en el contenido de aceite de semilla cuando se prueba bajo invernadero o condiciones de campo (Taylor et al, 2009; Weselake et al, 2008). La expresión de DAGAT2 del hongo del suelo (*Umbelopsis ramanniana*) en la soja (*Glycine max*) resultó en un incremento del 1,5% (en peso) en el contenido de aceite de semillas y mayor formación cuerpos lipídicos en condiciones de campo (Lardizábal et al., 2008).

En la mayoría de las especies de plantas, DAGAT1 parece jugar un papel más importante en la acumulación de aceite de semillas (Li et al., 2010a). En las plantas, la acumulación de ácidos grasos inusuales, tales como hidroxí y epoxi ácidos grasos, DAGAT2 parece tener un papel más importante en la incorporación de estos ácidos grasos inusuales en TAG (Li et al., 2010a). Los diferentes patrones de expresión de DAGAT1 y DAGAT2 en las semillas en desarrollo también podrían tener un papel en la determinación de la composición final de ácidos grasos del aceite de la semilla en la madurez. Durante el desarrollo de semillas de árbol de tung, la expresión DAGAT1 se incrementó ligeramente, mientras que la expresión de DAGAT2 fue fuertemente inducida antes del inicio de la acumulación de TAG (Shockey et al., 2006). La expresión de DAGAT1 se corresponde con la biosíntesis de TAG en diversos tejidos, y DAGAT2 parece estar más directamente implicada en la síntesis de TAG en las semillas (Shockey et al., 2006). Es difícil, sin embargo, para extrapolar el papel regulador de DAGAT de unas especies de cultivo a otras. Por ejemplo, la actividad de DAGAT tiene una gran influencia en la formación de TAG en el olivo (*Olea europaea*) y *B. napus* (Weselake et al., 2008), pero la actividad DAGAT ejerce sólo un control menor sobre la formación de TAG en la palma (*Elaeis guineensis*) (Ramli et al., 2005). Por lo tanto, es necesaria una mejor comprensión de la expresión y la acción enzima DAGAT.

Así pues, DGAT es considerada la enzima clave en el control de la tasa de síntesis de TAGs en semillas al ser responsable del último paso de la biosíntesis de TAGs y no estar implicada en la de lípidos de membrana (Ichihara et al., 1988; Cahoon et al., 2007; Napier, 2007; Venegas-Calación et al., 2010). Es difícil, sin embargo, extrapolar el papel regulador de DAGAT de unas especies de cultivo a otras. Por

ejemplo, la actividad de DAGAT tiene una gran influencia en la formación de TAG en el olivo (*Olea europaea*) y *B. napus* (Weselake *et al.*, 2008), pero la actividad DAGAT ejerce sólo un control menor sobre la formación de TAG en la palma (*Elaeis guineensis*) (Ramli *et al.*, 2005). Por lo tanto, es necesaria una mejor comprensión de la expresión y la acción enzima DAGAT.

Así pues, 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, 2001; Shockey *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010).

En resumen, la importancia relativa de DAGAT1 vs. DAGAT2 en cuanto a la biosíntesis de TAG es todavía materia de debate (Lung y Weselake, 2006; Cahoon *et al.*, 2007). Las evidencias acumuladas transmiten una imagen mudable, en la que dependiendo del organismo, ya sea animal, planta, levadura, etc,.. es una u otra DAGAT la que lleva el peso de la biosíntesis de TAG. Actualmente se puede afirmar que DAGAT1 tiene un papel clave en plantas (Lung y Weselake, 2006), pero que, incluso dentro del reino vegetal, y a nivel de especie, la contribución de cada DAGAT puede variar considerablemente (Shockey *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007).

2.2.2 Nivel calidad

Como ya hemos discutido, DAGAT1 y DAGAT2, en conjunto, juegan un papel importante en la biosíntesis de TAGs, pero varían tanto en sus patrones de expresión como en las preferencias relativas de sustrato.

Las propiedades bioquímicas de DAGAT han sido ampliamente investigadas por complementación de estudios in vitro e in vivo. Los primeros estudios in vitro de especificidad y/o selectividad por el sustrato DAGAT no reconocen las diferencias entre DAGAT1 y DAGAT2. El descubrimiento de los genes que codifican estos dos polipéptidos DAGAT ha permitido un análisis más detallado de la biosíntesis de TAG. Ahora, la sobreexpresión de cDNAs DAGAT en organismos deficientes en

DAGAT endógeno y la biosíntesis de TAG ofrece una herramienta eficaz para caracterizar la especificidad y la selectividad por el sustrato de DAGATs.

Un análisis comparativo de las DAGAT1 y DAGAT2 de plantas se ha realizado en el tung árbol (*Vernicia fordii*), *Vernonia galamensis* y el ricino (*Ricinus communis*). Expresión de DAGATs del tung árbol (VfDAGATs) en células de levadura, seguida de ensayo de las enzimas in vitro, reveló que VfDAGAT1 y VfDAGAT2 mostraban sólo pequeñas diferencias en la preferencia de sustrato, y VfDAGAT2 tenían menores niveles de actividad que VfDAGAT1 (Shockey *et al.*, 2006). Sin embargo, en vivo, VfDAGAT2 mostraron cinco veces mayor actividad para la incorporación de ácido α -eleosteárico en TAG que VfDAGAT1 (Shockey *et al.*, 2006). Del mismo modo, la expresión específica de VgDAGAT1 y VgDAGAT2 en semillas de soja mostraron que VgDAGAT2 era más selectivo que VgDAGAT1 para sustratos con ácido vernólico (12,13-epoxi, ácido 9-cis-octadecenoico), un ácido graso inusual que contiene un enlace epoxy (Li *et al.*, 2010b). Por otra parte, DAGAT2 del ricino (RcDAGAT2) también se encontró que prefiere ácidos grasos inusuales como el ácido ricinoleico (Burgal *et al.*, 2008; Kroon *et al.*, 2006). En general, estos estudios señalaron la preferencia de DAGAT2 para catalizar la producción de especies de TAG con una composición de ácidos grasos más bien definida.

La sobreexpresión de DAGATs que codifican enzimas con las preferencias específicas de los sustratos puede aumentar el contenido de ácidos grasos inusuales en las plantas transgénicas. Burgal *et al.* (2008) observó que DAGAT2 del ricino (*Ricinus communis*), designado RcDAGAT2, prefiere acil-CoA y DAG que contiene ácido ricinoleico (12-hidroxi-9-cis-octadecenoico ácido). La coexpresión de la hidroxilasa de ácidos grasos de ricino (RcFAH) y DAGAT2 dio lugar a un aumento del 30% en ácido ricinoleico, nivel que fue dos veces más que la expresión de RcFAH solo (Burgal *et al.*, 2008). Por otra parte, el cDNA que codifica tung árbol (*Vernicia fordii*) DAGAT2 (VfDAGAT2) fue clonado y sobreexpresado en células de levadura, y mostró alta preferencia para la síntesis de TAG que contiene ácido eleosteárico (18:03 cis Δ 9, trans Δ 11, trans Δ 13) (Shockey *et al.*, 2006). Estos estudios demostraron la importancia de la actividad DAGAT en afectar a la composición de ácidos grasos, además de la acumulación de TAG.

En cuanto a la especificidad por sustrato, DAGAT1 posee un amplio rango de afinidad por distintos AGs, jugando un papel principal en la biosíntesis de TAGs durante el desarrollo de la semilla (Lung y Weselake, 2006; Liu *et al.*, 2012), mientras que DAGAT2, relegada en ocasiones a un segundo plano, parece tener un papel clave en la incorporación de AGs inusuales a TAGs en aquellas plantas que los acumulan (Kroon *et al.*, 2006; Shockey *et al.*, 2006; Burgal *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008; Yen *et al.*, 2008; Cagliari *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012).

Generalmente, se ha descrito la actividad DAGAT como de amplia especificidad por sustrato (Frentzen, 1998), refiriéndose al acilo incorporado, sin hacer hincapié en el otro sustrato implicado en la reacción, DAG, la molécula receptora del acilo.

Respecto al acilo, los datos mostrados hasta el momento son muy diferentes, a veces dependiendo de la especie. En azafrán, la composición *sn*-3 depende exclusivamente de la disponibilidad de acil-CoAs (Ichihara *et al.*, 1988); algo similar sucede en el caso del cacahuete. Sin embargo, en espinaca, ricino y maíz, sí existe una preferencia específica: los dos primeros prefieren 16:0-CoA, en tanto que el maíz es el 18:0-CoA el preferido (Ichihara *et al.*, 1988). En un estudio posterior, la DAGAT de ricino exhibe preferencia por el ácido ricinoleico, 18:1-OH (Vogel y Browse, 1996). Por su parte, la DAGAT de *Arabidopsis* tiene preferencia por 20:1-CoA (Katavic *et al.*, 1995) y la de *Garcinia indica* por el 18:0-CoA (Daniel *et al.*, 2003). Trabajos recientes con *Vernonia galamensis* y *Stokesia laevis*, dos especies caracterizadas por acumular ácido vernólico, demuestran que DAGAT tiene preferencia por el vernoloil-CoA (Yu *et al.*, 2006).

Los trabajos centrados en la especificidad por DAG, a su vez, ponen de manifiesto una preferencia de sustrato en función de la especie (Miége y Marechal, 1999). En azafrán y *Cuphea lanceolata*, DAGAT prefiere especies de DAG del tipo 10:0/10:0, mientras que en ricino es 18:1-OH/18:1-OH la especie preferida (Vogel y Browse, 1996; He *et al.*, 2004a). En *V. galamensis* y *S. laevis*, DAGAT prefiere DAG acilado con ácido vernólico (Yu *et al.*, 2006).

BLOQUE II: ANÁLISIS DE TRIACILGLICÉRIDOS (TAGs) EN LÍNEAS MUTAGENIZADAS DE GIRASOL ALTO OLEICO ALTO ESTEÁRICO (HOHE) Y SELECCIÓN DE NUEVOS CANDIDATOS

El procedimiento normal de selección, autofecundación y selección de las semillas con los caracteres deseados no fue suficiente para fijar ningún carácter en esta línea. Las generaciones que daban las plantas seleccionadas eran semillas con contenidos altos y bajos, algunas veces sólo con valores por debajo de los criterios de selección. Aún así, se ha conseguido aumentar los contenidos de algunos de los parámetros a estudio, por lo que se continuará con dicho procedimiento en lo sucesivo.

