



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOCENCIAS

ESTUDIO FITOQUÍMICO Y MOLECULAR DE
SEMILLA DE *Jatropha cinerea*: BIOSÍNTESIS DE LOS
ÁCIDOS GRASOS OLEICO Y LINOLEICO.

TESIS

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

Presenta:

JOSÉ PABLO LOVIO FRAGOSO

Hermosillo, Sonora, México

14 de Diciembre de 2015

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

ESTUDIO FITOQUÍMICO Y MOLECULAR DE SEMILLA DE *Jatropha cinerea*:
BIOSÍNTESIS DE LOS ÁCIDOS GRASOS OLEICO Y LINOLEICO

TESIS

Que para obtener el grado de

MAESTRO EN BIOCENCIAS

Presenta

JOSÉ PABLO LOVIO FRAGOSO

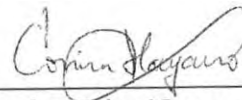
APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis intitulada “Estudio Fitoquímico y Molecular de Semilla de *Jatropha cinerea*: Biosíntesis de los Ácidos Grasos Oleico y Linoleico” presentada por el I.B. José Pablo Lovio Fragoso, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Biociencias con especialidad en Biotecnología de Recursos Naturales.



Dr. Luis Ángel Medina Juárez

Director



Dra. Ángela Corina Hayano Kanashiro

Co – Director



Dra. Nohemí Gámez Meza

Asesor Interno



Dr. Octavio Martínez de la Vega

Asesor Externo

DEDICATORIA

A **Dios** y a la **Divina Providencia**, que más que dedicar es un ofrecimiento, un acto de gratitud y de amor porque no ha parado de sorprenderme e irme llevando de la mano sabiamente a donde yo le doy gloria y a donde Él quiere que yo esté. Por su amor, protección en cada paso que doy y por darme en el momento justo lo que en verdad necesito. Sin Él nada soy y con Él todo lo puedo.

A **mis padres**, mi principal apoyo. Por todo el amor, la fe, confianza y apoyo en cada uno de mis proyectos y sueños. Tengo de cada uno de ellos lo mejor y para mí son los pilares más importantes de mi vida.

A **mi hermana Alexia**, mi fiel cómplice, por todas sus ocurrencias, por todo su amor y apapacho en esos momentos cuando más lo he necesitado.

A **mi familia** de sangre y de espíritu, que es toda una guerrera y que a pesar de que la vida nos ha puesto a prueba, vamos hacia adelante, fuerte y al final siempre siendo uno.

A **mis verdaderos amigos**, que en esta etapa crucial de mi vida me han dado para arriba y me han apoyado con sus palabras, actos y que me han motivado a hacer cosas que antes no me atrevía y que eran necesarias hacerlas. Gracias infinitas.

Al **amor** y **desamor**, que en este tiempo tocaron a mi puerta, le agradezco que me haya mostrado mi capacidad de amar, de crecer, de poner límites, darme cuenta de lo mucho que valgo como persona y mis principios, a no conformarme con menos de lo que doy y seguir creyendo fielmente que sin importar el tiempo que tome, al final encontraré lo que ando buscando.

A **todas y cada una de las personas** que han extendido su mano a mí, que han influido directa o indirectamente en mí e inspirado a ser mejor persona.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad de Sonora** y al **Posgrado en Biociencias del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas**, al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** y al **Programa para el Mejoramiento del Profesorado (PROMEP)** por todo el apoyo, los espacios, facilidades y oportunidades brindadas durante el desarrollo y término de esta tesis de maestría.

Al **Dr. Luis Ángel Medina Juárez**, por todo su apoyo, amistad, accesibilidad, confianza y guía en este proyecto. Muy agradecido por abrirme las puertas, por siempre estar dispuesto a ayudarme, brindarme consejos y por su constante búsqueda en que mi estancia y crecimiento en el posgrado fuera de lo mejor. Profe, muy agradecido por todo eso y más.

A la **Dra. Ángela Corina Hayano Kanashiro**, no encuentro todas las palabras para decirle lo mucho que me ha enriquecido como ser humano y lo agradecido que estoy con usted por contagiarme la pasión por la investigación. Me encuentro lejos de serlo, pero es usted un ejemplo al que yo aspiro ser en mi carrera profesional. Gracias por todo lo que me compartió en este tiempo y por su paciencia sobre todo. Ya verá, la higuera dará frutos y en abundancia.

A la **Dra. Nohemí Gámez Meza**, muy agradecido por todas sus enseñanzas, sus pláticas, su apoyo, confianza y acertadas observaciones tanto en las clases como en este proyecto.

Al **Dr. Octavio Martínez de la Vega**, por aceptar la invitación a formar parte y su contribución en este proyecto. Gracias totales.

Al **Dr. José Arturo Sánchez Paz**, por su amabilidad, accesibilidad, sentido del humor y sus acertadas observaciones y recomendaciones en este proyecto. También gracias a la **Dra. Tania Lizbeth Enríquez Espinoza**, al **M.C. Adán Valenzuela Castillo** y al equipo de trabajo del **Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR)**, por el apoyo, asesoría, espacios y facilidades brindadas para este proyecto.

A los **Dres. Alejandro Varela Romero y José Manuel Grijalva Chón**, por su apoyo y las facilidades brindadas al permitirme hacer uso del espacio y equipos en su laboratorio de Ecología Molecular del DICTUS.

Al **Dr. Hernán Celaya Michel**, por su apoyo, enseñanzas, consejos y acompañamiento durante los muestreos.

A otros académicos también de la Universidad de Sonora y del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas por su apoyo: **Dr. Armando Tejeda Mansir**, por su ánimo y apoyo; **Dr. José Antonio López Elías**, por su apoyo, pláticas y ocurrencias; **Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán**, por su apoyo, confianza y fe en mi persona. Por las facilidades, espacios y consejos brindados. **Dra. Gloria Ayala Astorga**, por el espacio y facilidades brindadas; **Dra. Gudelia Figueroa Preciado**, la admiro, gracias por su apoyo y por ser de esas personas que inspiran; **Dr. Enrique de la Re**, por su ‘bullying’ y pláticas amenas. **Dra. Mayra Lizeth González Félix**, por su seguimiento y palabras de ánimo. **Dr. Alfonso García Galaz y M.C. Edgar Sandoval Petris**, gracias también por su apoyo, orientación y facilidades brindadas. Muy agradecido con todos.

A la **M.C. Claudia Celeste Molina Domínguez**, compañera del partido, muy agradecido con usted por todo su apoyo, enseñanza, paciencia, pláticas, ocurrencias y vivencias. Has enriquecido mi persona de una manera extraordinaria. No tengo palabras para agradecerle tanto.

A mis compañeros de laboratorio que han estado a lo largo de mi estancia: **Tania Cota y Fabiola Ordaz**, gracias por su amistad. **Omar Alejandro Reyna Valenzuela**, abnegado compañero de trabajo, muy agradecido por tu amistad, apoyo, confianza y compañía en este proyecto. **Cynthia Machado**, gracias por enseñarme muchas cosas y ser clave en mi inicio de esta aventura. **Saraí Agustín**, por tu gran amistad y por ser alguien que desde un principio me brindo todo su apoyo y cariño; **Luisa Rascón**, por tu amistad y apoyo. **Dulce Molina**, por tu apoyo y asesoría.

A otros grandes maestros que me motivan a prepararme constantemente, compañeros que ahora inician sus tesis de licenciatura o realizaron sus estancias de investigación conmigo: **Michel López, Luis López, Diego Félix, Marcelino Sotelo, Ari Ung, Ruth Cota, Jorge Landell,** y **la Generación 2015 de la licenciatura de Biología** de la Universidad de Sonora. ¡Gracias chicos!

A mis compañeros del posgrado en Biociencias y tesistas de laboratorios donde laboré y conviví, por la amistad, consejos, tips, facilidades y apoyo brindado: **Martín Acedo, Carlos Ballesteros, Manuel Lastra, Diana Fimbres, Jesús Encinas, Carlos Maldonado, Romeo Méndez, Rafael Bórquez, Maru Rentería y Fabiola Gandarilla.**

A otras personas que de manera indirecta o directa han hecho esto posible. Gracias por su amistad, apoyo y accesibilidad: **Ceci Piri, Claudia, Loly, Ismael, Irene, Lupita, Nico, Don Gaby, Eli...** en fin, la lista es muy larga y no acabaría nunca de agradecer y si no aparecen aquí, lo seguro es que están en mi corazón. Estoy convencido que Dios nos va poniendo a todos en donde debemos estar para entre todos crecer, ser mejores, plenos y contribuir a que todo llegue a su destino. ¡Gracias! ¡Gracias!

RESUMEN

Las plantas del género *Jatropha* pertenecen a la familia de las Euphorbiaceae y se caracterizan por su adaptación a diversas condiciones agrícolas y climáticas. Se distribuyen ampliamente por todo el mundo y se conocen alrededor de 186 especies, de las cuales 48 se encuentran en México y 39 de ellas son endémicas. *Jatropha cinerea* es una especie nativa del Noroeste de México; se caracteriza por su crecimiento en suelos salinos a lo largo de las costas y por su adaptación en zonas áridas y semiáridas. La información relacionada con la caracterización química de su semilla es escasa y no existen estudios de la expresión de los genes que están involucrados en la síntesis de los ácidos grasos, específicamente oleico y linoleico. Por lo tanto, el objetivo de este proyecto fue analizar la composición química de la semilla y la expresión de genes involucrados en la síntesis de los ácidos grasos oleico y linoleico en la semilla de *Jatropha cinerea*. Los resultados mostraron que los principales ácidos grasos en el aceite de *Jatropha cinerea* fueron el ácido oleico y linoleico, siendo éste último el más abundante. No se detectaron tocoferoles ni carotenoides en el aceite. Las pastas de semilla de *Jatropha cinerea* resultaron ser una fuente importante de compuestos fenólicos, siendo el más abundante el ácido cafeico. Los genes que presentaron mayor inducción en la semilla de *Jatropha cinerea* fueron *KASII* y *FAD2-1*. El contenido de ácidos grasos y el nivel de expresión de genes mostraron una relación moderada, a excepción del gen *D9SD*. Las secuencias de los genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos de *Jatropha cinerea* mostraron una homología alta con las secuencias de *Jatropha curcas*, usando BioEdit y BLAST, brindando información para el desarrollo de estudios a futuro.

ABSTRACT

The genus *Jatropha* belongs to the Euphorbiaceae family and they are characterized by its adaptability to different agricultural and climatic conditions. They are widely distributed around the world with 186 species of which 48 are in Mexico and 39 are endemic. *Jatropha cinerea* is native of the Northwest of Mexico; it is characterized by growing in saline soils along the coast and it is adapted to arid and semiarid areas. The information related to chemical composition of the seeds is scarce and the expression of genes involved in the fatty acids synthesis, specifically oleic and linoleic acid is still unknown. Therefore, the aim of this study was to analyze the chemical composition and the expression of the genes involved in the oleic and linoleic acid synthesis in the seed of *Jatropha cinerea*. The results showed that the main fatty acids found in the *Jatropha cinerea* oil were oleic and linoleic acid, being the most abundant the linoleic acid. Tocopherols and carotenoids were not detected in the oil. *Jatropha cinerea* meals proved to be an important source of phenolic compounds and the most abundant was the caffeic acid. The genes that showed a higher induction in *Jatropha cinerea* seeds were *KASII* and *FAD2-1*. The fatty acid composition and the level of expression of genes showed a moderate relationship, except the gene *D9SD*. The sequences of the genes involved in oleic and linoleic acids from *Jatropha cinerea* showed a high homology with *Jatropha curcas* sequences, using BioEdit and BLAST, providing information to develop future studies.

ÍNDICE GENERAL

	Página
APROBACIÓN	<i>i</i>
DEDICATORIA	<i>ii</i>
AGRADECIMIENTOS	<i>iii</i>
RESUMEN	<i>vi</i>
ABSTRACT	<i>vii</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>xii</i>
ÍNDICE DE TABLAS	<i>xvi</i>
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1 Generalidades del género <i>Jatropha</i>	4
2.1.1 Composición de aceites de <i>Jatropha</i>	5
2.1.2 Componentes químicos en semillas de <i>Jatropha</i>	6
2.1.2.1 Compuestos fenólicos en <i>Jatropha</i>	7
2.2 <i>Jatropha curcas</i>	8
2.2.1 Cultivo de <i>Jatropha curcas</i>	8
2.2.2 Clima que favorece el desarrollo de plantas de <i>Jatropha curcas</i>	9
2.2.3 Suelos que favorecen el desarrollo de plantas de <i>Jatropha curcas</i>	9
2.2.4 Producción de semilla de <i>Jatropha curcas</i>	9
2.2.4.1 Riesgos y retos en el cultivo de <i>Jatropha curcas</i>	11
2.2.5 Producción de aceite de <i>Jatropha curcas</i>	11
2.2.6 Producción de biodiesel	12
2.2.6.1 Experiencias con biodiesel de <i>Jatropha curcas</i> en México	14
2.2.7 Estudios moleculares en <i>Jatropha curcas</i>	15
2.3 <i>Jatropha cinerea</i> (<i>Jci</i>)	16
2.4 Composición de los aceites vegetales	19
2.4.1 Ácidos grasos	20
2.4.2 Protección natural del aceite	23
2.4.2.1 Tocoferoles	24
2.4.2.2 Carotenoides	26
2.5 Genes involucrados en la síntesis de los ácidos grasos oleico y linoleico	27
2.5.1 Genes involucrados en la síntesis del ácido oleico	27
2.5.1.1 Gen <i>ACPI</i>	27
2.5.1.2 Gen <i>KASII</i>	28
2.5.1.3 Gen <i>D9SD</i>	29

	Página
2.5.2 Genes involucrados en la síntesis del ácido linoleico	29
2.5.2.1 Genes <i>FAD2</i>	29
2.6 Análisis de expresión de genes	30
2.6.1 Extracción de ARN	31
2.6.1.1 Extracción de ARN con fenol.	32
2.6.2 Métodos para analizar la expresión de genes	33
2.6.2.1 <i>Northern Blot</i>	33
2.6.2.2 Hibridación ' <i>in situ</i> '	34
2.6.2.3 RT-PCR	35
2.6.2.3.1 RT-PCR semicuantitativa	35
2.6.2.3.2 RT-PCR cuantitativa o qRT-PCR Tiempo Real	36
2.7 Secuenciación de ácidos nucleicos	37
2.7.1 Análisis de las secuencias	38
III. JUSTIFICACIÓN	39
IV. HIPÓTESIS	40
V. OBJETIVOS	41
5.1 Objetivo General	41
5.2 Objetivos Específicos	41
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	42
6.1 Material Biológico	42
6.2 Extracción de aceite de semillas de <i>J. cinerea</i>	42
6.2.1 Perfil de ácidos grasos de aceite de <i>J. cinerea</i>	43
6.2.2 Cuantificación de carotenoides totales en aceite de semilla de <i>J. cinerea</i>	43
6.2.3 Cuantificación de tocoferoles en aceite de semilla de <i>J. cinerea</i>	43
6.3 Extracciones y determinación analítica de los compuestos fenólicos en extractos metanólicos de semilla de <i>J. cinerea</i> .	44
6.3.1 Obtención de extractos metanólicos de pasta de semilla de <i>J. cinerea</i>	44
6.3.2 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos de los extractos metanólicos de <i>J. cinerea</i> por HPLC-DAD.	44
6.3.3 Identificación de compuestos fenólicos de los extractos metanólicos de <i>J. cinerea</i> por FIA-ESI-IT-MS/MS.	45
6.4 Análisis de la expresión diferencial de genes involucrados en la síntesis de ácido oleico y linoleico en semilla de <i>J. cinerea</i> .	45
6.4.1 Preparación de la muestra	45
6.4.2 Extracción de ARN total	45

	Página
6.4.2.1 Cuantificación e integridad del ARN total.	46
6.4.2.2 Purificación de ARN extraído de semilla de <i>J. cinérea</i> .	48
6.4.3 Secuencias de genes relacionados con la biosíntesis de los ácidos oleico y linoleico y considerados para este estudio.	49
6.4.4 RT-PCR semi-cuantitativo.	50
6.4.4.1 Síntesis de ADNc.	50
6.4.4.2 Reacción de PCR	51
6.4.4.3 Determinación de los parámetros de ciclos y temperaturas	52
6.4.4.4 Análisis de los productos de RT-PCR semicuantitativo	52
6.5 Secuenciación de los genes <i>ACPI</i> , <i>KASII</i> , <i>D9SD</i> , <i>FAD2-1</i> , <i>FAD2-2</i> y <i>Actina</i> de <i>J. cinerea</i> .	54
6.6 Análisis preliminar del gen <i>FAD2-1</i> por qRT-PCR Tiempo Real	61
6.6.1 Síntesis de ADNc	61
6.6.2 Elaboración de curvas estándar de los genes <i>Actina</i> y <i>FAD2-1</i>	62
6.6.2.1 Obtención de productos de PCR	62
6.6.2.2 Purificación de los productos de PCR	63
6.6.2.3 Elaboración de diluciones	64
6.6.2.4 Reacción de PCR Tiempo Real	64
6.6.3 Análisis preliminar de expresión del gen <i>FAD2-1</i> qRT-PCR Tiempo Real.	65
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
7.1 Observaciones en el área de muestreo de las semillas de <i>J. cinerea</i>	67
7.2 Características físicas de las semillas de <i>J. cinerea</i>	68
7.3 Caracterización química del aceite de <i>J. cinerea</i>	68
7.3.1 Perfil de ácidos grasos del aceite de <i>J. cinerea</i>	68
7.3.2 Contenido de tocoferoles y carotenoides en el aceite de <i>J. cinerea</i>	70
7.4 Compuestos fenólicos presentes en los extractos metanólicos de semilla de <i>J. cinerea</i>	71
7.5 Análisis de expresión de genes	75
7.5.1 Integridad de ARN total	75
7.5.2 Estandarización de condiciones para PCR	75
7.5.3 Genes involucrados en la síntesis del ácido graso oleico	77
7.5.3.1 Gen <i>ACPI</i> relacionado reacción inicial de desaturación en los ácidos grasos de 16 y 18 carbonos.	77
7.5.3.2 Gen <i>KASII</i> relacionado con la elongación de C16:0 a C18:0	78
7.5.3.3 Gen <i>D9SD</i> relacionado con la síntesis del ácido oleico	79
7.5.4 Genes involucrados en la síntesis del ácido graso linoleico	81

	Página
7.5.4.1 Genes <i>FAD2-1</i> y <i>FAD2-2</i> relacionados con la síntesis del ácido linoleico	81
7.5.5 Relación entre el contenido de los ácidos grasos oleico y linoleico de <i>J. cinerea</i> y la expresión de genes involucrados.	84
7.6 Secuencias de los genes <i>ACPI</i> , <i>KASII</i> , <i>D9SD</i> , <i>FAD2-1</i> , <i>FAD2-2</i> y <i>Actina</i> de <i>J. cinerea</i> .	86
7.6.1 Gen <i>Actina</i>	86
7.6.2 Gen <i>ACPI</i>	86
7.6.3 Gen <i>KASII</i>	87
7.6.4 Gen <i>D9SD</i>	87
7.6.5 Gen <i>FAD2-1</i>	87
7.6.6 Gen <i>FAD2-2</i>	87
7.7 Resultados preliminares del gen <i>FAD2-1</i> por qRT-PCR Tiempo Real	94
7.7.1 Curva estándar del gen de <i>Actina</i> en <i>J. cinerea</i>	94
7.7.2 Curva estándar del gen de <i>Actina</i> en <i>J. curcas</i>	96
7.7.3 Curva estándar del gen de <i>FAD2-1</i> en <i>J. cinerea</i>	97
7.7.4 Curva estándar del gen de <i>FAD2-1</i> en <i>J. curcas</i>	98
7.7.5 Expresión del gen <i>FAD2-1</i> relacionado con la síntesis del ácido linoleico	99
VIII. CONCLUSIONES	101
IX. RECOMENDACIONES	102
X. LITERATURA CITADA	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Distribución de <i>J. cinerea</i> en el Noroeste de México. Simbología: Poblaciones =● Avistamientos=▲. Mapa tomado de: SOUTHWEST ENVIRONMENTAL INFORMATION NETWORK, SEINet. 2015. Fecha de consulta: 06 de noviembre. Disponible en: http://swbiodiversity.org/seinet/index.php	17
2	<i>J. cinerea</i> en época seca y de floración en la costa del municipio de Hermosillo, Sonora.	18
3	Estructuras principales de <i>J. cinerea</i> . A) Hoja, B) Flores y C) Fruto.	18
4	Estructura química de una molécula de triacilglicérido.	20
5	Estructura química de los tocoferoles (parte superior) y tocotrienoles (parte inferior). Tomado de Lampi, (2011).	24
6	Ruta metabólica de ácidos grasos en plantas (Participación de los genes <i>ACPI</i> , <i>KASII</i> , <i>D9SD</i> , <i>FAD2-1</i> y <i>FAD2-2</i> en la síntesis de los ácidos grasos oleico y linoleico).	30
7a	Procedimiento del análisis de secuencias en BioEdit.	57
7b	Procedimiento del análisis de secuencias en BioEdit.	58
7c	Procedimiento del análisis de secuencias en BioEdit.	59
7d	Procedimiento del análisis de secuencias en BioEdit.	60
8	Muestreos realizados para la colección de semillas de <i>J. cinerea</i> en Bahía de Kino.	67
9	Características físicas de las semillas de <i>J. cinerea</i> .	68
10	Cromatograma del perfil de ácidos grasos de <i>J. cinerea</i> .	69
11	Espectros de masas de los extractos metanólicos de semilla de <i>J. cinerea</i> . (A): Espectro del ión 179 <i>m/z</i> correspondiente al ácido cafeico. (B): Espectro del ión 289 <i>m/z</i> correspondiente a epicatequina. (C): Espectro del ión 125 <i>m/z</i> correspondiente al ácido gálico.	74
12	ARN total de semillas de <i>J. curcas</i> y <i>J. cinerea</i> en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed™ (Biotium). A) ARN extraído con el reactivo TRIzol® B) ARN tratado con el kit RNeasy MinElute Cleanup Kit. Carril 1: ARN de semilla de <i>J. curcas</i> . Carril 2: ARN de semilla de <i>J. cinerea</i> .	75

Figura		Página
13	Número de ciclos en la reacción de PCR. Gradiente de ciclos realizado con el gen de <i>Actina</i> con temperatura de alineamiento de 61.9 ° C. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Sin muestra. Carril 3: 25 ciclos. Carril 4: 27 ciclos. Carril 5: 29 ciclos. Carril 6: 31 ciclos. Carril 7: 33 ciclos.	76
14	Optimización de temperatura de alineamiento de PCR. Gradiente realizado en el gen <i>KASII</i> . Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Sin muestra. Carril 3: 60.2 °C. Carril 4: 61.9 °C. Carril 5: 64.4 °C. Carril 6: 66.1 °C. Carril 7: 67.8 °C.	76
15	Productos de PCR presentados en gel de agarosa al 1 % teñido con GelRed™ (Biotium) del gen <i>ACPI</i> . <i>Actina</i> como gen de control interno. A) Muestreo 2013; B) Muestreo 2014. Carril 1: Semilla de <i>J. curcas</i> . Carril 2: Semilla de <i>J. cinerea</i> .	78
16	Productos de PCR presentados en gel de agarosa al 1 % teñido con GelRed™ (Biotium) del gen <i>KASII</i> . <i>Actina</i> como gen de control interno. A) Muestreo 2013; B) Muestreo 2014. Carril 1: Semilla de <i>J. curcas</i> . Carril 2: Semilla de <i>J. cinerea</i> .	79
17	Productos de PCR presentados en gel de agarosa al 1 % teñido con GelRed™ (Biotium) del gen <i>D9SD</i> . <i>Actina</i> como gen de control interno. A) Muestreo 2013; B) Muestreo 2014. Carril 1: Semilla de <i>J. curcas</i> . Carril 2: Semilla de <i>J. cinerea</i> .	80
18	Comparación de los niveles de expresión de los genes <i>ACPI</i> , <i>KASII</i> y <i>D9SD</i> , evaluados semi-cuantitativamente por RT-PCR en relación al gen de control interno <i>Actina</i> en semillas de <i>J. curcas</i> y <i>J. cinerea</i> del muestreo 2013. Los valores mostrados son el promedio de la proporción de la señal específica del gen con la señal del gen <i>Actina</i> y la media ± desviación estándar de 3 réplicas.	80
19	Comparación de los niveles de expresión de los genes <i>ACPI</i> , <i>KASII</i> y <i>D9SD</i> , evaluados semi-cuantitativamente por RT-PCR en relación al gen de control interno <i>Actina</i> en semillas de <i>J. curcas</i> y <i>J. cinerea</i> del muestreo 2014. Los valores mostrados son el promedio de la proporción de la señal específica del gen con la señal del gen <i>Actina</i> y la media ± desviación estándar de 3 réplicas.	81
20	Productos de PCR presentados en gel de agarosa al 1 % teñido con GelRed™ (Biotium) del gen <i>FAD2-1</i> . <i>Actina</i> como gen de control interno. A) Muestreo 2013; B) Muestreo 2014. Carril 1: Semilla de <i>J. curcas</i> . Carril 2: Semilla de <i>J. cinerea</i> .	82

Figura		Página
21	Productos de PCR presentados en gel de agarosa al 1 % teñido con GelRed™ (Biotium) del gen <i>FAD2-2</i> . <i>Actina</i> como gen de control interno. A) Muestreo 2013; B) Muestreo 2014. Carril 1: Semilla de <i>J. curcas</i> . Carril 2: Semilla de <i>J. cinerea</i> .	83
22	Comparación de los niveles de expresión de los genes <i>FAD2-1</i> y <i>FAD2-2</i> , evaluados semi-cuantitativamente por RT-PCR en relación al gen de control interno <i>Actina</i> en semillas de <i>J. curcas</i> y <i>J. cinerea</i> del muestreo 2013. Los valores mostrados son el promedio de la proporción de la señal específica del gen con la señal del gen <i>Actina</i> y la media \pm desviación estándar de 3 réplicas.	83
23	Comparación de los niveles de expresión de los genes <i>FAD2-1</i> y <i>FAD2-2</i> , evaluados semi-cuantitativamente por RT-PCR en relación al gen de control interno <i>Actina</i> en semillas de <i>J. curcas</i> y <i>J. cinerea</i> del muestreo 2014. Los valores mostrados son el promedio de la proporción de la señal específica del gen con la señal del gen <i>Actina</i> y la media \pm desviación estándar de 3 réplicas.	84
24a	Análisis de la secuencia del gen de <i>Actina</i> en BLAST en la plataforma de NCBI.	88
24b	Análisis de la secuencia del gen de <i>Actina</i> en BLAST en la plataforma de NCBI.	88
25a	Análisis de la secuencia del gen <i>ACPI</i> en BLAST en la plataforma de NCBI.	89
25b	Análisis de la secuencia del gen <i>ACPI</i> en BLAST en la plataforma de NCBI.	89
26a	Análisis de la secuencia del gen <i>KASII</i> en BLAST en la plataforma de NCBI.	90
26b	Análisis de la secuencia del gen <i>KASII</i> en BLAST en la plataforma de NCBI.	90
27a	Análisis de la secuencia del gen <i>D9SD</i> en BLAST en la plataforma de NCBI.	91
27b	Análisis de la secuencia del gen <i>D9SD</i> en BLAST en la plataforma de NCBI.	91
28a	Análisis de la secuencia del gen <i>FAD2-1</i> en BLAST en la plataforma de NCBI.	92
28b	Análisis de la secuencia del gen <i>FAD2-1</i> en BLAST en la plataforma de NCBI.	92

Figura		Página
29a	Análisis de la secuencia del gen <i>FAD2-2</i> en BLAST en la plataforma de NCBI.	93
29b	Análisis de la secuencia del gen <i>FAD2-2</i> en BLAST en la plataforma de NCBI.	93
30	Curva estándar del gen <i>Actina</i> en <i>J. cinerea</i> . De izquierda a derecha se muestran en orden descendente y por triplicado las curvas de amplificación de las diluciones utilizadas para la obtención de la curva estándar del gen de <i>Actina</i> .	95
31	Curva de disociación del amplicón diana del gen <i>Actina</i> en <i>J. cinerea</i> . El amplicón del gen de <i>Actina</i> se disocia completamente a una temperatura promedio de 85 °C.	95
32	Curva estándar del gen <i>Actina</i> en <i>J. curcas</i> . De izquierda a derecha se muestran en orden descendente y por triplicado las curvas de amplificación de las diluciones utilizadas para la obtención de la curva estándar del gen de <i>Actina</i> .	96
33	Curva de disociación del amplicón diana del gen <i>Actina</i> en <i>J. curcas</i> . El amplicón del gen de <i>Actina</i> se disocia completamente a una temperatura promedio de 85 °C.	96
34	Curva estándar del gen <i>FAD2-1</i> en <i>J. cinerea</i> . De izquierda a derecha se muestran en orden descendente y por triplicado las curvas de amplificación de las diluciones utilizadas para la obtención de la curva estándar del gen de <i>FAD2-1</i> .	97
35	Curva de disociación del amplicón diana del gen <i>FAD2-1</i> en <i>J. cinerea</i> . El amplicón del gen de <i>FAD2-1</i> se disocia completamente a una temperatura promedio de 85 °C.	97
36	Curva estándar del gen <i>FAD2-1</i> en <i>J. curcas</i> . De izquierda a derecha se muestran en orden descendente y por triplicado las curvas de amplificación de las diluciones utilizadas para la obtención de la curva estándar del gen de <i>FAD2-1</i> .	98
37	Curva de disociación del amplicón diana del gen <i>FAD2-1</i> en <i>J. curcas</i> . El amplicón del gen de <i>FAD2-1</i> se disocia completamente a una temperatura promedio de 83 °C.	98
38	Comparación de los niveles de expresión del gen <i>FAD2-1</i> por qRT-PCR Tiempo Real, en relación al gen control <i>Actina</i> en semillas de <i>J. curcas</i> (n = 2) y <i>J. cinerea</i> (n = 3) del muestreo 2014. Los valores mostrados son el promedio de la proporción de la señal específica del gen con la señal del gen <i>Actina</i> y la media ± desviación estándar.	99

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Ejemplos de ácidos grasos saturados (SFA).	21
2	Ejemplos de ácidos grasos insaturados.	22
3	Secuencia de genes que codifican para la síntesis de ácidos grasos oleico y linoleico.	50
4	Temperaturas y ciclos empleados en qRT-PCR Tiempo Real	65
5	Perfil de ácidos grasos y contenido de tocoferoles y carotenoides en aceite de <i>J. cinerea</i> y <i>J. curcas</i>	70
6	Compuestos identificados por FIA-ESI-MS/MS en modo de ionización negativa de extractos metanólicos de pasta de semilla de <i>J. cinerea</i> y <i>J. curcas</i>	73
7	Condiciones definidas para PCR	77

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas del género *Jatropha* se caracterizan por su amplia adaptación a diversas condiciones agrícolas y climáticas: zonas áridas, regiones con precipitaciones abundantes o escasas y suelos marginales. Se distribuyen ampliamente alrededor del mundo, principalmente en regiones tropicales de América, África y Asia, conociéndose hasta el momento aproximadamente 186 especies, de las cuales, 48 se encuentran en México y 39 de estas especies son endémicas (Govaerts *et al.* 2012; Steinmann, 2002). De todas las especies del género *Jatropha*, *Jatropha curcas* ha sido la más estudiada y en México es la que se encuentra mayormente distribuida (Abdelgadir y Van Staden, 2013; Loyola-Vargas *et al.*, 2012; Divakara, *et al.*, 2010; Rodríguez-Acosta *et al.*, 2009). Fresno-Ramírez y Orozco-Ramírez (2013) organizaron la distribución de las especies del género *Jatropha* en México en 8 grupos y dentro de las especies más representativas de las zonas áridas se identificaron a *Jatropha cordata*, *Jatropha cardiophylla*, *Jatropha cuneata* y *Jatropha cinerea*.

Jatropha cinerea es una especie nativa del Noroeste de México; se desarrolla en suelos salinos y a lo largo de la costa. Se encuentra adaptada a climas secos y subtropicales y frecuentemente se ve expuesta a largos periodos de sequía (Hishida, M *et al.*, 2013). Existen escasos estudios con respecto al perfil de ácidos grasos en aceite extraído de semillas de una variedad de *Jatropha cinerea* ubicada en Sinaloa, México (Sosa-Segura, *et al.*, 2014; Soto-León *et al.*, 2014), pero aún se desconoce la información referente a la composición fenólica de su semilla y no existen estudios sobre la expresión de genes involucrados en la síntesis de los ácidos grasos.

Ante un mundo en constante movimiento y transformación, el consumo energético de la población mundial es cada vez más elevado debido a los avances científicos y tecnológicos. La obtención de fuentes de energía se ha concretado en la extracción de recursos no renovables como el petróleo, originando una problemática con el paso del tiempo, debido al agotamiento de los yacimientos de dicha fuente energética; esto pudiera derivar en una crisis

económica y social, si no se investigan y se encuentran alternativas viables como fuentes de energía (Reddy y Pamidimarri, 2010). Por otro lado, la emisión excesiva de gases invernadero a la atmósfera es otro punto a destacar, ya que ha desencadenado un efecto adverso en la naturaleza conocido como calentamiento global, el cual ha mermado y dañado la biodiversidad del planeta (Qu *et al.*, 2012). Recientemente, el interés en la producción de biocombustibles a partir de aceites vegetales se ha incrementado considerablemente como resultado de la búsqueda de fuentes alternativas al uso del petróleo como fuente principal para la producción de combustibles y así contrarrestar el impacto negativo en todos los ámbitos en los que se ha influido el abuso del consumo de petróleo (Loyola-Vargas *et al.*, 2012; Achten *et al.*, 2008; Verrastro y Ladislaw, 2007).

En base a lo mencionado anteriormente, se deberán investigar soluciones que no impliquen regresiones en la mejora ante la problemática que se ha abordado. Según reportes recientes (Martínez *et al.*, 2010), una alternativa de biocombustible son las plantas del género *Jatropha*, caracterizándose por su crecimiento en condiciones climáticas adversas, por su producción de semilla, su reconocimiento por ser una planta que puede producir biodiesel de calidad alta y además de la existencia de especies que contienen compuestos que las hacen no ser una opción alimenticia debido a su toxicidad y su incapacidad de asimilación (Reddy y Pamidimarri, 2010; Gubitz *et al.*, 1999).

Se han realizado estudios principalmente con plantas de la especie *Jatropha curcas*, sin embargo, en lo que respecta a especies que predominan en la regiones áridas y semiáridas de México como es el caso del Estado de Sonora, el conocimiento en cuanto a su utilización como recurso para la obtención de biocombustibles es escaso, despertando un interés ya que son endémicas de la región. Se ha evaluado la composición fenólica y componentes de la semilla de las especies *Jatropha cordata* y *Jatropha cardiophylla* para detectar si dichas especies son viables para ser administradas como alimento para ganado, sin hacer énfasis en la extracción de aceite para su transformación en biocombustible (Gámez-Meza, *et al.*, 2013).