CONCLUSIONES | 289-294

1. A partir de semillas en desarrollo de girasol se han clonado y secuenciado dos isoformas diferentes para la lisofosfatidato aciltransferasa microsomal: *HaLPAAT1* y *HaLPAAT2*. Ambas isoformas se caracterizan por presentar un alto grado de identidad aminoacídica, predominando cambios y/o sustituciones conservativas y semiconservativas localizados en regiones no relevantes para la actividad catalítica de estas enzimas.
2. El análisis filogenético realizado determinó que *HaLPAAT1* y *HaLPAAT2*, junto al resto de LPATs analizadas, poseen un origen común. Así mismo, los alineamientos aminoacídicos llevados a cabo demostraron que las dos isoformas *HaLPAATs* pertenecen a una misma familia de lisofosfolípido aciltransferasas (LPLATs) del tipo LCLAT1.
3. El estudio comparativo de motivos conservados y residuos aminoacídicos, así como el de dominios transmembrana, posibilitaron un mayor entendimiento de la estructura, funcionalidad y regulación de las *HaLPAATs*, para las que se ha propuesto un modelo topológico similar. De este modo, ambas isoformas se localizarían en el retículo endoplásmico, presentando hasta cuatro dominios transmembrana, lo que situaría sus extremos N y C-terminal y las regiones catalíticas expuestas hacia el citosol.
4. *HaLPAAT1* y *HaLPAAT2* mostraron un patrón similar de expresión génica. Ambos genes se expresaron de forma ubicua en todos los tejidos estudiados, si bien presentaron un pico máximo de expresión característico en los primeros estadios del desarrollo de la semilla, en torno a los 15 DDF, coincidiendo con la síntesis activa de lípidos de reserva en girasol. En general, los niveles de expresión de *HaLPAAT1* fueron más altos que los de *HaLPAAT2*, doblando dicha expresión a los 15 DDF en semilla.
5. La expresión heteróloga de *HaLPAAT1* y *HaLPAAT2* en la estirpe silvestre W303-1A de *S. cerevisiae* no sólo alteró las tasas de crecimiento y generación de los cultivos, sino que además modificó el contenido y composición de TAGs de la levadura, demostrando la producción de proteínas activas en dicho hospedador.

Conclusiones

6. El expresión heteróloga de *HaLPAAT1* y *HaLPAAT2* en la línea KO N504681 (*lpat2*) de *A. thaliana* no supuso diferencias significativas en la morfología de las semillas, si bien se vieron modificados el contenido y composición de TAGs de éstas, demostrando nuevamente la producción de proteínas activas en esta planta.
7. A partir de semillas en desarrollo de girasol se han clonado y secuenciado dos isoformas diferentes para la diacilglicerol aciltransferasa 1 microsomal: *HaDAGAT1A* y *HaDAGAT1B*, caracterizadas por presentar un alto grado de identidad aminoacídica entre ambas. Del mismo modo, se ha clonado y secuenciado la diacilglicerol aciltransferasa 2 microsomal: *HaDAGAT2*, la cual difiere considerablemente en tamaño y peso molecular con respecto a las otras.
8. El análisis filogenético realizado estableció una clara distinción entre *HaDAGAT1s* y *HaDAGAT2*. Así mismo, los alineamientos aminoacídicos llevados a cabo demostraron que las dos isoformas *HaDAGAT1s* pertenecen a una misma familia de aciltransferasas unidas a membranas (MBOAT), mientras que *HaDAGAT2* pertenece a una familia de lisofosfolípido aciltransferasas (LPLATs) del tipo MGAT. Estudios recientes han determinado que la divergencia de sus genes aconteció pronto en la evolución de eucariotas, siendo un claro ejemplo de convergencia funcional.
9. El estudio comparativo de motivos conservados y residuos aminoacídicos, así como el de dominios transmembrana, posibilitaron un mayor entendimiento de la estructura, funcionalidad y regulación de las *HaDAGATs*, para las que se han propuesto distintos modelos topológicos. De este modo, *HaDAGAT1A* presentaría ocho dominios transmembrana, lo que situaría sus extremos N y C-terminal expuestas hacia el citosol, mientras que *HaDAGAT1B* presentaría hasta nueve dominios transmembrana, situando su extremo C-terminal hacia el lumen; en ambos casos, las regiones catalíticas estarían solapándose con dichos dominios transmembrana. *HaDAGAT2*, por su parte, presentaría tan sólo dos dominios transmembrana, lo que situaría sus extremos N y C-

terminal y las regiones catalíticas expuestas hacia el citosol. Todas ellas se localizarían en el retículo endoplásmico.

10. *HaDAGAT1A*, *HaDAGAT1B* y *HaDAGAT2* mostraron patrones de expresión génica diferentes. Los tres genes se expresaron de forma ubicua en todos los tejidos estudiados, si bien los niveles de expresión de *HaDAGAT2* fueron los más altos, seguidos de forma general por *HaDAGAT1B* y *HaDAGAT1A*. No obstante, todos ellos presentaron un pico máximo de expresión característico en los primeros estadios del desarrollo de la semilla, en torno a los 15 DDF, coincidiendo con la síntesis activa de lípidos de reserva en girasol.
11. La expresión heteróloga de *HaDAGATs* en la estirpe cuádruple mutante H1246 de *S. cerevisiae* no sólo alteró las tasas de crecimiento y generación de los cultivos, sino que además modificó el contenido y composición de TAGs de la levadura, demostrando la producción de proteínas activas en dicho hospedador. En este apartado destacaron los resultados obtenidos de *HaDAGAT2*.
12. La caracterización bioquímica *in vitro* de *HaDAGATs* en la estirpe cuádruple mutante H1246 de *S. cerevisiae* permitió establecer el pH óptimo y perfil de especificidad por sustrato para cada enzima. Así, las *HaDAGAT1s* presentaron un pH óptimo en torno a 7,0, si bien *HaDAGAT1A* mostró mayor afinidad por oleil-CoA que por estearoil-CoA y *HaDAGAT1B* un mismo patrón de especificidad por ambos sustratos. Por otro lado, *HaDAGAT2* presentó un pH óptimo ensayado en torno a 6,5, no mostrando actividad alguna con los sustratos ensayados.
13. El expresión heteróloga de *HaDAGAT1A*, *HaDAGAT1B* y *HaDAGAT2* en la línea KO N3861 (*AS11*) de *A. thaliana* supuso un incremento del volumen de las semillas. Así mismo, se vieron modificados el contenido y composición de TAGs de éstas, demostrando nuevamente la producción de proteínas activas en esta planta. En el caso de *HaDAGAT1B*, se pudo demostrar su expresión génica en dicha línea mutante, pero no fue posible realizar el análisis lipídico correspondiente.

Conclusiones

14. En general, los resultados obtenidos del análisis de las distintas poblaciones de semillas provenientes de la línea segregante alto oleico alto esteárico (HOHE) de girasol a lo largo de cuatro generaciones sugieren que el método de selección ha sido efectivo para mejorar los parámetros relativos al contenido en esteárico (E), EOE y SUS, con incrementos considerables sobre todo en el primero de ellos. La falta de respuesta observada en relación al parámetro valor α Sat fue contraria a las estimaciones que se hicieron inicialmente, lo que sugiere la conveniencia de incorporar y considerar nuevos parámetros al estudio.

15. El análisis bidimensional mediante matrices de dispersión y el análisis de componentes principales llevados a cabo entre las variables estudiadas permitieron determinar la existencia de relaciones entre éstas. Así, existe una alta correlación entre las variables contenido de esteárico (E) y EOE, una menor correlación entre estas variable y el contenido SUS y la falta de correlación entre todas ellas y el valor α Sat.

BIBLIOGRAFÍA | 295-326

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.

Alba A. y Llanos M. (1990) El cultivo del girasol. Colección agroguías mundi-prensa. 158.

Álvarez-Ortega R., Cantisan S., Martínez-Force E. y Garcés, R. (1997) Characterization of polar and nonpolar seed lipid classes from highly saturated fatty acid mutants. *Lipids* 32, 833-837.

Anadón A., Martínez-Larrañaga M.R., Martínez M.A., Ares I., Ramos E., Gómez-Cortés P., Juárez M. y De la Fuente M.A. (2010) Acute oral safety study of dairy fat rich in trans-10 C18:1 versus vaccenic plus conjugated linoleic acid in rats. *Food and Chemical Toxicology* 48, 591-598.

AOCS Lipid Library - <http://lipidlibrary.aocs.org/>

Arroyo-Caro J.M., Chileh T., Kazachkov M., Zou J., Alonso D.L. y García-Maroto F. (2013) The multigene family of lysophosphatidate acyltransferase (LPAT)-related enzymes in *Ricinus communis*: cloning and molecular characterization of two LPAT genes that are expressed in castor seeds. *Plant Science* 199-200, 29-40.

Athenstaedt K. y Daum G. (2006) The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63, 1355-1369

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

Badui S. *Química de los Alimentos*. Pearson Education. México (2006) 245-300.

Banas 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.

Bibliografía

- Banilas G., Karampelias M., Makariti I., Kourti A. y Hatzopoulos P. (2011) The olive DGAT2 gene is developmentally regulated and shares overlapping but distinct expression patterns with DGAT1. *Journal of Experimental Botany* 62, 521-532.
- Bao X. y Ohlrogge J. (1999) Supply of fatty acid is one limiting factor in the accumulation of triacylglycerol in developing embryos. *Plant Physiology* 120, 1057-1062.
- Bates P. D., Fatihi A., Snapp A. R., Carlsson A. S., Browse J. y Lu C. (2012). Acyl editing and headgroup exchange are the major mechanisms that direct polyunsaturated fatty acid flux into triacylglycerols. *Plant Physiology* 160, 1530-1539.
- Bates P. D., Ohlrogge J. B. y Pollard M. (2007) Incorporation of newly synthesized fatty acids into cytosolic glycerolipids in pea leaves occurs via acyl editing. *Journal of Biological Chemistry* 82, 31206-31216.
- Bates P. D., Stymne S. y Ohlrogge, J. (2013) Biochemical pathways in seed oil synthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 16, 358–364.
- Bates P. D., y Browse J. (2012) The Significance of Different Diacylglycerol Synthesis Pathways on Plant Oil Composition and Bioengineering. *Frontiers in Plant Science* 3, 1–11.
- 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.
- Bau H. M., Mohtadi Nia D. J., Mejean L. y Debry G. (1983) Preparation of Colorless Sunflower Protein Products: Effect of Processing on Physicochemical and Nutritional Properties. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 60, 1141–1148.
- Baud S. y Lepiniec L. (2010) Physiological and developmental regulation of seed oil production. *Progress in Lipid Research* 49: 235–249.
- Bonanome A. y Grundy S.M. (1988). Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. *The New England Journal of Medicine* 318, 1244-1248.