Se ha reportado que el aceite extraído de semillas de *Jatropha* posee potencial para la producción de biodiesel, ya que los ácidos grasos más abundantes presentes en su aceite son el ácido oleico y linoleico (Gubitz *et al.*, 1999). Se encuentra ampliamente reportado que para la obtención de biodiesel de calidad alta en términos de estabilidad, se debe tener un contenido

alto de ácido oleico y que un contenido alto de ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linoleico, impactará negativamente en la estabilidad del aceite (Graef *et al.*, 2009; Gubitzi *et al.*, 1999). Para las semillas de *Jatropha* se encuentra reportado un contenido de ácidos grasos poliinsaturados (principalmente linoleico) de un 30 a 50 % del contenido total de aceite, afectando no sólo la estabilidad del aceite sino también el número de cetano que es un parámetro importante a considerar en la obtención de biodiesel (Ye *et al.*, 2013); es por ello, que es de relevancia evaluar la presencia de compuestos con actividad antioxidante que puedan fungir como una protección para el aceite así como analizar la expresión de los genes que se encuentran involucrados en la síntesis de los ácidos grasos principalmente de los ácidos grasos oleico y linoleico.

Se han realizado una amplia cantidad de estudios moleculares en la especie de *Jatropha curcas*; se han llevado a cabo estudios de variabilidad genética de poblaciones de esta especie provenientes de distintas partes del mundo con el fin de mejorar la calidad del aceite (Basha y Sujatha, 2009; Basha *et al.*, 2009; Ambrosi *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2008). Por otra parte, la secuenciación del genoma de *Jatropha curcas* ha proporcionado información importante en relación a la función de varios genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos y su tolerancia a estrés abiótico (Johnson *et al.*, 2011); los análisis transcriptómicos han brindado un panorama más completo para la identificación de las funciones de varios de los genes principales en la síntesis de ácidos grasos en *Jatropha curcas* e inclusive se ha llegado a silenciar el gen *FAD2-1* el cual es considerado como el responsable de la conversión del ácido oleico a linoleico (Qu *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2012) . Sin embargo, la información en relación a especies nativas del Estado de Sonora es insuficiente.

Para *Jatropha cinerea* no se tienen estudios sobre la composición fenólica de su semilla y hasta el momento no se tiene registro sobre el nivel de expresión de los genes que se encuentran involucrados en la biosíntesis de ácidos grasos de las especies que se desarrollan en la región. Es por ello que el objetivo de este estudio es analizar la composición fitoquímica y la expresión de genes involucrados en la síntesis de los ácidos grasos oleico y linoleico en la semilla de *Jatropha cinerea*.

II. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del género *Jatropha*

El género *Jatropha* pertenece a la familia de las Euphorbiaceae. Se distribuye principalmente en las regiones de América, África y Asia, comprendiendo aproximadamente 186 especies (Govaerts *et al.*, 2012). Dehgan y Webster (1979), hacen énfasis en que la mayoría de las especies pertenecen a regiones tropicales, subtropicales y semiáridas de América; sólo seis especies fueron encontradas en África y Asia. Más tarde, Hemming y Radcliffe-Smith (1987) señalaron la presencia de 26 especies de *Jatropha* en seis diferentes regiones localizadas al noreste del África tropical, resaltando que dicha área conocida como el ‘Cuerno de África’ es endémica. Steinmann (2002) reporta que existen 186 especies de *Jatropha* alrededor del mundo, de las cuales 48 se encuentran presentes en México y 39 de ellas son endémicas. Aproximadamente el 21 % de las especies del género *Jatropha* se encuentran distribuidas sólo en México (Fresnedo-Ramírez y Orozco-Ramírez, 2013).

La región de México que exhibe la mayor diversidad de especies de *Jatropha* es el Istmo de Tehuantepec en el Estado de Oaxaca, donde se encuentran presentes 12 especies. Esta zona posee una relevancia sustancial ecológica por sus condiciones biogeográficas (Fresnedo-Ramírez y Orozco-Ramírez, 2013). En primera instancia, su contacto entre las zonas Neotropicales y Neoárticas, favorece un grado alto de endemismo. Además su geomorfología es única, es una llanura con colinas rodeada por la Sierra Madre de Chiapas y la Sierra Madre de Oaxaca (Barrier *et al.*, 1998). También su clima es único; con la presencia de los vientos del norte durante la estación seca (Octubre-Noviembre y Abril-Mayo), mueve la humedad a través de toda el área y reduciendo la temperatura (Tapia *et al.*, 2007). Estos factores contribuyen a la biodiversidad alta de la región (Fresnedo-Ramírez y Orozco-Ramírez, 2013).

Las plantas del género *Jatropha* son especies suculentas, arbustos y árboles que pierden sus hojas durante períodos de sequía y se caracterizan por poseer raíces profundas, permitiéndoles su adaptación a condiciones semiáridas. Son resistentes a estrés hídrico, pudiendo sobrevivir con un mínimo de precipitación anual de 250 a 300 mm, sin embargo, se requieren al menos 600 mm para la floración y fructificación. La precipitación óptima para la producción de semilla oscila entre los 1000 y 1500 mm (FACT, 2007), que corresponde regiones subhúmedas; mayores precipitaciones (~ 3000 mm) pueden influir en la presencia de hongos en sus raíces restringiendo su crecimiento, excepto en suelos con buen drenaje (Foild, 1996).

Por otra parte, las plantas del género *Jatropha* se distinguen por su capacidad de sobrevivir en suelos secos y condiciones consideradas marginales para la agricultura, pudiendo inclusive arraigarse en grietas de rocas. Sin embargo, no significa que se obtendrá una productividad alta bajo dichas condiciones, pero que la salud del suelo se verá beneficiada por la presencia de éstas plantas, dando lugar a una alteración del suelo mínima, proporcionando una cubierta orgánica sobre la superficie del suelo y aprovecharse para prácticas agrícolas (Brittaine y Lutaladio, 2010).

El estudio de las plantas del género *Jatropha* se ha visto motivado por tres razones prácticas: su potencial como plantas ornamentales, aplicaciones médicas y extracción de aceites de semillas de varias especies para la producción de pinturas y solventes (McVaugh, 1945). A partir de 1950, la obtención de aceite ha ganado importancia debido al uso del aceite de semilla de *Jatropha curcas* como insumo para la producción de biodiesel para ser utilizado en motores de combustión interna (Heller, 1996). Además, es importante destacar que éstas especies poseen el potencial de crecer en ambientes perturbados (King *et al.*, 2009).

2.1.1 Composición de aceites de *Jatropha*

En años recientes, el interés por la producción de biocombustibles a partir de aceites vegetales se ha incrementado considerablemente, debido a que representan una alternativa viable para reducir el consumo de combustibles fósiles que son los principales responsables de la emisión de gases invernadero a la atmósfera (Achten *et al.*, 2008; Verrastro *et al.*, 2009). Sin embargo,

aún se genera una controversia el uso de fuentes agrícolas para reemplazar las fuentes convencionales de energía debido a que las primeras primordialmente su fin último es cubrir el ámbito alimenticio. Por lo tanto, los cultivos que se han considerados como fuentes potenciales para la producción de biocombustibles deben de tener como requisito no estar destinado principalmente para el consumo humano y que el uso de suelos enfocado a satisfacer esta necesidad se vea desviado de su fin principal (Sengo *et al.*, 2010).

Entre los cultivos que se han considerados como potenciales para la producción de biocombustibles se encuentran las plantas del género *Jatropha*, reportándose en sus semillas una cantidad considerable de aceite y en la composición del mismo, un contenido alto de los ácidos grasos oleico y linoleico, proyectándola como un recurso alternativo para la producción de biodiesel ya que al ser estos dos ácidos grasos los que se han encontrado en mayor cantidad, le brindan estabilidad al aceite (Graef *et al.*, 2009; Gubitz *et al.*, 1999).

Jatropha curcas ha sido la especie más estudiada y en la que se mayormente se ha reportado la composición de su aceite, encontrándose como ácidos grasos principales el oleico y el linoleico, representando alrededor del 79 % del contenido total de ácidos grasos presentes en su aceite (Loyola-Vargas *et al.*, 2012; Reddy *et al.*, 2013). Se tiene conocimiento de otros estudios en especies nativas de zonas áridas cuya composición coincide con lo ya reportado en *Jatropha curcas*; tal es el caso de *Jatropha cordata*, *Jatropha cardiophylla*, *Jatropha platyphilla* y *Jatropha cinerea*, en donde se ha encontrado al ácido linoleico como el más abundante seguido del ácido oleico (Gámez-Meza *et al.*, 2013; Sosa-Segura *et al.*, 2014; Soto-León *et al.*, 2014).

2.1.2 Componentes químicos en semillas de *Jatropha*

Las pastas de oleaginosas son los residuos obtenidos después de la extracción de aceite a partir de semilla, ya sea por extracción mecánica (prensado) o por extracción con solventes (hexano). Son consideradas fuentes importantes de proteína y posee también cantidades modestas de minerales (Dryden, 2008). Se encuentra reportado también la presencia de compuestos antioxidantes en pastas de oleaginosas, que por su composición química, no se mezclan con el aceite durante el proceso de extracción (Zeuthen y Bogh-Sorensen, 2003).

Las pastas residuales del proceso de extracción de aceite de semillas oleaginosas contienen una cantidad despreciable de antioxidantes liposolubles. Los compuestos antioxidantes que se han encontrado en las pastas son más polares y consisten en ácidos fenólicos, ya sea libres o esterificados, flavonoides (detectados en casi todas las pastas residuales de semillas de oleaginosas, al menos en pequeñas cantidades) y en menor proporción lignanos y sus derivados (Schmidt y Pokorny, 2005).

2.1.2.1 Compuestos fenólicos en *Jatropha*

Los compuestos fenólicos son un grupo de compuestos químicos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se encuentran en la mayoría de las frutas y vegetales frescos así como en tallos, raíces y hojas de plantas (Waterman y Mole, 1994). Poseen de uno o más anillos aromáticos o uno o más grupos hidroxilo. En plantas son los metabolitos secundarios más abundantes con más de 8000 estructuras fenólicas conocidas hasta el momento, que van desde simples moléculas como ácidos fenólicos hasta sustancias altamente polimerizadas como taninos (Dai y Mumper, 2010).

Los compuestos fenólicos poseen diferentes propiedades, generalmente se encuentran involucrados en la defensa contra la radiación ultravioleta o la acción de patógenos, parásitos, depredadores así como su contribución en el color de las plantas (Dai y Mumper, 2010). Otra propiedad y que es considerada la más importante es la antioxidante, siendo capaces de capturar diferentes especies reactivas de oxígeno debido a sus propiedades de donadores de electrones. Su efectividad antioxidante en alimentos depende no sólo de la ubicación y número de grupos hidroxilo sino también la ubicación física, interacción con otros componentes de los alimentos y condiciones ambientales (Velioglu *et al.*, 1998).

Para el género *Jatropha* se encuentran reportados varios estudios referentes a la presencia de compuestos fenólicos en semilla. En *Jatropha curcas*, Oskoueian *et al.* (2011), detectó ácido gálico, pirogalol, rutina, miricetina y daidzeína, mientras que Perea (2013) identificó ácido p-cumárico, ácido o-cumárico, miricetina, quercitina, ácido sinápico, ácido ferúlico, rutina, ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido cafeico, apigenina y kaempferol. Por otra parte, en especies nativas del Estado de Sonora, Alday (2011) reportó la presencia de

ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido sinápico y miricetina en *Jatropha cardiophylla* y *Jatropha cordata*.

2.2 *Jatropha curcas*

Jatropha curcas es una planta proveniente de la familia Euphorbiaceae, conocida en Mesoamérica como piñón. En México, se encuentra ampliamente distribuida en las costas del Océano Pacífico y del Golfo de México, desde Sinaloa hasta Chiapas y del norte de Veracruz hasta la península de Yucatán (Fresnedo-Ramírez y Orozco-Ramírez, 2013). A pesar de que sus semillas son tóxicas para los mamíferos, se le ha dado varios usos como medicamento, que ha predominado en la historia en el sur de México. Con el paso del tiempo, estas especies han ganado un interés económico importante debido a que en la última década se ha extraído aceite de sus semillas para la producción de biodiesel. *Jatropha curcas* se adapta a tierras marginales, es tolerante a estrés hídrico (permitiéndole crecer en sitios semiáridos) así como también su control en la erosión de suelos (Ovando-Medina *et al.*, 2013).

Jatropha curcas es reconocida como un cultivo energético nuevo por la presencia de cantidades altas de aceites en sus semillas que pueden ser transformadas en biodiesel. La calidad y desempeño del biodiesel dependerá de la composición química de los ácidos grasos presentes en el aceite. El perfil de ácidos grasos del aceite tiene un impacto directo en la calidad de ignición, calor de la combustión y en la estabilidad oxidativa (Qu *et al.*, 2012). Una composición de biodiesel ideal debe tener más ácidos grasos monoinsaturados y menos ácidos grasos poliinsaturados. El aceite de las semillas de *Jatropha curcas* contiene de un 30% a 50% de ácidos grasos poliinsaturados (principalmente linoleico) que repercute negativamente en la estabilidad oxidativa (Qu *et al.*, 2012).

2.2.1 Cultivo de *Jatropha curcas*

En un estudio realizado por GEXSI (The Global Exchange for Social Investment) en 2008, se estimó la superficie cultivada de plantas de *Jatropha curcas* a nivel mundial, calculándose en

1,030,021 ha. Asia presentó la mayor superficie destinada para este cultivo con 911,000 ha, siendo India (407,000 ha), China (105,000 ha) e Indonesia (75,500 ha) sus principales representantes. Le siguió el continente africano con 119,000 ha, siendo los principales exponentes Madagascar (35,700 ha), Zambia (35,200 ha) y Tanzania (17,600 ha). Para el caso de América se estimó un área de 21,000 ha, siendo Brasil (15,800 ha) y México (3,000 ha) los principales países con área dedicada al cultivo de *Jatropha curcas*.

2.2.2 Clima que favorece el desarrollo de plantas de *Jatropha curcas*

Las plantas de *Jatropha curcas* se desarrollan en regiones tropicales y subtropicales, ubicándose sus límites de cultivo entre los 30°N y 35°S. Crecen a altitudes bajas que oscilan entre los 0 y 500 metros sobre el nivel del mar. Además, no son sensibles a la duración del día (la floración es independiente de la latitud), dando lugar a la floración en cualquier período del año (Heller, 1996) y se encuentran bien adaptadas a condiciones de intensidad alta de luz (Baumgart, 2007).

2.2.3 Suelos que favorecen el desarrollo de plantas de *Jatropha curcas*

Los suelos más adecuados para su crecimiento son los arenosos de por lo menos 45 cm de profundidad (Gour, 2006). Los suelos arcillosos pesados son menos adecuados y deben evitarse, particularmente aquellos en los que su drenaje sea irregular, ya que las plantas de *Jatropha curcas* son intolerantes a condiciones de saturación de agua. Se ha reportado la habilidad de crecer éstas plantas en suelos alcalinos, (pH 6.0 a 8.5) (FACT, 2007). Por otro lado, se cuenta con estudios del noroeste de India, donde se afirma la tolerancia de *Jatropha curcas* al riego con agua salina, sin embargo, su rendimiento bajo éstas condiciones no se encuentra documentado (Dagar *et al.*, 2006).

2.2.4 Producción de semilla de *Jatropha curcas*.

Para un rendimiento mejor del aceite, las semillas deben ser colectadas maduras. Las semillas maduras pueden identificarse si el color de los frutos han cambiado de verde a amarillo-café.

La madurez se alcanza a los 90 días posteriores a la floración, pero no todos los frutos maduran al mismo tiempo; de ahí que su colecta es una labor intensiva ya que se realiza de manera manual y a intervalos regulares. El momento y duración del período de colecta varía de acuerdo a las condiciones estacionales de su ubicación. En regiones semiáridas la temporada de colecta puede abarcar un período de 2 meses, implicando colectas diarias o semanales. En condiciones de humedad permanente, la colecta por semana se considera suficiente a lo largo del año. La separación de semillas y cáscaras puede realizarse de forma manual o mecánica (Brittaine y Lutaladio, 2010).

El rendimiento de la semilla dependerá de diversos factores que se encuentren en el sitio en donde se desarrolla la planta (precipitación, tipo y fertilidad del suelo), factores genéticos, edad de la planta y cuidados del cultivo (método de propagación, distribución, poda, fertilización, irrigación, entre otros). La primera colecta se produce entre los 8 y 12 meses de vida de la planta con aproximadamente 0.2 kg a más de 2 kg por planta (Francis *et al.*, 2005; SENASICA, 2012). Los frutos son recolectados cuando comienzan a abrirse. Después de año y medio se efectúan dos colectas anuales, con una colecta promedio de 1.8 Kg. de frutos por planta. Después de 3 años de desarrollo se pueden obtener alrededor de 5 Kg de frutos por planta, de las cuales 3 Kg corresponden a semillas, las cuales se colectan manualmente (SENASICA, 2012).

La producción de frutos y semillas se estabiliza a partir del cuarto o quinto año. El rendimiento por hectárea es de 10 ton de frutos y 6 ton de semilla (con una población de 2,000 plantas por hectárea). Para regiones semiáridas y suelos marginales Heller (1996) y Tewari (2007) mencionan una producción de semilla de 2 a 3 toneladas por hectárea por año, que más tarde confirmaron Ouwens *et al.* (2007). Esta producción se logra con un régimen de lluvias adecuadas en el año. Para plantaciones de 2,000 o 2,500 plantas por hectárea, la colecta es manual. La colecta se realiza en dos o tres ocasiones durante el año, debido a que no todos los frutos maduran al mismo tiempo (SAGARPA, 2012).

2.2.4.1 Riesgos y retos en el cultivo de *Jatropha curcas*

GEXSI (The Global Exchange for Social Investment) después de interrogar a varios expertos alrededor del mundo en el cultivo de *Jatropha curcas*, recopiló varios puntos a los que se han enfrentado durante el desarrollo de dicha actividad:

- ✓ Se ha comenzado a industrializar los cultivos sin embargo la mayoría permanece en estado silvestre.
- ✓ Las expectativas de rendimiento son inciertas debido a la heterogeneidad de los resultados obtenidos hasta el momento y que las investigaciones orientadas a la planta en sí y en las técnicas de cultivo son recientes.
- ✓ Las plantas *Jatropha curcas* no generarán buenos rendimientos si se desarrollan en condiciones pobres; hay tiempos de compensación entre la rehabilitación de suelos marginales y la maximización de producción de aceite.
- ✓ La colecta de los cultivos de *Jatropha curcas* es una labor intensa pudiendo poner en riesgo su viabilidad económica.
- ✓ Las plantas *Jatropha curcas* poseen sustancias tóxicas. Con el tiempo se han ido desarrollando tecnologías para eliminarlos para poder utilizar las pastas de sus semillas para la fabricación de alimento para animales (GEXSI, 2008).

El panorama general proporcionado por el estudio generado por GEXSI (The Global Exchange for Social Investment) es que aún la industria de *Jatropha curcas* se encuentra en una fase temprana. Sin embargo, aproximadamente se han plantado 900,000 ha de *Jatropha curcas* y el número y tamaño de los proyectos para este cultivo generados en todos los países encuestados están creciendo rápidamente (GEXSI, 2008).

2.2.5 Producción de aceite de *Jatropha curcas*

Las semillas son el principal recurso del cual se extrae el aceite. El contenido de aceite en semilla oscila de un 18.4 a 42.3 % (Heller, 1996) pero generalmente permanece en un rango de entre un 30 a un 35 % del peso total de la semilla. El aceite se encuentra principalmente almacenado en la almendra de la semilla, que contiene aproximadamente de un 50 a 55 % del

contenido total de aceite (Jongschaap, 2007). El aceite está compuesto por un 21 % de ácidos grasos saturados y 79 % por ácidos grasos insaturados.

Los métodos tradicionales de extracción de aceite son altamente laboriosos, requiriendo algunos hasta 12 horas para producir un litro de aceite. Para mejorar la eficiencia en la extracción del aceite por medio de expulsos manuales, se recomienda que las semillas se sequen por exposición al sol o tostarse ligeramente por 10 minutos. Una práctica común en la producción a pequeña escala es alimentar los expulsos manuales con la semilla entera. En grandes plantas de procesamiento, la cáscara, que constituye el 40 % del peso total de la semilla, puede ser removida para utilizarse como combustible, ya sea para su quema o como materia prima para la producción de biogás (Brittaine y Lutaladio, 2010).

Producciones a pequeña escala mediante expulsos manuales pueden extraer un litro de aceite por cada 5 – 5.5 kg de semilla aproximadamente. Jongschaap (2007), calcula un rango de un 19 a un 22 % de aceite extraído a partir de la semilla completa y seca y un 30 % a partir de la almendra en peso total.

La extracción manual es relativamente ineficiente, ya que sólo se logra extraer alrededor de un 60 % del contenido de aceite total en la semilla. La extracción automatizada puede extraer desde un 75 a un 80 % del contenido de aceite disponible en semilla, produciendo un litro de aceite por cada 4 kg de semilla seca (Henning, 2000 citado por Achten *et al.*, 2008).

Otro tipo de métodos desarrollados para la extracción de aceite han sido los químicos, cuyo objetivo es aumentar la cantidad de aceite extraído por tonelada de semilla. Los métodos químicos emplean solventes, siendo el más común en la extracción de aceite de *Jatropha curcas* el n- hexano, el cual extrae desde un 95 a un 99 % del aceite contenido en la semilla. Sin embargo, el uso de solventes para la extracción de aceite sólo resulta económico en producciones a gran escala (Brittaine y Lutaladio, 2010).

2.2.6 Producción de biodiesel.

La consistencia y la calidad del aceite son importantes para la producción de biodiesel. La composición física y química del aceite de *Jatropha curcas* puede ser extremadamente

variable. Las características del aceite aparentemente se ven influenciadas por la interacción de factores genéticos y ambientales, como el tamaño y peso de la semilla así como el contenido de aceite en la misma. La madurez de los frutos también puede afectar la composición de los ácidos grasos en el aceite, mientras que el procesamiento y almacenamiento posterior pueden alterar la calidad del aceite (Raina y Gaikwad, 1987, citado por Achten *et al.*, 2008).

El aceite crudo de *Jatropha curcas* es relativamente viscoso, inclusive más que el de canola. Se caracteriza por su contenido bajo de ácidos grasos libres, lo que mejora su almacenamiento a pesar de sus niveles altos de ácidos grasos oleico y linoleico, ambos insaturados, lo que hace que sea más propenso a la oxidación; la presencia de ácidos grasos insaturados le permite permanecer líquido a bajas temperaturas. El aceite de *Jatropha curcas* también posee un número alto de cetano (51). Los bajos niveles de azufre (0.13 %) indican que es menos dañino al ser bajas las emisiones de dióxido de azufre al ser usado el aceite como combustible. Dichas características hacen que el aceite sea altamente adecuado para la producción de biodiesel (Brittaine y Litaladio, 2010).

El aceite de *Jatropha curcas* puede ser usado directamente como combustible líquido en motores de diésel viejos, en generadores y bombas que funcionen a velocidades constantes o en motores más nuevos pero con pequeñas modificaciones en el sistema de combustible. El aceite de *Jatropha curcas* también puede mezclarse con diésel proveniente de recursos fósiles, combinando así las propiedades de éste último con el bajo impacto ambiental del aceite vegetal (Siddharth, 2009; Achten, 2008).

Sin embargo, el aceite de *Jatropha curcas* posee una viscosidad de 20 a 25 veces mayor a la viscosidad del diésel convencional, causando inconvenientes cuando se utiliza el aceite no modificado o mezclas con un porcentaje alto de aceite de *Jatropha* en un motor. Por lo tanto, es necesario modificar el aceite para reducir su viscosidad y para hacerlo más adecuado para su uso en un motor (Siddharth, 2009). Los métodos empleados para llevar a cabo dicha modificación son la pirólisis y la micro-emulsificación mediante solventes tales como metanol, etanol y butanol, pero el método más común de conversión del aceite de *Jatropha* a biodiesel es la transesterificación. Este método es una reacción entre el aceite de *Jatropha* y metanol para la obtención de metil-ésteres más glicerol como derivado. El

biodiésel puede ser usado directamente en un motor de diésel o en una mezcla con diésel convencional (Siddharth, 2009; Achten, 2008).

2.2.6.1 Experiencias con biodiésel de *Jatropha curcas* en México

Los expertos en materia de biocombustibles, durante la administración del presidente mexicano Felipe Calderón en el periodo 2006 – 2012, pensaron que la proximidad del país con los Estados Unidos de América y las expectativas generadas a nivel internacional en relación a los biocombustibles aunado a la promulgación en 2008 de la Ley para la Promoción y Desarrollo de Bioenergía, el gobierno mexicano abriría exitosamente las puertas a la inversión y las oportunidades de mercado para los biocombustibles. Sin embargo, a 5 años después de la Ley de Bioenergía, México no tiene una industria en biocombustibles (Eastmond *et al.*, 2014).

Los inversionistas en biocombustibles responsabilizan de dicha situación principalmente a los subsidios en combustibles fósiles y a la falta de incentivos financieros por parte del gobierno mexicano para la bioeconomía (Torres, 2011; Global Medios, 2011 citados por Eastmond *et al.*, 2014). También problemas estructurales, políticos y contextuales tienen una influencia importante (Eastmond *et al.*, 2014).

Se han presentado programas en materia de bioenergéticos entre ellos el Programa de Producción Sustentable de Insumos para Bioenergéticos y de Desarrollo Científico y Tecnológico (SAGARPA, 2008 citado por Eastmond *et al.*, 2014) y el Programa de Introducción de Bioenergéticos en México (SENER, 2009 citado por Eastmond *et al.*, 2014) donde se muestra una visión prometedora sobre la industria de biocombustibles que se desarrollaría en el periodo 2007 – 2012, sin embargo a la fecha no se ha materializado ninguna de estas iniciativas pero han servido como guía para el desarrollo y la investigación científica y tecnológica, pretendiendo resolver diversas interrogantes en relación a la seguridad alimentaria, la pérdida de biodiversidad, contaminación, cambio de uso de suelo y disponibilidad de agua (Eastmond *et al.*, 2014).

El criterio más importante para la selección de materias primas potenciales para la obtención de biocombustibles fue la idoneidad de diferentes especies en ciertas condiciones

climáticas y biofísicas. Otro criterio sumamente importante (escrito en la Ley de Bioenergía) es la exclusión del maíz como materia prima para la producción de biocombustibles a menos que se contara con un excedente, el cual no es probable que se dé ya que desde la década de los 1960's, México no ha tenido producción suficiente de maíz para su propio consumo. Se le ha dado al maíz una relevancia en México y no solamente por ser el cultivo alimentario básico sino por ser considerado también un cultivo sagrado por sociedades indígenas, por lo que representa su origen y domesticación en el país y de ahí, viene la necesidad y sentimiento de responsabilidad por su conservación (Eastmond *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta lo anterior, SAGARPA generó una lista de cultivos prometedores como fuentes de materia prima para la obtención de biocombustibles: caña de azúcar, sorgo dulce y la remolacha azucarera para etanol y *Jatropha*, aceite de higuera y aceite de palma para biodiesel (Eastmond *et al.*, 2014).

En 2007, las plantas del género *Jatropha* fueron consideradas como una excelente opción para la producción de biodiesel en áreas tropicales y semi-tropicales y fue seleccionada como materia prima principal para diversas iniciativas en México, con tres proyectos desarrollados por compañías privadas en los Estados de Chiapas y Yucatán (Zamarripa-Colmenero *et al.*, 2009).

Como se ha reportado ampliamente, algunas de las principales dificultades que se han experimentado en proyectos de *Jatropha* se desprenden del cultivo en sí, como la falta de técnicas de cultivo para domesticación de la planta y la falta de información en cuanto a su potencial genético. Por otro lado, la falta de información para los agricultores del cultivo, representa un reto para el desarrollo de la industria de biocombustibles en México (Rucoba-García *et al.*, 2013).

2.2.7 Estudios moleculares en *Jatropha curcas*

A pesar del conocimiento que se tiene sobre las rutas de biosíntesis para ácidos grasos, el conocimiento es escaso sobre la variación en cuanto a la cantidad y el tipo de lípidos que la planta produce en sus tejidos y órganos (Gu *et al.*, 2012). El conocimiento de la ruta anabólica y de los genes que codifican para las enzimas que participan en dicho proceso permitirá su

modificación (Loyola-Vargas *et al.*, 2012). Recientemente se ha reportado la modificación de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos en semillas de *J. curcas*, logrando disminuir la producción de ácido linoleico y aumentar la síntesis de ácido oleico. Se han identificado en *Jatropha curcas*, los genes responsables de la longitud de la cadena del ácido graso y su nivel de saturación (Ye *et al.*, 2009). Entre ellos el gen *JcFAD2-1*, siendo el más importante ya que regula la conversión de ácido oleico a linoleico; donde encontraron que la supresión de su expresión en plantas de *J. curcas* mediante el uso de ARN de interferencia (ARNi), permitió generar resultados que mostraron mayores niveles de ácido oleico sin afectar las características agronómicas (Qu *et al.*, 2012).

Estudios recientes han corroborado la presencia y función de las enzimas responsables para la obtención de ácido oleico y linoleico en semillas de *Jatropha curcas* (Ye *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2011; Gu *et al.*, 2012; Qu *et al.*, 2012). Las enzimas en las que se hace énfasis son ACP1, KASII y D9SD para la producción de ácido oleico y FAD2-1 y FAD2-2 para el ácido linoleico. La función de varios genes involucrados en la biosíntesis de ácidos grasos han sido identificados en la planta modelo *Arabidopsis* (Ye *et al.*, 2013).

La cantidad común de linoleato en *Jatropha curcas* es aproximadamente de un 30 – 50% del contenido total de ácidos grasos, que reduce enormemente la estabilidad oxidativa del aceite, conduciéndolo a la rancidez y al decremento de su vida útil. Inclusive concentraciones bajas de ésteres grasos poliinsaturados ejercen un efecto desproporcional en la estabilidad oxidativa del biodiesel. Se sabe que el biodiesel con contenido alto de ácidos grasos monoinsaturados, poseen excelentes características con respecto a la calidad de ignición, emisiones de óxidos de nitrógeno y estabilidad del combustible. Lo ideal para el biodiesel es sustituir el ácido linoleico por el ácido oleico debido a que las desaturaciones reducen la estabilidad del mismo y afecta el número de cetano (Ye *et al.*, 2013).

2.3 *Jatropha cinerea* (Jci)

Jatropha cinerea, habita en climas cálidos, secos y semisecos desde el nivel del mar hasta los 1500 metros (López e Hinojosa, 19 '8), pudiendo también observarse comúnmente en llanuras,

laderas y a los bordes de las carreteras (Turner *et al.*, 2005). Comúnmente se le conoce como ‘Lomboy’, ‘Torito’ o ‘Sangregado’. Se distribuye ampliamente por la costa del Estado de Sonora, en la península de Baja California y se tiene conocimiento de pocas poblaciones al sur del Estado de Arizona (Figura 1) (Turner *et al.*, 2005).

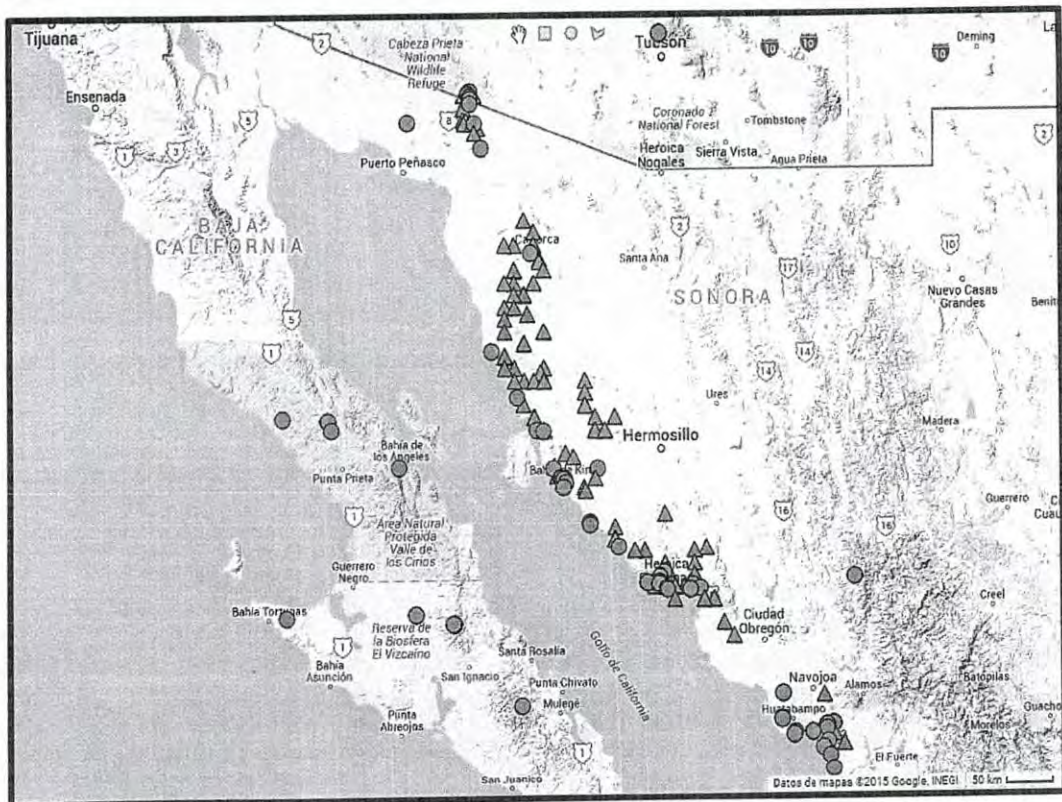


Figura 1. Distribución de *J. cinerea* en el Noroeste de México. Simbología: Poblaciones = ● Avistamientos=▲. Mapa tomado de: SOUTHWEST ENVIRONMENTAL INFORMATION NETWORK, SEINet. 2015. Fecha de consulta: 06 de noviembre. Disponible en: <http://swbiodiversity.org/seinet/index.php> .

Jatropha cinerea es un arbusto que puede llegar a medir los 7 metros de alto y de tallos delgados, sus hojas asemejan la forma de riñón, sus flores son rosadas y de apariencia tubular o globular y sus frutos son redondos (López e Hinojosa, 1988). Se caracteriza además por soportar largos períodos de sequía y su desarrollo en suelos salinos, (Figura 2). La floración se da durante la temporada de lluvias, que en la región, generalmente ocurre entre los meses de junio y octubre (Castellanos y Esqueda, 2012). (Figura 3).



Figura 2. *J. cinerea* en época seca y de floración en la costa del municipio de Hermosillo, Sonora.



Figura 3. Estructuras principales de *J. cinerea*. A) Hoja, B) Flores y C) Fruto.

A esta especie se le atribuyen diversos usos medicinales en los Estados de Baja California Sur y Sonora, dentro de los cuales se distinguen la cicatrización de heridas, particularmente aquellas que no cierran y llagas bucales. También se conoce que tiene la propiedad de detener hemorragias de la nariz, eliminar enfermedades del cuero cabelludo y tratar el escorbuto o la piorrea; todo esto mediante la preparación de extractos, obtenidos por la cocción de la cáscara del tallo, raíces y hojas (López e Hinojosa, 1988).

Por otra parte, se tiene constancia de reportes donde se ha comparado a las especies de *Jatropha curcas* y *Jatropha cinerea* y su respuesta a estrés salino en plántulas en crecimiento a diferentes concentraciones (Hishida *et al.*, 2013) así como las respuestas de enzimas antioxidantes ante el efecto de la salinidad en ambas especies (Hishida *et al.*, 2014). Aunque ambas especies se vieron afectadas en la producción de biomasa a diversas concentraciones, *Jatropha cinerea* se impuso a *Jatropha curcas* en su tolerancia y adaptación en suelos salinos, presentando características más favorables para su desarrollo y adaptación en suelos salinos que *Jatropha curcas*. Dicha información sugiere que *Jatropha cinerea* puede ser una especie adecuada para su estudio en la obtención de aceite por su producción de semillas en condiciones hostiles como lo es el estrés por salinidad, ya que es uno de los factores que limita el desarrollo y producción de *Jatropha curcas* en la región (Hishida *et al.*, 2014).

2.4 Composición de los aceites vegetales

Los aceites y grasas vegetales forman parte de una familia de compuestos químicos denominada lípidos (Bueno, 2012). Comúnmente son extraídos de distintas partes de las plantas como las semillas o frutos (Zielinska y Nowak, 2014). Los aceites vegetales están formados, principalmente, por triacilgliceroles o triglicéridos, moléculas compuestas por tres ácidos grasos unidos a un glicerol, así como se muestra en la Figura 4. Los triglicéridos constituyen el principal componente molecular de grasas y aceites vegetales (Bueno, 2012). Un aceite puede diferenciarse de una grasa debido a que el primero es considerado producto de origen vegetal y tiene una consistencia líquida, mientras que la grasa, es de origen animal y presenta una consistencia sólida y/o semisólida. Una característica de las grasas y los aceites es que tienen un carácter apolar fuerte, por lo tanto son insolubles en agua, pero son altamente solubles en sistemas orgánicos como éter, hexano y cloroformo, entre otros. De esta forma, los triglicéridos pueden ser extraídos de los tejidos vegetales y animales con el uso de solventes no polares (Herrera y Rico, 2015).

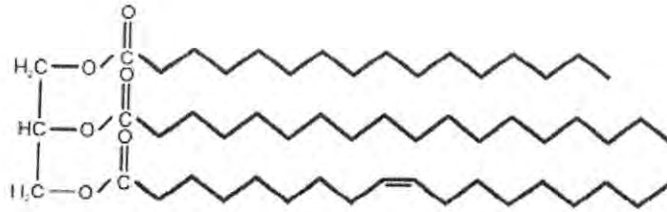


Figura 4. Estructura química de una molécula de triacilglicérido.

2.4.1 Ácidos grasos.

Un ácido graso es una biomolécula de naturaleza lipídica que consta de una cadena hidrocarbonada (región apolar) con un extremo carboxílico (región polar) y se deriva de la hidrólisis de las grasas. Los ácidos grasos constituyen del 94 al 96 % del peso total de la molécula de triglicérido en un aceite vegetal y el número de carbonos en la cadena puede oscilar entre 14 y 22 (Bueno, 2012). Las características físicas y químicas de los aceites y las grasas se ven altamente influenciadas por el tipo y proporción de los ácidos grasos presentes en el triacilglicerol, clasificándose en saturados, monoinsaturados y poliinsaturados (Zambiasi *et al.*, 2007).

Los ácidos grasos saturados (SFA) son aquellos que no poseen dobles enlaces en su molécula, formando parte de las grasas y las mantecas. Bajo condiciones normales, estos compuestos son sólidos blanquecinos. Los ácidos grasos cuya cadena sea mayor a 10 átomos de carbono no se volatilizan y son insolubles en agua. Entre los ácidos grasos saturados encontrados en aceites vegetales se tiene al mirístico, palmítico, estéarico o araquídico (Tabla 1). Ácidos grasos saturados con menor longitud de cadena (8 a 10 carbonos) se encuentran en la naturaleza en forma de triglicéridos (Bailey, 1984).

Tabla 1. Ejemplos de ácidos grasos saturados (SFA)

Nombre Común	Nombre IUPAC	Fórmula	Símbolo
Ácido Caprílico	Ácido Octanoico	CH ₃ (CH ₂) ₆ COOH	C8:0
Ácido Cáprico	Ácido Decanoico	CH ₃ (CH ₂) ₈ COOH	C10:0
Ácido Láurico	Ácido Dodecanoico	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH	C12:0
Ácido Mirístico	Ácido Tetradecanoico	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH	C14:0
-	Ácido Pentadecanoico	CH ₃ (CH ₂) ₁₃ COOH	C15:0
Ácido Palmítico	Ácido Hexadecanoico	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	C16:0
Ácido Margárico	Ácido Heptadecanoico	CH ₃ (CH ₂) ₁₅ COOH	C17:0
Ácido Esteárico	Ácido Octadecanoico	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	C18:0
-	Ácido Nonadecanoico	CH ₃ (CH ₂) ₁₇ COOH	C19:0
Ácido Araquídico	Ácido Eicosanoico	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH	C20:0
Ácido Behénico	Ácido Docosanoico	CH ₃ (CH ₂) ₂₀ COOH	C22:0
Ácido Lignocérico	Ácido Tetracosanoico	CH ₃ (CH ₂) ₂₂ COOH	C24:0

El ácido palmítico es el más ampliamente distribuido de los ácidos grasos saturados, se encuentra prácticamente en todas las grasas vegetales y animales, en cantidad de, por lo menos, un 6 a 8 % y es el principal constituyente de la manteca de cerdo, sebo, aceite de palma, manteca de cacao y otras mantecas vegetales. El ácido esteárico se halla también ampliamente distribuido; algunos aceites vegetales lo contienen alrededor del 1 al 3 %. Los ácidos araquídico, behénico y lignocérico sólo se encuentran en la grasa de la leche y algunos aceites de semillas como el cacahuate contiene del 1 al 3 % de cada uno (Bailey, 1984).

Con frecuencia los ácidos grasos contienen una o más dobles ligaduras, es decir que son “insaturados” (Tabla 2), y generalmente se encuentran en compuestos líquidos incoloros siendo los más comunes el ácido oleico y linoleico (Zielinska y Nowak, 2014; Koolman y Röhm, 2005). Uno de los principales parámetros que afectan las propiedades de los ácidos grasos y en consecuencia a las de los aceites que los forman es el grado de insaturación. Los dobles enlaces pueden variar tanto en número como posición dentro de la cadena carbonada (Bueno, 2012). Los ácidos grasos insaturados suelen presentar de forma natural la configuración geométrica *cis*, pudiendo adoptar la forma *trans* como resultado de ciertas

manipulaciones a las que se someten las grasas y aceites (León-Camacho, 1997 citado por Morales, 2012). Para su nomenclatura se emplea una clave única de varias cifras, por ejemplo 18:2; 9,12 para el ácido linoleico. La primera cifra indica el número de carbonos de la molécula y la segunda corresponde a las dobles ligaduras presentes. Las posiciones de las dobles ligaduras se indican luego del punto y coma (Koolman y Röhm, 2005). Existen dos clases de ácidos grasos insaturados llamados monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA).

Tabla 2. Ejemplos de ácidos grasos insaturados

Nombre Común	Nombre IUPAC	Fórmula	Símbolo	Familia Omega
Ácido Palmitoleico	Ácido delta-9-cis- hexadecénico	$C_{16}H_{30}O_2$	C16:1	7
Ácido Oleico	Ácido cis-9-octadecenoico	$C_{18}H_{34}O_2$	C18:1	9
Ácido Gadoleico	Ácido cis-11-eicosenoico	$C_{20}H_{38}O_2$	C20:1	9
Ácido Linoleico	Ácido (9Z,12Z)-9,12- Octadecadienóico	$C_{18}H_{32}O_2$	C18:2	6
α -Ácido Linolénico	Ácido (9Z,12Z,15Z)- octadeca-9,12,15-trienoico	$C_{18}H_{30}O_2$	C18:3	3
γ - Ácido Linolénico	Ácido cis-6,9,12- octadecatrienoico	$C_{18}H_{30}O_2$	C18:3	6
Ácido Araquidónico	Ácido Eicosa-tetraenoico	$C_{20}H_{32}O_2$	C20:4	6
Ácido Eicosapentanoico	Ácido (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)- icosa-5,8,11,14,17- pentaenóico	$C_{20}H_{30}O_2$	C20:5	3
Ácido Docosahexanoico	-	$C_{22}H_{32}O_2$	C22:6	3
Ácido Ricinoleico	Ácido (9Z,12R)-12- Hidroxi-octadec-9-enoico	$C_{18}H_{34}O_3$	C18:1	9

Los ácidos grasos monoinsaturados son aquellos que presentan en su estructura un solo doble enlace, siendo abundantes en aceites vegetales tales como el aceite de oliva, canola y palma (Gatica, 2011). Ejemplos de ácidos grasos monoinsaturados se tiene al ácido palmitoleico y oleico. El ácido oleico es el ácido graso más ampliamente distribuido, encontrándose en más o menos proporción similar en todos los aceites y grasas. El ácido oleico es el principal componente de la mayor parte de los aceites vegetales líquidos,

alcanzando el 20 % o más del total de ácidos grasos (Bailey, 1984). Desde el punto de vista nutricional, el consumo de alimentos con contenido alto en ácido oleico ejerce un efecto hipocolesterolemizante neto, aunque de menor magnitud que el atribuido a los ácidos grasos poliinsaturados (Astiasarán, 2003). Sin embargo, una de las propiedades más interesantes del consumo de ácidos grasos monoinsaturados es su resistencia a la oxidación (Covas, 2006).

Los ácidos grasos poliinsaturados son aquellos que en su estructura presentan más de un doble enlace y están presentes en las grasas animales, en aceites vegetales y alimentos de origen marino. Los dos tipos principales de ácidos grasos poliinsaturados son los de la serie ω -6 y ω -3. El ácido predominante de la serie ω -6, es el ácido linoleico (C18:2) que proviene principalmente de aceite de semillas, aunque también las grasas animales contienen pequeñas cantidades de linoleico y son estos tipos de ácidos grasos (pertenecientes a la serie ω -6), los que producen una disminución de la colesterolemia por reducción de las LDL (Lipoproteína de baja densidad) (Astiasarán, 2003).

El ácido graso procedente del reino vegetal representativo de la serie ω -3, es el ácido linolénico (C18:3). Los aceites de soja, borraja, colza y linaza, las nueces y las verdolagas son fuentes importantes de ácido linolénico. Ambos tipos de ácidos grasos poliinsaturados se consideran que son ácidos grasos esenciales porque no se sintetizan en el organismo y deben de ingerirse en los alimentos (Guerrero y De Luis Román, 2006).

Se conocen otros ácidos grasos poliinsaturados que poseen número mayor de insaturaciones (presencia de dobles enlaces), los cuales han sido difíciles de estudiar por la facilidad con que se isomerizan o polimerizan por la acción del calor o de los agentes químicos así como también por ser más propensos a la oxidación (Bailey, 1984; Guerrero y De Luis Román, 2006).

2.4.2 Protección natural del aceite

Los antioxidantes naturales son constituyentes de muchas frutas y vegetales y han atraído la atención pública y científica debido a su potencial como anticancerígenos (Tarandjiska *et al.*, 1996). Los antioxidantes son compuestos que inhiben o retrasan la oxidación de otras moléculas al inhibir la iniciación o propagación de las reacciones en cadena de la oxidación.

Los antioxidantes contienen un hidrógeno altamente disponible que puede ser fácilmente tomado por un radical peróxido que de un aceite o un hidrógeno de un éster. El radical libre resulta del antioxidante, pudiendo permanecer estable o reaccionar para formar una molécula estable deteniendo el proceso de oxidación. De esta manera la acción de los antioxidantes interrumpe la reacción en cadena de oxidación (El Diwani *et al.*, 2009).

Los aceites vegetales contienen antioxidantes naturales. Los más comunes son los tocoferoles, los cuales son altamente reactivos con radicales libres, formando compuestos que no contribuyen con la reacción en cadena de la oxidación (Tarandjiska *et al.*, 1996). Por otro lado, otros antioxidantes naturales son los carotenoides, que también poseen una función protectora contra el daño oxidativo y el oxígeno singulete, siendo éste último inactivado mediante β -caroteno (Foote *et al.*, 1970).

2.4.2.1 Tocoferoles

El término general vitamina E se utiliza para designar a un grupo de ocho sustancias similares naturales derivadas del 6-cromanol; cuatro conocidas como tocoferoles (α , β , γ y δ : la posición que ocupa el grupo metilo en el anillo cromanol determina la letra griega utilizada como prefijo), con la cadena lateral saturada y cuatro tocotrienoles (α , β , γ y δ tocotrienol) con la cadena lateral insaturada (Sayago-Gómez *et al.*, 2007). (Figura 5).

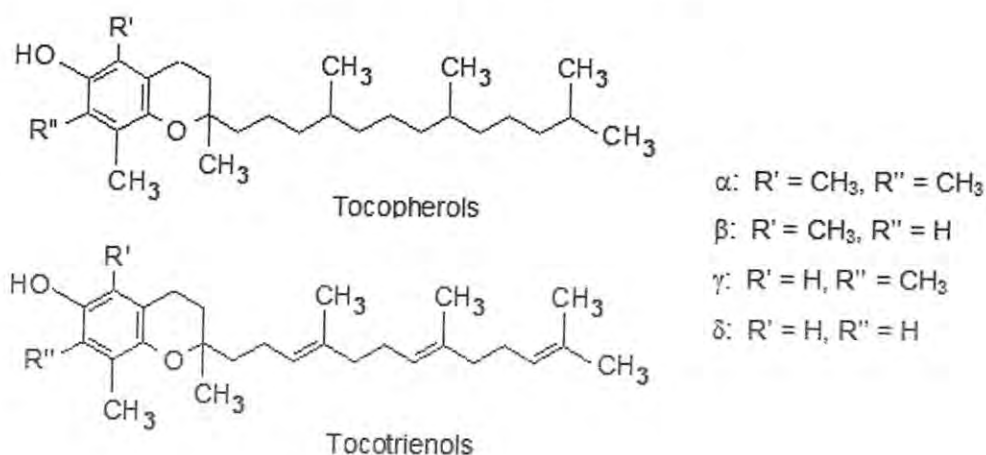


Figura 5. Estructura química de los tocoferoles (parte superior) y tocotrienoles (parte inferior). Tomado de Lampi, (2011).

La vitamina E se encuentra principalmente en el aceite de los vegetales (soja, maíz, algodón y girasol), granos, plantas y en el tejido adiposo de los animales. Se localiza principalmente en las hojas y partes verdes de las plantas, las cuales contienen más α -tocoferol que las partes amarillas. La distribución de los tocoferoles es diferente a los tocotrienoles. Los tocotrienoles son abundantes en el aceite de la semilla de palma. El aceite de girasol es tal vez la fuente más importante de vitamina E (42,1 a 113 mg/100g de aceite) (Hernández y Sastre, 1999).

La principal función de la vitamina E es su acción como antioxidante. Impide la propagación de la oxidación de los ácidos grasos insaturados (PUFAs) al atrapar radicales libres. Los radicales libres son átomos o moléculas inestables con uno o más electrones desapareados. Los PUFAs, los radicales sulfhidrilos de las proteínas y los ácidos nucleicos son compuestos que se ven alterados por su interacción con los radicales libres (Sokol, 1995). La oxidación de estas moléculas conduce a una disfunción celular y daño de los tejidos. La oxidación de los PUFAs en los fosfolípidos de las membranas inician las reacciones de peroxidación de los lípidos, la cual se propaga por sí misma en ausencia de vitamina E. El alfa tocoferil acetato es la forma cuantitativamente más importante utilizada como suplemento dietético en medicina. La vitamina E no esterificada se utiliza como antioxidante en tecnología alimentaria (evita que las grasas y aceites se enrancien) (Hernández y Sastre, 1999).

La vitamina E dona un electrón a estos radicales, los atrapa y forma compuestos intermedios estables. Para recuperar su forma activa reacciona con la vitamina C o con la enzima GS (glutación sintetasa). Su deficiencia conduce a menudo a desestabilizar las membranas biológicas. Es un componente de las membranas mitocondriales, del retículo endoplásmico y núcleo en el eritrocito. Por tanto sus funciones son: componente estructural estabilizador de membranas y un papel catalítico y regulador del metabolismo intermediario. Además es necesaria para mantener normal la estructura y la función neurológica (Hernández y Sastre, 1999).

En ausencia de O₂, los tocoferoles tienen una estabilidad elevada al calor, la luz y alcalinos. En presencia de O₂, pierden sus propiedades antioxidantes (Hernández y Sastre, 1999).

2.4.2.2 Carotenoides

Los carotenoides son compuestos liposolubles que se encuentran conformados por 8 unidades de isopreno con una serie de dobles enlaces conjugados que constituyen el grupo cromóforo característico; esta parte de la molécula de los carotenoides es responsable de la capacidad de absorber luz en la región visible, y en consecuencia de la coloración (Carranco-Jauregui *et al.*, 2011; Lock, 1997).

Los carotenoides pueden clasificarse como carotenos si sólo están formados por átomos de carbono e hidrógeno (hidrocarburos), y como xantofilas, si contienen alguna función oxigenada (Lock, 1997; Shen, *et al.*, 2009).

Se conocen alrededor entre 600 y 700 carotenoides de ocurrencia natural, de las cuales sólo 50 poseen actividad de provitamina A. De esos 50 compuestos, los precursores más importantes de vitamina A en los seres humanos son α - caroteno, β - criptoxantina y β - caroteno, los cuales se encuentran contenidos en la mayoría de los alimentos que poseen carotenoides. (Britton, 1989; Britton, 1991; Lozano-Alejo *et al.*, 2007; Jaswir *et al.*, 2011).

Los carotenoides se encuentran en las plantas en forma geométrica *trans*, sin embargo, su exposición a un proceso térmico induce el cambio de forma geométrica *trans* a *cis* (Updike y Shwartz, 2003) y su contenido se encuentra determinado por varios factores, entre ellos el genético, el ambiental o las estrategias empleadas en el manejo y desarrollo de cultivos, siendo en éste último en donde pueda presentarse un incremento en la concentración de carotenoides, pero también dependerá en dicho contenido el manejo pos-cosecha el que definirá si se presentan alteraciones químicas en los carotenoides y por tanto su biodisponibilidad (Kopsell y Kopsell, 2006).

En las verduras el contenido de carotenoides sigue el modelo general de los cloroplastos de todas las plantas superiores siendo de mayor a menos cantidad la luteína, b-caroteno, violaxantina, neoxantina, zeaxantina, b-criptoxantina y anteraxantina. En frutos las xantofilas se encuentran en mayor proporción, aunque en algunos casos, como en el jitomate, el licopeno es el más abundante. Se ha reportado que en ciertas frutas solo están presentes uno o dos carotenoides, este es el caso del género *Capsicum* (pimientos) que contienen capsantina y capsorubina (Rodríguez-Amaya, 1999; Meléndez-Martínez *et al.*, 2004).

Los carotenoides tienen la capacidad de inactivar algunas especies de moléculas en estado de excitación electrónica principalmente las debidas a reacciones fotosensibles. Como se sabe, la luz puede convertir moléculas a una forma electrónicamente excitada de vida corta, pero que pueden interactuar con otras de su misma especie para formar una molécula estable. Esta última es la que puede reaccionar con una variedad de moléculas para iniciar las reacciones fotoquímicas. En algunas circunstancias se pueden iniciar dos tipos de reacciones: 1) reaccionar con varias moléculas y generar ERON (especies reactivas de oxígeno y nitrógeno) que pueden dar lugar a reacciones diversas y dañar a las células; y 2) reaccionar directamente con el oxígeno y formar una molécula de oxígeno singulete. Esta molécula es extremadamente reactiva capaz de iniciar la peroxidación de lípidos al reaccionar con ácidos grasos saturados, de inactivar proteínas y enzimas al reaccionar con aminoácidos como metionina, histidina, triptófano o tirosina o bien de oxidar residuos de guanina en el ADN o ARN. Se ha demostrado que los carotenoides son efectivos para la inactivación de (1O_2); de esta manera los éstos pueden atrapar catalíticamente el (1O_2) y evitar el daño fotooxidativo iniciado por esta molécula reactiva (Sánchez *et al.*, 1999; Young y Lowe, 2001).

2.5 Genes involucrados en la síntesis de los ácidos grasos oleico y linoleico

2.5.1 Genes involucrados en la síntesis del ácido oleico

2.5.1.1 Gen *ACPI*

El gen *ACPI* codifica para la proteína portadora de acilo (ACP) que es un cofactor esencial en la biosíntesis de ácidos grasos. Son varias las especies que poseen isoformas de ésta proteína,

para las cuales se ha reportado que cuya expresión es constitutiva y en otros casos ha sido más específica (Branen, *et al.*, 2001). La presencia de la enzima ACP1 es necesaria para la síntesis de ácidos grasos en plantas superiores ya que interactúa en el elongamiento de la cadena acilo durante la síntesis de C16 a C18 (Guerra *et al.*, 1986). (Figura 6).

Se tiene conocimiento de distintas variantes de ACP presentes en todos los tejidos de las plantas, aunque no en las mismas cantidades, encontrándose mayor presencia de ACP1 en semilla (Branen *et al.*, 2001). ACP1 es un cofactor cuya presencia es relevante para la síntesis de ácidos grasos en plantas. Se encarga del transporte de cadenas acilo durante la biosíntesis de ácidos grasos a través de los ciclos de condensación, reducción y deshidratación, y se encuentra involucrada en la reacción inicial de desaturación en los ácidos grasos de 16 y 18 carbonos.

Se tiene registro de que ACP1 contribuye con la elongación de C16:0 a C18:0. Por otro lado otros estudios *in vitro* han encontrado que distintas variantes de ACP's presentan especificidad con tioesterasas y desaturasas. McKeon y Stumpf (1982), mencionan que ACP es un cofactor para la enzima SAD que es la encargada de la introducción del doble enlace en C18 para la formación del ácido oleico y los resultados obtenidos por Branen *et al.*, (2001), sugieren que SAD presenta especificidad por ACP1.

2.5.1.2 Gen *KASII*

El paso final de elongación en la forma de plastidios de C16:0 ACP a C18:0 ACP es conducida por los genes *KASII* (Harwood y Stumpf, 1971). Una vez que el ácido graso C16 es elongado a C18, puede posteriormente someterse a desaturaciones para la obtención de ácidos grasos insaturados (Li *et al.*, 2007). Estudios señalan que la sobreexpresión de *KASII* reduce el contenido de C16:0, promoviendo el contenido de 18:0, 18:1 y 18:2 (Leonard *et al.*, 1998). (Figura 6).

2.5.1.3 Gen *D9SD*

El gen *D9SD* codifica para la enzima Delta 9 Estearoil-acilo Desaturasa (D9SD) la cual se encuentra vinculada con la síntesis del ácido oleico. Delta-9-estearoil-ACP desaturasa convierte estearoil-ACP a oleoil-ACP en la ruta metabólica de la biosíntesis de ácidos grasos en plantas contribuyendo a la introducción de un doble enlace entre los carbonos 9 y 10 en presencia de oxígeno y NADH (Thompson *et al.*, 1991; Shah *et al.*, 2000). La relevancia de este gen reside que en la medida en que esté inducido, se generará la enzima correspondiente para la conversión del C18:0 a C18:1 (Gu *et al.*, 2012). (Figura 6).

2.5.2 Genes involucrados en la síntesis del ácido linoleico

2.5.2.1 Genes *FAD2*

La familia de los genes *FAD2* codifica las enzimas 1-acil-2-oleoil-sn-glicero-3-phosphoclina delta 12-desaturasas (*FAD2*) que son claves y responsables para la producción de ácido linoleico a partir de ácido oleico como sustrato en plantas. Se han identificado 3 genes putativos *delta 12 ácido graso desaturasas* en *Jatropha* (*JcFAD2s*) por medio de un amplio análisis en su genoma (Qu *et al.*, 2012). Dentro de los genes *FAD2*, *FAD2-1* de *Jatropha* (*JcFAD2-1*) ha sido de particular interés, ya que regula la conversión de ácido oleico a linoleico. Estudios realizados por Qu *et al.* (2012), han revelado que la expresión de *FAD2-1* es alta en semilla y débil en el resto de tejidos de *Jatropha curcas*, mientras que *FAD2-2* se encuentra fuertemente inducido en semillas pero en hojas su expresión es nula; se encuentra reportado que este patrón de expresión de estos genes es similar a otras especies pertenecientes a la familia de las Euphorbiaceae (Dyer *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2006). (Figura 6).

Es por ello que ante la falta de conocimiento en el aspecto genético de *Jatropha cinerea*, y considerando como ventaja que se encuentra accesible en la región centro del Estado de Sonora, se cree de vital importancia conocer ésta especie tanto química como molecularmente, así como también evaluar el nivel de expresión de los principales genes que participan en la biosíntesis de los ácidos grasos oleico y linoleico.

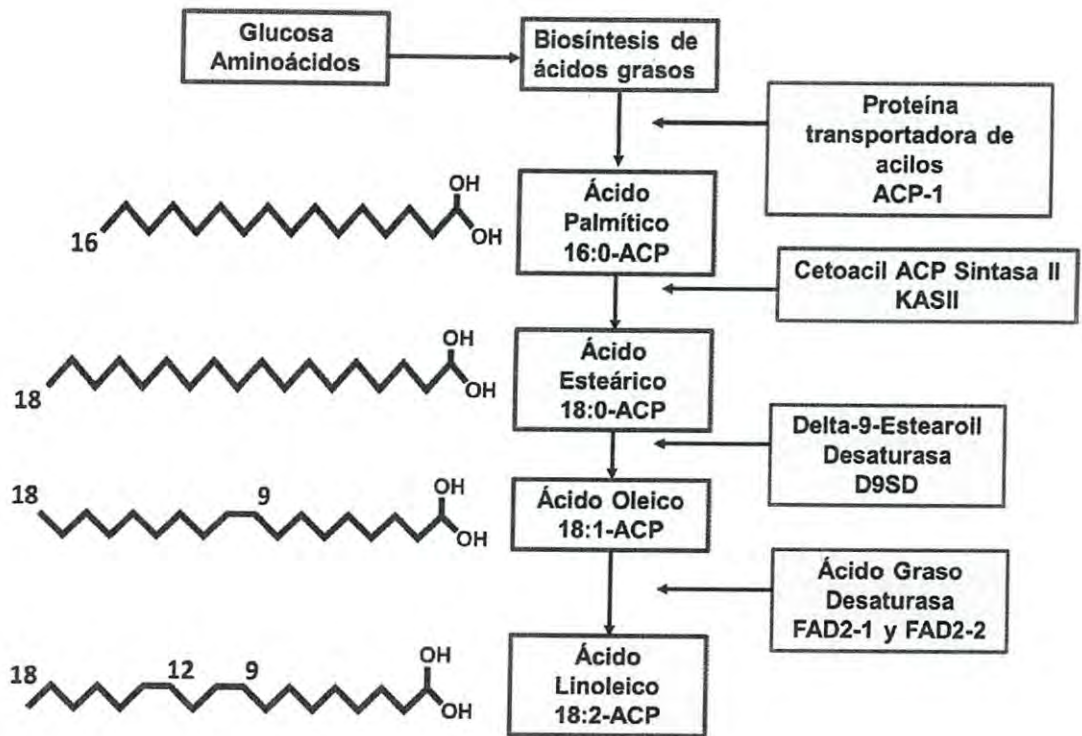


Figura 6. Ruta metabólica de ácidos grasos en plantas (Participación de los genes *ACP1*, *KASII*, *D9SD*, *FAD2-1* y *FAD2-2* en la síntesis de los ácidos grasos oleico y linoleico).

2.6 Análisis de expresión de genes

La capacidad de secuenciar genomas completos desarrollados en la última década ha impulsado a la investigación científica en la dirección de definir la función de cada uno de los genes identificados. Para contribuir con este objetivo se han diseñado técnicas que permiten estudiar la expresión génica global en un determinado tejido y en un momento particular del desarrollo, posibilitando la identificación inicial y el agrupamiento de clases funcionales de secuencias nuevas con una actividad asociada (Pessino *et al.*, 2004).

El término expresión génica abarca desde la activación del gen hasta que la proteína madura se ha localizado en el lugar adecuado y realiza su función, de tal manera que dicha proteína contribuye a la expresión del fenotipo celular. Este hecho puede ser abordado por

técnicas de análisis de proteínas ('binding' molecular, RIA, ELISA, Western Blot, inmunohistoquímica). Además, si la proteína es una enzima se puede estudiar su grado de expresión titulando su actividad enzimática (Hernández *et al.*, 1994).

Sin embargo, es un hecho generalmente aceptado que la abundancia de ARNm y el número de moléculas por célula de ese transcrito se correlaciona con el nivel de síntesis de la proteína correspondiente. Por esta razón, en la práctica, el grado de expresión de un gen puede ser estudiado con aproximación mediante detección y/o cuantificación de los ARNm funcionales del citoplasma. Los métodos utilizados (Northern Blot, protección de ARNasas, RT-PCR e hibridación *in situ*) se basan en su capacidad para detectar ARN mensajeros específicos y no productos proteicos (Hernández *et al.*, 1994).

2.6.1 Extracción de ARN

La posibilidad de aislar ARN lo más intacto posible es esencial tanto para el clonado de genes como para el análisis de la expresión génica. El éxito de cualquier extracción de ARN es totalmente dependiente de la eliminación de toda posible contaminación de ribonucleasas (ARNasas) que degradan el ARN durante y después de la extracción, provocando bajos rendimientos de ARN de longitud completa (Hernández *et al.*, 1994).

Las ribonucleasas son enzimas resistentes y de gran actividad catalítica (Berger y Kimmel, 1987):

- ✓ Son marcadamente resistentes al calor, manteniendo incluso una actividad tras un ligero calentamiento.
- ✓ Son activas dentro de un amplio rango de pH.
- ✓ Usualmente no se requieren cofactores para su actividad.

A diferencia del ADN, el ARN es inestable una vez obtenido el tejido, por la presencia de las ARNasas celulares. Por ello, resulta crítica la congelación del tejido o su rápida homogenización en la solución desnaturalizante. Una fuente potencialmente grande de contaminación con ARNasas son las manos del investigador por las células epidérmicas que se liberan continuamente. Es por ello que es obligado el uso de guantes tanto al realizar la

extracción como preparar soluciones. Los recipientes a utilizar deben de ser de plástico y estériles y si se quiere trabajar con recipientes de cristal es necesario calentarlos a 250 °C durante 24 horas o más (ni siquiera el uso de autoclave nos garantiza la inactivación de ribonucleasas) (Berger y Kimmel, 1987; Sambrock y Maniatis, 1989).

2.6.1.1 Extracción de ARN con fenol

Probablemente los métodos más comunes para la extracción de ácidos nucleicos son los que utilizan fenol (Berger y Kimmel, 1987). El principio básico de la extracción fenólica es la desproteinización del homogenizado celular (solución acuosa que contiene los ácidos nucleicos) y la eliminación de componentes no hidrosolubles mediante una separación de fases con distinta solubilidad (Hernández *et al.*, 1994).

En primer lugar, se efectúa la homogenización del tejido mediante el procedimiento más conveniente. Se añade un volumen de fenol y tras una intensa agitación, se centrifuga la mezcla dando como resultado la separación de dos fases (Hernández *et al.*, 1994):

- ✓ Una fase inferior orgánica que contiene lípidos, proteínas y fragmentos subcelulares varios.
- ✓ Una fase superior acuosa (menos densa) que contiene polisacáridos, ácidos nucleicos y otras pequeñas moléculas hidrosolubles, quedando la mayor parte de las proteínas en la interfase debido a su contenido en aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos (Hernández *et al.*, 1994; Avison, 2007).

En esta separación, el fenol suele usarse en combinación con cloroformo para aumentar la eficiencia de la extracción (Hernández *et al.*, 1994). El fenol puro posee una densidad 1.07 g/cm³ y es por ello que se forma una fase inferior al mezclarse con agua (1.00 g/cm³). El cloroformo asegura la separación de una fase orgánica y otra acuosa debido a que es miscible con el fenol y posee una mayor densidad que éste (1.47 g/cm³), ayudando así a la separación de la fase acuosa con el mínimo riesgo de contaminación con componentes de la fase orgánica (O'Neil *et al.*, 2006).

Otro factor importante en la extracción fenólica es el pH del fenol ya que éste parámetro habrá de determinar la separación del ADN y el ARN entre la fase orgánica y la fase acuosa (Brawerman *et al.*, 1972; Perry y Kelley, 1972). A pH neutro o ligeramente alcalino el ADN y el ARN son retenidos en la fase acuosa. El fenol a pH ácido retiene al ARN en la fase acuosa y precipita al ADN en la fase orgánica debido a que los grupos fosfatos del ADN son más fáciles de neutralizar que los que encuentran en el ARN e inclusive a este pH se minimiza la actividad de las ARNasas (Bradley *et al.*, 2001; Revest y Longstaff, 1998).

Transferida la fase acuosa a un tubo nuevo, las etapas siguientes están destinadas a purificar cada vez más el ARN mediante precipitaciones a temperatura baja con alcoholes (como etanol e isopropanol) y centrifugaciones secuenciales, produciendo un 'pellet' cada vez más libre de contaminantes (polisacáridos, sales, etc.) (Hernández *et al.*, 1994).

2.6.2 Métodos para analizar la expresión de genes

La caracterización molecular de cualquier gen requiere un análisis exhaustivo de la distribución temporal y espacial de la expresión del ARN. Se tiene conocimiento de varias técnicas que son ampliamente utilizadas para la detección y determinación de la abundancia de un ARNm y la elección de que técnica a emplear estará en función de la información que se desee obtener, sin embargo, un sólo método no proporciona toda la información ya que el análisis de expresión de genes requiere el uso de algunas técnicas (Ambio, s.f.).

2.6.2.1 Northern Blot

Roca *et al.* (2004), señalan que la técnica de *Northern blot* es de una amplia utilidad para la comparación de diferencias de expresión en el nivel del ARN mensajero de un determinado gen entre distintas muestras y presenta una ventaja adicional sobre la técnica de *Dot blot*: Una mayor especificidad al producirse una separación previa de las diferentes moléculas de ARN por su tamaño molecular antes de proceder a la hibridación con la sonda marcada.