- Bouvier-Nave P., Benveniste P., Oelkers P., Sturley S. L. y Schaller H. (2000) Expression in yeast and tobacco of plant cDNAs encoding acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase. *European Journal of Biochemistry* 267, 85-96
- Bracco U. (1994) Effect of triglyceride structure on fat absorption. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 60, 1002S-1009S.
- Brockhoff 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. y 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 oilseed rape. *Molecular Breeding* 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., Carnaby S., Brough C., Brazier M. y Slabas A.R. (2002) *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., Coleman J., Tommey A.M., Watson M.D. y Slabas A.R. (1994) Isolation and characterization of a maize cDNA that complements a 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase mutant of *Escherichia coli* and encodes a protein which has similarities to other acyltransferases. *Plant Molecular Biology* 26, 211-223.
- Brown A.P., Slabas A.R. y Denton H. (2002) Substrate selectivity of plant and microbial lysophosphatidic acid acyltransferases. *Phytochemistry* 61, 493-501.
- Browse J., Sychalla J., Okuley J. y Lightner J. (1998) Altering the fatty acid composition of vegetable oils. In: Harwood J.L., ed. *Plant lipid biosynthesis. Fundamentals and agricultural applications*. Cambridge: Cambridge University Press, 131-153.

Bibliografía

- Burdge G.C. y Calder P.C. (2005) α -Linoleic acid metabolism in adult humans: the effects of gender and age on conversion to longer-chain polyunsaturated fatty acids. *European Journal of Lipid Science and Technology* 107, 426–439.
- 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 Biotechnology Journal* 6, 819–831.
- Cahoon E.B., Ripp K.G., Hall S.E., y McGonigle B. (2002) Transgenic production of epoxy fatty acids by expression of a cytochrome P450 enzyme from *Euphorbia lagascae* seed. *Plant Physiology* 128, 615-624.
- 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.
- Campbell E.J. (1983) Sunflower oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 60, 387.
- Cantisán S., Martínez-Force E. y Garcés R. (2000) Enzymatic studies of high stearic acid sunflower seed mutants. *Plant Physiology and Biochemistry* 38, 377-382.
- 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.
- Cao J., Lockwood J., Burn P. y Shi Y. (2003) Cloning and functional characterization of a mouse intestinal acyl-CoA:monoacylglycerol acyltransferase, MGAT2. *Journal of Biological Chemistry* 278, 13860–13866.
- 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.
- Cases S., Smith S. J., Zheng Y. W., Myers H. M., Lear S. R., Sande E., Novak S., Collins C., Welch C. B., Lusi 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.

Cases S., Stone S.J., Zhou P., Yen E., Tow B., Lardizabal K.D., Voelker T. y Farese R.V. (2001) Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. *Journal of Biological Chemistry* 276, 38870-38876.

Chapman G.W.J. (1980) A conversion factor to determine phospholipid content in soybean and sunflower crude oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 59, 299-302.

Chapman K. D. y J. Ohlrogge (2011) TAG accumulation in plants. *Journal of Biological Chemistry* In press.

Chapman K.D., Ohlrogge J.B. (2012) Compartmentation of triacylglycerol accumulation in plants. *Journal of Biological Chemistry* 287, 2288-2294.

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.

Chardigny J.M., Destailats L., Malpuech-Brugère C., Moulin J., Bauman D.E., Lock A.L., Barbano D.M., Mensink R.P., Bezelgues J.B., Chaumont P., Combe N., Cristiani I., Joffre F., German J.B., Dionisi F., Boirie Y. y Sèbédio Y.L. (2008). Do trans fatty acids from industrially produced sources and from natural sources have the same effect on cardiovascular disease risk factors in healthy subjects? Results from the trans fatty acids collaboration (TRANSFACT) study. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 87, 558-566.

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

Chen S.L., Huang J.Q., Lei Y., Zhang Y.T., Ren X.P., Chen Y.N., Jiang H.F., Yan L.Y., Li Y.R. y Liao B.S. (2012) Identification and characterization of a gene encoding a putative lysophosphatidyl acyltransferase from *Arachis hypogaea*. *Journal of Biosciences* 37, 1029-39.

Bibliografía

- Cheng D., Nelson T.C., Chen J., Walker S.G., Wardwell-Swanson J., Meegalla R., Taub R., Billheimer J.T., Ramaker M. y Feder J.N. (2003) Identification of acyl coenzyme A: Monoacylglycerol acyltransferase 3, an intestinal specific enzyme implicated in dietary fat absorption. *Journal of Biological Chemistry* 278, 13611-13614.
- Cheng J.B. y Russell D.W. (2004) Mammalian wax biosynthesis-I. Identification of two fatty acyl-coenzyme A reductases with different substrate specificities and tissue distributions. *Journal of Biological Chemistry* 279, 37789-37797.
- Chi X., Hu R., Zhang X., Chen M., Chen N., Pan L., Wang T., Wang M., Yang Z. y Wang Q. (2014) Cloning and Functional Analysis of Three Diacylglycerol Acyltransferase Genes from Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *PLoS ONE* 9: e105834.
- Coleman J. (1992) Characterization of the *Escherichia coli* gene for 1-acyl-sn-glycerol 3-phosphate acyltransferase (plsC). *Molecular & General Genetics* 232, 295-303.
- Dahlqvist A., Stahl U., Lenman M., Banas A., Lee M., Sandager L., Ronne H. y Stymne S. (2000) Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 6487-6492.
- Damiani P., Cossignani L., Simonetti M., Santinelli F. y Monotti M. (1997) Stereospecific analysis of triacylglycerols from vegetable oils by two procedures—II: Normal and high-oleic sunflower oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74, 927-933.
- Das S., Castillo C. y Stevens T. (2001) Phospholipid remodeling/generation in *Giardia*: the role of the Lands cycle. *Trends in Parasitology* 17, 316-319.
- Dijkstra A.J. (2007) Modification processes and food uses. 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. 263-353.
- Dörmann P. (2005) Membrane lipids. IN Murphy, D.J. (Ed.). *Plants Lipids- Biology, Utilisation and Manipulation*. Blackwell Publishing, pp. 123-161

- Dubinsky E. y Garcés R. (2011) Aceite de girasol alto esteárico alto oleico. Asociación Argentina de Grasas y Aceites 84, 426-431.
- Dubois V., Bretonb S., Lindera M., Fannia J. y Parmentiera M. (2007) Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109, 710-732.
- Durrett T.P., Benning C. y Ohlrogge J. (2008) Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels. *The Plant Journal* 54, 593-607.
- Dyer J.M. y Mullen R. T. (2005) Development and potential of genetically engineered oilseeds. *Seed Science Research*, 15, 255-267.
- Dyer J.M., Stymne S., Green A.G., Carlsson A.S. (2008) High-value oils from plants. *The Plant Journal* 54, 640-55.
- Ebrahimi A., Maury P., Berger M., Poormohammad-Kiani S., Nabipour A., Shariati F. y Sarrafi A. (2008) QTL mapping of seed-quality traits in sunflower recombinant inbred lines under different water regimes. *Genome* 51, 599–615.
- EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies), 2010c. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA Journal* 2010; 8(3):1461, 107 pp. ¿Autores?
- Fahy E., Cotter D., Sud M. y Subramaniam S. (2011) Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et Biophysica Acta* 1811, 637–647.
- Fahy E., Subramaniam S., Brown H. A., Glass C., Merrill A. H., Murphy R., Raetz C., Russell D. W., Seyama Y., Shaw W., Shimizu T., Spener F., van Meer G., van Nieuwenhze M. S., White S. H., Witztum J. L. y Dennis E. A. (2005) A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research* 46, 839-861.
- Fahy E., Subramaniam S., Murphy R., Nishijima M., Raetz C., Shimizu T., Spener F., van Meer G., Wakelam M. y Dennis E.A. (2009) Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research* 50, S9-S14.

Bibliografía

FAOSTAT, 2015 - <http://faostat3.fao.org>

Fatemi S.H. y Hammond E.F. (1977) Glyceride structure variation in soybean varieties: II silver ion chromatographic analysis. *Lipids* 12, 1037–1041.

Fernández-Martínez J., Jimenez A., Dominguez J., Magarcia J., Garces R. y Mancho M. (1989) Genetic analysis of the high oleic acid content in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica* 41, 39-51.

Fernández-Martínez J., Rio M. y Haro A. (1993) Survey of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) germplasm for variants in fatty acid composition and other seed characters. *Euphytica* 19, 115-122.

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

Fernández-Moya V., Martínez-Force E. y Garcés R. (2000) Metabolism of Triacylglycerol Species during Seed Germination in Fatty Acid Sunflower (*Helianthus annuus*) Mutants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 770-774.

Fernández-Moya V., Martínez-Force E. y Garcés R. (2000a) Identification of triacylglycerol species from high-saturated sunflower (*Helianthus annuus*) mutants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 764-769.

Fernández-Moya V., Martínez-Force E. y Garcés R. (2002) Temperature effect on a high stearic acid sunflower mutant. *Phytochemistry* 59, 33–38.

Fernández-Moya V., Martínez-Force E. y Garcés R. (2005) Oils from improved high stearic acid sunflower seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 5326-30.

Fick G.N. (1984) Inheritance of high oleic acid in the seed oil of sunflower. In Proceedings of Sunflower Research Workshop, Bismarck, N. Dak., 1 February 1984. National Sunflower Association, Bismarck, N. Dak. p. 9.