La técnica consiste en la extracción de ARN del organismo de estudio para después correr una electroforesis en gel de agarosa (Rojas, 2013). Posteriormente, se transfieren los ARN separados a un papel de nitrocelulosa o a un filtro de membrana de nylon para luego incubarse en una solución con un fragmento de ADN de cadena simple radiactivo de un gen en particular; esta sonda de ADN marcada radiactivamente se unirá solo a las regiones del filtro en las que está localizado el fragmento de ARN de interés y de encontrarse el ADN marcado se unirá al ARNm, detectándose por autorradiografía (Gilbert, 2005).

La técnica permite conocer el tamaño preciso de los ARN identificados, reconocer los diferentes tipos de ARNm codificados por un mismo gen para determinar la cantidad y el tejido específico en que se encuentra un ARNm específico, para hacer posible la determinación de los niveles de actividad génica ya sea durante el desarrollo de un organismo o en distintos tejidos, durante un período definido o después de ser expuestos a diferentes estímulos fisiológicos (Rojas, 2013).

2.6.2.2 Hibridación '*in situ*'

La hibridación *in situ* (ISH) es la hibridación de fragmentos marcados de ADN de una hebra o de ARN con secuencias complementarias (sondas) a ADN / ARN celular, que en condiciones apropiadas forman híbridos estables (González-Bombardieri, 1993). Dicho de otra manera, el término hibridación describe la capacidad de las moléculas monocatenarias de ADN o ARN para interactuar (hibridarse) con secuencias complementarias (Ross y Pawlina, 2008). Estas sondas son marcadas con isótopos radiactivos, un nucleótido modificado en forma específica (digoxigenina) o biotina (un marcador multipropósito covalente usado con mucha frecuencia, no radiactivo) para después ponerlas en contacto con las muestras problema. Las sondas radiactivas son detectadas y visualizadas mediante radioautografía, mientras que la digoxigenina y la biotina por métodos inmunocitoquímicos y citoquímicos respectivamente (Ross y Pawlina, 2008; Panduro, 2012). La sensibilidad de esta técnica permite detectar una secuencia de ADN o ARN justo en el sitio físico en el que se encuentra para así analizar su distribución en las células y tejidos (FIBAO, 2007; Wilcox 1993).

2.6.2.3 RT-PCR

PCR son las siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction* o Reacción en Cadena de la Polimerasa. La idea básica de la técnica es sintetizar varias veces un pedazo o fragmento de ADN utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas elevadas, ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* (79 °C a 85 °C), de ahí su nombre comercial más conocido: *taq* polimerasa (Espinoza, 2007). Puesto que la PCR produce una amplificación, para detectar ARNm celular bastaría someterlo a este proceso (RT-PCR) y por el caso que fuera, podría visualizarse con un método de tinción adecuado (Hernández *et al.*, 1994).

Sin embargo, la *taq* polimerasa sólo es capaz de sintetizar ADN a partir de un molde de ADN y es necesario entonces generar una cadena de ADN complementario (ADNc) a partir de ARNm mediante una ADN polimerasa dependiente de ARN, enzima conocida como transcriptasa inversa o RT (Hernández *et al.*, 1994).

El método RT-PCR consiste primero en una extracción de ARN a partir del tejido en el que se quiere estudiar la expresión de un mensajero. El siguiente paso es la síntesis de una cadena de ADNc a partir del ARNm mediante una RT, aprovechándose de la presencia de la cola poli (A) de los mensajeros haciendo uso de un oligo nucleótido sintético de polideoxitimidina (oligo [dT]) que se une a las colas poli (A); esta cola es una característica casi universal en los distintos tipos de ARNm, teniendo entonces una muestra de moléculas de ADNc representativa de los tipos de mensajeros expresados en ese tejido. Seguidamente de esa solución se toma una alícuota y se somete a reacción de PCR utilizando una pareja de cebadores o 'primers' específica del ARNm de interés y si la elección de dichos 'primers' y las temperaturas del proceso son adecuadas, se tendrá en torno a 10^6 moléculas de ADN idénticas correspondientes a un fragmento del ARNm específico que se desea detectar (Hernández *et al.*, 1994).

2.6.2.3.1 RT-PCR semicuantitativa

Con frecuencia, el objetivo del análisis no es determinar de una forma absoluta el número de moléculas de un transcrito de la muestra, sino poder detectar diferencias cuantitativas en la expresión de un gen en distintas situaciones. Esta cuantificación relativa es el propósito de la

mayoría de los experimentos de estudio de expresión génica y también ésta es una de las principales aportaciones de la RT-PCR. Por tanto, midiendo la diferencia de densidad óptica (emisión radiactiva) de los productos de PCR se puede determinar la diferencia en la expresión de un determinado ARNm. Sin embargo, es obvia la necesidad de eliminar la variación debida al 'efecto tubo' (diferencias producidas por degradación parcial del ARN en alguna muestra, distinta eficiencia en la transcripción inversa, errores de pipeteo, etc.). Como control interno para la normalización se puede elegir un ARNm abundante en la célula y relativamente invariable como lo es la β - Actina o la $\beta 2$ - microglobulina (Hernández *et al.*, 1994).

Aunque se requieren de más estudios para determinar el mejor método de normalizar los resultados, la RT-PCR semicuantitativa parece ser bastante reproducible, relativamente resolutive y desde luego, enormemente sensible y específica (Hernández *et al.*, 1994).

2.6.2.3.2 RT-PCR cuantitativa o qRT-PCR Tiempo Real

El objetivo de la PCR en tiempo real es detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de fluoróforos en la reacción. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. Por su parte, el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de ADN de la muestra a diferencia del PCR punto final en donde no es posible detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia blanco (Tamay de Dios *et al.*, 2013). Precisamente, estas dos últimas características representan grandes ventajas del PCR en tiempo real, ya que el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción (Higuchi *et al.*, 1993) sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa como sucede en PCR punto final.

La nomenclatura que se usa también es diferente, si se utiliza ADN genómico entonces se habla de una qPCR (quantitative PCR), si por el contrario, primero se obtiene ADNc y luego se lleva a cabo la PCR, se refiere a una RT-qPCR (Bustin *et al.*, 2005).

Actualmente, la PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. Aun teniendo una cantidad pequeña de templado, el sistema garantiza alta sensibilidad, especificidad y eficiencia. Una de sus aplicaciones más usadas es

para cuantificar cambios leves en la expresión génica mediante la detección de los niveles del ARNm procedente de células o tejidos. La cantidad de ARNm que puede detectar la reacción puede ser a partir de concentraciones bajas a diferencia de la PCR punto final que necesita una concentración mayor (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

2.7 Secuenciación de ácidos nucleicos

Tanto el ADN como el ARN están compuestos por monómeros conocidos como nucleótidos constituidos por un monosacárido de cinco carbonos (siendo una ribosa en el ARN y una desoxirribosa en el ADN), un grupo fosfato y una base nitrogenada que puede ser adenina, timina, citosina o guanina diferenciándose en el caso del ARN que en lugar de timina se tiene uracilo (Stansfield, 1992). El orden que estos nucleótidos presentan se le conoce como secuencia y a los métodos y técnicas empleadas para conocer ese orden se les conoce como secuenciación (De Necochea y Canul 2004).

De Necochea y Canul (2004), señalan que el conocimiento del orden de los nucleótidos proporciona información valiosa y “con una infinidad de aplicaciones porque la diferencia fundamental entre todas las moléculas de ADN que forman el material genético de los seres vivos es la secuencia de estas cuatro bases nitrogenadas”.

El avance alcanzado haciendo uso de la secuenciación de los ácidos nucleicos ha sido enorme, siendo orientada la información generada a partir de esta herramienta hacia múltiples aplicaciones para encontrar respuestas a distintas interrogantes. Se ha podido entender la asociación de enfermedades con la variabilidad genética, la función de genes, el patrón de expresión de genes nuevos, la similitud o variación genética entre especies, la organización de la información genética, el origen de algunos genes, entre otras (Hutchinson III, 2007; Shendure y Ji, 2008). Por otra parte, ha originado el surgimiento de nuevas disciplinas como la filogeografía, filogenómica, metagenómica y genómica (Márquez-Valdemar *et al.*, 2013).

2.7.1 Análisis de las secuencias

Una vez recibidos los resultados de la secuenciación, se generan dos archivos para su análisis: un electroferograma y la secuencia en formato 'fasta'. Un electroferograma es un gráfico que proporciona el secuenciador después de analizar la electroforesis. En él se muestra la secuencia a partir de curvas de fluorescencia (una por cada base nitrogenada) pudiendo abrirse estos archivos en programas como Chromas o BioEdit. Márquez-Valdemar *et al.* (2013) mencionan que antes de continuar con los análisis es importante revisar los electroferogramas, ya que proporcionan mucha información como la calidad del PCR y la confiabilidad de los datos obtenidos.

Ya que se cuenta con la secuencia de interés e independientemente del objetivo de estudio, es importante compararla con las secuencias disponibles en las diferentes bases de datos que se encuentran en Internet. Existen herramientas como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool en la plataforma de NCBI) que es la más usada para corroborar que el fragmento secuenciado era lo que se estaba esperando encontrar. Después con ayuda de programas como BioEdit, se debe crear una secuencia consenso para comparar el sentido Forward y el sentido Reverse, porque las polimerasas tienen diferentes porcentajes de fidelidad o en ocasiones se pueden obtener problemas en la electroforesis de secuenciación, generando falsos polimorfismos. También es importante el uso de la secuencia consenso cuando el fragmento que se está analizando es mayor a 700 pares de bases (pb) debido a que permite obtener un tamaño mayor de la secuencia al completar ambas cadenas (Márquez-Valdemar *et al.*, 2013).

Posteriormente, independiente del propósito del estudio, se debe generar una hipótesis de homología de las bases al comparar y alinear las secuencias entre los organismos secuenciados. La alineación de secuencias consiste en colocar en la misma posición todas las bases. Dentro de los programas que se utilizan para este proceso, el más usado es CLUSTALX, que también forma parte de los programas de edición de secuencias como BioEdit (Márquez-Valdemar *et al.*, 2013).

III. JUSTIFICACIÓN

Se han realizado diversos estudios sobre la caracterización química y molecular de la especie *Jatropha curcas*. En estos estudios se reporta que su aceite se ha empleado para la obtención de biocombustibles y se ha confirmado la presencia de los ácidos grasos insaturados tales como el oleico y linoleico en el aceite de la semilla de dicha especie. Por otro lado, existen otras especies como la *Jatropha cordata* y *Jatropha cardiophylla* en la región centro del Estado de Sonora, las cuales están siendo estudiadas recientemente. Sin embargo, existen escasos estudios sobre la composición química del aceite extraído de semilla de *Jatropha cinerea* y no existen estudios de expresión de los genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos en las especies nativas del centro del Estado de Sonora, limitando el conocimiento para el control de los ácidos grasos poliinsaturados para evadir el efecto negativo de la oxidación de los aceites. Esta especie es de interés debido a su desarrollo en ambientes hostiles como suelos salinos y cambios de temperatura extremos con una producción de semilla abundante.

PLANTEAMIENTO DE LA PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

En base a los antecedentes ya mencionados se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es la relación entre la expresión de los genes *ACPI*, *KASII*, *D9SD*, *FAD2-1* y *FAD2-2* y el contenido de los ácidos grasos oleico y linoleico en semillas de *Jatropha cinerea*?

IV. HIPÓTESIS

El nivel de expresión de los genes *ACPI*, *KASII*, *D9SD*, *FAD2-1* y *FAD2-2* influye en el contenido de los ácidos grasos oleico y linoleico en semillas de *Jatropha cinerea*.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Analizar la composición fitoquímica de la semilla y la expresión de los principales genes involucrados en la síntesis de los ácidos grasos oleico y linoleico en la semilla de *Jatropha cinerea*.

5.2 Objetivos Específicos

- ✓ Determinar la composición fitoquímica de la semilla de *Jatropha cinerea*.
- ✓ Analizar el perfil de expresión de los genes *ACPI*, *KASII* y *D9SD* involucrados en la síntesis de ácido oleico.
- ✓ Analizar el perfil de expresión de los genes *FAD2-1* y *FAD2-2* involucrados en la síntesis de ácido linoleico.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material Biológico

Se realizaron colectas en dos puntos previamente identificados en la región centro del Estado de Sonora, México: 28°49'52.1106"N 111° 44' 23.316" O y 28°49'45.6234"N 111° 57' 12.1176"O. El primero de ellos se ubica a unos cuantos kilómetros antes de Bahía de Kino y el segundo se encuentra en Bahía de Kino (con una distancia entre ambos de aproximadamente 10 Km). Dichas colectas se llevaron a cabo durante los meses de septiembre y octubre de 2013 y 2014 para la obtención de semillas de *Jatropha cinerea*. Las semillas se expusieron al sol por 12 horas, para ser secadas. El peso, largo y ancho de las semillas se estimó tomando un promedio de 30 semillas tomadas al azar. El material se almacenó hasta realizar los análisis correspondientes.

6.2 Extracción de aceite de semillas de *J. cinerea*

Las semillas se molieron en una licuadora (Osterizer, Modelo 4122, México) y procedió a la extracción de aceite en frío usando hexano (Yilmaz y Toledo, 2004) en una relación pasta: solvente 1:6, por 4 horas. La extracción de aceite se realizó en dos ocasiones por 2 h y con hexano. El hexano remanente en el aceite fue removido utilizando un rotavapor (Labconco, Kansas City, MO, USA) a 40°C. El aceite se reflujo con nitrógeno y se almacenó a -20 °C hasta ser analizado físicoquímicamente. Las pastas residuales remanentes de la extracción del aceite fueron secadas y almacenadas a -20°C hasta sus análisis posteriores.

6.2.1 Perfil de ácidos grasos de aceite de *J. cinerea*

Las muestras de aceite (0.1 g) fueron saponificadas y metiladas de acuerdo al procedimiento de la AOCS (Ce 2-66), para la determinación del perfil de ácidos grasos. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAME) se analizaron en un cromatógrafo Agilent 7890A (Agilent, Mexico City, Mexico), con un detector de ionización de flama (FID) y una columna capilar de sílica SP-2560 (100 m x 0.25 mm i.d. 25µm de grosor de película, Supelco, Bellefonte, PA). Se utilizó nitrógeno como gas acarreador con un flujo de 20 cm/s., una temperatura isotérmica para la columna de 180°C. La temperatura del inyector y detector fue de 250 °C. Para la cuantificación de cada uno de los picos se realizó utilizando la estación de trabajo Varían Star ver. 6.0. La identificación de los picos de los FAME se llevó a cabo por comparación con los tiempos de retención de sus respectivos estándares (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). La cuantificación se realizó utilizando el C21:0 como estándar interno. Los resultados se obtuvieron por triplicado y cada réplica contó con su duplicado.

6.2.2 Cuantificación de carotenoides totales en aceite de semilla de *J. cinerea*

La cuantificación e identificación de carotenoides totales se determinó espectrofotométricamente de acuerdo a Szydłowska-Czeniak *et al.*, (2011). Las muestras de aceite de *Jatropha* (1 – 2 g) fueron disueltas en 10 mL de n-hexano, midiéndose su absorbancia en un equipo CARY BIO 100 UV-Vis. Se realizó un barrido espectral y se midió a una longitud de onda de 450 nm. El estándar utilizado fue β-caroteno.

6.2.3 Cuantificación de tocoferoles en aceite de semilla de *J. cinerea*

La cuantificación e identificación de tocoferoles se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de acuerdo al método Ce 8-89 (AOCS, 2009). Dos gramos de aceite se disolvieron en 25 mL de hexano. Las muestras (100 µL) se inyectaron directamente en un cromatógrafo Varian 9050 (Varian México) equipado con un detector ultravioleta (Varian 3400). Se utilizó una columna Supelcosil TM LC-SI, (15 cm x 4.6 cm x 5µm, Supelco, Bellefonte, PA) a temperatura ambiente. La fase móvil fue hexano-isopropanol (99.5:0.5 v/v)

a una velocidad de flujo de 1.7 mL/min. Los tocoferoles fueron medidos a una longitud de onda de 292 nm. Los picos de los cromatogramas fueron identificados por comparación con los tiempos de retención de los estándares α -tocoferol, γ -tocoferol y δ -tocoferol (Supelco-Sigma, Aldrich Química, México).

6.3 Extracciones y determinación analítica de los compuestos fenólicos en extractos metanólicos de semilla de *J. cinerea*

6.3.1 Obtención de extractos metanólicos de pasta de semilla de *J. cinerea*

A 1 g de muestra se agregaron 10 mL de metanol al 70 % (70:30 v/v). Posteriormente la mezcla se homogenizó y sonicó (Sonic 1510 R-DTH, Branson Ultrasonics Corporation, CT, USA) por 30 minutos y se centrifugó bajo las siguientes condiciones: 10000 x g por 15 minutos a 4°C (Heraeus Megafuge 16R Centrifuge, Thermo Scientific, Mexico City, México). Las muestras fueron filtradas en papel Whatman No. 2. La extracción metanólica se repitió dos veces para asegurar la máxima extracción de los compuestos. Los extractos se almacenaron a -20°C (Chitindingu *et al.*, 2007).

6.3.2 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos en extractos metanólicos de *J. cinerea* por HPLC-DAD.

La cuantificación e identificación de compuestos fenólicos se realizó de acuerdo a Cantos *et al.*, 2000. Se empleó un cromatógrafo HPLC Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies 1260 Infinity, México), equipado con una columna Supelcosil TM LC-18, (25 cm x 4 cm x 5 μ m, Supelco, Bellafonte, PA) y detector de arreglos de diodos. La fase móvil fue ácido fórmico al 5 % y metanol 100 % a un flujo de 1.5 mL / min. Se trabajó con estándares de ácido cafeico y epicatequina.

Para la cuantificación se elaboraron curvas de calibración para cuatro de los picos principales de los compuestos fenólicos. El ácido cafeico y epicatequina fueron cuantificados a 280 nm (longitud de onda a la cual presentan su absorbancia máxima) (García-Alonso *et al.*,

2003). Los compuestos fenólicos de los extractos metanólicos fueron analizados por triplicado.

6.3.3 Identificación de compuestos fenólicos en extractos metanólicos de *J. cinerea* por FIA-ESI-IT-MS/MS

Las muestras y los estándares (10 µg / mL) fueron solubilizados en metanol grado masas e inyectados por infusión directa en un espectrómetro de masas con electrospray y trampa de iones (Varian 500 MS, Santa Clara, CA, EUA), utilizando el modo de ionización negativa con nitrógeno como gas nebulizador y helio como gas de colisión. El intervalo de análisis fue de 100-2000 m/z. Los análisis en tándem se obtuvieron por CID. Los iones negativos de compuestos fenólicos se obtuvieron bajo las siguientes condiciones: Flujo de infusión: 10 µL/min, voltaje: -17 kV, temperatura de capilar: 350 °C, flujo de gas auxiliar: 1 mL/min.

6.4 Análisis de la expresión diferencial de genes involucrados en la síntesis de ácido oleico y linoleico en semilla de *J. cinerea*.

6.4.1 Preparación de la muestra

Se tomó un pool (agrupación de semillas) de todas las semillas colectadas en campo de distintos individuos de *J. cinerea*. Se utilizaron semillas de *J. curcas* originarias de una especie veracruzana no tóxica como referencia, las cuales fueron proporcionadas por el Dr. Jorge Martínez Herrera. La molienda de las semillas se llevó a cabo en morteros previamente desinfectados y horneados a 260°C; se dejaron en reposo para luego almacenarse a - 80 °C.

6.4.2 Extracción de ARN total

Para la extracción de ARN total de semillas de *J. cinerea*, se utilizó hielo seco en la base de los morteros previamente almacenados a - 80 °C. Las semillas fueron trituradas y el contenido

se vertió dentro de un tubo Eppendorf de 1.5 mL con 1 mL de TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) frío, siguiéndose las instrucciones del fabricante de dicho reactivo:

- ✓ Una vez adicionada la muestra al tubo Eppendorf con 1 mL de TRIzol[®], se incubó por 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación completa del complejo de nucleoproteína.
- ✓ Se siguió la sugerencia que el fabricante recomienda de realizar un paso adicional antes de continuar con el proceso de extracción, en caso de que el tejido posea un contenido alto de grasas, proteínas, polisacáridos o material extracelular. Se centrifugó la muestra ya adicionada al TRIzol[®] a 12 000 rpm por 10 min a 4 °C y el sobrenadante se traspasó a un tubo nuevo para dar continuidad al proceso de extracción.
- ✓ Se añadió 200 µL de cloroformo por 1 mL de reactivo TRIzol[®] utilizado para la homogenización. Se dejó reposar a temperatura ambiente de 2 a 3 minutos y se centrifugó a 12 000 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante se colocó en un tubo nuevo y se repitió este paso nuevamente.
- ✓ Se tomó el sobrenadante y se llevó a un tubo nuevo y se adicionó 500 µL de isopropanol al 100 %, dejándose incubar por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 12 000 rpm por 10 min y se decantó el sobrenadante dejando el pellet precipitado.
- ✓ Se lavó el pellet con 1 mL de etanol al 75 % y se centrifugó a 7 500 rpm por 5 min. Luego, se eliminó el etanol dejando secar el pellet (ARN precipitado) durante 10 min y se resuspendió en agua libre de ARNasas estéril (50 µL - 100 µL).

6.4.2.1 Cuantificación e integridad del ARN total

Para la cuantificación del ARN total se tomaron 2 µL de cada muestra y se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Se consideró que la relación de absorbancia 260/280 nm fuera entre el rango >1.8 a 2. La integridad del ARN total se analizó por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1 % preparándose de la siguiente manera:

- ✓ Se pesó 0.5 g de agarosa y se depositó en un matraz Erlen-Meyer de 250 mL con 50 mL de buffer TAE 1X estéril.
- ✓ Posteriormente se calentó la mezcla de agarosa con TAE 1X haciendo uso de un horno microondas por un minuto y medio, verificando su disolución cada 30 segundos. Ya que la mezcla no presentó grumos y se tornó transparente, se dejó reposar a temperatura ambiente hasta que la temperatura del matraz fuera soportable al dorso de la mano.
- ✓ Se añadió 1 μ L de GelRed™ (Biotium) y se agitó vigorosamente para después vaciarse lentamente en la placa de electroforesis previamente preparada con los sellos acrílicos, esto para evitar la formación de burbujas. Se colocaron los peines de separación correspondiente y se dejó reposar hasta que la mezcla se solidificara (15 a 20 minutos).
- ✓ Una vez formado el gel, se depositó en el tanque de la cámara de electroforesis. Se vertió la cantidad apropiada de buffer TAE 1X estéril hasta que cubriera el gel y se retiraron los peines con cuidado, evitando que se dañara el gel (Para este punto, la cámara de electroforesis debe estar en total asepsia, siendo previamente lavada con Benzal al 4 %).
- ✓ Se cargaron 2 μ L de muestra de ARN total mezclado con 2 μ L de buffer de carga y se depositaron en cada uno de los pozos.
- ✓ Se llevó a cabo la electroforesis conectando la cámara de electroforesis a una fuente de poder a 80 Volts por 35 minutos aproximadamente.
- ✓ Una vez terminado el proceso, se continuó con la visualización del gel de electroforesis en el fotodocumentador Bio-Imaging System MiniBis pro (Bio America Inc), guardándose la imagen para su análisis posterior.
- ✓ Por último se enjuagó con agua estéril todos los componentes de electroforesis al terminar la corrida, ya que con el paso del tiempo la acumulación de restos de sales puede dañar el equipo. De manera opcional se puede reutilizar el buffer de electroforesis.

6.4.2.2 Purificación de ARN extraído de semilla de *J. cinerea*

La obtención de ARN intacto y de buena calidad es de gran importancia para obtener información fidedigna, sin embargo, en ocasiones la eficiencia de la extracción puede ser no suficiente para aislar ésta o cualquier otra macromolécula deseada de entre toda una mezcla compleja de componentes que han de fungir como “contaminantes” y que dificultarán su análisis (Cultek, 2006). En consecuencia, se requiere hacer uso de otras herramientas para aumentar la calidad de la macromolécula que se pretenda analizar siendo en este caso el ARN extraído de semilla. Para ello, se usó el kit RNeasy MinElute Cleanup Kit de Qiagen, siguiéndose las instrucciones del fabricante.

El fabricante sugiere antes de iniciar el procedimiento de limpieza, considerar los siguientes puntos:

- ✓ Generalmente, no se requiere un tratamiento de la muestra con ADNasa ya que la membrana de sílica de las columnas **RNeasy MinElute** remueven eficientemente la mayoría de ADN que pueda estar presente en la muestra. Sin embargo, es oportuno un tratamiento con ADNasa en caso de que se vayan a emplear aplicaciones que sean sensibles a pequeñas cantidades de ADN, previo a la limpieza del ARN.
- ✓ Los pasos donde se requiera el uso de centrifuga deben operarse a temperatura ambiente (20 – 25 °C), asegurándose que la temperatura no descienda a menos de 20 °C y durante todo el procedimiento trabajar de la manera más rápida posible.

Generalmente, de las extracciones de ARN que se realizaron en este estudio, se obtuvo una cantidad de muestra superior a los 100 µL, por lo cual se siguió el procedimiento sugerido por el fabricante para el tratamiento de muestras con un volumen superior al ya mencionado:

- ✓ Se ajustó el volumen a 200 µL de la muestra con agua libre de ARNasas para posteriormente añadir 700 µL del buffer RLT y se mezcló bien.
- ✓ Se añadieron 500 µL de etanol al 96 - 100 % y se mezcló bien. Luego se transfirió la muestra (Aproximadamente 700 µL) a una columna **RNeasy MinElute spin column** (proporcionada por el fabricante) y se centrifugó a 10 000 rpm por 15 segundos. Se desechó el filtrado depositado en el tubo de colección en donde viene contenida la

columna. El resto de muestra sin tratar se pasó a la columna, se volvió a centrifugar y se desechó el filtrado.

- ✓ Posteriormente se colocó la columna **RNeasy MinElute spin column** en un tubo de colección nuevo. Se adicionaron 500 μ L del buffer RPE y se centrifugó a 10 000 rpm por 15 segundos y se desechó el filtrado.
- ✓ Luego se añadieron 500 μ L de etanol al 80 % a la columna **RNeasy MinElute spin column** y se centrifugó por 2 minutos a 10 000 rpm. Se eliminó el filtrado y el tubo de colección. Después de centrifugar, se retiró cuidadosamente la columna del tubo de colección que se desechó y se colocó en uno nuevo.
- ✓ Se abrió la tapa de la columna y se centrifugó a máxima velocidad por 5 minutos para secar la columna y eliminar el remanente de etanol presente en ella. Se eliminó el tubo de colección y se colocó la columna en un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril.
- ✓ Por último se añadieron 30 μ L de agua libre de ARNasas a la columna y se centrifugó por 1 minuto a máxima velocidad.

Las muestras de ARN se volvieron a analizar por NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), se corrieron en gel de agarosa para después visualizarse en el fotodocumentador y finalmente almacenarse a -80°C hasta su uso.

6.4.3 Secuencias de genes relacionados con la biosíntesis de los ácidos oleico y linoleico y considerados para este estudio.

Ante la ausencia de información referente a secuencias de *J. cinerea*, las secuencias de oligonucléotidos utilizadas fueron tomadas de la información existente para *J. curcas*. (Tabla 3).

Tabla 3. Secuencia de genes que codifican para la síntesis de ácidos grasos oleico y linoleico.

Nombre	Abreviación	Inicial (Forward)/ Reverso (Reverse)
Proteína transportado de acilo I	<i>ACPI</i>	F: ACCGTTTCAGGAAGCTGCTG R: ACATAGTTCACAACAAGATTGC (Gu <i>et al.</i> , 2012)
Cetoacil ACP sintasa II	<i>KASII</i>	F: GATGGGGTCAGCTTCGTTTG R: CCCAGCGACTGAGTCTGTTA
δ -9-esteroil- acilo desaturasa	<i>D9SD</i>	F: TGTTTGGAGAAGACATACCGG R: CAGGGCTGTGGTGACTIONAC (Gu <i>et al.</i> , 2012)
Ácido graso desaturasa 2-1	<i>FAD2-1</i>	F: CCACCATTTCACACTTGGTCAG R: GGTTGAGGAAGGAGGTGGAAG (Qu <i>et al.</i> , 2012)
Ácido graso desaturasa 2-2	<i>FAD2-2</i>	F: AGCAATCAAGCCTATATTGGGC R: CCAGAGAACTCCTCGGTTGG (Qu <i>et al.</i> , 2012)
Actina (Gen constitutivo)	<i>Actin</i>	F: ATGAGCTTCGAGTTGCACCA R: AGCATCAGTGAGATCACGAC (Li <i>et al.</i> , 2008).

6.4.4 RT-PCR semi-cuantitativo.

6.4.4.1 Síntesis de ADNc

Se utilizó la mezcla de dos kits, siendo uno el kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) y el kit Ilustra Ready-To-Go RT-PCR Beads (General Electric) para la síntesis de ADNc. El primer kit en usarse fue SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) y se siguieron las indicaciones del fabricante como sigue:

- ✓ En un tubo libre de nucleasas se añadió:
 - 1 μ L de 10x Buffer.

- 1 μL de ADNasa.
 - ARN total de *J. cinerea* (dependiendo del valor cuantificado. El volumen de ARN total para *J. cinerea* se definió de acuerdo al análisis de concentración de ARN total de la muestra).
 - H_2O libre de RNAsas (El volumen se definió de manera que el volumen final del tubo de reacción fuera de 10 μL).
- ✓ Posteriormente, se dejó reposar por 15 min a temperatura ambiente y se añadió 1 μL de Stop Solution para después incubarse a 70°C por 10 minutos.

Después se continuó con el kit Illustra™ Ready-To-Go™ RT-PCR Beads, siguiendo las instrucciones del fabricante:

- ✓ Al tubo con la mezcla obtenida durante el uso del kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (11 μL) se añadió lo siguiente:
 - 1 μL Oligo dT (pd(T12-18))
 - 38 μL de H_2O estéril.
- ✓ Se obtuvo un volumen final de reacción de 50 μL .
- ✓ La reacción de síntesis de ADNc se llevó a cabo utilizando un termociclador NYX Technik, con el programa RT_JAT_GE, incubando el tubo a 42 °C por 30 minutos.
- ✓ Después para inactivar la reacción se calentó a 95°C por 5 minutos. El ADNc resultante ya puede usarse para la amplificación por PCR.

6.4.4.2 Reacción de PCR

Se utilizó el kit Illustra™ PuReTaq™ Ready-To-Go™ PCR beads, siguiendo las instrucciones del fabricante, se añadieron los siguientes componentes a un microtubo estéril:

- ✓ 21 μL de agua estéril.
- ✓ 1 μL de primer reverso y 1 μL de primer forward (Dependiendo del gen).

Cada tubo del kit puede utilizarse para dos reacciones, por ello se dividió el contenido en otro microtubo estéril, teniendo en cada tubo 11.5 μL de reacción por tubo. Finalmente se añadió a cada tubo 1 μL de ADNc para tener un volumen final de reacción de 12.5 μL .

6.4.4.3 Determinación de los parámetros de ciclos y temperaturas.

La temperatura de alineamiento y los ciclos se definieron llevando a cabo un PCR gradiente de la siguiente manera:

- ✓ Se utilizó el programa JAT_GRAD en un termociclador NYX Technik, bajo las siguientes condiciones:
 - Un ciclo de desnaturalización por 5 minutos a 94 °C.
 - Para definir la temperatura de alineamiento se tomó un rango entre 55 °C y 65 °C. Las condiciones para cada ciclo de PCR fueron las siguientes: Temperatura de desnaturalización de 94 °C por 1 min, la temperatura de alineamiento por 30 segundos y la temperatura de extensión fue 72 °C por 40 segundos.
 - Para determinar la cantidad de ciclos apropiada para cada gen se tomó un rango de entre 25 y 35 ciclos, hasta que la amplificación de los productos de PCR para cada gen, fuera visible en el gel de agarosa.
 - Una vez definidos estos parámetros se procedió a utilizar el programa JATROPHA en el termociclador NYX Technik y SimpliAmp™ de Applied Biosystems, para el análisis de expresión de genes considerados en este estudio.

6.4.4.4 Análisis de los productos de RT-PCR semicuantitativo

Se realizó un gel de agarosa al 1 % para observar la integridad de los productos de PCR de la siguiente forma:

- ✓ Se pesaron 0.75 g de agarosa y se disolvieron en un matraz Erlen-Meyer con 75 mL de buffer TAE 1X estéril.

- ✓ Se calentó la mezcla de agarosa y TAE 1X en un horno microondas por un minuto y medio, verificando su disolución cada 30 segundos. Hasta que la mezcla no presentó grumos y se tornó transparente, se dejó reposar hasta que adquiriera una temperatura soportable al dorso de la mano.
- ✓ Se agregó 1 μ L de GelRed™ (Biotium) y se agitó vigorosamente para después vaciarse lentamente en la placa de electroforesis previamente preparada con los sellos acrílicos, esto para evitar la formación de burbujas. Se colocaron los peines de separación correspondiente y se dejó reposar hasta que la mezcla se solidificara (15 a 20 minutos).
- ✓ Una vez formado el gel, se retiraron los sellos y se colocó la placa dentro del tanque de electroforesis. Se vertió la cantidad apropiada de buffer TAE 1X estéril hasta que cubriera el gel y se retiraron los peines con cuidado, evitando que se dañara el gel.
- ✓ Se cargaron los productos de PCR con volumen de 2 μ L de muestra y un 1 μ L de Marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) para determinar el tamaño de cada uno de los fragmentos, con 2 μ L de buffer de carga 1X y se depositaron en los pozos correspondientes.
- ✓ Se llevó a cabo el proceso de electroforesis conectando la cámara de electroforesis a una fuente de poder a 100 Volts por 40 min aproximadamente.
- ✓ Una vez terminado el proceso, se visualizó el gel de electroforesis en el fotodocumentador Bio-Imaging System MiniBis pro (Bio America Inc).
- ✓ Por último se enjuagó con agua estéril todos los componentes de electroforesis al terminar la corrida, ya que con el paso del tiempo la acumulación de restos de sales puede dañar el equipo. De manera opcional se puede reutilizar el buffer de electroforesis.

La cuantificación de las bandas se realizó utilizando el software ImageJ (Java), el cual es un programa de procesamiento de imagen digital, es un software de dominio público desarrollado por National Institute of Health (Estados Unidos), diseñado específicamente para el análisis de imágenes científicas. La intensidad de banda se expresó en unidades de absorbancia relativa. La relación del ARN de la muestra se determinó y normalizó con el gen *Actina*, calculando las variaciones de la concentración de las muestras y como control de

eficiencia de reacción. Las intensidades relativas de los productos de PCR amplificados se determinaron utilizando Image J (Java), software de análisis de imágenes (versión 1.7.0_51) y se expresaron en unidades arbitrarias.