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. (1998). Acyltransferases from basic science to modified seed oils. *Fett-Lipid* 100, 161–166.
- 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
- Friedt W. (1992) Present status and future prospects of biotechnology in sunflower breeding. *Field Crops Research* 30, 425-442.
- Garcés R. y Mancha M. (1989) Oleate desaturation in seeds of two genotypes of sunflower. *Phytochemistry* 28, 2593-2595.
- Garcés R. y Mancha M. (1991) In vitro oleate desaturase in developing sunflower seeds. *Phytochemistry* 30, 2127-2130.
- Garcés R., García J.M. y Mancha M. (1989) Lipid characterization in seeds of a high oleic acid mutant. *Phytochemistry* 30, 2127–2130.
- Garcés R., Martínez-Force E., Salas J.J. y Venegas-Calderón M. (2009) Current advances in sunflower oil and its applications. *Lipid Technology* 21, 79-82.
- García-Díaz M.T., Martínez-Rivas J.M. y Mancha M. (2002) Temperature and oxygen regulation of oleate desaturation in developing sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *Physiologia Plantarum* 114, 13–20.
- Gebauer S.K., Psota T.L. y Kris-Etherton P.M. (2007) The diversity of health effects of individual trans fatty acid isomers. *Lipids* 42, 787-799.
- Ghosal A., Banas A., Stahl U., Dahlqvist A., Lindqvist Y. y Stymne S. (2007) *Saccharomyces cerevisiae* phospholipid:diacylglycerol acyl transferase (PDAT) devoid of its membrane anchor region is a soluble and active enzyme retaining its substrate specificities. *Biochimica et Biophysica Acta* 1771, 1457–1463
- Ghosh A.K., Chauhan N., Rajakumari S., Daum G. y Rajasekharan R. (2009) At4g24160, a soluble acyl-Coenzyme A-dependent lysophosphatidic acid acyltransferase. *Plant Physiology* 151, 869-881.

Bibliografía

- Gidda S.K., Shockey J.M., Rothstein S.J., Dyer J.M. y Mullen R.T. (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 Physiology and Biochemistry* 47, 867-879.
- González-Mellado D., von Wettstein-Knowles P., Garcés R. y Martínez-Force E. (2010) The role of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III in the condensation steps of fatty acid biosynthesis in sunflower. *Planta*. 231, 1277-89.
- Graham I.A., Larson T. y Napier J.A. (2007) Rational metabolic engineering of transgenic plants for biosynthesis of omega-3 polyunsaturates. *Current Opinion in Biotechnology* 18, 142–147.
- Grompone M.A. (2011) Sunflower oil. En: *Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses 2ª Edición* (Gunstone, F.D., ed.), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, pps: 137-167.
- Grundy S.M. (1994) Influence of stearic acid on cholesterol metabolism relative to other long-chain fatty acids. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 60, 986S-990S.
- Guihéneuf F., Leu S., Zarka A., Khozin-Goldberg I., Khalilov I. y Boussiba S. (2011) Cloning and molecular characterization of a novel acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 1-like gene (PtDGAT1) from the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *FEBS Journal* 278, 3651-3666.
- Gunstone F.D. (2001) Why are structured lipids and new lipid sources required? In *Structured and Modified Lipids* (Gunstone, F.D., ed). Marcel Dekker, Inc. pps: 1-9.
- 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.
- Hammond E.G. y Fehr W.R. (1984) Improving the fatty acid composition of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 11, 1713-1716.
- Harp T.K. y Hammond E.G. (1998) Stereospecific analysis of soybean triacylglycerols. *Lipids* 33, 209-216.

- Harwood J.L. (1979) The synthesis of acyl lipids in plant tissues. *Progress in Lipid Research* 18, 55-86.
- 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. (2005) Fatty acid biosynthesis. *Plant lipids: biology utilisation and manipulation*. Murphy D.J. Blackwell, Oxford, Reino Unido.
- 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.
- 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.
- Hazebroek J.P. (2000) Analysis of genetically modified oils. *Progress in Lipid Research* 39, 477-506.
- He X.H., Chen G.Q., Lin J.T. y McKeon T.A. (2004) Regulation of diacylglycerol acyltransferase in developing seeds of castor. *Lipids* 39, 865-871.
- Heiser C.B. Jr. (1965) Species crosses in *Helianthus*. III. Delimitation of sections. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 52, 364-370.
- Hernández M.L., Whitehead L., He Z.S., Gazda V., Gilday A., Kozhevnikova E., Vaistij F.E., Larson T.R., y Graham I.A. (2012) A Cytosolic Acyltransferase Contributes to Triacylglycerol Synthesis in Sucrose-Rescued Arabidopsis Seed Oil Catabolism Mutants. *Plant Physiology* 160, 215-225.

Bibliografía

- Hiramine Y., Tanabe T. (2011) Characterization of acyl-coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase (DGAT) enzyme of human small intestine. *Journal of Physiology and Biochemistry* 67, 259-264.
- 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.
- Hobbs D. H., Lu C. y Hills M. J. (1999) Cloning of a cDNA encoding diacylglycerol acyltransferase from *Arabidopsis thaliana* and its functional expression. *FEBS Letters* 452, 145-149.
- Hofmann K. (2000) A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for Wnt signaling. *Trends in Biochemical Sciences* 25, 111-112.
- Hongtrakul V., Slabaugh M.B. y Knapp S. (1998) A seed specific $\Delta 12$ oleate desaturase gene is duplicated, rearranged, and weakly expressed in high oleic acid sunflower lines. *Crop Science* 38, 1245-1249.
- Horrobin D.F. (1990) Gamma linolenic acid: an intermediate in essential fatty acid metabolism with potential as an ethical pharmaceutical and as a food. *Reviews in Contemporary Pharmacotherapy* 1, 1-45.
- Hsieh K. y Huang A.H.C. (2004) Endoplasmic reticulum, oleosins, and oils in seeds and tapetum cells. *Plant Physiology* 136, 3427-3434.
- Hu K., Li Y. y Huang A.H. (2005) Ubiquitous and endoplasmic reticulum-located lysophosphatidyl acyltransferase, LPAT2, is essential for female but not male gametophyte development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 17, 1073-1089.
- Hunter J.E. (2001) Studies on effects of dietary fatty acids as related to their position on triglycerides. *Lipids* 36, 655-668.
- 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

- Ilaiyaraja N., Rajarani A.P., Santha I.M. (2008) Cloning and characterization of diacylglycerol acyltransferase (DGAT) cDNA sequence from *Brassica juncea* cv Pusa Bold. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 45, 30-36.
- Jackson R.C. y Murray B.G. (1983) Colchicine induced quadrivalent formation in *Helianthus*: evidence of ancient polyploidy. *Theoretical and Applied Genetics* 64, 219-222.
- Jain R. K., Coffey M., Lai K., Kumar A. y MacKenzie S. L. (2000) Enhancement of seed oil content by expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase genes. *Biochemical Society Transactions* 28, 958-961.
- 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.
- Jakobsen M.U., Overvad K., Dyerberg J. y Heitmann B.L. (2008) Intake of ruminant trans fatty acids and risk of coronary heart disease. *International Journal of Epidemiology* 37, 173-182.
- Jaworski J. y Cahoon E.B. (2003) Industrial oils from transgenic plants. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 178–184.
- 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.
- Kabbaj A., Vervoort V., Abbott A.G., Tersac M. y Bervillé A. (1996) Polymorphism in *Helianthus* and expression of stearate, oleate and linoleate desaturase genes in sunflower with normal and high-oleic contents. *Helia* 19, 1–18
- Kalscheuer R. y Steinbüchel A. (2003) A novel bifunctional wax ester synthase/acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase mediates wax ester and triacylglycerol biosynthesis in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1. *Journal of Biological Chemistry* 278, 8075-82.

Bibliografía

- Katavic V., Reed D.W., Taylor D.C., Giblin E.M., Barton D.L., Zou J., 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 Physiology* 108, 399–409.
- Kelly F.D., Sinclair A.J., Mann N.J., Turner A.H., Abedin L. y Li D. (2001) A stearic acid-rich diet improves thrombogenic and atherogenic risk factor profiles in healthy males. *European Journal of Clinical Nutrition* 55, 88-96.
- Kennedy E.P. (1961) Biosynthesis of complex lipids. *Federation of American Societies for Experimental Biology* 20, 934-940.
- Khor G.L. y Esa N.M. (2008) Trans fatty acids intake: epidemiology and health implications. En *Trans Fatty Acids* (Dijkstra, A.J., Hamilton, R.J. y Hamm, W., eds) Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pps: 25-45.
- Khosla P. y Sundram K. (1996) Effects of dietary fatty acid composition on plasma cholesterol. *Progress in Lipid Research* 35, 93-132.
- Kinney A.J. (1996) Development of genetically engineered soybean oils for food applications. *Journal of Food Lipids* 3, 273-292.
- Kinney A.J. (1998) Plants as industrial chemical factories - new oils from genetically engineered soybeans. *Fett-Lipid* 100, 173-179.
- Kinney A.J. y Clemente T.E. (2005) Modifying soybean oil for enhanced performance in biodiesel blends. *Fuel Processing Technology* 86, 1137- 1147.
- Kleingartner L.W. (2002) NuSun sunflower oil: Redirection of an industry. In: Janick J, Whipkey A, eds. *Trends in New Crops and New Uses*. Alexandria, VA: ASHS Press; 2002:135-138.
- Knauf V.C. y Del Vecchio A.J. (2008) Genetic engineering of crops that produce vegetable oil. En *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, 3ª Edición (Akoh, C.C. y Min, B.D., eds) Taylor & Francis Group (CRC Press), Boca Raton, pps: 873-898.

- Knutzon D. y Knauf V. (1998) Manipulating seed oils for polyunsaturated fatty acid content, in *Plant Lipid Biosynthesis. Fundamentals and agricultural applications.* (Harwood, J.L., ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pps: 27-304.
- Knutzon D.S., Hayes T.R., Wyrick A., Xiong H., Maelor-Davies H. y 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 Physiology* 120, 739-746.
- 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.
- Köhler R.H., Horn R., Lössl A. y Zetsche K. (1991) Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the co-transcription of a new open reading frame with the atpA gene. *Molecular Genetics and Genomics* 227, 369-376.
- 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.
- Kummerow FA. (2009) The negative effects of hydrogenated trans fats and what to do about them. *Atherosclerosis*, 205, 458-465.
- Lacombe S. y Bervillé A. (2001) A dominant mutation for high oleic acid content of sunflower (*Helianthus annuus* L.) oil is genetically linked to a single oleate-desaturase RFLP locus. *Molecular Breeding* 8, 129-137.
- Lacombe S., Kaan F., Léger S. y Bervillé A. (2001) An oleate-desaturase and a suppressor loci direct high oleic acid content of sunflower (*Helianthus annuus* L.) oil in the

Bibliografía

- Pervenets mutant. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III* 324, 839-845.
- 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.
- Lacombe S., Kaan F., Griveau Y. y Bervillé A. (2004) The pervenets high oleic mutation: Methodological studies. *Helia*, 27, 41-53.
- Lardizabal K., Effertz R., Levering C., Mai J., Pedroso M.C., Jury T., Aasen E., Gruys K. y Bennett K. (2008) Expression of *Umbelopsis ramanniana* DGAT2A in seed increases oil in soybean. *Plant Physiology* 148, 89-96.
- Lardizabal K.D., Mai J.T., Wagner N.W., Wyrick A., Voeller T. y Hawkins D.J. (2001) DGAT2 is a new diacylglycerol acyltransferase gene family. *Journal of Biological Chemistry* 276, 38862-38869
- Lardizabal K.D., Thompson G.A. y Hawkins D. (2006). Diacylglycerol acyl transferase proteins. Official Gazette of the United States Patent and Trademark Office Patents. Edición: Office TUSPat. USA
- 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.
- 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.
- Li R., Yu K. y 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 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.
- Liu Q., Siloto R.M., Lehner R., Stone S.J. y Weselake R.J. (2012) Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase: molecular biology, biochemistry and biotechnology. *Progress in Lipid Research* 51, 350-377.
- Liu Q., Singh S. y Green A. (2002) 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.
- Lock Y.-Y., Snyder C.L., Zhu W., Siloto R.M.P., Weselake R.J. y Shah S. (2009) Antisense suppression of type 1 diacylglycerol acyltransferase adversely affects plant development in *Brassica napus*. *Physiologia Plantarum* 2009, 136.
- Lockwood J.F., Cao J.S., Burn P. y Shi Y.G. (2003) Human intestinal monoacylglycerol acyltransferase: differential features in tissue expression and activity. *The American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 285, E927-E937.
- Lu C., Xin Z., Ren Z., Miquel M. y Browse J. (2009) A new enzyme regulating triacylglycerol composition is encoded by the *ROD1* gene of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 18837-18842.

Bibliografía

- Luddy F.E., Barford R.A., Herb S.F., Magidman P. y Riemenschneider R.W. (1964) Pancreatic lipase hydrolysis of triglycerides by a semimicro technique. *Journal Of The American Oil Chemists Society* 41, 693–696.
- Lung S.C. y Weselake R.J. (2006) Diacylglycerol acyltransferase: a key mediator of plant triacylglycerol synthesis. *Lipids* 41, 1073–1088.
- Maisonneuve S., Bessoule J.J., Lessire R., Delseny M. y Roscoe T.J. (2010) Expression of Rapeseed Microsomal Lysophosphatidic Acid Acyltransferase Isozymes Enhances Seed Oil Content in Arabidopsis. *Plant Physiology* 152, 670–684.
- Martínez-Force E., Cantisán S., Serrano-Vega M. J. y Garcés R. (2000) Acyl-acyl carrier protein thioesterase activity from sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *Planta* 211, 673–678.
- Martínez-Force E., Ruiz-López N. y Garcés R. (2009) Influence of specific fatty acids on the asymmetric distribution of saturated fatty acids in sunflower (*helianthus annuus* l.) triacylglycerols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 1595–1599.
- Martínez-Force E., Ruiz-López N., y Garcés R. (2004) The determination of the asymmetrical stereochemical distribution of fatty acids in triacylglycerols. *Analytical Biochemistry* 334, 175-182.
- Martínez-Force E., y Garcés R. (1999) New oilseed varieties with modified fatty acid composition in the oil. *Trends in Agronomy* 2, 13–21.
- Martínez-Rivas J.M., García-Díaz M.T. y Mancha M. (2000) Temperature and oxygen regulation of microsomal oleate desaturase (FAD2) from sunflower. *Biochemical Society Transactions* 28, 890-892.
- Martínez-Rivas J.M., Sperling P., Lühs W. y Heinz E. (1998) Isolation of three different microsomal oleate desaturase cDNA clones from sunflower. Expression studies in normal type and high-oleic mutant. In: Sánchez J, Cerdá-Olmedo E, Martínez-Force E (eds) *Advances in plant lipid research*. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla, Seville, Spain, pp 137–139

- Martínez-Rivas J.M., Sperling P., Lühs W., y Heinz E. (2001) Spatial and temporal regulation of three different microsomal oleate desaturase genes (FAD2) from normal type and high-oleic varieties of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Molecular Breeding* 8, 159-168.
- Mensink R.P. (2005) Effect of stearic acid on plasma lipid and lipoproteins in humans. *Lipids* 40, 1201- 1205.
- Mensink R.P., Zock P.L., Kester A.D. y Katan M.B. (2003) Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: A meta-analysis of 60 controlled trials. *American Journal Clinical Nutrition* 77, 1146-1155.
- Milcamps A., Tumaney A.W., Paddock T., Pan D.A., Ohlogge J. y Pollard M. (2005) Isolation of a gene encoding a 1,2-diacylglycerol-sn-acetyl-CoA acetyltransferase from developing seeds of *Euonymus alatus*. *Journal of Biological Chemistry* 280, 5370-5377.
- 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.
- Mozaffarian D., Aro A. y Willett W.C. (2009) Health effects of trans-fatty acids: experimental and observational evidence. *European Journal Clinical Nutrition* 63, S5-S21.
- Mozaffarian D., Katan M.B., Ascherio A., Stampfer M.J. y Willett W.C. (2006) Trans fatty acids and cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine* 354, 1601-1613.
- Murphy D.J. (1993) Structure, function and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants. *Journal of Biological Chemistry* 32, 247-280.

Bibliografía

- Napier J.A. (2007) The production of unusual fatty acids in transgenic plants. *The Annual Review of Plant Biology* 58, 295-319.
- Napier J.A. y Graham I.A. (2010) Tailoring plant lipid composition: designer oilseeds come of age. *Current Opinion in Plant Biology* 13, 330–337.
- Nikolau B.J., Ohlrogge J.B. y Wurtele E.S. (2003) Plant biotin-containing carboxylases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 414, 211-222.
- Nykiforuk C.L., Furukawa-Stoffer T.L., Huff P.W., Sarna M., Laroche A., Moloney M.M. y Weselake R.J. (2002) Characterization of cDNAs encoding diacylglycerol acyltransferase from cultures of *Brassica napus* and sucrose-mediated induction of enzyme biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1580, 95-109.
- Oakes J., Brackenridge D., Colletti R., Daley M., Hawkins D.J., Xiong H., Mai J., Screen S.E., Val D., Lardizabal K., Gruys K. y Deikman J. (2011) Expression of fungal diacylglycerol acyltransferase2 genes to increase kernel oil in maize. *Plant Physiology* 155, 1146-1157.
- Ohlrogge J. y Browse J. (1995) Lipid biosynthesis. *Plant Cell* 7, 957–970.
- Ohlrogge J. y Jaworski J.G. (1997) Regulation of fatty acid synthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 109–136.
- OMS (2003). Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. Informe de una Consulta Mixta de Expertos OMS/FAO Serie de Informes Técnicos 916, 1-152.
- Osorio J., Fernandez-Martinez J., Mancha M. y Garcés R. (1995) Mutant sunflowers with high concentration of saturated fatty acids in the oil. *Crop Science* 35, 739-742.
- 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
- Patterson H.B.W. (1994) *Hydrogenation of Fats and Oils: Theory and Practice*. The American Oil Chemists' Society Press. USA.

- Pérez-Vich B., Fernández-Martínez J.M., Grondona M., Knapp S.J. y Berry S.T. (2002) Stearoyl-ACP and oleoyl-PC desaturase genes cosegregate with quantitative trait loci underlying high stearic and high oleic acid mutant phenotypes in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 104, 338–349.
- Pérez-Vich B., Garcés R. y Fernández-Martínez J.M. (1999) Genetic control of high stearic acid content in the seed oil of the sunflower mutant CAS-3. *Theoretical and Applied Genetics* 99, 663.
- Pérez-Vich B., Garcés R. y Fernández-Martínez J.M. (2000) Genetic relationships between loci controlling the high stearic and the high oleic acid traits in sunflower. *Crop Science* 40, 990–995.
- Pérez-Vich B., Knapp S.J., Leon A.J., Fernández-Martínez J.M., y Berry S.T. (2004) Mapping minor QTL for increased stearic acid content in sunflower seed oil. *Molecular Breeding* 13, 313–322.
- 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.
- Pérez-Vich B., Muñoz-Ruz J., Fernández-Martínez J. M. (2004) Developing midstearic acid sunflower lines from a high stearic acid mutant. *Crop Science* 44, 70-75.
- Pfeuffer M. y Schrezenmeir J. (2006) Impact of trans fatty acids of ruminant origin compared with those from partially hydrogenated vegetable oils on CHD risk. *International Dairy Journal* 16, 1383-1388.
- Pleite R, Martínez-Force E. y Garcés R. (2006) Increase of the stearic acid content in high-oleic sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *Journal of agricultural and food chemistry* 54, 9383-9388.
- Pleite R., Martínez-Force E. y Garcés R. (2006) Inhibitors of fatty acid biosynthesis in sunflower seeds. *Journal of Plant Physiology* 163, 885-894.