6.5 Secuenciación de los genes *ACPI*, *KASII*, *D9SD*, *FAD2-1*, *FAD2-2* y *Actina* de *J. cinerea*.

Se extrajo ADNg de hojas que se colectaron en campo de distintos individuos de *J. cinerea* durante la recolección de semilla y que previamente a su uso fueron almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. La extracción de ADNg a partir de hojas de *J. cinerea* se llevó a cabo mediante el kit ZR Plant/Seed DNA Miniprep de Zymo Research siguiendo las instrucciones del fabricante:

- ✓ Primero se preparan los tubos **Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filters** (tapadera verde): Se elimina la parte inferior de los tubos para después colocarse en un tubo de colección y centrifugarse a $8,000 \times g$ por 3 minutos (En cada paso que se requirió de centrifugación, se empleó una centrífuga AccuSpin™ Micro 17/17R de Fisher Scientific™).
- ✓ Se añadió aproximadamente 150 mg de tejido finamente triturado en un tubo **ZR BashingBead™ Lysis Tube** y se añadió 750 μL de solución de lisis. Se agitó vigorosamente por 10 minutos para luego centrifugarse a $10,000 \times g$ por 1 minuto.
- ✓ Se transfirieron 400 μL del sobrenadante a un tubo **Zymo-Spin IV™ Spin Filter** (tapadera naranja) previamente colocado en un tubo de colección y se centrifugó a $7,000 \times g$ por 1 minuto.
- ✓ Se adicionó 1,200 μL del buffer **Plant/Seed DNA Binding Buffer** al filtrado resultante en el paso anterior y se mezcló. Posteriormente se transfirieron 800 μL de la mezcla anterior a una columna **Zymo-Spin IIC™ Column** previamente colocada en un tubo de colección y se centrifugó a $10,000 \times g$ por 1 minuto. Se eliminó el filtrado y el resto de la mezcla se transfirió a la columna para nuevamente centrifugarse en las mismas condiciones ya mencionadas.

- ✓ Posteriormente la columna **Zymo-Spin IIC™ Column** fue colocada en un nuevo tubo de colección y se añadieron 200 µL del buffer **pre-lavado de ADN** y se centrifugó a 10,000 x g por 1 minuto, eliminándose el filtrado.
- ✓ Luego se añadieron 500 µL del buffer de **lavado de ADN** a la columna **Zymo-Spin IIC™ Column** y centrifugada a 10,000 x g por 1 minuto y se eliminó el filtrado.
- ✓ La columna **Zymo-Spin IIC™ Column** se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se adicionaron de 50 - 100 µL (mínimo 25 µL) del buffer de **Elución de ADN** directamente a la columna y se centrifugó a 10,000 x g por 30 segundos.
- ✓ Para finalizar, el filtrado se transfirió a los tubos **Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filters** (previamente preparados al inicio de la extracción) colocados en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y centrifugó a 8,000 x g por 1 minuto, obteniendo ADNg listo para su uso.

Una vez realizado el procedimiento anterior, el ADNg resultante se utilizó para llevar a cabo PCR's para cada uno de los genes considerados en este estudio, haciendo uso del kit Illustr[™] PuReTaq[™] Ready-To-Go[™] PCR beads de General Electric, obteniendo para cada gen 100 µL de producto de PCR. Los PCR's se realizaron en un termociclador SimpliAmp[™] de Applied Biosystems bajo las mismas condiciones que se establecieron durante la estandarización del RT-PCR Semicuantitativo. Los productos de PCR se cuantificaron en un espectrofotómetro NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific) y se corroboró su integridad en un gel de agarosa al 1 %.

Posteriormente, los productos de PCR fueron almacenados en hielo seco y se enviaron al Laboratorio de Servicios Genómicos de LANGEBIO CINVESTAV (Irapuato, Guanajuato) para su análisis. Una vez recibidos los resultados, las secuencias tanto Forward como Reverse de cada gen, fueron analizadas haciendo uso del programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.2.5 (Hall, Ibis Biosciences, CA, USA), en el cual se llevó a cabo lo siguiente:

- ✓ Se abrieron ambas secuencias (Forward y Reverse), las cuales vienen en formato '.ab1' que son compatibles con BioEdit (Figura 7a). Cada secuencia al abrirse, desplegó dos archivos. El primero es un electroferograma de la secuencia en el cual cada pico representa a cada una de las bases nitrogenadas (A, T, G y C) y el otro archivo es la secuencia en formato 'fasta'.

- ✓ En la ventana en que se encuentra la secuencia Reverse en formato fasta, del lado izquierdo donde se encuentra el nombre de la secuencia, se seleccionó y se presionaron las teclas Shift+Control+R para generar la cadena complementaria reversa. Así ya ambas secuencias ‘corren’ en la misma dirección y en su mayoría poseen los mismos nucleótidos.
- ✓ Se seleccionó la secuencia Reverse una vez ya invertida y se copió y pegó en la ventana en donde se encuentra la secuencia Forward.
- ✓ Luego en la parte superior del programa, se buscó la opción “Accessory Alignment” y se seleccionó la función “ClustalW multiple alignment” la cual sirvió para alinear ambas secuencias (Figura 7b).
- ✓ Dentro de la ventana donde se encuentran las secuencias en la parte superior en las opciones de vista, se seleccionó la opción “Shade identities and similarities” que facilitó la detección de las partes donde ambas secuencias coincidieron y difirieron (Figura 7c).
- ✓ Posteriormente, en la parte superior del programa se seleccionó “Alignment” y se seleccionó la opción “Create Consensus Sequence”, obteniéndose una secuencia que representó ambas secuencias (Forward y Reverse) para cada gen (Figura 7d).
- ✓ Cada secuencia se introdujo en el programa Basic Local Alignment Sequence Tool (BLAST) en la opción ‘Nucleotide blast’ de la plataforma National Center for Biotechnology Information (NCBI) para compararlas con las secuencias que se encuentran almacenadas en las bases de datos y corroborar que dichas secuencias corresponden a *Jatropha*.

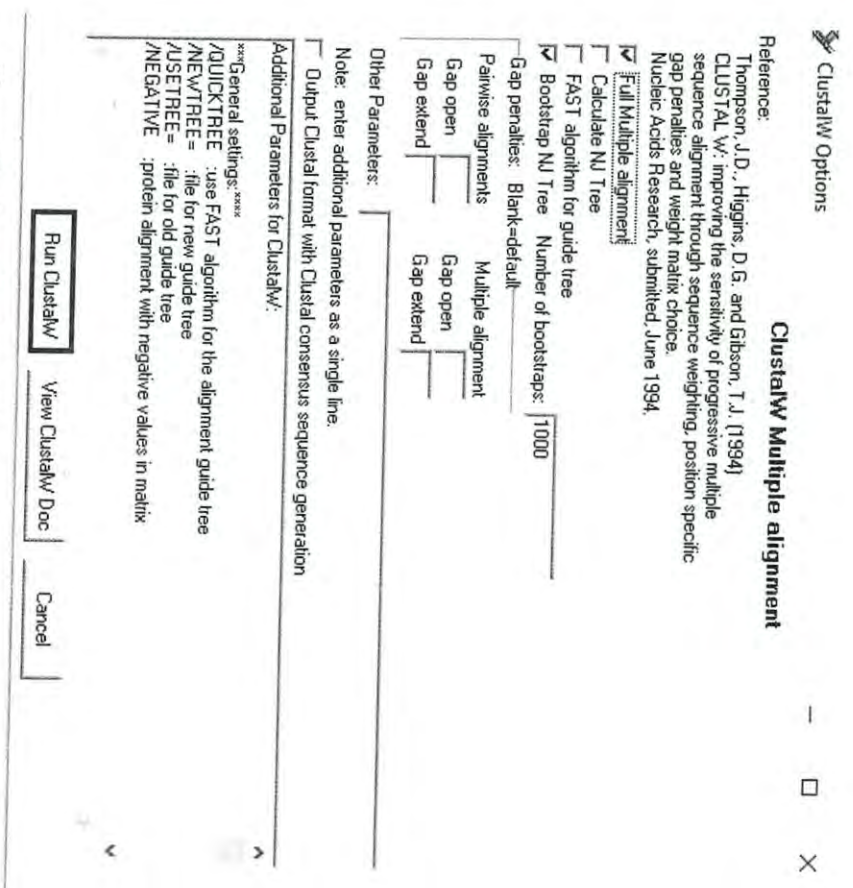


Figura 7b. Procedimiento del análisis de secuencias en BioEdit.

6.6 Análisis preliminar del gen *FAD2-1* por qRT-PCR Tiempo Real

Una vez que se corroboró que las secuencias analizadas en BioEdit y posteriormente en BLAST correspondían a secuencias de *Jatropha*, se realizó una prueba preliminar de análisis de expresión del gen *FAD2-1* por qRT-PCR Tiempo Real. Dicho análisis se llevó a cabo en el Laboratorio de Referencia, Análisis y Diagnóstico de Sanidad Acuícola del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR), Campus Hermosillo.

6.6.1 Síntesis de ADNc

Se llevó a cabo la extracción de ARN de semillas de la colecta 2014 tanto de *J. curcas* como de *J. cinerea*. La extracción de ARN total se realizó con el reactivo TRIzol® (Invitrogen) y se purificó con el kit RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen). Posteriormente, para la síntesis de ADNc, se utilizó la mezcla de dos kits, siendo uno el kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) y el kit QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) para la síntesis de ADNc. El primer kit en usarse fue SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) y se siguieron las indicaciones del fabricante como sigue:

- ✓ En un tubo libre de nucleasas se añadió:
 - 1 µL de 10x Buffer.
 - 1 µL de ADNasa.
 - 1 µg ARN total de *J. cinerea* o de *J. curcas* (el volumen de ARN total dependió de la concentración de éste en cada muestra).
 - H₂O libre de RNAsas (el volumen se definió de manera que el volumen final del tubo de reacción fuera de 10 µL).
- ✓ Posteriormente, se dejó reposar por 15 min a temperatura ambiente y se añadió 1 µL de Stop Solution para después incubarse a 70°C por 10 minutos.

Después se continuó con el kit QuantiTect Reverse Transcription Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante:

- ✓ A cada tubo con la mezcla obtenida durante el uso del kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (11 μ L) se añadió lo siguiente:
 - 2 μ L de **gDNA Wipeout Buffer**
 - 1 μ L de H₂O libre de ARNasas.
- ✓ Posteriormente se incubó a 42 °C por 5 minutos y se dejó reposar en hielo. Después se preparó un **Master Mix** (considerando que se utilizará para dos reacciones) de la siguiente manera:
 - 2.2 μ L de **Quantiscript Reverse Transcriptase**
 - 8.8 μ L de **Quantiscript RT Buffer**
 - 2.2 μ L de **RT Primer Mix**
- ✓ A cada tubo se añadieron 6 μ L del **Master Mix** teniendo una reacción de volumen final de 20 μ L.
- ✓ La reacción de síntesis de ADNc se llevó a cabo en un termociclador SimpliAmp™ de Applied Biosystems, incubando los tubos a 42 °C por 20 minutos.
- ✓ Después para inactivar la reacción se elevó la temperatura a 95 °C por 3 minutos. El ADNc resultante se utilizó para la amplificación por PCR.

6.6.2 Elaboración de curvas estándar de los genes *Actina* y *FAD2-1*

6.6.2.1 Obtención de productos de PCR

Se obtuvieron 100 μ L de producto de PCR de los genes *Actina* y *FAD2-1* utilizando el kit Illustra™ PuReTaq™ Ready-To-Go™ PCR beads, siguiendo las instrucciones del fabricante, añadiéndose los siguientes componentes a un microtubo estéril:

- ✓ 22 μ L de agua estéril.
- ✓ 1 μ L de primer reverso y 1 μ L de primer forward (Dependiendo del gen).
- ✓ 1 μ L de ADNc

Finalmente se verificó la integridad de los productos de PCR en gel de agarosa al 1 %.

6.6.2.2 Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR fueron purificados haciendo uso del kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante:

- ✓ Se añadieron 5 volúmenes del **Buffer PB** a un volumen de producto de PCR y se mezcló.
- ✓ Posteriormente se transfirió la muestra a una **columna QIAquick** colocada en un tubo de colección, se centrifugó por 1 minuto para después eliminar el filtrado y volver a colocar la **columna QIAquick** en el mismo tubo de colección.
- ✓ Se añadieron 750 μL del **Buffer PE** a la **columna QIAquick**, se centrifugó nuevamente por 1 minuto, eliminándose el filtrado y volviendo a colocar la **columna QIAquick** en el mismo tubo de colección. De nuevo se volvió a centrifugar por 1 minuto para eliminar restos del buffer.
- ✓ Se colocó la **columna QIAquick** en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se añadieron 50 μL de H_2O estéril. Se dejó reposar por 1 minuto y después se centrifugó.

Una vez purificados los productos de PCR, se cuantificaron en un espectrofotómetro NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific), se corroboró su integridad en un gel de agarosa al 1 % y se determinó el número de copias en las muestras haciendo uso de la herramienta proporcionada por el sitio web: <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>. La fórmula para determinar la cantidad de copias por μL se expresa como sigue: número de copias = $(\text{Concentración} \times 6.022 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol}) / (\text{longitud del amplicón} * 1 \times 10^9 * 650)$, donde la concentración es la concentración del producto de PCR purificado, 6.022×10^{23} moléculas/mol es el número de Avogadro, la longitud del amplicón es el tamaño del producto de PCR, 1×10^9 es para transformar gramos a nanogramos, y 650 es el promedio de cualquier par de bases en Daltons.

6.6.2.2 Elaboración de diluciones.

Para la preparación de las diluciones necesarias, se añadieron 90 μL de H_2O estéril a 8 tubos de 0.2 mL y se etiquetaron. Después se agregaron 10 μL del producto de PCR purificado a uno de los tubos y se mezcló 15 segundos por *vortex* para luego tomar 10 μL de ese tubo y pasarlo a otro tubo con 90 μL de H_2O estéril y así sucesivamente hasta contar con 8 diluciones.

6.6.2.3 Reacción de PCR Tiempo Real

La reacción de PCR en Tiempo Real se llevó a cabo en un termociclador LightCycler 480 II (Roche Applied Science, Basel, Suiza), en donde el producto de PCR en tiempo real fue medido por la señal fluorescente del reactivo IQTMSYBR® Green Supermix (Bio-Rad), considerando un rango de longitud de onda de 465 a 510 nm. Se probaron los oligos considerados en el análisis de PCR semicuantitativo, considerándose como adecuados para el este análisis.

Las reacciones previas se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar de la siguiente manera:

- ✓ Se preparó un Master Mix para la elaboración de las curvas de calibración. Tomando en cuenta en que se realizaron por triplicado y para evitar errores de pipeteo se añadieron a un tubo Eppendorf de 1.5 mL:
 - 240 μL de IQTMSYBR® Green Supermix (Bio-Rad).
 - 16 μL de primer Forward.
 - 16 μL de primer Reverse.
 - 144 μL de H_2O estéril.
- ✓ Se mezcló por *vortex* el Master Mix y se le dio un spin para después añadir en 9 tubos (diluciones) de 0.2 mL, 52 μL del Master Mix en cada uno de ellos.
- ✓ Posteriormente, se añadió a cada tubo 4 μL de su respectiva dilución. Se mezcló bien (*vortex* por 15 segundos) y se cargaron 14 μL en cada pozo de una placa (LightCycler®480 Multiwell Plate 96) de 96 pozos. Se selló y se centrifugó a 1 500

rpm a 4 °C por 2 minutos. En cada corrida de amplificación se incluyeron varios controles negativos.

- ✓ Finalmente se introdujo la placa al termociclador, llevándose a cabo la reacción de PCR en Tiempo Real bajo las condiciones que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Temperaturas y ciclos empleados en qRT-PCR Tiempo Real

	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización	1	95	60 s
		95	30 s
Amplificación	30	62	30 s
		72	30 s
Extensión	1	72	60 s
		95	1 s
Fusión	2	55	1 s

6.6.3 Análisis preliminar de expresión del gen *FAD2-1* por qRT-PCR Tiempo Real.

La reacción de PCR en Tiempo Real se llevó a cabo en un termociclador LightCycler 480 II (Roche Applied Science, Basel, Suiza), en donde el producto de PCR en tiempo real fue medido por la señal fluorescente del reactivo IQTMSYBR® Green Supermix (Bio-Rad), considerando un rango de longitud de onda de 465 a 510 nm.

Las reacciones previas se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar de la siguiente manera:

- ✓ Se preparó un Master Mix para cada gen. Tomando en cuenta que el análisis de cada gen se realizó por triplicado, para evitar errores de pipeteo y además que se debe introducir de una a dos diluciones de las que se analizaron al momento de la elaboración de curvas estándar, se añadieron a un tubo Eppendorf de 1.5 mL:
 - 67.5 µL de IQTMSYBR® Green Supermix (Bio-Rad).
 - 4.5 µL de primer Forward.
 - 4.5 µL de primer Reverse.

- 40.5 μL de H_2O estéril.
- ✓ Se mezcló bien el Master Mix (*vortex* por 15 segundos) y se le dio un spin para después añadir en 9 tubos de 0.2 mL, 13 μL del Master Mix en cada uno de ellos.
- ✓ Posteriormente se añaden a cada tubo 1 μL de ADNc (en el caso de las diluciones, 1 μL de la dilución que se consideró). Se mezcló bien (*vortex* por 15 segundos) y se cargó el contenido de cada tubo en cada pozo de una placa (LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, Roche) de 96 pozos. Se selló y se centrifugó a 1500 rpm a 4 °C por 2 minutos. Se consideraron varios controles negativos.
- ✓ Finalmente se introdujo la placa al termociclador, llevándose a cabo la reacción de PCR en Tiempo Real bajo las condiciones mencionadas en la Tabla 4.

El análisis de las curvas de calibración y de las muestras se realizó mediante el uso del software LightCycler® 480 versión LCS480 1.5.0.39.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Observaciones en el área de muestreo de las semillas de *J. cinerea*

En los muestreos realizados en ambos años (2013 y 2014) para la recolección de semillas de *Jatropha cinerea* se pudo apreciar que a mayor distancia de la costa, los tallos de las plantas eran más delgados y su producción de semilla era menor a diferencia de los que se encontraban cerca de la costa, que eran más gruesos y presentaban una producción de semilla más abundante por planta, pudiendo deberse a las condiciones ambientales (suelo, humedad) en las que se desarrollaron las plantas con respecto a su cercanía a la costa (Figura 8). Por otra parte el periodo de colecta fue más amplio en el año 2014 ya que las precipitaciones fueron más frecuentes, manifestándose inclusive a finales del mes de octubre y principios del mes de noviembre.

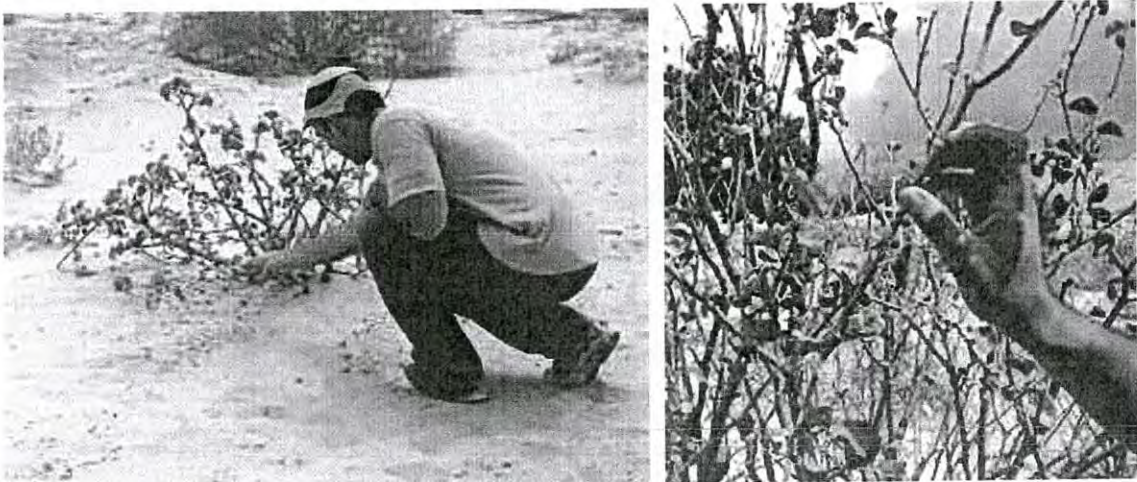


Figura 8. Muestreos realizados para la colecta de semillas de *J. cinerea* en Bahía de Kino.

7.2 Características físicas de las semillas de *J. cinerea*

El promedio de peso de las semillas de *Jatropha cinerea* analizadas en este estudio fue de 0.27 g y sus medidas promedio fueron de 8.59 mm de diámetro y 9.65 mm de largo (Figura 9). Soto-León *et al.*, (2014) reportaron un peso de 0.35 g, 8.21 mm de diámetro y 8.66 mm de largo, mientras que Sosa-Segura *et al.*, (2014) reportaron un peso promedio de 0.29 g por semilla en ejemplares de la misma especie ubicados en costas de Culiacán, Sinaloa, México en ambos estudios. Por otra parte en especies nativas del Estado de Sonora, como *J. cardiophylla* y *J. cordata* se han reportado pesos promedio de sus semillas de 0.46 g y 0.38 g, respectivamente (Gámez-Meza *et al.*, 2013). Con respecto a *J. curcas*, estudios han registrado un peso promedio de 0.60 g de semilla considerando ejemplares de varias regiones de México (Martínez-Herrera *et al.*, 2010).

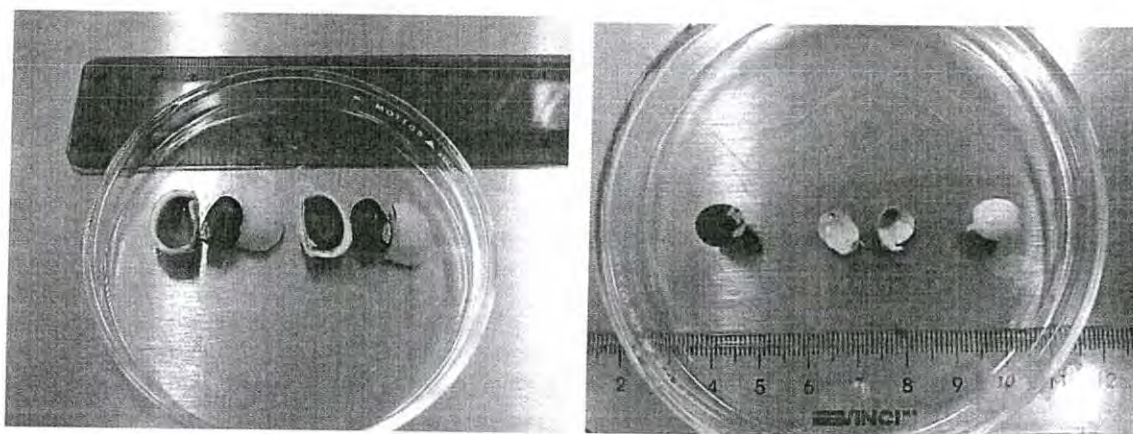


Figura 9. Características físicas de las semillas de *J. cinerea*.

7.3 Caracterización química del aceite de *J. cinerea*

7.3.1 Perfil de ácidos grasos del aceite de *J. cinerea*

Los principales ácidos grasos presentes en los aceites de *J. cinerea* y *J. curcas* fueron oleico y linoleico ambos insaturados (Figura 10). El ácido oleico en estos aceites se encontró en menor proporción en comparación con el contenido del ácido linoleico. Los resultados presentados en la Tabla 5 son la media de las colectas realizadas en ambos años (2013 y 2014) ya que al

realizar el análisis entre muestreos no se encontraron diferencias significativas. Por otra parte, se constató que además de presentar una tendencia semejante con *J. curcas*, el perfil de ácidos grasos de *J. cinerea* fue similar al reportado por Sosa-Segura *et al.* (2014). Se encontraron diferencias significativas en los niveles de todos los ácidos grasos reportados al comparar *J. cinerea* con *J. curcas*, a excepción del ácido behénico. Dichas diferencias se pueden atribuir a factores ambientales tales como temperatura, precipitación, humedad y nubosidad, como se encuentran ampliamente documentado para otras plantas oleaginosas (Onemli, 2012; Turhan *et al.*, 2010; Fayyaz-ul-Hassan *et al.*, 2005; Deng y Scarth, 1998).

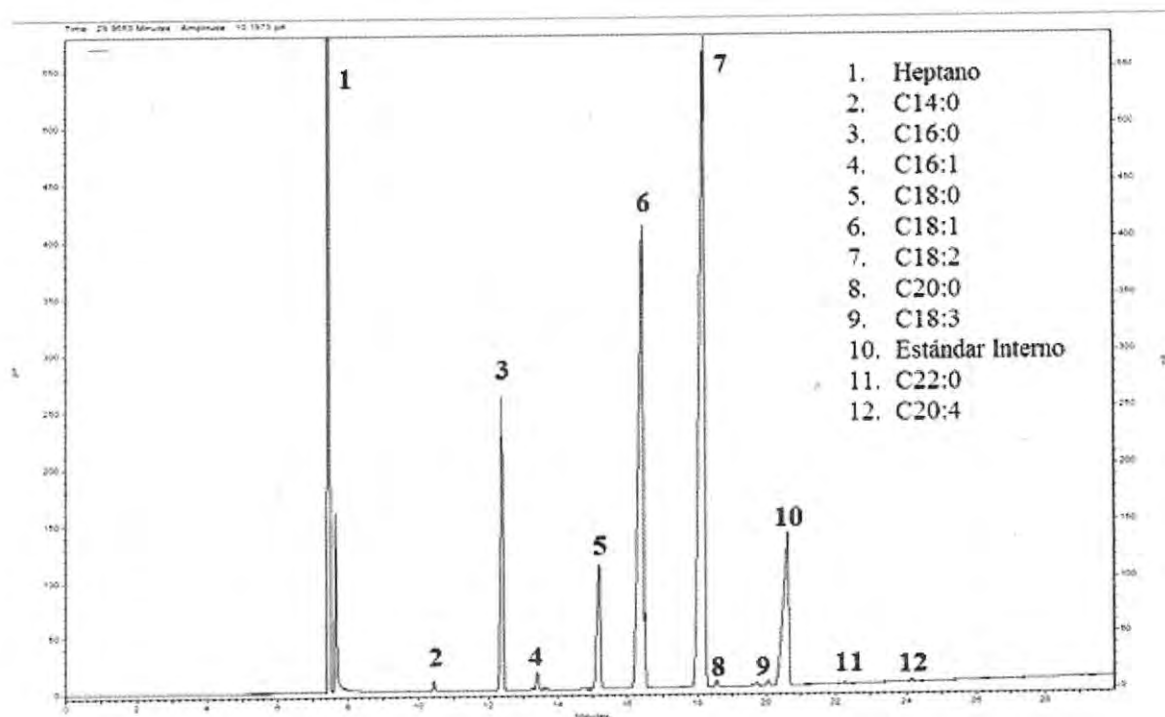


Tabla 5. Perfil de ácidos grasos y contenido de tocoferoles y carotenoides en aceite de *J. cinerea* y *J. curcas*

Ácido Graso (g FAME/100 g FAME)	<i>Jatropha cinerea</i>	<i>Jatropha curcas</i>
Mirístico	0.35 ± 0.004 ^b	0.17 ± 0.005 ^a
Palmítico	10.8 ± 0.01 ^a	12.21 ± 0.02 ^b
Palmitoleico	0.61 ± 0.002 ^a	0.67 ± 0.004 ^b
Estearico	6.71 ± 0.01 ^b	6.01 ± 0.01 ^a
Oleico	34 ± 0.03 ^a	37.59 ± 0.02 ^b
Linoleico	46.92 ± 0.02 ^b	42.81 ± 0.06 ^a
Linolenico	0.33 ± 0.002 ^b	0.28 ± 0.006 ^a
Araquídico	0.20 ± 0.004 ^b	0.20 ± 0.03 ^a
Behénico	0.03 ± 0.002 ^a	0.03 ± 0.002 ^a
Araquidónico	0.05 ± 0.003 ^a	0.03 ± 0.002 ^b
Total Ácidos Grasos Saturados	18.09	18.62
Total Ácidos Grasos Monoinsaturados	34.61	38.26
Total Ácidos Grasos Poliinsaturados	47.30	43.12
Tocoferoles	N.d.	N.d.
Carotenoides	N.d.	N.d.

FAME: Metil ésteres de ácidos grasos. Los valores son la media y ± desviación estándar de triplicados. El contenido de FAME es la media de los muestreos 2013 y 2014. Los valores en cada columna con diferentes letras (a-b) indican una diferencia significativa ($p < 0.05$). N.d.= No detectado. Índice de detección = < 2 ppm.

7.3.2 Contenido de tocoferoles y carotenoides en el aceite de *J. cinerea*

La presencia de tocoferoles y carotenoides en aceite de *Jatropha curcas* y *Jatropha cinerea* no fue detectada (< 2 ppm) (Tabla 5). Existen estudios sobre el contenido de tocoferoles en semilla de *Jatropha curcas* en donde se ha reportado la presencia de gamma-tocoferol (92.04 mg/kg) (Rodrigues, *et al.*, 2013) y gamma-tocotrienol (177.1 mg/kg) (Corzo-Valladares *et al.*, 2012). Por otro lado, se tienen reportes de la presencia de carotenoides en hojas de *Jatropha curcas* (Rigon, *et al.*, 2013; Matos *et al.*, 2012; Pompelli *et al.*, 2010), pero no en semilla. Kaul *et al.* (2010), señala que cerca del 1 % del aceite proveniente de semilla de *Jatropha curcas* está constituido por componentes insaponificables, incluyendo tocoferoles, tocotrienoles, carotenoides, fosfolípidos y otros productos antioxidantes sin especificar dentro de este porcentaje qué cantidad le corresponde a cada uno de dichos componentes.

Por otra parte, se ha observado que el estado de desarrollo de la semilla y su almacenamiento desempeñan una función relevante en la presencia de dichos compuestos. Rodríguez *et al.* (2013), mencionan que la cantidad del gamma-tocoferol se ve favorecida a una temperatura que oscila entre los 28 y 35 °C y afirman que bajo condiciones tropicales (temperatura y humedad alta), se ve favorecido el crecimiento de microorganismos como *Penicillium sp.* y *Aspergillus sp.* que son responsables de la degradación del aceite. Otro factor que puede influir en la detección de estos compuestos es el tipo de detector del HPLC, sin embargo las condiciones en las que se llevaron a cabo los análisis del presente estudio fueron similares a los estudios anteriormente mencionados. Por lo tanto, será necesario considerar la adición de componentes antioxidantes para proteger la estabilidad del aceite. Hasta el momento, no hay reportes del contenido de tocoferoles y carotenoides en semilla de *Jatropha cinerea*.

7.4 Compuestos fenólicos presentes en los extractos metanólicos de semilla de *J. cinerea*.

Los extractos metanólicos de pasta de semilla de *J. cinerea* fueron analizados por HPLC-DAD a una longitud de onda de 280 nm. Los compuestos fenólicos identificados fueron el ácido cafeico y el flavonoide epicatequina. El ácido cafeico fue el principal compuesto identificado en todos los extractos metanólicos de la pasta de semilla de *J. cinerea* (96.183 ± 11.295 mg/100g de muestra seca) analizados, siendo el compuesto presente en mayor cantidad, seguido por la epicatequina (41.932 ± 2.052 mg/100 g de muestra seca).

Por otra parte, los extractos metanólicos de *J. cinerea* se analizaron por infusión directa en un espectrómetro de masas con electrospray en modo de ionización negativa y trampa de iones (Figura 11). Se logró la identificación de los compuestos fenólicos mediante la confirmación del análisis de sus estándares puros y por referencia bibliográfica. En la Tabla 6 pueden apreciarse los compuestos fenólicos identificados por FIA-ESI-MS/MS en extractos metanólicos de pasta de semilla de *J. cinerea* y *J. curcas*, siendo éste el primer estudio en identificar los compuestos fenólicos presentes en las semillas de ambas especies por espectrometría de masas.

Para la especie de *J. curcas*, El-Baz *et al.* (2014) reportaron la presencia de ácido gálico, ácido benzoico, cumarina, ácido cumárico, ácido ferúlico, genisteína, luteolina, catequina, acacetina y rutina en extractos metanólicos de hojas. Huang *et al.* (2014) reportaron otros compuestos (vitexina, isovitexina, orioentina y rhoifolin) en extractos etanólicos también de hojas de *J. curcas*, analizados por HPLC-DAD-ESI-MS. En otro estudio reciente en cáscara de semilla de *J. curcas*, se reportó el contenido total de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de sus extractos pero sin identificar los compuestos fenólicos (Fu *et al.*, 2014). Oskoueian *et al.* (2011), detectó ácido gálico, pirogalol, rutina, miricetina y daidzeína en extractos metanólicos de pasta de semilla de *J. curcas*, mientras que Perea (2013) identificó ácido p-cumárico, ácido o-cumárico, miricetina, quercitrina, ácido sinápico, ácido ferúlico, rutina, ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido cafeico, apigenina y kaempferol en extractos metanólicos de la testa de semilla de *J. curcas* no tóxica. En los dos últimos estudios sólo identificaron los compuestos por HPLC.

En lo que respecta a especies nativas del Estado de Sonora, se ha reportado la presencia de ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido sinápico y miricetina en extractos metanólicos de pasta de semillas de *J. cardiophylla* y *J. cordata* (Alday, 2011). Los estudios de Perea (2013) y Alday (2011), coinciden ligeramente con los compuestos identificados en los extractos de la pasta de semilla de *J. cinerea*, coincidiendo en todas las especies la presencia del ácido cafeico. La presencia o ausencia de estos compuestos en una especie u otra puede deberse a las condiciones ambientales en las que éstas se desarrollan, ya que su síntesis ocurre como mecanismo de defensa y supervivencia.

Tabla 6. Compuestos identificados por FIA-ESI-MS/MS en modo de ionización negativa de extractos metanólicos de pasta de semilla de *J. cinerea* y *J. curcas*

Compuesto	<i>Jatropha cinerea</i>		<i>Jatropha curcas</i>	
	[M-H] (<i>m/z</i>)	Fragmentación de iones (<i>m/z</i>)**	[M-H] (<i>m/z</i>)	Fragmentación de iones (<i>m/z</i>)**
Ácido Benzoico	121	92 (21), 93 (100), 119 (10), 121 (39)	121	92 (100), 93 (58), 119 (32), 121 (71)
Ácido Protocatecuico	153	109 (100), 136 (50)	153	108 (100), 137 (29)
Ácido Protocatecuico	Nd		137	109 (100)
Aldehído Cumarina	145	117 (72), 144 (100)	145	117 (58), 144 (100)
Ácido Cumárico*	163	119 (84)	163	109 (24), 135 (100)
Ácido Vanílico	167	123 (47)	167	123 (14), 135 (95)
Ácido Gálico*	169	125 (100)	169	125 (100)
Ácido Cafeico*	179	135 (100), 161 (76)	179	135 (73), 161 (71)
Ácido Quínico	191	111 (100), 129 (13), 161 (20)	191	83 (18), 93 (63), 109 (33), 111 (26), 127 (100), 137 (14), 171 (67)
Ácido Ferúlico	193	111 (9), 135 (30), 177 (79)	193	111 (9), 137 (100)
Ácido Sinápico*	223	179 (54)	Nd	
[Epi]catequina*	289	179 (65), 205 (14), 245 (35)	289	205 (13), 227 (91), 245 (81), 271 (100)
Quercetina*	301	117 (86), 240 (100), 285 (50)	Nd	
Ácido Elágico*	Nd		301	185 (22), 229 (35), 257 (41)
Miricetina*	Nd		317	137 (19), 216 (48), 237 (67), 271 (29), 287 (57)
Ácido Clorogénico*	Nd		353	179 (11), 191 (24)

* Compuestos identificados por confirmación con sus estándares puros. ** Abundancia relativa de la fragmentación de iones. Nd: No detectado.