Bibliografía

- Rahman S.M., Takagi Y., Miyamoto K. y Kawakita T. (1995) High stearic soybean mutant induced by X-ray irradiation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 59, 922-923.
- Ramírez M., Amatea L. y Gil A. (2001) Absorption and distribution of dietary fatty acids from different sources. *Early Human Development*, 65, S95-S101.
- Rani S.H., Saha S. y Rajasekharan R. (2013) A soluble diacylglycerol acyltransferase is involved in triacylglycerol biosynthesis in the oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis*. *Microbiology* 159, 155-166.
- Reske J., Siebrecht J. y Hazebroed J. (1997) Triacylglycerol composition and structure in genetically modified sunflowers and soybean oils. *Journal Of The American Oil Chemists Society* 74, 989-998.
- Rieseberg L.H., Baird S.J.E. y Gardner K.A. (2000) Hybridization, introgression, and linkage evolution. *Plant Molecular Biology* 42, 205-224.
- Röbbelen G., Downey R.K. y Ashri A. (Eds.).1989. *Oil Crops Of the World*. McGraw-Hill Publishing Company. USA. 553 p.
- Rodríguez Rivera V. M. y Simón Magro E. (2008) *Bases de la alimentación humana*. Ed: Netbiblo, La Coruña, España.
- 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.
- Rogalski M. y Carrer H. (2011) Engineering plastid fatty acid biosynthesis to improve food quality and biofuel production in higher plants. *Plant Biotechnology Journal* 9, 554-564.
- Routaboul J.M., Benning C., Bechtold N., Caboche M. y Lepiniec L. (1999) The TAG1 locus of *Arabidopsis* encodes for a diacylglycerol acyltransferase. *Plant Physiology Biochemistry* 37, 831-840.
- Rowland *et al.*, 1990 (no Found)

- Ruiz-López N., Martínez-Force E. y Garcés R. (2003) Sequential one-step extraction and analysis of triacylglycerols and fatty acids in plant tissues. *Analytical Biochemistry* 317, 247-254.
- 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.
- Salas J.J., Martínez-Force E. y Garcés R. (2006) Phospholipid molecular profiles in the seed kernel from different sunflower (*Helianthus annuus*) mutants. *Lipids* 41, 805-811.
- Sandager L., Gustavsson M. H., Stahl U., Dahlqvist A., Wiberg E., Banas A., Lenman M., Ronne H. y Stymne S. (2002) Storage lipid synthesis is non-essential in yeast. *Journal of Biological Chemistry* 277, 6478-6482.
- Santinelli F., Damiani P. y Christie W.W. (1992) The triacylglycerol structure of olive oil determined by silver ion highperformance liquid chromatography in combination with stereospecific analysis. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 69, 552-556.
- Santori G., Di Nicola G., Moglie M. y Polonara F. (2012) A review analyzing the industrial biodiesel production practice starting from vegetable oil refining. *Applied Energy* 92, 109-132.
- Sasaki Y. y Nagano Y. (2004) Plant acetyl-CoA carboxylase: structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 68, 1175-1184.
- Schuchardt U., Sercheli R. y Matheus-Vargas R. (1998) Transesterification of Vegetable Oils: a Review. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 9, 199-210.
- Schuppert G.F., Tang S., Slabaugh M.B. y Knapp S.J. (2006) The Sunflower High-oleic Mutant Ol Carries Variable Tandem Repeats of FAD2-1, a Seed-specific Oleoyl-phosphatidyl Choline Desaturase. *Molecular Breeding* 17, 241-256.

Bibliografía

- Settlage S.B., Kwanyuen P. y Wilson R.F. (1998) Relation between diacylglycerol acyltransferase activity and oil concentration in soybean. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75, 775-781.
- Sharma M., Gupta S.K. y Mondal A.K. (2012) Production and Trade of Major World Oil Crops. En: *Technological Innovations in Major World Oil Crops, Volume 1*, 1-15. Ed: Gupta, S.K. Springer New York.
- 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
- Siloto R.M., Findlay K., Lopez-Villalobos A., Yeung E.C., Nykiforuk C.L. y Moloney M.M. (2006) The accumulation of oleosins determines the size of seed oilbodies in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 1961-1974.
- Slabas A.R., Hanley Z., Schierer T., Rice D., Turnbull A., Rafferty J., Simon B. y Brown A.P. (2001) Acyltransferases and their role in the biosynthesis of lipids – opportunities for new oils. *Journal of Plant Physiology* 158, 505–513.
- Small D. M. (1991) The effects of glyceride structure on absorption and metabolism. *Annual Review of Nutrition* 11, 413-434.
- Smith C.R.J. (1970) Occurrence of unusual fatty acids in plants. *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids* 11, 139-177.
- Snyder C.L., Yurchenko O.P., Siloto R.M., Chen X., Liu Q., Mietkiewska E. y Weselake R.J. (2009) Acyltransferase action in the modification of seed oil biosynthesis. *New Biotechnology* 26, 11-16.
- Soldatov K.I. (1976) Chemical mutagenesis in sunflower breeding. *Proceedings of the Seventh International Sunflower Association*, pp. 352-357, Vlaardingen, The Netherlands.
- Sperling P., Hammer U., Friedt W. y Heinz E. (1990) High oleic sunflower studies on composition and desaturation of acyl groups in different lipids and

- organs. *Zeitschrift Für Naturforschung Section C Journal Of Biosciences* 45, 166-172.
- Stahl U., Carlsson A. S., Lenman M., Dahlqvist A., Huang B., Banas W., Banas A. y Stymne S. (2004) Cloning and functional characterization of a phospholipid:diacylglycerol acyltransferase from Arabidopsis. *Plant Physiology* 135, 1324-1335.
- Steijns J.M. (2008) Dairy products and health: Focus on their constituents or on the matrix? *International Dairy Journal* 18, 425-435.
- Stender S. y Dyerberg J. (2004) Influence of trans fatty acids on health. *Annals of Nutrition and Metabolism* 48, 61-66.
- Stobart K., Mancha M., Lenman M., Dahlqvist A. y Stymne S. (1997) Triacylglycerols are synthesised and utilized by transacylation reactions in microsomal preparations of developing safflower (*Carthamus tinctorius* L) seeds. *Planta* 203, 58-66.
- Stymne S. y Appelqvist L.A. (1978) The biosynthesis of linoleate from oleoyl-CoA via oleoyl-phosphatidylcholine in microsomes of developing safflower seeds. *European Journal of Biochemistry* 90, 223–229.
- 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. *Biochemical Journal* 223, 305–314.
- Stymne S. y Stobart A.K. (1987) Triacylglycerol biosynthesis. In PK Stumpf, ed, *The Biochemistry of Plants, Vol 9*. Academic Press, Orlando, FL, pp 175-214
- Sun L., Ouyang C., Kou S.L., Wang S.H., Yao Y.Y., Peng T., Xu Y., Tang L. y Chen F. (2011) Cloning and Characterization of a cDNA Encoding Type 1 Diacylglycerol Acyltransferase from Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Zeitschrift für Naturforschung C* 66, 63-72.
- Takagi T. y Ando Y. (1991) Stereospecific analysis of triacylglycerols by chiral-phase HPLC direct derivatization of partially hydrolyzed products. *Journal of the Japanese Oil Chemists' Society* 40, 288-292.

Bibliografía

- Takagi T. y Ando Y. (1995) Stereospecific analysis of monounsaturated triacylglycerols in cocoa butter. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 72, 1203-1206.
- Tarrago-Trani M.T., Phillips K.M., Lemar L., y Holden J.M. (2006) New and existing oils and fats used in products with reduced trans fatty acid content. *Journal of the American Dietetic Association* 106, 867-880.
- Taylor D.C., Katavic V., Zou J.-T., MacKenzie S.L., Keller W.A., An J., Friesen W., Barton D.L., Pedersen K.K., Giblin E.M., Ge Y., Dauk M., Sonntag C., Luciw T. y Males D. (2001) Field-testing of transgenic rapeseed cv.Hero transformed with a yeast sn-2 acyltransferase results in increased oil content, erucic acid content and seed yield. *Molecular Breeding* 8, 317-22.
- Taylor D.C., Smith M.A., Fobert Y.P. / E Mietkiewska and RJ Weselake (2011). 4.06 Metabolic Engineering of Higher Plants to Produce Bio-Industrial Oil. En: *Comprehensive Biotechnology*, 2nd Edition. Moo-Young, M. Editorial: Jason Mitchell, Sera Relton, Esmond Collins, Will Smaldon, Kate Miklaszewska, Joanna Collett Production: Edward Taylor, Maggie Johnson. Elsevier. Radarweg 29, PO Box 211, 1000 AE Amsterdam, The Netherlands / The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford OX5 1GB, UK / 225 Wyman Street, Waltham, MA 02451, USA, pp: 67-85.
- Taylor DC, Zhang Y, Kumar A, Francis T, Giblin EM, Barton DL, *et al.* Molecular modification of triacylglycerol accumulation by over-expression of DGAT1 to produce canola with increased seed oil content under field conditions. *Botany* 2009;87: 533-43.
- Thele, J.J. y Ohlrogge J.B. (2002) Metabolic Engineering of Fatty Acids Biosynthesis in Plants. *Metabolic Engineering* 4, 12-21.
- Thijssen M.A. y Mensink R.P. (2005) Small differences in the effects of stearic acid, oleic acid, and linoleic acid on the serum lipoprotein profile of humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 82, 510-516.
- Töpfer R., Martini N. y Schell J. (1995) Modification of Plant Lipid Synthesis. *Science* 268, 681-686.

- Turkish A. R., Henneberry A. L., Cromley D., Padamsee M., Oelkers P., Bazzi H., Christiano A. M., Billheimer J. T. y Sturley S. L. (2005) Identification of two novel human acyl-CoA wax alcohol acyltransferases: Members of the diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) gene superfamily. *Journal of Biological Chemistry* 280, 14755–14764.
- Urie A.L. (1984) Inheritance of very high oleic acid content in sunflower. In *Proceedings of Sunflower Research Workshop*, Bismarck, N. Dak., 1 February 1984. National Sunflower Association, Bismarck, N. Dak. pp. 8–9.
- van der Wal R. J. (1960) Calculation of the distribution of the saturated and unsaturated acyl groups in fats, from pancreatic lipase hydrolysis data. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 37, 18-20.
- 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.
- Venegas-Calderón 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.
- Vigeolas H., Waldeck P., Zank T. y Geigenberger P. (2007) Increasing seed oil content in oil-seed rape (*Brassica napus* L.) by over-expression of a yeast glycerol-3-phosphate dehydrogenase under the control of a seed-specific promoter. *Plant Biotechnology Journal* 5, 431–441.
- Voelker T. y Kinney A.J. (2001) Variations in the biosynthesis of seed storage lipids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52, 335–361.
- 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
- Vogel G. y Browse J. (1996) Cholinephosphotransferase and diacylglycerol acyltransferase. *Plant Physiology* 110, 923–931.