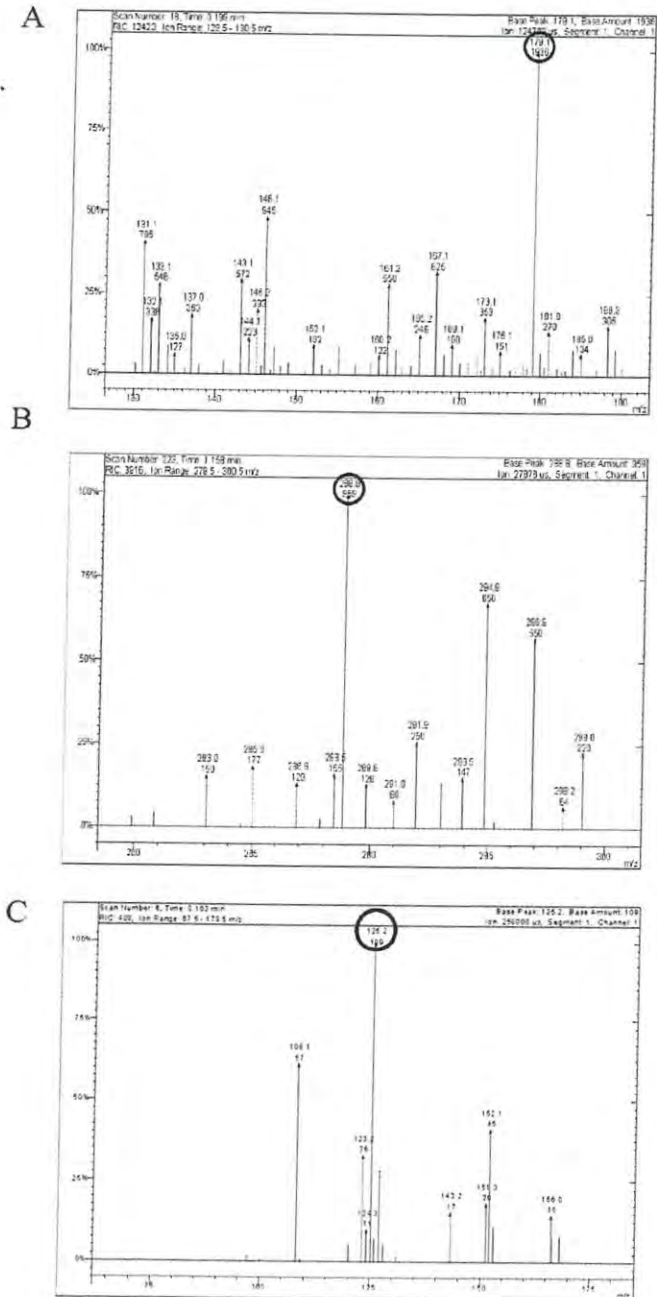


Figura 11. Espectros de masas de los extractos metanólicos de semilla de *J. cinerea*. (A): Espectro del ión 179 m/z correspondiente al ácido cafeico. (B): Espectro del ión 289 m/z correspondiente a epicatequina. (C): Espectro del ión 125 m/z correspondiente al ácido gálico.

7.5 Análisis de expresión de genes

7.5.1 Integridad de ARN total

La extracción del ARN total se realizó con el reactivo TRIzol® (INVITROGEN) y la purificación del ARN total se realizó utilizando el kit RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen). Estos dos kits permitieron obtener ARN total intacto y de buena calidad, corroborando su integridad en geles de agarosa al 1 %, donde aquellas muestras que presentaron un patrón de bandas bien definidas, fueron consideradas para la síntesis de ADNc. (Figura 12).

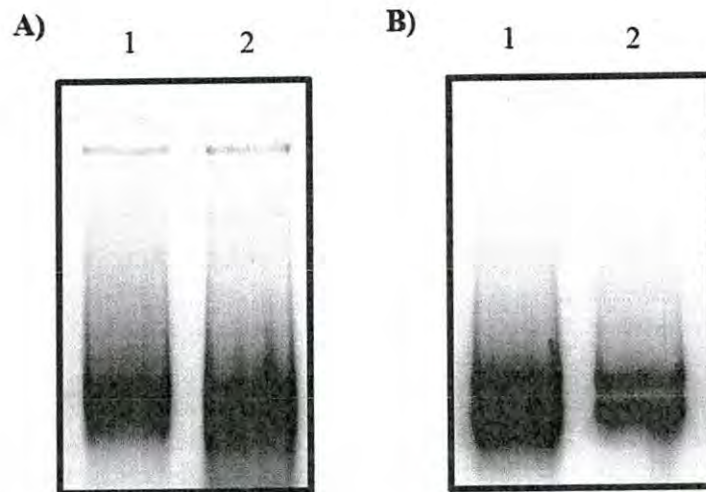


Figura 12. ARN total de semillas de *J. curcas* y *J. cinerea* en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed™ (Biotium). A) ARN extraído con el reactivo TRIzol® B) ARN tratado con el kit RNeasy MinElute Cleanup Kit. Carril 1: ARN de semilla de *J. curcas*. Carril 2: ARN de semilla de *J. cinerea*.

7.5.2 Estandarización de condiciones para PCR

De las tres etapas del procedimiento (extracción de ARN, síntesis de ADNc y PCR), la reacción de PCR es la más determinante para conseguir una verdadera estimación cuantitativa (Hernández *et al.*, 1994); por consiguiente, se definieron para cada gen, mediante un gradiente de ciclos (Figura 13), las cantidades adecuadas, esto para evitar que la reacción se saturara (*plateau*). Usualmente se aconseja un número de 25 – 30 ciclos como adecuado (Hernández *et al.*, 1994). También se definió por un gradiente de temperatura (Figura 14), la temperatura de

alineamiento para cada uno de los genes estudiados. En la Tabla 7 se presentan las condiciones a las cuales fueron analizados cada uno de los genes. Para la estandarización de dichas condiciones se empleó ADN genómico de *J. cinerea*.

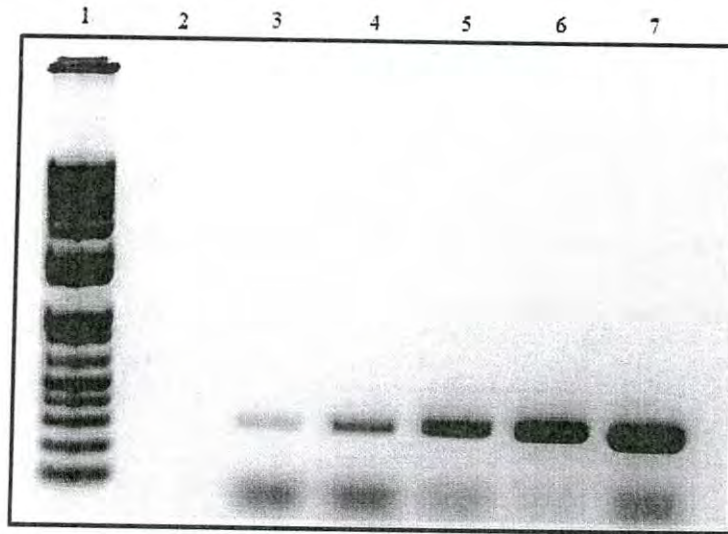


Figura 13. Número de ciclos en la reacción de PCR. Gradiente de ciclos realizado con el gen de *Actina* con temperatura de alineamiento de 61.9 ° C. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Sin muestra. Carril 3: 25 ciclos. Carril 4: 27 ciclos. Carril 5: 29 ciclos. Carril 6: 31 ciclos. Carril 7: 33 ciclos.

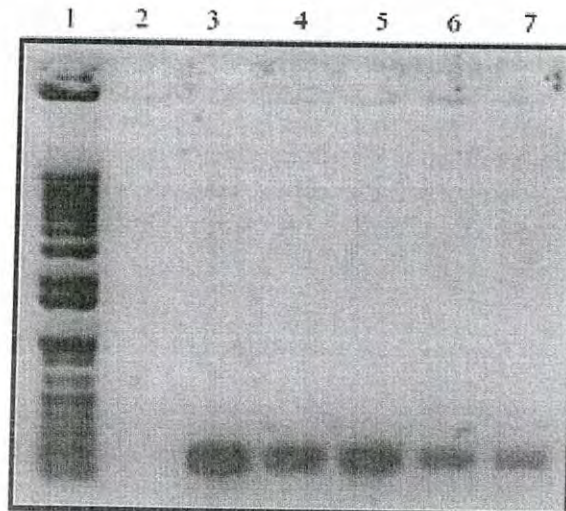


Figura 14. Optimización de temperatura de alineamiento de PCR. Gradiente realizado en el gen *KASII*. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Sin muestra. Carril 3: 60.2 °C. Carril 4: 61.9 °C. Carril 5: 64.4 °C. Carril 6: 66.1 °C. Carril 7: 67.8 °C.

Tabla 7. Condiciones definidas para PCR

Gen	Número de ciclos	Temperatura de Alineamiento (°C)
<i>Actina</i>	30	61.9
<i>ACPI</i>	30	59.6
<i>KASII</i>	33	60.2
<i>D9SD</i>	35	60.2
<i>FAD2-1</i>	30	61.9
<i>FAD2-2</i>	30	61.9

7.5.3 Genes involucrados en la síntesis del ácido graso oleico

7.5.3.1 Gen *ACPI* relacionado con la reacción inicial de desaturación en los ácidos grasos de 16 y 18 carbonos.

Se utilizaron 30 ciclos de PCR con una temperatura de alineamiento de 59.6 °C para visualizar los productos de PCR del gen *ACPI*. El tamaño de banda fue de 200 pb aproximadamente (Figura 15). El análisis de expresión de la especie de interés, *Jatropha cinerea*, mostró baja expresión (0.33 veces con respecto al gen de *Actina*) mientras que en *Jatropha curcas* se mostró más inducido (0.68 veces con respecto al gen de *Actina*) en el pool de semillas colectadas en 2013. En el muestreo de 2014, nuevamente la expresión de este gen en *Jatropha cinerea* fue baja (0.22 veces con respecto al gen de *Actina*) a diferencia de *Jatropha curcas* (0.57 veces con respecto al gen *Actina*).

En el estudio realizado por Gu *et al.* (2012), analizaron la expresión del gen *ACPI* durante 14, 28, 42 y 56 días de desarrollo en semilla de *Jatropha curcas*, observándose un aumento progresivo de su expresión a medida que se va desarrollando la semilla, pero al llegar al día 56 su expresión es baja o nula. Basado en lo anterior, probablemente la semilla *Jatropha cinerea* se encontraba en una etapa de maduración avanzada en donde la expresión del gen *ACPI* ya era baja. Por otra parte, se debe considerar que los productos de PCR se obtuvieron a

partir de oligos basados en secuencias de *Jatropha curcas* y posiblemente su homología no sea alta con la secuencia de *Jatropha cinerea*.

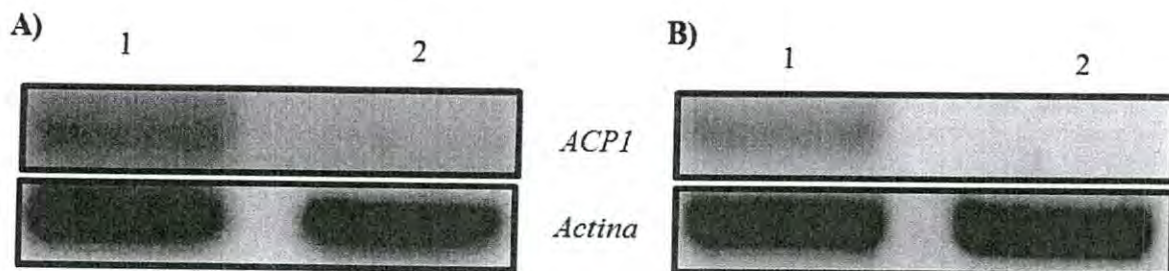


Figura 15. Productos de PCR presentados en gel de agarosa al 1 % teñido con GelRed™ (Biotium) del gen *ACPI*. *Actina* como gen de control interno. A) Muestreo 2013; B) Muestreo 2014. Carril 1: Semilla de *J. curcas*. Carril 2: Semilla de *J. cinerea*.

7.5.3.2 Gen *KASII* relacionado con la elongación de C16:0 a C18:0

Se necesitaron 33 ciclos para la visualización de los amplicones de PCR con una temperatura de alineamiento de 60.2 °C. El tamaño de los productos de PCR fue aproximadamente de 140 pb (Figura 16). El análisis de expresión de *Jatropha cinerea* mostró baja expresión (0.35 veces con respecto al gen de *Actina*) para el pool de semillas colectadas en 2013, mientras que para *Jatropha curcas* se mostró más inducido (0.98 veces con respecto al gen *Actina*). Por el contrario, en el análisis de expresión de *KASII* en las semillas colectadas en 2014, *Jatropha cinerea* mostró mayor expresión de este gen (0.80 veces con respecto al gen de *Actina*) que *Jatropha curcas* (0.66 veces con respecto al gen *Actina*).

Se ha reportado que la expresión del gen *KASII* aumenta de manera constante durante el desarrollo de la semilla de *Jatropha curcas*, observándose su más alta expresión a los 42 días desarrollo para luego disminuir (Gu *et al.*, 2012). La diferencia entre ambos muestreos (2013 y 2014) puede deberse a que las semillas de *Jatropha curcas* y *Jatropha cinerea* se encontraban en distinta etapa de maduración. En el muestreo de 2013, probablemente las semillas de *Jatropha cinerea* se encontraban en un periodo donde la expresión de este *KASII* fue baja, porque el desarrollo de la semilla se encontraba antes o después del tiempo en el que

se ha reportado mayor expresión de este gen (Gu *et al.*, 2012); caso contrario al muestreo del 2014, en donde la semilla de *Jatropha curcas* ya se encontraba en un estado de madurez avanzado mostrando expresión baja, mientras que las semillas de *Jatropha cinerea* se encontraba en una etapa de desarrollo en donde la expresión de *KASII* haya sido alta.

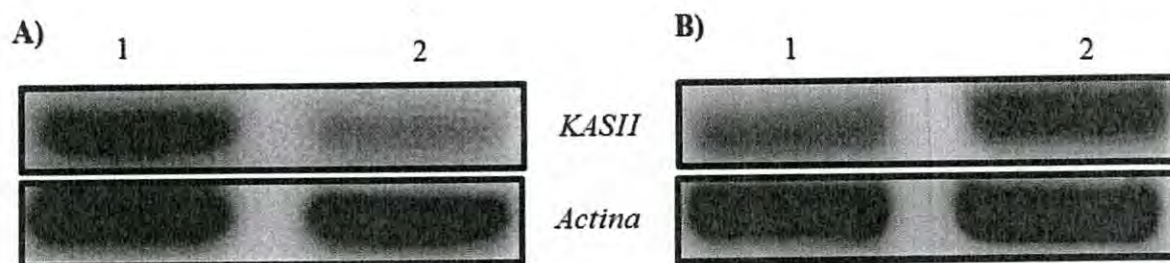


Figura 16. Productos de PCR presentados en gel de agarosa al 1 % teñido con GelRed™ (Biotium) del gen *KASII*. *Actina* como gen de control interno. A) Muestreo 2013; B) Muestro 2014. Carril 1: Semilla de *J. curcas*. Carril 2: Semilla de *J. cinerea*.

7.5.3.3 Gen *D9SD* relacionado con la síntesis del ácido oleico

De acuerdo a los análisis realizados se definió a *D9SD* como un gen de baja expresión, ya que requirió de 35 ciclos para visualizar el producto de PCR, que resultó de 200 pb aproximadamente (Figura 17). En el pool de semillas de *Jatropha cinerea* de la colecta realizada en el año 2013 se observó expresión baja del gen *D9SD* (0.06 veces con respecto al gen de *Actina*) mientras que en *Jatropha curcas* se mostró más inducido (0.33 veces con respecto al gen de *Actina*). Para las semillas de la especie de interés colectadas en 2014, el resultado fue similar, encontrándose casi totalmente reprimido este gen en *Jatropha cinerea* (0.01 veces con respecto al gen de *Actina*) mientras que en *Jatropha curcas* se observó inducido (0.72 veces con respecto al gen de *Actina*)

Gu *et al.* (2012), observaron que la expresión de *D9SD* durante el desarrollo de la semilla de *Jatropha curcas* es alta a los 28 días de desarrollo, teniendo una expresión baja al inicio del mismo para luego aumentar a los 28 días y posteriormente bajar a los 42 días de desarrollo y finalmente a los 56 días su expresión es baja o nula. Esto pudiera suponer que las semillas de la especie de interés se encontraban en una etapa de desarrollo maduro y reforzaría

los resultados encontrados por Gu *et al.* (2012) para *Jatropha curcas*. Otra razón, pudiera ser que los oligos al ser basados en secuencias de la especie de referencia (*Jatropha curcas*), para el caso de este gen en particular, no presente una homología alta con la secuencia de este gen en *Jatropha cinerea*.

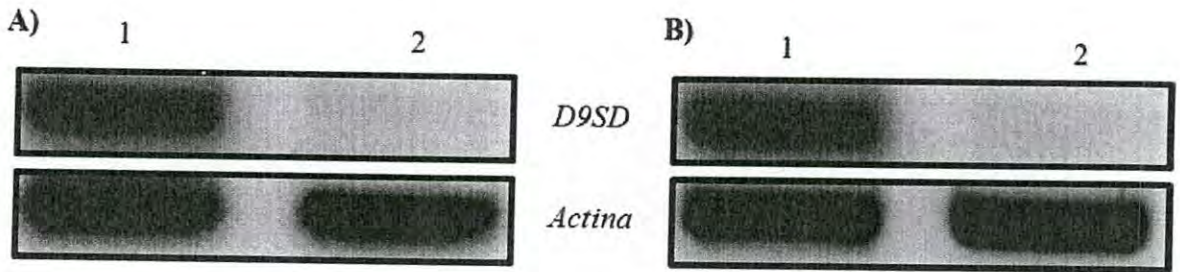


Figura 17. Productos de PCR presentados en gel de agarosa al 1 % teñido con GelRed™ (Biotium) del gen *D9SD*. *Actina* como gen de control interno. A) Muestreo 2013; B) Muestreo 2014. Carril 1: Semilla de *J. curcas*. Carril 2: Semilla de *J. cinerea*.

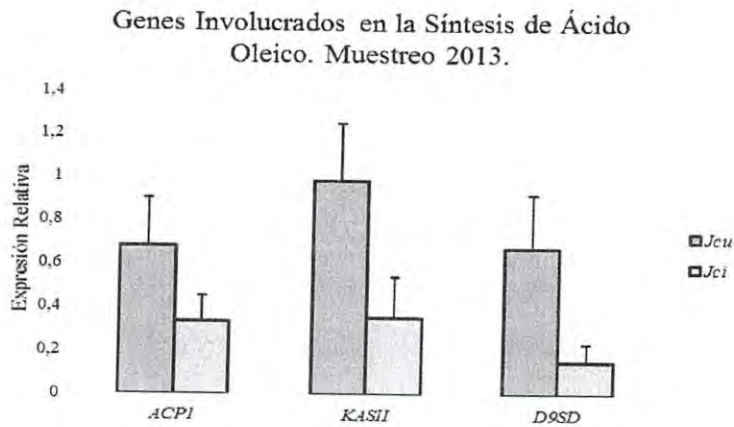


Figura 18. Comparación de los niveles de expresión de los genes *ACPI*, *KASII* y *D9SD*, evaluados semi-cuantitativamente por RT-PCR en relación al gen de control interno *Actina* en semillas de *J. curcas* y *J. cinerea* del muestreo 2013. Los valores mostrados son el promedio de la proporción de la señal específica del gen con la señal del gen *Actina* y la media \pm desviación estándar de 3 réplicas.

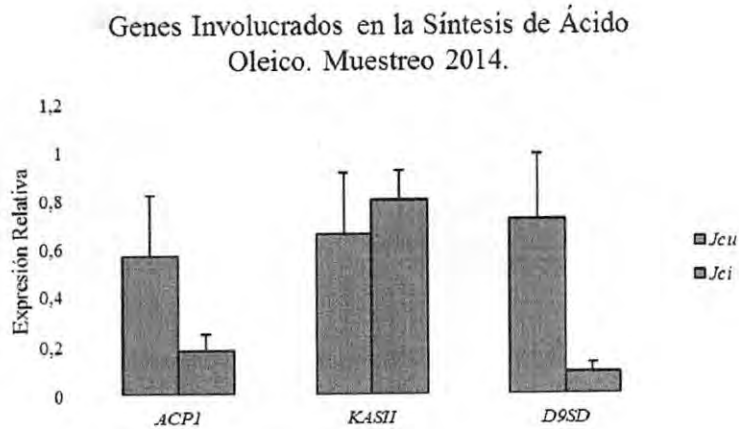


Figura 19. Comparación de los niveles de expresión de los genes *ACPI*, *KASII* y *D9SD*, evaluados semi-cuantitativamente por RT-PCR en relación al gen de control interno *Actina* en semillas de *J. curcas* y *J. cinerea* del muestreo 2014. Los valores mostrados son el promedio de la proporción de la señal específica del gen con la señal del gen *Actina* y la media \pm desviación estándar de 3 réplicas.

7.5.4 Genes involucrados en la síntesis del ácido graso linoleico

7.5.4.1 Genes *FAD2-1* y *FAD2-2* relacionados con la síntesis del ácido linoleico

El tamaño de producto de PCR obtenido para el gen *FAD2-1* fue de 155 pb aproximadamente (Figura 20). El gen *FAD2-1* es considerado el principal gen involucrado en la conversión del ácido oleico a linoleico, siendo su expresión alta en semilla y baja en otros tejidos. Por otro lado, en el caso del gen *FAD2-2*, se observaron amplicones de 133 pb aproximadamente. (Figura 21).

El análisis de expresión de *FAD2-1* en el pool de semillas colectadas en 2013 de la especie de interés (*Jatropha cinerea*) mostró expresión baja (0.48 veces con respecto al gen de *Actina*) en comparación a la especie de referencia (*Jatropha curcas*), en la que se observó mayor inducción de este gen (0.92 veces con respecto al gen de *Actina*). Por otra parte, en el pool de semillas de *Jatropha cinerea* colectadas en 2014 se observó mayor inducción de este gen (0.66 veces con respecto al gen de *Actina*) que en *Jatropha curcas* (0.51 veces con respecto al gen de *Actina*).

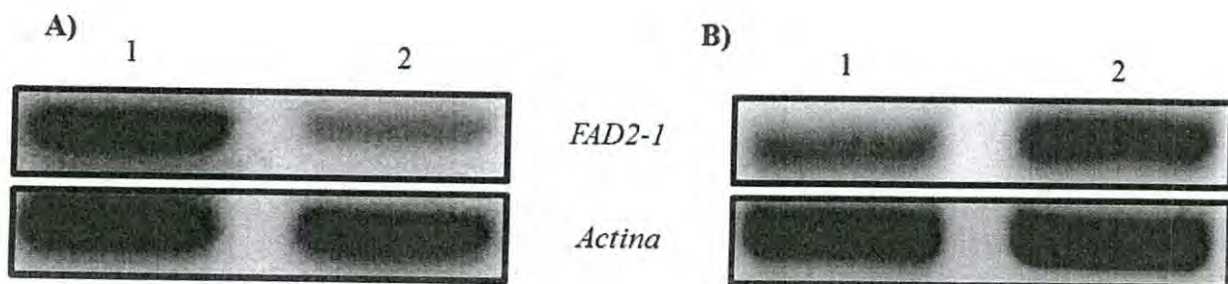


Figura 20. Productos de PCR presentados en gel de agarosa al 1 % teñido con GelRed™ (Biotium) del gen *FAD2-1*. *Actina* como gen de control interno. A) Muestreo 2013; B) Muestreo 2014. Carril 1: Semilla de *J. curcas*. Carril 2: Semilla de *J. cinerea*.

En el caso del gen *FAD2-2*, el análisis de expresión mostró mayor inducción en *Jatropha curcas* (0.80 veces con respecto al gen de *Actina*), mientras que en *Jatropha cinerea* se observó una expresión baja (0.17 veces con respecto al gen de *Actina*) en el pool de semillas de la colecta realizada en 2013. Con lo que respecta al análisis de la expresión de *FAD2-2* en la especie de interés (*Jatropha cinerea*), aún se observó una expresión baja (0.27 veces con respecto al gen de *Actina*) comparada con *Jatropha curcas* (0.66 veces con respecto al gen de *Actina*).

En el estudio realizado por Gu *et al.* (2012) señalan que los genes *FAD2* son de expresión alta, viéndose una mayor inducción a los 28 días del desarrollo de la semilla de *Jatropha curcas* y posterior a ello baja su expresión pero continúa expresándose durante el desarrollo de la semilla de *Jatropha curcas*. Se considera que las diferencias observadas en la expresión del gen *FAD2-1* de un año con respecto al otro, pudo deberse a la etapa de desarrollo en la que se encontraban las semillas tanto la especie de interés (*Jatropha cinerea*) como la de referencia (*Jatropha curcas*).

En el caso del gen *FAD2-2*, el patrón de expresión en ambas colectas (2013 y 2014) fue similar, observándose más inducido en semilla de *Jatropha curcas* que en semilla de *Jatropha cinerea*. Pudiera ser que en *Jatropha cinerea*, el gen *FAD2-2* sea de expresión baja, que su patrón de expresión en el desarrollo de la semilla sea diferente al de *Jatropha curcas*, que otros genes que no se consideraron en este estudio sean los que influyan en la síntesis del

ácido linoleico y en su contenido alto en el aceite o que el hecho de que los oligos estén basados en secuencias de *Jatropha curcas*, su homología no sea alta con la secuencia del gen de *Jatropha cinerea*.

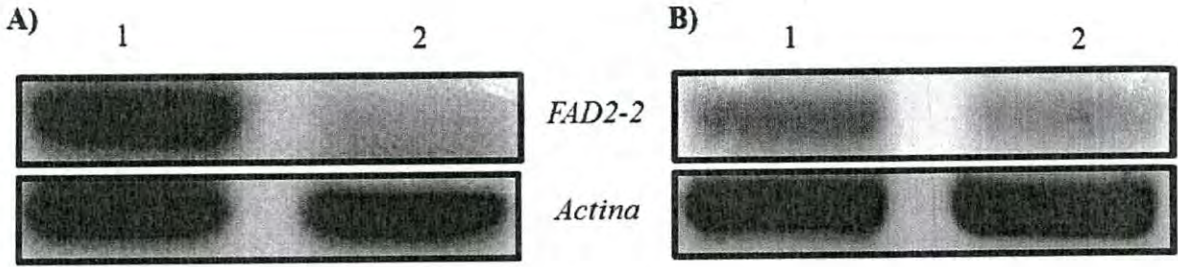


Figura 21. Productos de PCR presentados en gel de agarosa al 1 % teñido con GelRed™ (Biotium) del gen *FAD2-2*. *Actina* como gen de control interno. A) Muestreo 2013; B) Muestreo 2014. Carril 1: Semilla de *J. curcas*. Carril 2: Semilla de *J. cinerea*.

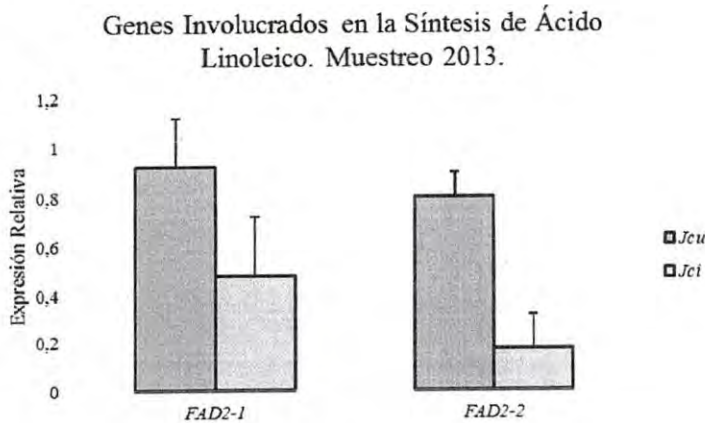


Figura 22. Comparación de los niveles de expresión de los genes *FAD2-1* y *FAD2-2*, evaluados semi-cuantitativamente por RT-PCR en relación al gen de control interno *Actina* en semillas de *J. curcas* y *J. cinerea* del muestreo 2013. Los valores mostrados son el promedio de la proporción de la señal específica del gen con la señal del gen *Actina* y la media \pm desviación estándar de 3 réplicas.

Genes Involucrados en la Síntesis de Ácido Linoleico. Muestreo 2014.

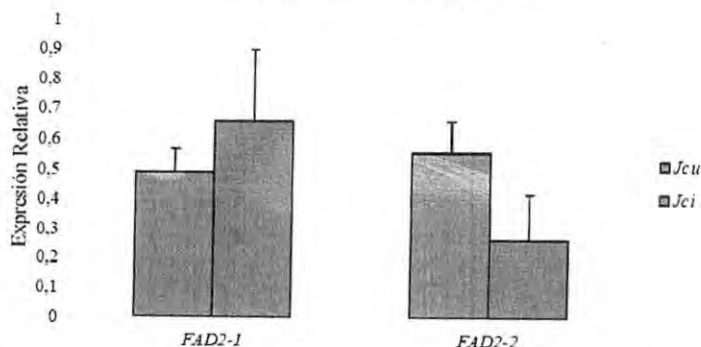


Figura 23. Comparación de los niveles de expresión de los genes *FAD2-1* y *FAD2-2*, evaluados semi-cuantitativamente por RT-PCR en relación al gen de control interno *Actina* en semillas de *J. curcas* y *J. cinerea* del muestreo 2014. Los valores mostrados son el promedio de la proporción de la señal específica del gen con la señal del gen *Actina* y la media \pm desviación estándar de 3 réplicas.

7.5.5 Relación entre el contenido de los ácidos grasos oleico y linoleico de *J. cinerea* y la expresión de genes involucrados.

Una vez realizados cada uno de los análisis, se constató que la expresión de los genes involucrados tanto en *J. curcas* como *J. cinerea* siguieron un mismo patrón a excepción del gen *FAD2-2* donde fue notoria la diferencia de su expresión en una especie con respecto a otra, encontrándose altamente expresado en *J. curcas*. La expresión de los genes considerados en este estudio y que se encuentran involucrados en la síntesis de los mismos, específicamente de los ácidos oleico y linoleico y corroborándose con el perfil de ácidos grasos de ambas especies, sugiere que en las semillas existe una relación moderada entre el contenido de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente el linoleico y la expresión de genes involucrados en la síntesis del ácido linoleico.

Se observó ligeramente mayor contenido de ácido oleico en *J. curcas* (37.59 g/100 g FAME) con respecto a *J. cinerea* (34 g/100 g FAME) coincidiendo con lo observado en la expresión de los genes analizados. Para el caso del ácido linoleico también los niveles del mismo difirieron ligeramente en una especie con respecto a otra, siendo en *J. cinerea* donde se

encontró mayor cantidad (46.92 g /100 g FAME), que en *J. curcas* (42.81 g /100 g FAME) a pesar de que en esta última se vió una mayor inducción de los genes *FAD2-1* y *FAD2-2* que en *J. cinerea*.

Lo anterior puede deberse a varios factores, entre ellos, la presencia de otros genes involucrados en la síntesis de los ácidos grasos que no se están considerando en este estudio y que también influyen en el contenido de los mismos. De acuerdo a estudios de Gu *et al.*, (2012), las desaturasas desempeñan una función crucial ya que son responsables de la presencia de los ácidos grasos poliinsaturados. Se ha demostrado que conforme la semilla se acerca a su maduración, la expresión de los genes que codifican para estas enzimas aumenta progresivamente, contribuyendo a un contenido mayor de ácidos grasos poliinsaturados. Ejemplo de ellos están los genes *AAD*, *DALD*, *DI2FAC* y *SD*. Por otro lado se encuentran presentes otros genes que también participan en la síntesis del ácido oleico como *DGATI* y síntesis de ácidos grasos saturados como *FATA* y *FATB* que no fueron estudiados y que podrían brindar un panorama más completo entre su expresión y el contenido de ácidos grasos.

Otro factor es el hecho de que al desconocerse la secuencia de los genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos en *J. cinerea*, se consideraron secuencias de *J. curcas* para el diseño de los oligos a emplear en las reacciones de PCR, pudiendo coincidir algunos pares de bases con el ADNc obtenido a partir de ARN de *J. cinerea* pero no en su totalidad, influyendo en los resultados analizados.

Por otra lado, Hernández *et al.* (1994), mencionan que hay genes sobre todo aquellos que codifican para productos que son utilizados y degradados rápidamente en los que predominan los procesos postranscripcionales, pudiendo afectar los resultados al momento de comparar la expresión de genes junto con el perfil de ácidos grasos. Hernández *et al.*, (1994), explican que la concentración de ARNm funcional disponible para la traducción en proteína va a depender no sólo de la tasa de síntesis del ARNm sino también de su *estabilidad relativa* una vez en el citoplasma, habiendo pruebas como “ensayos de runoff” o de “*hibridación in situ*” para detectar si dichos procesos contribuyeron en la expresión de los genes.

7.6 Secuencias de los genes *ACPI*, *KASII*, *D9SD*, *FAD2-1*, *FAD2-2* y *Actina* de *J. cinerea*.

Para cada uno de los genes enviados a secuenciación a los laboratorios de Servicios Genómicos de LANGEBIO-CINVESTAV, se siguió el siguiente procedimiento al momento de su análisis:

- ✓ Se generó una secuencia consenso después del análisis de las secuencias Forward y Reverse de dicho gen en BioEdit.
- ✓ Posteriormente, se introdujo la secuencia consenso en la herramienta BLAST de la plataforma NCBI y se consideraron los parámetros de identidad y número de secuencia de cada gen depositada en la base de datos del GenBank, para confirmar que dicha secuencia corresponde a *Jatropha* y al gen que se está analizando.