Bibliografía

- Vrânceanu A.V. (1977) El girasol; traducción de A. Guerrero. Mundi Prensa, Madrid, pp. 181-213 y 219-237.
- Wagner A. y Daum G. (2005) Formation and mobilization of neutral lipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Society Transactions* 33, 1174-1177.
- Wagner M., Hoppe K., Czabany T., Heilmann M., Daum G., Feussner I. y Fulda M. (2010) Identification and characterization of an acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) gene from the microalga *O. tauri*. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 407-416.
- Wang H.W., Zhang J.S., Gai J.Y. y Chen S.Y. (2006) Cloning and comparative analysis of the gene encoding diacylglycerol acyltransferase from wild type and cultivated soybean. *Theoretical and Applied Genetics* 112, 1086-1097.
- Weggemans R.M., Rudrum M. y Trautwein E.A. (2004) Intake of ruminant versus industrial trans fatty acids and risk of coronary heart disease-what is the evidence? *European Journal Lipid SciencesTechnology* 106, 390- 397.
- 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., 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., 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

- Xu J., Francis T., Mietkiewska E., Giblin E. M., Barton D. L., Zhang Y., Zhang M. y Taylor, D. C. (2008) Cloning and characterization of an acyl-CoA-dependent diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) gene from *Tropaeolum majus*, and a study of the functional motifs of the DGAT protein using site-directed mutagenesis to modify enzyme activity and oil content. *Plant Biotechnology Journal* 6, 799–818.
- 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 Physiology* 160, 638–652.
- Yen C.-L. E., Stone S. J., Cases S., Zhou P. y Farese R. V. Jr. (2002) Identification of a gene encoding MGAT1, a monoacylglycerol acyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 8512–8517.
- 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.
- Yen C.L.E. y Farese R.V. (2003) MGAT2, a monoacylglycerol acyltransferase expressed in the small intestine. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 18532–18537.
- Yen C-L.E., Monetti M., Burri B. J., y Farese R. V. Jr. (2005) The triacylglycerol synthesis enzyme DGAT1 also catalyzes the synthesis of diacylglycerols, waxes, and retinyl esters. *The Journal of Lipid Research* 46, 1502–1511.
- Yu K., Li R., Hatanaka T. y Hildebrand D. (2008) Cloning and functional analysis of two type 1 diacylglycerol acyltransferases from *Vernonia galamensis*. *Phytochemistry* 69, 1119–1127.
- Yu W.L., Ansari W., Schoepp N.G., Hannon M.J., Mayfield S.P. y Burkart M.D. (2011) Modifications of the metabolic pathways of lipid and triacylglycerol production in microalgae. *Microbial Cell Factories* 10, 91.
- 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

Bibliografía

- Zheng P., Allen W.B., Roesler K., Williams M.E., Zhang S., Li J., Glassman K., Ranch J., Nubel D., Solawetz W. Bhatramakki D., Llaca V., Deschamps S., Zhong G.Y., Tarczynski M.C. y Shen B. (2008) A phenylalanine in DGAT is a key determinant of oil content and composition in maize. *Nature Genetics* 40, 367–372.
- Zhou X.R., Shrestha P., Yin F., Petrie J.R. y Singh S.P. (2013) AtDGAT2 is a functional acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase and displays different acyl-CoA substrate preferences than AtDGAT1. *Febs Letters* 587, 2371-2376.
- Zock P.L., de Vries J.H.M., de Fouw N.J. y Katan M.B. (1995) Positional distribution of fatty acids in dietary triglycerides: effects on fasting blood lipoprotein concentrations in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 61, 48-55.
- Zou J., Wei Y., Jako C., Kumar A., Selvaraj G. y Taylor D.C. (1999) The *Arabidopsis thaliana* TAG1 mutant has a mutation in a diacylglycerol acyltransferase gene. *The Plant Journal* 19, 645-653
- Zou J.-T., Katavic V., Giblin E.M., Barton D.L., MacKenzie S.L., Keller W.A., Hu X. y Taylor D.C. (1997) Modification of seed oil content and acyl composition in Brassicaceae by expression of a yeast sn-2 acyltransferase gene. *Plant Cell* 9, 909–923.

APÉNDICES | 327-332

APÉNDICE I

Oligonucleótidos de nueva generación

Nombre		Secuencia (5' > 3')	Nº degs.	TM (°C)	Gen / Plásmido / Proteína	Función *
<i>LPATf1a</i>	F	MGR WSN GAY ATT GAY TGG	256	52.6	<i>HaLPAAT1</i>	Clonación
<i>LPATf1sp</i>	F	TGT CAT AGG TTG GTC AAT GTG G	-	58.4	<i>HaLPAAT1</i>	Clonación
<i>LPATf2sp</i>	F	AAG GGA CTC GAT TTA CTA ATG C	-	56.5	<i>HaLPAAT1</i>	Clonación
<i>LPATr1</i>	R	ACR AAN CCY TTN GTD CKD GG	1152	57.6	<i>HaLPAAT1</i>	Clonación
<i>LPATr2sp</i>	R	ACA TTG ACC AAC CTA TGA CAG G	-	58.4	<i>HaLPAAT1</i>	Clonación
<i>LPATr3sp</i>	R	AAG ATG CAT ATT CTT GAG CTG C	-	56.5	<i>HaLPAAT1</i>	Clonación
<i>qHaLPAT1f1sp</i>	F	GTC TCA CAT TCA CTG CAG CC	-	59.4	<i>HaLPAAT1</i>	qRT-PCR
<i>qHaLPAT1r1sp</i>	R	TCT TGT ACA CTG CCG TTA CC	-	57.3	<i>HaLPAAT1</i>	qRT-PCR
<i>KpnILPAT1F</i>	F	AAG GTA CCA TGG CAA TCT CAG CAG CAG C	-	69.0	<i>HaLPAAT1</i>	Clonación pYES2
<i>XbaILPAT1R</i>	R	CGG TCT AGA TCA ATG CAG TTT TTC TTG TAC ACT GC	-	69.0	<i>HaLPAAT1</i>	Clonación pYES2
<i>BamHILPAT1F</i>	F	AAG GAT CCA TGG CAA TCT CAG CAG CAG C	-	68.0	<i>HaLPAAT1</i>	Clonación pCAMBIA-1300EC
<i>XmaILPAT1R</i>	R	ACC CGG GTC AAT GCA GTT TTT CTT GTA CAC	-	66.8	<i>HaLPAAT1</i>	Clonación pCAMBIA-1300EC
<i>LPATf1sp</i>	F	TGT CAT AGG TTG GTC AAT GTG G	-	58.4	<i>HaLPAAT2</i>	Clonación
<i>LPATf2sp</i>	F	AAG GGA CTC GAT TTA CTA ATG C	-	56.5	<i>HaLPAAT2</i>	Clonación
<i>HaLPAT2f1sp</i>	F	TGT ACA CAG ATG CCG AGA CCC	-	61.8	<i>HaLPAAT2</i>	Clonación
<i>LPATr2sp</i>	R	ACA TTG ACC AAC CTA TGA CAG G	-	58.4	<i>HaLPAAT2</i>	Clonación
<i>LPATr3sp</i>	R	AAG ATG CAT ATT CTT GAG CTG C	-	56.5	<i>HaLPAAT2</i>	Clonación
<i>HaLPAT2r1sp</i>	R	ACT TTA ACG TGA ATC ACA GAC G	-	56.5	<i>HaLPAAT2</i>	Clonación
<i>qHaLPAT2f2sp</i>	F	GCT CAC ATT CAC TGC AAT TGG G	-	60.3	<i>HaLPAAT2</i>	qRT-PCR
<i>qHaLPAT2r1sp</i>	R	CTC TTG TAC ATT ACC ATT GC	-	53.2	<i>HaLPAAT2</i>	qRT-PCR
<i>KpnILPAT2F</i>	F	AAA GGT ACC ATG GCT ATC GCA GCA GCA GC	-	69.5	<i>HaLPAAT2</i>	Clonación pYES2
<i>XbaILPAT2R</i>	R	CGG TCT AGA TCA GTG CAG TTT CTC TTG TAC ATT ACC	-	69.5	<i>HaLPAAT2</i>	Clonación pYES2
<i>BamHILPAT2F</i>	F	AAG GAT CCA TGG CTA TCG CAG CAG C	-	66.3	<i>HaLPAAT2</i>	Clonación pCAMBIA-1300EC
<i>XmaILPAT2R</i>	R	ACC CGG GTC AGT GCA GTT TCT CTT GTA CAT TAC C	-	70.7	<i>HaLPAAT2</i>	Clonación pCAMBIA-

Apéndices

<i>DGAT1ABf3</i>	F	TGG CCA CTT CTW ATG TGC	2	53.7	<i>HaDAGAT1A</i>	Clonación
<i>DGAT1f2sp</i>	F	TGC ATA GTG GTG CTT GTT GC	-	57.3	<i>HaDAGAT1A</i>	Clonación
<i>DGAT1Af2sp</i>	F	ACG TAT AGC CGA CTC TGC TGC	-	61.8	<i>HaDAGAT1A</i>	Clonación
<i>DGAT1AATG</i>	F	GAT CAT AGG ATG TCA TCC	-	51.4	<i>HaDAGAT1A</i>	Clonación
<i>DGAT1r1</i>	R	AYA RCA TCA RTG WMA CRC C	64	53.4	<i>HaDAGAT1A</i>	Clonación
<i>DGAT1Ar1sp</i>	R	TGC AGC AAG TGG GAA TAC TGG	-	59.8	<i>HaDAGAT1A</i>	Clonación
<i>qHaDGAT1Af1sp</i>	F	GTC TGT CAC TTC CAG TCT TCC	-	59.8	<i>HaDAGAT1A</i>	qRT-PCR
<i>qHaDGAT1Ar1sp</i>	R	AAG AGT GAT AGC AGC AGA GTC G	-	60.3	<i>HaDAGAT1A</i>	qRT-PCR
<i>KpnIDGAT1AF</i>	F	AAG GTA CCA TGG CAT CCG ACG TAC GTA GG	-	69.5	<i>HaDAGAT1A</i>	Clonación pYES2
<i>XbaIDGAT1AR</i>	R	GCG GTC TAG ATT ATT TGG TGT TGA CTT TTC TAT TC	-	66.0	<i>HaDAGAT1A</i>	Clonación pYES2
<i>BamHIDGAT1AF</i>	F	AAG GAT CCA TGT CAT CCG ACG TAC GTA GG	-	68.1	<i>HaDAGAT1A</i>	Clonación pCAMBIA-1300EC
<i>XmaIDGAT1AR</i>	R	AAG GAC CCG GGT TAT TTG GTG TTG ACT TTT CTA TTC	-	68.3	<i>HaDAGAT1A</i>	Clonación pCAMBIA-1300EC
<i>DGAT1ATG</i>	F	TAA TGG CGT TAY TAG ATM CG	4	53.2	<i>HaDAGAT1B</i>	Clonación
<i>DGAT1ABf3</i>	F	TGG CCA CTT CTW ATG TGC	2	53.7	<i>HaDAGAT1B</i>	Clonación
<i>DGAT1f2sp</i>	F	TGC ATA GTG GTG CTT GTT GC	-	57.3	<i>HaDAGAT1B</i>	Clonación
<i>DGAT1Bf3sp</i>	F	GTT ACG ACA ATT GAT CAA GC	-	53.2	<i>HaDAGAT1B</i>	Clonación
<i>DGAT1r1</i>	R	AYA RCA TCA RTG WMA CRC C	64	53.4	<i>HaDAGAT1B</i>	Clonación
<i>DGAT1ABr1</i>	R	GAT TYT CAA TGA TGA GCC	2	50.3	<i>HaDAGAT1B</i>	Clonación
<i>DGAT1BSTOP</i>	R	GTC TTG TTT AAA ATT CAC TTG CC	-	55.3	<i>HaDAGAT1B</i>	Clonación
<i>qHaDGAT1Bf1sp</i>	F	TGT GCT GCC TCT CTC TTC TGC	-	61.8	<i>HaDAGAT1B</i>	qRT-PCR
<i>qHaDGAT1Br1sp</i>	R	CAT GTA GAG CGA TTA CAA TAG GG	-	58.9	<i>HaDAGAT1B</i>	qRT-PCR
<i>BamHIDGAT1BF</i>	F	AAG GAT CCA CCA TGG CGT TAT TAG ATC CGC C	-	69.5	<i>HaDAGAT1B</i>	Clonación pYES2
<i>XbaIDGAT1BR</i>	R	CGG TCT AGA TCA CTT GCC ATT ATT CAC C	-	65.1	<i>HaDAGAT1B</i>	Clonación pYES2
<i>BamHIDGAT1BF2</i>	F	AAG GAT CCA TGG CGT TAT TAG ATC CGC C	-	66.6	<i>HaDAGAT1B</i>	Clonación pCAMBIA-1300EC
<i>XmaIDGAT1BR</i>	R	GAA CCC GGG TCA CTT GCC ATT ATT CAC C	-	68.0	<i>HaDAGAT1B</i>	Clonación pCAMBIA-1300EC
<i>DGAT2f1sp</i>	F	AGG CAT ATA TGG ACA TGG	-	51.4	<i>HaDAGAT2</i>	Clonación
<i>DGAT2r1sp</i>	R	GTT GCA GCC GTT AGT CCA AGC	-	61.8	<i>HaDAGAT2</i>	Clonación
<i>DGAT2r2sp</i>	R	CTC TCG AAT AGA TCT TCA ACC	-	58.4	<i>HaDAGAT2</i>	Clonación
<i>qHaDGAT2f1sp</i>	F	CTG AGG CAT ATA TGG ACA TGG	-	57.9	<i>HaDAGAT2</i>	qRT-PCR

<i>qHaDGAT2r1sp</i>	R	AAC GTC TCC TGA ACG CCA CC	-	61.4	<i>HaDAGAT2</i>	qRT-PCR
<i>KpnIDGAT2F2</i>	F	AAG GTA CCA TGG CCA CGA CGA CGG AGA ACA C	-	69.5	<i>HaDAGAT2</i>	Clonación pYES2
<i>XbaIDGAT2R</i>	R	CGG TCT AGA TCA CAT AAT TCT TAA CTG AAG ATT AGG	-	66.1	<i>HaDAGAT2</i>	Clonación pYES2
<i>BamHIDGAT2F3</i>	F	AGG ATC CAT GTC CAC GAC GAC GGA GAA CAC A	-	70.8	<i>HaDAGAT2</i>	Clonación pCAMBIA-1300EC
<i>XmaIDGAT2R3</i>	R	ACC CTC CCG GGT CAC ATA ATT CTT AAC TGA AGA TTA GGA TAA CC	-	71.3	<i>HaDAGAT2</i>	Clonación pCAMBIA-1300EC
<i>N504681 LP</i>	F	ACC ACC CGG TTA ATT TTT CTG	-	55.9	<i>AtLPAT2</i>	AtGenotipado
<i>N504681 RP</i>	R	CTT TTT ACC ACA TGC AAA GGG	-	55.9	<i>AtLPAT2</i>	AtGenotipado
<i>N546680 LP</i>	F	GAA AGC CAT TGC AGT AGC TTG	-	57.9	<i>AtLPAT3</i>	AtGenotipado
<i>N546680 RP</i>	R	CGT GTA GGT TGT CTT GGA AGC	-	59.8	<i>AtLPAT3</i>	AtGenotipado
<i>LBb1.3</i>	F	CGG GTA CCA TGG AGG TTA AGA TAT CGG	-	61.3	<i>AtLPAT2 / AtLPAT3</i>	AtGenotipado
<i>N3861 LA</i>	F	CGA CCG TCG GTT CCA GCT CAT CGG	-	69.6	<i>AtDGAT1</i>	AtGenotipado
<i>N3861 LC</i>	F	TAA ACA GTA GAC TCA TCA TCG	-	54.0	<i>AtDGAT1</i>	AtGenotipado
<i>N3861 RB</i>	R	GCG GCC AAT CTC GCA GCG ATC TTG	-	67.8	<i>AtDGAT1</i>	AtGenotipado
<i>N852633 LP</i>	F	CCA ACT CGA ACA AAA GAA ACG	-	55.9	<i>AtFatA1</i>	AtControl genómico
<i>N852633 RP</i>	R	CAA TGG TTT CAA CAG TAG CGG	-	57.9	<i>AtFatA1</i>	AtControl genómico
<i>AtActin-F</i>	F	GGA AGG ATC TGT ACG GTA AC	-	57.3	<i>AtActina</i>	AtAnálisis expresión
<i>AtActin-R</i>	R	TGT GAA CGA TTC CTG GAC CT	-	57.3	<i>AtActina</i>	AtAnálisis expresión
<i>Sc18Sf1sp</i>	F	TTG GCC GAG AGG TCT TGG TA	-	59.4	ScSubunidad 18S	ScAnálisis expresión
<i>Sc18Sr1sp</i>	R	GGG ACG TAA TCA ACG CAA GC	-	59.4	ScSubunidad 18S	ScAnálisis expresión
<i>M13 forward</i>	F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT G	-	56.7	pMBL-T	PCR screening
<i>M13 reverse</i>	R	CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG	-	57.9	pMBL-T	PCR screening
<i>GAL1for</i>	F	GTC AAG GAG AAA AAA CCC CGG ATC	-	62.7	pYES2	PCR screening
<i>CYCrev</i>	R	GCG TGA CAT AAC TAA TTA CAT GAT GCG	-	61.9	pYES2	PCR screening
<i>CaMV35SF1</i>	F	CGT AAG GGA TGA CGC ACA AT	-	57.3	pCAMBIA-1300EC	PCR screening
<i>nosT</i>	R	ACG TCA TGC ATT ACA TGT TAA TTA	-	54.2	pCAMBIA-1300EC	PCR screening

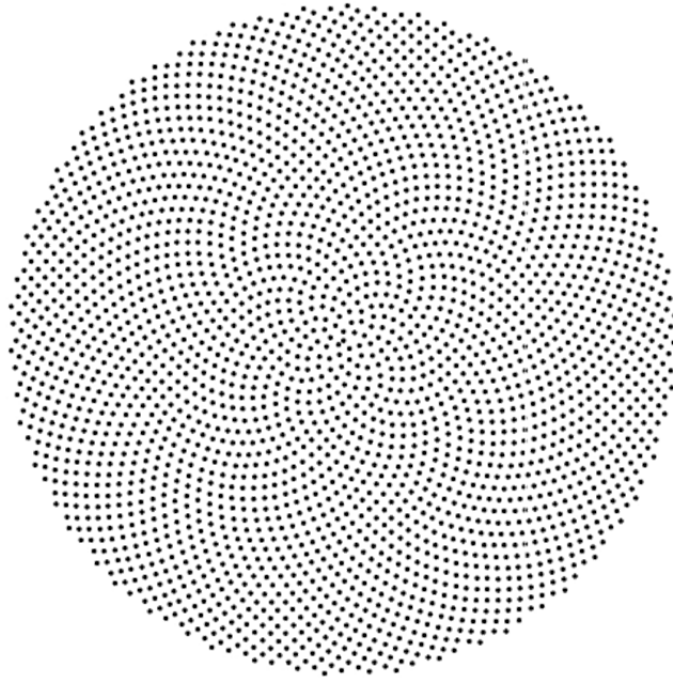
Apéndices

Oligonucleótidos comerciales						
Nombre		Secuencia (5' > 3')	Nº degs.	TM (°C)	Compañía	Función
<i>FA2Z</i>	R	AAC TGG AAG AAT TCG CGG	-	53.7		Clonación extremo 3'
<i>UPM Long</i>	F	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA ACA ACG CAG AGT	-	74.0	RACE, Clontech (Japón)	Clonación extremo 5'
<i>UPM Short</i>	F	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	-	58.4	RACE, Clontech (Japón)	Clonación extremo 5'
<i>NUP</i>	F	AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GT	-	54.7	RACE, Clontech (Japón)	Clonación extremo 5'

En verde se marca diana de restricción, en azul codón de inicio de transcripción (ATG), en rojo codón de stop de transcripción. Subrayado se marca la secuencia Kozak (ANNATGG).

Código nucleotídico IUPAC.- M: A/C; R: A/G; W: A/T; Y: C/T; S: G/C; K: G/T; H: A/C/T; D: A/G/T; N: A/C/G/T.

* Se indican las funciones para los que fueron diseñados inicialmente, si bien algunos oligonucleótidos se usaron además para comprobar, mediante PCR screening, la presencia y correcta orientación de los fragmentos o clones insertados en los diferentes plásmidos de clonación o vectores de expresión, así como el análisis de la expresión de las proteínas recombinantes.



$$r = c \sqrt{n}$$
$$\theta = n \times 137.5^\circ$$



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



UNIVERSITY OF
ALBERTA