7.6.1 Gen *Actina*

La secuenciación de los productos de PCR del gen de *Actina* y su posterior análisis en el programa de BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.2.5 (Hall, Ibis Biosciences, CA, USA), permitió la obtención de una secuencia consenso de 760 pb, la cual al analizarse en BLAST en la plataforma de NCBI, presentó una homología del 99 % con la secuencia NM_001308728.1 correspondiente al gen de *Actina* de *J. curcas* (Figuras 24a y 24b).

7.6.2 Gen *ACPI*

Se generó una secuencia consenso de 789 pb una vez realizado el alineamiento Y análisis de las secuencias Forward y Reverse del gen *ACPI* en el programa de BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.2.5 (Hall, Ibis Biosciences, CA, USA). Dicha secuencia presentó una identidad del 94 % con la secuencia JQ806272.1 correspondiente al gen de *ACPI* de *J. curcas* depositada en la base de datos GenBank (Figuras 25a y 25b).

7.6.3 Gen *KASII*

Los análisis de las secuencias Forward y Reverse del gen *KASII* en el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.2.5 (Hall, Ibis Biosciences, CA, USA), permitió la obtención de una secuencia consenso de 918 pb, la cual al introducirse a BLAST, mostró una homología del 99 % con la secuencia de *KASII* de *J. curcas*, registrada en el GenBank con el número de acceso DQ987700.2 (Figuras 26a y 26b).

7.6.4 Gen *D9SD*

El análisis de las secuencias Forward y Reverse del gen *D9SD* en el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.2.5 (Hall, Ibis Biosciences, CA, USA), generó una secuencia consenso de 735 pb, la cual al introducirse en BLAST, permitió identificar una homología del 98 % con la secuencia con número de acceso JQ806303.1, correspondiente al gen *D9SD* de *J. curcas* (Figuras 27a y 27b).

7.6.5 Gen *FAD2-1*

La secuencia consenso generada a partir de los análisis llevados a cabo en el programa de BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.2.5 (Hall, Ibis Biosciences, CA, USA), constó de 530 pb y se identificó una homología del 97 % con la secuencia registrada con el número de acceso JN544421.1 para dicho gen en *J. curcas* y depositada en la base de datos del GenBank (Figuras 28a y 28b).

7.6.6 Gen *FAD2-2*

Se obtuvo una secuencia consenso de 603 pb una vez realizado el alineamiento y análisis de las secuencias Forward y Reverse del gen *FAD2-2* en el programa de BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.2.5 (Hall, Ibis Biosciences, CA, USA). Dicha secuencia presentó una identidad del 98 % con la secuencia JN544422.1 correspondiente al gen de *FAD2-2* de *J. curcas* depositada en la base de datos GenBank (Figuras 29a y 29b).

Edit and Resubmit Save Search Strategies Formatting options Download

Nucleotide Sequence (760 letters)

RID 6RF6117B01R (Expires on 12-13 13:20 pm)

Query ID |l|Query_232637

Description None

Molecule type nucleic acid

Query Length 760

Database Name or Description Nucleotide collection (nt)

Program BLASTN 2.3.0 + Citation

Other reports: Search Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results]

Graphic Summary

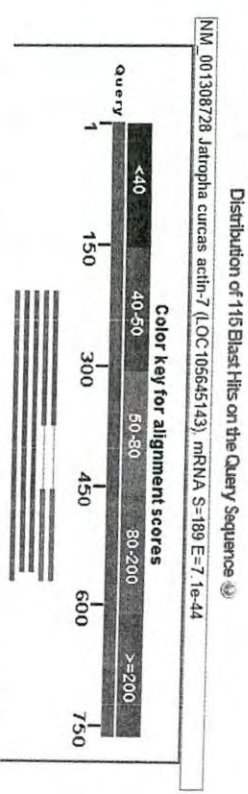


Figura 24a. Análisis de la secuencia del gen de *Actina* en BLAST en la plataforma de NCBI.

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select All None Selected: 0

Alignments

Description	Max score	Total Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Jatropha curcas actin-7 (LOC105645143). mRNA	305	495	37%	7e-79	99% XM_012230680.1
<input type="checkbox"/> Jatropha curcas actin-7 (LOC105645143). mRNA	305	495	37%	7e-79	99% NM_001308728.1
<input type="checkbox"/> Pinus cerasus isolate P158 actin V1 gene, partial cds	303	303	46%	2e-78	82% KP143844.1

Figura 24b. Análisis de la secuencia del gen de *Actina* en BLAST en la plataforma de NCBI.

NCBI/BLAST7/blastn suite/Formatting Results - 6RVIDJ5R015

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#)

[You Tube](#) [How to read this page](#) [Blast report description](#)

Nucleotide Sequence (789 letters)

RID 6RVIDJ5R015 [Expires on 12-13 16:43 pm]

Query ID |cd|Query_108111

Description None

Molecule type nucleic acid

Query Length 789

Database Name nr

Description Nucleotide collection (nt)

Program BLASTN 2.3.0+ [Citation](#)

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#)

[Graphic Summary](#)

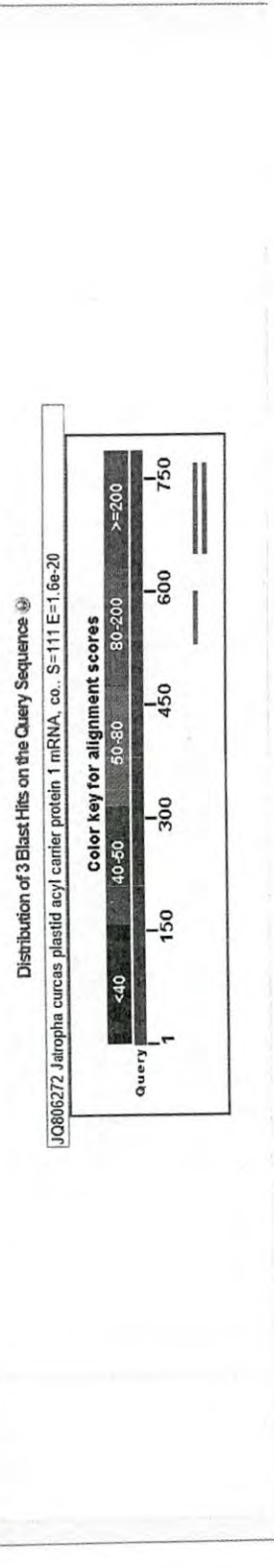


Figura 25a. Análisis de la secuencia del gen *ACPI* en BLAST en la plataforma de NCBI.

[Descriptions](#)

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments	Description	Max score	Total Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Jatropha curcas</i> uncharacterized LOC105631693.1 (LOC105631693). transcript variant X2. mRNA	132	132	15%	1e-26	87% XM_017213876.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: <i>Jatropha curcas</i> uncharacterized LOC105631693.1 (LOC105631693). transcript variant X1. mRNA	132	132	15%	1e-26	87% XM_017213869.1
<input type="checkbox"/>	<i>Jatropha curcas</i> plastid acyl carrier protein 1 mRNA, complete cds, nuclear gene for plastid product	111	111	9%	2e-20	94% J0806272.1

Figura 25b. Análisis de la secuencia del gen *ACPI* en BLAST en la plataforma de NCBI.

BLAST® Home Recent Results Saved Strategies Help

NCBI/BLAST/blastn suite/Formatting Results - 6RU0T4R6015

Edit and Resubmit Save Search Strategies Formatting options Download

You How to read this page Blast report description

Database Name nr
Description Nucleotide collection (nt)
Program BLASTN 2.3.0+ Citation

RID 6RU0T4R6015 (Expires on 12-13 16:25 pm)
Query ID |d|Query_261687
Description None
Molecule type nucleic acid
Query Length 735

Other reports: Search Summary Taxonomy reports Distance tree of results

Graphic Summary

Distribution of 6 Blast Hits on the Query Sequence

Color key for alignment scores

1 100 200 300 400 500 600 700

1 100 200 300 400 500 600 700

1 100 200 300 400 500 600 700

1 100 200 300 400 500 600 700

1 100 200 300 400 500 600 700

1 100 200 300 400 500 600 700

1 100 200 300 400 500 600 700

Figura 27a. Análisis de la secuencia del gen *D9SD* en BLAST en la plataforma de NCBI.

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected 0

	Max score	Total Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Jatropha curcas</i> (tele- <i>D</i> -stearoyl-acyl carrier protein desaturase mRNA, complete cds	259	417	32%	56-65	98% J08063033.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Jatropha curcas</i> acyl-facil-carrier-protein desaturase, chloroplast-like (LOC105644924). mRNA	259	417	32%	56-65	98% XM_012230433.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Jatropha curcas</i> DNA, clone - JH1 23111, complete sequence	259	417	32%	56-65	98% AF011964.1

Figura 27b. Análisis de la secuencia del gen *D9SD* en BLAST en la plataforma de NCBI.

BLAST® Home Recent Results Saved Strategies Help

NCBI/BLAST/blastn suite/Formatting Results - 06B43KA801R

Edit and Resubmit Save Search Strategies ▶ Formatting options. ▶ Download

Nucleotide Sequence (589 letters)

RID 06B43KA801R (Expires on 09-25 06:49 am)
 Query ID |Query_42061
 Description None
 Molecule type nucleic acid
 Query Length 589

Other reports: ▶ Search Summary Taxonomy reports [Distance tree of results]

Graphic Summary

Database Name nr
 Description Nucleotide collection (nt)
 Program BLASTN 2.2.32+ ▶ Citation

You [View](#) How to read this page Blast report description

Distribution of 4 Blast Hits on the Query Sequence

JN544422 Jatropha curcas clone JcFAD2-2 fatty acid desaturase 2 ... S=169 E=6.8e-38

Color key for alignment scores

Query

Figura 29a. Análisis de la secuencia del gen *FAD2-2* en BLAST en la plataforma de NCBI.

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select All None Selected 0

Alignments

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <i>Jatropha curcas</i> delta-12-acyl-lipid desaturase mRNA, partial cds	169	169	16%	7e-38	98%	J03952.01.1
<input type="checkbox"/> <i>Jatropha curcas</i> delta-12 fatty acid desaturase mRNA, complete cds	169	169	16%	7e-38	98%	J08062.08.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Jatropha curcas</i> somata-4 fatty acid desaturase, endoplasmic reticulum isoforms 1-like 1LLOC1055508911.mRNA	169	169	16%	7e-38	98%	XM_012232850.1
<input type="checkbox"/> <i>Jatropha curcas</i> clone JcFAD2-2 fatty acid desaturase 2 gene, complete cds	169	169	16%	7e-38	98%	JN544422.1

Figura 29b. Análisis de la secuencia del gen *FAD2-2* en BLAST en la plataforma de NCBI.

Los resultados obtenidos proporcionan información de gran relevancia, ya que en primer lugar, dan la confiabilidad de que los productos amplificados corresponden a secuencias del género *Jatropha* y a los genes que se seleccionaron en el presente estudio y que además presentan una homología alta con las secuencias depositadas en la base de datos del GenBank. Lo siguiente sería llevar a cabo el análisis de expresión de estos genes mediante la técnica de qRT-PCR Tiempo Real, que es más sensible y más precisa y donde se podrá cuantificar la cantidad de ADN presente en la muestra (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Por otra parte, la obtención, análisis y edición de las secuencias consenso generadas para cada uno de los genes analizados en este estudio, pueden compararse con las secuencias ya registradas en las bases de datos para *J. curcas* y visualizar las diferencias entre esta especie y *J. cinerea* y en consecuencia, diseñar nuevos oligonucleótidos en base a la información que se ha generado en este estudio, que hasta el momento se desconocía para la especie de *J. cinerea*, y así implementar técnicas moleculares que permitan develar fragmentos más grandes de cada gen, facilitando así el desarrollo de más estudios y de información sobre el funcionamiento, patrón de expresión y variabilidad de estos genes en *J. cinerea*.

7.7 Resultados preliminares del gen *FAD2-1* por qRT-PCR Tiempo Real

7.7.1 Curva estándar del gen de *Actina* en *J. cinerea*

La eficiencia obtenida para la curva estándar para el gen de *Actina* en *Jatropha cinerea* fue del 100 % y $R^2 = 0.99$ (Figura 30) siendo consideradas como aceptables las curvas con eficiencias entre 90 y 110 % (Valenzuela, 2014). El amplicón obtenido tuvo una $T_m = 85$ °C (Figura 31).

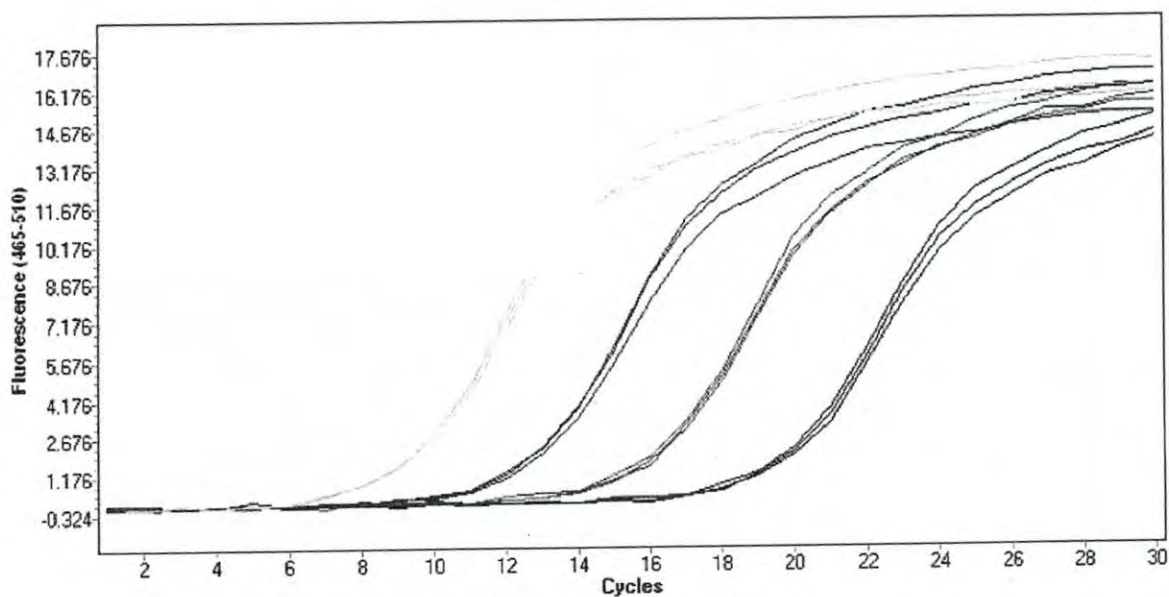


Figura 30. Curva estándar del gen *Actina* en *J. cinerea*. De izquierda a derecha se muestran en orden descendente y por triplicado las curvas de amplificación de las diluciones utilizadas para la obtención de la curva estándar del gen de *Actina*.

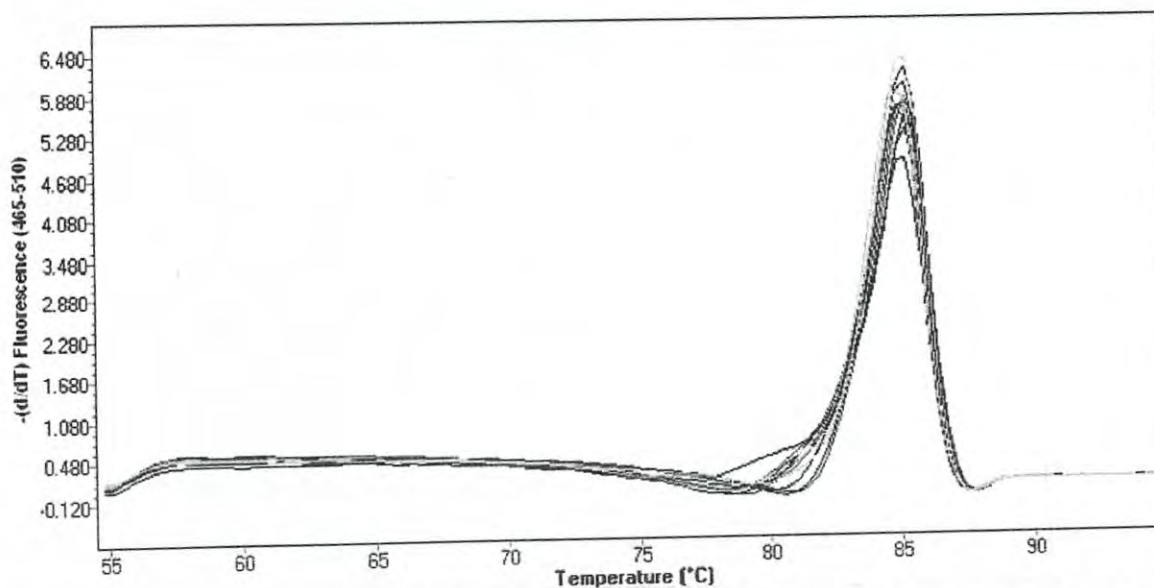


Figura 31. Curva de disociación del amplicón diana del gen *Actina* en *J. cinerea*. El amplicón del gen de *Actina* se disocia completamente a una temperatura promedio de 85 °C.

7.7.2 Curva estándar del gen de *Actina* en *J. curcas*

Se obtuvo una curva con una eficiencia de 105 % y $R^2 = 0.97$ (Figura 32). La temperatura de desnaturalización del amplicón (T_m) resultante fue $T_m = 85$ °C (Figura 33).

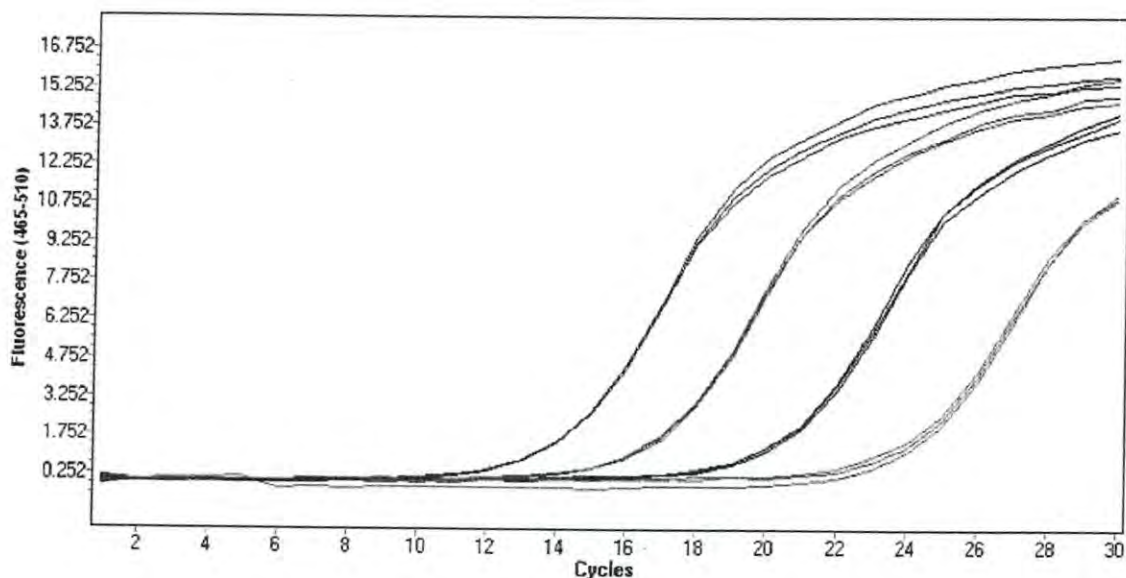


Figura 32. Curva estándar del gen *Actina* en *J. curcas*. De izquierda a derecha se muestran en orden descendente y por triplicado las curvas de amplificación de las diluciones utilizadas para la obtención de la curva estándar del gen de *Actina*.

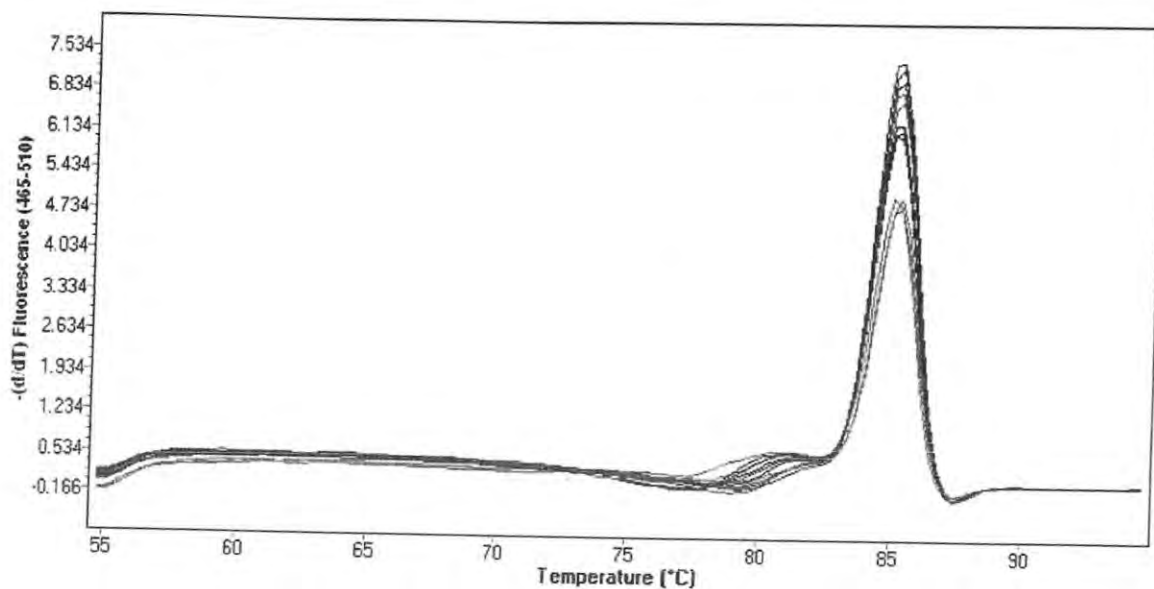


Figura 33. Curva de disociación del amplicón diana del gen *Actina* en *J. curcas*. El amplicón del gen de *Actina* se disocia completamente a una temperatura promedio de 85 °C.

7.7.3 Curva estándar del gen de *FAD2-1* en *J. cinerea*

Se obtuvo una curva con una eficiencia de 97 % y $R^2 = 0.99$ (Figura 34). La temperatura de desnaturalización del amplicón (T_m) resultante fue $T_m = 83\text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 35).

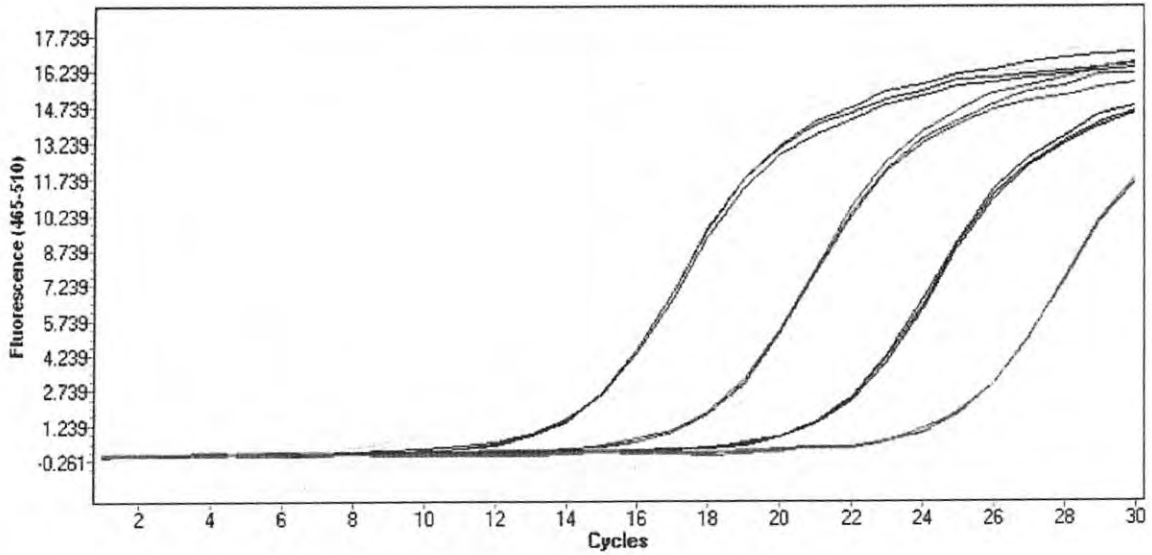


Figura 34. Curva estándar del gen *FAD2-1* en *J. cinerea*. De izquierda a derecha se muestran en orden descendente y por triplicado las curvas de amplificación de las diluciones utilizadas para la obtención de la curva estándar del gen de *FAD2-1*.

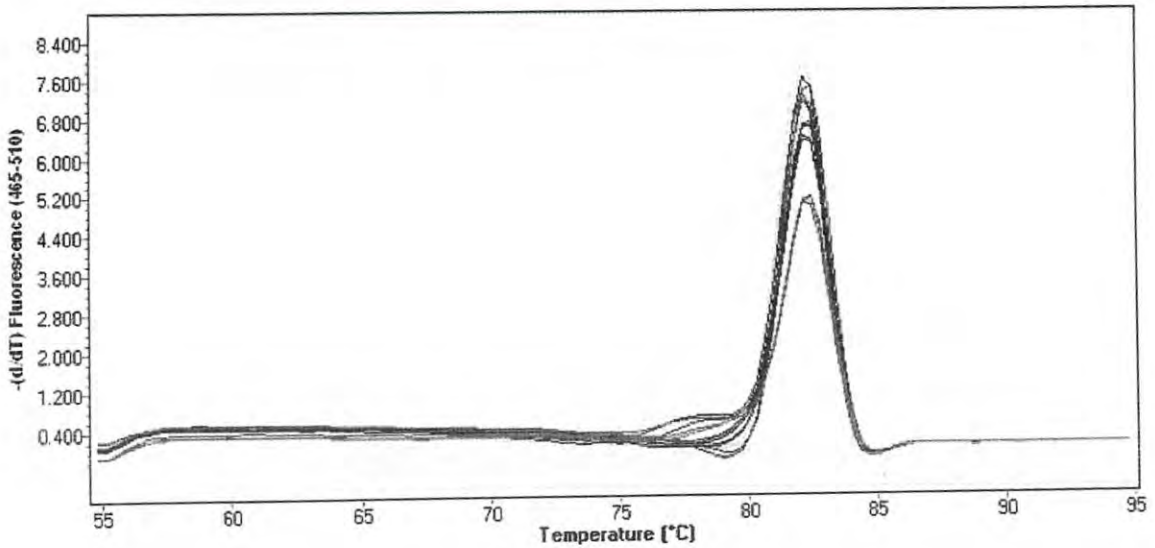


Figura 35. Curva de disociación del amplicón diana del gen *FAD2-1* en *J. cinerea*. El amplicón del gen de *FAD2-1* se disocia completamente a una temperatura promedio de $85\text{ }^\circ\text{C}$.

7.7.4 Curva estándar del gen de *FAD2-1* en *J. curcas*

Se generó una curva estándar para el gen *FAD2-1* en *Jatropha curcas* con una eficiencia del 100 % y $R^2 = 0.98$ (Figura 36). El amplicón obtenido tuvo una $T_m = 83$ °C (Figura 37).

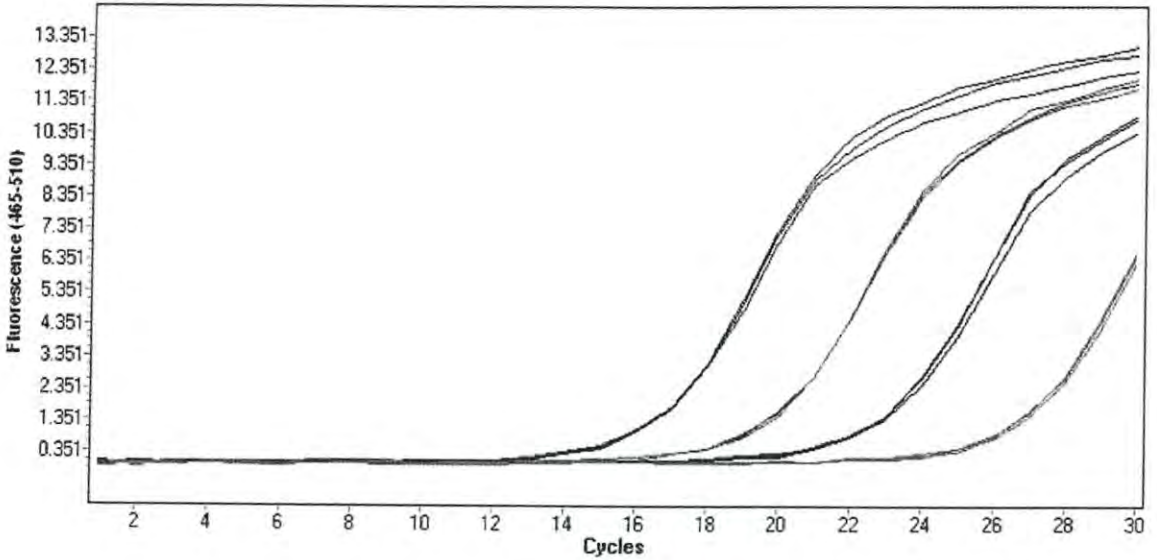


Figura 36. Curva estándar del gen *FAD2-1* en *J. curcas*. De izquierda a derecha se muestran en orden descendente y por triplicado las curvas de amplificación de las diluciones utilizadas para la obtención de la curva estándar del gen de *FAD2-1*.

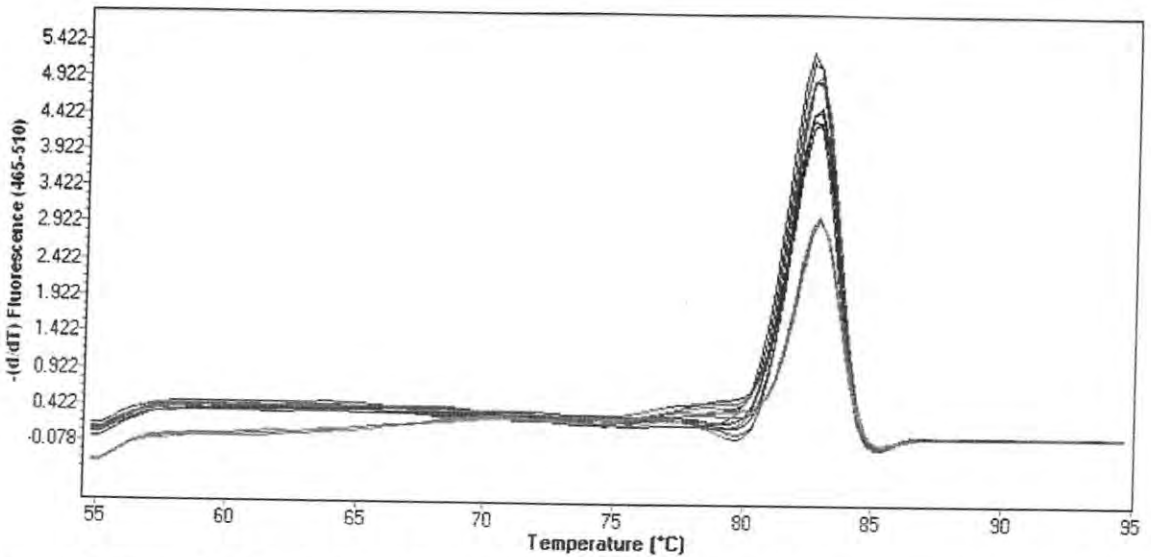


Figura 37. Curva de disociación del amplicón diana del gen *FAD2-1* en *J. curcas*. El amplicón del gen de *FAD2-1* se disocia completamente a una temperatura promedio de 83 °C.

7.7.5 Expresión del gen *FAD2-1* relacionado con la síntesis del ácido linoleico

Se optó para el análisis de las muestras llevar a cabo una cuantificación relativa. La cantidad mínima de transcritos del gen de *Actina* para *J. curcas* fue de 2.59×10^4 copias/ μL , la máxima de 2.99×10^4 , y una media de 2.79×10^4 copias/ μL . Para el caso de *J. cinerea*, la cantidad mínima de transcritos del gen de *Actina* fue de 1.50×10^4 copias/ μL , la máxima de 3.83×10^4 , y una media de 2.51×10^4 copias/ μL .

Para el gen *FAD2-1* en *J. curcas* la cantidad mínima de transcritos fue de 1.24×10^3 copias/ μL , la máxima de 1.58×10^3 , y una media de 1.41×10^3 copias/ μL . En *J. cinerea* la cantidad mínima de transcritos del gen de *FAD2-1* fue de 1.59×10^3 copias/ μL , la máxima de 5.96×10^3 , y una media de 4.33×10^3 copias/ μL .

Este análisis preliminar de expresión de *FAD2-1* por qRT-PCR Tiempo Real, corrobora los resultados obtenidos en el análisis de *FAD2-1* por RT-PCR semicuantitativo en el muestreo realizado en 2014 de *Jatropha cinerea* mostrándose mayor expresión (0.17 veces con respecto al gen de *Actina*) en comparación a la especie de referencia (*Jatropha curcas*), en la que se observó 0.05 veces con respecto al control interno. (Figura 38).

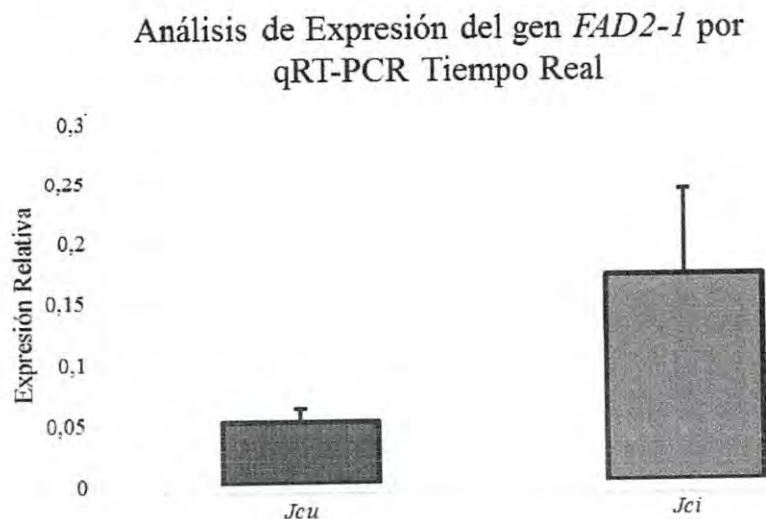


Figura 38. Comparación de los niveles de expresión del gen *FAD2-1* por qRT-PCR Tiempo Real, en relación al gen control *Actina* en semillas de *J. curcas* (n = 2) y *J. cinerea* (n = 3) del muestreo 2014. Los valores mostrados son el promedio de la proporción de la señal específica del gen con la señal del gen *Actina* y la media \pm desviación estándar.

Un punto importante a considerar para el desarrollo adecuado de qRT-PCR Tiempo Real es la validación de los genes de referencia, porque al ser una técnica sensible y precisa, se deben seleccionar los más estables en su expresión ya que cualquier variación, puede afectar el resultado final al momento de normalizar los datos (Dheda *et al.*, 2005; Hendriks-Balk *et al.*, 2007). Se han reportado diferentes algoritmos estadísticos para identificar los genes de referencia más adecuados, siendo uno de ellos el software geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002). Gutiérrez *et al.* (2008) haciendo uso del software geNorm probó 14 genes que son considerados como genes de referencia en análisis de *Arabidopsis* para evaluar su estabilidad encontrado que el gen de *Actina 7* es uno de los más estables. Esto sugiere que una vez realizados los análisis pertinentes, los oligos considerados en este estudio para el gen de *Actina* pudieran ser adecuados para normalizar los resultados, ya que su secuencia presenta una homología alta (99 %) con la secuencia depositada en el GenBank [*Jatropha curcas actin-7* (LOC105645143), mRNA con número de acceso NM_001308728.1].

Los resultados obtenidos a partir de la secuenciación de los productos de PCR de *Jatropha cinerea* y el análisis preliminar de la expresión del gen *FAD2-1* por medio de qRT-PCR Tiempo Real, generan expectativas y brindan confiabilidad para extender el análisis de qRT-PCR Tiempo Real al resto de los genes y así tener un panorama más completo y preciso de su expresión en semilla de *Jatropha cinerea*.

T. 160206

VIII. CONCLUSIONES

Los principales ácidos grasos identificados en las semillas de *Jatropha cinerea* fueron los ácidos oleico y linoleico, siendo éste último el más abundante.

La presencia de compuestos antioxidantes como tocoferoles y carotenoides no fue detectada en el aceite extraído de las semillas de *Jatropha cinerea*.

Las pastas residuales de las semillas de *Jatropha cinerea* resultaron ser una fuente importante de compuestos fenólicos. El compuesto fenólico de mayor abundancia fue el ácido cafeico.

Los genes *KASII* y *FAD2-1* presentaron mayor nivel de expresión en ambas especies de *Jatropha*.

La relación entre el contenido de ácidos grasos en el aceite y la expresión de genes es moderada con excepción del gen *D9SD*.

Las secuencias de los genes analizados en este estudio brindan la certeza de que corresponden a genes involucrados en la síntesis de los ácidos oleico y linoleico en el género *Jatropha*.

IX. RECOMENDACIONES

Se recomienda extender este estudio a nivel molecular a todas las especies del género *Jatropha* nativas del Estado de Sonora para obtener más información de las plantas de éste género.

Debido a la relación entre la expresión de genes y la maduración de la semilla, se recomienda definir el grado de maduración del material biológico para estudios posteriores.

Es recomendable ampliar la caracterización química de todas las especies del género *Jatropha* nativas del Estado de Sonora y considerar otros tejidos por la importancia etnobotánica que tienen en la región.

Se sugiere analizar la expresión de los genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos mediante la técnica de qRT-PCR Tiempo Real por su sensibilidad y precisión.

Realizar un análisis transcriptómico en la semilla de *Jatropha cinerea* con énfasis en la síntesis de los ácidos grasos.

X. LITERATURA CITADA

- Achten WMJ, Verchot L, Franken YJ, Mathijs E, Singh VP, Aerts R y Muys B. (2008). *Jatropha* bio-diesel production and use. *Biomass and Bioenergy* 32(12): 1063-1084.
- Alday P. (2011). Evaluación de las semillas de *Jatropha cordata* y *Jatropha cardiophylla* como fuentes de proteína, compuestos fenólicos y aceite para la obtención de biodiesel. (Tesis Maestría). Universidad de Sonora, Hermosillo, Mexico.
- Ambio Inc. (s.f.). Strategies for detecting mRNA Northern blotting, nuclease protection assays, in situ hybridization, and RT-PCR. Technote 6(3). Fecha de consulta: 08 de noviembre de 2015. Disponible en: (<https://www.thermofisher.com/mx/es/home/references/ambion-tech-support/northern-analysis/tech-notes/strategies-for-detecting-mrna.html>)
- Ambrosi DG, Galla G, Purelli M, Barbi T, Fabbri A, Lucretti, S et al. (2010). DNA markers and FCSS analyses shed light on the genetic diversity and reproductive strategy of *Jatropha curcas* L. *Diversity* 2: 810 – 836.
- AOCS. (2009). Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 4th ed., Method Ce 8-89. Amer. Oil Chemists' Society, Champaign, IL.
- Astiasarán I, Lasheras B, Ariño A y Martínez J. (2003). Alimentos y Nutrición en la Práctica Sanitaria. España: Ediciones Díaz de Santos.
- Abdelgadir H y Van Staden J. (2013). Ethnobotany, ethnopharmacology and toxicity of *Jatropha curcas* L. (*Euphorbiaceae*): A review. *South African Journal of Botany* 88: 204 – 218.
- Barrier E, Velasquillo L, Chavez M y Gaulon R. (1998). Neotectonic evolution of the Isthmus of Tehuantepec (southeastern Mexico). *Tectonophysics* 287(1):77– 96.
- Basha SD y Sujatha M. (2009). Genetic analysis of *Jatropha* species and interspecific hybrids of *Jatropha curcas* using nuclear and organelle specific markers. *Euphytica* 168(2):197–214.
- Basha SD, Francis G, Makkar HPS, Becker K y Sujatha M. (2009). A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. *Plant Science* 176(6): 812–823.

- Baumgart S. (2007, March). *Jatropha* Cultivation Belize. En *Proceedings of the Expert Seminar on Jatropha curcas L. Agronomy and Genetics*. FACT Foundation, Netherlands. (pp. 26 – 28).
- Berger SL y Kimmel AR. (1987). Guide to Molecular Cloning Techniques. En Berger S y Kimmel R (Eds), *Methods in Enzymology*. San Diego: Academic Press.
- Bradley JR, Johnson D y Rubenstein D. (2001). Lecture notes on molecular medicine. Oxford: Wiley-Blackwell science.
- Branen JK, Chiou TJ y Engeseth NJ. (2001). Overexpression of acyl carrier protein-1 alters fatty acid composition of leaf tissue in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 127(1):222-229.
- Brawerman G, Mendecki, J y Lee SY. (1972). A procedure for the Isolation of Mammalian Messenger Ribonucleic Acid. *Biochemistry* 11(4): 637 – 641.
- Brittaine R y Lualadio N: (2010). *Jatropha*: a smallholder bioenergy crop: the potential for pro-poor development (Vol. 8). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Britton G. (1989). Carotenoids and Polyterpenoids. *Natural Product Reports* 6(4): 359-392.
- Britton G. (1989). Carotenoids and Polyterpenoids. *Natural Product Reports* 8(3): 223-249.
- Bueno Ferrer C. (2012). Bio-compuestos Termoplásticos basados en Aceites Vegetales. Estudio de su Aplicabilidad al Envasado de Alimentos. (Tesis Doctoral). Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Universidad de Alicante.
- Bustin SA, Benes V, Nolan T y Pfaffl MW. (2005). Quantitative real-time RT-PCR- a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* 34(3): 597 – 601.
- Cantos E, García-Viguera C, de Pascual-Teresa S y Tomas-Barberán FA. (2000). Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(10): 4606 – 4612.
- Carranco-Jaúregui ME, Calvo-Carrillo MC y Pérez-Gil-Romo F. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *ALAN* 61(3): 233-241.
- Castellanos AE y Esqueda M. (2012). Uso de la biodiversidad para la bioenergía y biocombustibles en las zonas áridas de México. México: Editorial Universidad de Sonora.
- Chitindingu K, Ndhlala AR, Chapano C, Benhyura MA y Muchuweti M. (2007). Phenolic compound content, profiles and antioxidant activities of *Amaranthus hybridus* (pigweed), *Brachiaria brizantha* (upright bra- chiara) and *Panicum maximum* (guinea grass). *Journal of Food Biochemistry* 31(2): 206 – 216.

- Corzo-Valladares PA, Fernández-Martínez JM y Velasco L. (2012). Tocochromanol content and composition in *Jatropha curcas* seeds. *Industrial Crops and Products* 36(1): 304 – 307.
- Covas MI, Nyysönen K, Poulsen HE, Kaikkonen J, Zunft HJF y Kiesewetter H y Nascetti S. (2006). The Effect of Polyphenols in Olive Oil on Heart Disease Risk Factors. A Randomized Trial. *Annals of Internal Medicine* 145(5): 333 - 341.
- Cultek. (2006). Extracción y purificación de ácidos nucleicos. [En línea]. Fecha de consulta: 19 de septiembre de 2015. Disponible en: (http://www.divulgacion.ccg.unam.mx/files/pdfs/como/Purificacion_extraccion_DNA-RNA.pdf)
- Dai J y Mumper RJ. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15(10): 7313 – 7352.
- Dagar JC, Tomar OS, Kumar Y, Bhagwan H, Yadav RK y Tyagi NK. (2006). Performance of Some Under-Explored Crops under Saline Irrigation in a Semiarid Climate in Northwest India. *Land Degradation and Development* 17(3): 285 – 299.
- De Necochea R y Canul JC. (2004). Métodos fisicoquímicos en biotecnología: Secuenciación de ácidos nucleicos. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Dehgan B y Webster GL. (1979). Morphology and infrageneric relationships of the genus *Jatropha* (*Euphorbiaceae*). (Vol.4). University of California Publications in Botany.
- Deng X y Scarth R. (1998). Temperature effects on fatty acid composition during development of low-linolenic oilseed rape (*Brassica napus L.*). *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75(7): 759 – 766.
- Dheda K, Huggett JF, Chang JS, Kim LU, Bustin SA, Johnson MA, Rook GA y Zumla A. (2005). The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Analytical Biochemistry* 344(1): 141–143.
- Divakara BN, Upadhyaya HD, Wani SP y Gowda CL. (2010). Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas L.*: A review. *Applied Energy* 87(3): 732 – 742.
- Dryden GML. (2008). *Animal Nutrition Science*. London: CABI. pp. 63 – 64.
- Dyer JM, Chapital DC, Kuan JCW, Mullen RT, Turner C, McKeon TA y Pepperman AB. (2002). Molecular analysis of a bifunctional fatty acid conjugase/desaturase from tung. Implications for evolution of plant fatty acid diversity. *Plant Physiology* 130(4): 2027 – 2038.
- El-Baz FK, Ali FF, El-Rahman AAA, Aly HF, Saad SA y Mohamed AA. (2014). HPLC Evaluation of Phenolic Profile, and Antioxidant Activity of Different Extracts of

- Jatropha curcas* Leaves, International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research 29(40): 203 – 210.
- Eastmond A, García C, Fuentes A y Becerril-García J. (2014). México. En Solomon BD y Bailis R (Eds), *Sustainable Development of Biofuels in Latin America and the Caribbean* (pp.203 - 219). Nueva York: Springer Science+Business Media.
- FACT. (2007). The *Jatropha* Handbook. From Cultivation to Application. Recuperado en: http://www.snvworld.org/files/publications/fact_foundation_jatropha_handbook_2010.pdf
- Fayyaz-ul-Hassan HA, Cheema MA y Manaf A. (2005). Effects of environmental variation on oil content and fatty acid composition of canola cultivars. *Journal of Research Science* 16(2): 65 – 72.
- FIBAO. (2007). Hibridación in situ. [En línea]. [Fecha de consulta: 10 de noviembre de 2015]. Disponible en: <http://medmol.es/tecnicas/35/>
- Foote CS, Denny RW, Weaver L, Chang Y y Peters J. (1970). Quenching of singlet oxygen. *Annals of the New York Academy of Sciences* 171(1): 139-148.
- Francis G, Edinger R y Becker K. (2005). A concept for simultaneous wasteland reclamation, fuel production, and socio-economic development in degraded areas in India: need, potential and perspectives of *Jatropha* plantations. *Natural Resources Forum* (Vol. 29, No.1, pp. 12-24). Blackwell Publishing, Ltd.
- Fresnedo-Ramírez J y Orozco-Ramírez Q. (2013). Diversity and distribution of genus *Jatropha* in Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution* 60(3): 1087 – 1104.
- Fu R, Zhang Y, Guo Y, Liu F y Chen F. (2014). Determination of phenolic contents and antioxidant activities of extracts of *Jatropha curcas* L. seed shell, a by-product, a new source of natural antioxidant. *Industrial Crops and Products* 58(24): 265 – 270.
- Gámez-Meza N, Alday-Lara PP, Makkar HP, Becker, K y Medina-Juárez LA. (2013). Chemical characterisation of kernels, kernel meals and oils from *Jatropha cordata* and *Jatropha cardiophylla* seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93(7): 1706 - 1710.
- García-Alonso FJ, Periago MJ, Vidal-Guevara ML, Cantos E, Ros G, Ferreres F y Abellán, P. (2003). Assessment of the antioxidant properties during storage of a dessert made from grape, cherry, and berries. *Journal of Food Science* 68(4): 1525–1530.
- Gatica A. (2011). Ácidos Grasos EPA y DPH y su Vital Importancia en la Nutrición Humana. [En línea]. Indualimentos. Universidad de Chile. Fecha de consulta 22 de febrero de 2014. Disponible en: <http://www.dinta.cl/wp-dintacl/wp-content/uploads/epa-dha.pdf>

- GEXSI. Global Market Study on *Jatropha*. (2008). [En línea]. [Fecha de consulta: 04 de febrero de 2015]. Disponible en: http://www.jatropha-alliance.org/fileadmin/documents/GEXSI_Global-Jatropha-Study_FULL-REPORT.pdf
- Gilbert SF. (2005). *Biología del Desarrollo*. España: Editorial Médica Panamericana. pp. 99.
- González-Bombardieri S. (1993). Avances en el diagnóstico histopatológico de las enfermedades quirúrgicas. *Revista Chilena de Cirugía* 45(3): 215 – 222.
- Gour VK. (2006). Production practices including post-harvest management of *Jatropha curcas*. En Singh B, Swaminathan R y Ponraj (Eds), *Proceedings of the biodiesel conference toward energy independence - Focus of Jatropha* (pp.223-251). India: Rashtrapati Bhawan
- Govaerts R, Frodin DG, Radcliffe-Smith A y Carter S. (2012). World checklist and bibliography of Euphorbiaceae (with Pandaceae). UK: Royal Botanic Gardens, Kew.
- Graef G, LaVallee BJ, Tenopir P, Tat M, Schweiger B, Kinney AJ, Van Gerpen JH y Clemente TE. (2009). A high-oleic-acid and low-palmitic acid soybean: agronomic performance and evaluation as a feedstock for biodiesel. *Plant Biotechnology Journal* 7(5): 411-421.
- Gu K, Yi C, Tian D, Sangha JS, Hong Y y Yin Z. (2012). Expression of fatty acid and lipid biosynthetic genes in developing endosperm of *Jatropha curcas*. *Biotechnology for Biofuels* 5(1):47.
- Gübitz GM, Mittelbach M y Trabi M. (1999). Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. *Bioresource Technology* 67(1):73–82.
- Guerra DJ, Ohlrogge JB y Frentzen M. (1986). Activity of acyl carrier protein isoforms in reactions of plant Fatty Acid metabolism. *Plant Physiology* 82(2): 448–453.
- Guerrero DB y De Luis Román DA. (2006). *Manual de nutrición y metabolismo*. España: Ediciones Díaz de Santos.
- Gutiérrez L, Mauriat M, Guenin S, et al. (2008). The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction RT-PCR analysis in plants. *Plant Biotechnology Journal* 6(6): 609 – 618.
- Harwood JL y Stumpf PK. (1971). Fat metabolism in higher plants: XLIII. Control of fatty acid synthesis in germinating seeds. *Archives Biochemistry Biophysics* 142(1):281– 91.
- Heller J. (1996). *Physic nut, Jatropha curcas Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops*. Italia: International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) pp. 66.
- Hemming CF y Radcliffe-Smith A. (1987). A revision of the Somali species of *Jatropha* (*Euphorbiaceae*). *Kew bulletin* 42(1):103–12.

- Hendriks-Balk MC, Michel MC y Alewijnse AE. (2007). Pitfalls in the normalization of real-time polymerase chain reaction data. *Basic Research in Cardiology* 102(3): 195–197.
- Hernández M y Sastre A. (1999). *Tratado de Nutrición*. España: Ediciones Díaz de Santos. pp. 190 – 195.
- Hernández A, Vasallo PM y Salido E. (1994). Análisis del RNA: Estudio de la expresión génica. *Nefrología* 14(2): 145–162.
- Herrera R y Rico J. Los aceites vegetales como Fuente de Biodiesel. *Saber más*. [En línea]. 21 de enero de 2015, ISSN: 2007-7041 [fecha de consulta: 03 de febrero de 2015]. Disponible en: <http://www.sabermas.umich.mx/archivo/secciones-antteriores/articulos/54-numero-7/109-los-aceites-vegetales-como-fuente-de-biodiesel.pdf>
- Hishida M, Ascencio-Valle F, Fujiyama H, Orduño-Cruz A, Endo T y Larrinaga-Mayoral JA. Antioxidant Enzyme Responses to Salinity Stress of *Jatropha curcas* and *J. cinerea* at Seedling Stage. (2014). *Russian Journal of Plant Physiology* 61(1): 53–62.
- Hishida M, Ascencio-Valle F, Fujiyama H, Orduño-Cruz A, Endo T y Larrinaga-Mayoral JA. (2013). Response to salt stress in growth, water relations, and ion content of *Jatropha curcas* and *J. cinerea* seedlings. *Interciencia* 38(4): 298-304.
- Huang Q, Guo Y, Fu R, Peng T, Zhang Y y Chen F. (2014). Antioxidant activity of flavonoids from leaves of *Jatropha curcas*. *ScienceAsia* 40(3): 193-197.
- Hutchinson III CA. (2007). DNA sequencing: bench to beside and beyond. *Nucleic Acids Research* 35(18): 6227-6237.
- Jaswir I, Noviendri D, Hasrini RF y Octavianti F. (2011). Carotenoids: sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. *Journal of Medicinal Plant Research* 5(33): 7119-7131.
- Johnson ST, Eswaran N y Sujatha M. (2011). Molecular approaches to improvement of *Jatropha curcas* Linn. as a sustainable energy crop. *Plant Cell Reports* 30(9):1573–1591.
- Jongschaap REE, Corré WJ, Bindraban PS y Brandenburg WA. (2007). Claims and facts on *Jatropha curcas* L.: Global *Jatropha curcas* evaluation, breeding and propagation programme (en línea). *Plant Research International B.V.*; Wageningen UR. Disponible en: http://www.factfuels.org/media_en/Claims_and_Facts_on_Jatropha_-WUR
- Kaul S, Porwal J y Garg MO. (2010). Parametric Study of *Jatropha* Seeds for Biodiesel Production by Reactive Extraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 87(8): 903–908.
- Koolman J y Röhm KH. (2005). *Bioquímica. Texto y Atlas*. Alemania: Editorial Médica Panamericana.

- Kopsell DA y Kopsell DE. (2006). Accumulation and bioavailability of dietary carotenoids in vegetable crops. *Trends in Plant Science* 11(10): 499-507.
- King AJ, He W, Cuevas JA, Freudenberger M, Ramiaramananana D y Graham IA. (2009) Potential of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. *Journal of Experimental Botany* 60(10): 2897-2905.
- Lampi A. (2011). Analysis of Tocopherols and Tocotrienols by HPLC. [Imagen]. Recuperado de: <http://lipidlibrary.aocs.org/Analysis/content.cfm?ItemNumber=40389>.
- Leonard JM, Knapp SJ y Slabaugh MB. (1998). A Cuphea β -ketoacyl-ACP synthase shifts the synthesis of fatty acids towards shorter chains in Arabidopsis seeds expressing Cuphea FatB thioesterases. *The Plant Journal* 13(5): 621–628.
- Li Q, Du W y Liu D. (2008) Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 80(5): 749-756.
- Li LY, Wang XL, Gai JY y Yu DY. (2007) Molecular cloning and characterization of a novel microsomal oleate desaturase gene from soybean. *Journal of Plant Physiology* 164(11): 1516–26.
- Lock O. (1997). *Colorantes Naturales*. Perú: Pontificia Universidad Católica del Perú.
- López R e Hinojosa A. (1988). *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. Recuperado el día 07 de octubre de 2013 en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Jatropha%20ocinerea&id=7875>
- Loyola-Vargas VM, García-Almada JL, Cadenas-González MT y Galáz-Ávalos RM. (2012). El potencial de las plantas para suministrar materia prima para la producción de biocombustibles. Recuperado el día 30 de mayo de 2013 en: http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2012_2/Loyola_Biofuels.pdf
- Lozano-Alejo N, Carrillo GV, Pixley K y Palacios-Rojas N. (2007). Physical properties and carotenoid content of maize kernels and its nixtamalized snacks. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 8(3): 385-389.
- Lu C, Fulda M, Wallis JG y Browse J. (2006). A high-throughput screen for genes from castor that boost hydroxy fatty acid accumulation in seed oils of transgenic *Arabidopsis*. *Plant Journal* 45(5): 847 – 856.
- Martínez-Herrera J, Martínez-Ayala AL, Makkar HPS, Francis G y Becker K. (2010). Agroclimatic conditions, chemical and nutritional characterization of different provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. *European Journal of Scientific Research* 39(3):396 – 407.

- Márquez-Valdemar LM, Serrato-Díaz A y Cerritos-Flores R. (2013). Secuenciación de fragmentos de ADN. [En línea]. En: Cornejo-Romero, A., Serrato-Díaz, A., Rendón-Aguilar, B. y Rocha-Munive, M (eds). Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Recuperado el día 15 de octubre de 2015 en: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/secuenciacion.pdf>
- Matos FS, de Oliveria LR, Galvão de Freitas R, Evaristo AB, Missio RF, Oliva Cano MA y Antônio dos Santos Dias L. (2012). Physiological characterization of leaf senescence of *Jatropha curcas* L. populations. *Biomass and Bioenergy* 45(2012): 57–64.
- McKeon TA y Stumpf PK. (1982). Purification and characterization of the stearoyl-acyl carrier protein desaturase and the acyl-acyl carrier protein thioesterase from maturing seeds of safflower. *The Journal of Biological Chemistry* 257(20): 12141–12147.
- McVaugh R. (1945). The genus *Jatropha* in America. Principal infrageneric groups. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 72(3): 271 – 294.
- Meléndez-Martínez AJ, Vicario-Romero I y Mira H. (2004). Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 54(2): 209-215.
- Morales M. (2012). *Grasas y Aceites Alimentarios*. España: Ediciones Diaz de Santos.
- O’Neil MJ, Smith A, Heckelman PE, Obenchain, JR, Gallipeau, JAE, Darecca, MA y Budavari, S. (2006). *The Merck Index*. New Jersey: Merck & Co.
- Onemli F. (2012). Impact of climate change on oil fatty acid composition of peanut (*Arachis hypogaea* L.) in three market classes. *Chilean Journal of Agricultural Research* 72(4): 483 – 488.
- Oskoueian E, Abdullah N, Ahmad S, Saad WZ, Omar AR y Ho YW. (2011). Bioactive Compounds and Biological Activities of *Jatropha curcas* L. Kernel Meal Extract. *International Journal of Molecular Sciences* 12(9): 5955–5970.
- Ouwens KD, Francis G, Franken YJ, Rijssenbeek W, Riedacker A, Foidl N, Jongschaap R y Bindraban P. (2007). Position Paper on *Jatropha curcas* State of the Art, Small and Large Scale Project Development. Fact Foundation. Recuperado en: <http://betuco.be/agroforestry/Jatropha%20-%20Paper%20on%20Jatropha%20and%20Large%20Scale%20Project%20Development.pdf>
- Ovando-Medina I, Adriano-Anaya L, Vázquez-Ovando A, Ruiz-González S, Rincón-Rabanales M y Salvador-Figueroa M. (2013). Genetic Diversity of *Jatropha curcas* in Southern Mexico. En Bahadur B et al. (Eds), *Jatropha, Challenges for a New Energy Crop* (pp.219 – 250). Nueva York: Springer Science+Business Media.
- Panduro A. (2012). *Biología molecular en la clínica*. México: McGraw Hill. pp. 12 – 13.

- Perea X. (2013). Análisis de compuestos fenólicos y valoración de la bioactividad de extractos de testa de *Jatropha curcas* L. no tóxica. (Tesis Maestría). Instituto Politécnico Nacional, Guasave, Mexico. Recuperado en: <http://itzamna.bnct.ipn.mx:8080/dspace/bitstream/123456789/13161/1/Xiomara%20Patricia%20Perea%20Dom%C3%ADnguez.pdf>
- Perry RP y Kelley D. (1972). The Production of Ribosomal RNA from High Molecular Weight Precursors". *Journal of Molecular Biology* 70(2): 265-279.
- Pompelli MF, Barata-Luís R, Vitorino HS, Gonçalves ER, Rolim EV, Santos MG y Endres L. (2010). Photosynthesis, photoprotection and antioxidant activity of purging nut under drought deficit and recovery. *Biomass and Bioenergy* 34(8): 1207–1215.
- Qu J, Mao HZ, Chen W, Gao, SQ, Bai YN, Sun YW, Geng Y y Ye J. (2012). Development of marker-free transgenic *Jatropha* plants with increased levels of seed oleic acid. *Biotechnology for Biofuels* 5(1):10.
- Reddy MP, Sudheer PD, Mastan SG, Rahman H, Carels N y Bahadur B. (2013). Karyology and Genomics of *Jatropha*: Current status and future prospects. En Bahadur B, Sujatha M y Carels N. (Eds.), *Jatropha, Challenges for a New Energy Crop* (pp.301–320). Nueva York: Springer Science+Business Media.
- Reddy M y Pamidimarri D. (2010). Biology and Biotechnological Advances in *Jatropha curcas* – a Biodiesel Plant. En Ramawat KG (Eds), *Desert Plants* (pp. 57 – 71). India: Springer.
- Revest P y Longstaff A. (1998). *Molecular Neuroscience*. New York: Springer.
- Rigon JPG, Capuani S, de Brito Neto JF y Beltrao NEDM. (2013). Indirect measurement of photosynthetic pigments in the leaves of *Jatropha curcas*. *Semina: Ciências Agrárias* 34(2): 669–674.
- Roca P, Oliver J y Rodríguez AM. (2004). *Bioquímica. Técnicas y Métodos*. España: Editorial Hélice. pp. 327.
- Rodrigues J, Miranda I, Gominho J, Vasconcelos M, Barradas G, Pereira H, Bianchi-de-Aguilar F y Ferreira-Dias S. (2013). Variability in oil content and composition and storage stability of seeds from *Jatropha curcas* L. grown in Mozambique. *Industrial Crops and Products* 50: 828 - 837.
- Rodríguez-Acosta, M, Vega-Flores K, De Gante-Cabrera V y Jiménez-Ramírez J. (2009). Distribución del género *Jatropha* L. (*Euphorbiaceae*) en el estado de Puebla, México. *Polibotánica* 28: 37 – 48.
- Rodríguez-Amaya DB. (1999). Carotenoides y Preparación de alimentos: La retención de carotenoides Provitamin A en Alimentos preparados, procesados y almacenados. Agencia para el Desarrollo Internacional de los Estados Unidos.

- Rojas D. (2013). Fundamentos de técnicas blotting: Southern, Northern, Western. [En línea]. [Fecha de consulta: 10 de noviembre de 2015]. Disponible en: <http://es.slideshare.net/CarolinaHerrera151/fundamentos-de-technicas-blotting-southern-northern-western>
- Ross MH y Pawlina W. (2008). Histología: Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. pp.12.
- Rucoba-García A, Munguía-Gil A y Sarmiento-Franco F. (2013). Entre la *Jatropha* y la pobreza: reflexiones sobre la producción de agrocombustibles en tierras de temporal en Yucatán. *Estudios Sociales (Hermosillo, Son.)* 21(41): 115-142.
- SAGARPA. (2012). Información Técnica de Semilla de *Jatropha curcas* Mexicana para Exportación. [En línea]. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=23492&IdUrl=47165>
- Sánchez A, Flores-Cotera LB, Langley E, Martin R, Maldonado G y Sánchez S. (1999). Carotenoides: estructuras, biosíntesis, regulación y aplicaciones. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 41(3): 175-91.
- Sayago-Gómez A, Marín-Beltrán M, Aparicio-López R y Morales-Millán MTA. (2007). Vitamina E y aceites vegetales. *Grasas y Aceites*, 58(1): 74 – 86.
- Schmidt S y Pokorny J. (2005). Potential application of oilseeds as sources of antioxidants for food lipids- a review. *Czech Journal of Food Sciences* 23(3): 93-102.
- SENASICA. (2012). Información técnica de semilla de *Jatropha curcas* Mexicana para exportación. [En línea]. Fecha de consulta: 22 de febrero de 2014. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=23492&IdUrl=47165>
- Sengo I, Gominho J, d'Orey L, Martins M, d'Almeida-Duarte E, Pereira H y Ferreira-Dias S. (2010). Response surface modeling and optimization of biodiesel production from *Cynara cardunculus* oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112(3): 310–320.
- Shah FH, Rashid O y San CT. (2000). Temporal regulation of two isoforms of cDNA clones encoding delta 9-stearoyl-ACP desaturase from oil palm (*Elaeis guineensis*). *Plant Science* 152(1): 27–33.
- Shen Y, Hu Y, Huang K, Yin SA, Chen B y Yao S. (2009). Solid-phase extraction of carotenoids. *Journal of Chromatography A* 1216(30): 5763-5768.
- Shendure J y Ji H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* 26(10): 1135-1145.

- Sokol RJ. (1995). Metabolism and disorders of vitamin E in infancy and childhood. *International seminars in Paediatric Gastroenterology and Nutrition* 4:8-15.
- Sosa-Segura MP, Oomah BD, Drover JCG, Heredia JB, Osuna-Enciso T, Váldez-Torres JB y Angulo-Escalante MA. (2014). Physical and Chemical Characterization of Three Non-Toxic Oilseeds from the *Jatropha* Genus. *Journal of Food and Nutrition Research* 2(1): 56–61.
- Soto-León S, López-Camacho E, Milán-Carrillo J, Sánchez-Castillo MA, Cuevas-Rodríguez E, Picos-Corrales LA y Contreras-Andrade I. (2014). *Jatropha cinerea* seed oil as potential non-conventional feedstock for biodiesel produced by an ultrasonic process. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13(3):739-747.
- Stansfield W. (1992). *Genética*. México: Mc Graw Hill.
- Steinmann VW. (2002). Diversidad y endemismo de la familia *Euphorbiaceae* en México. *Acta Botánica Mexicana* 61:61–93.
- Southwest Environmental Information Network, SEINet. 2015. Fecha de consulta: 06 de noviembre. Disponible en: <http://swbiodiversity.org/seinet/index.php>.
- Sun QB, Li L, Li Y, Wu GJ y Ge XJ. (2008). SSR and AFLP markers reveal low genetic diversity in the biofuel plant *Jatropha curcas* in China. *Crop Science* 48(5):1865–1871.
- Szydłowska-Czerniak A, Trokowski K, Karlovits G y Sztyk E. (2011). Effect of refining processes on antioxidant capacity, total contents of phenolics and carotenoids in palm oils. *Food Chemistry* 129(3): 1187-1192.
- Tamay de Dios L, Ibarra C y Velasquillo C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad* 2(2): 70 – 78.
- Tapia-García M, García-Abad MC, Carranza-Edwards A y Vazquez-Gutierrez F. (2007). Environmental characterization of the continental shelf of the Gulf of Tehuantepec, Mexico. *Geofísica Internacional* 46(4): 249–260.
- Tarandjiska RB, Marekov IN, Niklilova-Damyanova BM y Amidzhin BS. (1996). Determination of triacylglycerol classes and molecular species in seed oils with high content of linoleic and linolenic acids. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 72(4): 403-410.
- Tewari D. (2007). *Jatropha* and biodiesel. Primera Edición. New Delhi: Ocean Books Ltd pp. 1–228.
- Thompson GA, Scherer DE, Foxall-Van Aken S, Kenny JW, Young HL, Shintani DK, Kridl JC y Knauf VC. (1991). Primary structures of the precursor and mature forms of stearyl

- acyl carrier protein desaturase from safflower embryos and requirement ferredoxin for enzyme activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(6): 2578 – 2582.
- Turhan H, Citak N, Pehlivanoglu H y Mengul Z. (2010). Effects of ecological and topographic conditions on oil content and fatty acid composition in sunflower. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 16(5): 553–558.
- Turner RM, Bowers JE y Burguess TL. (2005). *Sonoran Desert Plants: An Ecological Atlas*. United States of America: The University of Arizona Press.
- Updike AA y Shwartz SJ. (2003). Thermal processing of vegetables increases cis isomers of lutein and zaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(21): 6184 – 6190.
- Valenzuela A. (2014). Expresión y Polimorfismo del gen Hsp70 del Ostión del Pacífico (*Crassostrea gigas*) como una Medida del Estrés Estacional en Condiciones de Cultivo. (Tesis Maestría). Universidad de Sonora, Hermosillo, Mexico.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A y Speleman F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3(7): 1-12.
- Velioglu YS, Mazza G, Gao L y Oomah BD. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(10): 4113-4117.
- Verrastro F y Ladislaw S. (2007). Providing energy security in an interdependent world. *Washington Quarterly* 30(4): 95–104.
- Waterman PG. y Mole S. (1994). *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Wilcox JN. (1993). Fundamental Principles of In Situ Hybridization. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 41(12): 1725 – 1733.
- Xu R., Wang R y Liu A. (2011). Expression profiles of genes involved in fatty acid and triacylglycerol synthesis in developing seeds of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.). *Biomass and Bioenergy* 35: 1683-1692.
- Ye J, Hong Y, Qu J y Wang C. (2013). Improvement of *J. curcas* Oil by Genetic Transformation. En Bahadur B, Sujatha M y Carels, N (Eds) *Jatropha, Challenges for a New Energy Crop* (pp. 547-562). Nueva York: Springer Science+Business Media.
- Ye J, Qu J, Bui HTN y Chua NH. (2009). Rapid analysis of *Jatropha curcas* gene function by virus-induced gene silencing. *Plant Biotechnology Journal* 7(9): 964 – 976.
- Yilmaz Y y Toledo RT. (2004). Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(2): 255–260.

- Young AJ y Lowe GM. (2001). Antioxidant and Prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 385(1): 20-27.
- Zamarripa-Colmenero A, Ruíz-Cruz PA, Solís-Bonilla JL, Oliveira-de los Santos A y Martínez-Herrera J. (2009). Biocombustibles: perspectivas de producción de biodiesel a partir de *Jatropha curcas L.* en el trópico de México. [Folleto]. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
- Zambiasi RC, Przybylski R, Zambiasi MW y Mendonca CB. (2007). Fatty acid composition of vegetable oils and fats. *B.CEPPA. Curitiba* 25(1): 111 – 120.
- Zeuthen P y Bogh-Sorensen L. (2003). Food preservation techniques. England: Woodhead Publishing Limited. pp. 34.
- Zielinska I y Nowak I. (2014). Fatty acids in vegetable oils and their importance in cosmetic industry. *Chemik* 68(2): 103 – 110.